

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

**INMUNONANOTERAPIA ADOPTIVA PARA EL
TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA
TRIPLE NEGATIVO EN MODELOS
DERIVADOS DE PACIENTES**

CANDIDATO DOCTORAL

Jose Lucas Blaya Cánovas

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Sergio Granados Principal

Dra. Rosario Sánchez Martín

Granada, 27 de Septiembre de 2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: José Lucas Blaya Cánovas
ISBN: 978-84-1195-713-7
URI: <https://hdl.handle.net/10481/102623>

Criterios para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada

Publicación de un artículo científico en una revista relevante en el campo de la tesis doctoral, firmado por el doctorando, que forma parte de los resultados de la tesis.

Blaya-Cánovas JL, Griñán-Lisón C, Blancas I, Marchal JA, Ramírez-Tortosa C, López-Tejada A, Benabdellah K, Cortijo-Gutiérrez M, Cano-Cortés MV, Graván P, Navarro-Marchal SA, Gómez-Morales J, Delgado-Almenta V, Calahorra J, Agudo-Lera M, Sagarzazu A, Rodríguez-González CJ, Gallart-Aragón T, Eich C, Sánchez-Martín RM, Granados-Principal S. **Autologous patient-derived exhausted nano T-cells exploit tumor immune evasion to engage an effective cancer therapy.** Mol Cancer. 2024 May 9;23(1):83. doi: 10.1186/s12943-024-01997-x. PMID: 38730475; PMCID: PMC11084007

Este artículo ha sido publicado en la revista Molecular Cancer con un factor de impacto en el año 2023 de 27.7, ocupando la posición 4 de 313 en la categoría Bioquímica y Biología Molecular. Esta publicación pertenece al decil D1.

Criterios para optar al grado de Doctor con Mención Internacional por la Universidad de Granada

Estancia doctoral en un centro de investigación extranjero del 3 de marzo al 3 de Junio de 2023: Estancia en Leiden University Medical Center , Leiden, Países Bajos. En el laboratorio de la Dra. Christina Eich del departamento de Radiología, bajo su supervisión.

La tesis doctoral ha sido escrita en español y será defendida en español. Adicionalmente y siguiendo los requerimientos de la Universidad de Granada, parte de la tesis doctoral ha sido escrita en inglés (Resumen, objetivos y conclusiones), así como las conclusiones serán leídas en inglés durante la defensa.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	5
ABREVIATURAS	9
1.INTRODUCCIÓN	13
1.1 Cáncer de mama	13
1.1.1 Clasificación histológica	16
1.1.2 Clasificación molecular.....	17
1.2 Cáncer de mama triple negativo	19
1.3 Señalización de TGF β en cáncer de mama triple negativo	23
1.3.1 Transición epitelio-mesénquima, células madre cancerígenas y quimiorresistencia	26
1.4 Nanomedicina	30
1.4.1 Ácido poliláctico-co-glicólico.....	32
1.4.2 Funcionalización de nanopartículas	34
1.4.3 Nanopartículas biomiméticas	35
1.5 Evasión inmune	40
2.HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN.....	45
3.OBJETIVOS	47
3.OBJECTIVES	49
4.RESULTADOS	51
4.1 Objetivo 1. Evaluación de terapia anti-ATF4 en combinación con DOC sobre la señalización de TGF β y su efecto sobre transición epitelio mesénquima, células madre cancerígenas y quimiorresistencia.	51
4.1.1 Estudio de la señalización de TGF β bajo el tratamiento con DOC y la inhibición de ATF4	51

4.1.2 Evaluación de ISRIB sobre la señalización de TGFβ y la transición epitelio-mesénquima inducida por TGFβ y DOC..	54
4.1.3 Desarrollo y caracterización de una línea celular de cáncer de mama triple negativo resistente a DOC.....	57
4.1.4 Evaluación de las poblaciones de células madre cancerígenas en SUM159-R50	61
4.1.5 Evaluación de la quimiorresistencia y las poblaciones de células madre cancerígenas en SUM159-R50 bajo el tratamiento con ISRIB	65
4.2 Objetivo 2. Desarrollo de nanopartículas biomiméticas recubiertas con células T agotadas y su evaluación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	69
4.2.1 Síntesis, optimización y caracterización de las nanopartículas de PLGA y nanopartículas biomiméticas.	69
4.2.2 Aumento, preservación y orientación de los receptores de puntos de control inmunitarios en la superficie de NExT	77
4.2.3 Especificidad de NExT en células TNBC con expresión de PDL1	80
4.2.4 Encapsulación de fármacos y evaluación de la liberación y eficacia terapéutica <i>in vitro</i> de NExT	87
4.2.5 Evaluación de la toxicidad y perfil de biodistribución de NExT <i>in vivo</i>	91
4.2.6 Actividad terapéutica <i>in vivo</i> de NExT en un modelo PDL1+ PDX de TNBC	96
4.3 Objetivo 3. Encapsulación de terapia anti-ATF4 en nanopartículas biomiméticas y su evaluación en líneas celulares y organoides derivados de pacientes	103
4.3.1 Evaluación de la expresión de PDL1 bajo el tratamiento con DOC e ISRIB encapsulados en NExT.	103
4.3.2 Evaluación de la expresión de la apoptosis y viabilidad bajo el tratamiento con DOC e ISRIB encapsulados en NExT.	107
5.DISCUSIÓN	113

6. CONCLUSIONES	135
6. CONCLUSIONS.....	137
7.MATERIALES Y MÉTODOS	139
7.1 Pacientes	139
7.2 Cultivos celulares.....	139
7.2.1 Líneas celulares de cáncer de mama	139
7.2.2 Líneas celulares de leucemia.....	139
7.2.3 Cultivos primarios de PBMC enriquecidos en células T.....	140
7.3 Síntesis de nanopartículas de PLGA y NExT	141
7.3.1 Síntesis de nanopartículas PLGA vacías y cargadas con cumarina, IR780, DOX, y EPI.....	141
7.3.2 Síntesis de nanopartículas de PLGA con DOC e ISRIB	141
7.3.3 Aislamiento de membranas	142
7.3.4 Recubrimiento de NExT	143
7.4 Caracterización de nanopartículas de PLGA y NExT	144
7.4.1 Dispersión dinámica de luz	144
7.4.2 Microscopía electrónica de transmisión.....	144
7.5 Citometría de flujo.....	145
7.5.1 Evaluación de poblaciones de linfocitos en cultivos de PBMC	145
7.5.2 Optimización del recubrimiento de NExT	145
7.5.3 Inducción aguda de células T agotadas in vitro	145
7.5.4 Preservación y orientación de las proteínas de membrana en NExT.....	146
7.5.5 Evaluación de los niveles de PDL1	146
7.5.6 Evaluación de la administración dirigida de NExT.....	147
7.5.7 Evaluación de la población ALDH1+	148

7.5.8 Evaluación de la población lateral (side population)	149
7.5.9 Evaluación de la apoptosis	150
7.6 Western blot	150
7.6.1 Recubrimiento y purificación de las membranas de NExT	151
7.6.2 Evaluación del bloqueo de la señalización con TGFβ y de la EMT inducido por TGFβ1	152
7.6.3 Evaluación del bloqueo de la señalización con TGFβ y de la EMT inducidos por DOC	152
7.6.4 Evaluación de marcadores de CSC en la línea parental y la línea resistente y el efecto de ISRIB	153
7.7 Viabilidad	153
7.7.1 Evaluación de la toxicidad de las nanopartículas de PLGA y NExT in vitro	153
7.7.2 Evaluación de la eficacia terapéutica de las nanopartículas de PLGA y NExT in vitro	154
7.7.3 Evaluación de la quimiorresistencia	154
7.7.4 Evaluación de ISRIB sobre la quimiorresistencia	154
7.8 Evaluación de nanopartículas cargadas con fármacos	155
7.8.1 Evaluación de la eficiencia de encapsulación	155
7.8.2 Evaluación de la liberación	155
7.9 Estudios en animales	156
7.9.1 Seguridad in vivo de NExT	156
7.9.2 Acumulación intratumoral y biodistribución de NExT	157
7.9.3 Actividad terapéutica in vivo de NExT en un modelo PDX de TNBC	158
7.9.4 Inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, y FISH	159

7.9.5 Evaluación del efecto de DOC y la inhibición de ATF4 sobre la señalización de TGF β in vivo	161
7.9.6 Cultivo primario de PDxO	162
7.10 Evaluación de la señalización de TGF β	163
7.10.1 ELISA	163
7.10.2 Ensayo de reportero.....	163
7.11 Generación de resistencia en línea de TNBC	164
7.12 Evaluación de la expresión génica en SUM159-R50	164
7.12.1 Análisis transcriptómico del resistoma celular.....	165
7.13 Evaluación de la capacidad de autorrenovación	170
7.13.1 Eficiencia de formación de mamosferas	170
7.13.2 Formación de colonias	171
7.14 Análisis estadístico.....	171
REFERENCIAS.....	173

RESUMEN

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) es el subtipo más agresivo, con mayor capacidad metastásica y para el que las terapias específicas son limitadas. Éste se caracteriza, entre otras, por la desregulación en la señalización del Factor de Crecimiento Transformante β (TGF β). Esta alteración en la señalización de TGF β es factor inductor de la transición epitelio-mesénquima (EMT) y el aumento de las células madre del cáncer (CSC), que confieren mayor agresividad y quimiorresistencia. Esta Tesis Doctoral se basa en los resultados previos de la línea de investigación que ha demostrado que TGF β induce al Factor de Transcripción de Activación 4 (ATF4), que actúa promoviendo la agresividad del TNBC a través de la modulación de las CSC, EMT, actividad metastásica y proliferativa de las células tumorales. En base a estos resultados quedó demostrado que la inhibición génica de ATF4 actúa bloqueando la señalización de TGF β a través de un mecanismo de retroalimentación. Igualmente, se observó que el silenciamiento de ATF4 reducía el crecimiento tumoral de modelos xenógrafos derivados de pacientes con TNBC en ratones, con respecto a la monoterapia con el taxano docetaxel (DOC), y un incremento en la supervivencia de los animales. Así pues, esta Tesis Doctoral establece como punto de partida que la inhibición de ATF4 podría considerarse como una alternativa terapéutica cuyos beneficios derivarían de la reducción en la señalización de TGF β .

Dada la íntima relación entre TGF β y la adquisición de resistencia a la quimioterapia como antraciclinas y taxanos, y puesto que hemos demostrado como la inhibición de ATF4 bloquea la señalización de TGF β , consideramos que una terapia anti ATF4 basada en el fármaco ISRIB podría reducir la

aparición de tumores resistentes a las terapias convencionales. Los resultados obtenidos demuestran que el incremento de la señalización de TGF β promovido por la terapia con DOC se ve altamente reducida por la inhibición de ATF4, tanto génica como farmacológica con ISRIB. Además, se observa que el tratamiento combinado de DOC con ISRIB reduce la EMT y bloquea las vías canónica y no canónica de TGF β , mecanismos relacionados con la adquisición de resistencia a la terapia por las células tumorales.

Por ello, a continuación, nos preguntamos si la inhibición farmacológica de ATF4 podría ser una estrategia efectiva para reducir la resistencia adquirida a la quimioterapia en cáncer de mama triple negativo. Para llevar a cabo este estudio, se generó una línea celular resistente a DOC, SUM159-R50, y estudiamos la relación entre la quimiorresistencia y la población de CSC, así como el efecto de ISRIB sobre ella. Nuestros resultados mostraron que la línea se encontraba enriquecida en genes de resistencia y relacionados con la supervivencia celular, así como en diversas poblaciones de CSC, y que el tratamiento con ISRIB resensibiliza la línea celular SUM159-R50 a la quimioterapia y reduce dichas poblaciones.

Uno de los principales problemas asociados a la quimioterapia es la aparición de efectos adversos en los pacientes consecuencia de la falta de selectividad de estos fármacos por el tejido tumoral, su toxicidad, baja tasa de biodistribución y, por tanto, su eficacia limitada. Es por ello que en esta tesis hemos planteado una alternativa con el fin de dirigir de forma activa la administración de la terapia anti ATF4 estudiada. Para ello hemos desarrollado nanopartículas (NP) modificadas en su superficie (o funcionalizadas), que permiten una acumulación intratumoral más precisa y elevada, mejorando así

la administración, perfil terapéutico, y la eficacia de fármacos en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, la funcionalización de la superficie de forma sintética implica procedimientos complejos que aumentan los costos y los tiempos, presentando desafíos para la implementación clínica. Para evitar estos inconvenientes, hemos llevado a cabo la funcionalización “natural” a través del desarrollo de nanopartículas biomiméticas (BNP), que han surgido como plataformas únicas de administración de fármacos que superan las limitaciones de las NP dirigidas activamente. No obstante, las BNP recubiertas con células no modificadas muestran funcionalidades reducidas, como la administración específica al tumor, disminuyendo la eficacia terapéutica. Estos desafíos pueden superarse mediante la ingeniería de células no derivadas de pacientes para el recubrimiento de BNP, pero estos enfoques son complejos y costosos, dificultando su aplicación clínica más amplia.

En respuesta a estos desafíos, hemos desarrollado una estrategia innovadora que aprovecha el agotamiento de las células T y la evasión inmune del tumor para mejorar la administración de nanoterapéuticos a los tumores. Nuestra perspectiva única ha dado lugar a una nueva y revolucionaria clase de BNP elaboradas a partir de células T agotadas (NExT) procedentes de pacientes con cáncer de mama triple negativo (TNBC) mediante métodos de cultivo específicos sin necesidad de ingeniería sofisticada. Las NExT se generaron recubriendo NP de ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) con células T derivadas de TNBC agotadas *in vitro* mediante un protocolo de activación aguda.

Nuestros resultados muestran que las NExT, dotadas naturalmente con receptores de puntos de control inmunitario (IC) (PD1, LAG3, TIM3),

aumentan la administración específica al tumor al involucrar sus respectivos ligandos específicos, mejorando la eficacia terapéutica de la quimioterapia y alterando el eje PD1/PDL1 de manera similar a como lo hace la inmunoterapia (IT) basada en inhibidores del punto de control inmunitario (*immune checkpoint*). Las NExT derivadas de pacientes autólogos revelaron una acumulación intratumoral excepcional, un índice quimioterapéutico y una eficiencia elevados en un modelo PDL1+ de xenoinjerto derivado de pacientes (PDX) con TNBC. Junto a ello, nuestros resultados demostraron que NExT posee una doble actividad como nanoplataforma terapéutica. Por un lado, distribuye de forma dirigida la carga farmacológica a las células cancerígenas PDL1+, y por otro remodela el microambiente tumoral a través de la reducción de la expresión de PDL1, mimetizando a la IT inhibidora de checkpoint y abriendo la puerta a su uso como quimioinmunoterapia.

Finalmente, debido a la relación observada entre ATF4 y TGF β con la evasión inmune, y dado que el objetivo último de este trabajo es administrar de forma activa una terapia anti ATF4 para el tratamiento dirigido del TNBC, consideramos una estrategia terapéutica prometedora incluir DOC e ISRIB en NExT dirigidas frente a PDL1. Los resultados muestran que la combinación de ambos fármacos dentro de las NP conduce a niveles reducidos de PDL1, proliferación reducida e inducción de apoptosis.

En conclusión, nuestros resultados destacan el desarrollo de NExT como una plataforma innovadora y rentable para la administración de quimioterapia en TNBC, y subrayan el potencial de la inhibición de ATF4 como una estrategia prometedora para superar la quimiorresistencia, EMT, CSC y la evasión inmune.

ABSTRACT

Triple-negative breast cancer (TNBC) is the most aggressive subtype, with greater metastatic capacity and for which specific therapies are limited. It is characterized, among other things, by dysregulation in Transforming Growth Factor β (TGF β) signaling. This alteration in TGF β signaling is an inducing factor of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the increase of cancer stem cells (CSC), which confer greater aggressiveness and chemoresistance. This Doctoral Thesis is based on previous results of the research that have demonstrated that TGF β induces Activating Transcription Factor 4 (ATF4), which acts to promote TNBC aggressiveness through modulation of CSCs, EMT, metastatic activity and tumor cell proliferation. In those works it was demonstrated that genetic inhibition of ATF4 acts by blocking TGF β signaling through a feedback mechanism. Likewise, it was observed that ATF4 silencing reduced tumor growth in patient-derived xenograft models of TNBC in mice, compared to monotherapy with the taxane docetaxel (DOC), and an increase in animal survival. Thus, this Doctoral Thesis establishes as a starting point that ATF4 inhibition could be considered as a therapeutic alternative whose benefits would derive from the reduction in TGF β signaling.

Given the intimate relationship between TGF β and the acquisition of resistance to chemotherapy such as anthracyclines and taxanes, and since we have demonstrated how ATF4 inhibition blocks TGF β signaling, we consider that an anti-ATF4 therapy based on the drug ISRIB could reduce the appearance of tumors resistant to conventional therapies. Results show that the increase in TGF β signaling promoted by DOC therapy is highly reduced by ATF4 inhibition, both genetic and pharmacological with ISRIB. In addition, it was

observed that the combined treatment of DOC with ISRIB reduces EMT and blocks the canonical and non-canonical TGF β pathways, mechanisms related to the acquisition of resistance to therapy by tumor cells.

Therefore, we next asked whether pharmacological inhibition of ATF4 could be an effective strategy to reduce acquired resistance to chemotherapy in triple-negative breast cancer. To carry out this study, a DOC-resistant cell line was generated, SUM159-R50, and studied the relationship between chemoresistance and the CSC population, as well as the effect of ISRIB on it. Our results showed that the line was enriched in resistance genes and those related to cell survival, as well as in various CSC populations, and that treatment with ISRIB resensitizes the SUM159-R50 cell line to chemotherapy and reduces these populations.

One of the main problems associated with chemotherapy is the appearance of adverse effects in patients as a consequence of the lack of selectivity of these drugs for tumor tissue, their toxicity, low bioavailability rate and, therefore, their limited efficacy. That is why in this thesis we have proposed an alternative in order to actively direct the administration of the studied anti-ATF4 therapy. For this we have developed nanoparticles (NP) modified on their surface (or functionalized), which allow a more precise and elevated intratumoral accumulation, thus improving the administration, therapeutic profile, and efficacy of drugs in cancer treatment. However, synthetic surface functionalization involves complex procedures that increase costs and times, presenting challenges for clinical implementation. To avoid these drawbacks, we have carried out "natural" functionalization through development of biomimetic nanoparticles (BNP), which have emerged as

unique drug delivery platforms that overcome the limitations of actively targeted NP. However, BNP coated with unmodified cells show reduced functionalities, such as tumor-specific delivery, decreasing therapeutic efficacy. These challenges can be overcome by engineering non-patient-derived cells for BNP coating, but these approaches are complex and costly, hindering their wider clinical application.

In response to these challenges, we have developed an innovative strategy that leverages T cell exhaustion and tumor immune evasion to enhance delivery of nanotherapeutics to tumors. Our unique perspective has given rise to a new and revolutionary class of BNP made from exhausted T cells (NExT) from triple-negative breast cancer (TNBC) patients using specific culture methods without the need for sophisticated engineering. NExT were generated by coating poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) NP with TNBC-derived T cells exhausted *in vitro* using an acute activation protocol.

Our results show that NExT, naturally endowed with immune checkpoint (IC) receptors (PD1, LAG3, TIM3), enhance tumor-specific delivery by engaging their respective specific ligands, improving the therapeutic efficacy of chemotherapy and altering the PD1/PDL1 axis in a similar way to immune checkpoint inhibitor-based immunotherapy (IT). NExT derived from autologous patients revealed exceptional intratumoral accumulation, high chemotherapeutic index and efficiency in a PDL1+ patient-derived xenograft (PDX) model of TNBC. Along with this, our results demonstrated that NExT possesses dual activity as a therapeutic nanoplatform. On the one hand, it directly distributes the pharmacological load to PDL1+ cancer cells, and on the other hand, it remodels the tumor microenvironment through the reduction

of PDL1 expression, mimicking checkpoint inhibitor IT and opening the door to its use as chemoimmunotherapy.

Finally, due to the observed relationship between ATF4 and TGF β with immune evasion, and given that the ultimate goal of this work is to actively administer an anti-ATF4 therapy for the targeted treatment of TNBC, we consider a promising therapeutic strategy to include DOC and ISRIB in NExT targeted against PDL1. The results show that the combination of both drugs within the NP leads to reduced PDL1 levels, reduced proliferation and induction of apoptosis.

In conclusion, our results highlight the development of NExT as an innovative and cost-effective platform for chemotherapy delivery in TNBC, and underscore the potential of ATF4 inhibition as a promising strategy to overcome chemoresistance, EMT, CSC and immune evasion.

ABREVIATURAS

ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ALDF	Aldefluor
AR	Receptor de andrógenos
ATF	Factor de activación transcripcional
ATF4	Factor de activación transcripcional 4
BIRC5	Survivina
BL1	Subtipo basal 1
BL2	Subtipo basal 2
BNP	Nanopartículas biomiméticas
CAF	Fibroblastos asociados al cáncer
CAR-T	Células T con receptor de antígeno quimérico
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CDIS	Carcinoma ductal in situ
CLI	Carcinoma lobulillar invasivo
CLIS	Carcinoma lobulillar in situ
CREB	Unión al elemento de respuesta a cAMP
CSC	Células madre cancerígenas
CTC	Células tumorales circulantes
DCM	Diclorometano
DEAB	Dietilaminobenzaldehído
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOC	Docetaxel
DOX	Doxorrubicina
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELS	Dispersión de luz electroforética
EMA	Agencia europea de medicamentos
EMT	Transición epitelio-mesénquima

EPI	Epirrubicina
EPR	Permeabilidad y retención mejorada
ER	Receptor de estrógenos
ExT	Células T agotadas
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de EEUU
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
HCC	Carcinoma hepatocelular
HCC	Carcinoma hepatocelular
HER2	Receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
IC	Control inmunitario
IL-6	Interleucina 6
IM	Subtipo inmunomodulador
ISR	Respuesta integrada al estrés
IT	Inmunoterapia
LAG3	Gen 3 de activación de linfocitos
LAR	Subtipo con receptor de andrógeno luminal
M	Subtipo mesenquimal
MFE	Eficiencia de formación de mamóferas
MFI	Intensidad de fluorescencia media
MSL	Subtipo mesenquimal similar a célula madre
NaT	Células T sin activar
NExT	Nanopartículas recubiertas con células T agotadas
NNaT	Nanopartículas recubiertas con células T sin activar
NP	Nanopartículas
NSG	NOD SCIG Gamma
ORF	Marcos de lectura abiertos
p300 HAT	Acetiltransferasa de histonas p300
PD1	Receptor de muerte celular programada 1
PDL1	Ligando del receptor de muerte programada 1

PDX	Xenoinjerto derivado de paciente
PDxO	Organoide derivado de xenoinjerto derivado de paciente
PEG	Polietilenglicol
PFA	Paraformaldehído
PHD3	Proteína inducible por hipoxia 3
PLGA	Ácido poliláctico-co-glicólico
PR	Receptor de progesterona
SDS	Dodecilsulfato sódico
SP	Población lateral
TBS	Buffer tris salino
TBST	Buffer tris salino con tween
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TGF β	Factor de crecimiento transformante β
TIGIT	Receptor inmunológico de las células T con dominios Ig e ITIM
TIL	Linfocitos infiltrados en tumor
TIM3	Inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3
TLDA	Arrays de Baja Densidad Taqman
TME	Microambiente tumoral
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
TYMS	Timidilato sintasa
α SMA	α actina de músculo liso

1.INTRODUCCIÓN

1.1Cáncer de mama

El cáncer de mama es la segunda neoplasia maligna más frecuente a nivel mundial y la primera entre las mujeres a nivel mundial¹. Según los datos más recientes de GLOBOCAN (**Figura 1**), se estima que en 2022 se diagnosticaron 2.3 millones de nuevos casos de cáncer de mama en todo el mundo, lo que representa aproximadamente el 25% de todos los cánceres diagnosticados en mujeres. En cuanto a la prevalencia, se calcula que en 2022 había más de 8 millones de mujeres vivas diagnosticadas con cáncer de mama en los últimos 5 años a nivel global.

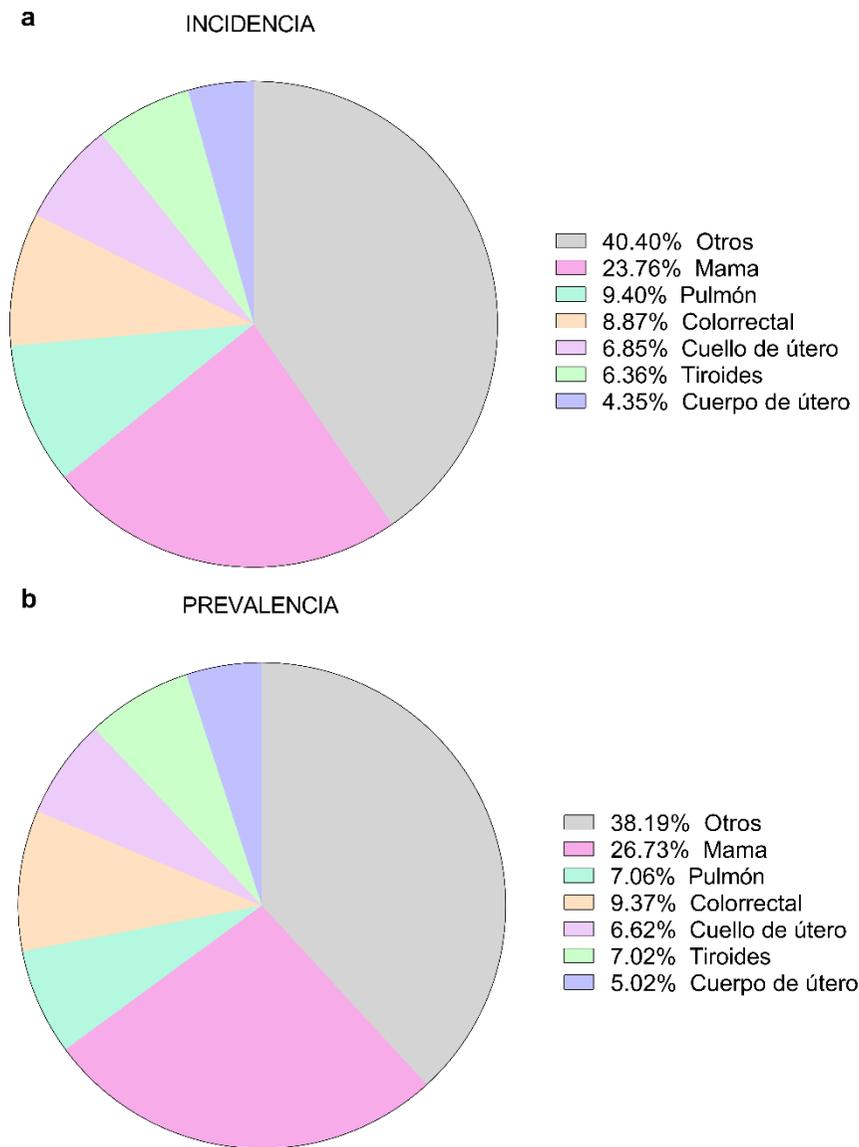


Figura 1. Datos de **a**, incidencia y **b**, prevalencia del cáncer en 2022 a nivel global (GLOBOCAN).

La supervivencia relativa a 5 años para el cáncer de mama varía ampliamente a nivel mundial. En los países desarrollados, la supervivencia a 5

años supera el 80%, mientras que en algunas regiones de Asia y África puede ser entre el 70 y 40%².

A pesar de que la supervivencia ha mejorado notablemente en las últimas décadas gracias a los avances en detección precoz y tratamiento, sigue siendo una de las principales causas de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial³. En 2022 se estima que hubo 666,000 muertes por cáncer de mama en todo el mundo, lo que representa el 15.4% de todas las muertes por cáncer en mujeres (Figura 2).

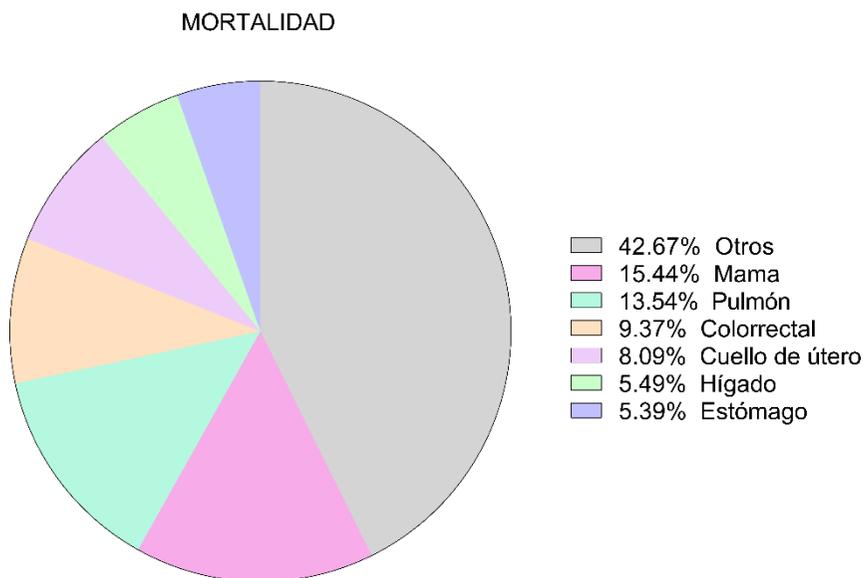


Figura 2. Datos de mortalidad en cáncer en 2022 a nivel global (GLOBOCAN).

Sin embargo, aunque se habla de él como una sola enfermedad, el cáncer de mama es muy diverso y engloba diferentes subtipos muy diferentes que pueden clasificarse en función de criterios moleculares e histológicos.

1.1.1 Clasificación histológica

Existen diferentes tipos, como alveolar, sólido, túbulo-lobular, carcinoma de osteoclastos gigantes, invasivo cribiforme, mucinoso, papilar, etc., pero los más comunes son:

- Carcinoma Ductal Invasivo (CDI):

Es el más común, representando alrededor del 70-80% de todos los casos de cáncer de mama⁴. Histológicamente, se caracteriza por la invasión de las células cancerosas a través de la membrana basal de los conductos mamarios⁵. Puede derivarse de un carcinoma ductal *in situ* (CDIS)⁶.

- Carcinoma Lobulillar Invasivo (CLI):

Representa aproximadamente el 10% de los casos de cáncer de mama⁴. Se origina en los lóbulos de la glándula mamaria y se caracteriza por la invasión de las células cancerosas en los tejidos circundantes gracias a la desregulación de la adhesión célula-célula por la pérdida de E-cadherina⁷. Puede derivarse de un carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS)⁵.

1.1.2 Clasificación molecular.

En función de la expresión de receptores moleculares (**Figura 3**), el cáncer de mama puede clasificarse en:

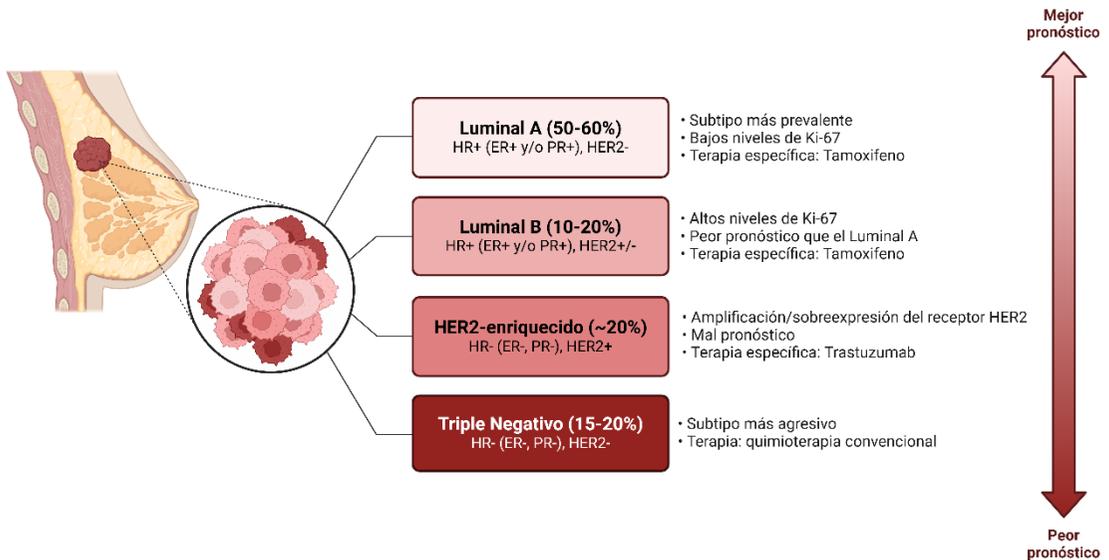


Figura 3. Resumen de la clasificación molecular del cáncer de mama (Figura creada con BioRender).

- Luminal A:

Se caracteriza por una alta expresión del receptor de estrógenos (ER) y receptor de progesterona (PR), baja expresión del receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) y baja tasa de proliferación, o lo que es lo mismo, bajo índice de Ki67. Es el subtipo más común, representando el 50-60% de los cánceres de mama. Tiene el mejor pronóstico con menor riesgo de recurrencia, la supervivencia global más alta⁸ y responde bien a la terapia endocrina adyuvante con tamoxifeno o inhibidores de aromatasa^{9,10}.

- **Luminal B:**

Representa el 10-20% de los cánceres de mama y también es positivo para ER y PR, pero con mayor expresión de Ki67 y positividad para HER2. Tiene un pronóstico intermedio^{8,11} y requiere terapia endocrina más quimioterapia o terapias dirigidas contra HER2 como trastuzumab^{12,13}.

- **HER2+:**

Representa alrededor del 20% de los cánceres de mama y se caracteriza por la sobreexpresión y/o amplificación de HER2, con baja expresión de ER y PR. Tiene un pronóstico relativamente malo, pero responde bien a las terapias dirigidas contra HER2 como trastuzumab y pertuzumab más quimioterapia convencional¹³⁻¹⁵.

- **Triple negativo / Basal (TNBC):**

Representa el 15-20% de los cánceres de mama y es negativo para ER, PR y HER2 (fenotipo triple negativo). Tiene un comportamiento clínico agresivo y un peor pronóstico en comparación con otros subtipos¹⁶. Además, por la ausencia de estos marcadores, las terapias dirigidas aprobadas son limitadas, por lo que la quimioterapia convencional basada en antraciclinas y taxanos es el tratamiento estándar, al que resultan responder altamente¹⁷.

1.2 Cáncer de mama triple negativo

El TNBC se caracteriza por presentar rasgos clínicos distintivos que denotan su agresividad. Entre ellos, destacan por ser tumores de mayor tamaño al diagnóstico, con dos tercios de los casos superando los 2 cm y una alta tasa de positividad ganglionar, afectando al 54% de los pacientes. Dicha agresividad también se hace patente en los patrones de recurrencia, ya que el TNBC presenta un riesgo significativamente mayor de recurrencia en comparación con otros subtipos de cáncer de mama y exhibe un patrón de recurrencia precoz y agresivo, lo que subraya la importancia de una vigilancia estrecha y estrategias terapéuticas efectivas en esta población de pacientes^{17,18}.

La agresividad biológica del TNBC también está relacionada una alta propensión a la metástasis, diseminándose comúnmente a diferentes órganos. Según varios estudios, los sitios más frecuentes de metástasis en pacientes con TNBC son los pulmones y el hueso, seguido de hígado y cerebro^{19,20}. Además, la supervivencia global de los pacientes con TNBC metastásico es generalmente baja, con una media de supervivencia de solo 13 meses²¹.

Por otro lado, el TNBC representa un desafío clínico debido a su falta de dianas terapéuticas específicas, limitando las opciones de tratamiento y pudiendo influir en la supervivencia de las pacientes. La ausencia de receptores hormonales y HER2 en este subtipo implica que no se pueden utilizar terapias dirigidas a estas dianas terapéuticas, como el tamoxifeno o el trastuzumab, que han demostrado ser efectivas en otros subtipos de cáncer de mama²², siendo la principal estrategia la quimioterapia convencional con taxanos, antraciclinas, ciclofosfamida y agentes alquilantes²³. Los taxanos como el docetaxel (DOC)

y paclitaxel, actúan bloqueando la polimerización de los microtúbulos generando un arresto del ciclo celular y son los fármacos más utilizados en el tratamiento del cáncer de mama metastásico y en aquellos que no pueden seguir el tratamiento con antraciclinas. Por su parte, las antraciclinas como la doxorubicina (DOX) consisten en antibióticos que dañan el ADN de las células cancerosas a través de su intercalación y bloqueando la topoisomerasa II y son las más utilizadas como primera línea de tratamiento, pero su uso se ve limitado por problemas cardiológicos. De forma común, los taxanos y antraciclinas se administran en combinación. Así mismo, existen otros quimioterapéuticos menos utilizados, como la eribulina que también inhibe la dinámica de los microtúbulos, y la capecitabina, un precursor del 5-fluorouracil, el cisplatino y la gemcitabina, que inhiben la síntesis de ADN²⁴.

No obstante, la heterogeneidad del TNBC también ofrece oportunidades para un tratamiento más personalizado: comprender la diversidad molecular y clínica dentro de este subtipo es esencial para desarrollar estrategias terapéuticas más precisas y efectivas²⁵.

En este sentido, se han identificado seis subtipos de TNBC con perfiles únicos de expresión génica, incluyendo dos subtipos basal-like (BL1 y BL2), uno inmunomodulador (IM), uno mesenquimal (M), uno mesenquimal similar a célula madre (MSL) y uno luminal con expresión del receptor de andrógeno (LAR). Los subtipos BL1 y BL2 mostraron una mayor expresión de genes relacionados con el ciclo celular y la respuesta al daño en el ADN, respondiendo preferentemente al cisplatino. En contraste, los subtipos M y MSL presentaron un enriquecimiento en genes asociados con la transición epitelio-mesénquima (EMT) y vías de factores de crecimiento como TGF β , respondiendo a

tratamientos con NVP-BEZ235 y dasatinib. Por su parte, el subtipo IM, presenta enriquecimiento en genes de señalización de células inmune intrínseca, al margen de las células inmunes infiltradas. Finalmente, el subtipo LAR se caracterizó por la señalización del receptor de andrógenos (AR) y se asoció con una menor supervivencia libre de recaída, siendo sensible a la bicalutamida, un antagonista de AR¹⁶.

Además de estos subtipos encontramos otras alteraciones muy presentes en TNBC. Por ejemplo, *TP53* es el gen más comúnmente mutado, siendo codificador de la proteína p53 que regula el ciclo celular y la apoptosis. También son muy comunes los defectos en la recombinación homóloga, principalmente por mutaciones en *BRCA1* pero también *BRCA2*, *ATM*, *RAD51*, *CHK2* o *PALB2*. De hecho, se ha visto que las alteraciones germinales de *BRCA1* desembocan en TNBC más que en otros subtipos de cáncer de mama. Así mismo, encontramos mutaciones de pérdida de función en *PTEN* y de ganancia en *PIK3CA*, *PIK3R1* y *AKT1*, que desembocan en la activación de la ruta de PI3K. Finalmente, también se ha clasificado el TNBC en base a la respuesta inmune generada, encontrando el BL inmunoactivado (BLIA) y el BL inmunosuprimido (BLIS) con peor pronóstico^{23,26}.

Todas estas alteraciones en TNBC complican su estudio, pero permiten el desarrollo de nuevas terapias específicas. Los inhibidores de PARP como el olaparib y talazoparib aprovechan la deficiencia en recombinación homóloga atacando a la capacidad de reparación del ADN, por lo que generan muy buenas respuestas en tumores deficientes en *BRCA1*. También se han aprobado anticuerpos conjugados con quimioterapéuticos como sacitumab govitecan que presenta SN-38 unido a un anticuerpo para TROP-2, una glicoproteína

sobreexpresada en TNBC. Así mismo, inmunoterapia (IT) como el pembrolizumab, un anticuerpo monoclonal que se une a PD1 o atezolizumab que se une a PDL1 han sido aprobados para su uso en TNBC, especialmente en pacientes avanzados PDL1+^{23,26}.

1.3 Señalización de TGF β en cáncer de mama triple negativo

Como hemos visto en la sección anterior, TGF β es una de las alteraciones moleculares comunes en TNBC, especialmente en los subtipos M y MSL. TGF β es una familia de polipéptidos secretados que regulan la embriogénesis y la homeostasis de los tejidos adultos a través de vías de señalización conservadas. Estas vías incluyen la fosforilación de proteínas Smad y la activación de quinasas intracelulares, regulando así la expresión génica y la función proteica²⁷. En el contexto del cáncer, TGF β desempeña un papel dual. Inicialmente, puede actuar como un supresor tumoral, pero en etapas avanzadas, promueve la progresión del tumor. TGF β apoya el crecimiento tumoral, induce angiogénesis y modifica el microambiente tumoral, fomentando la inmunosupresión y la remodelación vascular²⁸.

En TNBC, se le ha asociado con la regulación de procesos como la EMT, la apoptosis y la pluripotencia de las células madre del cáncer (CSC), es decir, con un fenotipo más agresivo (**Figura 4**). Se ha observado que los niveles de mRNA de TGF β 1 y TGF β 2 son más altos en células de TNBC en comparación con células no-TNBC, activando la EMT y generando un aumento en la capacidad migratoria e invasiva de las células²⁹. Además, la exposición a quimioterapia como la epirrubicina (EPI) o el paclitaxel^{30,31}, aumenta la expresión de TGF β y los marcadores de CSC de mama, lo que contribuye a la resistencia a la quimioterapia.

Por otra parte, estudios previos de esta investigación liderada por el Dr. Granados han demostrado que aguas abajo de la señalización TGF β se activa la expresión del factor de transcripción activador 4 (ATF4)³². ATF4 pertenece a

la familia de factores de transcripción activadores (ATF) o proteínas de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB). Estos factores reconocen una secuencia consenso en muchos promotores virales y celulares, controlando la expresión de numerosos genes eucariotas relacionados con diversas funciones fisiológicas, principalmente respondiendo a señales ambientales y controlando la homeostasis^{33,34}.

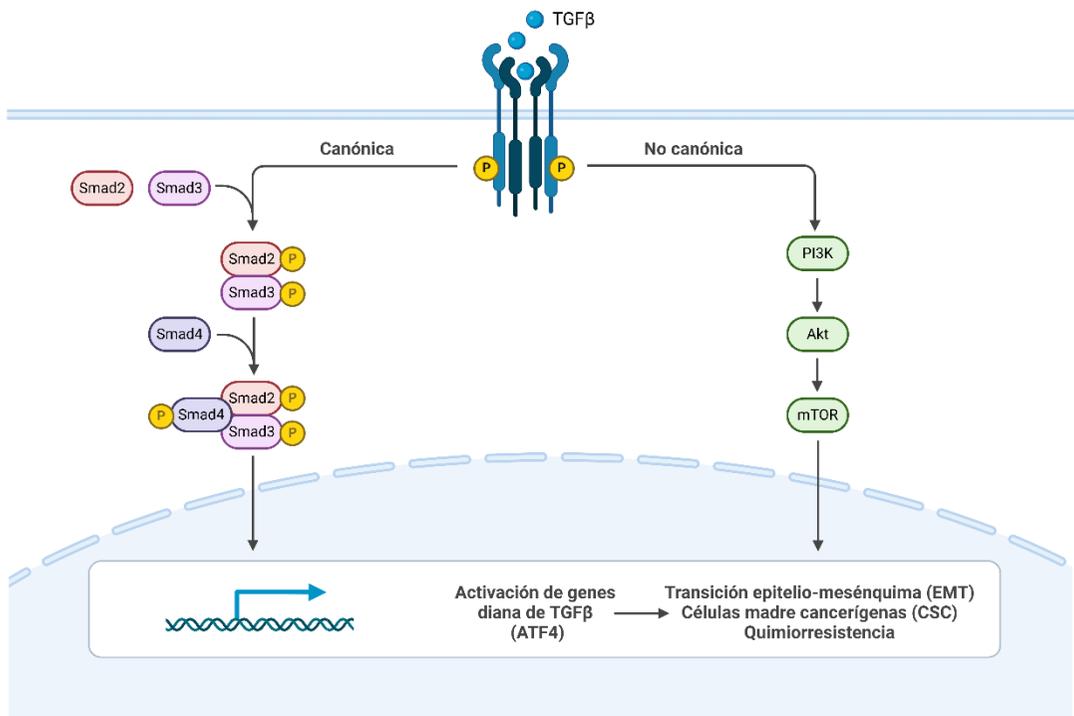


Figura 4. Esquematación de la ruta canónica de TGFβ a través de Smad y la ruta no canónica a través de PI3K/Akt/mTOR (Figura creada con BioRender).

El gen ATF4 se encuentra en el cromosoma 22 y su ARNm tiene tres marcos de lectura abiertos cortos (ORF) en la región 5' UTR, cruciales para el control de su expresión³⁵. ATF4 puede formar dímeros uniéndose a sí mismo o

a otros factores de transcripción como JUN, FOS y FRA-1. Esta dimerización puede cambiar su función de transactivador a represor^{36,37}. Las modificaciones postranscripcionales también afectan su función y estabilidad. β TrCP reconoce ATF4 y promueve su ubiquitinación y degradación proteasomal, mientras que la interacción con la proteína inducible por hipoxia (PHD3) o la acetiltransferasa de histonas p300 (p300 HAT) estabiliza la proteína ATF4³⁸. ATF4 regula procesos como la respuesta antioxidante, la apoptosis (dependiendo del contexto celular), la homeostasis energética y la autofagia^{34,37}.

