

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN**



**“PARTICIPACIÓN DEL FACTOR TRADUCCIONAL EIF4E EN EL DESARROLLO  
DEL MECANISMO DE QUIMIORRESISTENCIA A DOXORRUBICINA EN UN  
MODELO DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA**

**PRESENTA**

**HÉCTOR FRAYDE GÓMEZ**

**TUTOR**

**DR. VICTOR GUADALUPE GARCÍA GONZÁLEZ**

**MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, FEBRERO 2026**



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Baja California y a la Facultad de Medicina y Nutrición, por abrirme las puertas y permitirme realizar mis estudios de posgrado dentro del Programa de Doctorado en Ciencias en Biomedicina.

Al Dr. Víctor García González, por la confianza, por permitirme el trabajar en una de sus líneas de investigación. Por su asesoría académica y apoyo a lo largo de la realización de este proyecto.

A la Dra. Brenda Chimal Vega, por el apoyo técnico tanto de adecuaciones a técnicas como en la enseñanza de técnicas nuevas empleadas en este proyecto.

A cada uno de los que formaron parte del comité de tesis, por enriquecer, dirigir, guiar y proyectar a lo largo de cada uno de los semestres para la mejora tanto de un servidor como del proyecto; así como el proceso editorial tanto del artículo como del presente trabajo.

A cada de uno de los que formaron parte del laboratorio en mi estancia, pasantes de servicio social, tanto a los que solo me toco acompañarlos y apoyarlos en algo como aquellos con los que trabaje directamente, Roberto y Adrián, compañeros de posgrado, Omar Medina, Andrea Muñoz, Georgina Quintana, a laaaaa Ruuuth García, Ángel Pulido y particularmente a Mario Oregel, con quien compartí largas horas de trabajo, clases, viajes y congresos, que hicieron que el trabajo se volviera más ligero.

A mis compañeros y amigos de CISALUD, mi jefe Dr. Ulises Rieke Campoy, por las facilidades, permisos y apoyo para poder cumplir con este proyecto. A Vanessa y Carmen, por que cada a una a su manera, no me permitieron desistir y siempre tuvieron oídos y palabras para mí. Y al Dr. Javier González Ramírez por siempre “presionarme” a ya terminar esto, gracias por sus palabras.

A mi familia, a mis amigos cercanos y a la chilanga banda por todo el apoyo que me mostraron a lo largo de toda esta travesía de no vernos, dejarlos “plantados” en eventos, simplemente gracias por estar y seguir apoyando mis locuras.

Al Dr. Nicolas Serafin Higuera, por el apoyo en lo relacionado a la citometría de flujo, su análisis y comprensión. Así como al Dr. Ignacio Rivero Espejel, por abrirnos las puertas de su laboratorio y permitirnos trabajar en él, además de compartirnos sus juguetes.

## INDICE

RESUMEN.....	9
ABSTRACT .....	10
2. INTRODUCCIÓN .....	11
2.1 CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO .....	11
2.2 REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN Y PAPEL DEL COMPLEJO EIF4F .....	12
2.3 EL FACTOR DE INICIACIÓN EIF4E: CARACTERÍSTICAS Y SU IMPLICACIÓN EN CÁNCER .....	13
2.4 EL PAPEL DE NRF2 EN EL CÁNCER Y SU RELEVANCIA EN EL CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO .....	16
2.5 TRANSPORTADORES ABC Y SU PAPEL EN LA QUIMIORRESISTENCIA EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO .....	17
2.6 EIF4E-NRF2-ABCB1 COMO EJE CENTRAL DE LA QUIMIORRESISTENCIA EN TNBC.....	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
4. HIPÓTESIS .....	24
5. OBJETIVO GENERAL .....	24
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
7. MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
7.1 CULTIVO CELULAR .....	25
7.2 GENERACIÓN DE LA VARIANTE RESISTENTE A DOXORRUBICINA .....	25
7.3 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR .....	26
7.4 INTERNALIZACIÓN DE LA DOXORRUBICINA MEDIANTE ANÁLISIS CITOMÉTRICO.....	26
7.5 CUANTIFICACIÓN DE DOXORRUBICINA EN MEDIOS EXTRACELULARES .....	26
7.6 ENSAYO DE MIGRACIÓN POR CIERRE DE HERIDA .....	27
7.7 ENSAYOS DE INVASIÓN.....	27
7.8 WESTERN BLOTS.....	28
7.9 QPCR .....	29
7.10 ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN (IP) .....	29
7.11 ACOPLAMIENTO MOLECULAR (DOCKING).....	30
7.12 ENSAYOS DE SIRNA .....	31
7.13 ZIMOGRAMAS .....	31
7.14 ANÁLISIS GEPIA .....	32
7.15 ANÁLISIS KM-PLOT .....	32
7.16 DINÁMICA MOLECULAR .....	32
8. RESULTADOS .....	34

8.1 GENERACIÓN DE UNA VARIANTE CELULAR DE MDA-MB-231 RESISTENTE A DOXORRUBICINA .....	34
8.2 LA QUIMIORRESISTENCIA SE ASOCIA CON UNA ADMINISTRACIÓN DE LA DOXORRUBICINA EN LA VARIANTE RESISTENTE.....	36
8.3 IMPACTO DE LA QUIMIORRESISTENCIA SOBRE LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN CELULAR.....	39
8.4 MODULACIÓN DEL FACTOR EIF4E EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON DOXORRUBICINA .....	42
8.5 VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE EIF4E: UN FACTOR CRÍTICO EN LA QUIMIORRESISTENCIA	45
8.6 ACTIVIDAD DE MMP-9 E INVASIÓN CELULAR EN EL CONTEXTO DE LA RESISTENCIA A DOXORRUBICINA .....	47
8.7 PAPEL DE LOS TRANSPORTADORES ABC EN LA QUIMIORRESISTENCIA A DOXORRUBICINA .....	48
8.8 CARACTERIZACIÓN DE NRF2 COMO FACTOR REGULADOR CLAVE EN LA QUIMIORRESISTENCIA.....	58
8.9 REGULACIÓN DE EIF4E MEDIADA POR LA MOLÉCULA DE INHIBICIÓN DE 4E1RCAT .....	62
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	66
9. CONCLUSIONES.....	73
10. REFERENCIAS .....	75
11. PERSPECTIVAS.....	81
12. ANEXOS.....	82

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRATEGIAS PARA LA GENERACIÓN DE VARIANTE QUIMIORRESISTENTE.....	34
FIGURA 2. GENERACIÓN DEL FENOTIPO DE QUIMIORRESISTENTE USANDO IC <sub>25</sub> DOXORRUBICINA (0.3 μM). 36	
FIGURA 3. LA QUIMIORRESISTENCIA A LA DOXORRUBICINA EN CÉLULAS MDA-MB-231 SE ASOCIA A LA EXCRECIÓN INTRACELULAR DE DOXORRUBICINA.....	39
FIGURA 4. LAS BAJAS CONCENTRACIONES DE DOXORRUBICINA PROMUEVEN LA MIGRACIÓN CELULAR EN LAS CÉLULAS MDA <sub>R</sub> . .....	41
FIGURA 5. EN LA VARIANTE MDA <sub>R</sub> , SE REGISTRA UNA MAYOR EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE EIF4E EN CONCENTRACIONES ELEVADAS DE DOXORRUBICINA. ....	45
FIGURA 6. VÍA EIF4E, UN FACTOR CRÍTICO PARA LA QUIMIORRESISTENCIA.....	46
FIGURA 7. DINÁMICA DEL COMPLEJO EIF4F EN MDA <sub>N</sub> Y MDA <sub>R</sub> INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON DOXORRUBICINA. ....	47
FIGURA 8. ACTIVIDAD DE MMP-9 E INVASIÓN CELULAR POR EFECTO DE LA DOXORRUBICINA.....	48
FIGURA 9. LA QUIMIORRESISTENCIA A LA DOXORRUBICINA ESTÁ ASOCIADA CON EL TRANSPORTADOR ABCB1.....	50
FIGURA 10. ENSAYOS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE ABCB1 CON DOXORRUBICINA Y RODAMINA 123. .....	53
FIGURA 11. EXPRESIÓN DE EIF4E Y ABCB1 EN CÁNCER DE MAMA EN BASES DE DATOS. ....	55
FIGURA 12. LA INHIBICIÓN DE ABCB1 CON VERAPAMILO PROMUEVE CITOTOXICIDAD SIGNIFICATIVA EN LAS CÉLULAS MDA <sub>R</sub> . .....	57
FIGURA 13. NRF2 ESTÁ ASOCIADO CON LA EXPRESIÓN DE EIF4E. ....	59
FIGURA 14. EFECTO DE SIRNA EIF4E EN EL MODELO DE RESISTENCIA A DOXORRUBICINA EN AMBAS VARIANTES CELULARES. ....	60
FIGURA 15. REPRESENTACIÓN DE LA RED FUNCIONAL DE ASOCIACIÓN DE PROTEÍNAS MNK1 Y MNK 2 CON EIF4E. ....	61
FIGURA 16. EFECTO DEL INHIBIDOR DE EIF4E (4E1RCAT) EN CÉLULAS MDAR. ....	63
FIGURA 17. EL EJE EIF4E/ABCB1 EN LA QUIMIORRESISTENCIA, EL PAPEL DE LA MOLÉCULA 4E1RCAT....	65
FIGURA 18. MODELO INTEGRATIVO DEL EJE EIF4E-NRF2-ABCB1 EN LA RESISTENCIA A LA DOXORRUBICINA. .....	71

## ABREVIATURAS

4E-BP – *eIF4E-binding protein* (proteína de unión a eIF4E)  
4E1RCat – Inhibidor sintético de la interacción eIF4E–eIF4G  
ABC – *ATP-binding cassette*  
ABCB1 – *ATP-binding cassette subfamily B member 1* (P-glicoproteína, MDR1)  
ABCC – *ATP-binding cassette subfamily C*  
ABCG2 – *ATP-binding cassette subfamily G member 2*  
ADT – *AutoDock Tools*  
Akt – *Protein kinase B*  
ATCC – *American Type Culture Collection*  
BC – *Breast cancer* (cáncer de mama)  
BCRP – *Breast cancer resistance protein*  
cDNA – ADN complementario  
CM – Cáncer de mama  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono  
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
Dox – Doxorubicina  
eIF4E – Eukaryotic initiation factor 4E (factor de iniciación eucariótico 4E)  
EMT – *Epithelial–mesenchymal transition* (transición epitelio–mesénquima)  
ER – Receptor de estrógeno  
ERK – *Extracellular signal-regulated kinase*  
EROs – Especies reactivas de oxígeno  
GAPDH – *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*  
GEPIA – *Gene Expression Profiling Interactive Analysis*  
GLOBOCAN – *Global Cancer Observatory*  
GTEx – *Genotype-Tissue Expression*  
HER2 – *Human epidermal growth factor receptor 2*  
HIF-1 $\alpha$  – *Hypoxia-inducible factor 1 alpha*  
IC25 – Concentración inhibitoria 25 %  
IC50 – Concentración inhibitoria 50 %  
IARC – *International Agency for Research on Cancer*  
IP – Inmunoprecipitación  
KEAP1 – *Kelch-like ECH-associated protein 1*  
KM-Plot – *Kaplan–Meier Plotter*  
MAPK – *Mitogen-activated protein kinase*

MDA<sub>N</sub> – Variante parental sensible de MDA-MB-231  
MDA<sub>R</sub> – Variante resistente a doxorrubicina de MDA-MB-231  
MDR – *Multidrug resistance* (resistencia a múltiples fármacos)  
MNK – *MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase*  
MOE – *Molecular Operating Environment*  
mRNA / ARNm – ARN mensajero  
mTOR – *Mechanistic target of rapamycin*  
mTORC1 – Complejo 1 de mTOR  
MTT – Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio  
NaN<sub>3</sub> – Azida de sodio  
NBD – *Nucleotide-binding domain*  
NF-κB – *Nuclear factor kappa B*  
Nrf2 – *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*  
PBS – *Phosphate-buffered saline*  
PDCD4 – *Programmed cell death protein 4*  
PI3K – *Phosphoinositide 3-kinase*  
PR – Receptor de progesterona  
PVDF – Fluoruro de polivinilideno  
qPCR – Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa  
RIPA – *Radioimmunoprecipitation assay buffer*  
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute medium*  
SDS-PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio  
Ser209 – Serina 209  
siRNA – ARN de interferencia pequeño  
TCGA – *The Cancer Genome Atlas*  
TMD – *Transmembrane domain*  
TNBC – *Triple negative breast cancer* (cáncer de mama triple negativo)  
Trp – Triptófano  
VEGF – *Vascular endothelial growth factor*  
WHO – *World Health Organization*

## Resumen

El cáncer de mama (CM) es la neoplasia maligna más frecuente en mujeres y representa una de las principales causas de mortalidad femenina a nivel mundial. Entre sus subtipos, el cáncer de mama triple negativo (TNBC) destaca por su alta agresividad, escasas opciones terapéuticas y reducida expectativa de supervivencia. Un desafío relevante en su tratamiento es la quimiorresistencia, estrechamente vinculada con alteraciones en la maquinaria de traducción y la sobreexpresión de transportares de eflujo. En este contexto, la subunidad eIF4E del complejo eIF4F ha sido identificada como regulador clave en este proceso. El objetivo del presente estudio fue caracterizar el papel de eIF4E en los mecanismos de quimiorresistencia a doxorrubicina (Dox) en un modelo celular de TNBC. Para esto, se generó la variante resistente MDA<sub>R</sub> a partir de la línea MDA-MB-231, mediante exposición prolongada a la concentración inhibitoria 25 (IC<sub>25</sub>) de Dox. MDA<sub>R</sub> mostró mayor capacidad migratoria e invasiva y la activación sostenida de eIF4E por fosforilación en Ser209 (eIF4E-pSer209), la cual se asoció a la inducción de la vía de VEGF y a la secreción de MMP-9 bajo tratamiento con Dox. Asimismo, se detectaron niveles elevados del transportador ABCB1, cuya regulación dependió de eIF4E, como se confirmó con el inhibidor 4E1RCat y ensayos de silenciamiento por siRNA. De forma complementaria, el análisis *in silico* reveló la capacidad de unión de Dox al transportador ABCB1; además, bajo condiciones de alta concentración de Dox, se observó la activación del factor nuclear Nrf2. En conjunto, estos hallazgos evidencian que el eIF4E promueve la traducción selectiva de genes asociados con quimiorresistencia, facilitando tanto el aumento del potencial invasivo como la activación de mecanismos de desintoxicación mediados por ABCB1 en células TNBC resistentes a Dox.

## **Abstract**

Breast cancer (BC) is the most common type of cancer in women and one of the leading causes of cancer-related deaths worldwide. Within its subtypes, triple negative breast cancer (TNBC) is especially aggressive and is associated with a shorter life expectancy. One of the greatest challenges in treating TNBC is the chemoresistance development, a process through which cancer cells adapt to survive chemotherapy. This phenomenon is often linked to changes in the way cell protein production control and the increased activity of drug efflux pumps expel therapeutic agents.

In this study, we developed a doxorubicin resistant TNBC model (MDA<sub>R</sub>) derived from the MDA-MB-231 cell line by exposing it to inhibitory concentration 25 (IC<sub>25</sub>). The resistant cells not only displayed higher survival but also showed enhanced migration and invasion capacities. We found that this phenotype was associated with sustained activation of the translation factor eIF4E, specifically through phosphorylation at Ser209, which in turn promoted VEGF signaling and secretion of MMP-9. Moreover, resistance correlated with higher expression levels of the ABCB1 drug transporter, a condition confirmed by experiments using the eIF4E inhibitor 4E1RCat.

Supporting these findings, molecular docking simulations suggested that doxorubicin can directly bind to ABCB1, reinforcing its role in drug efflux. At higher drug concentrations, resistant cells also activated the stress response factor Nrf2, adding another layer of protection. Finally, knockdown experiments targeting eIF4E confirmed its central role in regulating Nrf2 and ABCB1 expression. Altogether, our results suggest that chemoresistance in this model is driven by eIF4E activity, which promotes invasive behavior and drug detoxification through ABCB1, highlighting eIF4E as a potential therapeutic target in TNBC.

## **2. Introducción**

### **2.1 Cáncer de mama triple negativo**

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en mujeres y constituye una de las principales causas de mortalidad por cáncer a nivel mundial. De acuerdo con las estimaciones de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), en el año 2022 se diagnosticaron aproximadamente 2.3 millones de nuevos casos de cáncer de mama (23.8% del total de cánceres) y se registraron 666,103 muertes. En México, los datos del Observatorio Global del Cáncer (GLOBOCAN,2026) indican que el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia, con cerca de 31, 043 casos nuevos y alrededor de 8,195 defunciones en 2022 (IARC/WHO,2026). El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que engloba múltiples entidades biológicas y moleculares, cada una con diferente pronóstico y respuesta al tratamiento. Tradicionalmente, se clasifica en cuatro subtipos moleculares: luminal A, luminal B, HER2 positivo y basal, definidos por la presencia de receptores hormonales de estrógeno y progesterona, la sobreexpresión de HER2 (receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano 2) y el marcador de proliferación Ki-67 (Perou et al., 2019). Dentro de estos subtipos, el cáncer de mama triple negativo (TNBC, por sus siglas en inglés) se caracteriza por la ausencia de la expresión de los receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) y HER2, lo que lo convierte en un cáncer clínicamente desafiante debido a la ausencia de blancos terapéuticos específicos (Bianchini et al., 2022). El TNBC representa entre el 10 – 20% de todos los carcinomas mamarios, caracterizado por un comportamiento clínico agresivo, una alta tasa de proliferación, y una elevada frecuencia de metástasis (visceral y cerebral), así como un pronóstico adverso (Schneider et al., 2021). Pacientes con metástasis suelen tener una mediana de supervivencia menor a 18 meses, con tasas de recaída temprana que ocurren generalmente entre los primeros 2 a 3 años después del diagnóstico (Denkert et al., 2017; Garrido-Castro et al., 2019). El tratamiento estándar para el TNBC es la quimioterapia basada en antraciclinas. Sin embargo, un obstáculo importante para el éxito terapéutico es la quimiorresistencia, tanto intrínseca como adquirida. Se estima que hasta el 90% de los fracasos terapéuticos en el escenario metastásico

están asociados con quimiorresistencia (O'Reilly et al., 2019). La quimiorresistencia en TNBC es un fenómeno multifactorial que involucra alteraciones en la respuesta al daño en el ADN, la activación de rutas de señalización relacionadas a la supervivencia (PI3K/Akt/mTOR, MAPK, NF-κB), la remodelación del microambiente tumoral y la sobreexpresión de proteínas transportadoras de la familia ABC que median el eflujo de fármacos como la doxorubicina (Chen et al., 2020; Nedeljkovic & Damjanovic, 2019). En años recientes, los procesos que regulan la traducción han cobrado relevancia en la oncología molecular. Factores de iniciación como el eIF4E se han vinculado al control selectivo de transcritos (ARNm) que codifican proteínas relacionadas con proliferación, angiogénesis, estrés oxidativo y resistencia farmacológica (Hinnebusch et al., 2022). Particularmente, eIF4E ha mostrado interacción funcional con factores de la transcripción, como Nrf2 y con transportadores de la familia ABC, como ABCB1, lo cual podría contribuir a la agresividad y resistencia del TNBC (Sun et al., 2020; Hu et al., 2021).

## **2.2 Regulación de la traducción y papel del complejo eIF4F**

La traducción del ARNm se puede dividir en cuatro etapas fundamentales: iniciación, elongación, terminación y reciclaje ribosomal. La iniciación abarca los procesos previos a la formación del primer enlace peptídico, mientras que la elongación comprende todas las reacciones desde la formación de este enlace hasta la incorporación del último aminoácido. La terminación se refiere a la liberación de la cadena polipeptídica completa y el reciclaje se encarga de preparar a los ribosomas para iniciar un nuevo ciclo de traducción (Andreev et al., 2017). La iniciación es considerada el punto más regulado y determinante, ya que establece el marco de lectura y define los ARNm que serán traducidos. La expresión génica puede regularse a distintos niveles, pero la traducción es fundamental para ajustar de manera efectiva y rápida las concentraciones de proteínas en respuesta a estímulos internos y externos (Guo, 2018). Tradicionalmente, el ribosoma se consideraba un componente invariable de este proceso; sin embargo, estudios recientes han revelado una heterogeneidad estructural y funcional en las subunidades. Se ha documentado la existencia de subunidades ribosomales especializadas que permiten funciones específicas incluso dentro de un mismo tipo

celular, lo cual amplía la diversidad de control traduccional (Shi et al., 2017). Esta especialización también se observa en los factores de iniciación, como los complejos eIF3 y eIF4E, los cuales son esenciales para el reclutamiento del ribosoma a la región 5'-UTR de los ARNm y para la selección diferencial de ARN mensajeros (Genuth & Barna, 2018). El factor eIF4F es un complejo heterotrimérico altamente conservado compuesto por eIF4E, proteína que reconoce y se une a la <sup>7m</sup>G (7-metil-guanosina o cap) del extremo 5' del ARNm, eIF4A, una proteína con función de helicasa dependiente de ATP que desenrolla estructuras secundarias de la región 5' no traducida (5'-UTR), y eIF4G, una proteína de andamiaje que conecta al mRNA con la proteína ribosomal 43S y la extensión de poli-adeninas (cola poli-A). El factor eIF4E constituye un elemento central de este complejo y representa un punto crítico en la traducción dependiente de cap (Amiri et al., 2025). En condiciones fisiológicas, eIF4E es inhibido por las proteínas 4E-BPs, evitando la formación del complejo eIF4F. La activación de la vía mTORC1 induce la fosforilación de 4E-BPs y su disociación de eIF4E, liberándolo para promover la traducción de ARNm asociados a proliferación, angiogénesis, metabolismo y supervivencia celular (Hinnebush et al., 2022). Por estas razones, la traducción mediada por el complejo eIF4F, y en especial el control ejercido por eIF4E, representa un punto regulador crucial en la oncología molecular. Actualmente, diversas estrategias terapéuticas, incluyendo inhibidores de la interacción eIF4E-cap y moduladores de la vía mTOR/4E-BP, se encuentran en evaluación como moléculas prometedoras para superar la resistencia en tumores como el TNBC (Chu & Pelletier, 2021; Pelletier et al., 2021).