En el contexto del TNBC, nuestro grupo de investigación ha demostrado que ATF4 se relaciona con una menor supervivencia en una cohorte de 35 pacientes, así como con la adquisición de un fenotipo más agresivo tanto *in vitro* como *in vivo*. De hecho, nuestros estudios demostraron que la inhibición de ATF4 en líneas celulares de TNBC redujo la migración, la invasión, las CSC, la proliferación, y la EMT, así como aumentó la supervivencia y disminuyó la metástasis, el crecimiento tumoral y la recaída en modelos de PDX tras el tratamiento con DOC. Además, a pesar de que ATF4 se ha estudiado principalmente implicado en la respuesta integrada al estrés (ISR), demostramos que su activación tiene lugar de forma independiente a ISR y que ocurre aguas abajo de la ruta canónica de TGF β de Smad2/3 y de la ruta no canónica con mTOR/RAC1-RHOA, generando un bucle de retroalimentación positiva sobre ambas vías, que da lugar a una sobreactivación de la señalización³².

Por tanto, ATF4 se encuentra relacionado también con una de las vías no canónicas de TGF β : PI3K/Akt/mTOR, que es crucial para la regulación de

procesos celulares fundamentales, incluyendo el crecimiento, la proliferación, la supervivencia y el metabolismo celular.

En el contexto del cáncer, la activación aberrante de esta vía contribuye a la oncogénesis y a la resistencia a la terapia³⁹. Concretamente, en TNBC, las alteraciones genéticas y moleculares en componentes de esta ruta son frecuentes y se asocian con un comportamiento tumoral agresivo y resistencia al tratamiento: las mutaciones en el gen *PIK3CA*, que codifica la subunidad catalítica p110 α de PI3K, son alteraciones muy comunes en TNBC. Estas mutaciones conducen a la activación constitutiva de la ruta PI3K/Akt/mTOR, promoviendo la supervivencia y proliferación celular^{40,41}. Por otra parte, la pérdida de función del gen supresor tumoral *PTEN*, un inhibidor de la vía PI3K, es otra alteración relevante en TNBC (30-50% de los casos). La pérdida de PTEN resulta en la activación descontrolada de la vía PI3K/Akt/mTOR⁴². Aunque menos comunes, las mutaciones en Akt o mTOR pueden conducir a una activación de mTOR, promoviendo el crecimiento y la supervivencia del tumor⁴⁰.

1.3.1 Transición epitelio-mesénquima, células madre cancerígenas y quimiorresistencia

La EMT es un proceso biológico mediante el cual las células epiteliales pierden sus características y adquieren propiedades mesenquimales como la pérdida de polaridad y de uniones celulares y la reorganización del citoesqueleto, una mayor producción de matriz extracelular que aumenta su motilidad, y la desdiferenciación, permitiéndoles migrar e invadir otros tejidos, volviendo al tumor mucho más agresivo y maligno⁴³⁻⁴⁶.

TGF β activa factores de transcripción inductores de EMT (como Twist1, Snail, Slug y Zeb1) que suprimen la expresión de moléculas epiteliales (como E-cadherina y TJP1) e inducen características mesenquimales (como N-cadherina, fibronectina y vimentina)⁴³. En estudios con líneas celulares tratadas con EPI (MB-231/EPI), se observó un aumento en la señalización de TGF β que aumentó migración e invasión y resistencia a la droga, asociado con cambios en EMT³⁰.

Por otro lado, la inducción de EMT no solo facilita la diseminación del cáncer, sino que también está vinculada con la generación de CSC al causar un aumento en la expresión de genes relacionados con la pluripotencia^{44,47}. Las CSC son una subpoblación de células dentro de un tumor que poseen la capacidad de iniciar y mantener el crecimiento tumoral. Estas células son intrínsecamente resistentes a la quimioterapia y están asociadas con la recurrencia y la metástasis del cáncer^{48,49}.

Algunos de los marcadores relacionados son las células madre son CD44, CD24, ALDH1, ABCG2, CD133, EpCAM, nestina, gangliósido GD2, CD49f, CD61, CXCR4, CXCL1, HMGCS, CD166 y CD47, siendo los tres primeros los esenciales para su identificación en cáncer de mama⁵⁰.

La señalización de TGF β juega un papel crucial en la regulación de las CSC en TNBC. Estudios han demostrado que la exposición a TGF β puede inducir la EMT y conferir propiedades de CSC a las células tumorales⁵¹. Se ha visto que el ligando TGF β 1 y el receptor de TGF β están sobreexpresados en CSC⁵². Así mismo, el tratamiento con paclitaxel, genera un aumento en la

señalización de TGF β , correlacionado con el aumento de CD44 y *ALDH1A1* y la capacidad de formación de esferas³¹.

Finalmente, la resistencia a la quimioterapia es un desafío significativo en el tratamiento de TNBC. Los mecanismos de resistencia son multifactoriales e incluyen la sobreexpresión de transportadores de eflujo de fármacos, alteraciones en las vías de señalización celular, sobreexpresión de las dianas e inactivación de los compuestos⁵²⁻⁵⁵.

La señalización de TGF β está implicada en varios de estos mecanismos. Por ejemplo, la activación de TGF β puede aumentar la expresión de transportadores de eflujo como ABCG2, que expulsa los agentes quimioterapéuticos fuera de las células, reduciendo su efectividad⁴³.

Además, se ha visto que TGF β induce quimiorresistencia en TNBC a través de EMT, activando la expresión de factores de transcripción como *SNAIL*, que resulta en un fenotipo de CSC con alta capacidad de autorrenovación y resistencia intrínseca a la quimioterapia, por ejemplo, mediante la detoxificación de fármacos gracias a la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH)⁵⁶. También, DCST1-AS1, un ARN largo no codificante, potencia la señalización de TGF β /Smad mediante la interacción con ANXA1, promoviendo la EMT y aumentando la resistencia a fármacos como DOX y paclitaxel en células TNBC⁵⁷.

Así mismo, la sobreexpresión de vimentina ha demostrado un incremento en la resistencia a epirrubicina (EPI), paclitaxel y ciclofosfamida, que se reduce con su inhibición génica, y además, genera una reducción en la

fosforilación de Akt⁵⁸, que también se ha relacionado con quimiorresistencia en TNBC, ya que mutaciones en PI3K dan lugar a la sobreactivación de Akt que desemboca en el desarrollo de quimiorresistencia en MDA-MB-231 y MDA-MB-468⁵⁹. De hecho, varios estudios recientes han demostrado que el bloqueo de la ruta PI3K/Akt/mTOR con diferentes inhibidores como capivasertib, alpelisib, piperina o GBP2 mejora el tratamiento con DOX o paclitaxel en TNBC⁶⁰⁻⁶².

1.4 Nanomedicina

La nanomedicina ha revolucionado el campo de la medicina moderna al ofrecer soluciones innovadoras para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Una de las principales ventajas de la nanotecnología en medicina es su capacidad para mejorar la biodisponibilidad y estabilidad de los fármacos. Los nanomateriales pueden encapsular medicamentos, protegiéndolos de la degradación prematura y permitiendo una liberación controlada y sostenida, lo que mejora la eficacia terapéutica⁶³. Además, la capacidad de los nanomateriales para liberar medicamentos de manera controlada y dirigida permite una mayor precisión en el tratamiento de enfermedades, minimizando el daño a los tejidos sanos⁶⁴. La nanomedicina también ha mejorado significativamente las técnicas de diagnóstico, utilizando nanomateriales como agentes de contraste en diversas modalidades de imagen, lo que mejora la resolución y la especificidad de las imágenes⁶⁵.

Sin embargo, a pesar de estos avances, la nanomedicina enfrenta varios desafíos importantes. Uno de los principales problemas es la evaluación de la seguridad y toxicidad de los nanomateriales. Aunque los materiales biodegradables han mejorado el perfil de seguridad, aún existen preocupaciones sobre su toxicidad a largo plazo y la respuesta inmunológica del cuerpo a estos materiales⁶³. La biodistribución en el cuerpo es otro desafío crítico, ya que es esencial comprender cómo se distribuyen y eliminan para optimizar su diseño y funcionalidad. Además, la producción a gran escala puede ser costosa y técnicamente desafiante, lo que limita su accesibilidad para su uso clínico⁶⁴. Por otra parte, la falta de estándares y políticas regulatorias claras para la

caracterización y el uso de nanomateriales también representa un obstáculo significativo para su aplicación clínica⁶⁵.

La nanomedicina se apoya en el uso de las nanopartículas (NP) que, gracias a su alto ratio área:volumen y su tamaño nanométrico, presentan unas características fisicoquímicas que le permiten traspasar diferentes barreras biológicas, mejorar la biodisponibilidad o la administración dirigida de fármacos o agentes de imagen⁶⁶.

Existen diferentes tipos de NP recogidas en la **Tabla 1** en función del material del que estén hechas como poliméricas, magnéticas, liposomas, micelas, dendrímeros, nanotubos de carbono, *quantum dots*, NP de sílice y NP de óxido metálico^{63,66,67} (**Figura 5**).

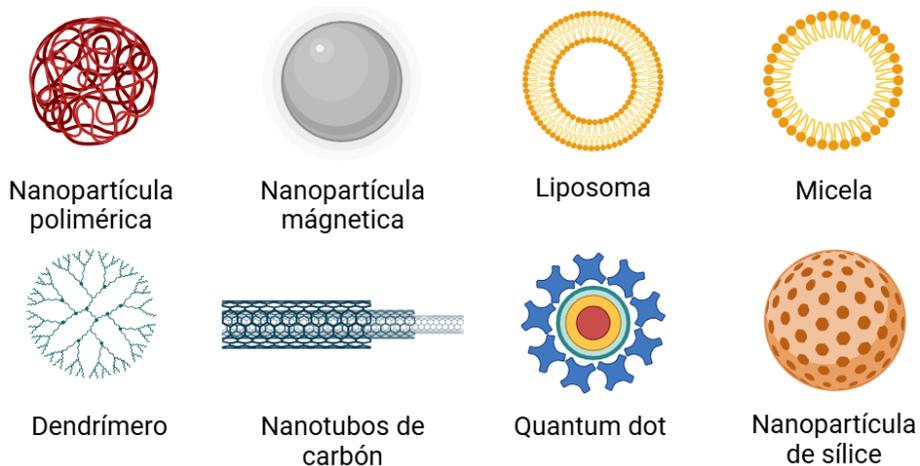


Figura 5. Representación gráfica de NP poliméricas, magnéticas, liposomas, micelas, dendrímeros, nanotubos de carbono, *quantum dots* y de sílice (Figura creada con BioRender).

Tabla 1. Resumen de los tipos de NP y sus aplicaciones según el material.

Tipo de NP	Descripción	Aplicaciones
NP poliméricas	Incluyen polímeros sintéticos como PMMA y PLGA, y naturales como gelatina, quitosano y albúmina ⁶⁷ .	Transporte de medicamentos, biodegradables, menos tóxicos, mejoran la eficiencia del transporte de medicamentos ⁶⁷ .
NP magnéticas	Compuestas principalmente de hierro ⁶⁷ .	Diagnóstico y terapia, agentes de contraste en resonancia magnética (MRI), purificación de materiales biológicos ⁶⁷ .
Liposomas	Vesículas esféricas formadas por una bicapa lipídica ⁶⁶ .	Mejoran la biodisponibilidad de medicamentos, reducen la toxicidad, encapsulan agentes hidrofílicos e hidrofóbicos ⁶³ .
Micelas	Núcleo hidrofóbico y superficie hidrofílica ⁶⁷ .	Transporte de medicamentos hidrofóbicos, mejora de solubilidad ⁶⁷ .
Dendrímeros	Polímeros altamente ramificados ⁶⁶ .	Transporte de medicamentos: alta solubilidad y capacidad de carga ⁶⁶ .
Nanotubos de carbono	Estructuras cilíndricas de grafeno ⁶⁷ .	Portadores de medicamentos, biosensores, alta resistencia mecánica, conductividad térmica ⁶⁷ .
Quantum dots	Nanocristales semiconductores ⁶⁷ .	Eliminación de células cancerosas, imagenología biomédica ⁶⁷ .
NP de sílice	Alta superficie específica, capacidad de funcionalización ^{63,66} .	Administración de medicamentos, aplicaciones de imagenología, mejora de biocompatibilidad y eficiencia de carga de medicamentos ^{63,66} .

1.4.1 Ácido poliláctico-co-glicólico

El ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) es un copolímero sintético ampliamente utilizado en la nanotecnología debido a sus propiedades biocompatibles y biodegradables. Este material ha sido aprobado por la

Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para aplicaciones médicas, lo que subraya su seguridad y eficacia en el cuerpo humano^{68,69}.

El PLGA se degrada en ácido láctico y ácido glicólico, ambos metabolitos no tóxicos que son eliminados del cuerpo a través de rutas metabólicas naturales, como el ciclo de Krebs y la excreción renal⁷⁰. Esta capacidad de degradación controlada permite ajustar la liberación de fármacos encapsulados, lo que es crucial para aplicaciones terapéuticas que requieren una liberación sostenida y controlada de medicamentos⁶⁸.

Las NP de PLGA se preparan mediante varios métodos, siendo los más comunes la emulsión- evaporación de solventes, la nanoprecipitación y el *salting out*. En el método de emulsión- evaporación, el fármaco y polímero se disuelven en un solvente orgánico volátil y se emulsiona en una fase acuosa que contiene surfactantes. Posteriormente, el solvente se evapora, formando NP. Por otra parte, la nanoprecipitación, implica la adición de una solución de polímero y fármaco en un solvente miscible con agua a una fase acuosa, lo que resulta en la precipitación de NP. El método de *salting out* utiliza una solución de polímero y fármaco en un solvente orgánico miscible con agua, que se emulsiona en una fase acuosa con sal y estabilizadores, provocando la formación de NP al difundir el solvente orgánico en el agua⁶⁸⁻⁷⁰.

La biodegradabilidad y biocompatibilidad hacen del PLGA un material apropiado y sencillo para la síntesis de NP para la liberación de fármacos, sin embargo, a pesar de estas cualidades, no consigue evadir completamente al

sistema inmune, por lo que su superficie debe modificarse para mejorar esta característica⁷¹.

1.4.2 Funcionalización de nanopartículas

La nanotecnología en el tratamiento del cáncer mejora la liberación controlada del fármaco, la estabilidad del agente terapéutico, el tiempo en circulación y la acumulación pasiva en tumores gracias a la mejora del efecto de permeabilidad y retención (EPR) que consiste en la capacidad de los tumores sólidos de acumular mayor cantidad de macromoléculas gracias al aumento de la angiogénesis y la permeabilidad de los vasos sanguíneos^{72,73}. Sin embargo, el efecto EPR varía según el tumor y las NP pueden ser rápidamente eliminadas por el sistema inmunológico mediante un mecanismo de opsonización, limitando su eficacia^{74,75}.

Para superar estas limitaciones, se han desarrollado métodos de funcionalización. Se comenzó con procesos como el recubrimiento con polietilenglicol (PEG) para evitar ser reconocidas y aumentar su tiempo en circulación, y se fue desarrollando, existiendo en la actualidad diferentes estrategias de funcionalización.

La conjugación covalente implica la unión de moléculas a la superficie de los nanomateriales mediante enlaces covalentes, utilizando grupos funcionales como ácidos carboxílicos, aminas y tioles. Por otro lado, la conjugación no covalente se basa en interacciones físicas débiles como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals, lo que permite mantener las propiedades intrínsecas del nanomaterial^{76,77}. De esta

forma se añaden pequeñas biomoléculas a la superficie de las NP específicas para diferentes marcadores de manera que mejoran la entrega de fármacos haciéndola más activa⁷⁸.

Sin embargo, las NP funcionalizadas químicamente enfrentan problemas como rápido aclaramiento por el sistema inmune y pobres efectos farmacológicos, además de que dichos procesos de funcionalización son complejos y costosos, dificultando su extensiva aplicación clínica. En respuesta a estas limitaciones, surgen en los últimos años las NP biomiméticas (BNP)⁷⁹.

1.4.3 Nanopartículas biomiméticas

Las NP recubiertas con membranas celulares o BNP son una estrategia innovadora que utiliza membranas derivadas de células naturales, como eritrocitos, leucocitos, células cancerosas, células madre, plaquetas o células bacterianas, para recubrir un núcleo de NP. Entre las ventajas que presentan, las BNP muestran características de mimetismo de la superficie celular, mejor biodistribución, menor toxicidad y mayor eficacia terapéutica^{80,81}, al retener las moléculas de adhesión de la superficie celular, lo que les permite dirigirse específicamente a tumores o regiones inflamadas y activar respuestas inmunes^{82,83}. Además, pueden evitar la fagocitosis y prolongar la circulación en el cuerpo gracias a la presencia de proteínas de superficie específicas, como CD47 en las membranas de eritrocitos, que actúan como señales antifagocíticas^{80,81}.

En la **Figura 6** podemos ver una representación de la fabricación de BNP que consisten principalmente en la rotura de las membranas por buffers

hipotónicos, congelación-descongelación, homogeneización, y el posterior recubrimiento de los núcleos mediante extrusión o sonicación. En la extrusión física, las membranas celulares y los núcleos de las NP se fusionan mediante la aplicación de presión a través de una membrana porosa, mientras que con la sonicación la energía ultrasónica se aplica para fusionar las membranas celulares con los núcleos de las NP⁸⁰.

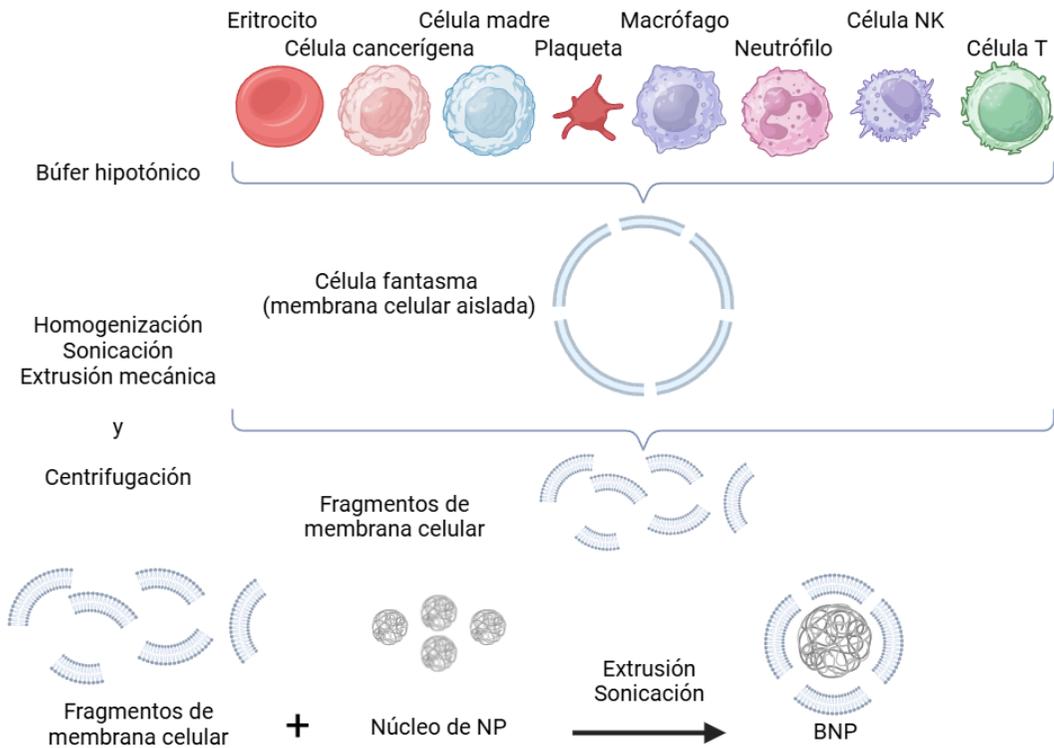


Figura 6. Esquematización del proceso de fabricación de BNP (Figura creada con BioRender, modificada de Narain *et al.* 2017).

La selección de un tipo celular u otro para el recubrimiento dependerá del objetivo de las NP y los marcadores y características que nos interese que presenten. En la **Tabla 2** podemos encontrar un resumen de los principales tipos

celulares usados para el recubrimiento de NP y sus características y aplicaciones^{75,80-93}.

Tabla 2. Resumen de los tipos celulares utilizados en la fabricación de BNP.

Tipo celular	Descripción
Eritrocitos	Las BNP recubiertas con membranas de eritrocitos son efectivas en la evasión del sistema inmunológico y prolongan el tiempo de circulación, al ser biocompatibles, biodegradables y no inmunogénicas. Pueden cargar y liberar fármacos de manera controlada, mejorando la eficacia terapéutica y reduciendo la toxicidad. Sin embargo, estas BNP no consiguen una administración dirigida activa debido a la ausencia de moléculas superficiales específicas ^{81,83-85} .
Células cancerígenas	Las BNP de células cancerosas pueden dirigirse específicamente a tumores gracias a la retención de moléculas de adhesión de la superficie celular. Mejoran la acumulación en tumores y activan respuestas inmunes, gracias a la presencia de proteínas específicas como integrinas, E-cadherinas o el antígeno TF facilita la autoadherencia y el reconocimiento específico de células tumorales, generando un aumento en la acumulación en el tumor de 40 veces con respecto a las recubiertas con eritrocitos. Además, pueden evadir el sistema inmune, aumentando el tiempo en circulación y utilizarse en la terapia fototérmica ^{81,83,87,88} .
Células madre	Las BNP recubiertas con membranas de células madre inhiben la inflamación, tienen afinidad por tejidos dañados y actividad inmunomoduladora. Son efectivas en la entrega dirigida de fármacos y la regeneración de tejidos al aumentar la acumulación en la zona tumoral y evitar la eliminación por el sistema inmune ^{80,82,86,94} .
Plaquetas	Las BNP recubiertas con membranas de plaquetas tienen afinidad por las vasculaturas lesionadas, las células cancerosas y algunos patógenos. Son efectivas en la terapia del cáncer, la terapia fotodinámica y la reparación de tejidos, mostrando alta biocompatibilidad y prolongada circulación ^{81,83} .
Leucocitos	Las BNP recubiertas con membranas de leucocitos pueden dirigirse a regiones inflamadas y tumores, cruzando barreras biológicas con facilidad.

	Son efectivas en la entrega dirigida de fármacos y la modulación inmune, mejorando la eficacia de los tratamientos contra el cáncer, gracias a su acumulación en los tumores y el aumento del tiempo de circulación ^{80,82,89} .
Macrófagos	Las BNP recubiertas con membranas de macrófagos pueden dirigirse específicamente a tumores y mejorar la terapia fototérmica del cáncer. Aumentan la captación y acumulación en la zona tumoral, mejorando la eficacia anticancerígena. La combinación con membranas de células tumorales logró una disminución del 89% de la metástasis pulmonar del cáncer de mama ^{80,90,91,95} .
Neutrófilos	Las BNP recubiertas con membranas de neutrófilos pueden capturar eficientemente células tumorales circulantes (CTC) y prevenir la formación de nuevas lesiones metastásicas ⁸⁰ .
Células NK	Las BNP recubiertas con membranas de células NK pueden dirigirse a tumores sólidos y mejorar la eficacia de la terapia, matando células cancerosas sin necesidad de sensibilización previa ⁸⁰ .
Linfocitos T	Las NP recubiertas con membranas de linfocitos T pueden dirigirse específicamente a tumores y mejorar la eficacia de la terapia contra el cáncer al disminuir la fagocitosis mediada por macrófagos, incrementar el tiempo en circulación y la acumulación en la zona tumoral ^{80,92,93} .

Las NP recubiertas con membranas de células T han demostrado ser una estrategia prometedora en la terapia contra el cáncer, aprovechando las propiedades de reconocimiento inmune de las células T para mejorar la especificidad y eficacia del tratamiento.

Se ha desarrollado un sistema de administración y distribución de fármacos basado en membranas de linfocitos T citotóxicos humanos para el tratamiento del cáncer gástrico, utilizando irradiación de baja dosis como quimioatrayente para dirigir las NP al sitio del tumor, lo que resultó en una inhibición significativa del crecimiento tumoral⁹².

También se han creado NP que imitan la membrana de células T para mejorar la terapia fototérmica contra el cáncer, utilizando química bioortogonal para aumentar la acumulación en los tumores y mejorar la eficacia⁹⁶. Además, se desarrollaron NP recubiertas con membranas de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR-T) para el tratamiento del carcinoma hepatocelular (HCC), proporcionando una alta especificidad para las células de HCC y mejorando la eficacia de la terapia⁹³.

De forma similar, se desarrollaron NP recubiertas con membranas de una línea celular de células T rica en los ligandos PD1, FasL, LFA1 y TGF β R1. Estas BNP inducen apoptosis mediada por el ligando Fas y son resistentes a las moléculas inmunosupresoras como TGF β 1 y PDL1, lo que les permite mejorar la eficacia terapéutica, restaurar las funciones citotóxicas de los linfocitos T y evitar la evasión inmune⁹⁷.

1.5 Evasión inmune

La evasión inmune es un mecanismo crucial que permite a las células tumorales escapar de la vigilancia del sistema inmunológico, facilitando así su crecimiento y diseminación. En TNBC, las células tumorales emplean diversas estrategias para evadir la respuesta inmune, incluyendo la pérdida de expresión de moléculas inmunoestimuladoras y la ganancia de expresión de moléculas inmunoinhibidoras⁹⁸ que se unen a los receptores de IC como el receptor de muerte celular programada 1 (PD1), la inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3 (TIM3), el gen 3 de activación de linfocitos (LAG3) y el receptor inmunológico de las células T con dominios Ig e ITIM (TIGIT).

Uno de los receptores de IC más relevantes es LAG3, que se encuentra en linfocitos T, B, NK, reguladores y células dendríticas activadas, con niveles particularmente altos en células T CD8⁺ que han sido agotadas. LAG3 se une a ligandos como la galectina-3 y MHC II, y su función es inhibir tanto la proliferación celular como la producción de citoquinas. En el caso del cáncer de mama, se ha observado una mayor expresión de LAG3, que coexiste con PD1 en linfocitos agotados, lo que se correlaciona con la gravedad de la enfermedad⁹⁹⁻¹⁰².

Por su parte, TIGIT se expresa en células T y NK, especialmente en T colaboradoras activadas y reguladoras. Este receptor tiene como ligandos la nectina-2 y el receptor de poliovirus, y su función es inhibir la activación de linfocitos T y NK, así como la citotoxicidad y la secreción de citoquinas en células NK. Además, su expresión en células tumorales y en células presentadoras de antígeno contribuye a la inhibición de la respuesta

inmunitaria, lo que resulta en un entorno propicio para el crecimiento tumoral^{100,101,103}.

TIM3 se encuentra en una variedad de células inmunitarias, incluyendo linfocitos T colaboradoras y citotóxicas, reguladoras, linfocitos NK, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Sus ligandos incluyen galectina-9, Ceacam1, HMGB1 y PS. TIM3 actúa suprimiendo la respuesta inmunitaria, induciendo la muerte celular de linfocitos T colaboradores y citotóxicos, y estimulando la supresión inmunitaria mediada por células T reguladoras. Este receptor está estrechamente relacionado con la supresión de la respuesta inmunitaria en el contexto tumoral, lo que resalta su importancia en la progresión del cáncer^{100,101,103-105}.

Finalmente, llegamos a PD1, que se expresa en linfocitos T, B, NK, monocitos y células dendríticas activadas, siendo su activación inducida por antígenos. Su función principal es inhibir la actividad, supervivencia, proliferación y producción de citoquinas de los linfocitos T, especialmente de las células efectoras CD8+. Este receptor interactúa con los ligandos de PD1 (PDL1 y PDL2), siendo el eje PD1/PDL1 es uno de los mecanismos más estudiados de evasión inmune en TNBC.

En el contexto del cáncer, la expresión de PDL1 en células tumorales y en linfocitos T reguladores contribuye a la inhibición de la respuesta inmunitaria, lo que a su vez favorece la proliferación y supervivencia de las células cancerígenas. La expresión de PDL1 es significativamente más alta en TNBC en comparación con otros subtipos de cáncer de mama, y su presencia está asociada con un peor pronóstico y una mayor agresividad tumoral.

En resumen, la finalidad de estos receptores de IC es bloquear la actividad antitumoral del sistema inmune⁹⁹⁻¹⁰⁷, favoreciendo un microambiente tumoral (TME) inmunosupresor (**Figura 7**). La infiltración de células inmunes en el TME de TNBC es un factor determinante en la respuesta al tratamiento y el pronóstico de los pacientes.

Los linfocitos T infiltrantes de tumor (TIL) han demostrado ser biomarcadores importantes para predecir la respuesta a la quimioterapia y la supervivencia general en pacientes con TNBC¹⁰⁸. Un alto grado de TIL, así como de macrófagos antitumorales M1 está asociado con un TME inmunorreactivo, es decir, con una mejor respuesta al tratamiento y una mayor supervivencia, lo que sugiere que la inmunidad antitumoral juega un papel crucial en el resultado de estos pacientes.

Sin embargo, la presencia de células inmunosupresoras como los macrófagos M2 y las células T reguladoras en el TME puede contrarrestar esta respuesta inmune, promoviendo un TME inmunosupresor que favorece la progresión tumoral y la metástasis¹⁰⁹.

Diferentes estudios han demostrado que la inhibición de PDL1 puede bloquear la apoptosis de células T y mejorar la respuesta inmune antitumoral, lo que ha llevado al desarrollo de terapias basadas en inhibidores de puntos de control inmunitarios como pembrolizumab y atezolizumab^{98,106-109}. Los ensayos clínicos han mostrado resultados prometedores con el uso de inhibidores de PD1/PDL1 en combinación con quimioterapia en pacientes con TNBC. Por ejemplo, el ensayo IMpassion130 demostró que la combinación de atezolizumab con nab-paclitaxel mejoró significativamente la supervivencia

general en pacientes con TNBC metastásico, especialmente en aquellos con tumores PDL1¹⁰⁸. Por lo tanto, la inhibición del eje PD1/PDL1 supone una estrategia prometedora para mejorar la respuesta inmune y el pronóstico en pacientes con TNBC.

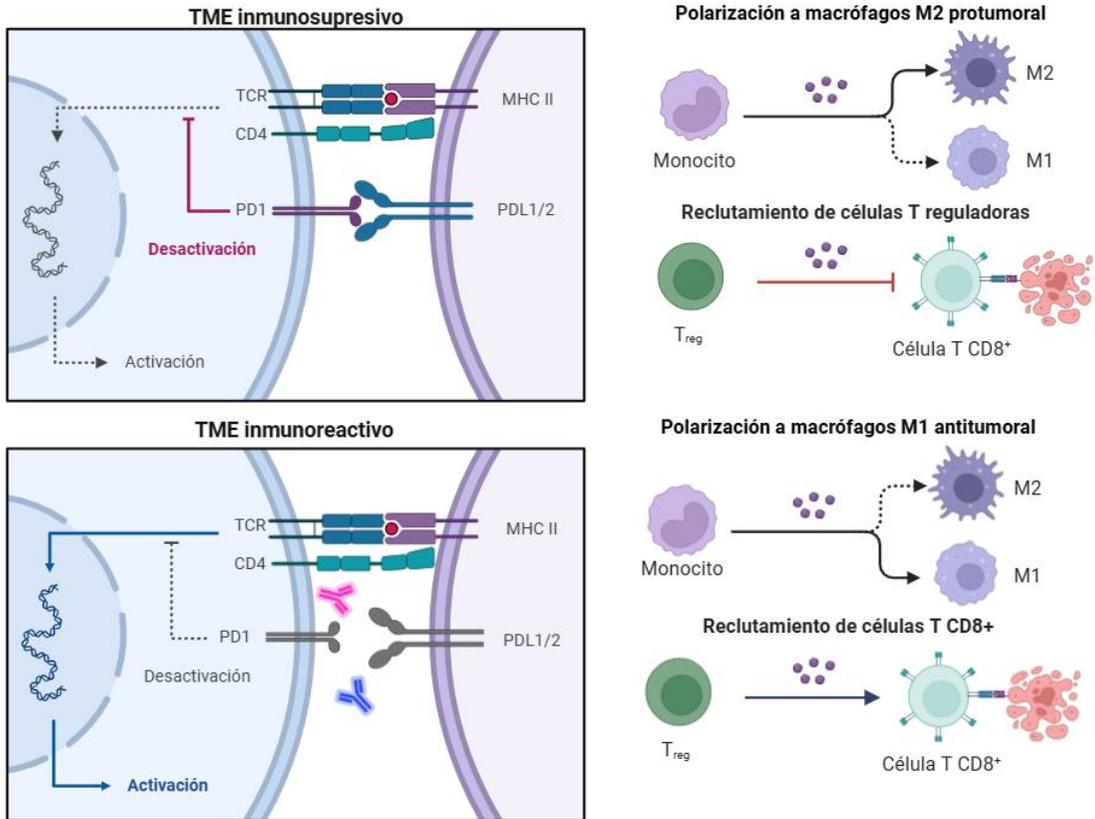


Figura 7. Representación de microambiente tumoral inmunosupresivo e inmunorreactivo (Figura creada con BioRender).

2.HIPÓTESIS JUSTIFICACIÓN

Y

El TNBC se caracteriza por su agresividad y la falta de ER, PR y HER2, lo que limita las opciones terapéuticas y se asocia con un mal pronóstico. Además, la quimioterapia convencional, como los taxanos, han demostrado aumentar la señalización de TGF β , una ruta que se ha relacionado con mal pronóstico, EMT, CSC y quimiorresistencia. ATF4 es un factor de transcripción aguas abajo de la señalización de TGF β y también se ha relacionado con estos procesos adversos. En base a estos hechos, se propone que el bloqueo de esta señalización mediante ISRIB, un inhibidor farmacológico de ATF4, puede dar lugar a la disminución de la señalización de TGF β , reduciendo así la EMT, las CSC y la quimiorresistencia en líneas de TNBC parentales y resistentes a DOC.

Además, el TNBC es conocido por su capacidad de evadir el sistema inmune, lo que complica aún más su tratamiento. Por tanto, para mejorar la eficiencia de administración de los taxanos y terapias anti-ATF4 y reducir la evasión inmune, desarrollaremos NP de PLGA recubiertas con membranas celulares de linfocitos T agotados procedentes de pacientes con TNBC, cargadas con DOC e ISRIB. A estas NP las denominaremos NExT (*Nanoparticles coated with membranes of **Ex**hausted **T**-lymphocytes*).

El uso de PLGA como material base para las NP se debe a su biocompatibilidad y biodegradabilidad, características por las que ha sido aprobado por la FDA y EMA. Estas propiedades aseguran que las NP no sean tóxicas y puedan ser utilizadas de manera segura en aplicaciones biomédicas.

Además, la encapsulación de fármacos en NP de PLGA permite una liberación controlada y sostenida, mejorando la eficacia terapéutica y reduciendo los efectos secundarios sistémicos.

El recubrimiento de las NP con membranas celulares de linfocitos T agotados es una estrategia innovadora para mejorar la especificidad del tratamiento. Los linfocitos T agotados expresan varios receptores de puntos de IC que encuentran sus ligandos en las células tumorales. Al recubrir las NP con estas membranas, se espera que las NP puedan reconocer y unirse específicamente a las células tumorales que expresan estos ligandos, aprovechando el proceso de evasión inmune para la entrega dirigida de los fármacos, y bloqueando este proceso, aumentando la eficacia del tratamiento. Además, el estudio se lleva a cabo con linfocitos T primarios con la idea de poder llevar a cabo en el futuro una terapia autóloga en la que se usen las propias células del paciente para recubrir las NP (**Figura 8**).

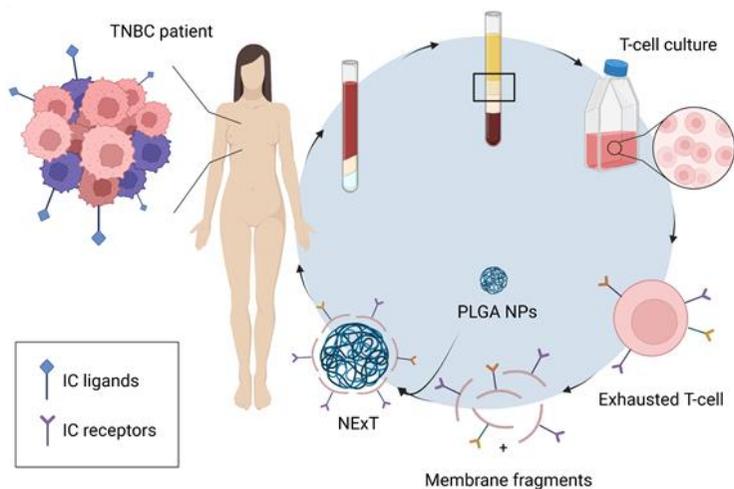


Figura 8. Esquemización del proceso de fabricación de NExT. IC: control inmunitario.

3.OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es evaluar la terapia anti-ATF4 en combinación con DOC y el desarrollo de BNP de células T agotadas, aprovechando la evasión inmune para su administración dirigida en TNBC.

Objetivo 1. Evaluar la terapia anti-ATF4 en combinación con DOC sobre la señalización de TGF β y su efecto sobre la EMT, CSC y quimiorresistencia.

Objetivo 1.1. Estudiar la señalización de TGF β bajo el tratamiento con DOC y la inhibición génica de ATF4.

Objetivo 1.2. Evaluar el efecto de ISRIB sobre la señalización de ATF4 y la EMT inducida por TGF β y DOC.

Objetivo 1.3. Desarrollar y caracterizar una línea celular de TNBC resistente a DOC.

Objetivo 1.4. Caracterizar las poblaciones de CSC en la línea celular resistente a DOC.

Objetivo 1.5. Evaluar el efecto de ISRIB sobre la quimiorresistencia y las poblaciones de CSC en la línea celular resistente a DOC.

Objetivo 2. Desarrollar BNP recubiertas con células T agotadas y su evaluación *in vitro* e *in vivo*.

Objetivo 2.1. Sintetizar, optimizar y caracterizar las NP de PLGA y BNP.

Objetivo 2.2. Aumentar, preservar y orientar los receptores de IC en la superficie de BNP.

Objetivo 2.3. Evaluar la especificidad y direccionamiento de las BNP en células de TNBC.

Objetivo 2.4. Encapsular fármacos y evaluar la liberación y eficacia terapéutica en células de TNBC.

Objetivo 2.5. Evaluar la toxicidad y perfil de biodistribución de las BNP *in vivo*.

Objetivo 2.6. Evaluar la actividad terapéutica *in vivo* de las BNP en un modelo PDX de TNBC.

Objetivo 3. Optimizar la encapsulación de ISRIB y DOC en BNP y evaluar su efecto en líneas celulares y organoides derivados de pacientes de TNBC.

Objetivo 3.1. Evaluar el efecto sobre los niveles de PDL1 bajo el tratamiento con DOC e ISRIB libres y encapsulados en BNP.

Objetivo 3.2. Evaluar el efecto sobre la apoptosis bajo el tratamiento con DOC e ISRIB libres y encapsulados en BNP.

3.OBJECTIVES

The main objective of this thesis is to test anti-ATF4 therapy in combination with DOC and to develop BNP from exhausted T cells, leveraging immune evasion for targeted delivery in TNBC.

Objective 1. To evaluate of anti-ATF4 therapy in combination with DOC on TGF β signaling and its effect on EMT, CSC, and chemoresistance.

Objective 1.1. To study of TGF β signaling under DOC treatment and ATF4 gene inhibition.

Objective 1.2. To evaluate the effect of ISRIB on ATF4 signaling and EMT induced by TGF β and DOC.

Objective 1.3. To develop and to characterize a DOC-resistant TNBC cell line.

Objective 1.4. To characterize CSC populations in the DOC-resistant cell line.

Objective 1.5. To evaluate the effect of ISRIB on chemoresistance and CSC populations in the DOC-resistant cell line.

Objective 2. To develop BNP coated with exhausted T cells and their evaluation *in vitro* and *in vivo*.

Objective 2.1. To synthesize, to optimize, and to characterize PLGA NP and BNP.

Objective 2.2. To enhance, to preserve, and to target IC receptors on the surface of BNP.

Objective 2.3. To evaluate specificity and targeting of BNP in TNBC cells.

Objective 2.4. To optimize drug encapsulation and to evaluate release and therapeutic efficacy in TNBC cells.

Objective 2.5. To evaluate toxicity and biodistribution profile of BNP *in vivo*.

Objective 2.6. To evaluate *in vivo* therapeutic activity of BNP in a PDX model of TNBC.

Objective 3. To encapsulate ISRIB and DOC in BNP and to evaluate their effect on cell lines and organoids derived from TNBC patients.

Objective 3.1. To evaluate the effect on PDL1 levels under treatment with free and BNP-encapsulated DOC and ISRIB.

Objective 3.2. To evaluate the effect on apoptosis under treatment with free and BNP-encapsulated DOC and ISRIB.

4.RESULTADOS

4.1 Objetivo 1. Evaluación de terapia anti-ATF4 en combinación con DOC sobre la señalización de TGF β y su efecto sobre transición epitelio mesénquima, células madre cancerígenas y quimiorresistencia.

4.1.1 Estudio de la señalización de TGF β bajo el tratamiento con DOC y la inhibición de ATF4

Para evaluar si el tratamiento con taxanos, específicamente DOC, influye en la señalización de TGF β , se realizó un experimento de ELISA con el objetivo de medir directamente el ligando TGF β 1 producido por las células tumorales durante un periodo de tiempo. Concretamente se realiza un análisis durante 72 horas en las líneas celulares SUM159 y MDA-MB-231 de TNBC (**Figura 9**).

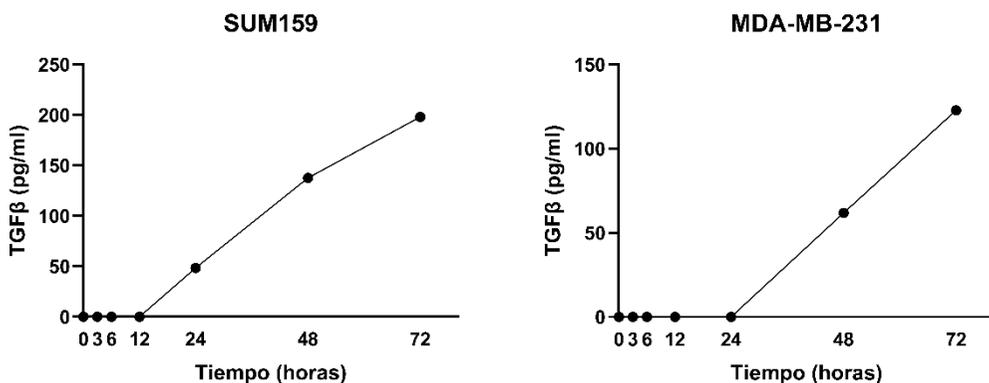


Figura 9. Medida de los niveles de TGF β mediante ELISA realizado en líneas celulares SUM159 y MDA-MB-231 después del tratamiento con 10 nM de DOC.

En este estudio se observó que el aumento del ligando TGF β 1 comienza después de 12 h de tratamiento en la línea celular SUM159 y a las 24 h en la línea MDA-MB-231 (**Figura 9**). Este incremento se mantuvo de manera progresiva durante al menos 72 h. Es importante destacar que el valor máximo de TGF β 1 producido por la línea SUM159 fue superior al observado en la línea MDA-MB-231.

Adicionalmente, se llevó a cabo un experimento utilizando la línea celular SBE-HEK293, la cual fue transfectada con un reportero de luciferasa unido a *Smad binding element* (SBE), por lo que cuando se activa la señalización de TGF β 1 se expresa SBE y emite fluorescencia al añadir luciferina al medio. Estas células fueron tratadas con DOC (10 nM) durante 4 y 6 días. Los resultados mostraron que el tratamiento con DOC incrementó la señalización tanto a los 4 como a los 6 días (**Figura 10**). Como era de esperar, el aumento del ligando ocurre antes del aumento en la señalización.

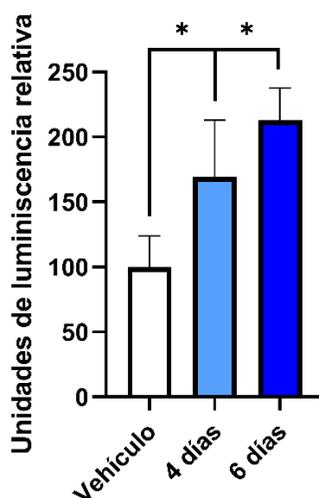


Figura 10. Ensayo de reportero SBE en la línea HEK293 después del tratamiento con 10 nM de DOC durante 4 y 6 días.

A continuación, investigamos si el aumento en la producción del ligando TGF β 1 también se produce en un entorno *in vivo* en ratones portadores de PDX de TNBC tratados con DOC. En ambos modelos PDX (BCM-3887, BCM-4664), observamos un aumento en los niveles de TGF β 1 como resultado del tratamiento con DOC (siSCR+DOC) (**Figura 11**). Este hallazgo sugiere que el DOC incrementa la señalización de TGF β también en modelos animales que imitan mejor la fisiología humana.

En nuestros estudios anteriores observamos que ATF4 forma parte de un sistema de retroalimentación positiva de la señalización de TGF β a través del aumento de las rutas canónicas (Smad) y no canónicas (PI3K Akt mTor)³². Por ello, realizamos el tratamiento con siATF4 en combinación o no con DOC para observar si la inhibición del gen *ATF4* es suficiente para reducir los niveles de ligando de TGF β 1 inducidos por el taxano. Los niveles del ligando fueron medidos mediante ELISA a partir de la sangre de los ratones. En este sentido, nuestros resultados muestran que la inhibición del mecanismo de retroalimentación positiva de ATF4 sobre TGF β es suficiente para disminuir significativamente la producción de TGF β 1 inducida después del tratamiento con DOC (**Figura 11**).

Por otro lado, el tratamiento con siATF4 en ausencia de DOC bloquea completamente el ligando basal en los ratones modelo BCM-3887 (**Figura 11**). Es necesario indicar que el modelo BCM-4664 no presentó niveles detectables del ligando, mientras que en el BCM-3887 los niveles basales eran mucho más altos, lo que podría estar relacionado con la alta capacidad metastásica de este modelo³².

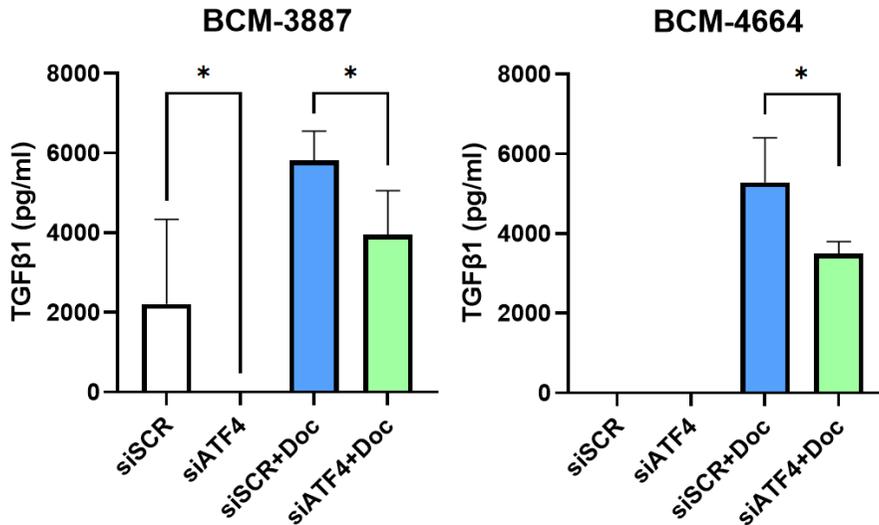


Figura 11. ELISA de TGFβ1 realizado en plasma de PDX después del tratamiento con siSCR, siATF4 y su combinación con DOC (10nM). Comparación con el grupo control correspondiente: *p < 0.05.

4.1.2 Evaluación de ISRIB sobre la señalización de TGFβ y la transición epitelio-mesénquima inducida por TGFβ y DOC

Para investigar la viabilidad de traducir nuestros resultados a la práctica clínica en el futuro, determinamos si un inhibidor farmacológico de ATF4 (ISRIB) mantendría la capacidad de inhibir la vía de señalización de TGFβ. Para ello, llevamos a cabo un ensayo reportero en el cual la línea celular SBE-HEK293 fue tratada con ISRIB (5 μM) bajo estimulación con TGFβ1 (10ng/ml). Los resultados, tal y como esperábamos demostraron un aumento de la señalización en el tratamiento con TGFβ1 que fue disminuido hasta niveles basales tras el tratamiento con ISRIB (**Figura 12**).

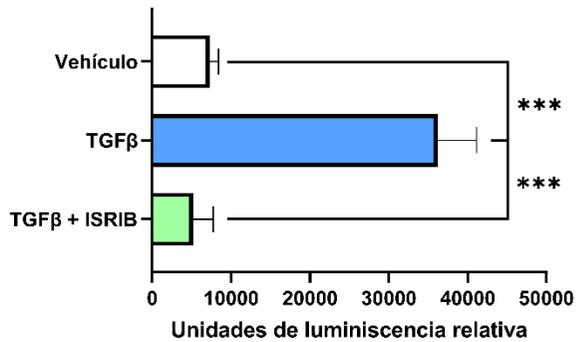


Figura 12. Ensayo de reportero en la línea HEK293 después del tratamiento con TGFβ (10ng/ml) e ISRIB (5μM). Comparación con el grupo correspondiente: ***p < 0.001.

Para investigar cómo ISRIB revierte la señalización de TGFβ, realizamos un análisis de Western blot para examinar la expresión de intermediarios clave en las vías canónica y no canónica de TGFβ, en células de TNBC SUM159 y MDA-MB-231 estimuladas con el ligando TGFβ1, así como por el tratamiento con DOC.

En el caso del TGFβ1 el tratamiento se mantuvo durante 24 h mientras que, con el DOC, como habíamos observado un aumento en la señalización a los 4 y 6 días, quisimos imitar los tratamientos producidos en pacientes, por lo que llevamos a cabo un ciclo de 4 días de tratamiento con ISRIB y/o DOC y otro ciclo de 4 días de recuperación.

Nuestros resultados muestran que ISRIB reduce el nivel de proteína ATF4 y tanto la forma total como la fosforilada de Smad2/3 (**Figura 13**), intermediarios de la vía canónica de TGFβ, imitando el efecto de la inhibición del gen *ATF4* en nuestros estudios previos³².

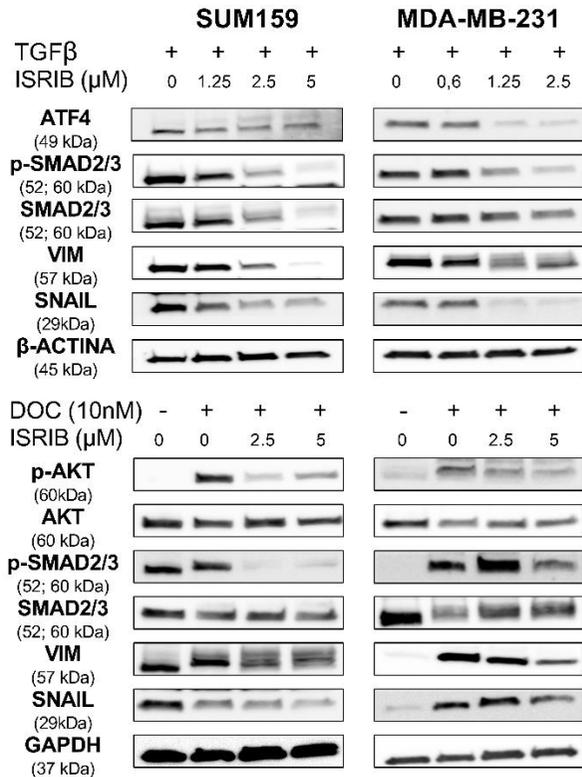


Figura 13. Western-blot en las líneas SUM159 y MDA-MB-231 bajo tratamiento con ISRIB y/o TGFβ o ISRIB y/o DOC.

Con respecto a la ruta no canónica, observamos que Akt se incrementa en ambas líneas celulares después del tratamiento con DOC. Sin embargo, más importante aún, este aumento en Akt se reduce con la combinación con ISRIB, lo que indica que la ruta no canónica Akt/mTOR de TGFβ también es bloqueada por la inhibición de ATF4. Estos resultados refuerzan la capacidad de ISRIB de revertir la señalización de TGFβ.

Para determinar los efectos de la combinación de ambos compuestos en la EMT, estudiamos la expresión de los marcadores mesenquimales vimentina y Snail. Observamos que el nivel de proteína de ambos marcadores se redujo

en las células tratadas con TGF β 1 y DOC cuando se añadió ISRIB (**Figura 13**). Este resultado sugiere que ISRIB puede contrarrestar la inducción de EMT provocada por TGF β 1 y DOC. En la línea celular MDA-MB-231, el tratamiento con DOC resultó en un aumento significativo de los marcadores de EMT, vimentina y Snail (**Figura 13**). Este incremento indica que DOC promueve la EMT en estas células, lo cual es consistente con su papel en la progresión tumoral y la resistencia a la quimioterapia.

Por otro lado, en las células SUM159, no se detectó un aumento significativo en la expresión de Snail y vimentina tras el tratamiento con DOC en comparación con el control. No obstante, se observó que la banda de vimentina inducida por DOC aparecía de un tamaño mayor, lo que podría indicar modificaciones postraduccionales o la presencia de isoformas diferentes de la proteína (**Figura 13**). Estos hallazgos subrayan la capacidad de ISRIB para inhibir la EMT inducida por TGF β 1 y DOC, lo cual es crucial para prevenir la progresión tumoral y la metástasis en TNBC.

4.1.3 Desarrollo y caracterización de una línea celular de cáncer de mama triple negativo resistente a DOC

El desarrollo de quimiorresistencia, particularmente a las antraciclinas y taxanos, presenta un gran desafío para el tratamiento del TNBC. Esta resistencia está estrechamente vinculada al enriquecimiento de células tumorales que muestran características similares a las de las células madre consecuencia de la activación de vías de señalización como TGF β ²⁹⁻³¹.

A partir de la hipótesis anteriormente planteada en base a nuestros estudios previos, comprobamos si la inhibición de TGF β mediada por el inhibidor de ATF4 ISRIB podría establecerse como una terapia encaminada a reducir la adquisición de resistencia al tratamiento con quimioterapia. En primer lugar, desarrollamos una línea celular de TNBC resistente a DOC. Para ello la línea SUM159 se sometió a 8 ciclos de tratamiento-recuperación con DOC 10 nM y una vez mostraron resistencia (ausencia de muerte celular bajo el microscopio y crecimiento positivo), la concentración se aumentó hasta 25 y 50 nM con un total de 12 ciclos finalmente.

La resistencia de SUM159-R50 a DOC se determinó mediante ensayo de viabilidad con WST-1 durante 48 h. Los resultados mostraron un aumento significativo en el valor de IC₅₀ (277 nM) de DOC en comparación con las células parentales SUM159 (3 nM) (**Figura 14**). Este aumento en la concentración necesaria para inhibir la viabilidad celular muestra la capacidad de resistencia al tratamiento de la línea celular generada.

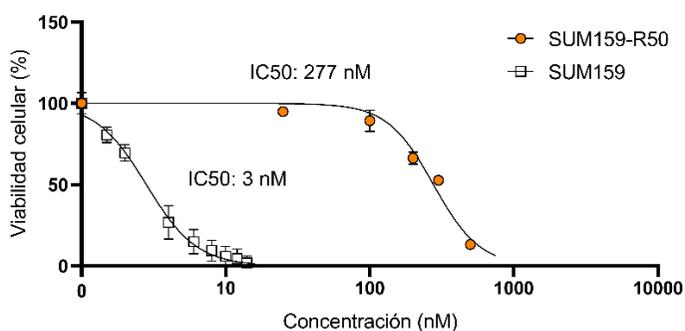


Figura 14. Viabilidad celular bajo diferentes concentraciones de DOC (0-1000 nM) en SUM159 y SUM159-R50.

Además, el desarrollo de la línea celular resistente a DOC SUM159-R50 se validó mediante un análisis transcriptómico examinando la expresión de genes involucrados en la quimiorresistencia utilizando Arrays de Baja Densidad Taqman personalizados con sondas Taqman (**Figura 15**).

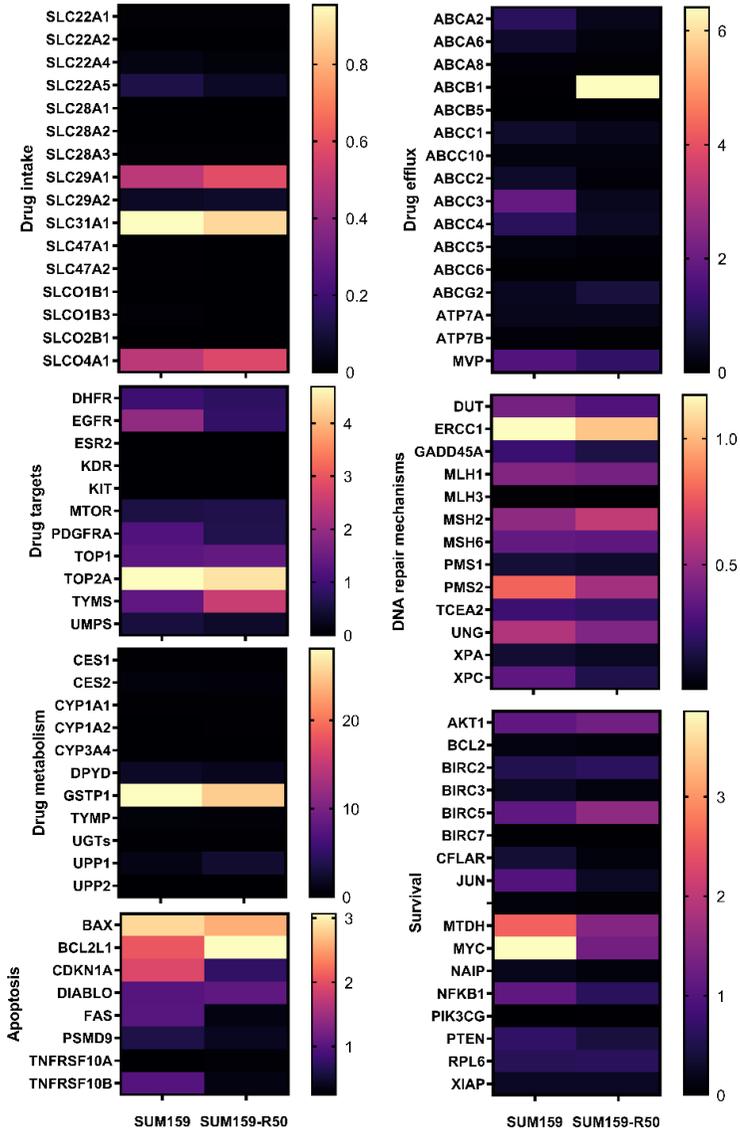


Figura 15. Análisis de la expresión génica de genes relacionados con la resistencia a la quimioterapia, involucrados en la captación de fármacos, el eflujo de fármacos, el metabolismo de fármacos, el mecanismo de reparación del ADN, la supervivencia, los objetivos de los fármacos y la apoptosis en SUM159 y SUM159-R50.

Observamos una regulación al alza en la expresión de los genes de eflujo de fármacos ABCB1 y ABCG2, el gen antiapoptótico survivina (BIRC5) y Timidilato sintasa (TYMS) involucrado en la síntesis de ADN, junto con una regulación a la baja en el gen proapoptótico FAS en la línea SUM159-R50.

Finalmente, para validar estos resultados, se llevó a cabo una qPCR de los genes *ABCB1*, *ABCG2*, *BIRC5*, *TYMS* y *FAS*. La **Figura 16** muestra resultados similares en el cambio de expresión de dichos genes. Se observó un aumento de 2000, 2.5, 2.5, y 2 veces en *ABCB1*, *ABCG2*, *TYMS* y *BIRC5*, respectivamente, mientras que un descenso a menos de la mitad en *FAS*. Estos cambios de expresión concuerdan con las características más agresivas de la línea resistente.

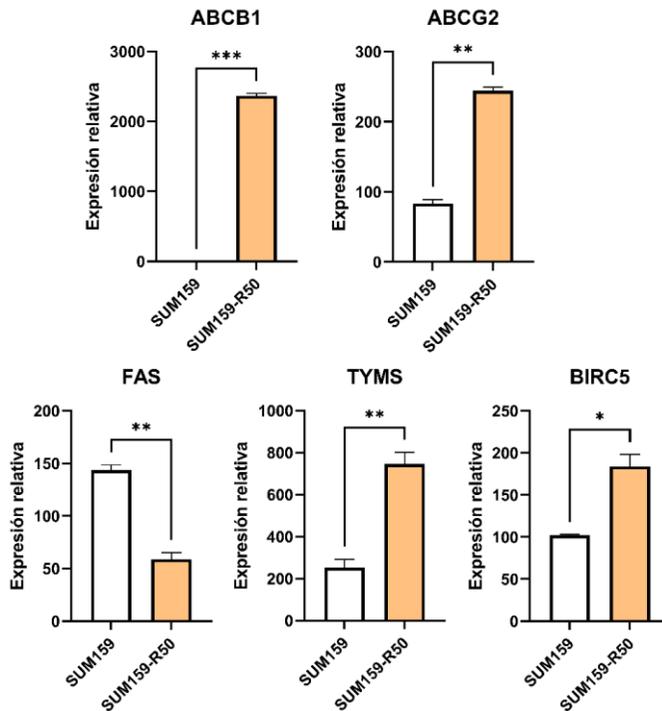


Figura 16. qPCR de *ABCB1*, *ABCG2*, *FAS*, *TYMS* y *BIRC5* en SUM159 y SUM150-R50. Comparación con el grupo control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.1.4 Evaluación de las poblaciones de células madre cancerígenas en SUM159-R50

Dado que la resistencia a la quimioterapia se ha vinculado a un aumento en las CSC^{48,49}, nuestro objetivo fue investigar si nuestra línea celular resistente previamente establecida, SUM159-R50, exhibía un enriquecimiento en CSC. Para ello, evaluamos la eficiencia de la formación de mamíferas en las líneas celulares parentales SUM159 y SUM159-R50, un ensayo ampliamente reconocido de la capacidad de autorrenovación de las células de cáncer de mama^{32,110-112}. La capacidad de formar mamíferas es un indicador importante de la presencia de CSC, ya que estas estructuras tridimensionales reflejan la habilidad de las células para proliferar y diferenciarse en un entorno similar al tejido tumoral.

Para evaluarlo, tras un ciclo de tratamiento a la línea resistente se sembraron la línea resistente y la parental en placas de baja adhesión con un medio de cultivo específico para CSC. El aumento en el tamaño y número de mamíferas en la línea resistente sugiere que estas células han adquirido características similares a las de las células madre, lo que podría contribuir a su resistencia a la quimioterapia.

En los experimentos realizados, observamos un aumento significativo en el número total de las mamíferas primarias y secundarias en la línea celular SUM159-R50 en comparación con SUM159 (**Figura 17a y b**). Este incremento en la formación de mamíferas de entre 2 y 5 veces sugiere que las células SUM159-R50 tienen una mayor capacidad de autorrenovación. Además, el tamaño de las mamíferas en la línea SUM159-R50 fue notablemente mayor,

con muchas de ellas superando los 100 μm , en comparación con las mamóferas formadas por las células SUM159 parentales.

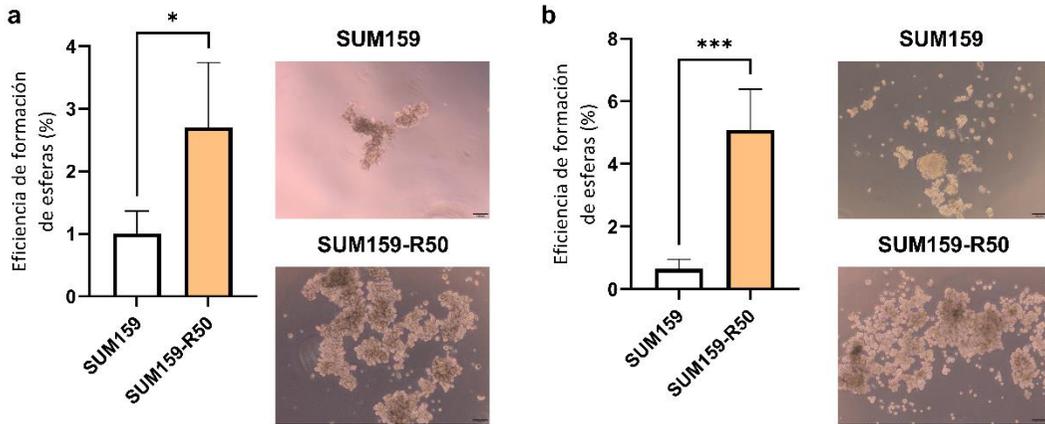


Figura 17. a, Cuantificación e imágenes representativas de la eficiencia de las líneas SUM159 y SUM159-R50 en la formación de mamóferas primarias y, **b**, secundarias. Comparación con el grupo control: * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$.

Por otra parte, quisimos evaluar la clonogenicidad en la línea celular SUM159-R50, que se refiere a la capacidad de las células individuales para proliferar y generar colonias, reflejando su potencial de autorrenovación y tumorigenicidad¹². Para ello, utilizamos un ensayo de formación de colonias en agar blando (0,8% de agar) durante 21 días.

En nuestros experimentos, observamos que la línea celular SUM159-R50, mostró un aumento significativo de hasta 15 veces en el recuento y por tanto, la formación de colonias en comparación con la línea celular parental (**Figura 18**).

Este incremento sugiere que las células SUM159-R50 tienen una mayor capacidad proliferativa y regenerativa, lo que es indicativo de un fenotipo más agresivo y resistente.

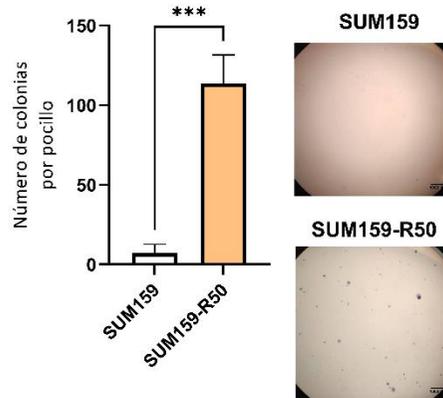


Figura 18. Cuantificación e imágenes representativas de la formación de colonias de SUM159 y SUM159-R50. Comparación con el grupo control: *** $p < 0.001$.

De la misma forma, el ensayo de Hoechst 33342 es un método ampliamente utilizado para detectar CSC. Esta técnica identifica la población de células conocida como *side population* (SP), que son conocidas por sus capacidades de autorrenovación y su estrecha asociación con la resistencia a fármacos ya que evalúa la capacidad de las células de expulsar el fluoróforo¹¹³⁻¹¹⁵. En nuestro estudio, evaluamos mediante citometría de flujo esta población, observando un aumento notable en las células SUM159-R50, como se ilustra en la **Figura 19**, con un aumento del ~3% de las células menos teñidas gracias al aumento de la capacidad de expulsar el compuesto por bombas de eflujo. Estos resultados concuerdan con los aumentos de expresión en ABCB1 y ABCG2.

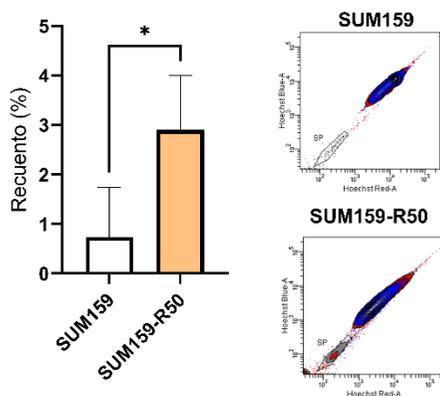


Figura 19. Cuantificación y diagrama de puntos representativos del análisis de población lateral por citometría en SUM159 y SUM159-R50. Comparación con el grupo control: * $p < 0.05$.

Finalmente, se realizó un ensayo por citometría para detectar la actividad de la enzima ALDH, que juegan un papel importante en la identificación de CSC, debido a los altos niveles de ALDH1 expresados por las células iniciadoras de tumores. Estas enzimas están involucradas en la detoxificación de aldehídos intracelulares y en la resistencia a la quimioterapia. Las células con alta actividad de ALDH1 tienen una mayor capacidad de autorrenovación y son más eficientes en la iniciación de tumores^{116–118}. El análisis de ALDH1 mediante citometría de flujo se realiza usando Aldefluor (ALDF) para detectar la actividad enzimática y Dietilaminobenzaldehído (DEAB) como inhibidor para diferenciar la señal específica, lo que permite identificar células con alta actividad de ALDH1, indicativas de propiedades de células madre. Las células de TNBC resistentes a DOC generadas mostraron una diferencia en el porcentaje de ALDH del ~3,5% con respecto a la línea parental (**Figura 20**).

En resumen, todos los ensayos mostraron un aumento en la pluripotencia de la línea SUM159-R50 y de las diferentes poblaciones de CSC tal y como se ha descrito con otros taxanos como paclitaxel¹¹⁹.

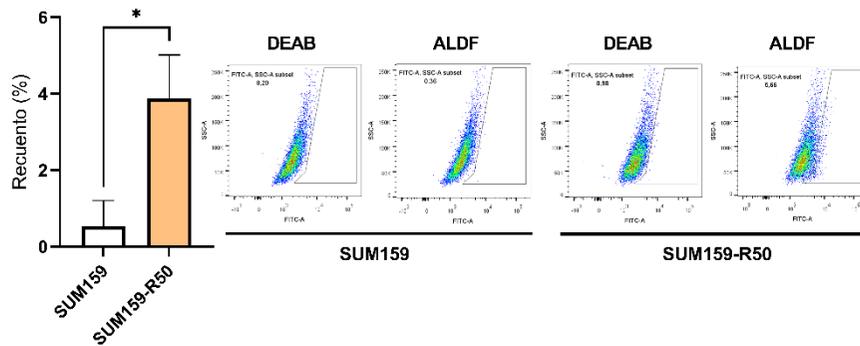


Figura 20. Cuantificación y diagrama de puntos representativos del análisis de ALDH1 por citometría en SUM159 y SUM159-R50. Comparación con el grupo control (células SUM159 parentales): * $p < 0.05$.

4.1.5 Evaluación de la quimiorresistencia y las poblaciones de células madre cancerígenas en SUM159-R50 bajo el tratamiento con ISRIB

Puesto que como hemos visto, la señalización de $TGF\beta$ está muy relacionada con el desarrollo de quimiorresistencia y las CSC, quisimos comprobar si el tratamiento con ISRIB reducía estas características en la línea celular resistente a DOC desarrollada. La resistencia de SUM159-R50 a DOC se determinó mediante ensayo de viabilidad, que mostró una reducción de IC_{50} de 277 nM a 62 nM después de solo 48 h de tratamiento de DOC combinado con ISRIB 5 μ M (**Figura 21**).

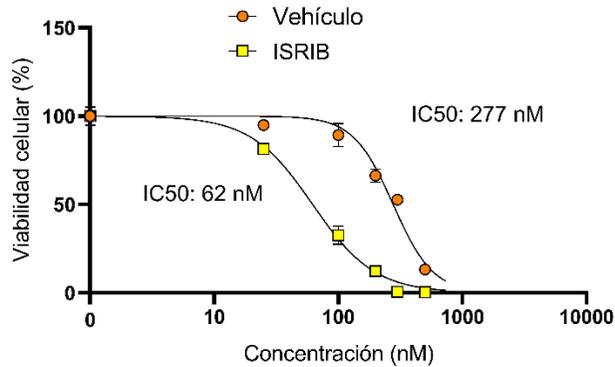


Figura 21. Viabilidad celular bajo diferentes concentraciones de DOC (0-1000 nM) con o sin ISRIB (5 µM) en SUM159-R50.

Queríamos demostrar si este efecto era consecuencia de una reducción en las CSC, por lo que se realizaron los ensayos previamente descritos en la línea resistente SUM159-R50 después del tratamiento con ISRIB 5 µM durante 48 h. Nuestros resultados mostraron que tanto la formación de colonias (**Figura 22**) como la eficiencia de formación de mamíferas (**Figura 23 a y b**) disminuyeron con ISRIB aproximadamente hasta la mitad.

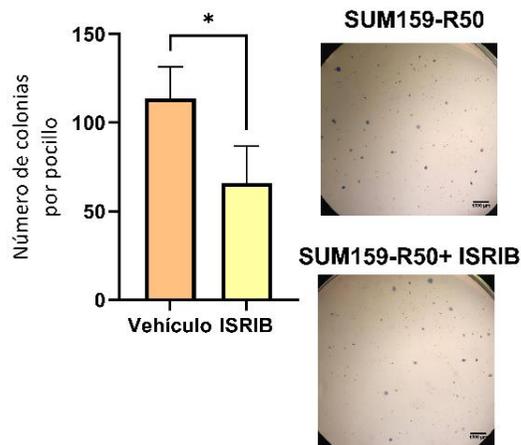


Figura 22. Cuantificación e imágenes representativas de la formación de colonias de SUM159-R50 tratadas o no con ISRIB 5 µM. Comparación con el grupo control: *p < 0.05.

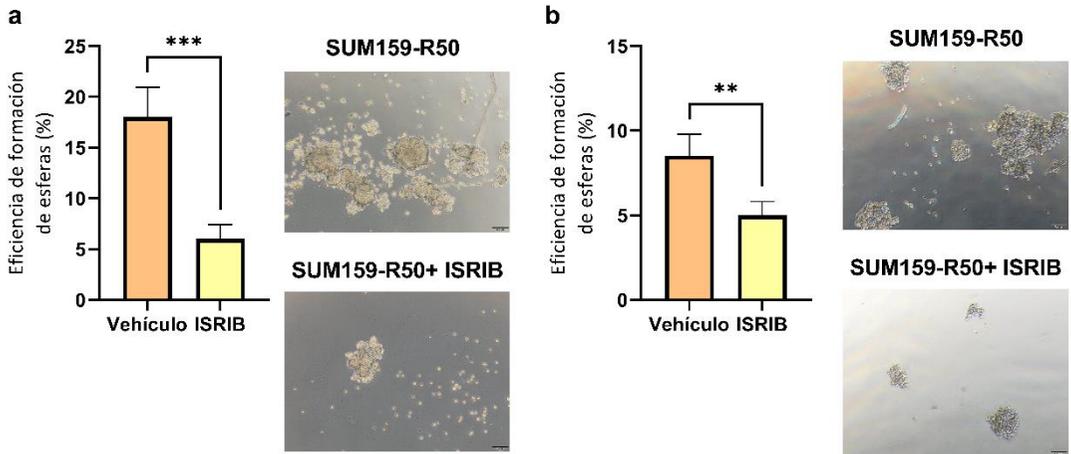


Figura 23. a, Cuantificación e imágenes representativas de la eficiencia de la línea SUM159-R50 tratadas o no con ISRIB 5 μM en la formación de mamosferas primarias y **b,** secundarias. Comparación con el grupo control: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

De la misma manera, los niveles de ALDH1 (**Figura 24a**) y *side population* (**Figura 24b**), que aumentaron en la línea SUM159-R50 en comparación con la línea parental, se redujeron drásticamente hasta casi 0% después del tratamiento con ISRIB.

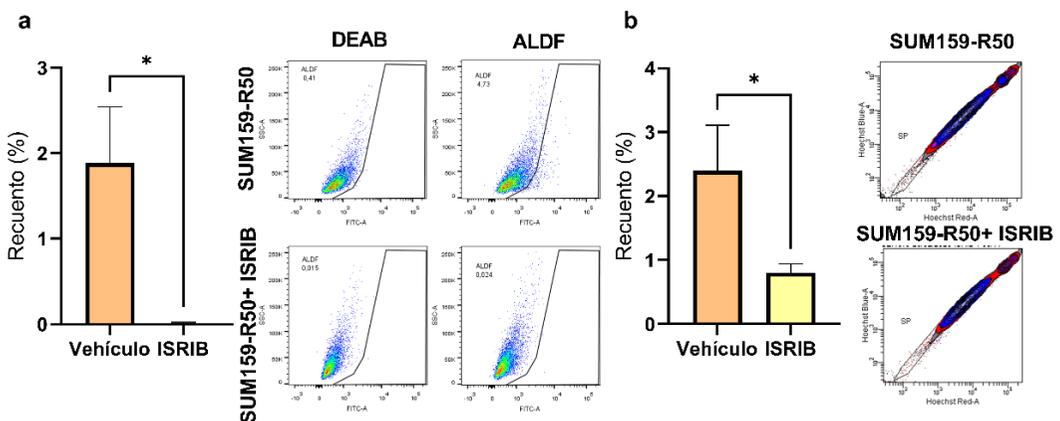


Figura 24. a, Cuantificación y diagrama de puntos representativos del análisis de ALDH1 por citometría en SUM159-R50 con y sin ISRIB 5 μM . **b,** Cuantificación y diagrama de puntos representativos del análisis de población lateral por citometría en SUM159-R50 con y sin ISRIB 5 μM . Comparación con el grupo control: * $p < 0.05$.

Este efecto va acompañado de una disminución en la vimentina, como hemos visto en las líneas SUM159 y MDA-MB-231. Además, también observamos una disminución en los marcadores de CSC como Oct4 y Notch1, confirmando la disminución en la población de CSC (**Figura 25**). En conjunto, estos hallazgos subrayan el potencial de ISRIB como una herramienta terapéutica para reducir la población de CSC y, por ende, la resistencia a la quimioterapia en el TNBC.

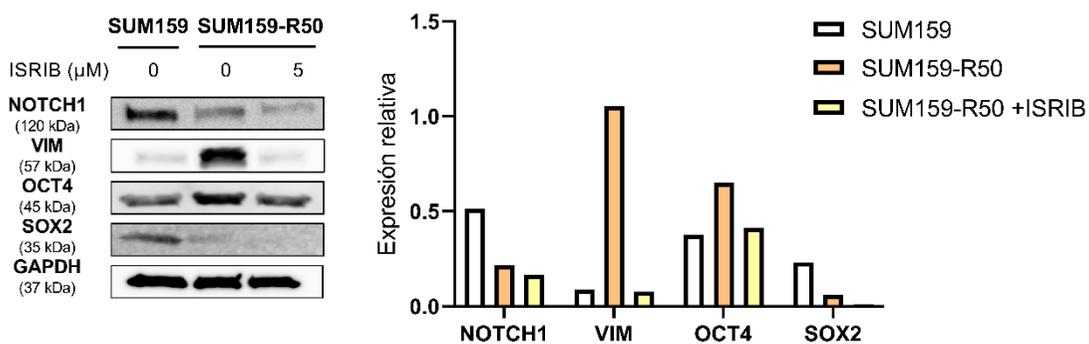


Figura 25. Western-Blot de SUM159 y SUM159-R50 tratadas o no con ISRIB 5 μM.

4.2 Objetivo 2. Desarrollo de nanopartículas biomiméticas recubiertas con células T agotadas y su evaluación *in vitro* e *in vivo*.

4.2.1 Síntesis, optimización y caracterización de las nanopartículas de PLGA y nanopartículas biomiméticas.

La primera fase de esta investigación se centró en la optimización de protocolo para la generación de NP de PLGA con un tamaño de alrededor de 200 nm, ya que éste es apropiado para poder albergar una gran carga de compuestos en su interior, pero lo suficientemente pequeño para no ser rechazado por el organismo. Las NP de PLGA se sintetizaron mediante una protocolo de evaporación de solvente de doble emulsión (W/O/W) anteriormente descrito con modificaciones (**Figura 26a**)¹²⁰.

El tamaño de las NP generadas fue determinado mediante dispersión dinámica de luz (DLS). Los resultados obtenidos revelaron que las NP de PLGA obtenidas tenían un diámetro medio de 193.5 ± 5.38 nm (**Figura 26 b, c**), con un índice de polidispersión (PDI) de 0.205.

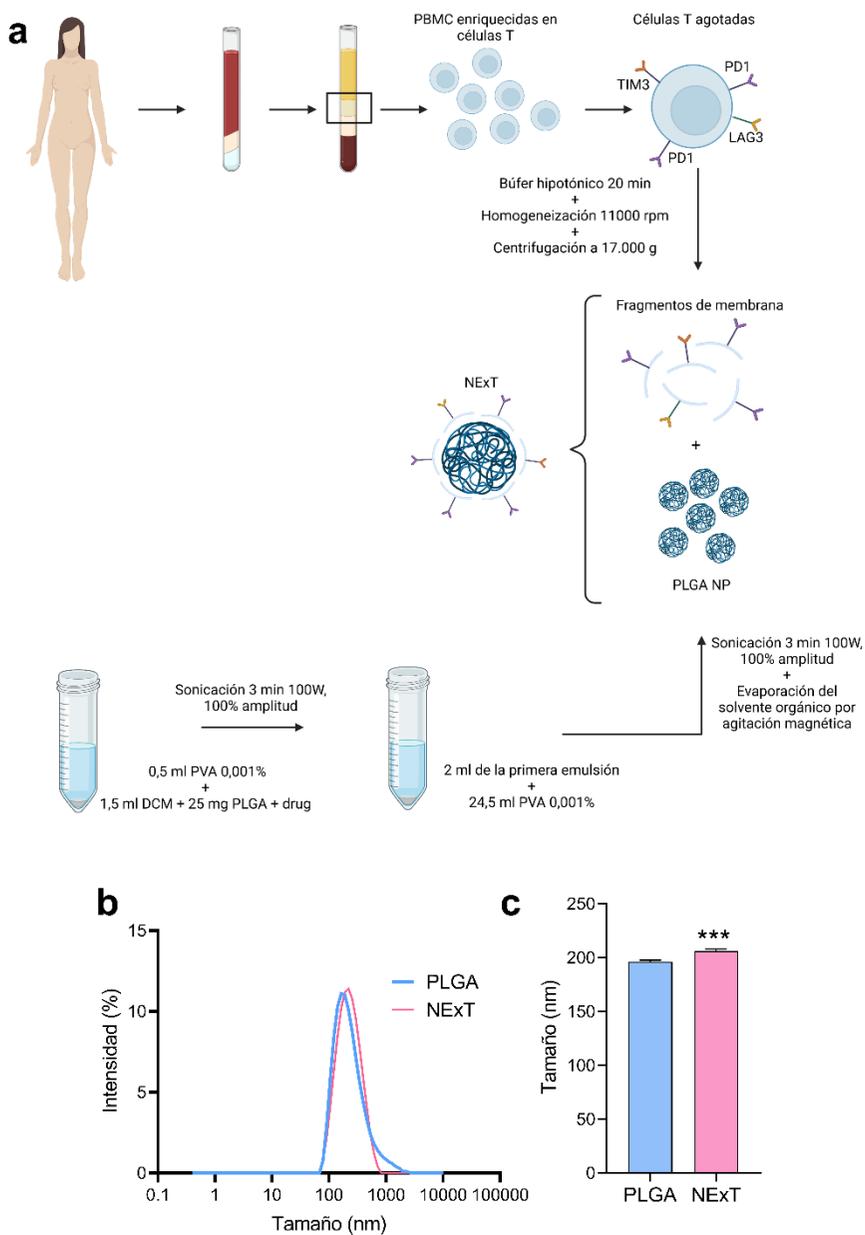


Figura 26. a, Esquema de la síntesis de NP de PLGA y de su recubrimiento con membranas de células T para generar NExT, **b**, Distribución de tamaño de las NP de PLGA y NExT. **c**, Tamaño medio de las NP de PLGA y NExT (n=3). Comparación con PLGA: ***p < 0.001.

A continuación, estos núcleos de PLGA se cubrieron con membranas de cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con TNBC para crear las NExT (**Figura 26a**). El protocolo de cultivo y expansión generó cultivos enriquecidos en células T con un 84% CD3+ y con números de células adecuados para el procedimiento de recubrimiento (**Figura 27**).

A continuación, mediante un ensayo de BCA para determinar el nivel de concentración de proteína de membrana, se determinó que se necesitaban 10 millones de PBMC para obtener 0,5 mg de proteína de membrana.

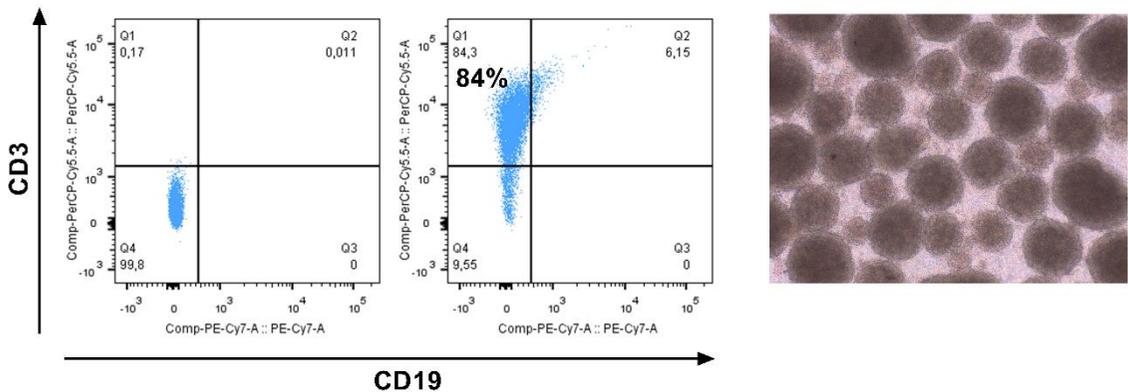


Figura 27. Diagrama de puntos representativos de citometría de flujo de PBMC para los marcadores CD3 y CD19 E Imagen representativa de un cultivo de PBMC enriquecido en células T.

Para optimizar el recubrimiento, este se llevó a cabo a diferentes condiciones de tiempos de sonicación (5, 10 y 15 min) (**Figura 28a**), concentración de membranas (1 y 2 mg/ml) (**Figura 28b**) y relación de volumen (1:1 y 1:2, PLGA:membranas en suspensión) (**Figura 28c**).

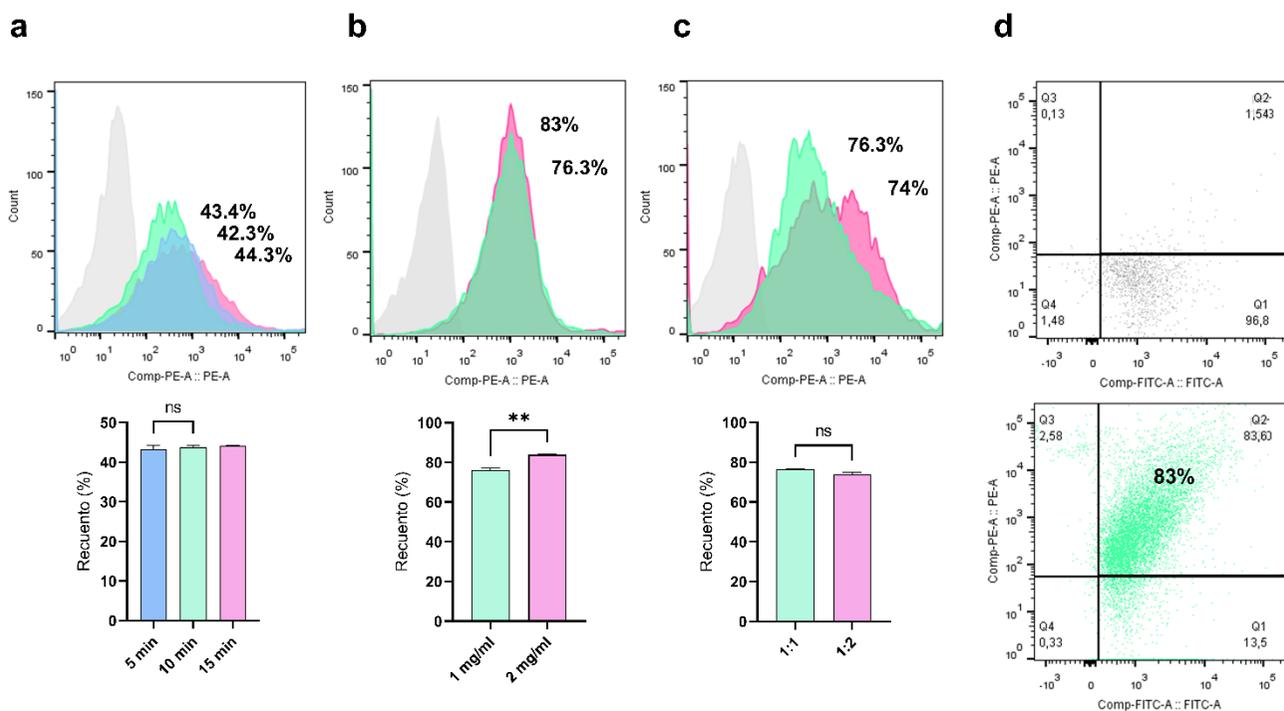


Figura 28. a, Histograma representativo de citometría de flujo y cuantificación de NExT recubiertas con membranas teñidas con DiL después de 5, 10 o 15 min de sonicación (n=2). b, Histograma representativo de citometría de flujo y cuantificación de NExT recubiertas con membranas teñidas con DiL a diferentes concentraciones de proteína: 1 o 2 mg/ml y cuantificación (n=2). c, Histograma representativo de citometría de flujo y cuantificación de NExT recubiertas con membranas teñidas con DiL en proporciones de volumen PLGA:membrana de 1:1 o 1:2 (n=2). d, Diagrama de puntos representativo de citometría de flujo de NP PLGA FITC+ y NExT FITC+ recubiertas con membranas teñidas con DiL. Los datos se representan como media \pm SEM. Comparación con el grupo control correspondiente **p<0.01.

Mientras que el incremento en el tiempo de sonicación y de la relación de volumen no generaron diferencias significativas en el recubrimiento, el aumento de la concentración de membrana si generó un incremento significativo, por lo que la eficiencia del recubrimiento se optimizó a concentraciones de NP de PLGA y membranas purificadas de 1 y 2 mg/ml,

respectivamente, con una relación de volumen núcleo:membrana de 1:1 y sonicación durante 5 min. El éxito del recubrimiento se verificó mediante la colocación de núcleos PLGA con FITC y membranas teñidas con DiI (**Figura 28d**), observando que un 83% de las NP se encuentran recubiertas.

El análisis fisicoquímico reveló que el recubrimiento de NExT generó un incremento significativo de entre 5 y 22 nm de diámetro, dando un tamaño medio de 207.72 ± 3.33 nm, un valor medio de PDI de 0.236 (**Figura 26a, b**). De nuevo, confirmamos el recubrimiento exitoso mediante la microscopía electrónica de transmisión (TEM) que mostró una estructura de núcleo-revestimiento típica de las BNP (**Figura 29a, b**). Además, el tamaño también fue similar a los medidos mediante DLS (NExT: 210-220 nm; PLGA: 180-200 nm), aportando robustez a los resultados.