### **2.3 El factor de iniciación eIF4E: características y su implicación en cáncer**

El factor de iniciación de la traducción eucariótico 4E (eIF4E) constituye un regulador esencial en la síntesis proteica y desempeña un papel central en el control de la expresión génica postranscripcional. Su relevancia biológica radica en la capacidad de reconocer y unirse a la estructura de cap (<sup>7m</sup>G) localizada en el extremo 5' de los ARNm, paso indispensable para la formación del complejo de iniciación eIF4F y, por ende, del reclutamiento del ribosoma durante la traducción dependiente de cap (Sharma et al., 2023). En condiciones fisiológicas, eIF4E

asegura la producción de proteínas necesarias para el crecimiento y la homeostasis celular. Sin embargo, alteraciones en su regulación han sido vinculadas con estados de hiperactividad que favorecen la proliferación celular descontrolada y el desarrollo de fenotipos tumorales agresivos (Wang et al., 2024; Pettersson et al., 2020). El factor eIF4E es una proteína pequeña de aproximadamente 25 kDa, localizada principalmente en el citoplasma, aunque también se han descrito funciones nucleares relevantes. Su estructura contiene un dominio altamente conservado para la unión al cap del ARNm mediante interacciones con residuos de triptófano (Trp56 y Trp102), lo que confiere especificidad en la unión (Saini & Bhattacharyya, 2021). Además, eIF4E interactúa con proteínas reguladoras como los factores de unión 4E-BP1/2/3 y con eIF4G, modulando la formación del complejo eIF4F. Este complejo permite desenrollar las estructuras secundarias del ARNm, facilitando el escaneo ribosomal (Sharma et al., 2023). En el núcleo, eIF4E participa en la exportación selectiva de ARNm que contienen elementos de sensibilidad a eIF4E, favoreciendo la expresión de genes relacionados con proliferación, supervivencia y adaptación al estrés (Wang et al., 2024). De igual forma, estudios recientes han demostrado que mutaciones en sitios de regulación de eIF4E, así como su sobreexpresión, pueden desestabilizar la homeostasis del transcriptoma y promover la plasticidad tumoral (Fawzy et al., 2021). Adicionalmente, la actividad de eIF4E está íntimamente vinculada con la señalización intracelular. Vías como PI3K/Akt/mTOR regulan la fosforilación de las 4E-BPs, lo que libera a eIF4E para asociarse con eIF4G y formar el complejo eIF4F, mientras que la vía MAPK/MNK modula directamente la fosforilación del propio eIF4E (Saini & Bhattacharyya, 2021; Hao et al., 2022). Esta integración con cascadas de señalización convierte a eIF4E en un punto estratégico para la traducción de proteínas asociadas con proliferación y la resistencia celular. Uno de los mecanismos que contribuyen a la hiperactividad de eIF4E es su fosforilación en la serina 209 (Ser209), catalizada por las quinasas MNK1 y MNK2. Este evento postraduccional incrementa la afinidad de eIF4E por ARNm con regiones 5'-UTR extensas o altamente estructuradas, potencia la exportación nuclear de transcritos oncogénicos y favorece la traducción de proteínas que confieren ventajas selectivas a las células tumorales (Bhat et al.,

2022). En modelos celulares, la fosforilación de eIF4E ha demostrado promover resistencia frente a quimioterapia, supervivencia bajo estrés oxidativo y mayor capacidad de invasión (Sharma et al., 2023). El equilibrio entre la unión de eIF4E a los 4E-BPs y su liberación por fosforilación constituye otro nivel crítico de regulación. En condiciones fisiológicas, los 4E-BPs no fosforilados secuestran a eIF4E, inhibiendo la formación del complejo eIF4F. Sin embargo, la activación de mTORC1 induce la fosforilación de los 4E-BPs, liberando eIF4E y aumentando de manera significativa la traducción dependiente de cap (Wang et al., 2024). Evidencias recientes demuestran que la hiperactividad de eIF4E fosforilado también incrementa la traducción de factores angiogénicos, como VEGF, lo que contribuye directamente a la formación y mantenimiento de un microambiente tumoral proangiogénico (Siddiqui et al., 2022). La sobreexpresión y fosforilación de eIF4E se han identificado como características comunes en varios tipos de cáncer, incluyendo pulmón, colón, próstata y mama. En estos escenarios, eIF4E favorece la traducción de genes relacionados con proliferación, angiogénesis y evasión de la apoptosis, contribuyendo a la progresión tumoral y a un pronóstico desfavorable (Bhat et al., 2022; Fawzy et al., 2021). La forma libre de eIF4E, así como su forma fosforilada, han sido implicadas en procesos asociados a fenotipos malignos, incluyendo la resistencia a la muerte celular y la angiogénesis, a través de la traducción preferencial de transcritos diana como BCL2 y VEGF, respectivamente (Sonenberg & Hinnebusch, 2009). En modelos de cáncer de mama, estudios en líneas luminales como MCF-7 han demostrado que la activación de eIF4E y del complejo eIF4F favorece la expresión de proteínas antiapoptóticas y pro-angiogénicas, contribuyendo a la supervivencia celular y a la progresión tumoral (Avdulov et al., 2004). De manera consistente, en otras líneas de cáncer de mama, incluyendo T47D y BT-474, se ha observado que la señalización asociada a eIF4E y a sus quinasas reguladoras modula la traducción de genes involucrados en proliferación, angiogénesis y resistencia terapéutica (Furic et al., 2010; Graff et al., 2021). En el contexto clínico, estudios en pacientes con melanoma han mostrado que la sobreexpresión de VEGF se asocia con la activación del eje VEGF/VEGFR, promoviendo una mayor capacidad invasiva del tumor y una respuesta deficiente a

la terapia. No obstante, aunque estos antecedentes sugieren que el control traslacional mediado por eIF4E podría desempeñar un papel relevante en la regulación de programas angiogénicos y de supervivencia en cáncer de mama (Avdulov et al., 2004, Graff et al., 2021). En el cáncer de mama, niveles elevados de eIF4E y su fosforilación en Ser209 se asocian con recurrencia temprana y menor supervivencia global (Sharma et al., 2023). En el subtipo de TNBC, caracterizado por la ausencia de receptores hormonales y HER2, eIF4E adquiere un papel aún más crítico. Estudios recientes sugieren que la fosforilación de eIF4E, potencia la traducción de transportadores de eflujo como ABCB1, así como de factores de invasión y angiogénesis, favoreciendo un fenotipo altamente agresivo y resistente a quimioterapias convencionales (Wang et al., 2024; Hao et al., 2022). Estos hallazgos posicionan a eIF4E como un biomarcador pronóstico y como una posible diana terapéutica en el TNBC, donde su inhibición podría revertir mecanismos de resistencia y mejorar la respuesta clínica (Siddiqui et al., 2022).

#### **2.4 El papel de Nrf2 en el cáncer y su relevancia en el cáncer de mama triple negativo**

El factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) es un regulador maestro de la respuesta antioxidante y del equilibrio redox celular. En condiciones fisiológicas, Nrf2 se mantiene inactivo en el citoplasma a través de su interacción con el supresor KEAP1, el cual facilita su degradación vía proteasoma. Frente a estímulos de estrés oxidativo o la presencia de especies reactivas de oxígeno (EROs), Nrf2 se libera de KEAP1, se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes que codifican enzimas antioxidantes y de desintoxicación. Esta activación permite a las células mantener la homeostasis y sobrevivir en ambientes adversos, otorgando a Nrf2 un papel protector en tejidos sanos (Pei et al., 2025; Lee et al., 2023). Sin embargo, en el contexto oncológico, la función de Nrf2 adquiere una dualidad que lo convierte en un factor clave para la progresión tumoral. La activación persistente y no regulada de Nrf2 otorga ventajas selectivas a las células cancerosas, al potenciar la resistencia a quimioterapia, promover la reprogramación metabólica, inhibir la apoptosis y mantener características fenotípicas “*stem-like*” de células madre tumorales (Bottoni et al., 2024). Estas adaptaciones han sido documentadas en

diferentes tipos de cáncer, y en el TNBC adquieren especial relevancia debido a la naturaleza agresiva y a la limitada disponibilidad de opciones terapéuticas. Cabe destacar que la activación sostenida de Nrf2 se ha relacionado con un peor pronóstico clínico y una menor respuesta a la quimioterapia (Mokhtarpour et al., 2024; Yu et al., 2025). Un aspecto emergente es la regulación traduccional de Nrf2 mediada por eIF4E, donde este último facilita la traducción selectiva de ARNm con regiones 5'-UTR extensas, entre ellos el de Nrf2. Estudios recientes muestran que la hiperactivación de eIF4E en modelos resistentes a antraciclinas aumenta la traducción de Nrf2, reforzando las capacidades antioxidantes y detoxificantes del tumor (Xu et al., 2023; Sharma et al., 2024). Asimismo, la interacción funcional entre eIF4E y Nrf2 parece reforzar fenómenos de plasticidad tumoral en TNBC. Mientras que por otro lado, Nrf2 favorece la transcripción de genes antioxidantes y transportadores de fármacos como lo son los transportadores ABCB1, la actividad de eIF4E asegura su traducción eficiente, generando un circuito de retroalimentación que consolida la resistencia a múltiples agentes quimioterapéuticos. Esta sinergia favorece la supervivencia celular bajo tratamiento, a la vez que contribuye a la transición epitelio – mesénquima (EMT), a un fenotipo *steam-like* y a la capacidad metastásica característica del TNBC. Por lo tanto, la coactivación de eIF4E y Nrf2 constituye un eje central de la quimiorresistencia y de la agresividad tumoral, planteando la posibilidad de intervenciones terapéuticas combinadas dirigidas a ambos puntos de la red traduccional y transcripcional. (Yu et al., 2025; Taddei et al., 2025).

## **2.5 Transportadores ABC y su papel en la quimiorresistencia en cáncer de mama triple negativo**

La superfamilia de transportadores con casete de unión a ATP (ATP-binding Cassette, ABC) constituye una de las familias de proteínas de membrana más amplias y conservadas evolutivamente, desde bacterias hasta organismos superiores. En humanos, está conformada por siete subfamilias (ABCA-ABCG) y al menos 48 miembros con funciones diversas (Wang et al., 2021). Estos transportadores, también conocidos como bombas de eflujo, median el transporte de moléculas endógenas y xenobióticos a través de la membrana plasmática

mediante hidrólisis de ATP. Se clasifican en importadores tipo I y tipo II (descritos solo en bacterias) y exportadores, identificados tanto en bacterias como en células de mamíferos (Beis, 2015). Estructuralmente, los transportadores ABC se componen de dos dominios transmembrana (TMD), que forman el canal a través del cual se movilizan los sustratos, y dos dominios de unión a nucleótidos (NBD), localizados en el citoplasma, donde la unión y la hidrólisis de ATP impulsan los cambios conformacionales necesarios para el transporte (Beis, 2022). La alternancia entre los estados abierto y cerrado de estos dominios permite el movimiento vectorial de una amplia gama de compuestos, incluyendo lípidos, metabolitos, péptidos y agentes quimioterapéuticos. En las células humanas, los transportadores ABC participan en procesos esenciales de homeostasis, en la regulación del transporte del colesterol, bilis, iones y xenobióticos, así como en la resistencia de múltiples fármacos (MDR), especialmente en el contexto del cáncer (Robey et al., 2021). La sobreexpresión de algunos de estos miembros disminuye la acumulación intracelular de quimioterapéuticos, reduciendo su eficacia y contribuyendo a la resistencia farmacológica (Sharom, 2020; Wang et al., 2023). El papel de los transportadores ABC en cáncer se describió inicialmente en la década de 1970, tras la observación de resistencia cruzada a múltiples fármacos no relacionados estructuralmente, incluso en ausencia de exposición previa. Desde entonces, se han identificado y caracterizado numerosos transportadores en relación con su estructura, función y participación en la tumorigénesis (Fletcher et al., 2010). Además de su función como bombas de eflujo, estudios recientes han demostrado su papel regulador en procesos como señalización celular, metabolismo lipídico y regulación del microambiente tumoral (Theile & Wizgall, 2021). En oncología, aproximadamente 13 de los 48 miembros de la familia ABC (principalmente de los grupos ABCA, ABCB y ABCG) se han asociado directamente con la quimiorresistencia, al reducir la concentración intracelular de fármacos y limitar su eficiencia (Wang et al., 2021). Entre estos, ABCB1 (Glicoproteína P, MDR1) es el transportador más estudiado desde hace más de cinco décadas y se considera el principal mediador de la resistencia a diferentes agentes quimioterapéuticos, como la doxorubicina. Otro transportador relevante es ABCG2 (BCRP), caracterizado por

un amplio rango de sustratos que en parte se solapan con ABCB1, incluyendo algunos inhibidores de topoisomerasas (Theile & Wizgall, 2021). La subfamilia ABCC, en particular ABCC1 y ABCC4, también se ha mostrado un papel relevante en la resistencia a múltiples fármacos, cuya sobreexpresión puede ser inducida por la exposición crónica a agentes citotóxicos (Sun et al., 2012). En el contexto del TNBC, la sobreexpresión de transportadores ABC se asocia a una reducción en la acumulación intracelular de fármacos, menor respuesta clínica y peor pronóstico (Sharom, 2020). La activación sostenida de ABCB1 disminuye la eficiencia de antraciclinas y taxanos, contribuyendo al fracaso terapéutico (Zhou et al., 2022). Esta regulación ocurre a distintos niveles; Nrf2 induce directamente la transcripción de ABCB1 mediante elementos de respuesta antioxidante en su promotor (Martínez et al., 2022; Wang et al., 2023), mientras que la traducción eficiente de este transportador depende de la disponibilidad de eIF4E, cuyo incremento potencia la síntesis de proteínas de resistencia (Xu et al., 2023; Sharma et al., 2024). En consecuencia, la relación de Nrf2-ABCB1 refuerza la capacidad de las células TNBC para evadir el efecto citotóxico de la quimioterapia. Además de la regulación transcripcional por Nrf2, la expresión de ABCB1 en TNBC puede ser inducida por hipoxia, a través de HIF-1 $\alpha$ , que activa elementos de respuesta en su promotor, así como por la activación de vías de señalización como PI3K/Akt/mTOR y MAPK/ERK (Chen et al., 2020). Asimismo, se ha demostrado que microRNAs como miR-27ab y miR-451 modulan negativamente la expresión de ABCB1, al regular a la baja la vía Akt/mTOR, sugiriendo que la desregulación de estos pequeños ARN no codificantes puede reforzar el fenotipo quimiorresistente (Kwak et al., 2020). En el ámbito clínico, diversos estudios han explorado el uso de inhibidores farmacológicos de ABCB1, como verapamilo, taraquidar y zosuquidar, con el objetivo de sensibilizar a las células tumorales a la quimioterapia. Sin embargo, la eficacia clínica ha sido limitada debido a la toxicidad sistémica y a la falta de selectividad hacia células tumorales (Robey et al., 2021). Más recientemente, se han evaluado nanopartículas y sistemas de liberación dirigidos, diseñados para evadir la expulsión mediada por ABCB1 o para coadministrar inhibidores en el microambiente tumoral, lo que representa un campo emergente en el desarrollo de terapias combinadas (Zhang et

al., 2023). Finalmente, estrategias terapéuticas innovadoras buscan modular la expresión de transportadores ABC de manera indirecta. La inhibición de eIF4E y la supresión de Nrf2 no solo impactan en la traducción y transcripción de ABCB1, respectivamente, sino que también favorecen la activación de procesos como la ferroptosis, aumentando la vulnerabilidad celular frente a la quimioterapia (Lin et al., 2025).

## **2.6 eIF4E-Nrf2-ABCB1 como eje central de la quimiorresistencia en TNBC**

Por un lado, Nrf2 promueve la transcripción de genes antioxidantes, así como de transportadores de la familia ABC, entre ellos ABCB1, lo que facilita la supervivencia celular bajo estrés oxidativo y presión farmacológica (Martínez et al., 2022; Wang et al., 2023). De manera complementaria eIF4E asegura la traducción eficiente de estos ARNm a proteínas funcionales, particularmente en condiciones de activación sostenida de la vía mTOR y fosforilación de 4E-BPs (Hinnebusch et al., 2022; Sun et al., 2020). Así, la cooperación entre eIF4E y Nrf2 refuerza un circuito de retroalimentación que incrementa la expresión y función de ABCB1, favoreciendo el eflujo de fármacos como la doxorrubicina y consolidando el fenotipo multirresistente a fármacos. La activación del eje propuesto por nuestro laboratorio, eIF4E-Nrf2-ABCB1, también se relaciona con procesos de plasticidad tumoral. Nrf2 contribuye a la transición epitelio mesenquimal y al fenotipo *steam-like* en subtipos mesenquimales de TNBC (Bottoni et al., 2024), mientras que el eIF4E potencia la traducción de proteínas asociadas a invasión y angiogénesis, como MMP-2 y 9, así como VEGF (Pelletier et al., 2021). En este contexto, ABCB1 no solo participa en la resistencia farmacológica, sino que también se ha vinculado con una mayor capacidad metastásica, reforzando la agresividad clínica de este subtipo tumoral (Zhou et al., 2022). Resultados experimentales de nuestro grupo confirman esta relación en un modelo derivado de células MDA-MB-231, variantes resistentes a doxorrubicina mostraron una mayor capacidad invasiva y una disminución de la expresión de PDCD4, acompañada de un aumento en la formación del complejo eIF4F (Gonzalez-Ortiz et al., 2022; Castañeda-Sanchez et al., 2024). Este hallazgo sugiere que la hiperactivación del complejo traduccional contribuye a la resistencia. De manera interesante, moléculas terpénicas como la criptotanshinona han

mostrado capacidad para revertir este fenotipo, posiblemente a través de la modulación de eIF4A, interfiriendo con la función de eIF4A y/o la interacción eIF4E – eIF4G (Galindo-Hernandez et al., 2019; Pulido-Capiz et al., 2024). Por otro lado, la evidencia experimental en modelos in vitro e in vivo respalda la noción de que la inhibición de alguno de estos puntos críticos puede impactar de forma significativa en todo el eje. Inhibidores de eIF4E, como 4EGI-1 o 4E1RCat, han demostrado reducir la expresión de genes dependientes de Nrf2 y limitar la síntesis de ABCB1, sensibilizando las células a la quimioterapia (Boussemart et al., 2014; Sai Kiran Naineni, 2020; Chu & Pelletier, 2021) De manera análoga, la supresión de Nrf2 no solo disminuye la transcripción de transportadores ABC, sino que también potencia la inducción de ferroptosis, un mecanismo de muerte celular especialmente prometedor en TNBC (Lin et al., 2025).

En conjunto, el eje eIF4E-Nrf2-ABCB1 representa un punto estratégico de regulación cruzada que articula la resistencia farmacológica, el control traduccional y la respuesta al estrés oxidativo. Su análisis Integrado permite entender mejor la base molecular del fenotipo quimiorresistente en el TNBC y sugiere nuevas oportunidades terapéuticas basadas en intervenciones combinadas dirigidas simultáneamente a la traducción, la transcripción y eflujo de fármacos.

### 3. Planteamiento del problema

El cáncer de mama constituye la neoplasia maligna más diagnosticada en mujeres a nivel mundial y es una de las principales causas de mortalidad femenina. Dentro de sus subtipos, el TNBC se caracteriza por su elevada agresividad clínica, la ausencia de receptores hormonales y HER2, así como por un pronóstico limitado, con una supervivencia promedio que no supera los 15 meses. Este subtipo afecta aproximadamente entre el 13 y 15% de la población hispana, lo que acentúa su relevancia biomédica y social (Kumar & Aggarwal, 2016).

El tratamiento estándar para el TNBC incluye el uso de agentes quimioterapéuticos, en particular antraciclinas, combinados con ciclos de radioterapia. Sin embargo, una de las principales limitaciones terapéuticas radica en la quimiorresistencia, fenómeno responsable de la falla farmacológica en un 85 – 90% de los casos. Esta resistencia está estrechamente asociada con la sobreexpresión y actividad de transportadores de la familia de proteínas ABC, los cuales modulan el eflujo de fármacos antineoplásicos y disminuyen su eficacia intracelular. En este contexto, resulta crítico profundizar en la regulación de los mecanismos moleculares que controlan su expresión, particularmente aquellos relacionados con el inicio de la traducción (O'Reilly et al., 2019; Chen et al., 2020).

Evidencias generadas en nuestro grupo de investigación han demostrado que, en un modelo celular de TNBC derivado de la línea MDA-MB-231, la proteína PDCD4 se encuentra regulada a la baja en variantes “parcialmente” resistentes a doxorubicina. Estas células, además, presentan una mayor capacidad invasiva y sugieren niveles elevados de formación del complejo eIF4F, determinado a través de la interacción entre eIF4A y eIF4E. Lo anterior indica que el complejo eIF4F constituye un regulador central en los mecanismos de quimiorresistencia, favoreciendo la traducción de proteínas asociadas a este proceso, incluyendo transportadores de la subfamilia ABC.

De manera específica, el factor eIF4E desempeña un papel esencial en el reconocimiento de la estructura cap ( $5' \text{-}^7\text{mG}$ ) del ARNm, siendo regulado por

proteínas moduladoras como 4E-BP1/2/3. Por lo tanto, resulta fundamental analizar como la hiperactividad de eIF4E y la dinámica de sus proteínas reguladoras contribuyen a la activación de transportadores ABC y a la instauración de un fenotipo quimiorresistente en el TNBC.