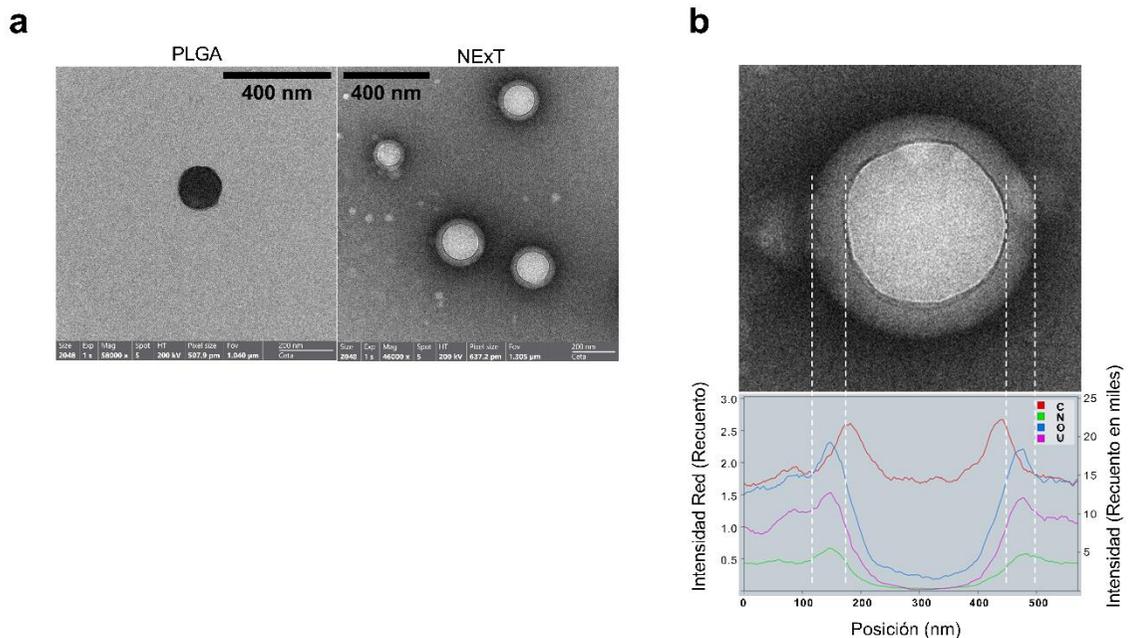


Figura 29. a, Imágenes de TEM de las NP de PLGA y NExT. **b,** Perfil de composición química de NExT por EDX. Carbono (rojo), nitrógeno (verde), oxígeno (azul) y uranio (rosa).

Mediante espectroscopía de dispersión de rayos X (EDX), se llevó a cabo un perfil de composición química, observándose elevados niveles de nitrógeno, oxígeno, carbono y uranio (utilizado para teñir el material biológico) en la periferia del núcleo, lo que evidencia la existencia de material biológico y confirma el adecuado recubrimiento de la membrana sobre el núcleo polimérico (**Figura 29b**).

Por otra parte, se midió la carga superficial (potencial ζ) de las NP de PLGA y NExT, encontrándose valores de -24.3 mV y -25.6 mV, respectivamente. Estos valores son muy similares a la carga superficial de la membrana pura de células T, que presenta un potencial ζ de -26.6 mV (**Figura 30**). Esta similitud en las cargas superficiales no solo confirma la presencia de la membrana de células T en las NP NExT, sino que también sugiere que las propiedades eléctricas inherentes de la membrana se han mantenido intactas durante el proceso de recubrimiento. Este mantenimiento de la carga negativa es crucial, ya que juega un papel fundamental en la interacción y estabilidad de las NP dentro del entorno biológico.

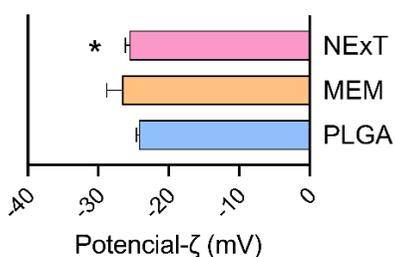


Figura 30. Potencial ζ en agua de las NP de PLGA y NExT y las membranas de células T purificadas (n=3). Comparación con PLGA: * $p < 0.05$.

El éxito del recubrimiento superficial y la pureza de las membranas de células T extraídas fueron validados mediante western blotting. Los resultados obtenidos mostraron un enriquecimiento significativo de la subunidad $\alpha 1$ de la proteína transmembrana Na^+/K^+ -ATPasa en las NP NExT y en las membranas puras de células T, en comparación con el lisado completo de linfocitos T.

Este hallazgo confirma que la membrana se ha integrado correctamente sobre NExT. Como era de esperar, también observamos la expresión de la proteína citosólica GAPDH en el lisado de células T, mientras que esta proteína no se detectó ni en las NExT ni en las membranas puras de células T (**Figura 31**). Esta ausencia de GAPDH en NExT y en las membranas puras refuerza la pureza de las muestras y sugiere que el proceso de extracción y recubrimiento no introdujo componentes citosólicos no deseados, asegurando así la especificidad del recubrimiento.

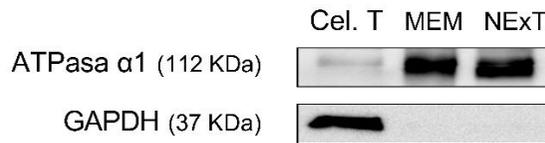


Figura 31. Western blot de la subunidad $\alpha 1$ de la ATPasa y GAPDH en células T, membranas purificadas y NExT.

Posteriormente, llevamos a cabo un análisis de la estabilidad de los núcleos de PLGA y NExT utilizando la técnica de DLS en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a lo largo de un período de 14 días.

Durante este periodo de tiempo, observamos en el tercer día de análisis, un aumento en el tamaño de las NP de PLGA en comparación con el tamaño inicial registrado el día cero (**Figura 32**). Esta tendencia de incremento en el

tamaño se mantuvo constante hasta la conclusión del experimento, el día 14. Sin embargo, este patrón no se replicó en el caso de NExT. A lo largo de todo el experimento, no se observó un cambio significativo en el tamaño de NExT, lo que sugiere una notable estabilidad de estas NP en comparación con los núcleos de PLGA. Estos resultados apuntan hacia una mayor resistencia y consistencia de las NExT frente a las condiciones de prueba, lo que respalda su potencial para aplicaciones de distribución de fármacos a largo plazo.

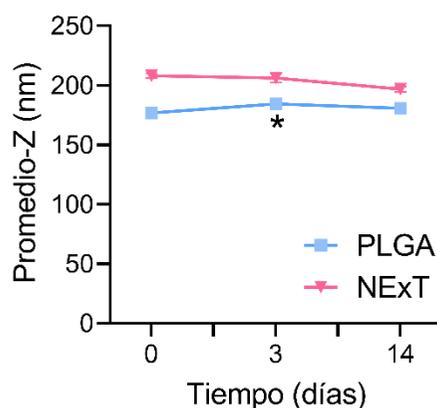


Figura 32. Representación gráfica del tamaño de las NP de PLGA y NExT en PBS durante 14 días (n=3). Comparación con día cero * $p < 0.05$

Para concluir la caracterización de las NP, llevamos a cabo la evaluación de los efectos de los núcleos de PLGA y NExT en la viabilidad de células SUM159 de TNBC.

Nuestros resultados revelaron una citotoxicidad insignificante en las concentraciones probadas, lo que confirma la ausencia de efectos adversos derivados tanto del PLGA como de las membranas celulares (**Figura 33**). Este hallazgo refuerza la seguridad y biocompatibilidad de las NP, respaldando su

potencial aplicación en terapias de administración de fármacos sin comprometer la viabilidad celular.

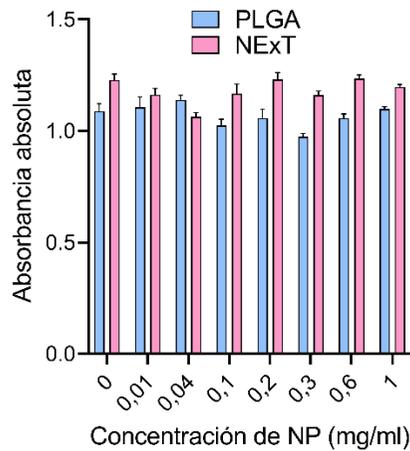


Figura 33. Toxicidad de las NP de PLGA y NExT en SUM159 a diferentes concentraciones (0-1 mg/ml) (n=6).

4.2.2 Aumento, preservación y orientación de los receptores de puntos de control inmunitarios en la superficie de NExT

Con el objetivo de determinar el momento óptimo para aislar las membranas de células T agotadas (ExT) para su posterior recubrimiento de NP, llevamos a cabo un estudio centrado en la expresión de los marcadores de punto de control inmunitario (IC) PD1, LAG3, TIM3 y TIGIT, conocidos por estar asociados con el agotamiento de células T.

Para ello, implementamos un modelo de activación aguda utilizando TransAct (10 μ l/ml) en cultivos enriquecidos en células T derivadas de PBMC

de pacientes con TNBC y procedimos a medir los niveles de expresión en intervalos de tiempo de 0, 24, 48 y 72 h (**Figura 34**). TransAct es un reactivo utilizado para la activación policlonal de células T, simulando señales de activación similares a las que ocurren en una respuesta inmune natural, mediante la activación de las moléculas CD3 y CD28 en la superficie de células T.

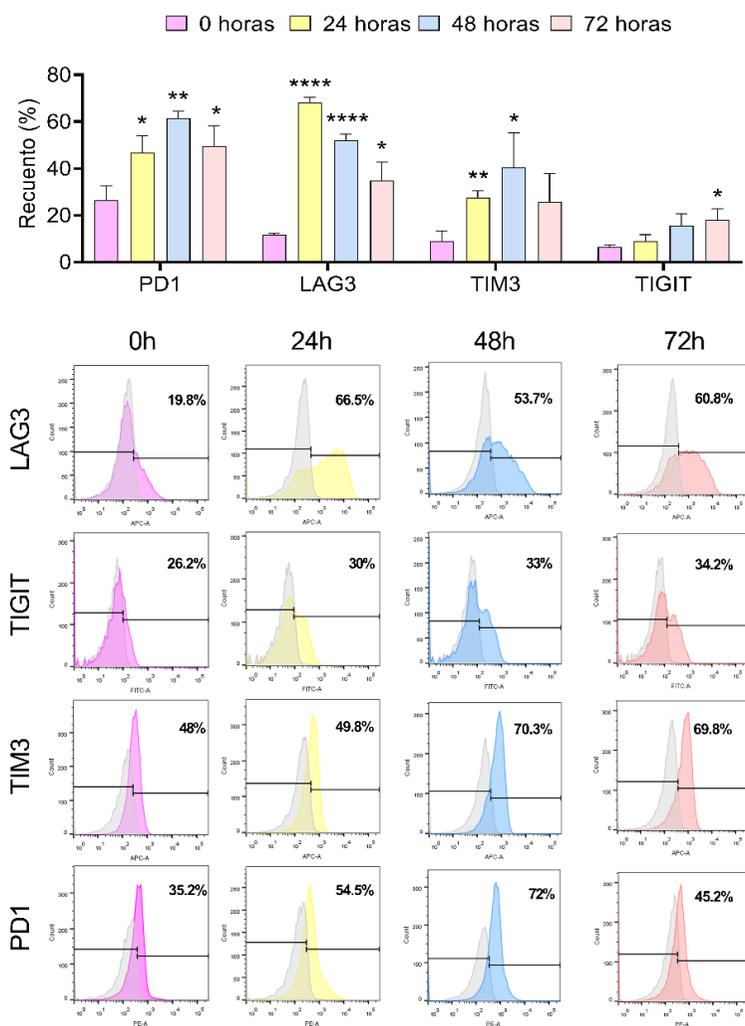


Figura 34. Niveles de LAG3, TIGIT, TIM3 y PD1 medidos por citometría de flujo en cultivos enriquecidos con células T después de la activación con TransAct a las 0, 24, 48 o 72 h (n=4 pacientes) e histogramas representativos. Comparación con niveles basales (0 h) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, y **** $p < 0.0001$.

Encontramos los niveles de expresión más altos a las 24 h para LAG3 y 48 h para TIGIT, TIM3, y PD1, siendo estos los puntos de tiempo seleccionados para aislar las membranas de ExT para el recubrimiento posterior de núcleos de PLGA.

Dado los niveles de expresión observados en el experimento anterior, PD1, LAG3, TIM3 y TIGIT se evaluaron en diferentes cultivos enriquecidos en células T de PBMC de pacientes con TNBC activados y recogidos a 24 y 48 h. Encontramos que aproximadamente el 64% de las células T expresaban PD1, seguido por un 43% que expresaba LAG3, un 55% con expresión de TIM3, y solo un 6% que mostraba expresión de TIGIT (**Figura 35a**).

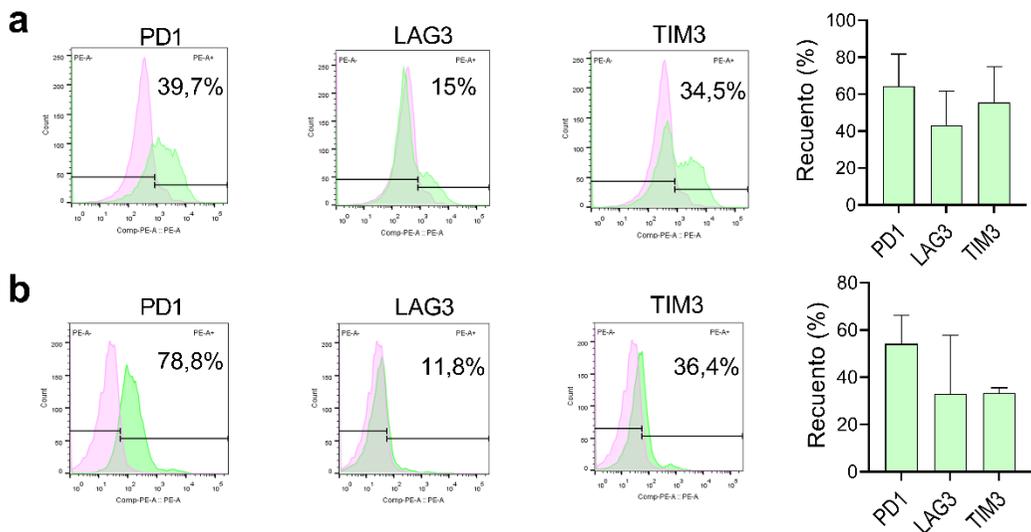


Figura 35. a, Histogramas de citometría de flujo representativos y cuantificación de los niveles de PD1, LAG3, TIM3 y TIGIT en la superficie de células T, y **b**, NExT reactivados con TransAct y recolectados a 24 y 48 h (n=3).

Confirmamos además la preservación, integridad y orientación adecuada de los receptores PD1, LAG3 y TIM3 después del aislamiento de membranas de ExT y el recubrimiento de NExT de cultivos enriquecidos en células T de

otros pacientes con TNBC. Sin embargo, los bajos niveles de TIGIT en las células T generaron que apenas se encontrase en la superficie de NExT.

Similar al perfil obtenido en ExT, encontramos que PD1 era el receptor más prevalente en la superficie de NExT (~50%), seguido por TIM3 (~30%), LAG3 (~27%) y TIGIT (2%) (**Figura 35b**). Un examen adicional de la intensidad de fluorescencia media normalizada reveló cantidades consistentes de los receptores de puntos de IC en NExT comparables a las de ExT (**Figura 36**).

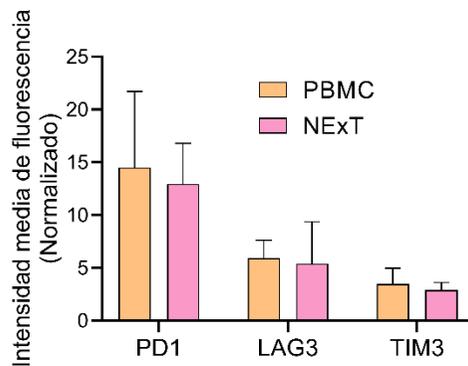


Figura 36. MFI normalizada de PD1, LAG3 y TIM3 (n=3).

4.2.3 Especificidad de NExT en células TNBC con expresión de PDL1

Teniendo en cuenta que PD1 presentaba los mayores niveles de expresión y los más consistentes en NExT, planteamos la hipótesis de que la interacción PD1/PDL1 podría ser un mecanismo primordial para la administración dirigida específica y acumulación intratumoral de NExT.

Para probar esta hipótesis, inicialmente examinamos los niveles de PDL1 en varias líneas celulares de cáncer de mama y encontramos que todas las

células TNBC probadas mostraron una mayor expresión basal e inducida por IFN γ de PDL1 que MCF7 (ER+), como era de esperar¹²¹. Entre estas, las células SUM159 y MDA-MB-231 exhibieron la mayor expresión (**Figura 37**). Estos resultados subrayan el potencial del bloqueo de la vía PD1/PDL1 en el microambiente tumoral de TNBC y sugieren un posible mecanismo de acumulación dirigida de las NExT en estos entornos tumorales altamente expresivos de PDL1.

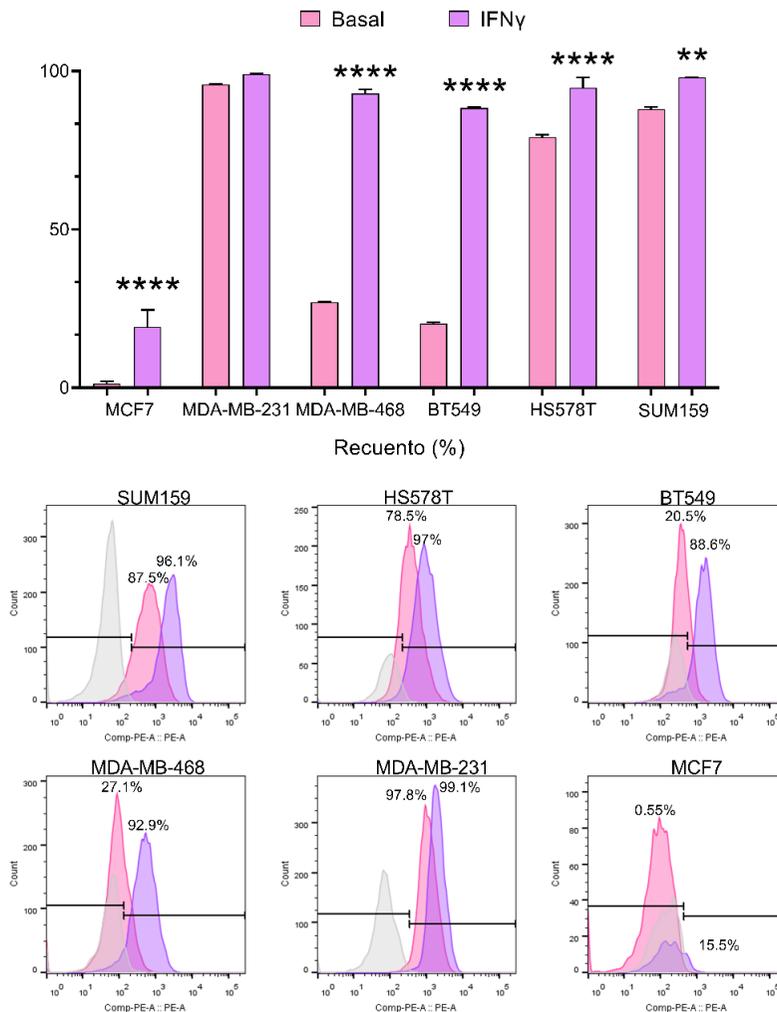


Figura 37. Niveles de PDL1 en diferentes líneas de cáncer de mama en condiciones basales y tras la inducción con IFN γ (100ng/ml) durante 24 h. Comparación con las condiciones basales:

** $p < 0.01$, y **** $p < 0.0001$

Para evaluar la especificidad de NExT y su capacidad para dirigirse a células tumorales PDL1^{high}, tratamos células SUM159 con NExT cargado con coumarina-6 y núcleos de PLGA sin recubrir.

Como resultado, encontramos una dirección de la administración más rápida y un mayor número de células positivas para coumarina-6 después del tratamiento con NExT durante 5 y 15 min (93.63% y 99.38%, respectivamente) en comparación con PLGA (33.42% y 43.46%, respectivamente). El tratamiento dirigido fue aumentando hasta que a los 30 min el 100% de las células fueron marcadas por las NP en ambos grupos (**Figura 38**).

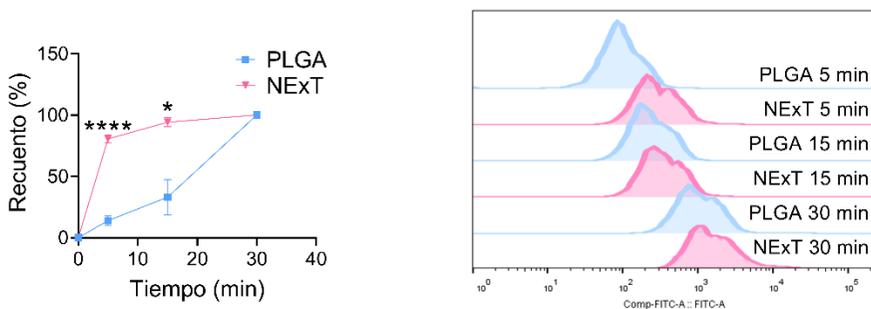


Figura 38. Cuantificación e histogramas representativos de citometría de flujo de las células positivas para coumarina-6 después del tratamiento con PLGA o NExT durante 5 y 15 min en células SUM159 (n=2 pacientes). Comparación con PLGA: *p < 0.05 y ****p < 0.0001.

Para profundizar en la validación de nuestra hipótesis, investigamos la capacidad de administración dirigida diferencial de NExT. Por un lado, con condiciones de baja (sin IFN γ) y alta (con IFN γ) expresión de PDL1 en células MDA-MB-468 y por otro lado con condiciones de baja (NNaT: NP recubiertas con células T sin activar) y alta (NExT) expresión de PD1 en las membranas usadas para recubrir las NP de PLGA cargadas con coumarina-6. Seleccionamos la línea MDA-MB-468, por exhibir una respuesta muy

significativa a $\text{IFN}\gamma$ en términos de expresión de PDL1 (~95%) en comparación con los niveles basales (~20%) (**Figura 39**).

El tratamiento con NNaT (PDL1^{low}) sin estimulación con $\text{IFN}\gamma$ (PDL1^{low}) logró el menor número de células positivas (~20%). Por el contrario, el tratamiento con NExT ($\text{PDL1}^{\text{high}}$) sin estimulación con $\text{IFN}\gamma$ (PDL1^{low}) promovió un mayor número de células marcadas (~40%), que fue similar al tratamiento con NNaT y estimulación con $\text{IFN}\gamma$ ($\text{PDL1}^{\text{low}}/\text{PDL1}^{\text{high}}$). Como esperábamos, el mayor número de células marcadas (~70%) resultó del tratamiento con NExT y la activación con $\text{IFN}\gamma$ ($\text{PDL1}^{\text{high}}/\text{PDL1}^{\text{high}}$) (**Figura 39**).

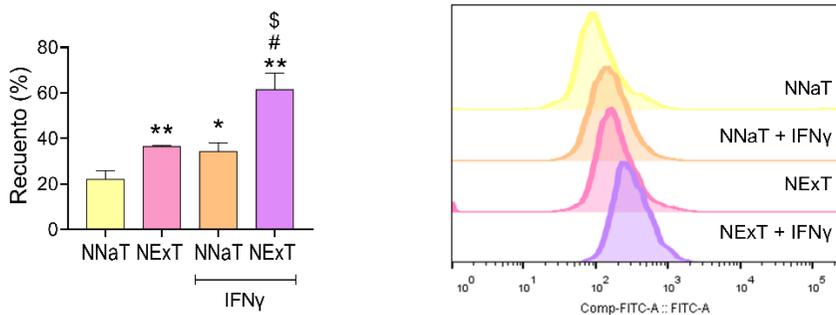


Figura 39. Cuantificación e histogramas representativos de citometría de flujo de las células positivas para cumarina-6 después del tratamiento con NP de PLGA recubiertas con membranas de cultivos enriquecidos con células T (NNaT) o NExT en células MDA-MB-468 estimuladas o no con $\text{IFN}\gamma$ (100 ng/ml durante 24 h) durante 15 min (n=2 pacientes). Comparación con NNaT: * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$; Comparación con NExT: \$ $p < 0.05$; Comparación con NNaT + $\text{IFN}\gamma$: # $p < 0.05$.

Por otra parte, llevamos a cabo la modificación de dos líneas de leucemia para aumentar la expresión de PDL1: Namalwa y Nalm7, obteniendo unos niveles alrededor del 90% de PDL1 tras la transducción (**Figura 40**). De esta

forma, podríamos comparar de nuevo la administración dirigida de NExT en condiciones de diferente expresión de PDL1.

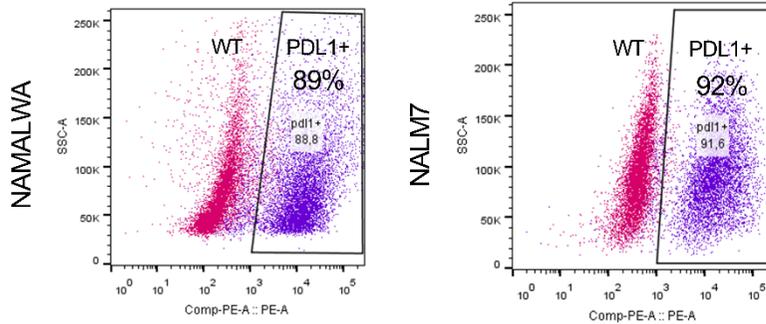


Figura 40. Diagrama de puntos de citometría de flujo representativo de los niveles de PDL1 en Namalwa y Nalm7 en condiciones basales (rosa) y tras la transducción (lila).

En primer lugar, en la línea Namalwa se seleccionaron tiempos de tratamiento con NExT similares a los tiempos que se habían utilizado con SUM159 y MDA-MB-468 observando tanto a 5 (~10% vs ~20%) como 15 min (~10% vs ~30%) que había un incremento en la administración dirigida tras la modificación genética, sin embargo, los niveles eran muy inferiores al resto de experimentos.

Por ello, en el siguiente experimento con Nalm7 aumentamos los tiempos hasta 30 y 60 min, donde vimos de nuevo este incremento en el tratamiento dirigido (~80%) con respecto al WT (~50%) (**Figura 41**).

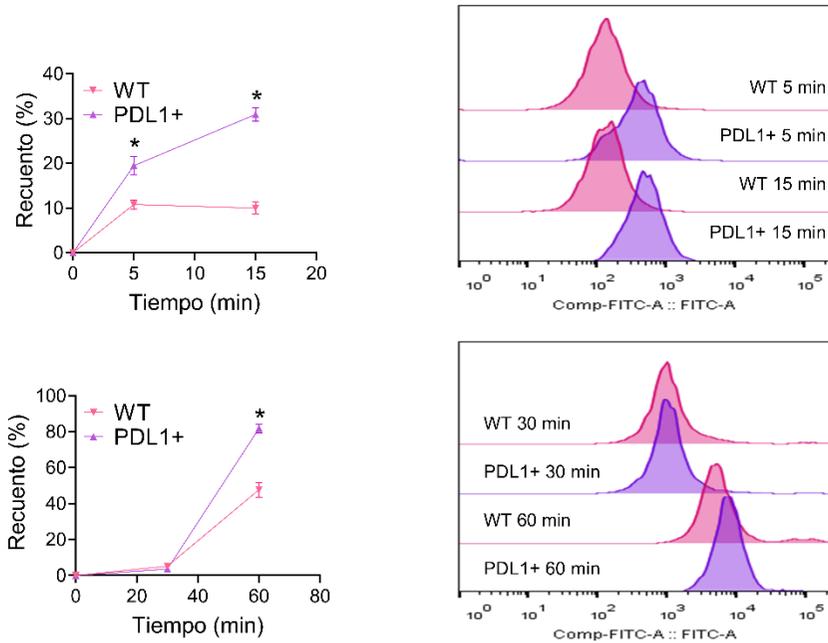


Figura 41. Cuantificación e histogramas representativos de citometría de flujo de células positivas para curcumina-6 después del tratamiento con PLGA o NExT en células Namalwa (WT y PDL1+) tratadas durante 5 y 15 min, y en células Nalm7 (WT y PDL1+) tratadas durante 30 y 60 min (n=2 pacientes). Comparación con WT: *p < 0.05.

Finalmente, validamos nuestra hipótesis mediante un experimento de rescate en células MDA-MB-468 tratadas con NExT cargadas con curcumina-6, con IFN γ y con el anticuerpo anti-PDL1 atezolizumab, que está aprobado por la FDA como IT para TNBC.

Como era de esperar, atezolizumab bloqueó eficientemente tanto los niveles basales como los inducidos por IFN γ de PDL1 (**Figura 42**), disminuyéndolo hasta prácticamente 0% en el primer caso, y volviendo a niveles basales (~30%) en el segundo.

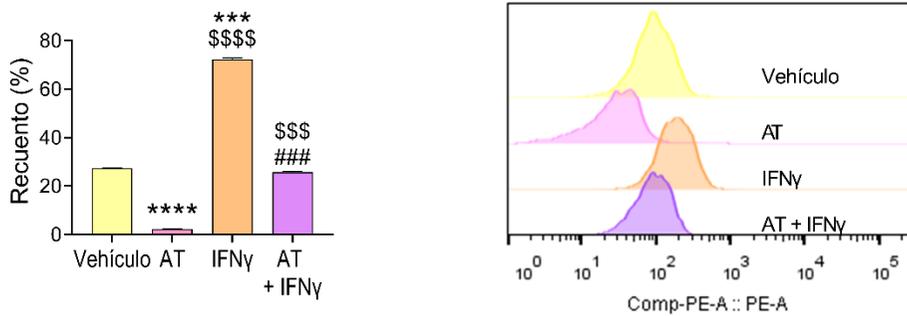


Figura 42. Cuantificación e histogramas representativos de citometría de flujo de los niveles de PDL1 en células MDA-MB-468 estimuladas o no con IFN γ (100 ng/ml durante 24 h) y bloqueadas o no con atezolizumab (AT) (10 μ g/ml durante 24 h) durante 15 min (n=2 pacientes). Comparación con Vehículo: ***p < 0.001 y ****p < 0.0001; Comparación con AT: \$\$\$p < 0.001 y \$\$\$p < 0.001 y p < 0.0001; Comparación con IFN γ : ###p < 0.001.

Estos resultados se reflejaron en la capacidad de NExT de alcanzar las células tumorales tratadas con atezolizumab. Como resultado, el número de células positivas para coumarina-6 marcadas por NExT después de la estimulación con IFN γ (~70%) se redujo a niveles basales (~35%) después del tratamiento con atezolizumab (**Figura 43**), mientras que en ausencia de IFN γ (30%) se redujeron hasta un 20%.

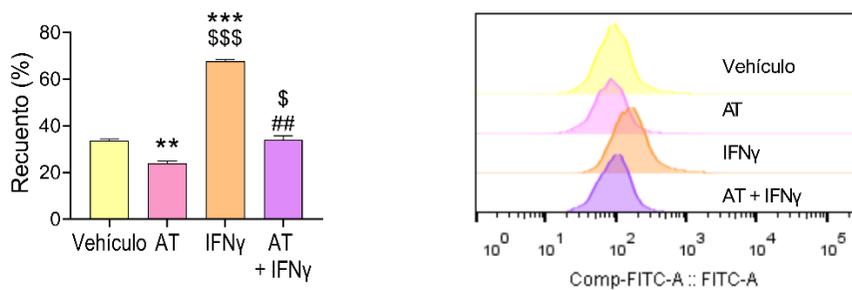


Figura 43. Cuantificación e histogramas representativos de citometría de flujo de las células positivas para coumarina-6 después del tratamiento con NExT en células MDA-MB-468 estimuladas o no con IFN γ (100 ng/ml durante 24 h) y bloqueadas o no con atezolizumab (AT) (10 μ g/ml durante 24 h) durante 15 min (n=2 pacientes). Comparación con Vehículo: **p < 0.01 y ***p < 0.001; Comparación con AT: \$p < 0.05 y \$\$\$p < 0.001; Comparación con IFN γ : ##p < 0.01.

Todos estos resultados en conjunto confirman de manera concluyente que la interacción PD1/PDL1 desempeña un papel crucial en la administración dirigida específica de las NExT hacia las células tumorales con alta expresión de PDL1, validando así nuestra hipótesis inicial.

Finalmente, nuestros resultados revelaron que las células SUM159 tratadas con NExT mostraron una menor tinción con anticuerpo anti-PDL1 en comparación con el control (**Figura 44**), posiblemente como consecuencia del bloqueo del marcador al unirse específicamente a nuestras NP. En general, estos resultados respaldan que la interacción PD1/PDL1 podría ser el mecanismo primario de NExT para administrar dirigidamente a células tumorales y además demuestran un posible efecto inmunoterapéutico intrínseco en NExT.

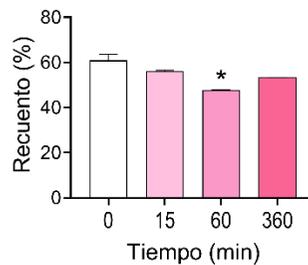


Figura 44. Niveles de PDL1 en SUM159 tratadas con NExT durante 0, 15, 60, y 360 min. Comparación con niveles basales: * $p < 0.05$.

4.2.4 Encapsulación de fármacos y evaluación de la liberación y eficacia terapéutica *in vitro* de NExT

Para evaluar la eficacia de la administración dirigida de fármacos a células cancerosas de NExT cargado con quimioterapia, formulamos NP de PLGA cargadas con DOC, DOX y EPI. La caracterización fisicoquímica, eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (LC) se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Caracterización de NP de PLGA con DOC, DOX y EPI.

Fármaco	Promedio-Z (nm)	Potencial ζ (mV)	PDI	EE (%)	LC (%)
DOC	190.6 \pm 5.2	-16.5 \pm 0.15	0.12 \pm 0,05	80 \pm 15.52	16.05 \pm 2.61
DOX	165.1 \pm 1.13	-29.3 \pm 3.7	0.05 \pm 0.03	9.9 \pm 0.98	0.78 \pm 0.10
EPI	194.3 \pm 10.8	-24.3 \pm 0.8	0.09 \pm 0.01	8.1 \pm 1.25	0.64 \pm 0.08

Como observamos, se obtuvieron tamaños de NP similares de entre 165 y 195 nm, así como un potencial ζ entre -16 y -29 mV y un PDI entre 0,05 y 0,12.

Es importante destacar que la EE fue relativamente baja en el caso de las antraciclinas (8,1% y 9,9%), aunque suficientes para los ensayos *in vitro*. Sin embargo, en el caso del DOC logramos optimizar la eficiencia hasta alcanzar un 80% de encapsulación mediante un cambio en el protocolo de síntesis de NP. Este protocolo, no alteró el tamaño ni la carga superficial de las NP, que se mantuvo similar al de los otros fármacos o las NP vacías vistas anteriormente. Este proceso de mejora de la EE se llevó a cabo porque, además de los experimentos *in vitro*, planeamos realizar experimentos *in vivo* que requieren cantidades superiores de fármaco.

A partir de estos núcleos de PLGA, preparamos NExT con quimioterapia e investigamos las cinéticas de liberación acumulativa de ambas durante 14 días. Nuestros hallazgos revelaron un patrón de liberación de fármacos que se asemeja al perfil bifásico típico observado en NP de PLGA, con una liberación general más lenta para el DOC (alrededor del 30% en las primeras 24 h) que para las antraciclinas (alrededor del 50% en 24 h).

Además, tal y como se esperaba, se observó una liberación más gradual en NExT (**Figura 45**). Estos hallazgos resaltan la capacidad de NExT para proporcionar una liberación controlada y sostenida de los agentes quimioterapéuticos, lo que podría traducirse en una mayor eficacia terapéutica y una reducción de los efectos secundarios no deseados.

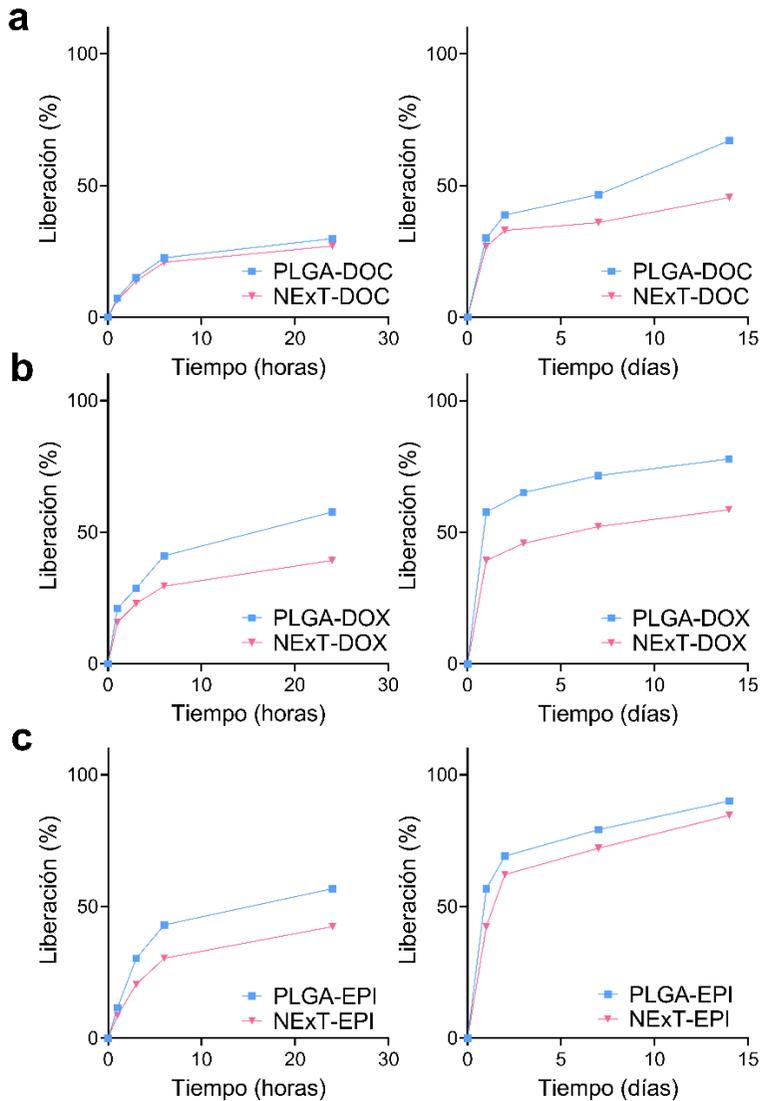


Figura 45. a, Liberación *in vitro* de DOC, b, DOX, y c, EPI durante 1, 3, 6 y 24 h (izquierda), y 1, 3, 7 y 14 días (derecha) en PBS Tween (0.1%) (pH 7.4) a 37°C.

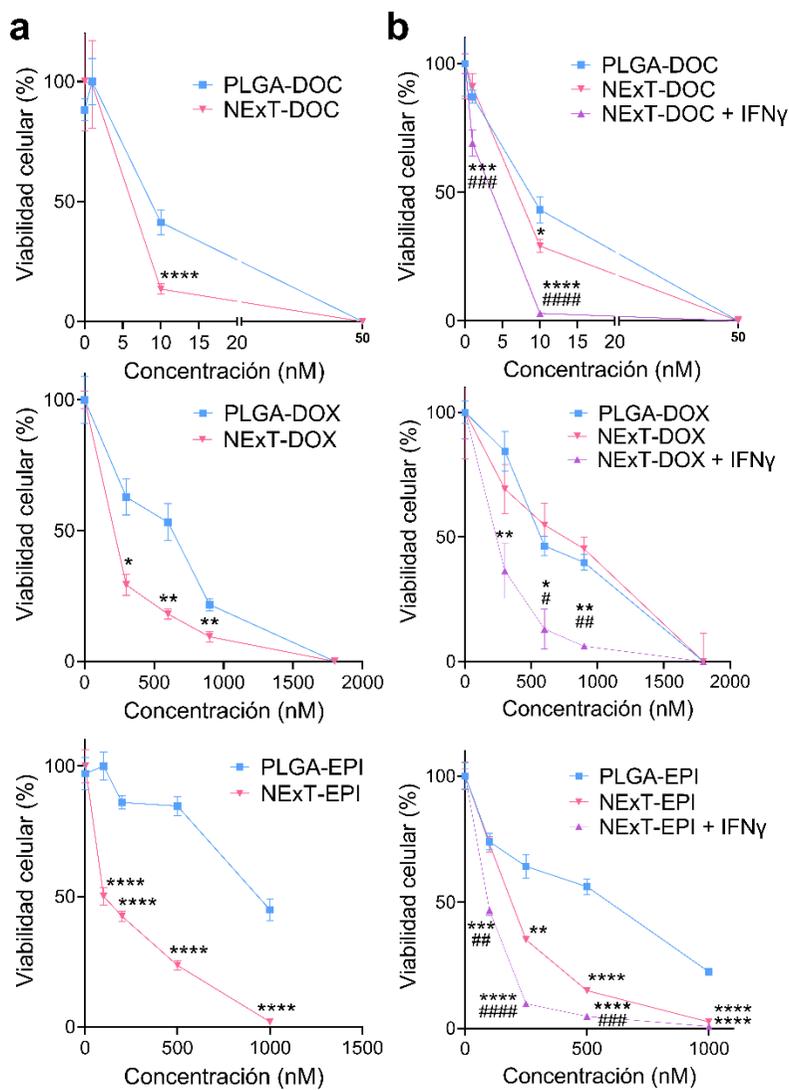


Figura 46. a, Proliferación celular de células SUM159 y **b**, células MDA-MB-468, estimuladas o no con IFN γ (100 ng/ml), tratadas con NP de PLGA y NExT cargadas con DOC, DOX y EPI durante 48 h (n=6). Comparación con PLGA: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 y ****p < 0.0001; Comparación con NExT: #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001 y ####p < 0.0001.

La evaluación de los efectos antiproliferativos de DOC, DOX y EPI cargados en núcleos de PLGA y NExT se realizó en células SUM159 y MDA-MB-468. El tratamiento con NExT cargado con DOC, DOX y EPI redujo

notablemente la viabilidad de las células SUM159 a los 3 días en comparación con estos fármacos encapsulados en PLGA (**Figura 46a**).

De manera similar, la citotoxicidad de DOC y EPI en células MDA-MB-468 mostró un aumento cuando se administraron a través de NExT (**Figura 46b**), mientras que no se notó una diferencia discernible para DOX. Sin embargo, se observó un incremento en su eficacia terapéutica tras la estimulación con IFN γ al igual que con el resto de compuestos. Estos resultados resaltan el potencial de las NExT como vehículos eficaces para la administración dirigida de quimioterapia

4.2.5 Evaluación de la toxicidad y perfil de biodistribución de NExT *in vivo*

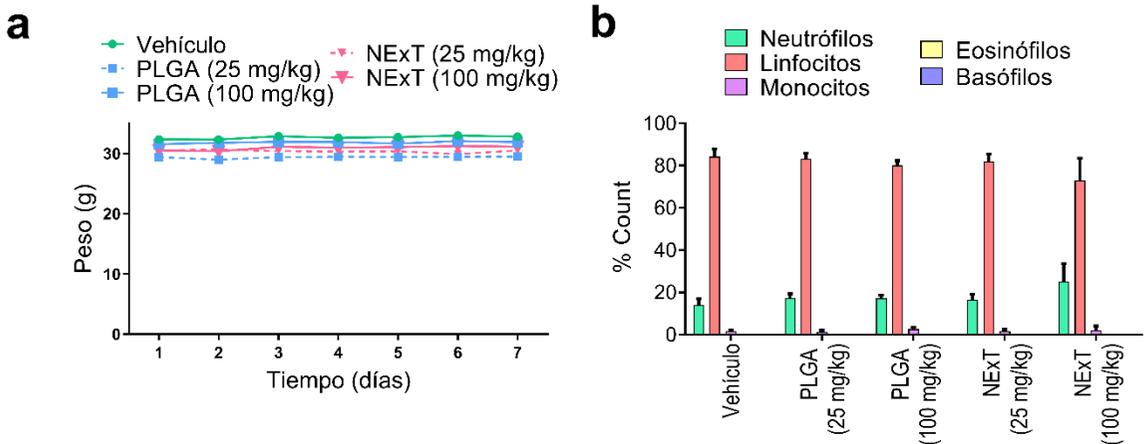


Figura 47. a, Representación gráfica del seguimiento del peso corporal de los ratones CD1 tratados con PLGA y NExT a dosis de 25 y 100 mg/kg durante una semana. **b**, Representación gráfica de la fórmula leucocitaria de ratones CD1 tratados con PLGA y NExT a dosis de 25 y 100 mg/kg (n=3).

La plataforma NExT derivada de pacientes autólogos se concibe como un vehículo para la nanoterapia adoptiva que debe exhibir buenos perfiles de bioseguridad para futuras aplicaciones en humanos. En busca de este objetivo, se evaluó la toxicidad *in vivo* mediante análisis histopatológicos y hematológicos en ratones CD1 inyectados por vía intravenosa con 25 mg/kg o 100 mg/kg de NExT y PLGA. Los animales tratados con NP no mostraron cambios significativos en el peso corporal (**Figura 47a**) ni en la fórmula leucocitaria (**Figura 47b**).

Para profundizar en la posible toxicidad de los núcleos de PLGA y NExT se llevaron a cabo analíticas de sangre de los ratones y se evaluaron parámetros hematológicos como recuento de glóbulos blancos (WBC), recuento de glóbulos rojos (RBC), hemoglobina (Hgb), hematocrito (HCT), volumen corpuscular (MCV), hemoglobina corpuscular (MCH), concentración de hemoglobina corpuscular (MCHC) y plaquetas (PLT), en los que tampoco se observaron diferencias significativas (**Tabla 4**).

Tabla 4. Parámetros hematológicos en ratones tras el tratamiento con PLGA y NExT a dosis de 25 y 100 mg/kg (n=3).

Parámetro	Control	Vehículo	PLGA (25 mg/kg)	PLGA (100 mg/kg)	NExT (25 mg/kg)	NExT (100 mg/kg)
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	2.33 \pm 0.5	4.23 \pm 1.1	2.63 \pm 0.7	4.93 \pm 0.5	4.37 \pm 1.3	4.23 \pm 1.6
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	7.23 \pm 0.4	8.07 \pm 0.5	6.37 \pm 2.2	7.74 \pm 0.4	7.89 \pm 0.2	7.31 \pm 0.7
Hgb (g/dl)	13.4 \pm 0.85	14.13 \pm 0.5	12.40 \pm 3.2	13.70 \pm 0.4	14.03 \pm 0.6	12.70 \pm 1.7
HCT (%)	40.9 \pm 1.95	44.43 \pm 2.2	36.03 \pm 13.7	43.07 \pm 2.1	43.87 \pm 1.6	40.73 \pm 3.6

MCV (fL)	56.6±0.79	55.10±1.9	56.17±2.1	56.25±0.9	55.63±2.2	55.67±0.7
MCH (pg)	18.6±0.23	17.57±0.6	20.17±2.9	17.40±1.1	17.80±0.7	17.30±1.0
MCHC (g/dl)	32.8±0.49	31.80±0.4	36.10±6.8	31.87±1.2	32.00±0.1	31.10±1.9
PLT (×10³/μl)	739±321	1061±103	593±427	975±211	932±74	589±468

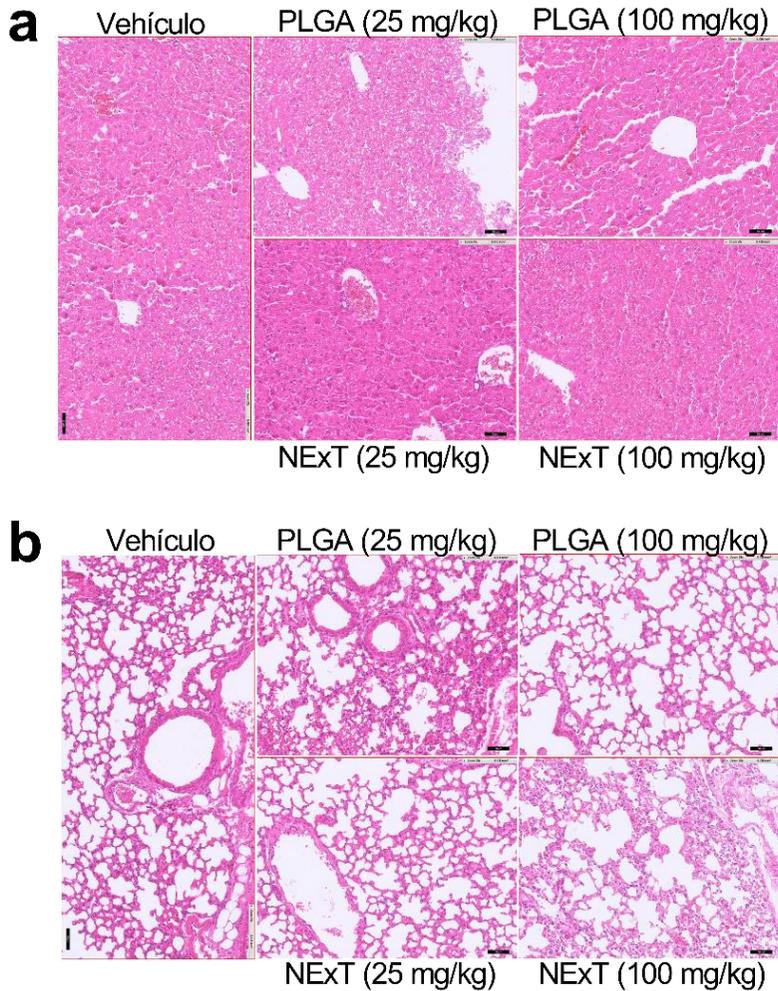


Figura 48. a, Imágenes representativas de hígados y b, pulmones teñidos con hematoxilina/eosina (H&E) de ratones CD1 tratados con Vehículo, PLGA vacío (25 y 100 mg/kg) y NExT vacío (25 y 100 mg/kg) (n=3 ratones/grupo). Barra de escala = 50 μm.

Finalmente, se buscaron alteraciones histopatológicas en órganos como el hígado (**Figura 48a**) o los pulmones (**Figura 48b**) de estos ratones tratados con NP en comparación con el grupo de vehículo, observando la ausencia de patrones patológicos en las mismas.

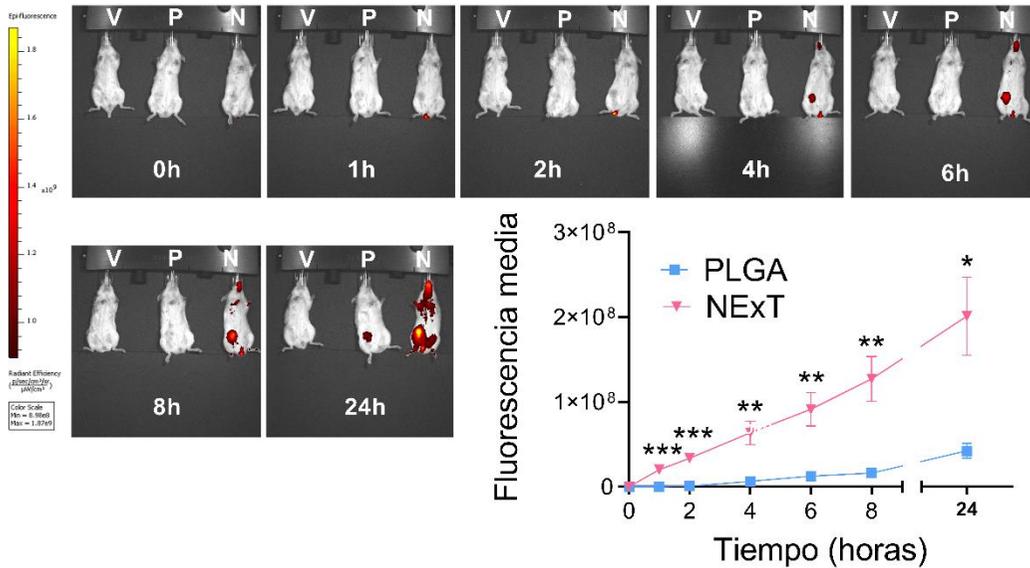


Figura 49. Imágenes representativas y cuantificación *in vivo* de la acumulación intratumoral de fluorescencia en ratones con xenoinjertos de SUM159 tratados con PLGA cargado con IR780 (P), NEXT (N) o Vehículo (V) durante 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h (n=6 ratones/grupo). Comparación con el grupo PLGA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

La eficacia de NEXT para alcanzar y acumularse en el tejido tumoral se examinó mediante la biodistribución *in vivo* de NEXT y PLGA cargados con IR780 inyectados por vía intravenosa en un modelo xenógrafo ortotópico de ratón generado a partir de la línea celular SUM159.

Las imágenes de fluorescencia *in vivo* revelaron una acumulación y penetración más rápida y selectiva en el sitio tumoral de NEXT que de PLGA,

de hecho, la fluorescencia del grupo NExT fue detectable tan pronto como 1 h después de la inyección sin disminución durante el tiempo de prueba. A las 24 h, la fluorescencia fue más de 5 veces mayor que la de PLGA. En contraste, PLGA exhibió una distribución intratumoral más lenta y baja, con fluorescencia solo detectable a partir de las 4 h (**Figura 49**).

A las 24 h, los ratones se sacrificaron y se midió la fluorescencia en los órganos corazón, pulmón, hígado, riñones y bazo, así como en el tejido tumoral. El análisis de tejidos *ex vivo* mostró un patrón de biodistribución similar entre NExT y PLGA en los principales órganos, siendo el hígado y los pulmones los más marcados en ambos casos, pero destacando una localización mucho más elevada en el tumor en el caso de NExT (**Figura 50**), demostrando una eficacia y precisión de la plataforma en la entrega dirigida a los tumores.

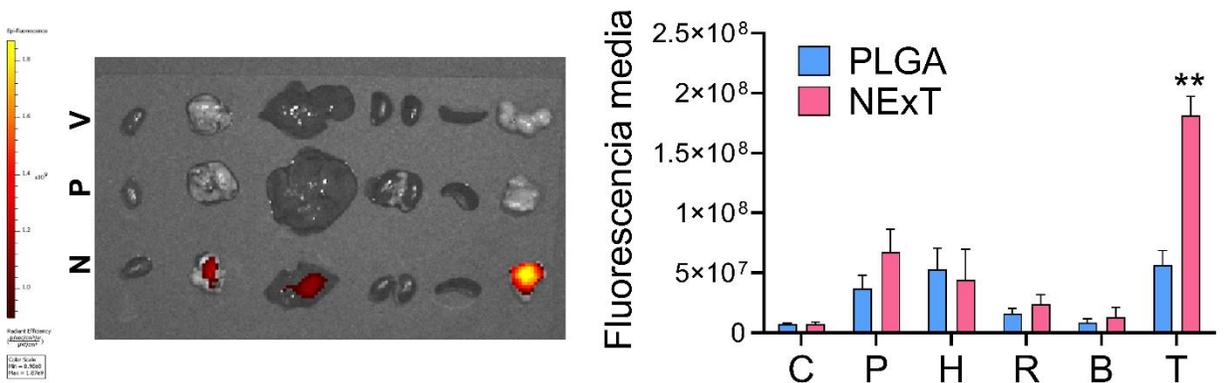


Figura 50. Imágenes representativas y cuantificación de fluorescencia en los órganos (Corazón: C; Pulmón: P; Hígado: H; Riñones: R; Bazo: B) y tumor (T) de ratones tratados con PLGA cargado con IR780 (P), NExT (N) o Vehículo (V) durante 24 h (n=6). Comparación con el grupo PLGA: ** $p < 0.01$.

4.2.6 Actividad terapéutica *in vivo* de NExT en un modelo PDL1+ PDX de TNBC

Dado que NExT ha demostrado una acumulación intratumoral excepcional y una notable eficacia terapéutica en células de TNBC con expresión de PDL1+, hemos llevado a cabo investigaciones adicionales para explorar más a fondo el potencial terapéutico de NExT derivado de pacientes autólogos.

En este contexto, utilizamos un modelo xenógrafo de tumor PDL1+ derivado de una paciente (PDX) con TNBC (UGR01) en ratón inmunodeprimido. Este enfoque nos permitió evaluar de manera más precisa y detallada la capacidad de NExT para infiltrarse en el tumor y ejercer su efecto terapéutico en un entorno que simula las condiciones clínicas de la paciente.

La inmunohistoquímica y la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) confirmaron que el modelo de UGR01 mantenía las características histológicas de TNBC con respecto a la paciente de origen (**Figura 51a**). Además, mediante el uso de microscopía confocal se pudo observar que el tejido PDX presentaba una expresión positiva de PDL1 (**Figura 51b**). Este estado de PDL1+ es particularmente relevante, ya que puede predecir una respuesta favorable al tratamiento con la terapia encapsulada en NExT.

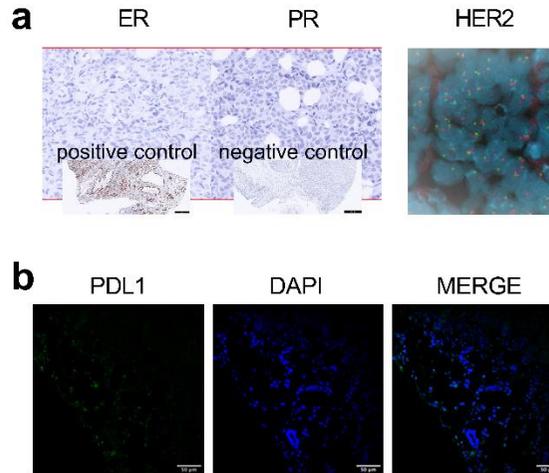


Figura 51. a, Inmunohistoquímica de ER y PR y evaluación de la amplificación negativa de HER2 mediante FISH, mostrando dos copias del gen (rojo) y centrómero 17 (verde) por núcleo (azul). Barra de escala = 500 μm . **b,** Imágenes representativas de microscopía confocal de PDL1 (verde) en el modelo PDX (UGR01) (objetivo óptico original: 40 \times). Barra de escala = 50 μm .

A continuación, los ratones portadores de PDX (n=5 por grupo) fueron sometidos a un régimen de inyecciones con DOC, administrado tanto en su forma libre como encapsulado en PLGA y en NExT.

La dosis administrada fue de 5 mg/kg en los días 0, 3, 7 y 10, alcanzando una dosis total acumulada de 20 mg/kg y. Los cambios en el tamaño del tumor fueron monitoreados meticulosamente hasta el día 14 (**Figura 52**), permitiendo una evaluación detallada de la eficacia terapéutica de cada formulación.

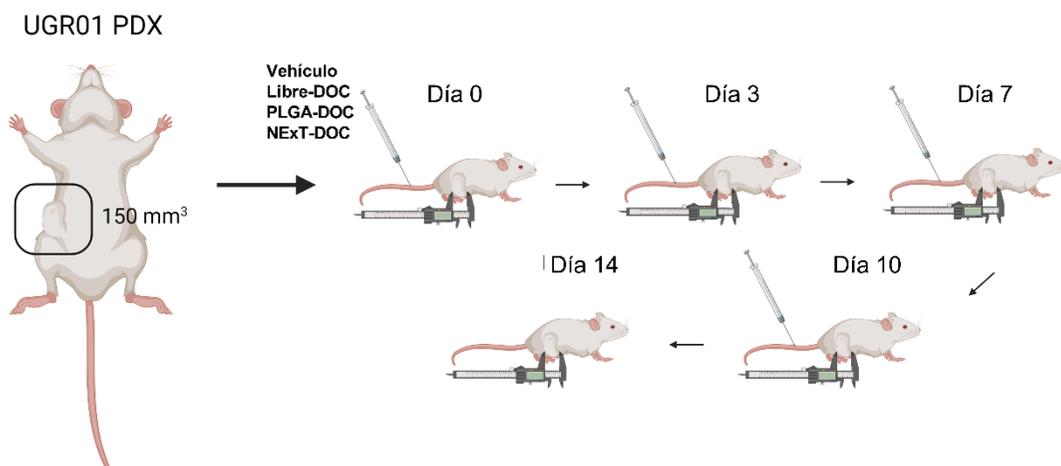


Figura 52. Ilustración esquemática del cronograma terapéutico para el modelo de ratón PDX (UGR01).

Después de 14 días, los ratones tratados con NExT cargado con DOC exhibieron un crecimiento tumoral significativamente menor en comparación con aquellos que recibieron el fármaco libre. El grupo tratado con NExT apenas creció con respecto al inicio de los tratamientos, mientras que el grupo tratado con el vehículo multiplicó más de 3 veces su tamaño, y los grupos con el fármaco libre y en PLGA casi 3 veces.

Como era de esperar, los grupos PLGA-DOC y DOC libre no demostraron una actividad terapéutica significativa en comparación con el Vehículo (**Figura 53**), como se había visto antes con una dosis acumulada de 25 mg/kg¹²².

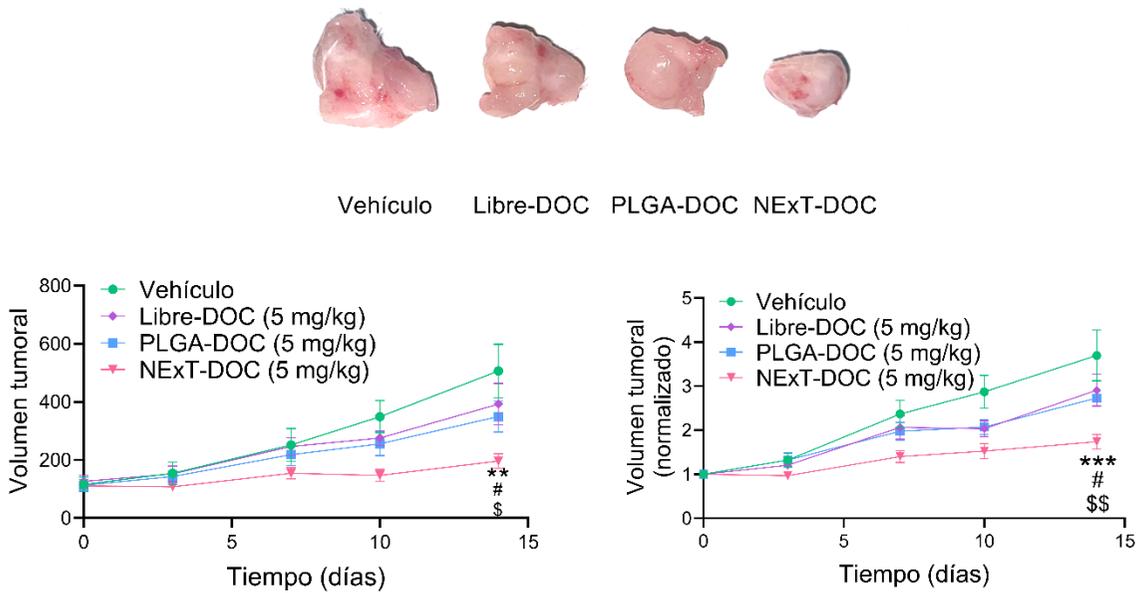


Figura 53. Cambio en el volumen tumoral de los ratones portadores de UGR01 tratados con Vehículo, DOC libre (Libre-DOC), PLGA cargado con DOC (PLGA-DOC) y NExT cargado con DOC (NExT-DOC) (n=5) normalizado y sin normalizar e imágenes representativas de los tumores extirpados al día 14. Comparación con Vehículo: **p < 0.01; Comparación con Libre-DOC: #p < 0.05; Comparación con PLGA-DOC: \$p < 0.05.

Además, los datos obtenidos mediante microscopía confocal revelaron una reducción sustancial en la expresión de Ki67 en el grupo tratado con NExT-DOC en comparación con los otros grupos, reduciéndolo hasta prácticamente cero. Ki67 es un marcador bien conocido de proliferación celular, y su disminución sugiere que NExT potenció la inhibición de la proliferación tumoral inducida por DOC (**Figura 54**). Este hallazgo es crucial, ya que indica que NExT no solo mejora la administración y distribución del fármaco, sino que también amplifica su efecto antiproliferativo.

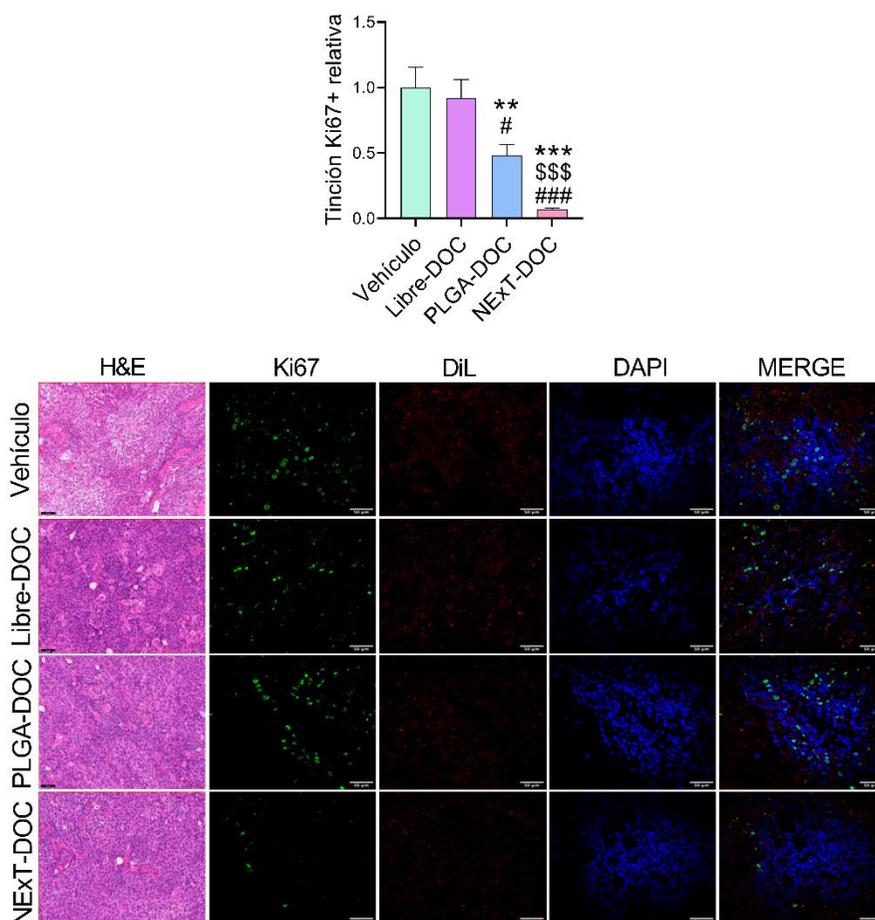


Figura 54. Imágenes representativas de microscopía confocal (objetivo óptico original: 40×), H&E, y cuantificación (n=5) de Ki67 (verde) en tumores UGR01. DiI se utilizó para teñir las membranas celulares. Barra de escala = 50 μ m. Comparación con Vehículo: **p < 0.01 y ***p < 0.001; Comparación con Libre-DOC: #p < 0.05 y ###p < 0.001; Comparación con PLGA-DOC: \$\$\$p < 0.001.

Debido a que nuestros experimentos *in vitro* sugerían que NEX-T podría dirigirse a las células cancerígenas e interrumpir el eje PD1/PDL1, confirmamos además los niveles de PDL1 en células tumorales y el TME en el tejido tumoral PDX.

La microscopía confocal mostró una disminución significativa en la expresión de PDL1 (tanto en células tumorales como en TME) por NExT-DOC hasta la aproximadamente la mitad en comparación con los grupos PLGA-DOC y DOC libre, que no diferían del Vehículo (**Figura 55**). Esto puede ser consecuencia de una eliminación de forma específica de las células PDL1+ en el tumor, o por el bloqueo de dicho marcador por la unión de NExT.

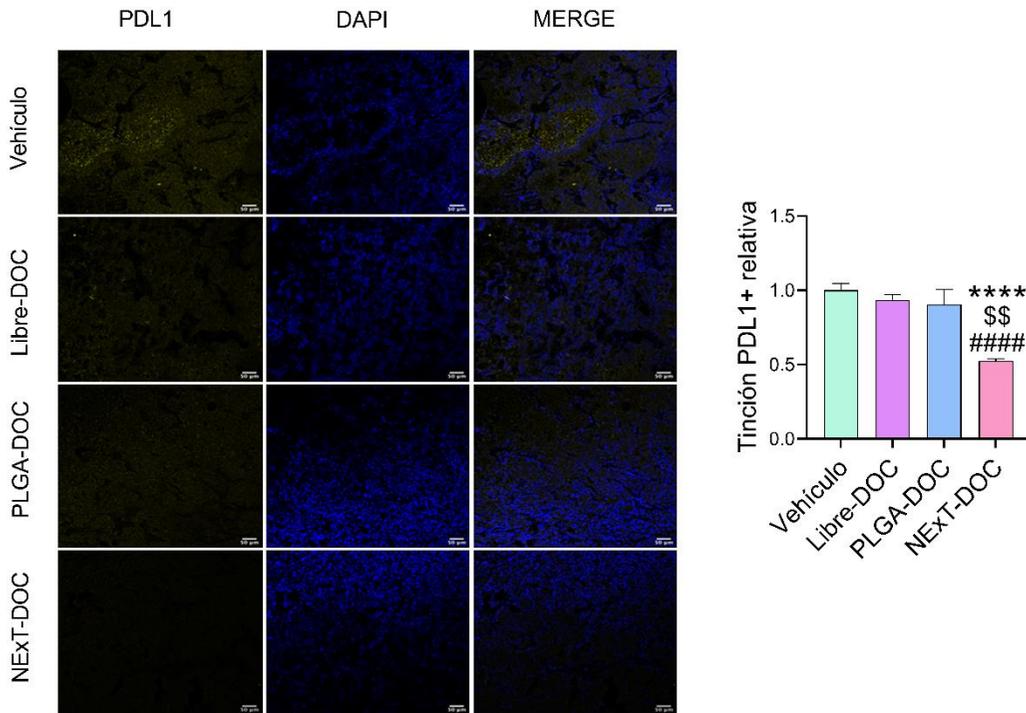


Figura 55. Imágenes representativas de microscopía confocal (20×) y cuantificación de PDL1 y en tumores PDX UGR01 (n=3). Barra de escala = 50 μ m. Comparación con Vehículo: ****p < 0.0001; Comparación con Libre-DOC: #####p < 0.0001; Comparación con PLGA-DOC: \$\$\$p < 0.01.

Estos resultados se correlacionaron con una reducción significativa en fibroblastos asociados al tumor (CAF) como lo evidencia el marcador α -actina de músculo liso (α -SMA) (**Figura 56**). En suma, ambos resultados generan un

microambiente menos favorable para el crecimiento del cáncer, subrayando el potencial de NExT como una estrategia terapéutica polifacética.

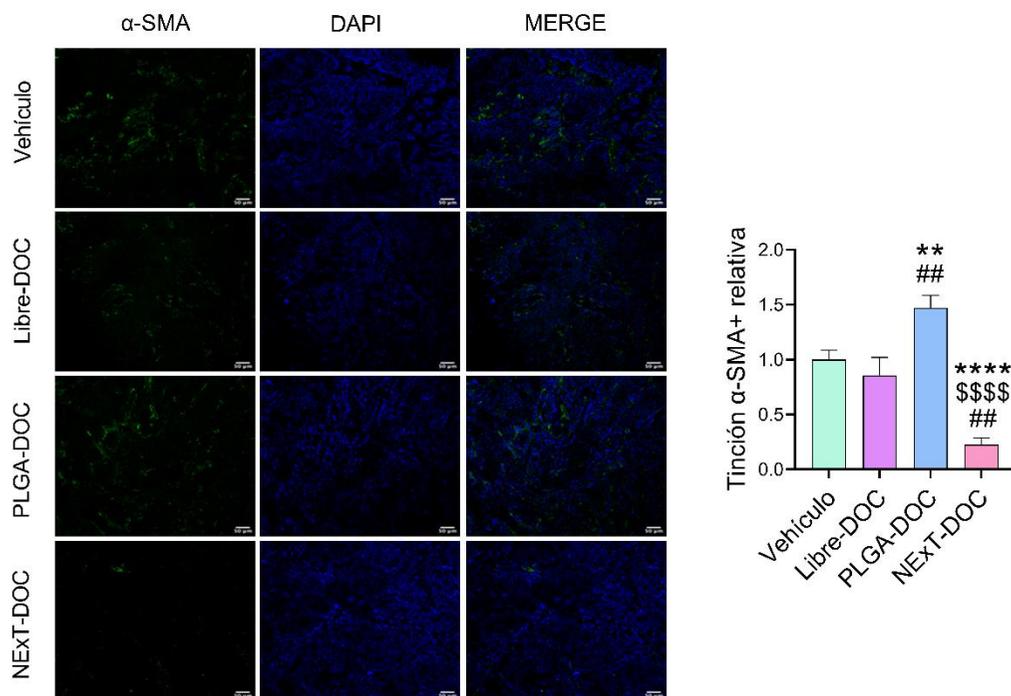


Figura 56. Imágenes representativas de microscopía confocal (20 \times) y cuantificación de α SMA y en tumores PDX UGR01 (n=3). Barra de escala = 50 μ m. Comparación con Vehículo: **p < 0.01 y ****p < 0.0001; Comparación con Libre-DOC: ##p < 0.01; Comparación con PLGA-DOC: \$\$p < 0.01 y \$\$\$p < 0.0001.

4.3 Objetivo 3. Encapsulación de terapia anti-ATF4 en nanopartículas biomiméticas y su evaluación en líneas celulares y organoides derivados de pacientes

4.3.1 Evaluación de la expresión de PDL1 bajo el tratamiento con DOC e ISRIB encapsulados en NExT.

Estudios recientes han demostrado una correlación entre la expresión de ATF4 y PDL1¹²³⁻¹²⁵, sugiriendo que la administración de DOC e ISRIB utilizando NExT dirigidas a PDL1 podría suponer un enfoque terapéutico prometedor. Según la literatura, las células con mayor expresión de PDL1 también tendrán niveles más altos de ATF4 y, por lo tanto, pueden responder mejor a nuestra terapia propuesta.

Además, para proporcionar un apoyo más sólido a nuestros hallazgos, utilizamos un modelo de organoide (UGR01 PDxO) derivado del PDX UGR01 previamente utilizado en los experimentos *in vivo*. Los modelos de organoides imitan más de cerca la enfermedad y están ganando reconocimiento como un sistema preclínico válido con alto potencial de traslación. El uso de un PDxO nos permite probar nuestra hipótesis en un modelo representativo de tumores humanos¹²⁶.

Inicialmente, tratamos UGR01 (**Figura 57**) con diferentes concentraciones de DOC (0.1nM, 0.5nM, 5nM y 10nM). Como era de esperar, la viabilidad de los organoides disminuyó con concentraciones más altas de DOC, resultando en un IC50 de 0.5 nM.

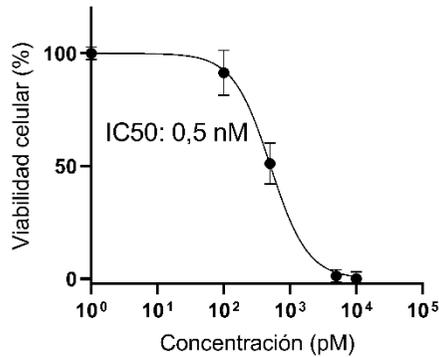


Figura 57. Proliferación celular bajo diferentes concentraciones de DOC en UGR01 PDxO.

Como hemos visto anteriormente, UGR01 es un modelo de PDX positivo para PDL1, sin embargo, hemos comprobado como su expresión se pierde al establecer el cultivo de organoides (**Figura 58**). La literatura muestra que un componente (Y-27632) en el medio de cultivo de organoides reduce la expresión de PDL1¹²⁷. Por ello, nuestro siguiente objetivo fue aumentar los niveles de PDL1 en este modelo de organoides para que pudieran ser diana de NExT y ver si su expresión se reducía con ISRIB.

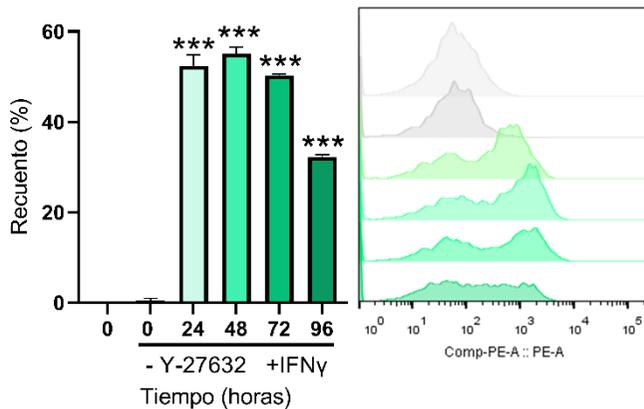


Figura 58. Cuantificación e histogramas representativos de citometría de flujo de los niveles de PDL1 en UGR01 PDxO bajo estimulación con IFN γ y depleción de Y-27632. Comparación con el grupo control: ***p < 0.001.

Para restaurar la expresión normal, estimulamos los organoides con IFN γ (100ng/ml) y eliminamos Y-27632. Medimos los niveles de PDL1 a las 0, 24, 48, 72 y 96 h, observando un aumento rápido de ~50% que alcanzó su punto máximo a las 24 h antes de disminuir, por lo que seleccionamos 24 h de estimulación con IFN γ para futuros experimentos (**Figura 58**).

Puesto que ATF4 y PDL1 están relacionados¹²³, esperamos ver una reducción de PDL1 tras el tratamiento con ISRIB. Para estudiarlo, fabricamos NExT cargadas con ISRIB y medimos los niveles de PDL1 mediante citometría de flujo en las células MDA-MB-231 tratadas durante 72 h según los siguientes grupos: vehículo, DOC (5 nM), DOC + ISRIB (5 μ M), DOC-NExT y DOC + ISRIB-NExT. Las características de las NP cargadas con ISRIB se muestran en la **Tabla 5**, mostrando unos valores similares a los observados anteriormente, con un tamaño algo superior. ISRIB redujo significativamente PDL1 a través del bloqueo de ATF4. El efecto se mejoró aún más al encapsular los compuestos en NExT, reduciendo los niveles en un 30% en comparación con el grupo control (**Figura 59a**).

Tabla 5. Caracterización de NP de PLGA con ISRIB.

Fármaco	Promedio-Z (nm)	Potencial ζ (mV)	PDI	EE (%)	LC (%)
ISRIB	203.8 \pm 4.2	-21.9 \pm 0.32	0.09 \pm 0.02	55.6 \pm 2.96	11.12 \pm 0.59

Realizamos el mismo experimento en células SUM159 (**Figura 59b**) y en el modelo PDxO previamente estimulado con IFN γ durante 24 h (**Figura 59c**), cambiando las concentraciones de DOC a 2,5 y 0,5 nM respectivamente, observando reducciones similares de ~30% y ~15% respectivamente.

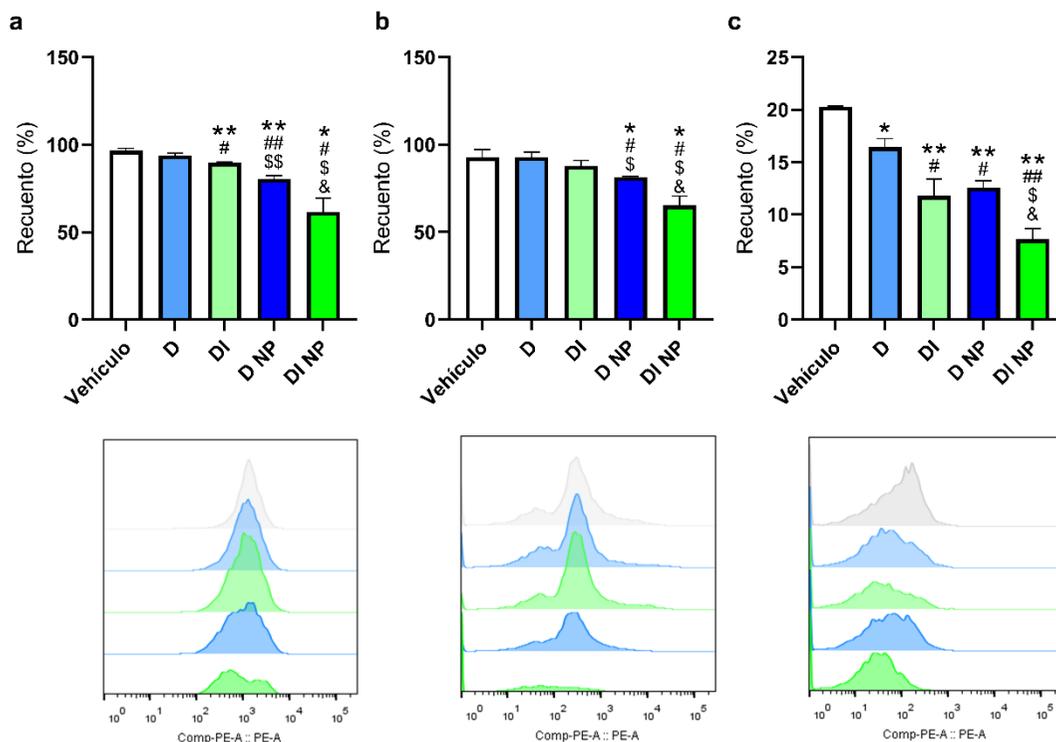


Figura 59. a, Cuantificación e histogramas representativos de citometría de flujo de los niveles de PDL1 en MDA-MB-231 bajo tratamiento con DOC (D) 5 nM o DOC 5 nM e ISRIB (DI) 5 μ M cargados o no en NExT (NP). **b,** Cuantificación e histogramas representativos de citometría de flujo de los niveles de PDL1 en SUM159 bajo tratamiento con DOC (D) 2.5 nM o DOC 2.5 nM e ISRIB (DI) 5 μ M cargados o no en NExT (NP). **c,** Cuantificación e histogramas representativos de citometría de flujo de los niveles de PDL1 en UGR01 PDxO bajo tratamiento con DOC (D) 0.5 nM o DOC 0.5 nM e ISRIB (DI) 5 μ M cargados o no en NExT (NP). Comparación con el vehículo: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; con D: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$; con DI: \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.001$; y con D NP: & $p < 0.05$.

Estos resultados, refuerzan nuestra hipótesis inicial en la cual, la administración de DOC+ISRIB en NExT favorece la reducción de los niveles de PDL1, sin embargo, no podemos saber si esto se debe a la eliminación de las células con alto PDL1 derivada de la especificidad de NExT sobre ellas, del

efecto disruptivo de NExT sobre el eje PD1/PDL1, por la reducción en su expresión mediante el bloqueo de ATF4, o por el efecto combinado de todos. Futuros experimentos serían necesarios para confirmar la causa.

4.3.2 Evaluación de la expresión de la apoptosis y viabilidad bajo el tratamiento con DOC e ISRIB encapsulados en NExT.

Habiendo determinado los niveles de PDL1 en la sección anterior, nuestro objetivo fue evaluar la eficacia de los tratamientos en la inducción de apoptosis en las líneas celulares MDA-MB-231, SUM159 y SUM159-R50, así como en los PDxO UGR01. Se trataron durante 72 h en los grupos: DOC, DOC + ISRIB, DOC-NExT y DOC + ISRIB-NExT, con una concentración de ISRIB de 5 μ M y de DOC 5, 2,5 250 y 0,5 nM respectivamente para cada cultivo.

Nuestros hallazgos revelaron un aumento en la apoptosis temprana tras el tratamiento con DOC en SUM159 y MDA-MB-231. Este efecto se potenció aún más cuando se administró utilizando el sistema NExT y cuando se combinó con ISRIB en MDA-MB-231 (**Figura 60**), SUM159 (**Figura 61**) y UGR01 PDxO (**Figura 62**), resultando en aumentos de aproximadamente 30%, 50% y 30%, respectivamente. Aunque el modelo de organoides mostró una ligera disminución en la apoptosis tardía, los niveles totales de apoptosis se elevaron.

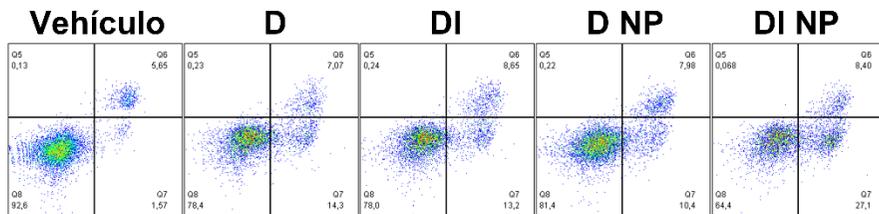
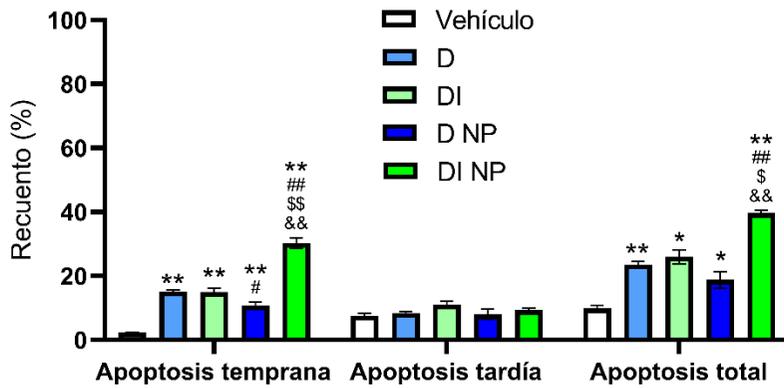


Figura 60. Cuantificación y diagrama de puntos representativo de citometría de flujo de los niveles de apoptosis en MDA-MB-231 bajo tratamiento con DOC (D) 5 nM o DOC 5 nM e ISRIB (DI) 5 μ M cargados o no en NExT (NP). Comparación con el grupo control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; con D: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$; con DI: \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.001$; y con D NP: && $p < 0.01$.

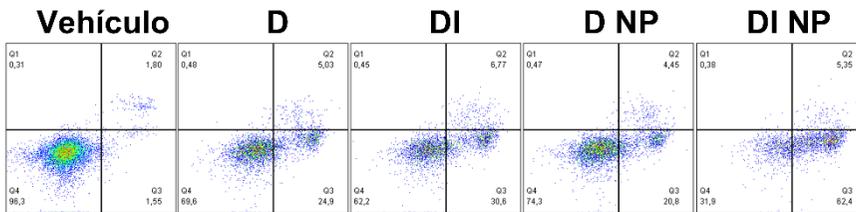
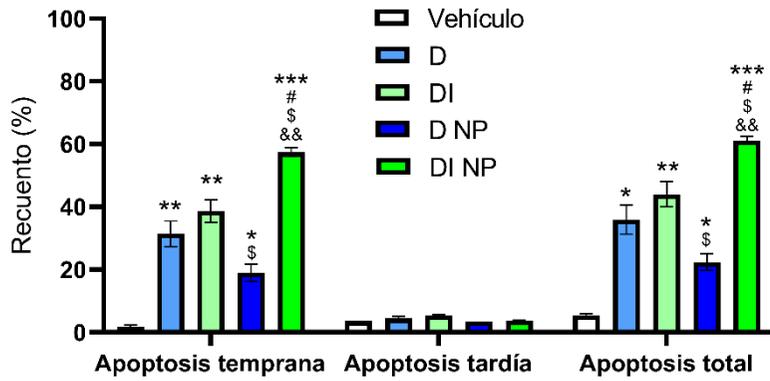


Figura 61. Cuantificación y diagrama de puntos representativo de citometría de flujo de los niveles de apoptosis en SUM159 bajo tratamiento con DOC (D) 2.5 nM o DOC 2.5 nM e ISRIB (DI) 5 μ M cargados o no en NEXT (NP). Comparación con el grupo control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; con D: # $p < 0.05$; con DI: \$ $p < 0.05$; y con D NP: && $p < 0.01$.

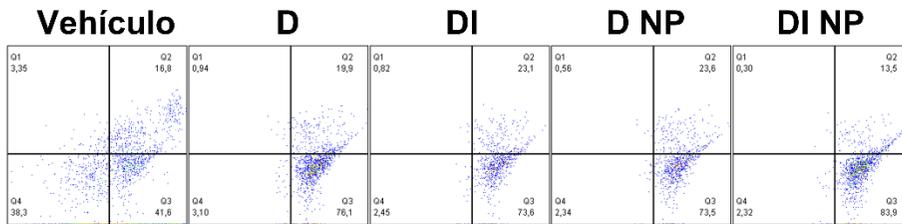
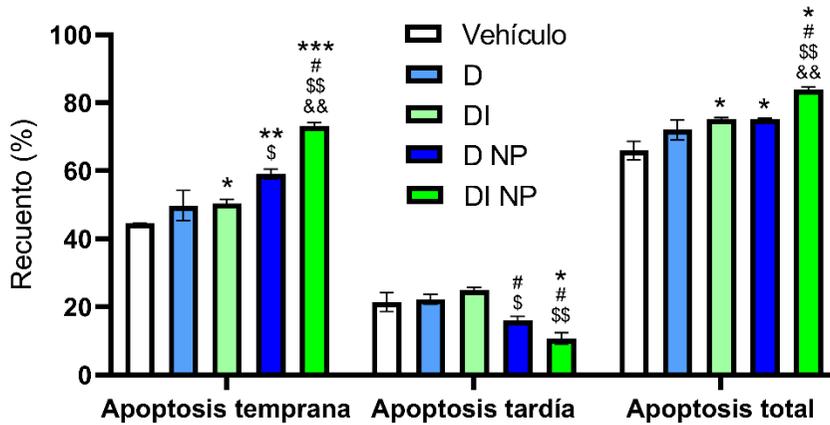


Figura 62. Cuantificación y diagrama de puntos representativo de citometría de flujo de los niveles de apoptosis en PDxO UGR01 bajo tratamiento con DOC (D) 0.5 nM o DOC 0.5 nM e ISRIB (DI) 5 μ M cargados o no en NExT (NP). Comparación con el grupo control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; con D: # $p < 0.05$; con DI: \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$; y con D NP: && $p < 0.01$.

Sin embargo, en la línea resistente a DOC SUM159-R50, no se observaron cambios significativos en los niveles de apoptosis o necrosis (Figura 63).

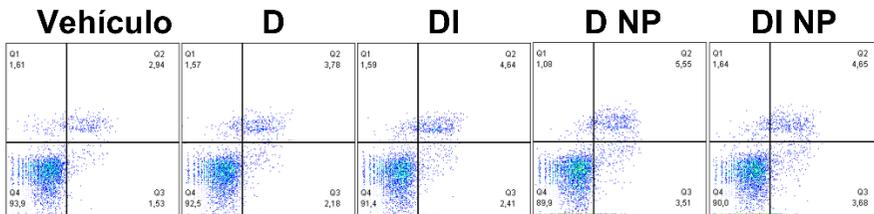
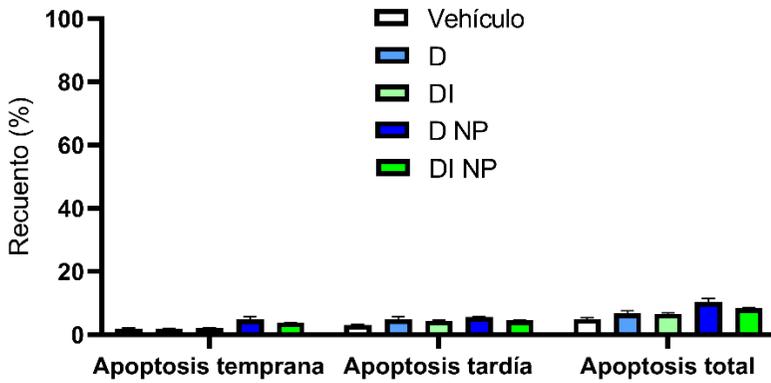


Figura 63. Cuantificación y diagrama de puntos representativo de citometría de flujo de los niveles de apoptosis en SUM159-R50 bajo tratamiento con DOC (D) 250 nM o DOC 250 nM e ISRIB (DI) 5 μ M cargados o no en NExT (NP).