#### **4. Hipótesis**

La hiperactivación del factor traduccional eIF4E promueve la formación y funcionalidad del complejo eIF4F, lo cual potencia la sobreexpresión de bombas de eflujo de la familia ABC, favoreciendo tanto el eflujo de doxorrubicina como el desarrollo de un fenotipo quimiorresistente y altamente invasivo en células de cáncer de mama triple negativo.

#### **5. Objetivo general**

Analizar el papel del factor traduccional eIF4E en la activación de bombas de eflujo de la familia ABC y en los mecanismos moleculares asociados que favorecen la quimiorresistencia a doxorrubicina en un modelo celular de cáncer de mama triple negativo, mediante la caracterización de su expresión, su interacción con proteínas reguladoras y la evaluación funcional de las bombas de eflujo, para identificar posibles blancos terapéuticos para revertir la resistencia farmacológica y mejorar la eficacia del tratamiento en este tipo de cáncer.

#### **6. Objetivos específicos**

1. Generar un modelo celular de cáncer de mama triple negativo mediante el establecimiento de variantes resistentes a doxorrubicina.
2. Caracterizar los marcadores proteicos asociados al fenotipo resistente en la variante generada, evaluando además indicadores del comportamiento celular como la capacidad de migración e invasión.
3. Analizar el papel del factor eIF4E en la variante resistente mediante la evaluación de sus niveles de expresión, la formación del complejo eIF4F y su interacción con proteínas reguladoras de la familia 4E-BP empleando técnicas de Western Blot.
4. Caracterizar el efecto del *knockdown* de los componentes del complejo eIF4F sobre los mecanismos de quimiorresistencia, con énfasis en el papel de eIF4E utilizando la tecnología siRNA.
5. Evaluar el efecto del inhibidor sintético 4E1RCat, sobre la modulación de la actividad de eIF4E en la variante resistente.

## **7. Materiales y métodos**

### **7.1 Cultivo celular**

Se utilizó la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 de la American Type Culture Collection (ATCC HTB-26) como línea celular parental para generar la variante celular resistente a la doxorrubicina y como control interno para realizar estudios comparativos. A menos que se indique otro punto, las células proliferaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos (50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina).

### **7.2 Generación de la variante resistente a doxorrubicina**

Para este trabajo, decidimos evaluar la línea celular MDA-MB-231, ya que esta se encuentra clasificada como una línea celular mesenquimal con similitudes a una célula madre, lo que nos permite estudiar los fenómenos moleculares con la quimiorresistencia. A continuación, implementamos dos protocolos para generar la variante celular resistente a doxorrubicina. El primero consistió en el tratamiento con concentraciones crecientes de doxorrubicina, con una dosis inicial de 0.05 µM. Se realizaron periodos de tratamiento de 4 – 6 días y se estableció un periodo de recuperación de 20 – 30 días. En este caso, el protocolo se basó en el enfoque experimental previo del grupo, con adecuaciones.

En el segundo, se confirmó el IC<sub>50</sub> de la línea celular parental (0.6 µM de doxorrubicina) durante un periodo de 3 días y un periodo de recuperación de 3 – 4 semanas; este proceso se repitió durante siete veces. Sin embargo, para este protocolo, solo el IC<sub>50</sub> era el adecuado. Finalmente, en el tercer protocolo, las células resistentes a la doxorrubicina se obtuvieron mediante tratamientos con la IC<sub>25</sub> de la doxorrubicina (0.3 µM) durante 72 h y un periodo de recuperación de 24 – 27 días. Este esquema de tratamiento se aplicó durante siete ciclos. Las células se mantuvieron bajo una concentración baja de doxorrubicina (15 nM) durante los periodos de recuperación y proliferación. Esta variante generada bajo el esquema de IC<sub>25</sub> se denominó MDA<sub>R</sub> y, como control, evaluamos las células parentales MDA-MB-231 denominadas MDA<sub>N</sub>.

### **7.3 Ensayos de viabilidad celular**

Se utilizaron ensayos de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) con una modificación del protocolo de Hernández-Valencia et al., para evaluar la quimiorresistencia. Las células en proliferación se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 40 000 células por pocillo con 500  $\mu$ L de medio DMEM suplementando durante 24 h a 37°C/5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos celulares se mantuvieron en un medio DMEM no suplementado durante 24 h. A continuación, los cultivos celulares se trataron con concentraciones crecientes de doxorubicina (0.05 – 6.4  $\mu$ M) durante 48 h. Además, se caracterizó el efecto concomitante de doxorubicina (1.6  $\mu$ M) y verapamilo (10  $\mu$ M) durante 24 h. Posteriormente se añadieron 250  $\mu$ L por pocillo de solución de MTT (0.5 mg/mL de MTT disuelto en medio DMEM sin suplementar) y la placa se incubó a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> durante 3 h. Se retiró el medio y la monocapa celular fue lisada con 250  $\mu$ L de DMSO (90%v/v), se recogió en tubos cónicos de 1.5 mL y estos se centrifugaron a 2504 x g durante 10 min a 20°C. Se recogieron las medidas de absorbancia a 595 nm.

### **7.4 Internalización de la Doxorubicina mediante análisis citométrico**

Las células se incubaron bajo varios tratamientos con doxorubicina en medio DMEM durante 24 h, con un periodo previo de ayuno de 24 h. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS 1X. La monocapa celular se recuperó en PBS (300  $\mu$ L) y la suspensión celular se homogenizó suavemente. La caracterización celular se realizó en un citómetro Beckman-Coulter Cytoflex (Pasadena, CA, EE. UU); se caracterizaron 15 000 eventos utilizando el filtro PC7-A para registrar la fluorescencia asociada a la doxorubicina, y se utilizó la intensidad media de fluorescencia para el análisis.

### **7.5 Cuantificación de doxorubicina en medios extracelulares**

Los cultivos celulares proliferaron hasta alcanzar una confluencia del 90% en medio DMEM completo. Los cultivos se mantuvieron en ayuno durante 24 h con medio DMEM sin suplementar. Se prepararon los estímulos con concentraciones crecientes de doxorubicina (0 – 1-6  $\mu$ M) en medio OptiMEM, que contiene bajo

contenido en rojo de fenol. Las células se incubaron durante 24 y 48 h. Del mismo modo, realizamos experimentos bajo el tratamiento con la molécula de verapamilo (10  $\mu$ M), un inhibidor de ABCB1 descrito en la literatura; evaluamos su efecto sobre la exportación de doxorrubicina. Se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 3170 x g a 4°C durante 10 minutos para eliminar los detritus celulares. Los sobrenadantes se recolectaron y se evaluó en un fluorómetro CaryEclipse Variant (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EE. UU.) con una longitud de onda de excitación y emisión de 470 nm y 595 nm, respectivamente. Se construyó una curva estándar para determinar la concentración.

### **7.6 Ensayo de migración por cierre de herida**

El efecto de la quimiorresistencia a la doxorrubicina sobre la migración se evaluó mediante un ensayo de cierre de herida, tal y como lo describen Leal-Orta et al. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 200 000 células por pocillo y se incubaron a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h hasta alcanzar la confluencia del 100%. Se retiró el medio y se adicionó 1 mL de medio DMEM sin suplementar durante 24 h. Pevio a la estimulación, las células se pretrataron con mitomicina C durante 2 h (8  $\mu$ g/mL). La herida se realizó utilizando una punta estéril de 200  $\mu$ L, se realizaron dos lavados con PBS 1X y las células se incubaron durante 48 h con los diferentes tratamientos. Se incluyeron un pocillo con DMEM sin suplementar como control negativo y un pocillo con DMEM suplementado como control positivo. Posterior a las 48 h de tratamiento, el sobrenadante se recolecto para los ensayos de zimografía, y las células fueron fijadas con metanol frío durante 10 minutos en agitación suave. El metanol fue retirado y las células fueron teñidas con azul de Coomassie durante 10 minutos en agitación suave. Se realizaron dos lavados finales con PBS 1X frío y se observaron bajo el microscopio invertido.

### **7.7 Ensayos de invasión**

Los ensayos de invasión se realizaron en sistema transwell con un tamaño de poro de 8  $\mu$ M (NEST, Wuxi Nest Biotechnology Co. Jiansu, China). Se añadieron 50  $\mu$ L de BD Matrigel (Corning, Somerville, MA, EE. UU.) a los insertos del cultivo y se mantuvieron a 37°C durante 45 minutos. Las células MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub> se sembraron

a una densidad de  $1 \times 10^5$  células por inserto en DMEM sin suero en la cámara superior. En la cámara inferior se colocaron 600  $\mu$ L de DMEM suplementado al 10% con SFB, junto con las concentraciones de tratamiento de doxorubicina (0 – 1.6  $\mu$ M). Se utilizó medio DMEM completo como control positivo. El sistema de cámaras se incubó durante 48 h a 37°C en una atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, posteriormente se eliminaron las células y el matrigel de la superficie superior de las membranas con hisopos de algodón, y a las células de la superficie inferior se lavaron una vez con PBS 1X y posteriormente se fijaron con metanol durante 5 minutos, se realizaron tres replicas biológicas para el análisis estadístico.

### **7.8 Western Blots**

En placas de cultivo de 60 mm<sup>2</sup>, se sembraron 500, 000 células en 4 ml de medio DMEM suplementado durante 24 h y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar una confluencia del 90%. El medio DMEM suplementado se sustituyó por el medio DMEM experimental y las células se incubaron a 37 °C durante 24 h (ayuno). Se retiró el medio y se colocaron 4 ml de medio DMEM experimental bajo concentraciones crecientes de doxorubicina (0-1,6  $\mu$ M). Los tratamientos se mantuvieron durante 48 h. Para los ensayos de siRNA, el tratamiento con dox se mantuvo durante 12 h.

Posteriormente, se retiraron los tratamientos y la monocapa celular se lavó una vez con PBS. El lisado total de proteínas se realizó utilizando el sistema tampón RIPA (sc-24948) (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EE. UU.). Para la separación de proteínas, se utilizaron geles de poliacrilamida-SDS al 10% para la caracterización de las proteínas que integran el complejo eIF4F, y geles de poliacrilamida-SDS al 12% para la identificación de las 4EBP y el VEGF. Las proteínas se transfirieron durante la noche a membranas de PVDF a 4 °C, 90 mA. Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5%/TBST al 0,1% y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario durante la noche a 4 °C bajo agitación suave. Evaluamos estos objetivos: anti-eIF4E (sc-9976), anti-eIF4E-pSer-209 (ab76256), anti-p-4EBP1/2/3 (sc-271947), anti-VEGF (sc-57496) y anti-Nrf2 (sc-365949); anti-GAPDH (sc-32233) se utilizó como control de carga. Se utilizó el anticuerpo secundario anti-

ratón conjugado con peroxidasa de rábano para la detección utilizando el kit Immobilon Western (Millipore, Burlington, MA, USA)

## 7.9 qPCR

Las variantes celulares MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub> con una confluencia de 90% fueron tratadas según los esquemas de tratamientos anteriormente mencionados. A continuación, se obtuvo el ARN total de las variantes celulares con Trizol, siguiendo las especificaciones del proveedor. El cDNA se sintetizó utilizando 1 µg de ARN y el kit Primer Script RT-PCR (Takara Inc, Tokio, Japón). La concentración de cDNA se estandarizó para qPCR con PowerUp Sybr Green Master Mix 2X (Applied biosystems, Waltham, MA, EE. UU.), de acuerdo con las indicaciones del fabricante, y se utilizaron 4 µL de los cDNA resultantes para cada reacción de PCR. Las secuencias de los cebadores fueron ABCB1 forward 5'-GCCAGCTGAACTCCTTAGAC-3', y reverse 5'-GATTCGTGCACAGCAGCA-3', ABCC1 forward 5'-GGCTCAAGGAGTATTCAGAG-3', ABCC1 reverse 5'-CCATCG ATGATGATCTCTCC-3, GAPDH forward 5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3' y GAPDH reverse 5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3'. Las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado utilizando un sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7000 (Applied Biosystem); Los datos se analizaron utilizando el método 2-ΔΔCt con GAPDH como calibrador de referencia y se presentaron como cambio relativo.

## 7.10 Ensayos de inmunoprecipitación (IP)

Los cultivos celulares de MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub> se trataron con unas dosis crecientes de doxorubicina (0 – 1.6 µM). Para estos experimentos se utilizaron 250 µg de los lisados celulares totales. El lisado total de proteínas se realizó utilizando el sistema tampón RIPA (sc-24948) (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EE. UU.). Para el total de proteína de estos lisados se emplearon 2 µL de anti-eIF4E (sc-9976). Todas las muestras se incubaron durante 3 h a 4°C con agitación suave. A continuación, se añadieron 10 µL de proteína A/G agarosa (sc-2003) y se mantuvo la incubación a 4°C por 12 h más. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 1409 x g durante 3 minutos. Se evaluó la formación de los complejos inmunes a través de la

separación proteica por SDS-PAGE, posterior transferencia a membrana PVDF y la identificación por western-blot mediante el procesamiento de 20  $\mu$ L de las muestras de sobrenadante. Se utilizó GAPDH como control de carga.

### **7.11 Acoplamiento molecular (Docking)**

Las coordenadas atómicas de la proteína ABCB1 (PDB 7A69), con una resolución de 3.2 Å, fue utilizado para el experimento de acoplamiento molecular. La estructura de la doxorubicina (CID 31703) y el verapamilo (CID 2520) se obtuvieron de la base de datos de PubChem. Se preparó la estructura de la proteína y se eliminaron pequeñas moléculas, así como el agua. Los ligandos y las proteínas se protonaron en 3D y se minimizó la energía utilizando un entorno operativo molecular (MOE) con los parámetros predeterminados (colocación: Triangle Matcher, recalificación 1: London G, campo de fuerza AMBER99). Cada ligando se generó mediante diferentes conformaciones y la proteína se visualizó utilizando las interacciones de los ligandos implementadas en MOE. Se utilizó una estrategia similar para la caracterización de ABCC (PDB 6UY0) con doxorubicina. Para la caracterización del factor eIF4E, se evaluó la estructura PDB 4UED, incluida en la interacción con 4E-BP1 y la molécula 4E1RCat (CID 1619554). Los resultados del acoplamiento se analizaron utilizando los valores de la puntuación S. La puntuación S, en MOE es una función de puntuación compuesta que se utiliza para estimar la afinidad de unión entre un ligando y una proteína diana durante las simulaciones de acoplamiento molecular. Integra múltiples términos energéticos incluyendo interacciones de Van der Waals, electrostáticas, puentes de hidrógeno, de solvatación y tensión torsional, para aproximar la energía libre de unión. La puntuación se expresa en unidades arbitrarias que se correlacionan con la fuerza de unión, donde los valores más negativos sugieren interacciones más favorables entre el ligando y el receptor.

AutoDock Vina (versión 1.2.7). La estructura cristalina ABCB1 humano, misma utilizada para la plataforma MOE, se preparó eliminando las moléculas de agua y los ligandos co-cristalizados no esenciales. Se añadieron hidrógenos polares y se asignaron cargas de Gasteiger utilizando AutoDock Tools 1.5.7 (ADT). Los ligandos,

incluidos la doxorubicina y la rodamina 123, se prepararon en sus conformaciones de energía mínima y la flexibilidad torsional se definió dentro de ADT.

Se definió una cuadrícula para abarcar la región de unión al sustrato y la región transmembrana del transportador ABCB1, con las dimensiones de 73 x 92 x 82 Å. El acoplamiento se realizó utilizando los parámetros predeterminados de Vina con un nivel de exhaustividad de 8, y se seleccionó la posición de unión con la posición más alta (La energía libre de unión más baja) para su posterior análisis. Las afinidades de unión se registraron en kcal/mol, y las interacciones entre el ligando y la proteína se visualizaron utilizando MOE.

### **7.12 Ensayos de siRNA**

Las células se sembraron a una densidad de  $7.5 \times 10^4$  células por placa y se incubaron durante toda la noche en medio DMEM sin antibióticos. El siRNA eIF4E (h) (sc-35284) y el siRNA control A (sc-37007) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE. UU.) La transfección se realizó en las siguientes condiciones: se diluyeron 4  $\mu\text{L}$  de siRNA eIF4E (10  $\mu\text{M}$ ) en 50  $\mu\text{L}$  de medio de transfección (Solución A) y, por otro lado, se homogenizaron 3  $\mu\text{L}$  de reactivo de transfección con 50  $\mu\text{L}$  de medio de transfección (Solución B). A continuación, se añadió, la solución A la solución B, se mezcló suavemente y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de medio de transfección y nuevamente se mezcló de manera suave, y se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de solución total por pozo. Las células se incubaron a 37°C durante 6 h y fueron añadidos 500  $\mu\text{L}$  de medio completo (2X) y se incubaron durante 24 h. Se retiró el medio y se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de medio completo 1x durante 12 h, tras lo cual se colocaron los tratamientos con doxorubicina. Tras verificar la eficacia de la transfección mediante Western Blot, se llevó a cabo el experimento con doxorubicina utilizando una concentración final de 1.6  $\mu\text{M}$  de doxorubicina y un tiempo de tratamiento de 12 h.

### **7.13 Zimogramas**

Los cultivos de MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub> se incubaron bajo diferentes tratamientos y el medio condicionado fue recolectado. Se mezclaron volúmenes de 40  $\mu\text{L}$  de muestra

(medio condicionado) sin calentar con tampón de muestra 5x (0,313 M Tris pH 6,8, 10 % SDS, 50 % glicerol y 0,05 % azul de bromofenol) y se procesaron en geles de poli(acrilamida) al 8% co polimerizados con gelatina (1% m/v). Los geles se enjuagaron dos veces con Tritón X-100 al 2.5% y posteriormente fueron incubados en solución de revelado (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM CaCl<sub>2</sub> y 0,02 % NaN<sub>3</sub>) durante 48 h a 37°C. Los geles se fijaron y se tiñeron en azul de Coomassie G-250 al 0.25% en ácido acético al 10% y metanol al 30%). La actividad proteolítica se detectó como bandas claras sobre el fondo teñido del sustrato sin procesar.

#### **7.14 Análisis GEPIA**

Analizamos la base de datos GEPIA, para evaluar las posibles implicaciones de las proteínas de interés eIF4E y ABCB1 en el cáncer de mama. Evaluamos los siguientes niveles de expresión del ARNm de eIF4E (Gen codificado EIFE, ID del gen: 1977) y ABCB1 (Gen codificador ABCB1, ID del gen: 5243) y su relación con la supervivencia global en pacientes con cáncer de mama utilizando GEPIA, que recopila información del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) y GTEx (Genotype-Tissue- Expression).

#### **7.15 Análisis KM-Plot**

De manera similar, utilizamos la base de datos de KM-plot para evaluar la implicación de la expresión de la proteína eIF4E (Uniprot ID: P06730) y su relación con la supervivencia en pacientes con TNBC y pacientes con TNBC tratados con doxorubicina. Seleccionamos la base de datos TCGA-RPPA para el análisis KM.

#### **7.16 Dinámica Molecular**

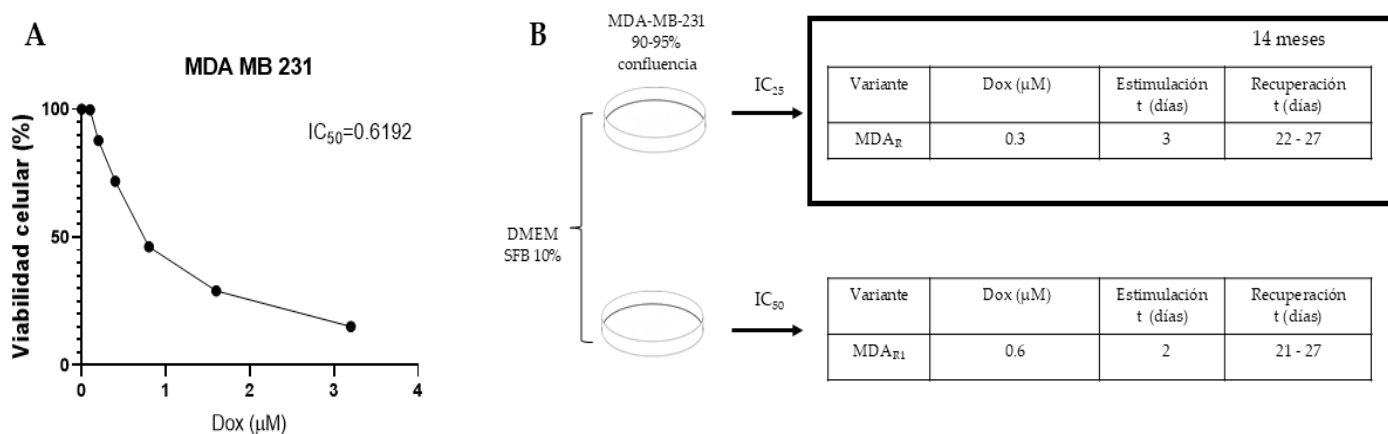
Se realizó una simulación de dinámica molecular utilizando el complemento QwikMD 1.364 en VWD y el motor de simulación NAMD 2.1465 para evaluar la estabilidad del complejo ABCB1- Dox derivado del acoplamiento molecular. La simulación se llevó a cabo en un disolvente explícito para agilizar el análisis y evitar la complejidad añadida de incrustar la proteína transmembrana en una bicapa lipídica. Se aplicaron restricciones posicionales armónicas a los C $\alpha$  de la proteína a lo largo de la simulación para preservar la arquitectura general del poro transmembrana en ausencia de un entorno de membrana lipídica.

El complejo ABCB1-Dox se solvato en una caja rectangular de moléculas de agua TIP3P con un amortiguador de 18 Å, y el sistema se neutralizó con iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> para alcanzar una fuerza iónica fisiológica de 0.15 M. Se utilizó el campo de fuerza CHARMM36 para la proteína ABCB1. La topología y los parámetros de doxorubicina se generaron utilizando CHARMM-GUI, sin embargo, debido a la complejidad estructural de este ligando, faltaban o eran incorrectos varios parámetros, incluidas las definiciones de enlaces, ángulos, diédricos y torsiones inadecuadas, que se corrigieron manualmente antes de la simulación.