No obstante, al examinar la proliferación celular en UGR01 PDxO y SUM159-R50 (**Figura 64**), notamos reducciones en ambos. Para los organoides, esta disminución puede atribuirse al aumento de la apoptosis, mientras que, en la línea celular resistente, sugiere una detención del ciclo celular.

En resumen, podemos decir, que ISIRB genera un efecto sinérgico sobre la apoptosis generada por DOC en líneas celulares y organoides de TNBC que se ve incrementado mediante la administración en NExT, confirmando que podría ser una buena estrategia terapéutica. Sin embargo, a pesar de reducir la

quimiorresistencia y proliferación en la línea resistente SUM159-R50, este efecto no se ve reflejado en la apoptosis.

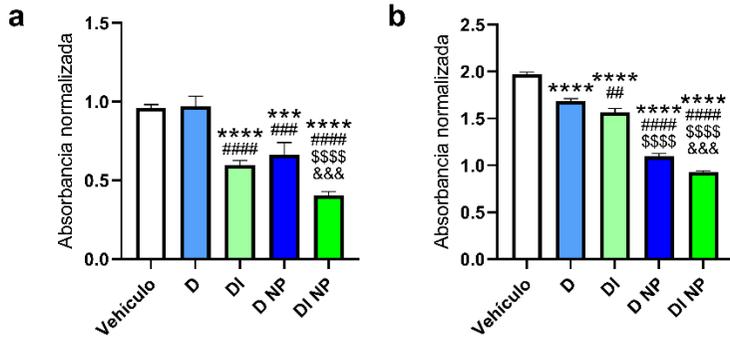


Figura 64. a, Proliferación en UGR01 PDxO bajo tratamiento con DOC (D) 0.5 nM o DOC 0.5 nM e ISRIB (DI) 5 μ M cargados o no en NExT (NP). **b,** Proliferación en SUM159-R50 bajo tratamiento con DOC (D) 250 nM o DOC 250 nM e ISRIB (DI) 5 μ M cargados o no en NExT (NP). Comparación con grupo control: ****p < 0.001, ****p < 0.0001; con D: ##p < 0.01, ###p < 0.001, #####p < 0.0001; con DI: \$\$\$p < 0.0001; y con D NP: &&p < 0.001.

5.DISCUSIÓN

La señalización de TGF β en TNBC se ha relacionado con un fenotipo más agresivo al promover la resistencia a la terapia, la metástasis y la recurrencia tumoral¹²⁸. Así, el perfil de expresión génica del TNBC está enriquecido en genes responsables de la actividad de autorrenovación y EMT, como la expresión aumentada de TGF β . Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con DOC también aumenta la cantidad de TGF β 1 en líneas celulares de TNBC y en un modelo PDX de TNBC, además de incrementar la señalización de TGF β . Estos resultados están en concordancia con estudios previos que también mostraron cómo el paclitaxel y otros quimioterapéuticos aumentan la señalización de TGF β favoreciendo la EMT en el cáncer de mama, así como aumentando las poblaciones de CSC y la metástasis²⁹⁻³¹. Los autores atribuyeron los mecanismos bajo estos efectos a la elevación de especies reactivas de oxígeno después de la quimioterapia, lo que media la activación inducida por TGF β de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la señalización de Snail que impulsa la EMT.

En este sentido, nuestro grupo ha demostrado en estudios previos que el tratamiento con TGF β 1 aumentó la expresión de ATF4 en células no tumorales MCF10A y células de TNBC¹²⁹. ATF4 está comúnmente sobreexpresado en el tejido tumoral de pacientes con TNBC, lo cual se considera un factor de mal pronóstico³². En consecuencia, se ha demostrado que su inhibición reduce la EMT y la población de CSC en modelos preclínicos de TNBC¹³⁰. De acuerdo con nuestros estudios anteriores, en el presente trabajo validamos que la expresión de ATF4 está regulada por un mecanismo de retroalimentación

positiva, ya que la inhibición del gen ATF4 produce una reducción de la señalización de TGF β , incluso después de la regulación al alza observada en el nivel de TGF β después del tratamiento con DOC³². Estos resultados refuerzan el potencial de ATF4 como una diana terapéutica en pacientes con TNBC.

ISRIB es una pequeña molécula similar a un fármaco que se dirige a la subunidad alfa del factor de iniciación de la traducción eucariota 2 (eIF2 α), inhibiendo la síntesis de factores de respuesta al estrés como ATF4, razón por la cual se le considera un inhibidor indirecto de éste¹³¹. ISRIB atenúa la vía de TGF β tanto en células tratadas con TGF β 1 como con DOC, en concordancia con nuestras observaciones previas que indican que la inhibición de ATF4 resulta en el bloqueo de las vías canónicas (Smad2/3) y no canónicas (Akt/mTOR) de TGF β como parte del mecanismo de retroalimentación positiva que regula la expresión de ATF4³².

Nuestros resultados además respaldan estudios previos sobre el mecanismo de acción de ISRIB y nos proporcionan la hipótesis positiva sobre la capacidad de ISRIB de bloquear la señalización de TGF β . Durante la activación de la ISR, la fosforilación de eIF2 α reprime la síntesis de proteínas en respuesta a estímulos tales como el incorrecto plegamiento proteico. Se conoce que el principal mecanismo de acción de ISRIB consiste en la inhibición de la ISR al antagonizar la fosforilación de eIF2 α y promover la activación de eIF2B, bloqueando así la activación de ATF4, efecto que depende del umbral de fosforilación de eIF2 α . Si atendemos a la posible relación entre ISRIB y TGF β , es conocido que este último induce la quinasa GSK3 β , la cual a su vez fosforila e inhibe a eIF2B¹³²⁻¹³⁹, promoviendo la expresión de ATF4 que hemos observado en nuestros estudios³². Sin embargo, estos efectos podrían ser

contrarrestados por ISRIB a través de la reactivación que promueve sobre eIF2B. De este modo, se impediría la expresión de ATF4, lo que a su vez interrumpiría la retroalimentación positiva que ATF4 ejerce sobre TGF β , constituyendo así nuestra hipótesis sobre el mecanismo por el cual ISRIB bloquearía la señalización de TGF β .

La EMT lleva a las células cancerosas a adquirir un fenotipo mesenquimal, aumentando su motilidad, diseminación e induciendo la desdiferenciación. La vimentina es una proteína filamentosa cuya expresión está relacionada con la polarización de los microtúbulos, la migración celular y la expresión de factores de transcripción relacionados con la EMT, como Slug⁴⁶. Por otro lado, Snail es un supresor de un homólogo de E-cadherina (marcador epitelial), y su expresión está alterada en el cáncer de mama metastásico. La sobreexpresión de ambos marcadores está asociada con un mal pronóstico, ya que induce resistencia a la apoptosis, confiere recurrencia tumoral y genera propiedades similares a las CSC¹⁴⁰. Nuestros resultados muestran cómo ISRIB reduce la expresión de estos marcadores mesenquimales en células tratadas con TGF β y DOC. La banda de vimentina detectada en células SUM159 en respuesta a DOC podría indicar una modificación postraduccional, como la fosforilación, y por lo tanto, activación, siendo éste un efecto visto en otras proteínas como YAP¹⁴¹. En este sentido, se ha informado que el paclitaxel induce la fosforilación de vimentina, lo que tiene un impacto en su organización y estabilización¹⁴². La supresión de la EMT inducida por taxanos también se ha visto con diferentes inhibidores de la vía de señalización de TGF β ^{53,143,144}. Además, estudios con xenoinjertos de MDA-MB-231 en ratones han mostrado que la combinación de paclitaxel con un inhibidor de TGF β aumenta la supervivencia⁴⁵. Mientras que estudios de microarrays han vinculado altos

niveles de ARNm de vimentina con una baja tasa de supervivencia en pacientes después del tratamiento con taxanos y antraciclinas, lo que sugiere que juega un papel importante en la progresión del cáncer. Junto a ello, se ha demostrado que el silenciamiento de vimentina induce la reducción de la migración y proliferación en células MDA-MB-231 de TNBC, siendo éstos unos resultados similares a los obtenidos en líneas de otros tipos de cáncer, como el de pulmón¹⁴⁵.

Por otro lado, la sobreexpresión de Snail también conduce a la EMT como se ha validado en experimentos con la línea de adenocarcinoma de mama MCF7 en la que se sobreexpresó el gen *SNAIL*. Los autores observaron una transición en su morfología (cambios en tamaño y forma, y pérdida de adhesiones celulares) así como el aumento de la expresión de otros factores de transcripción relacionados con la EMT, como Slug, Twist1 y Zeb1¹⁴⁶. Es por ello que, en conjunto, nuestros resultados sugieren que ISRIB disminuye el potencial metastásico inducido por el tratamiento con el taxano DOC *in vitro* al disminuir la expresión de dichos marcadores mesenquimales.

En el presente estudio hemos visto como la señalización de TGF β exacerbada por el tratamiento con taxanos desencadena la EMT, CSC y quimiorresistencia, que se encuentran estrechamente interrelacionados ya que la EMT proporciona a las células un fenotipo pluripotente, similar a CSC que a su vez presentan quimiorresistencia intrínseca^{43,44,48}. Además, hemos visto como ISRIB reduce, no solo la señalización de TGF β inducida por DOC, sino también la EMT, por lo que hipotetizamos que podría ser una buena terapia para evitar la quimiorresistencia.

Para estudiarlo, hemos desarrollado una línea celular TNBC resistente a DOC utilizando la línea celular SUM159. Los resultados obtenidos a partir del microarray de resistoma fueron validados mediante qPCR para los genes que mostraron los mayores cambios en su expresión: *ABCB1*, *ABCG2*, *TYMS*, *FAS* y *BIRC5*.

La capacidad de hidrólisis de ATP confiere a *ABCB1* y *ABCG2* (miembros de la familia de las proteínas de casete de unión a ATP) la habilidad de expulsar fármacos fuera de las células. Esta característica les permite sobrevivir a la quimioterapia cuando la diana, como en el caso del DOC, se encuentra dentro de la célula^{147,148}. Nuestros hallazgos están en consonancia con la literatura existente, que ha demostrado que *ABCB1* incrementa su expresión en otros modelos de células TNBC resistentes a DOC, como MCF-7 y MDA-MB-231, siendo uno de los principales mecanismos de resistencia a los taxanos¹⁴⁹.

BIRC5, que pertenece a la familia de inhibidores de proteínas de apoptosis (IAP), regula los microtúbulos durante la mitosis. Esta función podría explicar la supervivencia de las células en presencia de DOC al inhibir la apoptosis¹⁵⁰. De manera similar, *TYMS* se ha relacionado con la progresión del ciclo celular, migración, proliferación e invasión. Además, *TYMS* es la molécula diana del 5-Fluorouracilo (5-FU)^{151,152}, por lo que su mayor expresión en las células SUM159-R50 podría favorecer tanto la supervivencia tumoral como la agresividad y la resistencia cruzada a 5-FU. Por último, *FAS* es un receptor proapoptótico cuya inhibición se ha asociado con una mayor agresividad tumoral y un peor pronóstico, al reducir la supervivencia de los pacientes con cáncer de mama¹⁵³.

En conjunto, las diferencias en la expresión de estos marcadores explican por qué la línea celular SUM159-R50 es más agresiva, proliferativa y quimiorresistente a DOC en comparación con la línea celular SUM159 original. Estos hallazgos no solo amplían nuestro entendimiento sobre los mecanismos de resistencia a los taxanos en TNBC, sino que también subrayan la importancia de estos genes como posibles dianas terapéuticas para superar la resistencia a la quimioterapia y mejorar el pronóstico de los pacientes con este tipo de cáncer.

Con el fin de demostrar que la resistencia a la quimioterapia se atribuye, al menos parcialmente, al incremento en la población de CSC, llevamos a cabo análisis funcionales que confirmaron el enriquecimiento de CSC en la línea celular resistente SUM159-R50. La formación de esferas ensayo ampliamente reconocido de la capacidad de autorrenovación de las células de cáncer de mama, mientras que el ensayo de colonias en agar blando muestra la capacidad de las células individuales para proliferar, reflejando su potencial de autorrenovación y tumorigenicidad. El incremento en ambos ensayos en la línea resistente hace patente su mayor agresividad y fenotipo pluripotente.

Además, las enzimas ALDH están involucradas en la desintoxicación de aldehídos producidos por procesos metabólicos fisiológicos, agentes ambientales y fármacos citotóxicos, por lo que estas enzimas pueden aumentar la resistencia de las células a los tratamientos quimioterapéuticos. Por otra parte, la enzima ALDH1 se considera un marcador de CSC porque, aunque se expresa en células madre normales, su expresión se incrementa en CSC^{116-118,154}. El porcentaje de aumento en la actividad de ALDH1 detectado en la línea celular SUM159-R50 es similar al observado en diferentes publicaciones

revisadas que informaron un aumento en la actividad de ALDH de 3-6% en líneas celulares de TNBC resistentes a paclitaxel, en comparación con el control^{119,155}.

Por otro lado, el resultado obtenido por la prueba de Hoechst 33342 está dentro del rango observado en diferentes artículos relacionados que varía entre 1%-7%, en comparación con el control, lo que nos permite confirmar la presencia de CSC¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Este incremento concuerda con el incremento en ABCB1 y ABCG2 ya que se basa en la capacidad de la población lateral para expulsar compuestos. Además, experimentos previos con la línea SUM159 han mostrado resultados similares, con una población aumentada de CSC en células resistentes a paclitaxel, demostrando que el tratamiento a largo plazo con taxanos induce la expansión de CSC y confiere resistencia adaptativa a la quimioterapia¹¹⁹. Estos resultados indican que el tratamiento con fármacos, como el taxano DOC, a largo plazo induce la propagación de CSC y confiere resistencia a la quimioterapia.

Por otro lado, nuestros resultados mostraron cómo el tratamiento con ISRIB revirtió las características de pluripotencia de la línea celular SUM159-R50, sensibilizándolas al tratamiento con DOC de manera similar a la línea parental. Estos resultados coinciden con los observados en la literatura respecto al tratamiento con ISRIB, en la línea celular SUM159 mostró una población aumentada de CSC con el tratamiento con paclitaxel, la cual se redujo con el tratamiento con ISRIB.

Asimismo, la combinación de ambos compuestos también redujo la formación de colonias y sensibilizó las células al tratamiento con paclitaxel en

modelos derivados de pacientes de las líneas SUM159 y MDA-MB-231¹⁵⁹. De manera similar, la inhibición genética de *ATF4* se ha asociado con una disminución de la capacidad de formación de colonias en células HeLa¹⁶⁰. El bloqueo de las vías de Akt y Smad visto anteriormente podría ser una explicación ya que se ha demostrado un aumento en la fosforilación de Akt en CSC en comparación con no-CSC en cáncer de mama. De hecho, Notch1 es un activador de la vía PI3k/Akt en células epiteliales mamarias y la inhibición de Notch1 resulta en la inhibición de Akt en líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y DCIS¹⁶¹. Oct4 se activa a través de la fosforilación en T235 por Akt, favoreciendo el mantenimiento de la pluripotencia de CSC en cáncer de mama^{162,163}. Akt también se ha relacionado con el desarrollo de resistencia: la inhibición de la vía PI3K/Akt en CSC resuelve problemas de resistencia a múltiples fármacos¹⁶⁴. Por otro lado, la activación de Smad por la vía de TGFβ también induce factores de transcripción que facilitan la EMT, contribuyendo al mantenimiento de CSC. Se ha demostrado que Smad2/3/4 aumenta la expresión de otros marcadores de pluripotencia como Nanog, CD133 y CD44 y está asociado con metástasis y EMT^{165,166}. En resumen, ambas vías de señalización han sido implicadas en la adquisición de resistencia al tratamiento con taxanos a través de la adquisición de EMT, el enriquecimiento en CSC y la inhibición de la apoptosis, y se esperaría que su inhibición sensibilizara las células tumorales y redujera la resistencia adquirida^{31,45,119}.

Posteriormente, para mejorar la administración de esta terapia combinada, llevamos a cabo el desarrollo de unas BNP. Las NP de PLGA son frecuentemente elegidas como núcleos de BNP debido a su rendimiento favorable cuando están recubiertas con membranas celulares, además de ser un material biodegradable y aprobado por la EMA y la FDA^{84,87,91,92,96,167-169}.

En este contexto, llevamos a cabo la síntesis de estas NP, obteniendo resultados con un tamaño promedio de alrededor de 200 nm. Este hallazgo es consistente con estudios previos que han demostrado que un tamaño de entre 100-300 nm es óptimo para la encapsulación de fármacos. Este rango de tamaño asegura un equilibrio adecuado entre la carga de fármacos y la promoción del efecto EPR, además de facilitar la evasión del sistema inmune, maximizando así los efectos citotóxicos deseados^{170,171}.

Para la obtención de las BNP (NExT), las NP de PLGA se recubrieron con PBMC enriquecidas en células T que posteriormente fueron agotadas siguiendo un protocolo de activación aguda. Nuestros resultados demostraron que la expansión de PBMC generaba cultivos enriquecidos en células T de manera similar a lo observado en la bibliografía¹⁷². Además, logramos generar una cantidad adecuada de células T para llevar a cabo los experimentos necesarios. Este proceso de optimización fue crucial para asegurar la viabilidad y funcionalidad de las BNP.

Durante la optimización del recubrimiento, se demostró que la sonicación en un sonicador de baño generaba un recubrimiento correcto de las NP con las membranas celulares. Este método de sonicación ha sido previamente validado en la literatura, y nuestros resultados corroboran su eficacia⁸⁰. Además, se observó que un aumento en la concentración de membrana celular mejoraba significativamente el proceso de recubrimiento, lo que sugiere que la cantidad de membrana disponible para el recubrimiento es un factor crítico para la eficiencia del proceso.

El análisis fisicoquímico de NExT reveló que éstas eran significativamente más grandes, con un rango de tamaño entre 5 y 22 nm. Este incremento en el diámetro es consistente con investigaciones previas^{84,86,87,91,93,168,173,174}, lo que sugiere que nuestras observaciones están en línea con la literatura existente.

Además, se observó la típica estructura esférica tipo núcleo-revestimiento, y confirmamos que dicho revestimiento estaba compuesto por material biológico. La forma esférica de las NP ha sido objeto de debate en la comunidad científica, sin embargo, las partículas esféricas han sido las más estudiadas debido a sus ventajas inherentes. Entre estas ventajas se incluyen una mayor capacidad de carga de fármacos y un menor reconocimiento por parte de los macrófagos^{170,171,175}.

El potencial ζ de NExT se situó alrededor de -20 mV, un valor que ha sido reportado por otros estudios en NP recubiertas con membranas. Este potencial ζ negativo se correlaciona con una buena estabilidad coloidal, un alto efecto citotóxico y una reducción de la opsonización, lo que es crucial para la evasión del sistema inmune y la prolongación de la circulación en el torrente sanguíneo^{170,175}.

Mediante Western blot, confirmamos nuevamente el adecuado recubrimiento de las BNP, así como la validez de nuestro protocolo para extraer y purificar las membranas. Este método de validación es consistente con metodologías similares reportadas en la literatura, lo que refuerza la fiabilidad de nuestros procedimientos experimentales^{87,91}.

Finalmente, analizamos la estabilidad y toxicidad de las BNP. Consistentes con la bibliografía¹⁷⁶, nuestros resultados confirmaron la estabilidad de las BNP por periodos prolongados, así como su buena biocompatibilidad. La estabilidad prolongada es un atributo deseable que asegura que las NP mantengan sus propiedades fisicoquímicas y funcionales durante el almacenamiento y el transporte. La buena biocompatibilidad de NExT es fundamental para su aplicación en terapias clínicas, ya que minimiza los efectos adversos y maximiza la eficacia terapéutica.

El crecimiento tumoral o las infecciones virales crónicas provocan una activación inmune persistente que resulta en disfunción o agotamiento de las células T. Este estado se caracteriza por una expresión elevada de receptores de puntos de control inhibitorios como PD1, LAG3 y TIM3, junto con una disminución en la producción de citoquinas y proliferación. Los modelos *in vitro* de agotamiento de células T por activación crónica son complejos y producen un número significativamente menor de células en comparación con la activación aguda. Sin embargo, la alta expresión de receptores de puntos de control inhibitorios puede lograrse de manera transitoria después de la activación de células T sin que estas se vuelvan disfuncionales y manteniendo el número de células^{177,178}. Nuestros resultados subrayan el buen rendimiento de nuestras metodologías para producir células modificadas (ExT) sin requerir técnicas avanzadas de ingeniería. Este enfoque no solo simplifica el proceso de producción, sino que también reduce los costos y el tiempo necesario para generar células terapéuticas, lo que es crucial para su aplicación clínica.

Posicionadas como la piedra angular de la nanoterapia adoptiva, las NExT derivadas de pacientes están destinadas a entregar terapias de manera

personalizada para cada paciente después de su infusión autóloga al mismo individuo. Este enfoque personalizado es fundamental para maximizar la eficacia terapéutica y minimizar los efectos secundarios, ya que permite adaptar el tratamiento a las características específicas de cada paciente. En consecuencia, se espera que las variaciones genéticas que contribuyen a la expresión heterogénea de receptores control inmunitario entre los pacientes¹⁷⁹ introduzcan variabilidad en los perfiles de expresión de receptores en células T, ExT y, por lo tanto, NExT, como se evidencia en nuestro estudio. Esta variabilidad genética puede influir en la respuesta al tratamiento y debe ser considerada al diseñar estrategias terapéuticas personalizadas.

Se ha demostrado que la administración dirigida de forma activa se mejora significativamente con NP que muestran múltiples moléculas específicas en su superficie, principalmente porque pueden unirse a diferentes moléculas objetivo simultáneamente, aumentando así su avidéz por las células objetivo¹⁸⁰. En consecuencia, aquí demostramos que las NExT están funcionalizadas de manera natural con diversos receptores (PD1, LAG3, TIM3) que pueden interactuar con sus ligandos correspondientes (por ejemplo, PDL1, Galectina-3, FGL-1, MHCII, Galectina-9, HMGB1, Ceacam-1) dentro del tumor. Además, aunque no está dentro del alcance de este estudio, no podemos descartar la posible decoración de NExT con TCR capaces de reconocer MHCII expresados en células tumorales, lo que podría potencialmente aumentar aún más la especificidad y eficacia de la administración dirigida al tumor, proporcionando una capa adicional de reconocimiento y ataque a las células malignas^{92,167}.

Los tumores TNBC expresan ligandos específicos de PD1, LAG3 y TIM3, como PDL1, Galectina-3, FGL-1, MHCII, Galectina-9 o HMGB1 secretado¹⁸¹⁻¹⁸⁴, que ofrecen múltiples objetivos para la mejora de la administración activa de fármacos por NExT. Aunque la presencia de otras moléculas como LAG3 o TIM3 en NExT puede mejorar la administración dirigida y acumulación tumoral, nuestro enfoque se mantuvo en PD1 debido a su retención constante en NExT. Además, diversos estudios han demostrado el papel fundamental que tiene el eje PD1/PDL1 en la evasión inmune, aumentando el interés en su estudio.

Nuestros estudios en diferentes líneas con diferentes niveles de expresión de PDL1 nos llevaron a identificar que la interacción PD1/PDL1 como un mecanismo principal para la administración dirigida específica y acumulación intratumoral y apoyando la relevancia de la interacción PD1/PDL1 para la especificidad de NExT en la administración dirigida en tumores PDL1+. Esta evidencia está en consonancia con los resultados observados previamente que muestran que NP funcionalizadas con anti-PDL1 han exhibido un alto nivel de internalización dentro de las células de glioblastoma de ratón¹⁸⁵ y de TNBC¹⁸⁶ que expresan altos niveles de PDL1, en contraste con NP no funcionalizadas o en células tumorales que exhiben baja expresión de PDL1. Además, el menor porcentaje de PDL1 disponible en células SUM159 tratadas con NExT no solo indica que esta plataforma proporciona una interferencia en la unión del anticuerpo anti-PDL1 a las moléculas de PDL1 en presente células tumorales, sino que también sugiere la interrupción del eje PD1/PDL1.

Este hallazgo es particularmente relevante, ya que indica que las NExT no solo actúan como vehículos de entrega de fármacos, sino que son capaces

de actuar intrínsecamente como inmunoterapéutico, revertiendo la inmunosupresión mediada por el tumor y permitiendo una reactivación de las respuestas inmunitarias antitumorales.

Diversos estudios y ensayos clínicos se han centrado recientemente en el bloqueo de este eje¹⁸⁵⁻¹⁹¹. De hecho, ya se encuentra aprobados fármacos para el bloqueo de PD1, pembrolizumab, y de PDL1, atezolizumab. El estudio KEYNOTE-522 mostro una ventaja al combinar pembrolizumab con quimioterapia en TNBC no metastásico independientemente de los niveles de PDL1, así como el KEYNOTE-355 lo demostró para TNBC metastásico PDL1+. Por otra parte, IMpassion031 mostró la eficacia de la combinación de atezolizumab con nab-paclitaxel en TNBC temprano, al igual que IMpassion130 lo mostró en TNBC avanzado no tratado positivo para PDL1. El éxito en el uso de estos inhibidores hace que actualmente siga estudiándose y existan ensayos clínicos que aún no han sido publicados¹⁹².

En cuanto al uso de NP para bloquear este eje existen artículos que han explorado la efectividad de nanoplataformas conjugadas con anticuerpos o vesículas diseñadas para interrumpir el eje inhibitorio PD1/PDL1. Cheng *et al.* Desarrollaron BNP recubiertas con membranas de células cancerígenas y un péptido anti-PD1, que se desprendía en el microambiente tumoral, generando la activación de los linfocitos T¹⁶⁸. Además, se han generado liposomas, con péptidos anti-PDL1 que generan la activación de linfocitos T citotóxicos^{190,191}. Sin embargo, los estudios que utilizan BNP para administrar selectivamente las células cancerosas a través del agotamiento inmunológico son escasos^{80,193}, y nulos aquellos que explotan la evasión inmune tumoral. Esta situación

posiciona a NExT como una nueva clase de BNP para la administración activa de fármacos, con características similares a la IT.

De hecho, Saleh *et al.* Han demostrado que el bloqueo del eje PD1/PDL1 genera un aumento en la expresión de TIM3 y LAG3 en células T citotóxicas cuando estas son co-cultivadas con células de TNBC como MDA-MB-468 y MDA-MB231¹⁹⁴. Por lo tanto, nuestro enfoque en el que se bloquean varios marcadores a la vez se erige como una buena estrategia para estos casos.

Es por eso que cada vez se están estudiando más IT dirigidas a otros puntos de IC. La combinación del bloqueo de PD1 y LAG3 está siendo estudiada en un ensayo clínico de fase I/II (NCT02460224). Dentro de este estudio, se observó, un aumento de las células infiltradas positivas en un paciente que presento una respuesta tumoral completa¹⁹⁵. Además, se ha demostrado en TNBC una alto porcentaje de expresión de LAG3 correlacionado con un peor pronóstico¹⁹⁶. Así mismo, TIM3 se ha relacionado con peor respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en pacientes de TNBC en estado avanzado¹⁹⁷. Su bloqueo ha mostrado un efecto sinérgico junto con el bloqueo de PD1 en tumores carcinogénicos inducidos, mientras que un nuevo ensayo clínico en TNBC metastásico se está llevando a cabo (NCT03652077)¹⁹⁸. En resumen, la inhibición simultánea de múltiples puntos de IC ha demostrado un efecto sinérgico que podría lograrse mediante nuestra estrategia terapéutica con NExT.

En el tratamiento del TNBC no operable, la quimioterapia con agentes como los taxanos y las antraciclinas sigue siendo el enfoque terapéutico establecido. Sin embargo, estas terapias presentan desafíos significativos

debido a su falta de selectividad hacia el tejido tumoral, lo que conlleva a eventos adversos considerables, bajas tasas de biodistribución y problemas de eficacia^{180,199}. En este contexto, evaluamos la eficacia de NP NExT cargadas con DOC, DOX y EPI en estudios *in vitro*. Consistente con estudios previos^{84,91,200}, observamos un patrón de liberación bifásico de los fármacos, similar al perfil bifásico típico observado en NP de PLGA. Sin embargo, la liberación de los fármacos fue más gradual en las NExT, lo cual puede atribuirse a la presencia de la membrana que actúa como una barrera, impidiendo la difusión rápida del fármaco. Este hallazgo es crucial, ya que una liberación más controlada y sostenida puede mejorar la eficacia terapéutica y reducir los efectos secundarios asociados con picos de concentración plasmática.

Además, nuestros resultados subrayan la precisión y eficacia superior de las NExT en la entrega de fármacos quimioterapéuticos, así como un aumento significativo en el índice terapéutico en comparación con las NP de PLGA. Este aumento en la eficiencia terapéutica se observó particularmente en células PDL1+ de TNBC, lo cual es probablemente debido a la mayor avidéz de las NExT por este ligando. La mayor interacción de las NExT con las moléculas de PDL1 en la superficie celular puede ser atribuida a la presencia de más sitios de unión específicos. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos de NP conjugadas con péptidos que reconocen PDL1 y cargadas con curcumina, los cuales demuestran una mayor citotoxicidad en células con alta expresión de PDL1, mientras que no se observó una diferencia significativa entre las NP funcionalizadas y no funcionalizadas en células con baja expresión de PDL1^{186,201}.

Ciertas quimioterapias, como las examinadas aquí, regulan positivamente receptores y ligandos de IC, incluido PDL1. En consecuencia, es plausible que la especificidad dirigida de NExT a células PDL1^{low} pueda amplificarse por la quimioterapia atrapada en su interior al regular al alza los ligandos de IC (por ejemplo, PDL1) y sinergizar con la IT, como se ha informado en otras NP²⁰².

Como se ha informado previamente para otros BNP^{80,86,92,174,176}, nuestros datos demuestran la buena biocompatibilidad de NExT, permitiendo su futura aplicación en clínica para la terapia del cáncer.

En términos de biodistribución *in vivo*, entre los principales órganos, NExT y PLGA se encontraron principalmente en el hígado, como se ha informado para otros BNP de PLGA^{92,96,167} y sistemas de nanosistemas dirigidos a PDL1/PD1^{185,187-191}. Es importante destacar que encontramos que NExT se acumularon fundamentalmente dentro del tejido tumoral con alta expresión de PDL1. Otras BNP han demostrado exhibir tropismo tumoral *in vivo* en comparación con NP sin el recubrimiento^{88,200,203,204}. En el caso de NP funcionalizadas con anticuerpos contra PDL1, éstas se acumularon específicamente en glioblastomas con expresión de PDL1 de la misma manera¹⁸⁵. En general, estos resultados indican la capacidad superior y más precisa de NExT para dirigirse al tumor en comparación con PLGA, lo que respalda su futura aplicación en clínicas para la terapia del cáncer.

La eficacia terapéutica *in vivo* de NExT se determinó en un modelo PDX de PDL1+ de TNBC. Como cabía esperar de acuerdo a estudios anteriores¹⁶⁹, nuestros hallazgos destacan que NExT sirve como una nanoplataforma que se

dirige de forma eficaz y específica a tumores PDL1+. Hay que indicar que la dosis acumulativa de DOC inyectada en este estudio fue tres veces menor que la administrada a modelos PDX de TNBC o aquella que es encapsulada en NP de PLGA, lo que indica que NExT aumenta significativamente el índice terapéutico de la quimioterapia^{32,205}. Nuestros resultados son consistentes con lo observado en la bibliografía, según la cual, estudios con NP cargadas con DOC han mostrado una disminución en el crecimiento tumoral en cáncer de próstata cuando están recubiertas con membranas, así como con otros fármacos, como paclitaxel y DOC, y también en la expresión de Ki67 en cáncer de mama^{200,206–208}.

La quimioinmunoterapia, conocida como la combinación de quimioterapia e inhibidores de IC como atezolizumab (anti-PDL1) o pembrolizumab (anti-PD1), es un avance en la terapia de primera línea del cáncer, incluyendo para pacientes con TNBC^{209,210}. Una vez más, nuestros resultados indicaron que NExT se unen a PDL1 en células tumorales y reducen su disponibilidad, sugiriendo que NExT podría provocar una ocupación de PDL1 que bloquearía la interacción PD1/PDL1 entre linfocitos T y las células tumorales. De hecho, encontramos niveles reducidos de PDL1 en células cancerosas y el TME del tejido tumoral PDX tratado con NExT-DOC. En este sentido, se sabe que algunos BNP pueden modular el TME, mejorando la inmunidad antitumoral y reduciendo el microambiente inmunosupresor mediante la activación de células inmunitarias a través del bloqueo de la interacción PD1/PDL1^{32,126,211,212}. Junto a esto, se ha determinado que la interrupción del eje PD1/PDL1 es un mecanismo seguido por otras plataformas que expresan PD1, así como la propia IT basada en inhibidores del punto de IC,

que provocan la alteración del TME^{188,189,213}. Por tanto, estos datos sugieren que la interferencia de NExT con PDL1 podría remodelar el TME.

En este sentido, como parte del TME, el estroma tumoral induce la progresión del cáncer, metástasis y resistencia a la terapia. Dentro del estroma tumoral, los CAF son una de las poblaciones celulares más abundantes que promueven la tumorigénesis, metástasis, recurrencia, resistencia a fármacos, TME inmunosupresor mediante la expresión de PDL1 y mal pronóstico en varios cánceres^{214,215}. α SMA es un marcador específico de CAF que está correlacionado con la enfermedad metastásica y el mal pronóstico en pacientes con TNBC²¹⁶. Similar a otras nanoplataformas conjugadas con DOC²¹⁷, nuestras investigaciones mostraron que NExT redujeron significativamente el α SMA estromal en el tejido tumoral PDX, sugiriendo que NExT no solo pueden dirigirse a las células tumorales sino también remodelar el TME mediante la eliminación de CAF a través de la interacción con PDL1, validando de este modo nuestra hipótesis. Por lo tanto, se justifican futuras investigaciones para determinar si NExT podría funcionar como una IT autóloga al interrumpir el eje PD1/PDL1, aumentando la respuesta inmune anticancerígena sin inmunogenicidad, similar a los hallazgos informados para otras plataformas con propiedades inmunoterapéuticas¹⁸⁵⁻¹⁹¹.

Si se confirma, podemos hipotetizar que NExT cargados con quimioterapia podrían provocar efectos comparables a los de la quimioinmunoterapia¹⁹⁰, lo que aumenta el interés en la aplicación clínica de esta nanoplataforma. No obstante, es razonable cuestionarse qué pacientes se beneficiarían en mayor proporción del empleo de NExT para su tratamiento. Si serían los pacientes con TNBC en etapas tempranas quien se beneficiarían de

NExT independientemente del estado de PDL1 como se sucede en el tratamiento con atezolizumab²¹⁸, o bien si sería de interés para el tratamiento de la enfermedad avanzada con positividad para PDL1, en los que sería deseable una elección cuidadosa de los quimioterapéuticos a emplear con el objeto de facilitar el incremento de los niveles de PDL1 en el tejido tumoral para aumentar su sensibilidad a NExT.

Finalmente, en cumplimiento de nuestro último objetivo que consiste en mejorar la administración de la terapia combinada de ISIRB y DOC, llevamos a cabo la encapsulación nuestra terapia dentro de NP dirigidas a PDL1. En resumen, nuestros resultados mostraron como el ISIRB promovió la reducción de PDL1 en modelos de líneas celulares y organoides. Estos resultados concuerdan con lo esperado, dada la correlación previa observada entre la expresión de ATF4 y PDL1¹²³⁻¹²⁵. Estos son resultados muy positivos, ya que la reducción o el bloqueo de PDL1 en células tumorales y linfocitos infiltrantes del tumor están relacionados con un mejor pronóstico en pacientes con TNBC debido a su efecto inmunosupresor^{219,220}.

Además, ATF4 estimula la evasión inmune: el aumento de ATF4 conduce a altos niveles de fosforilación de STAT3 que, a su vez, aumenta la expresión de VEGF e IL-10, lo que causa inmunosupresión de la inmunidad innata y adaptativa²²¹. Por otra parte, se ha visto que la interacción entre PD1 y PDL1 termina en la activación de la vía eIF2 α /ATF4, que a su vez estimula, a través del factor regulador de IFN γ , la expresión de ATF4 e IFN α , lo que regula al alza PD1 estableciendo un bucle de retroalimentación¹²³. De esta forma, la liberación de un inhibidor de ATF4 en el TME donde hay células infiltradas con altas expresión de PD1 generaría un TME más inmunogénico. También TGF β

se ha relacionado con la evasión inmune en TNBC, y es que su inhibición de ha resultado en la reducción del crecimiento tumoral en modelos de ratones con TNBC a través de la mejora del microambiente, incrementando los linfocitos citotóxicos y reduciendo los reguladores²²². También se ha observado que la combinación de la inhibición de PDL1 y TGF β ha demostrado mejor actividad antitumoral en TNBC *in vivo*, así como un incremento de los linfocitos citotóxicos infiltrados en comparación a la inhibición de cada uno por separado²²³.

En este sentido, nuestros resultados mostraron un incremento en los niveles de apoptosis temprana. Este efecto proapoptótico se potenció con la combinación de ISRIB, particularmente al administrar los fármacos utilizando NExT. Mientras que las células resistentes a DOC no mostraron cambios en la apoptosis, la proliferación aún se redujo, lo que sugiere efectos duales apoptóticos y citostáticos de nuestro enfoque de tratamiento combinado. De esta forma, aunque ATF4 se clasifica generalmente como proapoptótico, la activación a través de TGF β , en lugar de ISR, podría producir resultados diferentes^{32,224}. Por ejemplo, reducir ATF4 mediante ISRIB puede potenciar los efectos apoptóticos y citostáticos del DOC al disminuir la capacidad de las CSC de eflujo de fármacos, detoxificación o proliferación, como hemos visto en nuestra investigación. Los aumentos en la apoptosis y las reducciones en la proliferación y PDL1 exacerbados por la administración de NP concuerdan con nuestros experimentos previos que muestran que NExT mejoran la eficacia terapéutica *in vitro* e *in vivo*.

6. CONCLUSIONES

1. El taxano DOC promueve la señalización de TGF β tanto *in vitro* como *in vivo*, aspecto que se revierte gracias a la inhibición génica de *ATF4*.
2. ISRIB reduce la señalización de TGF β a través de las rutas canónica y no canónica, así como de la inducción de EMT, derivadas de la activación por TGF β 1 y el tratamiento con DOC.
3. Se ha generado una línea celular resistente a DOC (SUM159-R50) enriquecida en genes de resistencia como las bombas de eflujo de fármacos ABCB1.
4. SUM159-R50 muestra un enriquecimiento en varias poblaciones de CSC con propiedades de autorrenovación, clonogenicidad, y detoxificación y eflujo de fármacos.
5. ISRIB revierte la quimiorresistencia adquirida a DOC y disminuye diferentes poblaciones de CSC y su capacidad iniciadora de tumores y de autorrenovación.
6. Se han desarrollado BNP (NExT) con tamaño, potencial y PDI apropiado, con un recubrimiento eficiente que otorga elevada estabilidad e inocuidad para sistemas vivos.
7. Se ha conseguido aumentar la expresión de receptores de IC PD1, LAG3 y TIM3 mediante un método sencillo de activación aguda. Los marcadores se han mantenido de forma adecuada en la superficie de las NExT, siendo PD1 el marcador mayoritario y más consistente en NExT.
8. NExT muestra una elevada capacidad para alcanzar de forma específica células tumorales con expresión de PDL1.
9. NExT ha demostrado ser una plataforma en la que se pueden encapsular diferentes fármacos que son liberados de una forma más controlada y

sostenida que los núcleos de PLGA, así como muestran un mayor efecto terapéutico *in vitro*.

10. Los ensayos *in vivo* demuestran la inocuidad de NExT, así como una biodistribución intratumoral más específica que nanopartículas de PLGA.
11. NExT presenta una mayor eficacia terapéutica *in vivo*, disminuyendo de forma significativa el crecimiento tumoral con bajas dosis de quimioterapéutico, y promoviendo una remodelación del TME hacia uno menos inmunosupresor y menos promotor de progresión tumoral.
12. La administración de DOC e ISRIB vehiculizados en NExT se postula como una buena estrategia terapéutica que reduce la evasión inmune (a través de la expresión de PDL1), tanto a través de la capacidad intrínseca de las NP como a través de la inhibición de ATF4 y TGF β , en líneas celulares y organoides derivados de pacientes de TNBC.
13. La combinación de DOC e ISRIB administrada en NExT potencia la apoptosis y disminución de la viabilidad generadas por DOC gracias a la inhibición de ATF4 y la administración dirigida específica de NExT en líneas celulares y organoides derivados de pacientes de TNBC.

6. CONCLUSIONS

1. The taxane DOC promotes TGF β signaling both *in vitro* and *in vivo*, an effect that is mitigated by *ATF4* gene inhibition.
2. ISRIB attenuates TGF β signaling through canonical and non-canonical pathways, as well as EMT induction derived from activation by TGF β 1 and treatment with DOC.
3. A DOC-resistant cell line (SUM159-R50) has been generated and enriched in resistance genes such as ABCB1 drug efflux pumps.
4. SUM159-R50 exhibits enrichment in various CSC populations with self-renewal, clonogenicity, and drug detoxification and efflux properties.
5. ISRIB reverses acquired DOC chemoresistance and diminished different CSC populations and their tumor-initiating and self-renewal capacities.
6. BNP (NExT) have been developed with appropriate size, potential, PDI, and efficient coating, which provides high stability, and safety to living systems.
7. Increase of the expression of IC receptors PD1, LAG3, and TIM3 through a straightforward method of acute activation is achieved. The markers are maintained on the surface of NExT, with PD1 being the predominant and most consistent marker in NExT.
8. NExT exhibits a high capacity to specifically target tumor cells expressing PDL1.
9. NExT has proved to be a robust platform capable of encapsulating diverse pharmacological agents, which are released in a more controlled and sustained manner compared to PLGA cores, thereby demonstrating a superior therapeutic effect *in vitro*.

10. *In vivo* assays demonstrate the non-toxicity of NExT and a more precise intratumoral biodistribution than PLGA nanoparticles.
11. NExT demonstrates superior *in vivo* therapeutic efficacy, significantly reducing tumor growth with low doses of chemotherapeutic agents and promoting the remodeling of the TME towards a less immunosuppressive and tumor-promoting.
12. The administration of DOC and ISRIB vehiculated in NExT is proposed as an efficacious therapeutic strategy that mitigates immune evasion (via PDL1 expression), both through the intrinsic properties of the nanoparticles and through the inhibition of ATF4 and TGF β , in TNBC patient-derived cell lines and organoids.
13. The combination of DOC and ISRIB administered in NExT enhances apoptosis and viability reduction induced by DOC, owing to the inhibition of ATF4 and the precise targeted delivery of NExT in TNBC patient-derived cell lines and organoids.

7.MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Pacientes

El estudio reclutó a 24 pacientes diagnosticadas con TNBC de la UGC de Oncología del Hospital Clínico San Cecilio de Granada, España. Se recogieron muestras de sangre periférica (8 ml) y una biopsia de tumor con aguja gruesa de una paciente según el protocolo aprobado por el Comité de Ética de Referencia con el código PI19/01533/1626-N-19.

7.2 Cultivos celulares

7.2.1 Líneas celulares de cáncer de mama

Las líneas celulares de cáncer de mama humano MCF7 (RE+), MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT549 y HS578T de ATCC y SUM159 (TNBC) de Asterand, se cultivaron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich), suplementado con 10% de FBS (suero bovino fetal, Thermo Fisher Scientific), a 37°C y 5% de CO₂.

7.2.2 Líneas celulares de leucemia

Las células Namalwa (CRL-1432) y Nalm7 (CRL-3273) de ATCC se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS y 100 U/ml de penicilina/estreptomomicina (1%P/S, Biowest) a 37°C y 5% de CO₂.

7.2.3 Cultivos primarios de PBMC enriquecidos en células T

Se aislaron PBMC de sangre periférica en tubos BD Vacutainer CPT – Heparina Sódica (BD Biosciences) mediante centrifugación a 1,800×g durante 30 min a temperatura ambiente. Las PBMC se lavaron dos veces con 1X PBS suplementado con FBS (2%) (buffer de lavado) a 450×g durante 10 min a temperatura ambiente. El cultivo y la activación de PBMC para obtener cultivos enriquecidos en linfocitos T sin selección magnética se realizaron como se había publicado anteriormente, con modificaciones^{171,225}.

Brevemente, las células se transfirieron a una placa de fondo plano de 12 pocillos Nunclon (Thermo Fisher Scientific) (2-4 millones de células/pocillo) con 2 ml de medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero humano AB (Sigma-Aldrich), antibiótico penicilina-estreptomicina (1%) (Gibco), e IL-2 (100 U/ml) (Peprotech) (RPMI+) y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 días sin manipulación. Transcurridos estos días de aclimatación, las células en suspensión se aislaron de las células adherentes y se expandieron en medio RPMI+ fresco con T Cell TransAct (10 µl/ml) durante 3 semanas. El medio de cultivo RPMI+ se renovó cada 48-72h.

La evolución de la proliferación se verificó mediante conteo manual con azul de tripano (Gibco). Una vez alcanzado un número superior a 24 millones el mantenimiento se llevó a cabo en frasco T75 con un volumen de medio de unos 25 ml con el mismo medio de cultivo, se llevaron a cabo reactivaciones con TransAct (10 µl/ml) cada 3-4 para reactivar la proliferación.

7.3 Síntesis de nanopartículas de PLGA y NExT

7.3.1 Síntesis de nanopartículas PLGA vacías y cargadas con cumarina, IR780, DOX, y EPI.

Las NP de PLGA se sintetizaron mediante una técnica de evaporación de solvente de doble emulsión (W/O/W) como se publicó anteriormente con modificaciones¹²⁰. Para este propósito, se disolvieron 25 mg de PLGA (terminado en ácido, láctico:glucónico 50:50, Mw 24-38 kDa) (Resomer RG 503 H. Sigma-Aldrich) en 1.5 ml de diclorometano (DCM) solo (PLGA vacío) o con cumarina-6 (Sigma-Aldrich) (37.5 µg), IR780 (1 mg) (Sigma-Aldrich), EPI (2 mg) o DOX (2 mg) (MedChem Express). Esta solución orgánica se emulsionó gota a gota con 0.5 ml de alcohol polivinílico (PVA) (0.001%) con un sonicador de sonda (100W, 100% de amplitud) durante 3 min (UP100H, Hielscher). La emulsión obtenida (W/O) se añadió gota a gota a 24.5 ml de PVA (0.001%) y se sonicó nuevamente (100W, 100% de amplitud) durante 3 min para formar una doble emulsión (W/O/W). El DCM se evaporó mediante agitación magnética durante 2h.

7.3.2 Síntesis de nanopartículas de PLGA con DOC e ISRIB

Para la encapsulación de DOC, el protocolo anterior se modificó de acuerdo al protocolo publicado por Cho *et al*²²⁶. Para ello, se disolvieron 6 mg de DOC (MedChem Express) en 0.5 ml de DCM y posteriormente se añadieron 25 mg de PLGA. En el caso del ISRIB, se disolvieron 5 mg de éste con 0,5 ml de DCM y 0,5 ml de cloroformo, para aumentar la solubilidad del fármaco y mejorar su encapsulación. Tras la adición de 25 mg de PLGA, esta disolución

fue sonicada (100W, 100% de amplitud) durante 2 min. La mezcla obtenida se añadió a 10 ml de PVA (0.2%) y se sonicó nuevamente (100W, 100% de amplitud) durante 10 min. El DCM se evaporó mediante agitación magnética durante 2h.

7.3.3 Aislamiento de membranas

El aislamiento de membranas celulares se realizó utilizando un protocolo modificado basado en publicaciones anteriores²²⁷. Para este propósito, los cultivos enriquecidos en células T (NaT) o ExT se lavaron con PBS 1X y se resuspendieron en una proporción de 3 millones de células por ml de buffer hipotónico de Tris-Magnesio (Tris 10 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7.4), suplementado con inhibidor de proteasa y fosfatasa 1X (Thermo Fisher Scientific), EDTA (0.5 mM) (Thermo Fisher Scientific) y benzonasa (12,5 U/ml) (Santa Cruz Biotechnology), a 4°C durante 20 min.

La suspensión celular se homogeneizó durante 40 s con un dispersor Ika Ultra-Turrax T18 a 11,000 rpm y se centrifugó a 600×g durante 10 min a 4°C para descartar los desechos celulares más grandes.

Finalmente, el sobrenadante se centrifugó a 17,000×g durante 30 min a 4°C para obtener un pellet enriquecido en membranas plasmáticas celulares. El contenido de proteínas de dicho pellet se cuantificó utilizando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific). Las membranas resultantes se resuspendieron en agua MilliQ a una concentración de 1-2 mg de proteína/ml.

7.3.4 Recubrimiento de NExT

El recubrimiento de NP de PLGA, vacías o cargadas con un fármaco o agente de imagen, se realizó mediante sonicación como se ha publicado previamente²²⁸.

Para optimizar la eficiencia del recubrimiento, las membranas celulares se marcaron con DiL (Tetrametilindocarbocianina Perclorato 2.5 μ M; Invitrogen) mediante su incubación durante 20 min a 37°C. El exceso de fluoróforo se eliminó mediante centrifugación a 17,000 \times g durante 30 min a 4°C. Las membranas marcadas se resuspendieron a una concentración final de 1 o 2 mg/ml y se mezclaron con NP de PLGA marcado con FITC (Nanovex Biotechnologies) (1 mg/ml) a relaciones de volumen PLGA:membrana de 1:1 y 1:2.

Posteriormente se sonicaron durante 5, 10 y 15 min en un sonicador de baño a 100W y 40 kHz (GT SONIC-R3) con diferentes concentraciones de membrana marcada con DiL (1 y 2 mg de proteína/ml) a relaciones de volumen de PLGA:proteína de membrana de 1:1 y 1:2.

Finalmente, el protocolo de recubrimiento optimizado para preparar NExT y NP recubiertas con membranas de cultivos enriquecidos en células T se estableció de la siguiente manera: NP de PLGA (1 mg/ml) y la fracción de membrana (2 mg de proteína/ml) de ExT o NaT se mezclaron en una proporción de volumen 1:1 (núcleo:membrana) y se sonicaron durante 5 min en un sonicador de baño a 100W y 40 kHz.

7.4 Caracterización de nanopartículas de PLGA y NExT

7.4.1 Dispersión dinámica de luz

El tamaño, PDI y el potencial ζ en agua MilliQ (pH 6.6-6.8) de las NP de PLGA y NExT se caracterizaron en un sistema Zetasizer Nano S (Malvern Instrument, UK) mediante DLS y ELS (dispersión de luz electroforética). Se utilizó la rutina de auto-optimización en el software Zetasizer para todas las mediciones, y el potencial ζ se calculó según la teoría de Smoluchowsky.

Para el ensayo de estabilidad, las NP de PLGA y NExT se conservaron a 4°C y se midieron a 0, 3 y 14 días mediante DLS.

7.4.2 Microscopía electrónica de transmisión

La TEM se realizó siguiendo el protocolo publicado anteriormente⁸⁷ para observar la estructura de las NP y el correcto recubrimiento. Brevemente, se depositaron 50 μ l de NP en una rejilla de cobre de malla cuadrada 300 recubierta de carbono durante 5 min.

La tinción negativa de las muestras (PLGA y NExT) se realizó con acetato de uranilo al 1% (Sigma Aldrich) para teñir el material biológico, para después lavar con agua durante 1 min. Después de secar las muestras con papel a temperatura ambiente, se determinó su composición química e imagen con un microscopio de transmisión de alta resolución Thermo Fisher TALOS F200X a 200 kV, mediante EDX.

7.5 Citometría de flujo

7.5.1 Evaluación de poblaciones de linfocitos en cultivos de PBMC

El porcentaje de células T (CD3+) y B (CD19+) se investigó en cultivos enriquecidos en células T expandidas durante 3 semanas e incubadas con anti-CD3 (2.5 µg/ml, anti-human CD3, OKT3, PerCP Cyanine 5.5; eBioscience) y anti-CD19 (10 µg/ml, anti-human CD19, SJ25C1, APC; eBioscience) durante 15 min a temperatura ambiente. El porcentaje de células positivas para cada anticuerpo se determinó con un citómetro de flujo FACSVerse (BD Biosciences) y se analizó con FlowJo.

7.5.2 Optimización del recubrimiento de NExT

Para estudiar la eficiencia del recubrimiento, las NP de PLGA FITC⁺ y FITC⁻, decoradas con membranas marcadas con DiL, se analizaron en un citómetro de flujo FACSVerse (BD Biosciences) bajando el umbral de la dispersión al mínimo para detectar las NP como se ha publicado anteriormente^{167,229}. Los resultados se analizaron mediante el software FlowJo.

7.5.3 Inducción aguda de células T agotadas in vitro

Los ExT se obtuvieron mediante la activación aguda de cultivos enriquecidos en células T con T Cell TransAct (10 µl/ml) durante 0, 24, 48 y 72 h antes de la recolección. La expresión de los receptores PD1, LAG3, TIM3 y TIGIT, inhibidores del IC, se determinó mediante citometría de flujo en ExT

después de la incubación con anti-PD1 (5 µg/ml, anti-human CD279, J105, PE; eBioscience), anti-LAG3 (0.3 µg/ml, anti-human CD223, 3DS223H, PE o APC; eBioscience), anti-TIGIT (0.625 µg/ml, anti-human TIGIT, MBSA43, FITC; eBioscience), anti-TIM3 (0.625 µg/ml anti-human CD366, F38-2E2, PE o APC; eBioscience), o el isotipo correspondiente (Mouse IgG1 kappa Isotype Control, PE, APC o FITC; eBioscience), durante 15 min a temperatura ambiente. La expresión de cada marcador se determinó en un citómetro de flujo FACSVerse (BD Biosciences) y los resultados se analizaron con FlowJo.

7.5.4 Preservación y orientación de las proteínas de membrana en NExT

Para evaluar la preservación y correcta orientación de los receptores de IC en NExT, las NP recubiertas se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente con anticuerpos anti-PD1, anti-LAG3 y anti-TIM3, o su isotipo correspondiente, como se ha descrito en la sección anterior. La expresión superficial de los receptores IC en NExT se determinó mediante citometría de flujo (citómetro de flujo FACSVerse, BD Biosciences) bajando el umbral en la dispersión para detectar las NP como se indicado previamente. Los resultados se analizaron mediante FlowJo.

7.5.5 Evaluación de los niveles de PDL1

La expresión de PDL1 se indujo en las líneas celulares de cáncer de mama SUM159, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF7, BT549 y HS578T mediante tratamiento con IFN γ (100 ng/ml) durante 24h como se ha publicado¹⁹⁹.

La expresión exógena de PDL1 en las células Namalwa y Nalm7 se realizó mediante su transducción con vectores lentivirales de PDL1 a una multiplicidad de infección (MOI) de 20 mediante espinoculación ($800\times g$ durante 30 min a $32^{\circ}C$).

Para el estudio del mecanismo de acción de NExT mediante un ensayo de rescate, los niveles de PDL1 se bloquearon en MDA-MB-468 mediante el tratamiento con el anticuerpo de IT atezolizumab ($10\ \mu g/ml$) durante 24 h.

Para inducir la expresión de PDL1 en organoides, éstos se trataron con $IFN\gamma$ ($100\ ng/ml$) durante 0, 24, 48, 72 o 96 h. Los niveles de PDL1 se evaluaron en las líneas MDA-MB-231 y SUM159 y en el PDxO UGR01 después del tratamiento durante 72 h con ISRIB ($5\ \mu M$) y/o DOC (5, 2.5 y 0.5 nM, respectivamente).

En todos los casos, los niveles de PDL1 se determinaron mediante citometría de flujo incubando las células cancerosas con anti-CD274 ($5\ \mu g/ml$, PDL1, MIH1, PE; eBioscience), o isotipo ($5\ \mu g/ml$, Mouse IgG1 kappa Isotype, PE; eBioscience) durante 15 min a temperatura ambiente. El porcentaje de células positivas para cada anticuerpo se determinó con un citómetro de flujo FACSVerse (BD Biosciences). El análisis de los resultados se realizó utilizando FlowJo.

7.5.6 Evaluación de la administración dirigida de NExT

Para evaluar la eficiencia de NExT en la administración dirigida, las células SUM159 se trataron con NExT o NP de PLGA ($100\ \mu g/ml$) cargadas

con cumarina-6 durante 5, 15 y 30 min. La línea celular MDA-MB-468 se cultivó en presencia/ausencia de IFN γ (100 ng/ml) durante 24h y se trató con NExT o NNaT (100 μ g/ml) cargadas con cumarina-6.

Así mismo, las células Namalwa y Nalm7 transducidas con PDL1 o de tipo salvaje (WT, *wild type*) se trataron con NExT o NP de PLGA (100 μ g/ml) cargadas con cumarina-6 durante 5 y 15 min, y 30 y 60 min, respectivamente.

Para el experimento de rescate, las células MDA-MB-468 (con/sin IFN γ , 100 ng/ml) se trataron con el anticuerpo anti-PDL1 atezolizumab (10 μ g/ml) durante 24h y NExT o NP de PLGA cargadas con cumarina-6 (100 μ g/ml) durante 15 min.

En todos los casos, el porcentaje de células positivas para la fluorescencia de cumarina-6 se detectó en el canal FITC mediante el citómetro de flujo FACS Verse y se analizó con FlowJo.

7.5.7 Evaluación de la población ALDH1+

La población de CSC positivas para el marcador ALDH1 se determinó en las células SUM159 y SUM159-R50 mediante el kit de ALDF de acuerdo a como hemos publicado anteriormente^{32,112,230} y siguiendo las instrucciones del proveedor (STEMCELL technologies). Este kit incluye en un reactivo fluorescente que bajo la actividad de ALDH1 genera un producto que se retiene en el interior de las células.

Para medir el efecto de ISRIB en la línea SUM159-R50 las células fueron sembradas y tratadas o no con ISRIB 5 μ M durante 2 días. A continuación, se resuspendieron quinientas mil células por muestra en buffer ALDF. Posteriormente, se añadió DEAB a las muestras correspondientes a una concentración de 50 μ M utilizándose como inhibidor para diferenciar la señal específica, lo que permite identificar células con alta actividad de ALDH1.

Se añadió reactivo de ALDF a una concentración de 1:200 y cada tubo se incubó durante 30 min a 37°C. La viabilidad celular se determinó mediante la tinción con SYTOX blue. Finalmente, la subpoblación ALDF+ (ALDH1+) se analizó en un citómetro de flujo FACSAria Fusion BD (Biosciences).

7.5.8 Evaluación de la población lateral (*side population*)

La población lateral (*side population*) con capacidad para el eflujo de sustancias se analizó en las células SUM159 y SUM159-R50, éstas últimas tratadas o no con ISRIB 5 μ M durante 2 días, siguiendo el protocolo previamente publicado¹¹². Brevemente, se resuspendieron un millón de células por muestra en 500 μ l de DMEM suplementado con FBS al 2% y HEPES (10 mM) y se añadieron 5 μ g/ml de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich).

Las muestras se incubaron durante 90 min a 37°C en la oscuridad, agitando a los 45 min. Como control de inhibición, se utilizó verapamilo a una concentración de 50 μ M. Se añadió 1 μ g/ml de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) para determinar la población viable. Hoechst 33342 fue excitado con láser UV a 355 nm, y las emisiones se detectaron a 450/50 nm y 670/30 nm en un citómetro FACSAria BD (Biosciences).

7.5.9 Evaluación de la apoptosis

La inducción de apoptosis en células de TNBC se evaluó utilizando un kit de detección de apoptosis Annexin V con yoduro de propidio (Immunostep) según el protocolo del fabricante y de acuerdo a nuestros trabajos previos²³¹. La apoptosis se evaluó en las líneas MDA-MB-231, SUM159 y SUM159-R50 y en el PDxO UGR01 después del tratamiento durante 72 h con ISRIB (5 μ M) y/o DOC (5, 2.5, 250 y 0.5 nM respectivamente). El porcentaje de células positivas para cada anticuerpo se determinó con un citómetro de flujo FACSVerse (BD Biosciences). El análisis de los resultados se realizó utilizando FlowJo.

7.6 Western blot

Los lisados celulares se obtuvieron añadiendo tampón de lisis 1X (Cell Signaling Technology) y cóctel de inhibidor de proteasas y fosfatasa 1X a los cultivos celulares, membranas purificadas, y NExT. Las muestras se congelaron a -80°C para favorecer el lisado, se agitaron con vórtex 3 veces durante 10 min, y se centrifugaron a 14.000 durante 5 min a 4°C para obtener el extracto proteico en el sobrenadante.

Cada muestra se preparó para la posterior electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida mediante la incubación de un volumen de extracto (equivalente a 30 μ g de proteína) con tampón de carga (Thermo Scientific) y β -mercaptoetanol (Sigma) (dilución 1:4) a 90°C durante 5 min. A continuación, cada muestra se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente

del 4-20% (Bio-Rad) sumergidos en tampón de electroforesis con dodecilsulfato sódico (SDS) (Bio-Rad) a 200V durante 30 min.

La transferencia de proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa se realizó a 50 Ah durante 50 min en presencia de tampón de transferencia (Bio-Rad). Las membranas fueron bloqueadas con leche desnatada al 5% en Búfer Tris salino (TBS) 1X con Tween 20 (1%) (Sigma) (TBST) durante 60 min y se lavaron en TBST tres veces durante 15 min. Se añadieron los anticuerpos primarios en una dilución 1:1000 en leche al 5% en TBST frente diferentes proteínas y se incubaron a 4°C toda la noche. Posteriormente, las membranas se lavaron en TBST tres veces durante 15 min, se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente anti-rabbit o anti-mouse a una dilución 1:1000 y se volvieron a lavar tres veces 15 min con TBST. Para revelar la expresión, las membranas se incubaron con reactivos de quimioluminiscencia Classic y Femto (Thermo Scientific) durante 5 min y se revelaron en el ImageQuant LAS4000. El análisis densitométrico se realizó con el software Image J.

7.6.1 Recubrimiento y purificación de las membranas de NExT

El grado de purificación del extracto de membranas y el correcto recubrimiento de NExT, se determinó mediante western blot de la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa α 1 (Santa Cruz Biotechnology) en células T, membranas purificadas y NExT. GAPDH (Proteintech) fue empleado como control de otro contenido celular distinto a membrana plasmática.

7.6.2 Evaluación del bloqueo de la señalización con TGFβ y de la EMT inducido por TGFβ1

Para evaluar el efecto de ISRIB en EMT y señalización de TGFβ inducidas por TGFβ1, se sembraron las líneas celulares SUM159 y MDA-MB-231 y se trataron con TGFβ1 recombinante humano (10 ng/ml) disuelto en BSA al 0.1% e ISRIB disuelto en DMSO (0, 1.25 μM, 2.5 μM y 5 μM para SUM159 y 0, 0.625 μM, 1.25 μM y 2.5 μM para MDA-MB-231) durante 72 h. Las muestras se recolectaron a las 24 h.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-Snail, anti-Vimentin, anti-Smad2/3, anti-pSmad2/3, anti-Akt, anti-pAkt, anti-βActina, (Cell Signaling Technology), y anti-ATF4 (Santa Cruz Biotechnology).

7.6.3 Evaluación del bloqueo de la señalización con TGFβ y de la EMT inducidos por DOC

Para evaluar el efecto de ISRIB sobre señalización de TGFβ y EMT inducidas por DOC se sembraron SUM159 y MDA-MB-231 se trataron con DOC (10 nM) y/o ISRIB (2.5 μM y/o 5 μM) diluido en DMSO durante 96 h. El inhibidor se reemplazó cada 72 h. Después de 96 h, se eliminó el medio y se añadió nuevo medio no tratado para dejar la cultura durante otras 96 h en recuperación.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-Snail, anti-Vimentin, anti-Smad2/3, anti-pSmad2/3, anti-Akt, anti-pAkt, anti-GAPDH (Cell Signaling Technology).

7.6.4 Evaluación de marcadores de CSC en la línea parental y la línea resistente y el efecto de ISRIB

Para evaluar los cambios en la expresión de marcadores de CSC en la línea resistente y el efecto de ISRIB sobre los mismos se sembraron células SUM159 y SUM159-R50 sin tratamiento, además, la línea resistente fue tratada con ISRIB 5 μ M. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-Notch1, anti-Vimentina, anti-OCT4, anti-SOX2 y anti-GAPDH (Cell Signaling Technology).

7.7 Viabilidad

Para evaluar la viabilidad de utiliza el reactivo WST-1 (Sigma-Aldrich) que se metaboliza en un compuesto detectable bajo la presencia de células activas metabólicamente y viables. Después de los tratamientos, se añadió el reactivo y se incubó a 37°C durante 1h. La absorbancia se midió a 450 nm en lector de placas Tecan.

7.7.1 Evaluación de la toxicidad de las nanopartículas de PLGA y NExT in vitro

La toxicidad de las NP de PLGA y NExT se estudió en células SUM159 sembradas en placas de 96 pocillos tratadas con concentraciones crecientes de NP (de 0.01 a 1 mg/ml).

7.7.2 Evaluación de la eficacia terapéutica de las nanopartículas de PLGA y NExT in vitro

La proliferación de células SUM159 y MDA-MB-468 se evaluó en placas de 96 pocillos tratadas con concentraciones crecientes de NP de PLGA o NExT cargadas con DOC (0-50 nM), DOX (0-1.8 μ M) y EPI (0-500 nM) durante 48 h.

7.7.3 Evaluación de la quimiorresistencia

Determinamos la adquisición de quimiorresistencia después de los tratamientos con DOC calculando la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀). Las células parentales SUM159 y las SUM159-R50 se sembraron en placas de 96 pocillos (n=6 réplicas/grupo) y se trataron con concentraciones crecientes de DOC (0-320 nM) durante 72 h.

7.7.4 Evaluación de ISRIB sobre la quimiorresistencia

Determinamos el efecto de ISRIB sobre la quimiorresistencia calculando la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀). Las células SUM159-R50 se sembraron en placas de 96 pocillos (n=6 réplicas/grupo) y se trataron con ISRIB (5 μ M) y/o concentraciones crecientes de DOC (0-320 nM) durante 72 h.

7.8 Evaluación de nanopartículas cargadas con fármacos

7.8.1 Evaluación de la eficiencia de encapsulación

Para determinar la masa del fármaco encapsulado, las NP cargadas con quimioterapia se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich). La concentración de DOC se midió mediante HPLC utilizando una curva de calibración en el rango de concentración de 0.00 a 500.0 µg/ml (R²=0.9998). La concentración de DOX y EPI se midió espectrofotométricamente a 480 nm utilizando una curva de calibración en el rango de concentración de 0.00 a 100.0 µg/ml (R²=0.9992) en un lector de placas Infinite 200 PRO.

La EE de cada fármaco se calculó según la Ecuación 1²⁰⁵:

$$\text{Ecuación 1: EE (\%)} = \frac{\text{masa de fármaco encapsulada}}{\text{masa total de fármaco}} \times 100$$

La LC de cada fármaco se calculó según la Ecuación 2²⁰⁵:

$$\text{Ecuación 2: LC (\%)} = \frac{\text{masa de fármaco encapsulada}}{\text{masa de fármaco encapsulada} + \text{masa de NPs}} \times 100$$

7.8.2 Evaluación de la liberación

El perfil de liberación de cada fármaco de NExT y NP de PLGA se determinó midiendo la concentración de fármaco libre en una fase receptora acuosa durante 4 semanas como se publicó previamente^{205,232}. Brevemente, las NP de PLGA y NExT (2 mg) se lavaron y se resuspendieron en 200 µl de PBS Tween (Sigma-Aldrich) (0.1%) (pH 7.4) y se incubaron a 37°C en un agitador orbital. Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes a 1, 3, 6, 24 y 48h, así

como a 1 y 2 semanas, tras la centrifugación a $9600\times g$ durante 5 min. Finalmente, se cuantificaron los fármacos como se ha descrito en la sección anterior.

7.9 Estudios en animales

Los procedimientos experimentales en animales se llevaron a cabo de acuerdo con los estándares institucionales (Comité de Ética en la Investigación de la Universidad de Granada) e internacionales (Consejo de las Comunidades Europeas). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Granada (código del protocolo aprobado: 12/07/2019/127). Todos los animales fueron alojados y mantenidos a 20-24°C, 50% de humedad relativa y un ciclo de luz-oscuridad de 10:14h con comida y agua *ad libitum*.

7.9.1 Seguridad in vivo de NExT

Se realizaron ensayos de toxicidad en ratones hembra CD1 de 6 a 8 semanas de edad (n=3 ratones/grupo). Los ratones fueron tratados con NP de PLGA vacías y NExT (25 o 100 mg/kg) en un volumen de 100 μ l a través de la vena de la cola. Se utilizó PBS como vehículo. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar y se evaluaron el peso corporal, la respuesta al manejo, el comportamiento, el apetito y otros signos clínicos (falta de aseo, agresividad hacia los compañeros, estereotipias, piloerección, secreción nasal y ocular, espalda arqueada, convulsiones, dificultad respiratoria severa, deshidratación severa, inmovilidad, aislamiento social e hipotermia) hasta el punto final.

Después de 7 días, se extrajo sangre mediante punción cardíaca (procedimiento terminal) y se recolectaron los órganos principales después de la eutanasia, como se publicó. Tras el examen macroscópico pertinente, los órganos se seccionaron y se incluyeron en para-formaldehído (PFA) al 4% para un estudio histopatológico posterior por un patólogo con hematoxilina/eosina (H&E). Los parámetros hematológicos (glóbulos blancos, glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media, plaquetas) y el recuento de glóbulos blancos fueron analizados por la Escuela de Análisis Clínicos de la Universidad de Granada.

7.9.2 Acumulación intratumoral y biodistribución de NExT

La acumulación intratumoral de NExT se evaluó en ratones hembra *NOD SCID Gamma* (NSG) inyectados ortotópicamente con células SUM159 (3×10^6) en la almohadilla de grasa mamaria (n=6).

Cuando los tumores alcanzaron 150-170 mm³, los ratones se aleatorizaron en los siguientes grupos experimentales: Vehículo, PLGA y NExT. Cada ratón recibió una inyección de NP de PLGA cargado con IR780 o NExT (100 µl) a una concentración de 100 µg/ml a través de la vena de la cola. Esta concentración resultó en una dosis de 0.5 mg/kg de fluoróforo. La fluorescencia se midió a 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h en el Sistema de Imagen In Vivo IVIS Spectrum (PerkinElmer) utilizando el filtro 745/800nm.

Después de 24 h, los animales se sacrificaron y la fluorescencia también se midió en corazones, pulmones, hígados, riñones, bazos y tumores *ex vivo*.

Los resultados se normalizaron con la fluorescencia de fondo del grupo vehículo.

7.9.3 Actividad terapéutica in vivo de NExT en un modelo PDX de TNBC

Generamos un modelo de PDX (UGR01) a partir de una biopsia con aguja gruesa de un paciente con TNBC inscrito en el Hospital Universitario San Cecilio (ibs.GRANADA) como hemos publicado previamente³². La biopsia del tumor (1 mm³) se implantó ortotópicamente en la almohadilla de grasa mamaria de ratones hembra NSG de 4 a 5 semanas de edad. El tejido tumoral PDX (G0) se extirpó y se cortó en pequeños fragmentos (1 mm³) y luego se reimplantó en nuevos ratones (3-4 ratones) para obtener G1. Este proceso se repitió hasta que se generó G3. Las primeras generaciones se fijaron en PFA al 4% e incluyeron en parafina para una caracterización histopatológica posterior por un patólogo.

Cuando los tumores G3 alcanzaron un tamaño de 120-170 mm³, los ratones se asignaron aleatoriamente a los grupos de tratamiento (n=5 ratones/grupo) Vehículo (1X PBS), DOC libre (5 mg/kg), PLGA-DOC (5 mg/kg) y NExT-DOC autólogo (5 mg/kg) recubierto con membranas de linfocitos T derivados del paciente fuente de la biopsia tumoral para generar el modelo PDX UGR01. Los ratones recibieron 4 inyecciones de 100 µl a través de la vena de la cola (dosis acumulativa de DOC: 20 mg/kg). El crecimiento tumoral se evaluó dos veces por semana con un calibrador digital y el volumen tumoral se calculó según la Ecuación 3 como publicamos³². Finalmente, los ratones PDX fueron sacrificados y los tumores se fijaron con PFA al 4% para un análisis posterior.

$$\text{Ecuación 3: } V = longitud^2 \times ancho \times \frac{\pi}{6}$$

7.9.4 Inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, y FISH

Los hígados, pulmones y tejido tumoral PDX se fijaron en PFA al 4% a 4°C durante 24h, se lavaron en PBS 0.1 M, se incluyeron en parafina con un procesador de tejidos automático (TP1020; Leica, Alemania) y se cortaron en secciones (4 μm).

La inmunofluorescencia se realizó como publicamos con anterioridad¹¹². Brevemente, las secciones se desparafinaron con xileno y se hidrataron con concentraciones decrecientes de alcohol. Para la inmunofluorescencia, la recuperación de antígenos se realizó a 121°C durante 15 min en una solución tampón de citrato de sodio (pH 6.0).

Luego, las secciones se bloquearon durante 2h a temperatura ambiente con BSA al 5% y se incubaron con los anticuerpos primarios anti-PDL1 (CD274, MIH1, eBioscience) (dilución 1:100), anti-PDL1 (CD274, 2B11D11, Proteintech) (dilución 1:100), anti-Ki67 (8D5, Cell Signaling) (dilución 1:1000) y anti- α -SMA (α -actina de músculo liso) (ab5694, Abcam) (dilución 1:100) durante la noche a 4°C.

Las muestras se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado (anti-rabbit Alexa Fluor 488 o anti-mouse Alexa Fluor 594; Cell Signaling) (dilución 1:500) durante 2 h a temperatura ambiente. Donde se indicó, las membranas celulares se tiñeron con DiI (2.5 μM ; Invitrogen) mediante incubación durante 20 min a 37°C.

Finalmente, se lavó tres veces con PBS y se montó con un medio de montaje que contiene DAPI (Cell Signaling). Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal Zeiss LSM 710.

La inmunohistoquímica se realizó después de la recuperación de antígenos (fluido de recuperación de antígenos 10X EDTA, pH 8.0; Vitro) en un módulo PTLINK (Vitro). La tinción se realizó en un Autostainer 480 (Vitro) utilizando el Sistema de Detección Master Polymer Plus (Peroxidasa) (Vitro). Para ello, las secciones se lavaron y bloquearon con peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 min y se incubaron con anticuerpos primarios contra ER (anticuerpo monoclonal de conejo, clon SP1; Vitro) y PR (anticuerpo monoclonal de conejo, clon 16; Vitro) durante 5 y 10 min a temperatura ambiente, respectivamente.

Las secciones se trataron luego con solución de inmunodetección (anticuerpo secundario biotinilado) durante 30 min, y 3,3'-diaminobenzidina (dilución 1:50) (Vitro) como agente cromogénico. Las secciones se tiñeron en hematoxilina de Meyer. Como control negativo, el anticuerpo primario se reemplazó por un suero no inmune. La ausencia de cualquier tinción nuclear en células neoplásicas se consideró negativa por un patólogo.

Las secciones desparafinadas de hígados, pulmones y tejido tumoral PDX se tiñeron con H&E y fueron evaluadas por un patólogo. Las secciones se hidrataron (desparafinadas), se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (Sigma-Aldrich) y se deshidrataron según las instrucciones del fabricante. Las

secciones teñidas se montaron en cubreobjetos con medio de montaje. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio Leica DM 550B.

Finalmente, el estado de HER2 se determinó utilizando la prueba de hibridación in situ fluorescente (FISH) en las secciones desparafinadas del tejido tumoral PDX (ERBB2/CCP17 FISH Probe Kit, CT-PAC001, CytoTest Inc). Se utilizaron las últimas recomendaciones de ASCO/CAP 2018 en la interpretación por un patólogo²³³.

7.9.5 Evaluación del efecto de DOC y la inhibición de ATF4 sobre la señalización de TGFβ in vivo

Los experimentos se realizaron utilizando dos PDX con TNBC: BCM-4664 y BCM-3887. Los PDX se trasplantaron en la grasa mamaria de ratones inmunosuprimidos NSG (NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ) durante 4 a 5 semanas, después de la extirpación de la glándula mamaria, y se mantuvieron en condiciones estándar. Para los tratamientos se prepararon NP liposomales de DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glicero-3-fosfolina) cargados con los siRNA frente a ATF4 (siATF4) y control (siSCR) para su administración a ratones *in vivo*. Para ello, los siRNA se mezclaron con el DOPC en presencia de exceso de terbutanol (1:10, p/p) y luego se añadió Tween 20. La mezcla se congeló en un baño de hielo seco/acetona y luego se liofilizó. Antes de la administración *in vivo*, la preparación liofilizada se hidrató con PBS (1X) a una concentración de 25 µg/ml.

Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 150 a 200 mm³, los animales se aleatorizaron en los siguientes grupos de tratamiento (n=5/grupo): siRNA no codificante (SCR) (5 µg dos veces por semana); ATF4-siRNA (5 µg

dos veces por semana); SCR (5 µg dos veces por semana) + DOC (20 mg/kg en los días 1, 14 y 28); y *ATF4*-siRNA (5 µg dos veces por semana) + DOC (20 mg/kg en los días 1, 14 y 28). A las 6 semanas, se extrajo sangre retroorbital y se aisló el plasma por centrifugación a 2.500 rpm durante 10 min a 4°C.

7.9.6 Cultivo primario de PDxO

Cuando los tumores PDX de la generación G2 alcanzaron un tamaño de 120-170 mm³, los ratones se sacrificaron y se recolectó el tejido tumoral para la obtención de los cultivos de organoides. Para el establecimiento de estos PDxO, los tumores se homogeneizaron finamente y posteriormente se digirieron enzimáticamente con colagenasa A (1,6 U/mL) (Roche) durante 15 min a 37°C en un agitador orbital (200 rpm). Tras la precipitación del material no digerido, el sobrenadante se recogió y conservó en hielo. Se realizaron dos o tres digestiones adicionales para enriquecer el pellet y se eliminaron los glóbulos rojos utilizando una solución de cloruro de amonio.

Las células aisladas se incluyeron en una membrana basal solubilizada reducida en factores de crecimiento (Matrigel®, Corning) o Extracto de Membrana Basal tipo 2 (BME type 2 PathClear, Cultrex), y se sembraron en gotas de 50 µl en placas de 24 pocillos. Después de 0,5-1 hora a 37°C, se añadió medio de organoides que se cambió cada 3-4 días. El medio de organoides consistió en DMEM/F12 avanzado con 5% de FBS, 10mM HEPES, 1× Glutamax, 1 µg/ml de hidrocortisona, 1X de penicilina/estreptomicina, 10 ng/ml de hEGF y 10 µM de Y-27632^{126,234}.

Aproximadamente cada 7 días, se procedió al pase de los PDxO maduros y en confluencia, mediante su recolección y liberación de la matriz a través de su incubación en una solución de recuperación celular (Cell recovery solution, Corning) durante 1 hora a 4°C. A continuación, las células fueron individualizadas mediante tripsinización a 37°C y embebidas en nueva matriz de membrana basal como se ha descrito anteriormente.

7.10 Evaluación de la señalización de TGFβ

7.10.1 ELISA

Los niveles de ligando TGFβ1 se midieron mediante ELISA con el kit Human TGFβ1 Quantikine (R&D) en el sobrenadante de células SUM159 y MDA-MB-231 tratadas con DOC (10 nM) durante 0, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h, así como en el plasma obtenido de los ratones PDX BCM-4664 y BCM-3887, siguiendo las instrucciones del proveedor.

7.10.2 Ensayo de reportero

La actividad de señalización de TGFβ se determinó en la línea celular SBE-HEK293 (BPS Bioscience) que expresa de manera estable el SBE junto con luciferasa, que se puede medir con un luminómetro GloMax (Promega), según nuestros estudios anteriores^{32,230}. Esta línea celular se cultivó siguiendo las recomendaciones del proveedor bajo condiciones de selección con el antibiótico Geneticin (400 µg/ml) (Sigma).

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se trataron con DOC (10 nM) durante 4 y 6 días o TGF (10 ng/ml) (Peprotech) e ISRIB (5 μ M) (Sigma) durante 3 días (n=6 réplicas por grupo). La actividad de SBE se analizó con el kit ONE-Step Luciferase Assay System (BPS Bioscience).

7.11 Generación de resistencia en línea de TNBC

La línea celular SUM159 resistente a DOC se desarrolló siguiendo el protocolo previamente publicado con paclitaxel con modificaciones¹¹⁹. Para generar resistencia en la línea SUM159 se comenzó con el tratamiento a 10 nM de DOC durante 2 días y posteriormente se añadió medio fresco sin tratamiento durante otros 2 días, para permitir que las células que resistían al quimioterapéutico proliferasen.

Esto se llevó a cabo durante 8 ciclos de tratamiento-recuperación hasta que se observó ausencia de muerte celular después del tratamiento. Finalmente, se comenzó a incrementar progresivamente la concentración de DOC hasta 50 nM durante 4 ciclos más, has obtener la nueva línea SUM159-R50 resistente a una concentración de 50 nM.

7.12 Evaluación de la expresión génica en SUM159-R50

El ARN de 500,000 células SUM159 y SUM159-R50 se extrajo según las instrucciones del fabricante (Omega Bio-Tek). Se sintetizó ADNc utilizando el kit de Transcripción Inversa de Alta Capacidad de Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.12.1 Análisis transcriptómico del resistoma celular

Se realizó un análisis transcriptómico utilizando Arrays de Baja Densidad Taqman® (TLDA) personalizados con sondas Taqman® para detectar los 92 genes humanos seleccionados (**Tabla 6**), incluidos tres genes de referencia como normalizadores utilizando TLDA en un Sistema de Detección de Secuencias ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Madrid, España).

Tabla 6. Genes incluidos en el TLDA.

Gen	Proteína
<i>SLC22A1</i>	Solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1
<i>SLC22A2</i>	Solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2
<i>SLC22A4</i>	Solute carrier family 22 (organic cation/carnitine transporter), member 4
<i>SLC22A5</i>	Solute carrier family 22 (organic cation/carnitine transporter), member 5
<i>SLC28A1</i>	Solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 1
<i>SLC28A2</i>	Solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 2
<i>SLC28A3</i>	Solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 3
<i>SLC29A1</i>	Solute carrier family 29 (equilibrative nucleoside transporter), member 1
<i>SLC29A2</i>	Solute carrier family 29 (equilibrative nucleoside transporter), member 2
<i>SLC31A1</i>	Solute carrier family 31 (copper transporter), member 1
<i>SLC47A1</i>	Solute carrier family 47 (family of multidrug and toxin extrusion transporters), member 1

<i>SLC47A2</i>	Solute carrier family 47 (family of multidrug and toxin extrusion transporters), member 2
<i>SLCO1B1</i>	Solute carrier organic anion transporter family, member 1B1
<i>SLCO1B3</i>	Solute carrier organic anion transporter family, member 1B3
<i>SLCO2B1</i>	Solute carrier organic anion transporter family, member 2B1
<i>SLCO4A1</i>	Solute carrier organic anion transporter family, member 4A1
<i>ABCA2</i>	ATP-binding cassette sub-family A, member 2
<i>ABCA6</i>	ATP-binding cassette sub-family A, member 6
<i>ABCA8</i>	ATP-binding cassette sub-family A, member 8
<i>ABCB1</i>	ATP-binding cassette sub-family B, member 1 (P-glycoprotein)
<i>ABCB5</i>	ATP-binding cassette sub-family B, member 5
<i>ABCC1</i>	ATP-binding cassette sub-family C, member 1
<i>ABCC2</i>	ATP-binding cassette sub-family C, member 2
<i>ABCC3</i>	ATP-binding cassette sub-family C, member 3
<i>ABCC4</i>	ATP-binding cassette sub-family C, member 4
<i>ABCC5</i>	ATP-binding cassette sub-family C, member 5
<i>ABCC6</i>	ATP-binding cassette sub-family C, member 6
<i>ABCC10</i>	ATP-binding cassette sub-family C, member 10
<i>ABCG2</i>	ATP-binding cassette sub-family G, member 2
<i>ATP7A</i>	ATPase copper transporting alpha polypeptide (Menkes protein)
<i>ATP7B</i>	ATPase copper transporting beta polypeptide (Wilson protein)
<i>MVP</i>	Major vault protein
<i>CES1</i>	Carboxylesterase 1
<i>CES2</i>	Carboxylesterase 2
<i>CYP1A1</i>	Cytochrome P450 family 1, subfamily A, polypeptide 1

<i>CYP1A2</i>	Cytochrome P450 family 1, subfamily A, polypeptide 2
<i>CYP3A4</i>	Cytochrome P450 family 3, subfamily A, polypeptide 4
<i>DPYD</i>	Dihydropyrimidine dehydrogenase
<i>GSTP1</i>	Glutathione S-transferase pi 1
<i>TYMP</i>	Thymidine phosphorylase
<i>UGT1A</i>	UDP glucuronosyltransferase family 1, polypeptide A cluster
<i>UPP1</i>	Uridine phosphorylase 1
<i>UPP2</i>	Uridine phosphorylase 2
<i>DHFR</i>	Dihydrofolate reductase
<i>EGFR</i>	Epidermal growth factor receptor
<i>ESR2</i>	Estrogen receptor 2 (ER beta)
<i>KDR</i>	Kinase insert domain receptor
<i>KIT</i>	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase
<i>MTOR</i>	Mechanistic target of rapamycin
<i>PDGFRA</i>	Platelet derived growth factor receptor alpha
<i>TOP1</i>	DNA topoisomerase I
<i>TOP2A</i>	DNA topoisomerase II alpha
<i>TYMS</i>	Thymidylate synthetase
<i>UMPS</i>	Uridine monophosphate synthetase
<i>DUT</i>	Deoxyuridine triphosphatase (dUTPase)
<i>ERCC1</i>	ERCC excision repair 1, endonuclease non-catalytic subunit
<i>GADD45A</i>	Growth arrest and DNA damage inducible alpha
<i>MLH1</i>	DNA mismatch repair protein MLH1 (MutL homolog 1)
<i>MLH3</i>	DNA mismatch repair protein MLH3 (MutL homolog 3)
<i>MSH2</i>	DNA mismatch repair protein MSH2 (MutS homolog 2)
<i>MSH6</i>	DNA mismatch repair protein MSH6 (MutS homolog 6)
<i>PMS1</i>	PMS1 homolog 1, MutL family mismatch repair protein Pms1
<i>PMS2</i>	PMS1 homolog 2, MutL family mismatch repair protein Pms2

<i>TCEA2</i>	Transcription elongation factor A2
<i>UNG</i>	Uracil-DNA glycosylase
<i>XPA</i>	<i>Xeroderma pigmentosum</i> , complementation group A
<i>XPC</i>	<i>Xeroderma pigmentosum</i> , complementation group C
<i>BAX</i>	BCL2 associated X, apoptosis regulator
<i>BCL2L1</i>	BCL2-like 1
<i>CDKN1A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
<i>DIABLO</i>	Diablo IAP-binding mitochondrial protein
<i>FAS</i>	TNF receptor superfamily, member 6 (FAS)
<i>PSMD9</i>	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 9
<i>TNFRSF10A</i>	TNF receptor superfamily member 10a
<i>TNFRSF10B</i>	TNF receptor superfamily member 10b
<i>AKT1</i>	AKT serine/threonine kinase 1
<i>BCL2</i>	B cell leukemia/lymphoma 2, apoptosis regulator
<i>BIRC2</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 2
<i>BIRC3</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 3
<i>BIRC5</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 5
<i>BIRC7</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 7
<i>CFLAR</i>	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
<i>JUN</i>	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
<i>KRT13</i>	Keratin, type I cytoskeletal 13
<i>MTDH</i>	Metadherin
<i>MYC</i>	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor
<i>NAIP</i>	NLR family apoptosis inhibitory protein
<i>NFKB1</i>	Nuclear factor kappa B subunit 1
<i>PIK3CG</i>	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide
<i>PTEN</i>	Phosphatase and tensin homolog
<i>RPL6</i>	Ribosomal protein L6
<i>XIAP</i>	X-linked inhibitor of apoptosis

Además, para validar el análisis transcriptómico de aquellos genes con mayor cambio de expresión, se realizó PCR cuantitativa (qPCR) utilizando la

polimerasa AmpliTaq Gold y el kit de detección SYBR® Green I (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Madrid, España) en un Sistema de PCR en Tiempo Real QuantStudio 3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Madrid, España) para ensayos de un solo tubo.

Las secuencias de los cebadores específicos de genes, que abarcan las uniones exón-exón en el ARNm objetivo, utilizados para qPCR de un solo tubo están disponibles en la **Tabla 7**. En todos los casos se utilizaron las siguientes condiciones térmicas: un solo ciclo de 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 60 s.

Tabla 7. Secuencias de oligonucleótidos usados para el análisis de la expresión génica por qPCR.

Proteína (Gen)	Primer sentido (5'-3')	Primer antisentido (5'-3')	Tamaño (bp)	Número de acceso
BCRP (<i>ABCG2</i>)	CCCAGGCCTCTATAGC TCAGATCATT	CACGGCTGAAACACTGC TGAAACA	161	NM_004827
FAS (<i>FAS</i>)	GCCCTGTCCTCCAGG TGAAA	GGCTTTGTCTGTGTACTC CTTCCC	103	NM_000043
GAPDH (<i>GAPDH</i>)	TGAGCCCGCAGCCTC C	TACGACCAAATCCGTTG ACTCC	138	NM_002046
MDR1 (<i>ABCB1</i>)	GCGCGAGGTCGGAAT GGAT	CCATGGATGATGGCAGC CAAAGTT	198	NM_000927
Survivin (<i>BIRC5</i>)	CCAGATGACGACCCC ATAGAGGAA	GCACTTCTCCGCAGTTT CCTCA	190	NM_001168
TS (<i>TYMS</i>)	GCTGTGGTTTATCAA GGGATCCACAA	TCCACTGGAAGCCATAA ACTGGG	155	NM_001071

La abundancia de ARNm se normalizó en función del contenido de GAPDH en las líneas celulares SUM159 y se utilizó una doble normalización basada en GAPDH y ACTB cuando se realizó el análisis TLDA. La determinación de ARNr 18S se utilizó como control de calidad entre las

muestras. La detección de productos amplificados se llevó a cabo utilizando SYBR Green I. Se utilizó ARN total de un hígado sano como calibrador. Los niveles de expresión se calcularon como $2^{-\Delta Ct}$, donde ΔCt fue la diferencia de Ct en cada muestra entre el gen objetivo y el normalizador.