## 8. Resultados

### 8.1 Generación de una variante celular de MDA-MB-231 resistente a doxorubicina

Con el objetivo de desarrollar un modelo celular representativo de resistencia adquirida a doxorubicina, se implementaron dos protocolos de inducción basados en las concentraciones inhibitorias  $IC_{25}$  e  $IC_{50}$  (Figura 1A, B), aplicados durante un periodo total de 14 meses mediante siete ciclos consecutivos de tratamiento. Debido a la elevada citotoxicidad inherente a la doxorubicina, la concentración  $IC_{25}$  fue determinada como la estrategia más adecuada, ya que los intentos de inducción utilizando la  $IC_{50}$  no condujeron al establecimiento de una población resistente, sino al desarrollo de células en estado quiescente. En consecuencia, se seleccionó un esquema de exposición sostenida a la  $IC_{25}$  para generar una variante derivada de MDA-MB-231, denominada  $MDA_R$  (Figura 2A). Cada ciclo de inducción consistió en tres días de exposición al fármaco, seguidos de un periodo de recuperación de 27 días hasta alcanzar una confluencia del 85–90%, previo al inicio del siguiente ciclo, lo que permitió la adaptación progresiva de las células al tratamiento y la consolidación del fenotipo resistente.

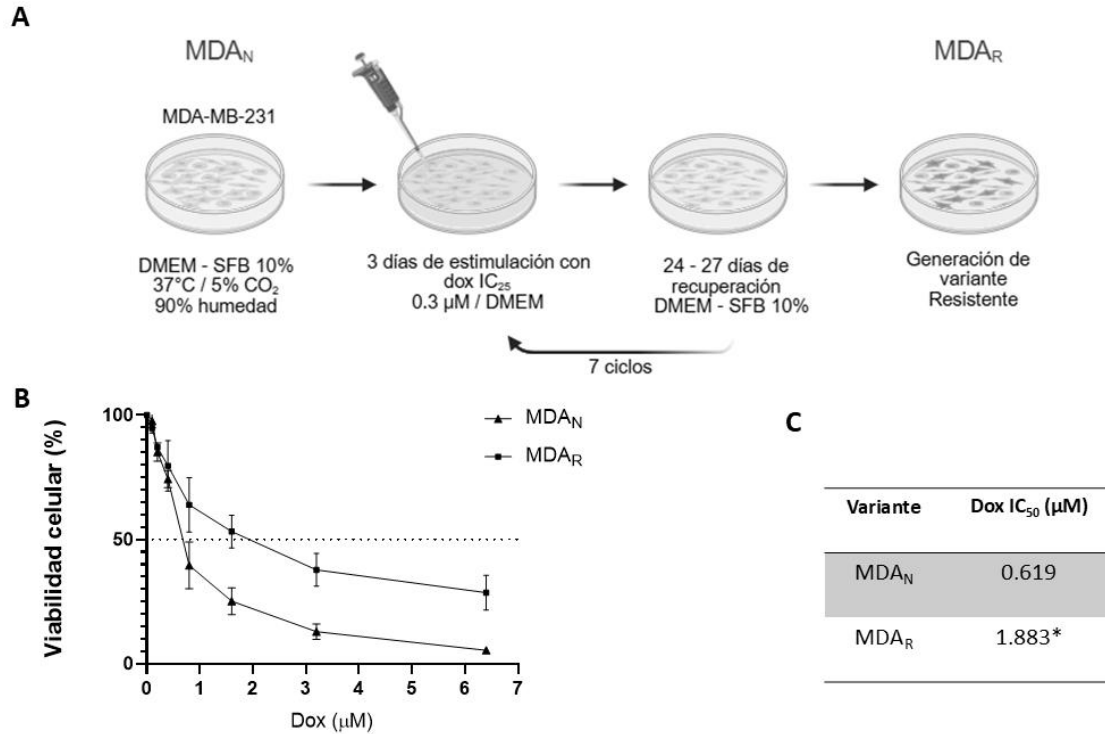


**Figura 1. Estrategias para la generación de variante quimiorresistente.**

(A) Ensayos de MTT con la línea MDA-MB-231 para determinar la  $IC_{50}$  a doxorubicina, en tratamientos dosis crecientes durante 48 horas. (B) Modelos de generación de la variante quimiorresistente utilizando las concentraciones  $IC_{25}$  e  $IC_{50}$ .

La caracterización funcional de la variante celular resistente se llevó a cabo mediante ensayos de viabilidad celular (MTT) frente a un gradiente de concentraciones crecientes de doxorrubicina (0–6.4  $\mu\text{M}$ ), con un tiempo de exposición de 48 horas. Los experimentos se realizaron por triplicado, lo que permitió determinar de manera robusta el perfil de sensibilidad farmacológica. Bajo estas condiciones, la variante identificada como MDA<sub>R</sub> se mantuvo en cultivo con una dosis de mantenimiento de doxorrubicina (15 nM). Los resultados revelaron un aumento significativo en la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) de la línea MDA<sub>R</sub> (1.883  $\mu\text{M}$ ) en comparación con la línea parental sensible, denominada MDA<sub>N</sub>, cuyo IC<sub>50</sub> fue de 0.619  $\mu\text{M}$  en las mismas condiciones experimentales (Figuras 2B, C). Este incremento aproximado de tres veces en la resistencia sugiere la activación de mecanismos celulares adaptativos implicados en la evasión de la citotoxicidad inducida por la doxorrubicina.

Es probable que el fenotipo quimiorresistente observado sea consecuencia de procesos moleculares relacionados con el metabolismo y el transporte de los fármacos, tales como la sobreexpresión de bombas de eflujo, la disminución en la acumulación intracelular del agente quimioterapéutico o la activación de rutas detoxificación celular. En conjunto, estos hallazgos sustentan el establecimiento de una variante resistente a doxorrubicina, útil para el estudio de los mecanismos subyacentes a la quimiorresistencia en cáncer de mama triple negativo. Para fines de este proyecto nos concentramos en la expresión de las bombas de eflujo.



**Figura 2. Generación del fenotipo de quimiorresistente usando IC<sub>25</sub> doxorubicina (0.3 μM).**

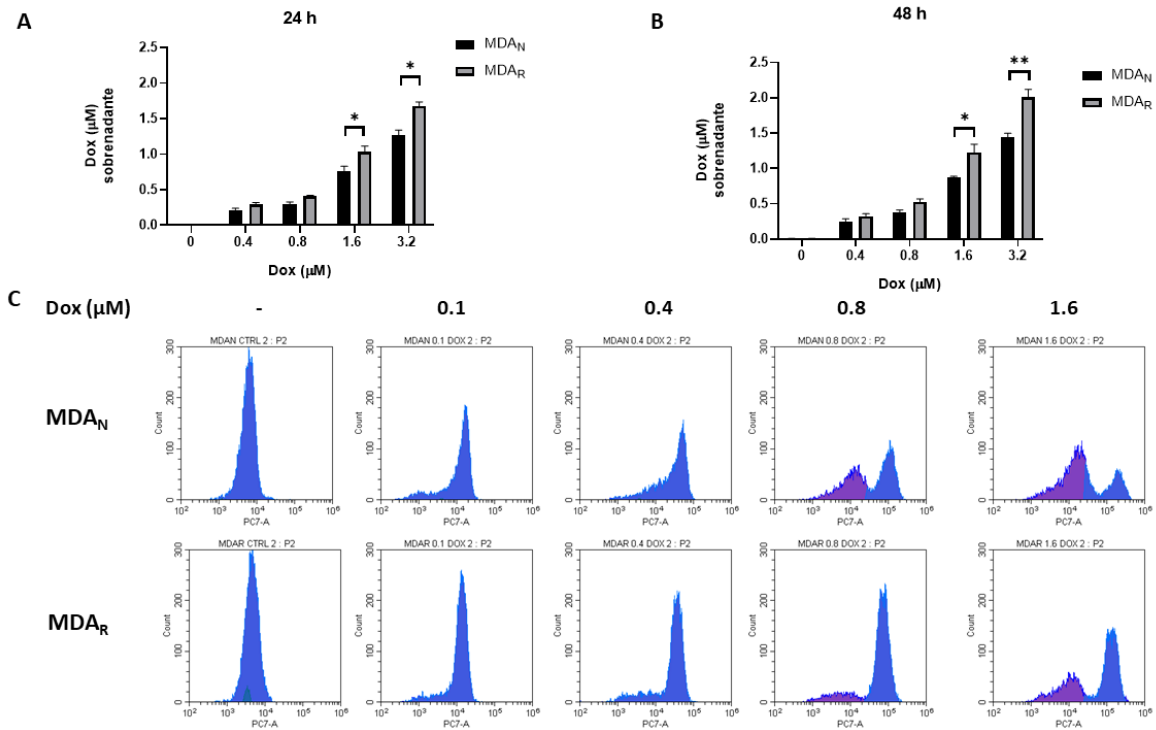
(A) Esquema general del protocolo para la generación de quimiorresistencia. (B) Curva dosis respuesta bajo el tratamiento de doxorubicina (0 – 6.4 μM) durante 48 horas de tratamientos en las variantes celulares MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub>. (C) Valores de IC<sub>50</sub> para ambas variantes celulares, MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub>, ensayos correspondientes a tres replicas biológicas ( $\bar{x} \pm D.S$ ) Se presentan el valor medio (n=3). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls donde \* p < 0.05.

## 8.2 La quimiorresistencia se asocia con una administración de la doxorubicina en la variante resistente.

Con el propósito de dilucidar los mecanismos celulares implicados en la quimiorresistencia, se llevó a cabo un análisis detallado del manejo intracelular y extracelular de la doxorubicina en las células MDA<sub>R</sub>. Esta estrategia experimental se basó en la cuantificación de la concentración de doxorubicina en el sobrenadante de los cultivos, completados con ensayos de citometría de flujo, aprovechando la fluorescencia intrínseca de la doxorubicina como marcador de su distribución subcelular. Inicialmente, se evaluaron los niveles extracelulares de doxorubicina como un indicador indirecto de la dinámica celular de expulsión del fármaco, procesos asociados típicamente a fenotipos quimiorresistentes (Figura 3A, B). Para esto, los cultivos celulares fueron tratados con concentraciones crecientes

de doxorubicina (0 – 3.2  $\mu\text{M}$ ) durante 24 y 48 horas (Figura 3A, B). Posteriormente, se recolectaron los sobrenadantes y se analizaron mediante espectrofluorimetría, empleando una curva estándar previamente validada para cuantificar la concentración de doxorubicina. Los resultados mostraron un incremento significativo en la concentración de doxorubicina en el sobrenadante de las células  $\text{MDA}_R$ , comparadas con las células  $\text{MDA}_N$ . A las 24 horas de tratamiento, la diferencia fue estadísticamente significativa a partir de la concentración de 1.6  $\mu\text{M}$  hasta las 3.2  $\mu\text{M}$  de doxorubicina (Figura 3A). A las 48 horas, el aumento en los niveles extracelulares de doxorubicina en cultivos  $\text{MDA}_R$  se observó también a partir de la misma concentración (1.6  $\mu\text{M}$ ), manteniéndose elevado con respecto a los cultivos control (Figura 3B). Estos hallazgos sugieren que las células  $\text{MDA}_R$  poseen un manejo más eficiente de la doxorubicina, probablemente mediante una mayor actividad de mecanismos de eflujo activo, como los transportadores de membrana tipo ABCB1, o bien una menor captación intracelular. En conjunto, los datos respaldan la hipótesis de que la gestión optimizada de doxorubicina por parte de las células  $\text{MDA}_R$  constituye un componente funcional clave del fenotipo quimiorresistente observado. Como complemento al análisis de los niveles extracelulares de doxorubicina, se evaluó la capacidad de excreción del fármaco en células parentales ( $\text{MDA}_N$ ) mediante citometría de flujo, bajo condiciones de exposición creciente a doxorubicina (0–1.6  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Para este análisis se estableció previamente una plantilla de citometría que permitió considerar y corregir la auto fluorescencia celular, garantizando así una cuantificación precisa de la fluorescencia atribuible a la doxorubicina. Esta estrategia permitió determinar la eficiencia del eflujo activo del fármaco, considerando que aquellas células incapaces de eliminarlo conservarían su fluorescencia intrínseca, lo que se traduce en acumulación intracelular. Los experimentos se realizaron por triplicado en ensayos independientes, y la determinación de ambas variantes celulares ( $\text{MDA}_N$  y  $\text{MDA}_R$ ) se llevó a cabo una vez generada y validada la plantilla de análisis, asegurando la reproducibilidad y consistencia de los resultados. Los resultados indicaron un aumento progresivo de la señal fluorescente hasta una concentración de 0.8  $\mu\text{M}$  en ambas líneas celulares,

MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub> (Figura 3C). Sin embargo, a concentraciones superiores (0.8 – 1.6  $\mu$ M), se observó la aparición de una segunda población en la línea MDA<sub>N</sub>, caracterizada por una menor intensidad de fluorescencia. Este fenómeno sugiere un aumento en la proporción de células no viables, posiblemente asociado a la citotoxicidad generada por la elevada acumulación intracelular de doxorrubicina. Para una evaluación más precisa del contenido intracelular de doxorrubicina, se determinó la intensidad media de fluorescencia, IMF (MFI, por sus siglas en inglés), parámetro que refleja la carga intracelular del fármaco independientemente del número total de células fluorescentes. Los datos obtenidos mostraron que, aunque la población de células viables en la línea MDA<sub>N</sub> fue menor, estas presentaron una IMF significativamente mayor en comparación con las células MDA<sub>R</sub>, lo que indica una mayor acumulación intracelular de doxorrubicina en células sensibles. En contraste, las células MDA<sub>R</sub> mostraron una menor IMF conforme se incrementaba la proporción de células viables, lo cual es consistente con la activación de mecanismos de expulsión del fármaco o con una reducción en su captación. Las determinaciones se realizaron en ensayos independientes por triplicado, incluyendo en cada uno de ellos el análisis paralelo de las variantes MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub>, lo que aseguró la consistencia y reproducibilidad de los resultados obtenidos. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que las células MDA<sub>R</sub> han desarrollado mecanismos adaptativos (como pudiera ser el aumento en la expresión de transportadores ABC) capaces de regular los niveles intracelulares de doxorrubicina, favoreciendo su eliminación y, en consecuencia, contribuyendo a la preservación de la viabilidad celular. Este comportamiento es coherente con un fenotipo quimiorresistente sostenido, estrechamente relacionado con las características moleculares que definen a las células tumorales agresivas.



**Figura 3. La quimiorresistencia a la doxorubicina en células MDA-MB-231 se asocia a la excreción intracelular de doxorubicina.**

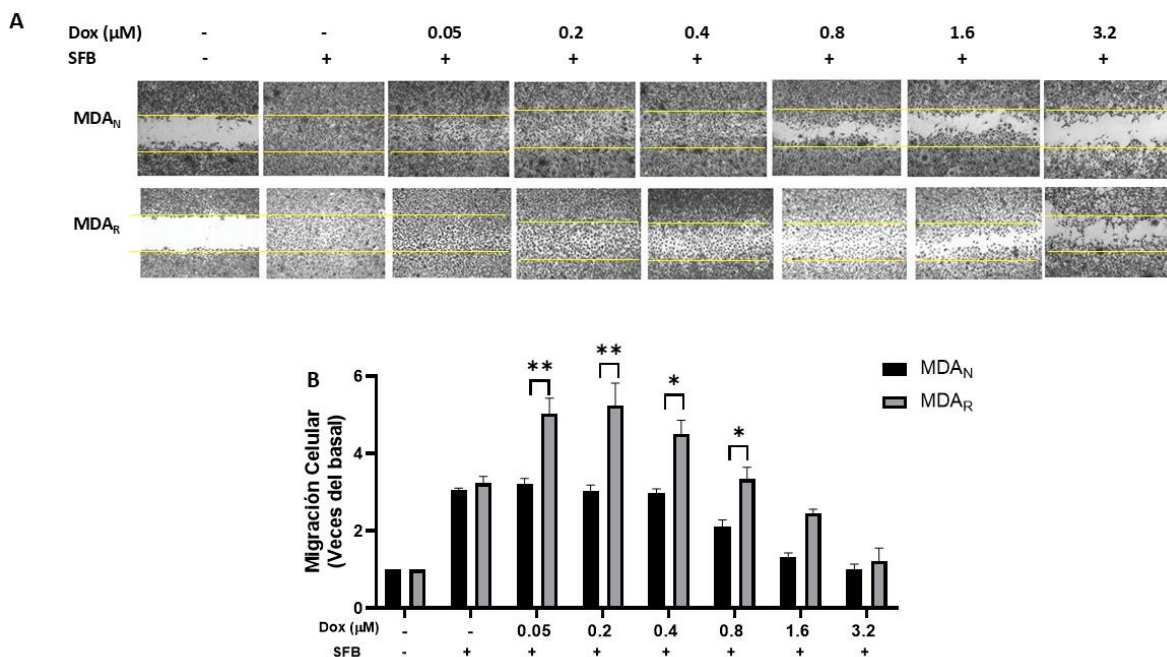
Cuantificación de doxorubicina en el medio sobrenadante a las 24 (A) y 48 (B) horas de estímulo a dosis crecientes de doxorubicina (0 – 3.2 μM) en las variantes MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub>. Los valores se determinaron en base a tres replicas (n=3,  $\bar{x} \pm$  D.S.) Los datos fueron analizados estadísticamente utilizando ANOVA de una vía y la prueba de comparación de Newman-Keuls, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01. Se registraron los valores de la fluorescencia de doxorubicina a 560 nm. (C) Ensayos de citometría de flujo para evaluar los efectos de la doxorubicina sobre ambas variantes celulares MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub> tras 24 horas de tratamientos a dosis crecientes. Para este análisis se evaluó la intensidad media de fluorescencia (IMF).

### 8.3 Impacto de la quimiorresistencia sobre la capacidad de migración celular

Una característica distintiva del cáncer de mama triple negativo (TNBC, por sus siglas en inglés), así como de las células quimiorresistentes, es su elevada capacidad migratoria, la cual se asocia con un comportamiento más agresivo y un mayor potencial metastásico. Para evaluar el impacto de la quimiorresistencia sobre la migración celular, se realizaron ensayos de migración con ambas variantes celulares, MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub>, bajo tratamiento con concentraciones crecientes de doxorubicina (0.05–3.2 μM). Con el fin de minimizar la influencia de la proliferación y mantener constante la densidad celular inicial durante el ensayo, las células fueron tratadas previamente con mitomicina C, permitiendo así atribuir los cambios observados principalmente a la capacidad migratoria. Asimismo, los experimentos

se realizaron a partir de tres réplicas biológicas independientes, garantizando la robustez estadística de los resultados. Imágenes representativas del ensayo para ambas variantes celulares se presentan en la Figura 4A. Como control negativo, se utilizaron células cultivadas sólo en medio DMEM, mientras que el control positivo consistió en células que crecieron en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Para ambas variantes celulares, los tratamientos con doxorubicina se realizaron en presencia de SFB, con el propósito de evaluar el efecto de la doxorubicina sobre la inducción de la migración. En las células MDA<sub>N</sub>, se observó que el control positivo indujo un aumento de 2.8 veces en la migración celular con respecto al control negativo. Además, la exposición a 0.05 µM de doxorubicina estimuló la migración de manera aún mayor, alcanzando un incremento de 3.12 veces según el análisis densitométrico (Figura 4B). Este efecto estimulador de la migración se mantuvo hasta una concentración de 0.4 µM de doxorubicina. Sin embargo, a partir de 0.8 µM, se observó una disminución progresiva y significativa de la migración celular, indicando un efecto inhibitorio dosis-dependiente de la doxorubicina a concentraciones más altas. La significancia de estas diferencias fue evaluada mediante análisis estadístico utilizando pruebas de ANOVA, lo que permitió confirmar la validez de las variaciones observadas entre las distintas condiciones experimentales. En las células MDA<sub>N</sub>, se observó que el control positivo indujo un aumento de 2.8 veces en la migración celular con respecto al control negativo. Además, la exposición a 0.05 µM de doxorubicina estimuló la migración de manera aún mayor, alcanzando un incremento de 3.12 veces según el análisis densitométrico (Figura 4B). Este efecto estimulador de la migración se mantuvo hasta una concentración de 0.4 µM de doxorubicina. Sin embargo, a partir de 0.8 µM, se observó una disminución progresiva y significativa de la migración celular, indicando un efecto inhibitorio dosis dependiente de doxorubicina a concentraciones más altas. Las diferencias entre las condiciones experimentales fueron evaluadas estadísticamente mediante ANOVA, confirmándose la significancia de los cambios observados. En contraste, las células MDA<sub>R</sub> mostraron un patrón de respuesta distinto. A bajas concentraciones de doxorubicina (0.05 0.8 µM), se observó un incremento notable en la migración, con aumentos de hasta 5 y 5.23 veces, con

comparación con el control negativo, respectivamente. Este fenotipo de migración fue constante incluso a concentraciones donde la migración de las células MDA<sub>N</sub> ya había comenzado a disminuir. La inhibición del comportamiento migratorio en MDA<sub>R</sub>, solo se hizo evidente a concentraciones elevadas de doxorubicina (1.6 y 3.2  $\mu\text{M}$ ), donde se registró una reducción en la migración celular (Figura 4B). Las comparaciones entre tratamientos fueron validadas mediante análisis de varianza, lo que permitió sustentar estadísticamente los efectos observados. Estos resultados indican que la variante resistente no solo tolera la presencia de la doxorubicina, sino que también mantiene una elevada capacidad migratoria en un rango más amplio de concentraciones de doxorubicina. Esta combinación de resistencia y migración podría representar una ventaja adaptativa fundamental en el contexto tumoral, al favorecer tanto la supervivencia frente a la quimioterapia como a la diseminación metastática.