7.13 Evaluación de la capacidad de autorrenovación

7.13.1 Eficiencia de formación de mamosferas

La eficiencia de formación de mamosferas (MFE) de la línea parental SUM159 se comparó con la MFE de la línea SUM159-R50 y esta última se compara con la SUM159-R50 pretratada con ISRIB (5 μ M) durante 48 h.

El ensayo de eficiencia de mamosferas se realizó como se había descrito anteriormente³². Brevemente, se cultivaron quinientas células en 24 pocillos de placas de ultrabajo adherencia con un medio especial suplementado con factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) 1:1000, factor de crecimiento epidérmico (EGF) 1:1000, interleucina 6 (IL-6) 1:1000 y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) 1:2500. A las 72 h se contaron las mamosferas primarias con diámetro superior a 100 μ m y fotografiaron, y posteriormente se cosecharon, disociaron y contaron para volver a sembrar 500 células/pocillo. Después de 72 h, se contaron las mamosferas secundarias con un diámetro mayor a 100 μ m. La MFE se calculó dividiendo el número de mamosferas secundarias por el número de células sembradas.

7.13.2 Formación de colonias

Las células SUM159 y SUM159-R50 fueron pretratadas o no durante 48 h con ISRIB y sembradas en placas de 6 pocillos en agar al 0.8% sobre una capa de agarosa al 1.6% con medio (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico/antimicótico (anfotericina). Se repuso medio fresco cada 3 días durante 21 días. Finalmente, las colonias se tiñeron con violeta cristal al 0.01%, se fotografiaron y se contaron.

7.14 Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre dos grupos experimentales se analizaron utilizando la prueba t de Student, y las diferencias entre grupos se analizaron mediante ANOVA de una vía con GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). Los experimentos se realizaron al menos por triplicado, a menos que se especifique lo contrario. Los resultados se muestran como media \pm error estándar de la media (SEM). Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

REFERENCIAS

1. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
2. Allemani, C. *et al.* Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *The Lancet* **391**, 1023–1075 (2018).
3. DeSantis, C. E. *et al.* Breast cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* **69**, 438–451 (2019).
4. Weigelt, B., Geyer, F. C. & Reis-Filho, J. S. Histological types of breast cancer: How special are they? *Mol. Oncol.* **4**, 192–208 (2010).
5. Goh, C. W. *et al.* Invasive ductal carcinoma with coexisting ductal carcinoma in situ (IDC/DCIS) versus pure invasive ductal carcinoma (IDC): a comparison of clinicopathological characteristics, molecular subtypes, and clinical outcomes. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **145**, 1877–1886 (2019).
6. Burstein, H. J., Polyak, K., Wong, J. S., Lester, S. C. & Kaelin, C. M. Ductal Carcinoma in Situ of the Breast. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1430–1441 (2004).
7. Barroso-Sousa, R. & Metzger-Filho, O. Differences between invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast: results and therapeutic implications. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **8**, 261–266 (2016).

8. Prat, A. & Perou, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* **5**, 5–23 (2011).
9. Dowsett, M. *et al.* Prediction of Risk of Distant Recurrence Using the 21-Gene Recurrence Score in Node-Negative and Node-Positive Postmenopausal Patients With Breast Cancer Treated With Anastrozole or Tamoxifen: A TransATAC Study. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1829–1834 (2010).
10. Paik, S. *et al.* A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2817–2826 (2004).
11. Cheang, M. C. U. *et al.* Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **101**, 736–750 (2009).
12. Goldhirsch, A. *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.* **24**, 2206–2223 (2013).
13. Slamon, D. J. *et al.* Studies of the HER-2/ *neu* Proto-Oncogene in Human Breast and Ovarian Cancer. *Science* **244**, 707–712 (1989).
14. Onitilo, A. A., Engel, J. M., Greenlee, R. T. & Mukesh, B. N. Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival. *Clin. Med. Res.* **7**, 4–13 (2009).
15. Bianchini, G. & Gianni, L. The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer. *Lancet Oncol.* **15**, e58–e68 (2014).

16. Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* **121**, 2750–2767 (2011).
17. Liedtke, C. *et al.* Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1275–1281 (2008).
18. Dent, R. *et al.* Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin. Cancer Res.* **13**, 4429–4434 (2007).
19. O'Reilly, D., Sendi, M. A. & Kelly, C. M. Overview of recent advances in metastatic triple negative breast cancer. *World J. Clin. Oncol.* **12**, 164–182 (2021).
20. Yao, Y., Chu, Y., Xu, B., Hu, Q. & Song, Q. Risk factors for distant metastasis of patients with primary triple-negative breast cancer. *Biosci. Rep.* **39**, BSR20190288 (2019).
21. Yin, L., Duan, J.-J., Bian, X.-W. & Yu, S. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res.* **22**, 61 (2020).
22. Foulkes, W. D., Smith, I. E. & Reis-Filho, J. S. Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1938–1948 (2010).
23. Lu, B., Natarajan, E., Balaji Raghavendran, H. R. & Markandan, U. D. Molecular Classification, Treatment, and Genetic Biomarkers in Triple-Negative Breast Cancer: A Review. *Technol. Cancer Res. Treat.* **22**, 153303382211452 (2023).

24. Romero Lagunes, M. L. & Pezo, R. C. A narrative review of chemotherapy in advanced triple negative breast cancer. *Precis. Cancer Med.* **4**, 13–13 (2021).
25. Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E. & Gianni, L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13**, 674–690 (2016).
26. Varzaru, V. B. *et al.* Triple-Negative Breast Cancer: Molecular Particularities Still a Challenge. *Diagnostics* **14**, 1875 (2024).
27. Tzavlaki, K. & Moustakas, A. TGF- β Signaling. *Biomolecules* **10**, 487 (2020).
28. Kaminska, B., Wesolowska, A. & Danilkiewicz, M. TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis. *Acta Biochim. Pol.* **52**, 329–337 (2005).
29. Kim, S., Lee, J., Jeon, M., Nam, S. J. & Lee, J. E. Elevated TGF- β 1 and - β 2 expression accelerates the epithelial to mesenchymal transition in triple-negative breast cancer cells. *Cytokine* **75**, 151–158 (2015).
30. Xu, X. *et al.* TGF- β plays a vital role in triple-negative breast cancer (TNBC) drug-resistance through regulating stemness, EMT and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **502**, 160–165 (2018).
31. Bholra, N. E. *et al.* TGF- β inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. *J. Clin. Invest.* **123**, 1348–1358 (2013).
32. González-González, A. *et al.* Activating Transcription Factor 4 Modulates TGF β -Induced Aggressiveness in Triple-Negative Breast Cancer

- via SMAD2/3/4 and mTORC2 Signaling. *Clin. Cancer Res.* **24**, 5697–5709 (2018).
33. Tanaka, T. *et al.* Targeted disruption of ATF4 discloses its essential role in the formation of eye lens fibres: Targeting of ATF4. *Genes Cells* **3**, 801–810 (1998).
34. Persengiev, S. P. [No title found]. *Apoptosis* **8**, 225–228 (2003).
35. Ameri, K. & Harris, A. L. Activating transcription factor 4. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 14–21 (2008).
36. St-Arnaud, R. & Hekmatnejad, B. Combinatorial control of ATF4-dependent gene transcription in osteoblasts: ATF4-dependent transcription in osteoblasts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1237**, 11–18 (2011).
37. Kasai, S. *et al.* Role of the ISR-ATF4 pathway and its cross talk with Nrf2 in mitochondrial quality control. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **64**, 1–12 (2019).
38. Wortel, I. M. N., Van Der Meer, L. T., Kilberg, M. S. & Van Leeuwen, F. N. Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells. *Trends Endocrinol. Metab.* **28**, 794–806 (2017).
39. Massihnia, D. *et al.* Triple negative breast cancer: shedding light onto the role of pi3k/akt/mTOR pathway. *Oncotarget* **7**, 60712–60722 (2016).
40. Pascual, J. & Turner, N. C. Targeting the PI3-kinase pathway in triple-negative breast cancer. *Ann. Oncol.* **30**, 1051–1060 (2019).

41. Amato, O. *et al.* *PIK3CA* copy-number gain and inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer. *Mol. Case Stud.* **9**, a006255 (2023).
42. Cerma, K. *et al.* Targeting PI3K/AKT/mTOR Pathway in Breast Cancer: From Biology to Clinical Challenges. *Biomedicines* **11**, 109 (2023).
43. Gooding, A. J. & Schiemann, W. P. Epithelial–Mesenchymal Transition Programs and Cancer Stem Cell Phenotypes: Mediators of Breast Cancer Therapy Resistance. *Mol. Cancer Res.* **18**, 1257–1270 (2020).
44. Luo, M., Brooks, M. & Wicha, M. Epithelial-Mesenchymal Plasticity of Breast Cancer Stem Cells: Implications for Metastasis and Therapeutic Resistance. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 1301–1310 (2015).
45. Park, S.-Y. *et al.* Combinatorial TGF- β attenuation with paclitaxel inhibits the epithelial-to-mesenchymal transition and breast cancer stem-like cells. *Oncotarget* **6**, 37526–37543 (2015).
46. Liu, C.-Y., Lin, H.-H., Tang, M.-J. & Wang, Y.-K. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget* **6**, 15966–15983 (2015).
47. Sulaiman, A., McGarry, S., Chilumula, S. C., Kandunuri, R. & Vinod, V. Clinically Translatable Approaches of Inhibiting TGF- β to Target Cancer Stem Cells in TNBC. *Biomedicines* **9**, 1386 (2021).
48. Iovanna, J., Mallmann, M. C., Gonçalves, A., Turrini, O. & Dagorn, J.-C. Current Knowledge on Pancreatic Cancer. *Front. Oncol.* **2**, (2012).

49. Adamska, A. *et al.* Molecular and cellular mechanisms of chemoresistance in pancreatic cancer. *Adv. Biol. Regul.* **68**, 77–87 (2018).
50. Saeg, F. & Anbalagan, M. Breast cancer stem cells and the challenges of eradication: a review of novel therapies. *Stem Cell Investig.* **5**, 39–39 (2018).
51. Nedeljković, M. & Damjanović, A. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer—How We Can Rise to the Challenge. *Cells* **8**, 957 (2019).
52. O'Reilly, E. A. *et al.* The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). *BBA Clin.* **3**, 257–275 (2015).
53. Yip, N. C. *et al.* Disulfiram modulated ROS–MAPK and NFκB pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties. *Br. J. Cancer* **104**, 1564–1574 (2011).
54. Bedard, P. L., Di Leo, A. & Piccart-Gebhart, M. J. Taxanes: optimizing adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**, 22–36 (2010).
55. Fedier, A. *et al.* Resistance to topoisomerase poisons due to loss of DNA mismatch repair. *Int. J. Cancer* **93**, 571–576 (2001).
56. Jalalirad, M. *et al.* Aurora-A kinase oncogenic signaling mediates TGF-β-induced triple-negative breast cancer plasticity and chemoresistance. *Oncogene* **40**, 2509–2523 (2021).

57. Tang, L. *et al.* DCST1-AS1 Promotes TGF- β -Induced Epithelial–Mesenchymal Transition and Enhances Chemoresistance in Triple-Negative Breast Cancer Cells via ANXA1. *Front. Oncol.* **10**, 280 (2020).
58. Winter, M. *et al.* Vimentin Promotes the Aggressiveness of Triple Negative Breast Cancer Cells Surviving Chemotherapeutic Treatment. *Cells* **10**, 1504 (2021).
59. Hu, H. *et al.* PIK3CA mutation confers resistance to chemotherapy in triple-negative breast cancer by inhibiting apoptosis and activating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Ann. Transl. Med.* **9**, 410–410 (2021).
60. Hakeem, A. N. *et al.* Piperine enhances doxorubicin sensitivity in triple-negative breast cancer by targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway and cancer stem cells. *Sci. Rep.* **14**, 18181 (2024).
61. Zhang, W. *et al.* GBP2 enhances paclitaxel sensitivity in triple-negative breast cancer by promoting autophagy in combination with ATG2 and inhibiting the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Int. J. Oncol.* **64**, 34 (2024).
62. Kaboli, P. J., Imani, S., Jomhori, M. & Ling, K.-H. Chemoresistance in breast cancer: PI3K/Akt pathway inhibitors vs the current chemotherapy. *Am. J. Cancer Res.* **11**, 5155–5183 (2021).
63. Su, S. & Kang, P. M. Systemic Review of Biodegradable Nanomaterials in Nanomedicine. *Nanomaterials* **10**, 656 (2020).
64. Zhang, C. *et al.* Progress, challenges, and future of nanomedicine. *Nano Today* **35**, 101008 (2020).

65. Domingues, C. *et al.* Where Is Nano Today and Where Is It Headed? A Review of Nanomedicine and the Dilemma of Nanotoxicology. *ACS Nano* **16**, 9994–10041 (2022).
66. Abdel-Mageed, H. M., AbuelEzz, N. Z., Radwan, R. A. & Mohamed, S. A. Nanoparticles in nanomedicine: a comprehensive updated review on current status, challenges and emerging opportunities. *J. Microencapsul.* **38**, 414–436 (2021).
67. Department of Photomedicine and Physical Chemistry, Medical College of The University of Rzeszów, University of Rzeszów, Poland, Dynarowicz, K., Aebisher, D., & Department of Photomedicine and Physical Chemistry, Medical College of The University of Rzeszów, University of Rzeszów, Poland. Nanomedicine – a review. *Eur. J. Clin. Exp. Med.* **20**, 102–108 (2022).
68. Alvi, M., Yaqoob, A., Rehman, K., Shoaib, S. M. & Akash, M. S. H. PLGA-based nanoparticles for the treatment of cancer: current strategies and perspectives. *AAPS Open* **8**, 12 (2022).
69. Sharma, S., Parmar, A., Kori, S. & Sandhir, R. PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. *TrAC Trends Anal. Chem.* **80**, 30–40 (2016).
70. Rezvantalab, S. *et al.* PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment. *Front. Pharmacol.* **9**, 1260 (2018).
71. Danhier, F. *et al.* PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J. Controlled Release* **161**, 505–522 (2012).

72. Sahin, A. *et al.* A small variation in average particle size of PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation leads to considerable change in nanoparticles' characteristics and efficacy of intracellular delivery. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* **45**, 1657–1664 (2017).
73. Fang, J., Nakamura, H. & Maeda, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 136–151 (2011).
74. Wang, H. *et al.* Cell membrane biomimetic nanoparticles for inflammation and cancer targeting in drug delivery. *Biomater. Sci.* **8**, 552–568 (2020).
75. Gong, P. *et al.* Immunocyte Membrane-Coated Nanoparticles for Cancer Immunotherapy. *Cancers* **13**, 77 (2020).
76. Díez-Pascual, A. M. Surface Engineering of Nanomaterials with Polymers, Biomolecules, and Small Ligands for Nanomedicine. *Materials* **15**, 3251 (2022).
77. Subbiah, R., Veerapandian, M. & S. Yun, K. Nanoparticles: Functionalization and Multifunctional Applications in Biomedical Sciences. *Curr. Med. Chem.* **17**, 4559–4577 (2010).
78. Mout, R., Moyano, D. F., Rana, S. & Rotello, V. M. Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2539 (2012).

79. Beh, C. Y., Prajnamitra, R. P., Chen, L.-L. & Hsieh, P. C.-H. Advances in Biomimetic Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy and Diagnosis. *Molecules* **26**, 5052 (2021).
80. Oroojalian, F., Beygi, M., Baradaran, B., Mokhtarzadeh, A. & Shahbazi, M. Immune Cell Membrane-Coated Biomimetic Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy. *Small* **17**, 2006484 (2021).
81. Narain, A., Asawa, S., Chhabria, V. & Patil-Sen, Y. Cell Membrane Coated Nanoparticles: next-generation Therapeutics. *Nanomed.* **12**, 2677–2692 (2017).
82. Fang, R. H., Kroll, A. V., Gao, W. & Zhang, L. Cell Membrane Coating Nanotechnology. *Adv. Mater.* **30**, 1706759 (2018).
83. Kroll, A. V., Fang, R. H. & Zhang, L. Biointerfacing and Applications of Cell Membrane-Coated Nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* **28**, 23–32 (2017).
84. Hu, C.-M. J. *et al.* Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 10980–10985 (2011).
85. Magnani, M. *et al.* Erythrocyte engineering for drug delivery and targeting. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **28**, 1–6 (1998).
86. Gao, C. *et al.* Stem Cell Membrane-Coated Nanogels for Highly Efficient In Vivo Tumor Targeted Drug Delivery. *Small* **12**, 4056–4062 (2016).

87. Fang, R. H. *et al.* Cancer Cell Membrane-Coated Nanoparticles for Anticancer Vaccination and Drug Delivery. *Nano Lett.* **14**, 2181–2188 (2014).
88. Chen, Z. *et al.* Cancer Cell Membrane–Biomimetic Nanoparticles for Homologous-Targeting Dual-Modal Imaging and Photothermal Therapy. *ACS Nano* **10**, 10049–10057 (2016).
89. Parodi, A. *et al.* Synthetic nanoparticles functionalized with biomimetic leukocyte membranes possess cell-like functions. *Nat. Nanotechnol.* **8**, 61–68 (2013).
90. Cao, X. *et al.* Paclitaxel-Loaded Macrophage Membrane Camouflaged Albumin Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy. *Int. J. Nanomedicine* **Volume 15**, 1915–1928 (2020).
91. Gong, C. *et al.* Macrophage-cancer hybrid membrane-coated nanoparticles for targeting lung metastasis in breast cancer therapy. *J. Nanobiotechnology* **18**, 92 (2020).
92. Zhang, L. *et al.* Human cytotoxic T-lymphocyte membrane-camouflaged nanoparticles combined with low-dose irradiation: a new approach to enhance drug targeting in gastric cancer. *Int. J. Nanomedicine* **Volume 12**, 2129–2142 (2017).
93. Ma, W. *et al.* Coating biomimetic nanoparticles with chimeric antigen receptor T cell-membrane provides high specificity for hepatocellular carcinoma photothermal therapy treatment. *Theranostics* **10**, 1281–1295 (2020).

94. Tian, W., Lu, J. & Jiao, D. Stem cell membrane vesicle-coated nanoparticles for efficient tumor-targeted therapy of orthotopic breast cancer. *Polym. Adv. Technol.* **30**, 1051–1060 (2019).
95. Xuan, M., Shao, J., Dai, L., He, Q. & Li, J. Macrophage Cell Membrane Camouflaged Mesoporous Silica Nanocapsules for In Vivo Cancer Therapy. *Adv. Healthc. Mater.* **4**, 1645–1652 (2015).
96. Han, Y. *et al.* T Cell Membrane Mimicking Nanoparticles with Bioorthogonal Targeting and Immune Recognition for Enhanced Photothermal Therapy. *Adv. Sci.* **6**, 1900251 (2019).
97. Kang, M. *et al.* T-Cell-Mimicking Nanoparticles for Cancer Immunotherapy. *Adv. Mater.* **32**, 2003368 (2020).
98. Steven, A. & Seliger, B. The Role of Immune Escape and Immune Cell Infiltration in Breast Cancer. *Breast Care* **13**, 16–21 (2018).
99. Andrews, L. P., Marciscano, A. E., Drake, C. G. & Vignali, D. A. A. LAG 3 (CD 223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol. Rev.* **276**, 80–96 (2017).
100. Kwa, M. J. & Adams, S. Checkpoint inhibitors in triple-negative breast cancer (TNBC): Where to go from here. *Cancer* **124**, 2086–2103 (2018).
101. Joller, N. & Kuchroo, V. K. Tim-3, Lag-3, and TIGIT. in *Emerging Concepts Targeting Immune Checkpoints in Cancer and Autoimmunity* (ed. Yoshimura, A.) vol. 410 127–156 (Springer International Publishing, Cham, 2017).

102. Wang, M. *et al.* Targeting breast cancer with a combination of DNT and LAG3 checkpoint blockage and its mechanism. *Immun. Inflamm. Dis.* **10**, (2022).
103. Basu, A. *et al.* Immunotherapy in breast cancer: Current status and future directions. in *Advances in Cancer Research* vol. 143 295–349 (Elsevier, 2019).
104. Wang, J., Xu, Y., Huang, Z. & Lu, X. T cell exhaustion in cancer: Mechanisms and clinical implications. *J. Cell. Biochem.* **119**, 4279–4286 (2018).
105. He, X. & Xu, C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Res.* **30**, 660–669 (2020).
106. Simon, S. & Labarriere, N. PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy? *OncoImmunology* **7**, e1364828 (2018).
107. Schütz, F. *et al.* PD-1/PD-L1 Pathway in Breast Cancer. *Oncol. Res. Treat.* **40**, 294–297 (2017).
108. Oner, G. *et al.* Triple-negative breast cancer—Role of immunology: A systemic review. *Breast J.* **26**, 995–999 (2020).
109. Zheng, H., Siddharth, S., Parida, S., Wu, X. & Sharma, D. Tumor Microenvironment: Key Players in Triple Negative Breast Cancer Immunomodulation. *Cancers* **13**, 3357 (2021).
110. Palomeras, S., Ruiz-Martínez, S. & Puig, T. Targeting Breast Cancer Stem Cells to Overcome Treatment Resistance. *Molecules* **23**, 2193 (2018).

111. Dandawate, P. R., Subramaniam, D., Jensen, R. A. & Anant, S. Targeting cancer stem cells and signaling pathways by phytochemicals: Novel approach for breast cancer therapy. *Semin. Cancer Biol.* **40–41**, 192–208 (2016).
112. López-Tejada, A. *et al.* TGF β Governs the Pleiotropic Activity of NDRG1 in Triple-Negative Breast Cancer Progression. *Int. J. Biol. Sci.* **19**, 204–224 (2023).
113. Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S. & Mulligan, R. C. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* **183**, 1797–1806 (1996).
114. Nakanishi, T. *et al.* Side-population cells in luminal-type breast cancer have tumour-initiating cell properties, and are regulated by HER2 expression and signalling. *Br. J. Cancer* **102**, 815–826 (2010).
115. Hirschmann-Jax, C. *et al.* A distinct “side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 14228–14233 (2004).
116. Li, H. *et al.* Stem Cell Marker Aldehyde Dehydrogenase 1 (ALDH1)-Expressing Cells are Enriched in Triple-Negative Breast Cancer. *Int. J. Biol. Markers* **28**, 357–364 (2013).
117. Ginestier, C. *et al.* ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell* **1**, 555–567 (2007).

118. Tanei, T. *et al.* Antitumor activity of Cetuximab in combination with Ixabepilone on triple negative breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res.* **18**, 6 (2016).
119. Tian, J. *et al.* Dasatinib sensitises triple negative breast cancer cells to chemotherapy by targeting breast cancer stem cells. *Br. J. Cancer* **119**, 1495–1507 (2018).
120. Badran, M. M. *et al.* Novel docetaxel chitosan-coated PLGA/PCL nanoparticles with magnified cytotoxicity and bioavailability. *Biomed. Pharmacother.* **106**, 1461–1468 (2018).
121. Pradhan, R. *et al.* Recent Advances in Targeted Nanocarriers for the Management of Triple Negative Breast Cancer. *Pharmaceutics* **15**, 246 (2023).
122. Di Gregorio, E. *et al.* RGD_PLGA Nanoparticles with Docetaxel: A Route for Improving Drug Efficiency and Reducing Toxicity in Breast Cancer Treatment. *Cancers* **15**, 8 (2022).
123. Chang, L.-C., Chen, T.-P., Kuo, W.-K. & Hua, C.-C. The Protein Expression of PDL1 Is Highly Correlated with Those of eIF2 α and ATF4 in Lung Cancer. *Dis. Markers* **2018**, 1–9 (2018).
124. Gilad, Y. *et al.* Drug-induced PD-L1 expression and cell stress response in breast cancer cells can be balanced by drug combination. *Sci. Rep.* **9**, 15099 (2019).
125. Suresh, S. *et al.* eIF5B drives integrated stress response-dependent translation of PD-L1 in lung cancer. *Nat. Cancer* **1**, 533–545 (2020).

126. Guillen, K. P. *et al.* A human breast cancer-derived xenograft and organoid platform for drug discovery and precision oncology. *Nat. Cancer* **3**, 232–250 (2022).
127. Meng, F., Su, Y. & Xu, B. Rho-associated protein kinase-dependent moesin phosphorylation is required for PD-L1 stabilization in breast cancer. *Mol. Oncol.* **14**, 2701–2712 (2020).
128. Park, Choi, & Nam. Targeting Cancer Stem Cells in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers* **11**, 965 (2019).
129. Granados-Principal, S. *et al.* Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* **17**, 25 (2015).
130. Vijay, G. V. *et al.* GSK3 β regulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* **21**, 37 (2019).
131. Anand, A. A. & Walter, P. Structural insights into ISRIB, a memory-enhancing inhibitor of the integrated stress response. *FEBS J.* **287**, 239–245 (2020).
132. Zyryanova, A. F. *et al.* Binding of ISRIB reveals a regulatory site in the nucleotide exchange factor eIF2B. *Science* **359**, 1533–1536 (2018).
133. Rabouw, H. H. *et al.* Small molecule ISRIB suppresses the integrated stress response within a defined window of activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 2097–2102 (2019).

134. Wong, Y. L. *et al.* eIF2B activator prevents neurological defects caused by a chronic integrated stress response. *eLife* **8**, e42940 (2019).
135. Wang, X. Eukaryotic initiation factor 2B: identification of multiple phosphorylation sites in the epsilon-subunit and their functions in vivo. *EMBO J.* **20**, 4349–4359 (2001).
136. Gomez, E. & Pavitt, G. D. Identification of Domains and Residues within the ϵ Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B (eIF2B ϵ) Required for Guanine Nucleotide Exchange Reveals a Novel Activation Function Promoted by eIF2B Complex Formation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3965–3976 (2000).
137. Tsai, J. C. *et al.* Structure of the nucleotide exchange factor eIF2B reveals mechanism of memory-enhancing molecule. *Science* **359**, eaaq0939 (2018).
138. Ojo, E., Otegbeye, F., Moreton, S. & Wald, D. Abstract 4618: TGF-B upregulates GSK3B and mediates NK dysfunction in cancer. *Cancer Res.* **77**, 4618–4618 (2017).
139. Singh, S. P. *et al.* Glycogen synthase kinase-3 inhibition attenuates fibroblast activation and development of fibrosis following renal ischemia/reperfusion in mice. *Dis. Model. Mech.* dmm.020511 (2015) doi:10.1242/dmm.020511.
140. Wu, Y. *et al.* Dub3 inhibition suppresses breast cancer invasion and metastasis by promoting Snail1 degradation. *Nat. Commun.* **8**, 14228 (2017).

141. Zhao, Y. *et al.* YAP-Induced Resistance of Cancer Cells to Antitubulin Drugs Is Modulated by a Hippo-Independent Pathway. *Cancer Res.* **74**, 4493–4503 (2014).
142. Vilalta, P. M., Zhang, L. & Hamm-Alvarez, S. F. A novel taxol-induced vimentin phosphorylation and stabilization revealed by studies on stable microtubules and vimentin intermediate filaments. *J. Cell Sci.* **111**, 1841–1852 (1998).
143. Kaschula, C. H. *et al.* The garlic compound ajoene covalently binds vimentin, disrupts the vimentin network and exerts anti-metastatic activity in cancer cells. *BMC Cancer* **19**, 248 (2019).
144. Satelli, A. & Li, S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3033–3046 (2011).
145. Kidd, M. E., Shumaker, D. K. & Ridge, K. M. The Role of Vimentin Intermediate Filaments in the Progression of Lung Cancer. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **50**, 1–6 (2014).
146. Palma, C. D. S. *et al.* Proteomic Analysis of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) Reveals Cross-talk between SNAIL and HDAC1 Proteins in Breast Cancer Cells. *Mol. Cell. Proteomics* **15**, 906–917 (2016).
147. Denisov, E. V. *et al.* Intratumoral morphological heterogeneity of breast cancer: neoadjuvant chemotherapy efficiency and multidrug resistance gene expression. *Sci. Rep.* **4**, 4709 (2014).

148. Wu, C.-P. *et al.* Avapritinib: A Selective Inhibitor of KIT and PDGFR α that Reverses ABCB1 and ABCG2-Mediated Multidrug Resistance in Cancer Cell Lines. *Mol. Pharm.* **16**, 3040–3052 (2019).
149. Hansen, S. N. *et al.* The stepwise evolution of the exome during acquisition of docetaxel resistance in breast cancer cells. *BMC Genomics* **17**, 442 (2016).
150. Lu, J. *et al.* Mitotic Deregulation by Survivin in ErbB2-Overexpressing Breast Cancer Cells Contributes to Taxol Resistance. *Clin. Cancer Res.* **15**, 1326–1334 (2009).
151. Zhang, S. *et al.* Identification of TYMS as a promoting factor of retroperitoneal liposarcoma progression: Bioinformatics analysis and biological evidence. *Oncol. Rep.* **44**, 565–576 (2020).
152. Colavito, D. *et al.* Thymidylate synthetase allelic imbalance in clear cell renal carcinoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **64**, 1195–1200 (2009).
153. Bębenek, M., Duś, D. & Koźlak, J. Reviews Prognostic value of the Fas/Fas-ligand system in breast cancer. *Współczesna Onkol.* **2**, 120–122 (2013).
154. Mele, L., Liccardo, D. & Tirino, V. Evaluation and Isolation of Cancer Stem Cells Using ALDH Activity Assay. in *Cancer Stem Cells* (eds. Papaccio, G. & Desiderio, V.) vol. 1692 43–48 (Springer New York, New York, NY, 2018).

155. Liu, P. *et al.* Disulfiram targets cancer stem-like cells and reverses resistance and cross-resistance in acquired paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer cells. *Br. J. Cancer* **109**, 1876–1885 (2013).
156. Wang, M., Wang, Y. & Zhong, J. Side population cells and drug resistance in breast cancer. *Mol. Med. Rep.* **11**, 4297–4302 (2015).
157. Niu, D.-G. *et al.* Morphine promotes cancer stem cell properties, contributing to chemoresistance in breast cancer. *Oncotarget* **6**, 3963–3976 (2015).
158. Gong, C. *et al.* Markers of Tumor-Initiating Cells Predict Chemoresistance in Breast Cancer. *PLoS ONE* **5**, e15630 (2010).
159. Jewer, M. *et al.* Translational control of breast cancer plasticity. *Nat. Commun.* **11**, 2498 (2020).
160. Huang, W. *et al.* Regulatory networks in mechanotransduction reveal key genes in promoting cancer cell stemness and proliferation. *Oncogene* **38**, 6818–6834 (2019).
161. Meurette, O. *et al.* Notch Activation Induces Akt Signaling via an Autocrine Loop to Prevent Apoptosis in Breast Epithelial Cells. *Cancer Res.* **69**, 5015–5022 (2009).
162. Almozyan, S. *et al.* PD-L1 promotes OCT4 and Nanog expression in breast cancer stem cells by sustaining PI3K/AKT pathway activation. *Int. J. Cancer* **141**, 1402–1412 (2017).

163. Zhao, Q.-W. *et al.* Akt-mediated phosphorylation of Oct4 is associated with the proliferation of stem-like cancer cells. *Oncol. Rep.* **33**, 1621–1629 (2015).
164. Chang, W.-W. *et al.* The expression and significance of insulin-like growth factor-1 receptor and its pathway on breast cancer stem/progenitors. *Breast Cancer Res.* **15**, R39 (2013).
165. Takebe, N., Warren, R. Q. & Ivy, S. P. Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. *Breast Cancer Res.* **13**, 211 (2011).
166. Gong, W. *et al.* Nodal signaling activates the Smad2/3 pathway to regulate stem cell-like properties in breast cancer cells. *Am. J. Cancer Res.* **7**, 503–517 (2017).
167. Yaman, S. *et al.* Melanoma Peptide MHC Specific TCR Expressing T-Cell Membrane Camouflaged PLGA Nanoparticles for Treatment of Melanoma Skin Cancer. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 943 (2020).
168. Cheng, S. *et al.* Artificial Mini Dendritic Cells Boost T Cell–Based Immunotherapy for Ovarian Cancer. *Adv. Sci.* **7**, 1903301 (2020).
169. Krishnan, N. *et al.* A modular approach to enhancing cell membrane-coated nanoparticle functionality using genetic engineering. *Nat. Nanotechnol.* (2023) doi:10.1038/s41565-023-01533-w.
170. Chiu, H. I., Samad, N. A., Fang, L. & Lim, V. Cytotoxicity of targeted PLGA nanoparticles: a systematic review. *RSC Adv.* **11**, 9433–9449 (2021).

171. Li, X., Montague, E. C., Pollinzi, A., Lofts, A. & Hoare, T. Design of Smart Size-, Surface-, and Shape-Switching Nanoparticles to Improve Therapeutic Efficacy. *Small* **18**, 2104632 (2022).
172. Noaks, E., Peticone, C., Kotsopoulou, E. & Bracewell, D. G. Enriching leukapheresis improves T cell activation and transduction efficiency during CAR T processing. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **20**, 675–687 (2021).
173. Deng, G. *et al.* Cell-Membrane Immunotherapy Based on Natural Killer Cell Membrane Coated Nanoparticles for the Effective Inhibition of Primary and Abscopal Tumor Growth. *ACS Nano* **12**, 12096–12108 (2018).
174. Bahmani, B. *et al.* Intratumoral immunotherapy using platelet-cloaked nanoparticles enhances antitumor immunity in solid tumors. *Nat. Commun.* **12**, 1999 (2021).
175. Gao, H. & He, Q. The interaction of nanoparticles with plasma proteins and the consequent influence on nanoparticles behavior. *Expert Opin. Drug Deliv.* **11**, 409–420 (2014).
176. Sun, H. *et al.* Cancer-Cell-Biomimetic Nanoparticles for Targeted Therapy of Homotypic Tumors. *Adv. Mater.* **28**, 9581–9588 (2016).
177. Singer, M. *et al.* A Distinct Gene Module for Dysfunction Uncoupled from Activation in Tumor-Infiltrating T Cells. *Cell* **166**, 1500-1511.e9 (2016).
178. Wu, J. E. *et al.* In vitro modeling of CD8⁺ T cell exhaustion enables CRISPR screening to reveal a role for BHLHE40. *Sci. Immunol.* **8**, eade3369 (2023).

179. Wagner, M., Jasek, M. & Karabon, L. Immune Checkpoint Molecules—Inherited Variations as Markers for Cancer Risk. *Front. Immunol.* **11**, 606721 (2021).
180. Navya, P. N. *et al.* Current trends and challenges in cancer management and therapy using designer nanomaterials. *Nano Conver.* **6**, 23 (2019).
181. Du, H. *et al.* The co-expression characteristics of LAG3 and PD-1 on the T cells of patients with breast cancer reveal a new therapeutic strategy. *Int. Immunopharmacol.* **78**, 106113 (2020).
182. Ju, M.-H., Byun, K.-D., Park, E.-H., Lee, J.-H. & Han, S.-H. Association of Galectin 9 Expression with Immune Cell Infiltration, Programmed Cell Death Ligand-1 Expression, and Patient's Clinical Outcome in Triple-Negative Breast Cancer. *Biomedicines* **9**, 1383 (2021).
183. Wang, Z. *et al.* Tumor-derived HMGB1 induces CD62Ldim neutrophil polarization and promotes lung metastasis in triple-negative breast cancer. *Oncogenesis* **9**, 82 (2020).
184. Wojtukiewicz, M. Z., Pogorzelska, M. & Politynska, B. Immunotherapy for triple negative breast cancer: the end of the beginning or the beginning of the end? *Cancer Metastasis Rev.* **41**, 465–469 (2022).
185. Lee, G. A. *et al.* Detection of PD-L1 Expression in Temozolomide-Resistant Glioblastoma by Using PD-L1 Antibodies Conjugated with Lipid-Coated Superparamagnetic Iron Oxide. *Int. J. Nanomedicine* **Volume 16**, 5233–5246 (2021).

186. Hasanpoor, Z., Mostafaie, A., Nikokar, I. & Hassan, Z. M. Curcumin-human serum albumin nanoparticles decorated with PDL1 binding peptide for targeting PDL1-expressing breast cancer cells. *Int. J. Biol. Macromol.* **159**, 137–153 (2020).
187. Sau, S., Petrovici, A., Alsaab, H., Bhise, K. & Iyer, A. PDL-1 Antibody Drug Conjugate for Selective Chemo-Guided Immune Modulation of Cancer. *Cancers* **11**, 232 (2019).
188. Zhang, X. *et al.* PD-1 Blockade Cellular Vesicles for Cancer Immunotherapy. *Adv. Mater.* **30**, 1707112 (2018).
189. Cheng, Y. *et al.* An Intelligent Biomimetic Nanoplatform for Holistic Treatment of Metastatic Triple-Negative Breast Cancer *via* Photothermal Ablation and Immune Remodeling. *ACS Nano* **14**, 15161–15181 (2020).
190. Gu, Z. *et al.* Nanotechnology-mediated immunochemotherapy combined with docetaxel and PD-L1 antibody increase therapeutic effects and decrease systemic toxicity. *J. Controlled Release* **286**, 369–380 (2018).
191. Merino, M. *et al.* A new immune-nanoplatform for promoting adaptive antitumor immune response. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **17**, 13–25 (2019).
192. Uchimiak, K., Badowska-Kozakiewicz, A. M., Sobiborowicz-Sadowska, A. & Deptała, A. Current State of Knowledge on the Immune Checkpoint Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer Treatment: Approaches, Efficacy, and Challenges. *Clin. Med. Insights Oncol.* **16**, 117955492210998 (2022).

193. Zeng, Y. *et al.* Cell membrane coated-nanoparticles for cancer immunotherapy. *Acta Pharm. Sin. B* **12**, 3233–3254 (2022).
194. Saleh, Toor, Khalaf, & Elkord. Breast Cancer Cells and PD-1/PD-L1 Blockade Upregulate the Expression of PD-1, CTLA-4, TIM-3 and LAG-3 Immune Checkpoints in CD4+ T Cells. *Vaccines* **7**, 149 (2019).
195. Rivoltini, L. *et al.* Immunological characterization of a long-lasting response in a patient with metastatic triple-negative breast cancer treated with PD-1 and LAG-3 blockade. *Sci. Rep.* **14**, 3379 (2024).
196. Asano, Y. *et al.* Clinical Significance of Expression of Immunoadjuvant Molecules (LAG-3, TIM-3, OX-40) in Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. *Anticancer Res.* **42**, 125–136 (2022).
197. Cabioglu, N. *et al.* TIM3 expression on TILs is associated with poor response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* **21**, 357 (2021).
198. Corti, C., Nicolò, E. & Curigliano, G. Novel immune targets for the treatment of triple-negative breast cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* **25**, 815–834 (2021).
199. Li, Y. *et al.* Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **15**, 121 (2022).
200. Li, Y. *et al.* Cancer cell membrane coated PLGA nanoparticles as biomimetic drug delivery system for improved cancer therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **222**, 113131 (2023).

201. Yang, S.-B., Banik, N., Han, B., Lee, D.-N. & Park, J. Peptide-Based Bioconjugates and Therapeutics for Targeted Anticancer Therapy. *Pharmaceutics* **14**, 1378 (2022).
202. Bagherifar, R. *et al.* Nanoparticle-mediated synergistic chemoimmunotherapy for tailoring cancer therapy: recent advances and perspectives. *J. Nanobiotechnology* **19**, 110 (2021).
203. Yong, T. *et al.* Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy. *Nat. Commun.* **10**, 3838 (2019).
204. Wu, H. *et al.* Combined Biomimetic MOF-RVG15 Nanoformulation Efficient Over BBB for Effective Anti-Glioblastoma in Mice Model. *Int. J. Nanomedicine* **17**, 6377–6398 (2022).
205. Cai, J. *et al.* PLGA nanoparticle-based docetaxel/LY294002 drug delivery system enhances antitumor activities against gastric cancer. *J. Biomater. Appl.* **33**, 1394–1406 (2019).
206. Lu, K., Li, Z., Hu, Q., Sun, J. & Chen, M. CRPC Membrane-Camouflaged, Biomimetic Nanosystem for Overcoming Castration-Resistant Prostate Cancer by Cellular Vehicle-Aided Tumor Targeting. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 3623 (2022).
207. Zhao, J. *et al.* Synergistic treatment of osteosarcoma with biomimetic nanoparticles transporting doxorubicin and siRNA. *Front. Oncol.* **13**, 1111855 (2023).

208. Zhang, Y. *et al.* Tumor cell membrane-derived nano-Trojan horses encapsulating phototherapy and chemotherapy are accepted by homologous tumor cells. *Mater. Sci. Eng. C* **120**, 111670 (2021).
209. Schmid, P. *et al.* Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **379**, 2108–2121 (2018).
210. Gandhi, L. *et al.* Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **378**, 2078–2092 (2018).
211. Qi, F. *et al.* Reversal of the immunosuppressive tumor microenvironment by nanoparticle-based activation of immune-associated cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **41**, 895–901 (2020).
212. Jin, Y. *et al.* Nano-enhanced immunotherapy: Targeting the immunosuppressive tumor microenvironment. *Biomaterials* **305**, 122463 (2024).
213. Wu, M. *et al.* Improvement of the anticancer efficacy of PD-1/PD-L1 blockade via combination therapy and PD-L1 regulation. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **15**, 24 (2022).
214. Xu, M., Zhang, T., Xia, R., Wei, Y. & Wei, X. Targeting the tumor stroma for cancer therapy. *Mol. Cancer* **21**, 208 (2022).
215. Zhao, Z., Li, T., Yuan, Y. & Zhu, Y. What is new in cancer-associated fibroblast biomarkers? *Cell Commun. Signal.* **21**, 96 (2023).
216. Zhou, J. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts Correlate with Tumor-Associated Macrophages Infiltration and Lymphatic Metastasis in Triple Negative Breast Cancer Patients. *J. Cancer* **9**, 4635–4641 (2018).

217. Murakami, M. *et al.* Docetaxel Conjugate Nanoparticles That Target α -Smooth Muscle Actin-Expressing Stromal Cells Suppress Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res.* **73**, 4862–4871 (2013).
218. Mittendorf, E. A. *et al.* Neoadjuvant atezolizumab in combination with sequential nab-paclitaxel and anthracycline-based chemotherapy versus placebo and chemotherapy in patients with early-stage triple-negative breast cancer (IMpassion031): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet* **396**, 1090–1100 (2020).
219. Wang, X. & Liu, Y. PD-L1 expression in tumor infiltrated lymphocytes predicts survival in triple-negative breast cancer. *Pathol. - Res. Pract.* **216**, 152802 (2020).
220. Badve, S. S. *et al.* Determining PD-L1 Status in Patients With Triple-Negative Breast Cancer: Lessons Learned From IMpassion130. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **114**, 664–675 (2022).
221. Cubillos-Ruiz, J. R., Bettigole, S. E. & Glimcher, L. H. Tumorigenic and Immunosuppressive Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer. *Cell* **168**, 692–706 (2017).
222. Lee, H. K. *et al.* Targeting transforming growth factor- β 2 by antisense oligodeoxynucleotide accelerates T cell-mediated tumor rejection in a humanized mouse model of triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **71**, 2213–2226 (2022).

223. Yi, M. *et al.* Anti-TGF- β /PD-L1 bispecific antibody promotes T cell infiltration and exhibits enhanced antitumor activity in triple-negative breast cancer. *J. Immunother. Cancer* **10**, e005543 (2022).
224. O’Leary, E. M. *et al.* TGF- β Promotes Metabolic Reprogramming in Lung Fibroblasts via mTORC1-dependent ATF4 Activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **63**, 601–612 (2020).
225. Van Voorhis, W., Hair, L., Steinman, R. & Kaplan, G. Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. *J. Exp. Med.* **155**, 1172–1187 (1982).
226. Cho, C.-W., Keum, C.-G., Noh, Y.-W. & Shin, S.-C. Practical preparation procedures for docetaxel-loaded nanoparticles using polylactic acid-co-glycolic acid. *Int. J. Nanomedicine* **2225** (2011) doi:10.2147/IJN.S24547.
227. Kaneti, L. *et al.* Nanoghosts as a Novel Natural Nonviral Gene Delivery Platform Safely Targeting Multiple Cancers. *Nano Lett.* **16**, 1574–1582 (2016).
228. Chai, Z. *et al.* Ligand-Modified Cell Membrane Enables the Targeted Delivery of Drug Nanocrystals to Glioma. *ACS Nano* **13**, 5591–5601 (2019).
229. Toledano Furman, N. E. *et al.* Reconstructed Stem Cell Nanoghosts: A Natural Tumor Targeting Platform. *Nano Lett.* **13**, 3248–3255 (2013).
230. Cruz-Lozano, M. *et al.* Hydroxytyrosol inhibits cancer stem cells and the metastatic capacity of triple-negative breast cancer cell lines by the

- simultaneous targeting of epithelial-to-mesenchymal transition, Wnt/ β -catenin and TGF β signaling pathways. *Eur. J. Nutr.* **58**, 3207–3219 (2019).
231. Calahorra, J. *et al.* Unlocking the effective alliance of β -lapachone and hydroxytyrosol against triple-negative breast cancer cells. *Biomed. Pharmacother.* **174**, 116439 (2024).
232. Kim, J. *et al.* Sustained and Long-Term Release of Doxorubicin from PLGA Nanoparticles for Eliciting Anti-Tumor Immune Responses. *Pharmaceutics* **14**, 474 (2022).
233. Wolff, A. C. *et al.* Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **142**, 1364–1382 (2018).
234. Scherer, S. D. *et al.* Breast cancer PDxO cultures for drug discovery and functional precision oncology. *STAR Protoc.* **4**, 102402 (2023).