**Figura 4. Las bajas concentraciones de doxorubicina promueven la migración celular en las células MDA<sub>R</sub>.**

(A) Imágenes representativas de ensayos de cierre de herida bajo tratamientos con dosis crecientes de doxorubicina (0.05 – 3.2  $\mu\text{M}$ ) en ambas variantes celulares. (B) Ensayo densitométrico de los ensayos de migración en las variantes MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub>. Los resultados se muestran en media y desviación estándar de tres replicas biológicas ( $n=3$ ,  $\bar{X} \pm \text{DS}$ ). Para este análisis se utilizó medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, y medio DMEM sin suplementar como control negativo. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple Newman-Keuls. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

#### **8.4 Modulación del factor eIF4E en respuesta al tratamiento con doxorubicina**

Con el propósito de analizar la modulación del factor de iniciación de la traducción eIF4E, se evaluaron tanto los niveles de expresión total como la forma fosforilada activa (eIF4E-pSer209), cuya activación depende de la fosforilación mediada las quinasas MNK y sus mecanismos regulatorios asociados. Los tratamientos con doxorubicina se aplicaron en un rango de concentraciones crecientes (0 – 1.6  $\mu\text{M}$ ) durante 48 horas, siguiendo los protocolos previamente establecidos. Estas concentraciones fueron seleccionadas con base a valores cercanos al  $\text{IC}_{50}$  determinado para cada variante celular y en rangos comúnmente utilizados en estudios in vitro de cáncer de mama, donde concentraciones entre 0.1 y 2  $\mu\text{M}$  han sido ampliamente empleadas para inducir estrés quimioterapéutico y respuestas adaptativas sin provocar citotoxicidad masiva (Wang et al., 2021). Tal como se ilustra en la Figura 5A, la expresión de eIF4E total y de eIF4E-pSer209 se asocia con características de agresividad tumoral. En la variante celular  $\text{MDA}_\text{N}$ , se observó una disminución progresiva de eIF4E en respuesta a dosis crecientes de doxorubicina. En contraste, en la variante  $\text{MDA}_\text{R}$ , los niveles de eIF4E se mantuvieron estables incluso ante la exposición más alta (1.6  $\mu\text{M}$ ), una concentración cercana al valor de  $\text{IC}_{50}$  determinado para esta variante celular (Figura 2C). Aunque en este estudio no se evaluó directamente el origen de esta estabilidad, no puede descartarse que en  $\text{MDA}_\text{R}$  la conservación de los niveles de eIF4E responda a mecanismos postraduccionales, como una mayor estabilidad proteica o una reducción en su degradación, más que a un aumento transcripcional per se, como ha sido descrito en contextos de estrés terapéutico y activación sostenida de vías de supervivencia. En este sentido, se ha reportado que la fosforilación de eIF4E y la activación de rutas asociadas a mTOR/MNK pueden contribuir a su estabilización funcional y a la persistencia de programas traduccionales prooncogénicos. En conjunto, este patrón diferencial sugiere una posible asociación con mecanismos de quimiorresistencia, alteraciones en el manejo intracelular de la doxorubicina y una mayor capacidad migratoria de la variante resistente.

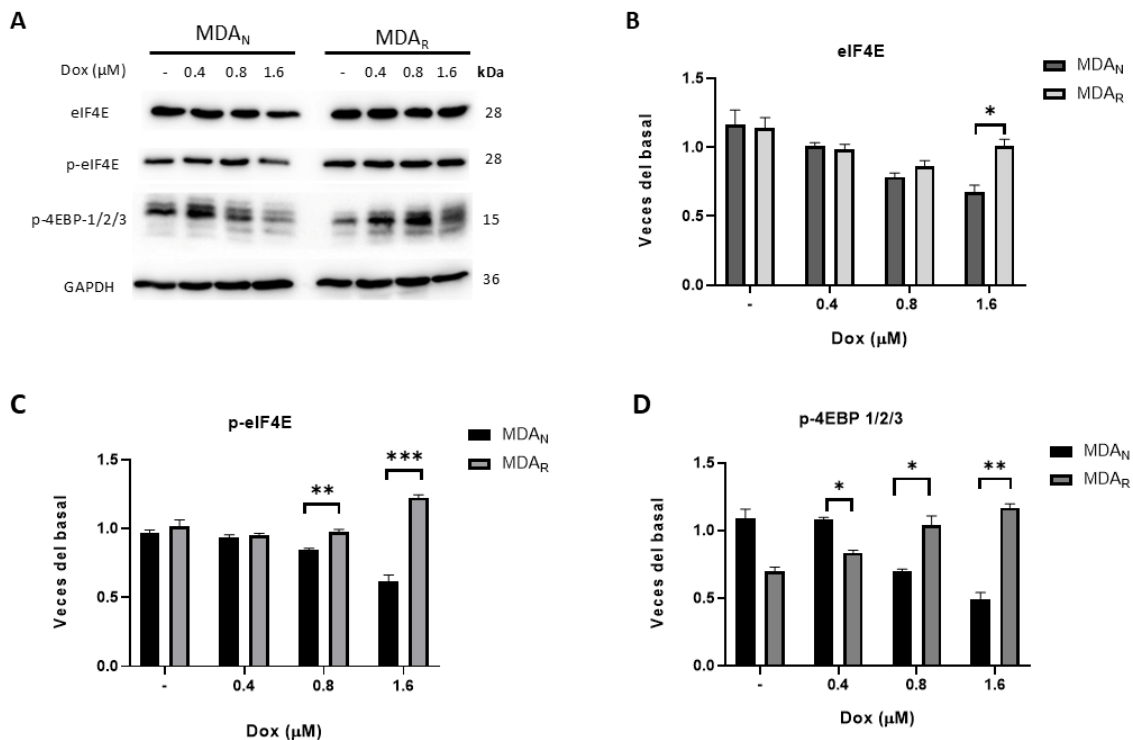
Adicionalmente, se registró una disminución dependiente de la dosis en los niveles de eIF4E-pSer209 en la variante MDA<sub>N</sub>, mientras que en la variante MDA<sub>R</sub> estos niveles se mantuvieron constantes, e incluso mostraron un leve incremento a la concentración de 1.6  $\mu$ M de doxorubicina (Figura 5A, C). Este hallazgo sugiere que la activación de eIF4E podría mantenerse sostenida bajo condiciones de estrés quimioterapéutico, lo cual implica un mecanismo adaptativo crítico para la supervivencia y persistencia celular en contextos de resistencia a la doxorubicina.

Por otra parte, un mecanismo regulador crucial de la actividad de eIF4E involucra a las proteínas de unión a eIF4E (4EBP's), cuya fosforilación, inducida principalmente por la vía de señalización Akt/mTORC1, impide su interacción con eIF4E y favorece así su activación funcional. En el contexto de cáncer, particularmente en cáncer de mama, 4EBP1 ha sido identificada como la isoforma con mayor relevancia funcional, ya que su estado de fosforilación se asocia estrechamente con la activación de la traducción cap-dependiente, progresión tumoral y resistencia a fármacos (Sonenberg & Hinnebusch, 2009; Martineau et al., 2013; Graff et al., 2021). En contraste, 4EBP2 y 4EBP3 han sido menos caracterizadas en este contexto, aunque podrían desempeñar funciones moduladoras o compensatorias dependientes del tipo celular. Con base en estas consideraciones, se evaluaron los niveles de fosforilación de las isoformas 4EBP1, 4EBP2 y 4EBP3 en respuesta al tratamiento con doxorubicina, con el objetivo de explorar su posible contribución diferencial a la regulación de eIF4E en condiciones de estrés quimioterapéutico.

En la variante celular MDA<sub>N</sub>, se observó una disminución dependiente de la dosis en la fosforilación de las proteínas 4EBP conforme aumentaba la concentración de doxorubicina (Figura 5D). Este patrón sugiere una reducción progresiva de la inactivación de las 4EBPs, lo que potencialmente podría contribuir a la represión de la traducción mediada por eIF4E en esta variante. Si bien en este estudio no se evaluó de manera directa la síntesis global de proteínas ni el estado del ciclo celular, la disminución en la fosforilación de 4EBPs es consistente con un escenario de inhibición de la traducción cap-dependiente, proceso que ha sido previamente asociado con una reducción de la actividad biosintética global y con la inducción de

arresto del ciclo celular bajo condiciones de estrés quimioterapéutico, particularmente en respuesta a agentes genotóxicos como la doxorrubicina (Proud, 2015; Robichaud et al., 2018). En este sentido, los cambios observados podrían reflejar una respuesta adaptativa de la variante sensible orientada a limitar la proliferación celular frente a la exposición al fármaco.

Por el contrario, en la variante MDA<sub>R</sub> se registró un incremento en los niveles de fosforilación de 4EBP1/2/3 en respuesta a concentraciones crecientes de doxorrubicina (Figura 5A, D), lo que sugiere una activación sostenida de la vía Akt/mTORC1 incluso bajo condiciones de estrés quimioterapéutico. Si bien en este estudio no se evaluaron directamente los niveles de fosforilación de Akt ni de mTOR, la fosforilación concomitante de múltiples isoformas de 4EBP —blancos canónicos de mTORC1— es consistente con la activación funcional de esta vía de señalización. En este contexto, estos hallazgos apoyan la preservación de mecanismos de señalización prooncogénicos en la variante resistente, los cuales favorecerían la liberación de eIF4E y el mantenimiento de una traducción dependiente de “cap” activa, contribuyendo así a la adaptación celular frente al tratamiento con doxorrubicina.

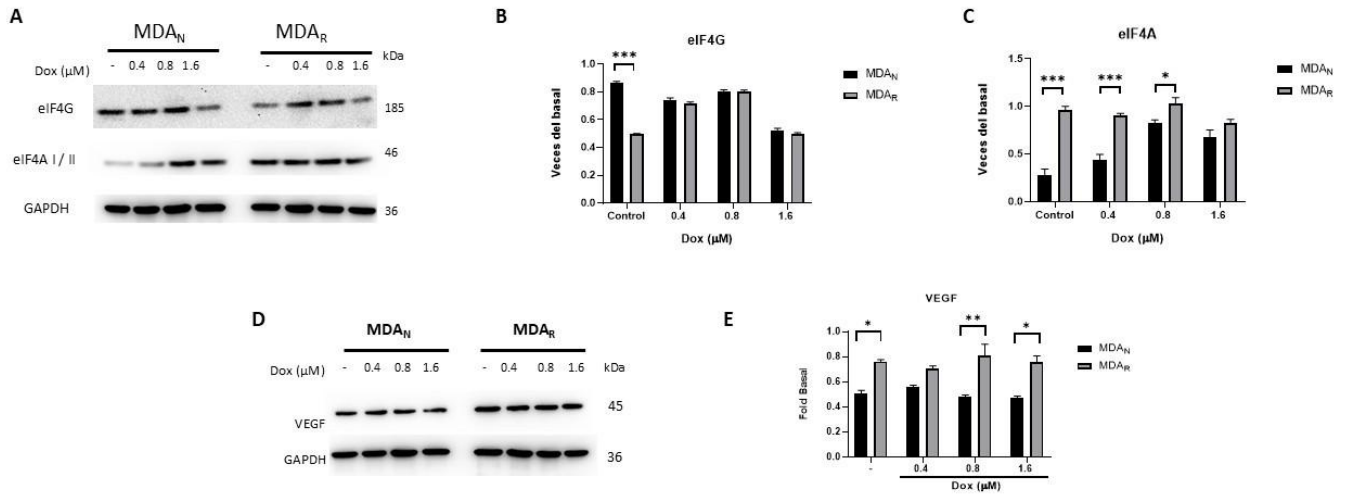


**Figura 5. En la variante MDA<sub>R</sub>, se registra una mayor expresión y actividad de eIF4E en concentraciones elevadas de doxorubicina.**

(A) Caracterización de las proteínas asociados a la actividad de eIF4E, eIF4E-pSer209 y p-4EBP1/2/3 en las variantes celulares MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub> posterior al tratamiento con concentraciones crecientes de doxorubicina (0 – 1.6  $\mu$ M). Densitometrías de eIF4E (B) y de eIF4E-p-Ser209 (C), respectivamente. (D) Detección de los niveles de fosforilación del regulador de la actividad eIF4E, 4E-BP1/2/3 bajo un rango de concentración de doxorubicina (0 – 1.6  $\mu$ M); se muestra la densitometría utilizando GAPDH como control. Los resultados se muestran en media y desviación estándar de tres replicas biológicas (n=3,  $\bar{x} \pm DS$ ). Los datos de tres replicas se analizaron estadísticamente utilizando ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Newman-Kleus. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 y \*\*\* p < 0.001.

### **8.5 Vía de señalización de eIF4E: un factor crítico en la quimiorresistencia**

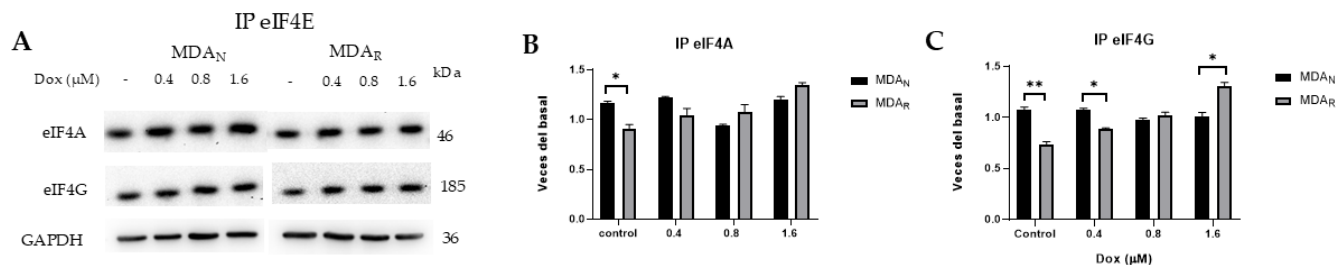
Con el propósito de profundizar en el papel de la maquinaria de iniciación de la traducción en la respuesta diferencial a la quimioterapia, se evaluó la expresión de los factores eIF4A y eIF4G en ambas variantes celulares bajo tratamiento con dosis crecientes de doxorubicina (0 – 1.6  $\mu$ M) (Figura 6A). En las células MDA<sub>R</sub>, se observó un aumento en la expresión de eIF4G a concentraciones de 0.4 y 0.8  $\mu$ M de doxorubicina, mientras que a 1.6  $\mu$ M su expresión disminuyó (Figura 6A, B). Para examinar la formación del complejo eIF4F, se realizó la inmunoprecipitación de eIF4E a partir de los lisados celulares totales, identificándose la presencia asociada de eIF4G y eIF4A (Figura 7A). De manera notable, el reclutamiento de eIF4G difirió entre ambas variantes, lo que sugiere una regulación dinámica del ensamblaje del complejo eIF4F inducida por el tratamiento con doxorubicina. Este cambio en la asociación de eIF4G podría reflejar una modulación de la eficiencia traduccional, ya sea a nivel global o de manera selectiva hacia subconjuntos de ARNm que dependen de una mayor actividad del complejo eIF4F, como aquellos con regiones 5'-UTR altamente estructuradas. En este contexto, aunque el presente análisis no permite discriminar entre un efecto generalizado o selectivo sobre la traducción, los resultados son consistentes con la idea de que la regulación del ensamblaje de eIF4F puede impactar preferentemente la expresión de genes involucrados en adaptación al estrés y resistencia terapéutica.



**Figura 6. Vía eIF4E, un factor crítico para la quimiorresistencia**

Las células MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub> fueron estimulados con concentraciones crecientes de doxorubicina (0 – 1.6 μM) posterior a 48 horas de tratamiento. (A) Western Blot de la proteína de andamiaje eIF4G y su densitometría (B) y (C) respectivamente. (D) Western blot de la expresión de VEGF en ambas variantes, se utilizó GAPDH como control de carga. (E) Densitometría de VEGF. Los resultados se muestran en media y desviación estándar de tres replicas biológicas (n=3,  $\bar{x} \pm DS$ ). Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01.

En este trabajo, se observó una asociación directa en células MDA<sub>R</sub> entre la fosforilación sostenida de eIF4E (Figura 5A, C) y la expresión de VEGF (Figura 6D, E), incluso bajo tratamiento con doxorubicina a concentraciones elevadas (1.6 μM), cercanas al valor de IC<sub>50</sub> (1.88 μM). En contraparte, las células MDA<sub>N</sub> mostraron una respuesta inversa, en la cual la expresión de VEGF se redujo de forma concomitante con una disminución en la fosforilación de eIF4E, particularmente a la dosis más alta de doxorubicina. Si bien estos resultados son consistentes con un control translacional dependiente de eIF4E, no puede descartarse que la regulación de VEGF involucre mecanismos postranscripcionales adicionales, tales como la estabilización del ARNm o la participación de proteínas de unión a ARN y microARNs sensibles al estrés celular. Este fenómeno podría contribuir a una respuesta diferencial en procesos que sostienen rutas oncogénicas, tales como la invasión celular, y ayudar a explicar los mecanismos subyacentes a la quimiorresistencia observada en la variante MDA<sub>R</sub>. Por tanto, la expresión sostenida de VEGF observada en la variante MDA<sub>R</sub> probablemente refleje la convergencia de múltiples niveles de regulación postranscripcional, reforzando el carácter adaptativo de este fenotipo frente al tratamiento con doxorubicina.



**Figura 7. Dinámica del complejo eIF4F en MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub> inducida por el tratamiento con doxorubicina.**

(A) Ensayo IP para evaluar la interacción eIF4E-eIF4G y eIF4E-eIF4G con concentraciones crecientes de doxorubicina durante 48 horas, en ambas variantes celulares MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub>. (B) Análisis densitométrico de eIF4A y eIF4G (C). Los resultados muestran la media y la desviación estándar de tres replicas biológicas (n=3,  $\bar{x} \pm DS$ ). Para la evaluación de este proceso, se utilizó DMEM suplementado con SFB al 10% como control positivo. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 y \*\*\* p < 0.001.

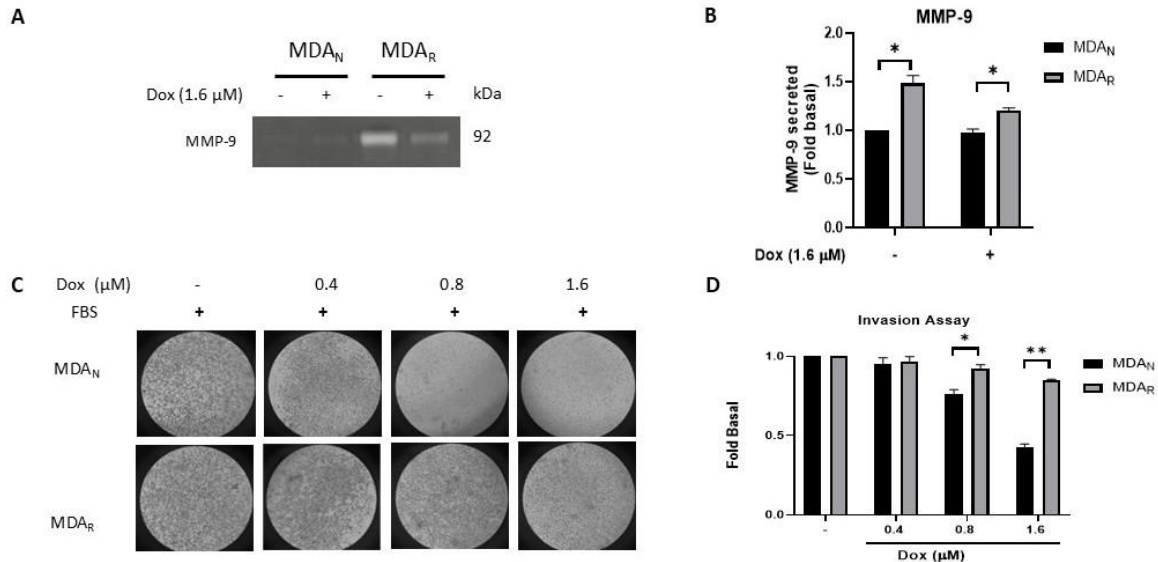
### 8.6 Actividad de MMP-9 e invasión celular en el contexto de la resistencia a doxorubicina

La secreción de metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9) se encuentra estrechamente asociada con una mayor capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales. Para evaluar este fenómeno, se analizó la actividad de MMP-9 en el medio extracelular de ambas variantes celulares, posterior al tratamiento con una concentración elevada de doxorubicina (1.6  $\mu\text{M}$ ). Los resultados muestran una actividad significativamente aumentada de MMP-9 en las células MDA<sub>R</sub>, mientras que en las células MDA<sub>N</sub>, dicha actividad se redujo bajo las mismas condiciones de tratamiento (Figura 8A, B).

Esta respuesta diferencial concuerda con la regulación del factor de traducción eIF4E, previamente caracterizada, y resulta coherente con las variaciones observadas en el comportamiento invasivo de ambas variantes. Específicamente, el aumento progresivo de las concentraciones de doxorubicina (0 – 1.6  $\mu\text{M}$ ) provocó una disminución significativa en la capacidad invasiva de las células MDA<sub>N</sub>, mientras que las células MDA<sub>R</sub> conservaron esta capacidad invasiva a pesar de la exposición a la doxorubicina (Figura 8C, D).

Además, se detectó actividad invasiva en las células MDA<sub>R</sub> incluso a las concentraciones más altas de doxorubicina, en correlación con la persistencia de

la actividad de MMP-9. Estos hallazgos ponen de manifiesto una diferencia fenotípica en la variante quimiorresistente, respaldando la hipótesis de que las propiedades invasivas pueden mantenerse activas incluso bajo condiciones de estrés quimioterapéutico intenso.



**Figura 8. Actividad de MMP-9 e invasión celular por efecto de la doxorubicina.**

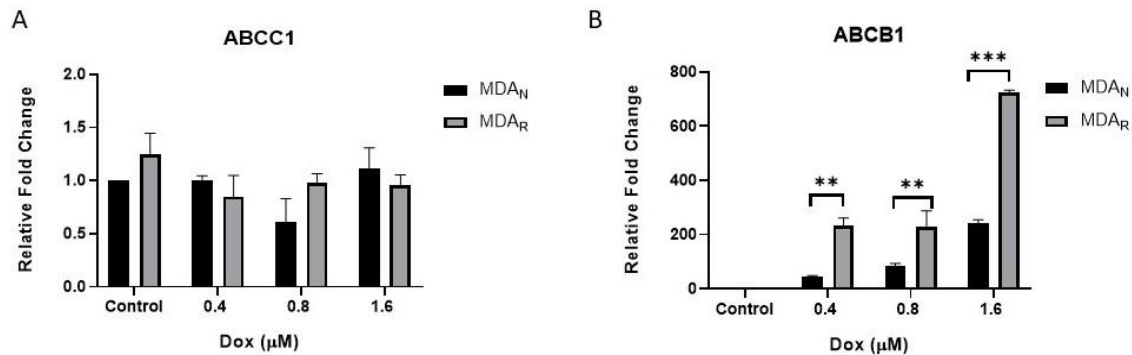
(A) Actividad de la metaloproteasa – 9 evaluada mediante zimografía y su densitometría correspondiente (B). Los resultados se muestran como media  $\pm$  desviación estándar de tres muestras biológicas ( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm DS$ ). Para evaluar este proceso, se utilizó como control la variante MDA<sub>N</sub>. (C) Imágenes representativas de los experimentos de invasión celular MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub> bajo tratamiento con concentraciones crecientes de doxorubicina (0 – 1.6  $\mu\text{M}$ ) y con medio DMEM suplementado con SFB al 10%. (D) Densitometría de los ensayos de invasión en las variantes MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub>. Para evaluar este proceso, se utilizó DMEM más SFB 10% como control positivo. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

### 8.7 Papel de los transportadores ABC en la quimiorresistencia a doxorubicina

Con el propósito de evaluar la implicación de los transportadores de la superfamilia ABC como determinantes de la quimiorresistencia, se seleccionaron transportadores representativos de esta familia para su caracterización mediante qPCR. En una primera estrategia, se establecieron las condiciones experimentales para analizar la expresión de ABCC1 y ABCB1 en ambas variantes celulares. Bajo condiciones basales, se observó una expresión ligeramente superior de ABCC1 en la variante resistente (MDA<sub>R</sub>) comparada con las MDA<sub>N</sub> (Figura 9A, B). Sin embargo,

tras el tratamiento con doxorubicina (0 – 1.6  $\mu\text{M}$ ), se evidenció una modulación de ABCC1 que sugiere una posible regulación negativa en MDA<sub>R</sub>. No obstante, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas variantes celulares a ninguna de las concentraciones evaluadas. Esta falta de respuesta diferencial podría deberse a la existencia de mecanismos compensatorios que permiten mantener la viabilidad celular en condiciones de estrés farmacológico en las células MDA<sub>R</sub>.

En contraste, bajo las mismas condiciones experimentales, se observó una sobreexpresión de ABCB1 dependiente de la concentración de doxorubicina en ambas variantes celulares (Figura 9B). Este efecto fue particularmente evidente en la variante MDA<sub>R</sub>, donde ABCB1 mostró un incremento significativo a partir de 0.4  $\mu\text{M}$  de doxorubicina, alcanzando niveles elevados a 1.6  $\mu\text{M}$ . En las células MDA<sub>N</sub>, la expresión de ABCB1 también aumentó de manera dosis-dependiente, aunque con una magnitud considerablemente menor. Esta respuesta contrasta con la observada para ABCC1, cuya expresión se mantuvo estable tras el tratamiento. Aunque los mecanismos moleculares subyacentes no fueron evaluados directamente en este estudio, no se puede descartar que la inducción de ABCB1 esté mediada, al menos en parte, por la activación de vías de señalización asociadas a la supervivencia celular, como PI3K/AKT, las cuales han sido previamente implicadas en la regulación de transportadores ABC en contextos de estrés quimioterapéutico y resistencia farmacológica (Katayama et al., 2014; Xia et al., 2020; Wang et al., 2021). En conjunto, estos resultados sugieren que ABCB1 podría representar un transportador predominante en la respuesta adaptativa a la doxorubicina, en concordancia con lo descrito en otros tipos de cáncer.



**Figura 9. La quimiorresistencia a la doxorubicina está asociada con el transportador ABCB1.** (A) Niveles de expresión de ABCB1 en las variantes MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub> bajo tratamiento con un rango de concentraciones de doxorubicina (0 – 1.6 μM) mediante determinación por qPCR. (B) En las mismas condiciones se caracterizaron los niveles de ABCB1. En ambos casos, se utilizó GAPDH como gen de referencia. Los resultados se muestran como media y la desviación estándar de tres replicas biológicas (n=3,  $\bar{x} \pm DS$ ).

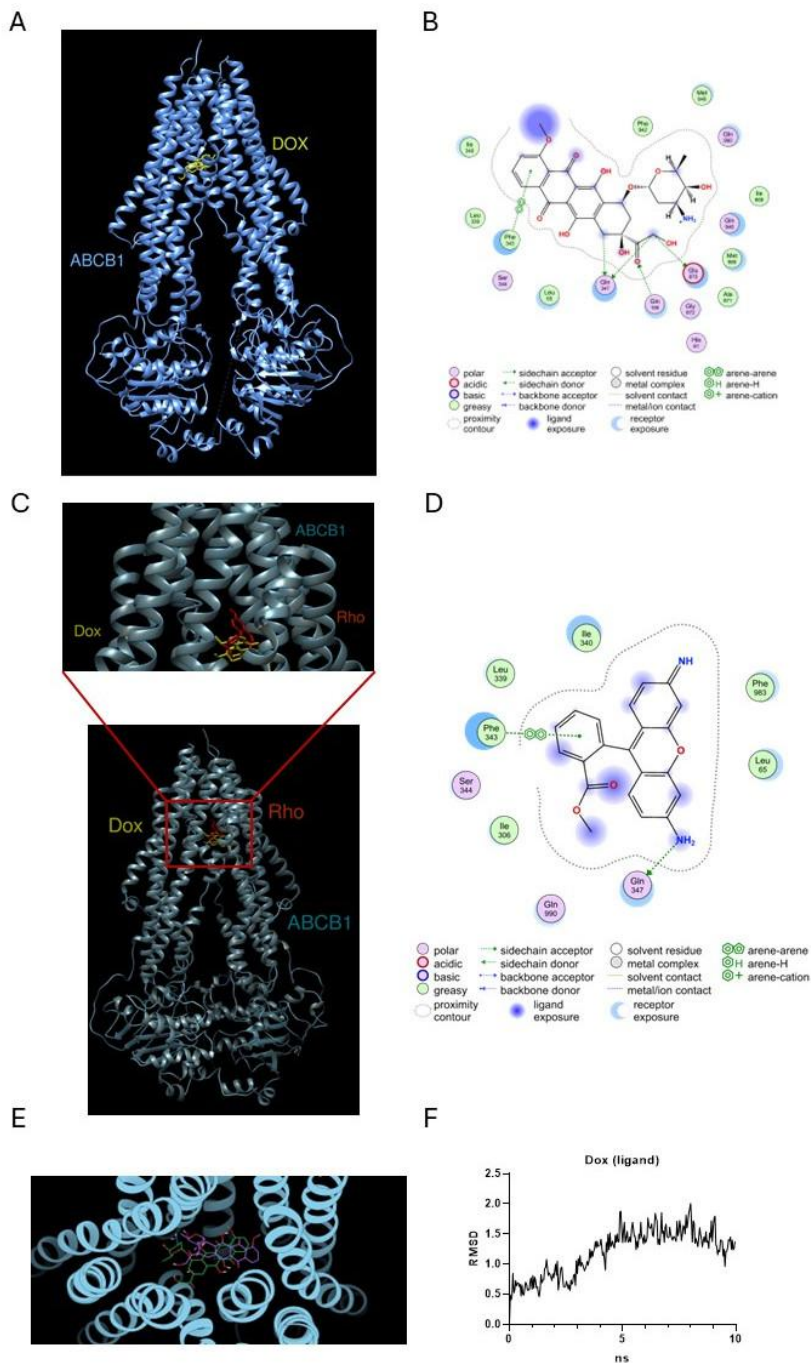
En este contexto, las simulaciones de acoplamiento molecular (docking) aportaron evidencia adicional del papel funcional de ABCB1 en el transporte de doxorubicina (Figura 10A, B). Se observó que la doxorubicina se acopla dentro de los dominios transmembrana 1 y 2 (TMD 1/2) de ABCB1, interactuando específicamente con residuos críticos como Phe343, Gln347, Glu875 y Gln946, reconocidos por su participación en el reconocimiento y estabilización del sustrato. El valor de S-score (-8.977) sugiere una conformación de unión estable y energéticamente favorable. Las interacciones principales incluyeron múltiples puentes de hidrogeno, particularmente con Gln195, Gln347 y Glu875, así como contactos hidrofóbicos con residuos aromáticos (Phe343), posicionando el anillo antraciclínico de la doxorubicina en el centro del sitio de unión del transportador ABCB1.

Para validar los resultados de las simulaciones de acoplamiento molecular doxorubicina-ABCB1, se utilizó como control positivo a la rodamina 123, un sustrato ampliamente caracterizado de este transportador. Las simulaciones por “docking” revelaron que la rodamina se acopla dentro de la cavidad de unión al sustrato, localizada entre los dominios transmembrana de ABCB1, interactuando con varios residuos críticos, como Ile340, Gln 990, Gln347, Leu65 y Phe983 (Figura 10B).

De forma notable, varios de estos residuos, en particular Glu875, Gln990 y Phe343, también participan en la unión de doxorubicina, lo que indica una superposición parcial entre los sitios de unión de ambos compuestos. Sin embargo, la doxorubicina establece interacciones adicionales con un conjunto más amplio de residuos, incluyendo Gln946, Met986 y Gln195, los cuales podrían contribuir a su mayor afinidad de unión y mayor estabilidad conformacional.

La coincidencia parcial de los sitios de unión, junto con las diferencias en los perfiles de interacción, sugiere que tanto la doxorubicina como la rodamina 123 comparten un dominio común de reconocimiento dentro de ABCB1, aunque establecen contactos específicos distintos con residuos clave del transportador. Estas diferencias en el modo de unión podrían influir en el posicionamiento del sustrato dentro del sitio de unión para el transporte y, potencialmente, en la eficiencia del proceso de translocación y expulsión del fármaco, sin que ello implique necesariamente mecanismos idénticos de eflujo. En este sentido, se ha propuesto que variaciones sutiles en las interacciones ligando-ABCB1 pueden modular la cinética de transporte y la afinidad relativa de distintos sustratos. En conjunto, estos hallazgos refuerzan el papel funcional de ABCB1 en el eflujo de doxorubicina (Figura 9B) y respaldan el uso del enfoque computacional como una herramienta válida para explorar diferencias funcionales en la interacción fármaco-transportador, las cuales deberán ser confirmadas mediante ensayos experimentales de eflujo. De manera complementaria, se llevaron a cabo simulaciones de acoplamiento molecular utilizando el software AutoDock Vina, con el propósito de evaluar de forma comparativa las afinidades de unión y los perfiles de interacción de ambos ligandos con el transportador ABCB1 (Figura 10C). Los resultados revelaron afinidades de unión de  $-8.977$  kcal/mol para doxorubicina y  $-7.568$  kcal/mol para rodamina 123, valores consistentes con las tendencias observadas previamente con MOE. La diferencia aproximada de  $1.4$  kcal/mol sugiere una afinidad relativa mayor de la doxorubicina por el sitio de unión evaluado, lo que, desde un punto de vista termodinámico, podría traducirse en una interacción más estable; sin embargo, esta variación se encuentra dentro de un rango moderado y no necesariamente implica diferencias proporcionales en la

eficiencia de transporte o expulsión del sustrato. De igual manera, se evaluó la estabilidad dinámica del complejo doxorubicina – ABCB1 mediante una simulación de dinámica molecular de 10 nanosegundos. El análisis de la desviación cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés) del ligando con respecto a su posición inicial (Figura 10E, F) mostro un incremento progresivo durante los primeros 5 ns, hasta alcanzar una meseta cercana a 1.5 Å, la cual se mantuvo estable a lo largo del resto de la dinámica. La ausencia de fluctuaciones o desviaciones significativas indica que la doxorubicina conservó una conformación estable en el dominio transmembrana dentro de sitio de unión de ABCB1. Una captura estructural del complejo, donde se comparan la conformación inicial (verde) y la final (púrpura) de la doxorubicina, confirma su permanencia embebida de manera consistente con la proteína. Así mismo, el sitio de unión delimitada por múltiples  $\alpha$ -hélices, conservo su integridad estructural y mantuvo al ligando fijo en el sitio unión, lo que respalda la hipótesis de que la doxorubicina no solo se acopla eficientemente, sino que además se retiene en una conformación estable compatible con el proceso de traslocación. Sin embargo, resulta necesario enfatizar que simulaciones adicionales, de mayor duración y que integren el ciclo completo del transporte, serán esenciales para dilucidar con mayor precisión la dinámica funcional de ABCB1 en condiciones fisiológicas.

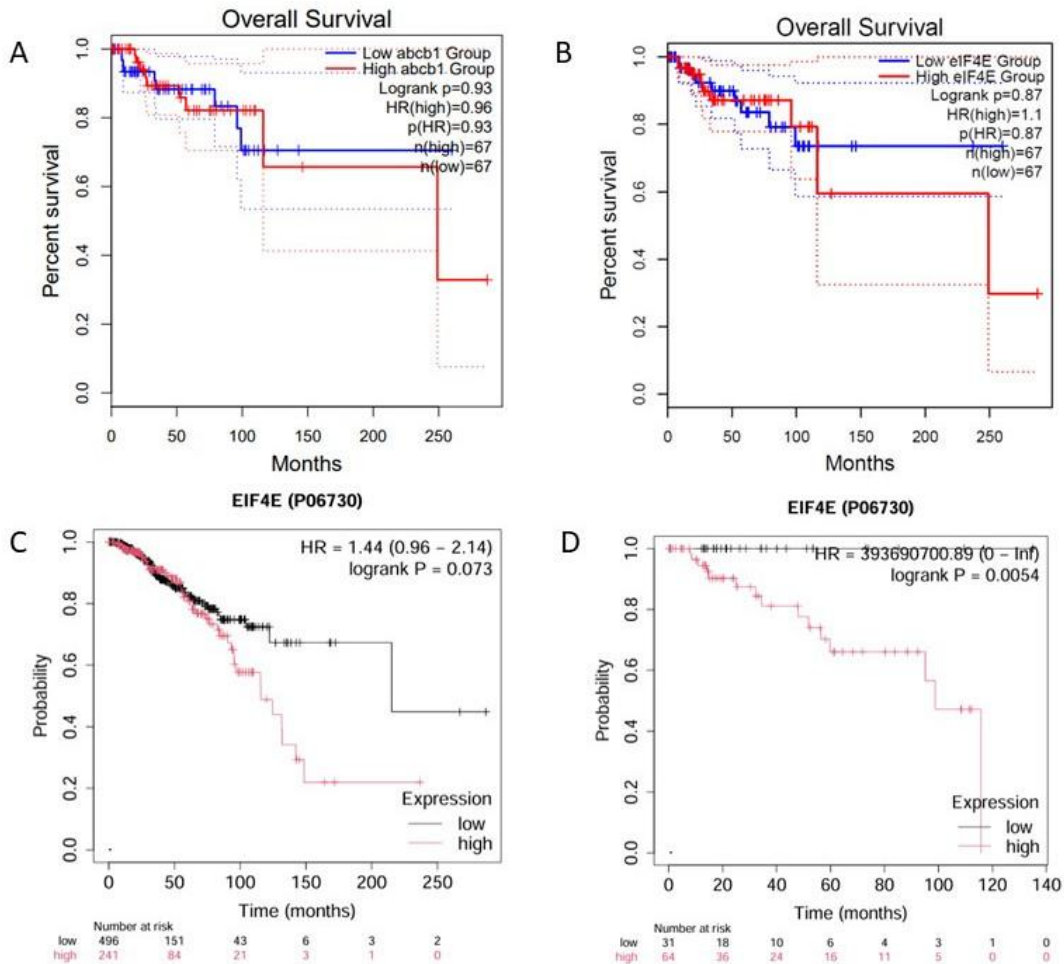


**Figura 10. Ensayos de acoplamiento molecular de ABCB1 con doxorubicina y rodamina 123.**

Acoplamiento molecular de ABCB1 (PDB: 7A69) bajo interacción con doxorubicina, se muestra un incremento en la región de interacción (A) y la predicción de los residuos determinantes de ABCB1 de la interacción con doxorubicina obtenida mediante el programa MOE (B). (C) Superposición del ligando (doxorubicina) en su conformación inicial (verde) y final (morado) dentro del bolsillo de unión transmembrana tras una simulación de dinámica molecular de 10 ns. (D) RMSD del ligando durante el tiempo de simulación (10 ns), calculado con respecto a la postura del acoplamiento inicial. (E) Superposición en DockVina del sitio de interacción de doxorubicina (amarillo) y rodamina 123 (rojo) en ABCB1. (F) Interacción del ligando de rodamina en ABCB1.

Complementando la caracterización del transportador, se realizó un análisis in silico de bases de datos de pronóstico en cáncer de mama (TCGA y GTEx) empleando la plataforma de GEPIA. Los resultados mostraron que altos niveles de expresión de ABCB1 se asocia con una reducción significativa en la supervivencia global de las pacientes con cáncer de mama (Figura 11 A, B). Lo que respalda su participación en los mecanismos de resistencia a doxorubicina. De manera paralela, el análisis en GEPIA reveló una correlación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de eIF4E y un peor pronóstico en términos de supervivencia global.

Estos hallazgos fueron validados de forma independiente mediante la base de datos KM-Plot, donde se observó que una alta expresión de eIF4E se correlaciona con menor supervivencia en pacientes tratados con doxorubicina en todos los subtipos de cáncer de mamá, siendo este efecto particularmente más pronunciado en el subtipo TNBC (Figura 11C, D). En conjunto, estos resultados clínico-computacionales refuerzan el papel dual de ABCB1 y eIF4E como biomarcadores de mal pronóstico y como un punto crítico en la adquisición de quimiorresistencia, lo que resalta su relevancia en el diseño de estrategias terapéuticas dirigidas.



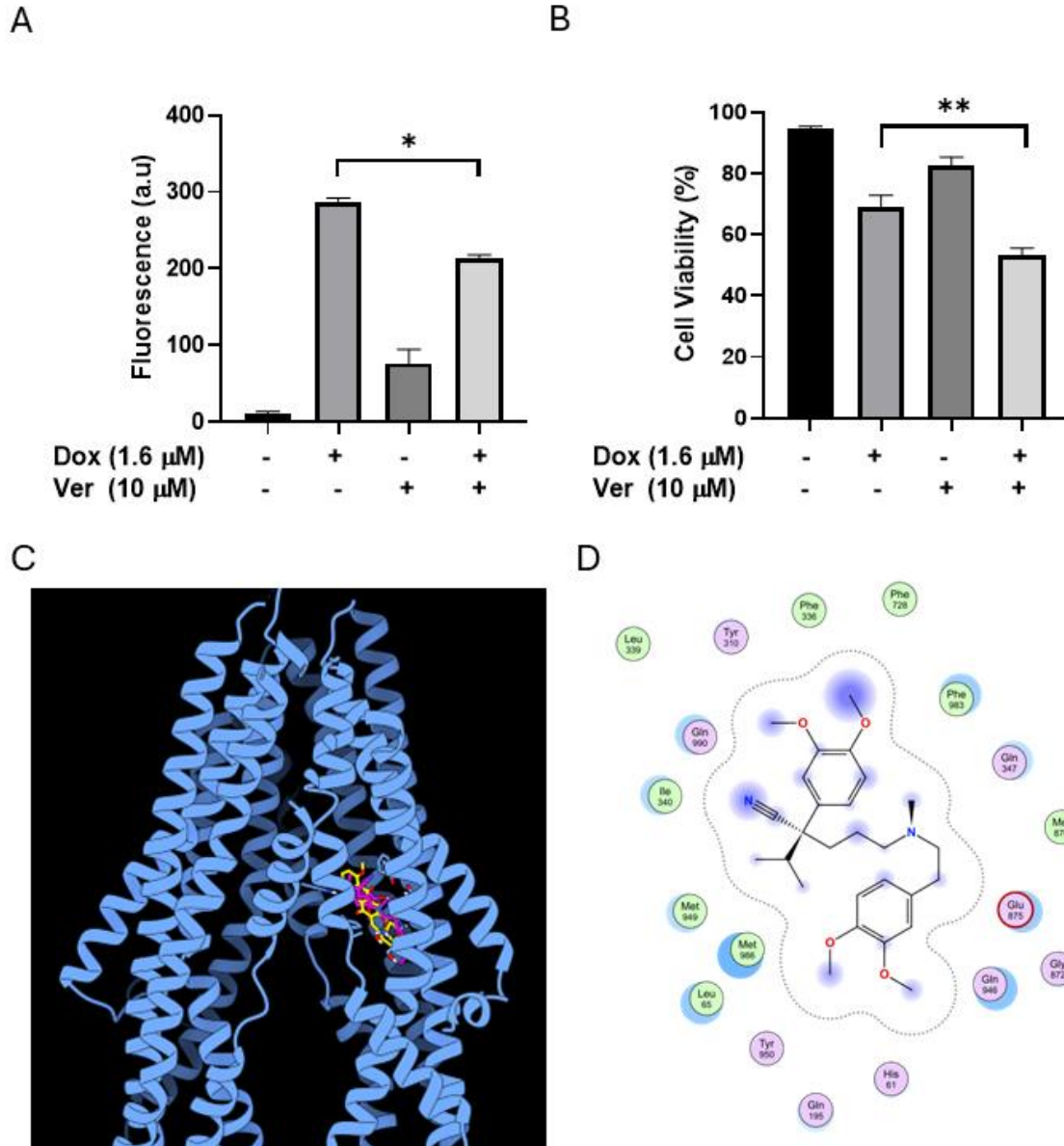
**Figura 11. Expresión de eIF4E y ABCB1 en cáncer de mama en bases de datos.**

(A) Grafico de supervivencia global para la expresión baja y alta del gen ABCB1 en pacientes con cáncer de mama de GEPIA. (B) El grafico de supervivencia global para la expresión baja y alta de eIF4E en pacientes con cáncer de mama se obtuvo de la base de datos GEPIA (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>). (C) Curva de Kaplan-Meier utilizando la base de datos TCGA-RPPA para eIF4E en todos los casos de TNBC notificados y repercusión en la mortalidad de eIF4E en casos de TNBC bajo tratamiento con doxorrubicina (<https://kmplot.com/analysis/>) (D).

Para explorar el papel funcional de ABCB1 en la quimiorresistencia del cáncer de mama, se empleó verapamilo, un inhibidor clásico de este transportador, tanto en ensayos funcionales como en análisis *in silico*. Considerando la elevada expresión de ABCB1 en la variante MDA<sub>R</sub>, las células resistentes fueron expuestas inicialmente a 1.6  $\mu$ M de doxorrubicina durante 12 h para inducir la sobreexpresión y, posteriormente, tratadas con verapamilo a 10  $\mu$ M, una concentración previamente reportada como inhibitoria. La cuantificación de los niveles extracelulares de doxorrubicina mostró una reducción significativa posterior al uso del inhibidor,

indicando que el verapamilo bloquea de manera efectiva el eflujo mediado por ABCB1. Además, la combinación doxorubicina-verapamilo produjo un incremento en la citotoxicidad bajo las mismas condiciones experimentales (Figura 12A, B), respaldando la hipótesis de que la inhibición del transportador ABCB1 potencia la sensibilidad de las células resistentes al interferir directamente con su función de transporte.

Para profundizar en las bases moleculares de esta inhibición, se realizaron estudios de “docking” empleando la estructura cristalográfica de ABCB1 (PDB: 7A69) con doxorubicina y verapamilo (Figura 12C, D). Ambos ligandos se localizaron dentro de los dominios transmembrana (TMD1/2) de ABCB1, estableciendo interacciones con residuos críticos como Gln347, Glu875 y Gln946, lo que permitió posicionar el anillo antraciclínico de la doxorubicina en el espacio central del sitio de unión al sustrato. La representación estructural de las conformaciones de unión evidenció que doxorubicina (amarillo) y verapamilo (magenta) ocupan posiciones espaciales casi idénticas dentro del sitio de unión de ABCB1 (azul), lo cual resulta consistente con el perfil de interacciones superpuestas descrito y respalda el posible mecanismo competitivo del verapamilo sobre el transportador.



**Figura 12. La inhibición de ABCB1 con verapamilo promueve citotoxicidad significativa en las células MDA<sub>R</sub>.**

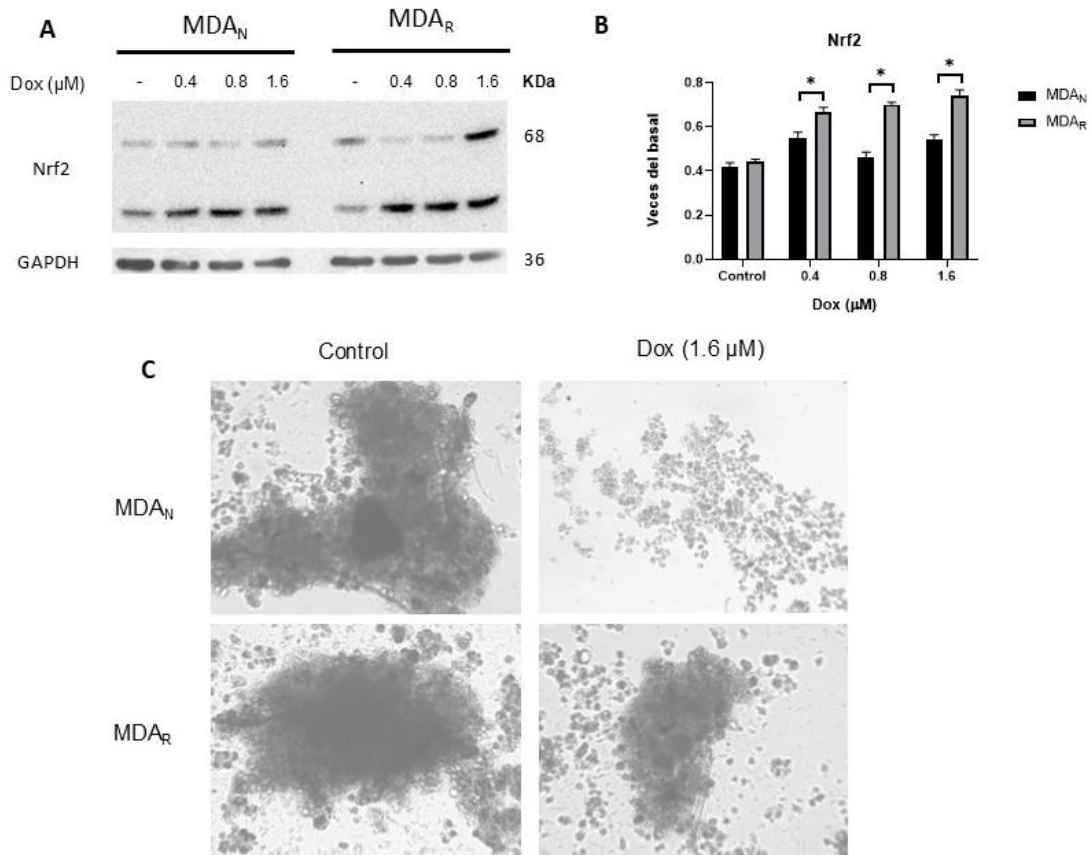
(A) Evaluación de la excreción de doxorubicina (1.6  $\mu$ M) posterior a 24 horas de tratamiento y tratamiento concomitante con el inhibidor (verapamilo, 10  $\mu$ M) de ABCB1. (B) Ensayo de viabilidad de MTT en las mismas condiciones. Ensayo de acoplamiento molecular de ABCB1 (PDB: 7A69) bajo la interacción de doxorubicina y verapamilo (C), se muestra un acercamiento a la región de interacción de los ligandos doxorubicina (amarillo) y verapamilo (magenta) (D), y la predicción de los residuos de ABCB1 determinantes de la interacción del verapamilo obtenida por el programa MOE. Los resultados se muestran como media y la desviación estándar de tres replicas biológicas ( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm DS$ ). Los datos se analizaron estadísticamente utilizando ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Estos hallazgos refuerzan la importancia de eIF4E no solo como un modulador de la quimiorresistencia, sino también como un posible facilitador de rasgos asociados

a la progresión tumoral, incluyendo el aumento de la capacidad invasiva. En este sentido, la sobreexpresión de eIF4E podría contribuir de manera indirecta a la resistencia a fármacos mediante la regulación preferencial de la traducción de transcritos involucrados en respuestas al estrés celular y en mecanismos de adaptación tumoral. Aunque la evidencia directa aún es limitada, se ha propuesto que eIF4E puede influir en la expresión y funcionalidad de transportadores ABC a través de la activación de programas de señalización asociados a la supervivencia celular y al control redox, incluyendo vías dependientes de Nrf2. Estas interacciones podrían afectar procesos postraduccionales como la estabilidad proteica o la actividad funcional de dichos transportadores, con consecuencias en el eflujo de fármacos y, por ende, en la respuesta terapéutica (Wang et al., 2021).

### **8.8 Caracterización de Nrf2 como factor regulador clave en la quimiorresistencia**

Evaluamos la expresión de Nrf2 para determinar su posible asociación con la regulación de ABCB1 en ambas variantes celulares bajo tratamientos con dosis crecientes de doxorrubicina (0–1.6  $\mu\text{M}$ ) (Figura 13A, B). En las células MDA<sub>R</sub>, Nrf2 mostró un incremento significativo de expresión a concentraciones elevadas de doxorrubicina (1.6  $\mu\text{M}$ ), lo que podría interpretarse, en primera instancia, como parte de una respuesta general al estrés oxidativo inducido por el tratamiento. Sin embargo, este aumento coincidió con una mayor expresión de eIF4E bajo las mismas condiciones, así como con el mantenimiento parcial del potencial proliferativo de la variante resistente, reflejado en la formación de esferoides, mientras que en la línea MDA<sub>N</sub> esta capacidad fue abolida (Figura 13C). Esta asociación sugiere que, en el contexto de resistencia, la activación de Nrf2 podría no ser únicamente una respuesta inespecífica al estrés, sino estar modulada, al menos en parte, por mecanismos dependientes del control traduccional mediado por el complejo eIF4E/eIF4F, como ha sido propuesto en otros modelos de adaptación tumoral (Sonenberg & Hinnebusch, 2009; Graff et al., 2021).



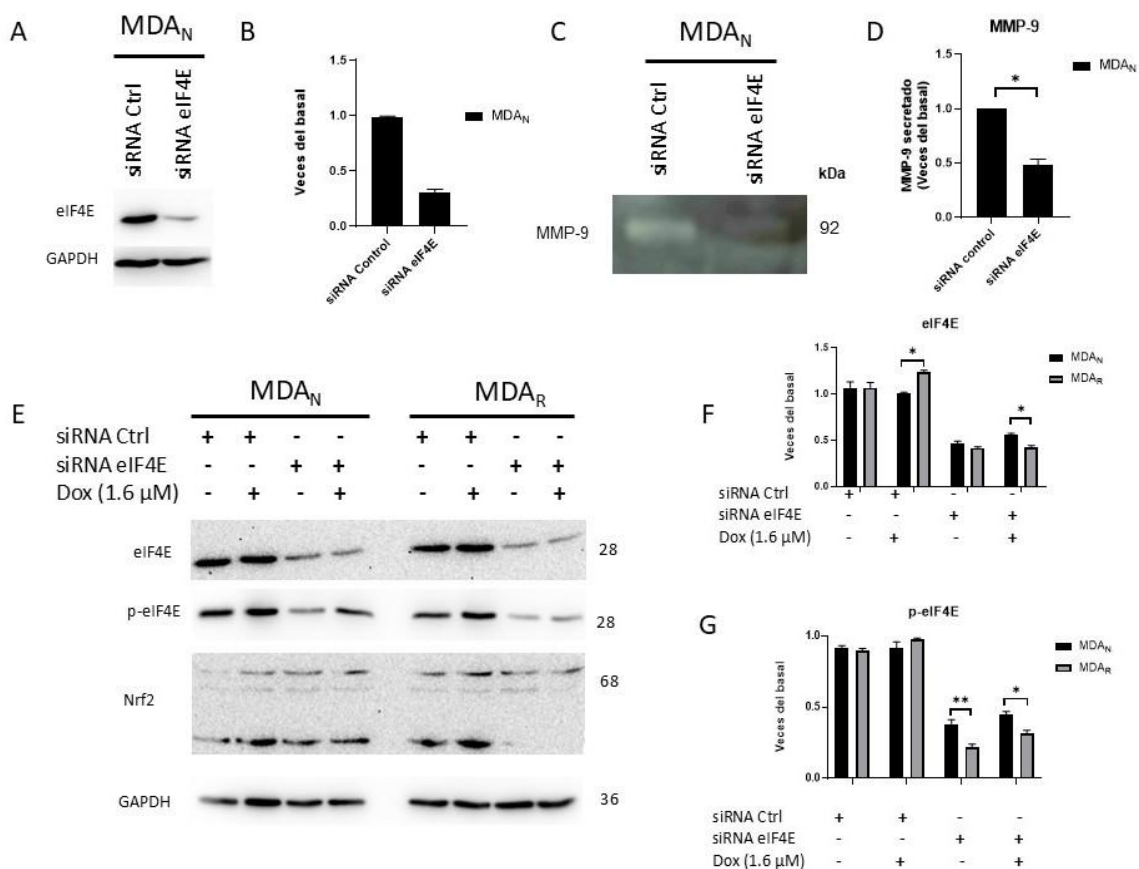
**Figura 13. Nrf2 está asociado con la expresión de eIF4E.**

(A) Western Blot evaluó los niveles de expresión de la proteína Nrf2 en variantes MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub> bajo concentraciones crecientes de doxorubicina (0 – 1.6 μM) y la densitometría correspondiente de Nrf2 (B). Los resultados muestran la media y desviación estándar de tres replicas biológicas (n=3,  $\bar{x} \pm DS$ ). Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01. (C) Ensayo de formación de esferoides. Tratamientos con doxorubicina en MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub>. 48 horas para la formación de esferoides (control) y 192 horas con tratamientos con doxorubicina (1.6 μM).

Asimismo, la disminución marcada en la actividad de MMP-9 (Figura 14C) observada tras el silenciamiento de eIF4E podría explicarse tanto como una consecuencia indirecta del bloqueo de la traducción cap-dependiente de efectores proinvasivos, como por una posible atenuación de programas regulados por Nrf2, sin que pueda establecerse en este estudio un mecanismo transcripcional directo (DeNicola et al., 2011). En este sentido, la represión concomitante de eIF4E, de su forma fosforilada (Ser209) y de Nrf2 tras la combinación de siRNA contra eIF4E y doxorubicina (Figura 14E, F, G) respalda la existencia de un eje funcional eIF4E/Nrf2 en la respuesta a la quimioterapia en TNBC, el cual podría actuar como

un nodo integrador entre mecanismos antioxidantes y resistencia farmacológica mediada por ABCB1.

Este planteamiento adquiere mayor relevancia al considerarse junto con estudios previos en cáncer de mama ER+, donde Nrf2 ha sido identificado como mediador de resistencia a terapias endocrinas como el tamoxifeno (Muñoz-Ayala et al., 2024), lo que sugiere que, aunque los contextos moleculares difieren entre subtipos, la activación de Nrf2 podría representar un mecanismo adaptativo compartido en la respuesta terapéutica del cáncer de mama.



**Figura 14. Efecto de siRNA eIF4E en el modelo de resistencia a doxorubicina en ambas variantes celulares.**

(A) Western Blot de la expresión de eIF4E de control utilizando siRNA en células MDA<sub>N</sub> con la densitometría correspondiente (B). (C) La actividad de MMP-9 se evaluó mediante zimografía posterior al tratamiento con siRNA de eIF4E y análisis densitométrico (D). (E) Western blot de la expresión de eIF4E, p-eIF4E y Nrf2 posterior al tratamiento de siRNA eIF4E, en tratamiento concomitante con doxorubicina (1.6 μM). Análisis densitométrico de eIF4E (F) y p-eIF4E (G). Los resultados muestran la media y desviación estándar de tres replicas biológicas (n=3,  $\bar{x} \pm DS$ ). Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 en relación con el control de carga (GAPDH).

Con el objetivo de explorar las posibles interacciones funcionales asociadas a la regulación de eIF4E y su papel en la respuesta a la quimioterapia, se realizó un análisis de redes de interacción proteica utilizando la plataforma STRING. Este análisis permitió identificar asociaciones de alta confianza entre componentes clave de la maquinaria de iniciación de la traducción y proteínas reguladoras involucradas en señalización celular (Figura 15).

El análisis de redes de interacción proteica realizado mediante STRING (<https://string-db.org/>) reveló asociaciones de alta confianza entre las cinasas reguladoras MNK1/2 y la proteína de andamiaje eIF4G1, componente esencial del complejo eIF4F y requerido para la fosforilación de eIF4E en Ser209 (Figura 16). Asimismo, dentro de la red generada se identificó a Nrf2 como un nodo funcionalmente relacionado, cuya traducción ha sido previamente asociada a la actividad de eIF4E. De manera concordante, el análisis mostró que Nrf2 presenta conexiones directas con ABCB1, un transportador clave implicado en el eflujo de doxorubicina (Xia, X., et al., 2020).

En conjunto, estos resultados del análisis de interacción proteica evidencian la existencia de una red funcional que vincula la señalización MNK–eIF4E con la regulación de Nrf2 y la expresión de ABCB1, en concordancia con los datos experimentales observados en la variante celular resistente.

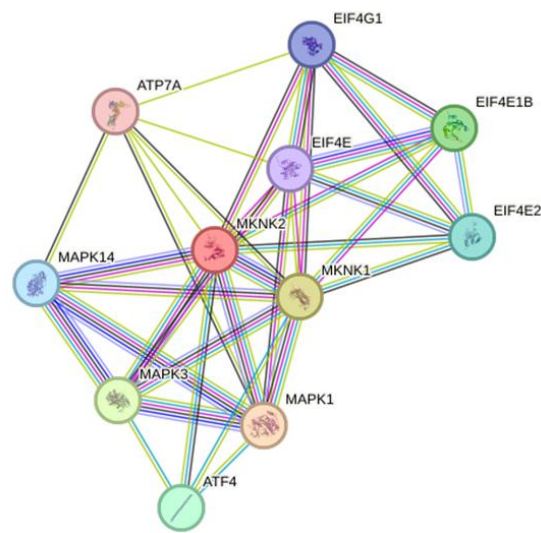
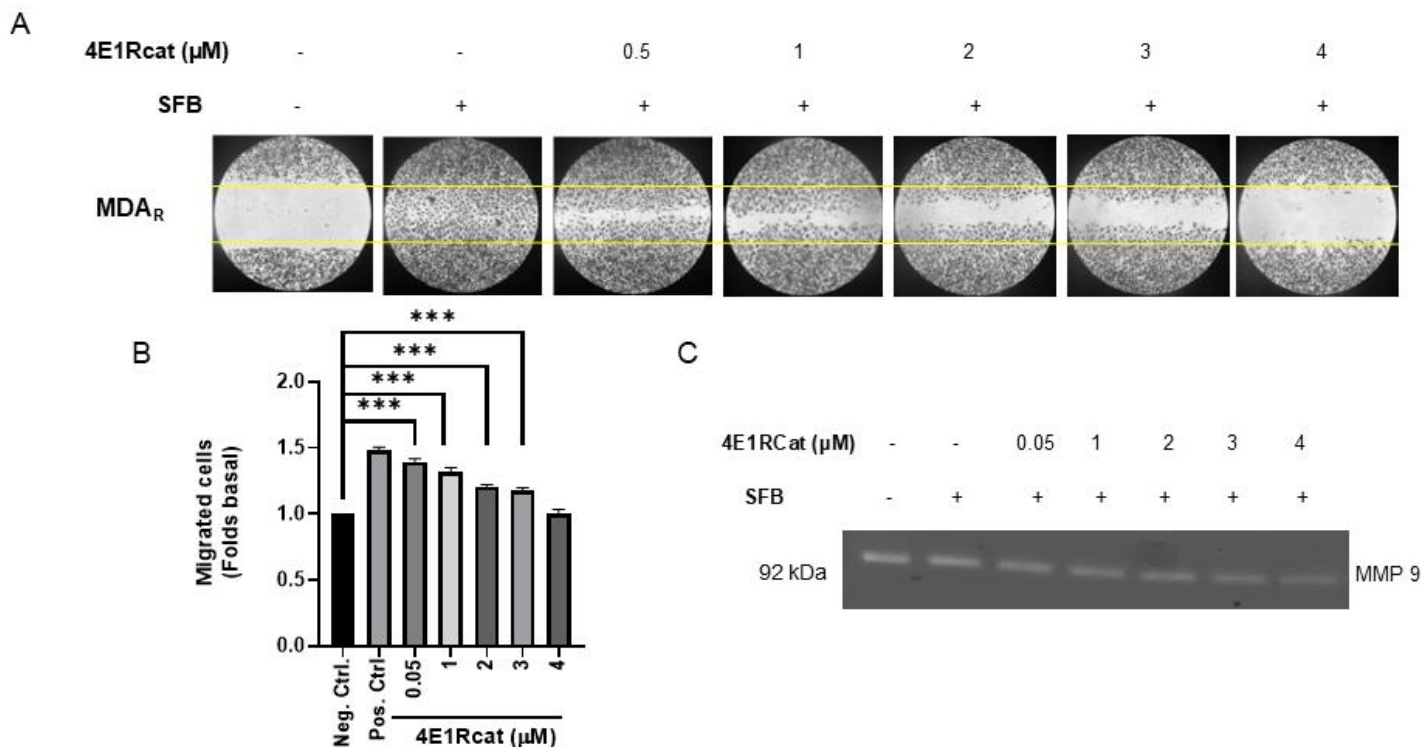


Figura 15. Representación de la red funcional de asociación de proteínas MNK1 y MNK 2 con eIF4E.

### **8.9 Regulación de eIF4E mediada por la molécula de inhibición de 4E1Rcat**

Como estrategia para evaluar la regulación de eIF4E, se analizó el efecto del inhibidor 4E1Rcat en variantes celulares TNBC, considerando procesos críticos como la migración y secreción de MMP-9 en células MDA<sub>R</sub>. A partir de un rango de concentraciones crecientes (0.5 – 4  $\mu$ M), se determinó que 3  $\mu$ M constituye la dosis óptima para la inhibición de eIF4E (Figura 16A, B). Con este dato, se exploró la relación entre la expresión de ABCB1 y la actividad de eIF4E en el contexto del tratamiento con doxorubicina a 1.6  $\mu$ M. Como se esperaba, la exposición a doxorubicina indujo un aumento de ABCB1 en ambas variantes, siendo más evidente este efecto en la variante resistente (Figura 17A). No obstante, el tratamiento combinado con el inhibidor redujo la expresión de ABCB1 únicamente en MDA<sub>N</sub>, mientras que en MDA<sub>R</sub> se mantuvo elevada a pesar del uso del inhibidor. Este hallazgo sugiere que la regulación de ABCB1 en la variante resistente presenta menor sensibilidad al efecto inhibitorio de 4E1Rcat, posiblemente debido a una fosforilación sostenida en Ser209. De hecho, se detectaron niveles más altos de eIF4E-P<sub>Ser209</sub> en MDA<sub>R</sub> en comparación con MDA<sub>N</sub> tanto en tratamiento solo con la doxorubicina, como en combinación con 4E1Rcat (Figura 17B, C). Estos resultados indican que el estado de fosforilación de eIF4E podría desempeñar un papel relevante en el mantenimiento de la expresión de ABCB1 en células quimiorresistentes, lo que sugiere que la actividad de este factor de iniciación no depende únicamente de su abundancia total, sino también de su regulación postraducciona, particularmente de la fosforilación en Ser209. No obstante, la falta de respuesta observada al inhibidor de eIF4E en la línea MDA<sub>R</sub> sugiere que este fenotipo resistente podría no depender exclusivamente de la traducción cap-dependiente. En este sentido, no se puede descartar la activación de vías compensatorias de traducción cap-independiente, como aquellas mediadas por elementos IRES, las cuales han sido descritas como mecanismos adaptativos en condiciones de estrés terapéutico. La posible coexistencia de estos programas traslacionales alternativos podría contribuir al mantenimiento de proteínas asociadas a la resistencia farmacológica, reforzando el fenotipo quimiorresistente y proporcionando un mecanismo adicional de escape frente a la inhibición de eIF4E.



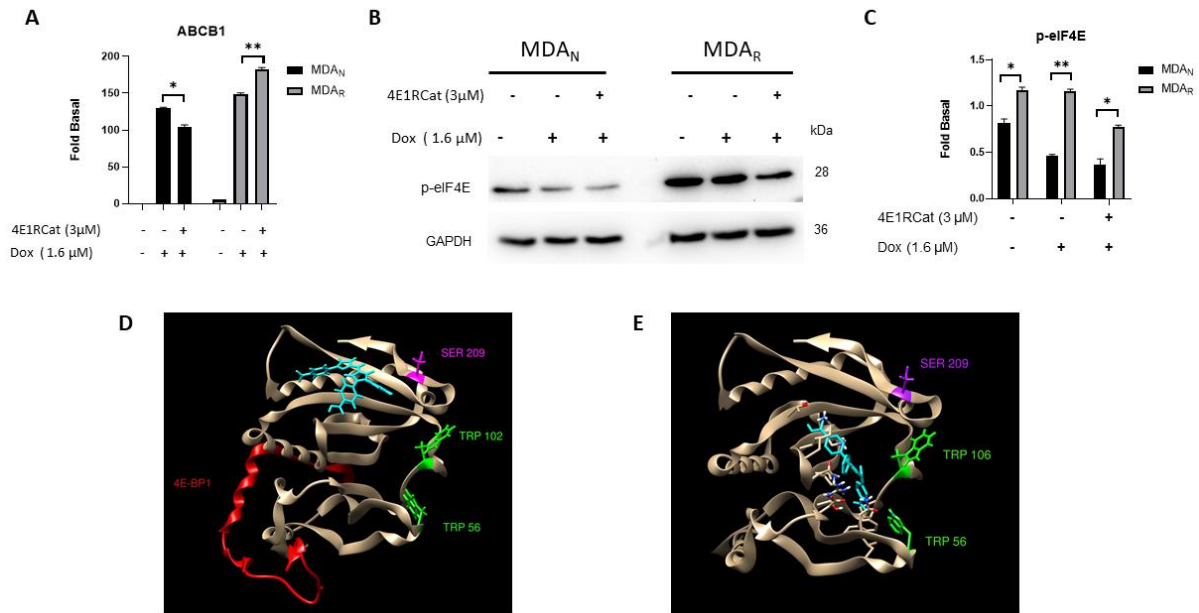
**Figura 16. Efecto del inhibidor de eIF4E (4E1RCat) en células MDAR.**

(A) Imágenes representativas de ensayos de cierre de herida bajo tratamientos con concentraciones crecientes del inhibidor 4E1RCat (0.05 – 4  $\mu\text{M}$ ) en cultivos de células MDA<sub>R</sub>. (B) Análisis densitométrico de ensayos de migración en la variante MDA<sub>R</sub>. (C) Actividad de la metaloproteasa – 9 evaluada mediante zimograma. Para la evaluación de la migración se utilizó DMEM suplementado con SFB al 10% y se utilizó como control positivo, mientras que medio DMEM sin suplementar fue utilizado como control negativo. Los resultados mostraron la media y la desviación estándar de tres replicas biológicas (n=3,  $\bar{x} \pm \text{DS}$ ). Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01.

Las simulaciones de acoplamiento molecular *in silico* revelaron que el sitio de unión de 4E1RCat en la estructura de eIF4E (PDB: 4UED) se ve modulado por la presencia del péptido 4EBP1 acoplado en la región N-terminal de eIF4E (Figura 17D). La interacción entre 4EBP1 y eIF4E se favorece bajo condiciones de baja fosforilación de 4EBP1, como se observó en las células MDA<sub>N</sub> tratadas con doxorubicina (1.6  $\mu\text{M}$ ) (Figura 5A, D). En este contexto, la inclusión de 4EBP1 en la simulación promovió el posicionamiento de 4E1RCat en proximidad al residuo Ser209, un sitio crítico asociado con la activación de eIF4E por fosforilación, mostrando además valores de energía libre de unión más favorables y una mayor convergencia estructural del complejo, reflejada en RMSD bajos entre las posiciones de interacción más favorables, lo que sugiere una interacción más

estable en este estado conformacional. En contraste, en ausencia de 4EBP1 — condición que refleja lo observado en las células MDA<sub>R</sub>, donde la fosforilación de 4EBP1/2/3 impide su interacción con eIF4E—, 4E1RCat adoptó una orientación alternativa cercana al sitio de unión al “cap”, estableciendo interacciones con residuos críticos como Trp102 y Trp56 (Figura 17E).

Estas observaciones estructurales sugieren que la accesibilidad diferencial de los dominios de eIF4E, modulada por el estado de fosforilación de 4EBP1, podría condicionar el modo de unión de 4E1RCat y, en consecuencia, influir en su eficiencia inhibitoria en distintos contextos celulares de cáncer de mama triple negativo. Desde una perspectiva funcional, este escenario plantea la posibilidad de que la plasticidad conformacional de eIF4E, regulada por señales de fosforilación dependientes del contexto, contribuya a modular tanto sus interacciones proteína-proteína como su susceptibilidad a la inhibición farmacológica. Aunque este modelo requiere validación experimental adicional, resulta consistente con reportes previos que describen cómo las modificaciones postraduccionales de eIF4E y de sus proteínas reguladoras influyen en la formación del complejo eIF4F y en la respuesta a inhibidores dirigidos a la traducción cap-dependiente (Sonenberg & Hinnebusch, 2009; Graff et al., 2021). En conjunto, estas consideraciones podrían tener implicaciones relevantes para la comprensión de la quimiorresistencia mediada por eIF4E y para el diseño racional de inhibidores que contemplen la heterogeneidad estructural y funcional de esta proteína.



**Figura 17. El eje eIF4E/ABCB1 en la quimiorresistencia, el papel de la molécula 4E1RCat.**

(A) Niveles de expresión de ABCB1 en células MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub> bajo tratamiento con doxorubicina (1.6 µM) y 4E1RCat (3 µM) durante 48 horas mediante determinación por qPCR, se utilizó GAPDH como gen de referencia. (B) Niveles de expresión de p-eIF4E evaluados por western blot bajo tratamiento concomitante con doxorubicina (1.6 µM) y 4E1RCat (3 µM), las variantes MDA<sub>N</sub> y MDA<sub>R</sub> tratadas por 48 horas. (C) Análisis densitométrico de p-eIF4E. Los resultados mostraron la media y la desviación estándar de tres replicas biológicas (n=3,  $\bar{x} \pm DS$ ) y se expresaron como % del control. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una sola vía y la prueba de comparación múltiple Newman-Keuls. \*\* p < 0.01 en relación con el control. Se utilizó GAPDH como control. (D, E) Ensayo de acoplamiento molecular de eIF4E (PDB: 4UED) bajo 4E1RCat e interacción concomitante de 4E1RCat y 4EBP-1. Cian: eIF4E, Verde: triptófano, rojo: proteína de unión (4E-BP-1).

## 8. Discusión de resultados

El cáncer de mama triple negativo (TBNC) se caracteriza por un pronóstico desfavorable y por la alta frecuencia de desarrollar resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos convencionales. Para modelar este fenómeno, se estableció una estrategia innovadora basada en la generación de una variante resistente a doxorubicina a partir de línea celular MDA-MB-231 (Figura 2). La exposición continua de la línea parental (MDA<sub>N</sub>) a una concentración subletal, correspondiente al IC<sub>25</sub>, permitió obtener una variante resistente (MDA<sub>R</sub>), cuya viabilidad mostró un incremento de 3.1 veces la IC<sub>50</sub> respecto a MDA<sub>N</sub>. Cabe destacar que el IC<sub>50</sub> de doxorubicina en MDA<sub>N</sub> (0.619  $\mu$ M) se encuentra dentro del rango clínico reportado en pacientes con cáncer de mama (0.023 – 1.14  $\mu$ M), mientras que el valor correspondiente en MDA<sub>R</sub> (1.8  $\mu$ M) se encuentra en rangos superiores, validando el establecimiento de un fenotipo resistente. Este modelo in vitro permite estudiar la resistencia adquirida frente a moléculas altamente citotóxicas y además constituye un sistema celular robusto para evaluar nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a contrarrestar este fenotipo en cáncer de mama triple negativo.

Los resultados indican diferencias en la respuesta a la doxorubicina entre ambas variantes. En la variante MDA<sub>R</sub>, la mayor viabilidad celular se acompañó de una menor acumulación intracelular y un aumento en la concertación de doxorubicina extracelular, lo que sugiere la participación de los mecanismos de eflujo (Figura 3). Este comportamiento implica procesos adaptativos que le confieren ventajas selectivas frente a altas concentraciones de doxorubicina, el cual coincide con reportes previos que relacionan la resistencia adquirida con la sobreexpresión de los transportadores de la familia ABC.

Los ensayos de migración e invasión confirmaron que el fenotipo resistente se asocia con un aumento de la agresividad tumoral (Figura 4). Específicamente, las células MDA<sub>R</sub> mostraron una capacidad migratoria aumentada frente a concentraciones subletales de doxorubicina (0.05 – 0.8  $\mu$ M), concordando con estudios que reportan la activación de la vía Src y el aumento de motilidad celular inducido por antraciclinas (Mohammed, S. et al., 2021). Además, a diferencia de las

células MDA<sub>N</sub>, que redujeron significativamente su actividad invasiva y secreción de MMP-9 frente a dosis elevadas de doxorubicina, las células MDA<sub>R</sub> mantuvieron estos rasgos (Figura 8), El mantenimiento de la capacidad de formación de esferoides bajo tratamientos de doxorubicina (Figura 13) refuerza la hipótesis de que la resistencia adquirida no solo promueve la supervivencia celular, sino que también potencia mecanismos relacionados con la plasticidad tumoral y metástasis.

A nivel molecular, el transportador ABCB1 se identificó como un mediador central en la resistencia observada. Su expresión aumentó de manera dosis dependiente en ambas variantes celulares, pero de manera significativamente mayor en MDA<sub>R</sub>, lo que respalda su papel como regulador del eflujo de doxorubicina. Los estudios *in silico* aportaron evidencia complementaria. Las simulaciones de acoplamiento molecular revelaron interacciones estables con doxorubicina en residuos críticos dentro de los dominios transmembrana de ABCB1, incluyendo Leu236, Glu243 y Lys826. Estas interacciones, mantenidas por puentes de hidrogeno y fuerzas de van der Waals, sugieren un acoplamiento de alta afinidad. Asimismo, el control experimental con rodamina 123 mostro un perfil de unión parcialmente solapado, confirmando la selectividad de doxorubicina hacia este transportador. Los valores de energía libre obtenidos con AutoDock Vina (-8.977 kcal/mol para doxorubicina y -7.568 kcal/mol para rodamina 123) confirman esta afinidad. Finalmente, las simulaciones de dinámica molecular de 10 ns corroboraron la estabilidad del complejo Dox-ABCB1 (Figura 10), evidenciando una retención sostenida del ligando en la cavidad transmembrana y reforzando la validez de los resultados estructurales.

En conjunto, estos hallazgos permiten proponer que la resistencia a doxorubicina en el modelo de la variante resistente se sustenta en dos puntos. Por un lado, el refuerzo de los mecanismos de eflujos mediados por ABCB1, y, por otro lado, la conservación de los rasgos de agresividad celular bajo la presencia de la doxorubicina. Esta integración de datos celulares, moleculares e *in silico* posiciona a este modelo como una herramienta valiosa para para la comprensión de la resistencia en cáncer de mama triple negativo y para la evaluación de

intervenciones terapéuticas que busquen bloquear la actividad de los transportadores ABC en este contexto clínico.

La inhibición de transportadores ABC ha sido propuesta como una estrategia clave para superar la resistencia a diferentes agentes quimioterapéuticos en distintos tipos de cáncer (Robey, R. W. et al, (2021)). En este contexto, el uso de verapamilo como inhibidor competitivo de ABCB1 resulta relevante (Limniatis, G., & Georges, E., (2022), ya que los resultados muestran que su presencia reduce significativamente el eflujo de doxorubicina en células MDA<sub>R</sub>, aumentando la retención intracelular y disminuyendo la viabilidad celular (Figura 12). Los ensayos de docking molecular respaldan esta evidencia, al demostrar que tanto la doxorubicina como el verapamilo se unen en la misma región en el sitio de unión del transportador ABCB1. Este hallazgo sugiere un mecanismo de inhibición competitiva, mediante el cual el verapamilo bloquea la expulsión de doxorubicina al ocupar el mismo sitio de interacción. Aunque no se descarta la participación de otros transportadores ni de mecanismos adicionales de resistencia, la relevancia de ABCB1 se confirma como un eje central en este modelo, enfatizando la importancia de comprender los procesos que regulan su expresión.

No obstante, la resistencia en cáncer de mama triple negativo no se explica únicamente por la actividad de ABCB1, sino que también involucra mecanismos de regulación traslacional (Silvera, D., Formenti, S. C., & Schneider, R. J., 2010). Los datos indican que la actividad de eIF4E se mantiene incluso bajo condiciones de estrés farmacológico, con expresión sostenida de eIF4E; así como de su forma fosforilada en Ser209 en la variante resistente y bajo tratamientos de doxorubicina. Este fenómeno se acompaña de una reducción en la fosforilación de las proteínas reguladoras 4EBP1/2/3, lo cual libera a eIF4E y favorece la formación del complejo eIF4F (Figura 7). La conservación de la actividad de eIF4E en este contexto es consistente con la activación de vías de señalización río arriba, en particular de las MNK (Figura 15), que facilita la fosforilación y potencia la traducción de ARNm asociados a supervivencia y en respuesta al estrés (Lineham, E., Spencer, J., & Morley, S. J., 2017).

Nuestros resultados demuestran que a concentraciones de doxorubicina superiores a los niveles plasmáticos reportados (1.6  $\mu\text{M}$ ), la actividad de del eje mTOR/eIF4E se mantiene funcional en células MDA<sub>R</sub>, correlacionándose con un incremento en la capacidad invasiva y en la secreción de MMP-9 (Figura 17). Esta relación se ve potenciada por condiciones de sobrecarga lipídica, previamente descritas como moduladoras de procesos invasivos mediados por eIF4E. Experimentos complementarios de silenciamiento génico confirmaron el papel central de eIF4E, ya que su inhibición mediante siRNA redujo la expresión de Nrf2 y ABCB1, además de disminuir la invasión celular y la activación de vías de supervivencia (Figura 14). Estos resultados refuerzan la noción de eIF4E como mediador clave de la quimiorresistencia en cáncer de mama triple negativo.

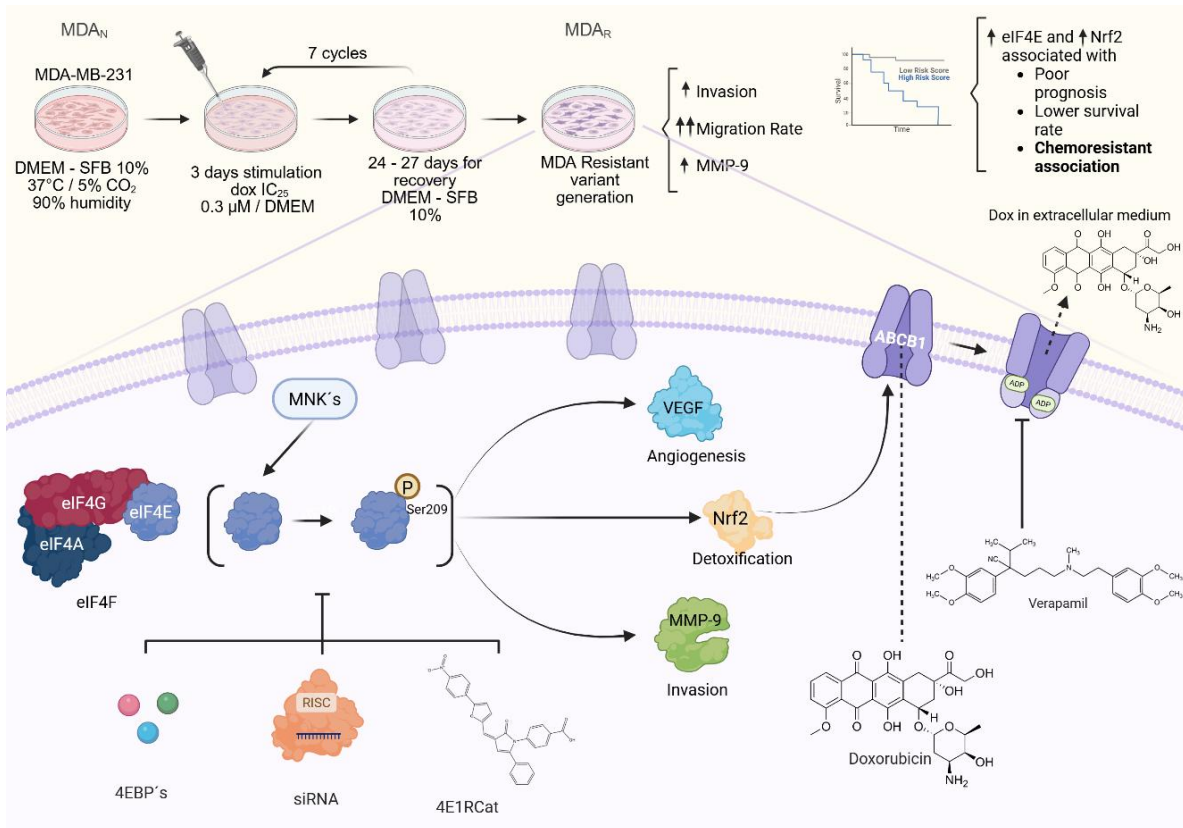
De manera adicional, el uso del inhibidor 4E1RCat permitió corroborar la importancia de eIF4E en la resistencia a doxorubicina, al observar cambios en significativos en la expresión de ABCB1 tras el tratamiento con doxorubicina (Figura 17). Nuestros ensayos de docking mostraron que, en presencia 4EBP1, 4E1RCat se localiza preferentemente cerca de Ser209, interfiriendo potencialmente con su fosforilación y actividad. Este resultado es consistente con los datos experimentales y sugiere un modelo en el que el acceso conformacional de eIF4E condiciona la eficacia del inhibidor. Aun así, reconocemos la necesidad de estudios estructurales tridimensionales, como la cristalografía de rayos X o cryo EM, para validar estos mecanismos de manera concluyente.

Desde una perspectiva terapéutica, el bloqueo de eIF4E puede lograrse mediante distintas aproximaciones. Mientras que 4E1RCat actúa compitiendo con el sitio de unión de eIF4G e impidiendo la formación del complejo eIF4F, otros compuestos como la ribavirina ejercen efectos indirectos sobre su función (Tan, H., He, L., & Cheng, Z., 2020). Alternativamente, las estrategias combinadas con la inhibición simultánea de eIF4E y de sus cinasas regulatorias (MNK) podrían interrumpir de manera más eficiente su actividad y su impacto sobre la expresión de ABCB1 (Kosciuczuk, E. M., Saleiro, D., & Platanias, L. C., 2017). Más recientemente el desarrollo de PROTACs ofrece una vía innovadora para inducir la degradación

selectiva de eIF4E (Ge, J. et al., 2024), abriendo nuevas posibilidades para el estudio funcional del eje eIF4E-Nrf2-ABCB1 en la resistencia a la doxorrubicina. La quimiorresistencia en el TNBC es el resultado de una compleja red de adaptaciones moleculares que incluyen alteraciones en la señalización, la plasticidad tumoral y la remodelación del microambiente. Entre los múltiples mecanismos descritos, la interacción funcional entre eIF4E, el factor de transcripción Nrf2 y el transportador ABCB1 ha emergido como un eje central que refuerza la resistencia a múltiples agentes quimioterapéuticos.

Finalmente, nuestro grupo proyecta validar estos hallazgos en modelos in vivo utilizando ratones BALB/c con inoculación ortotópica de células 4T1. El empleo de edición génica mediante CRISPR-Cas9 permitirá generar líneas Knockout (Dastjerd, N. T. et al, 2022) de eIF4E, evaluando de forma directa su papel en la resistencia y en la progresión metastásica. Estos experimentos aportarán evidencia esencial para consolidar la relevancia del eje eIF4E-Nrf2-ABCB1 en cáncer de mama triple negativo y sentarán bases sólidas para el diseño de intervenciones terapéuticas dirigidas.

En conjunto, los resultados obtenidos describen un modelo en el que la resistencia a doxorrubicina en cáncer de mama triple negativa se sustenta en la convergencia de dos puntos relacionados entre sí. El eflujo de la doxorrubicina mediada por ABCB1 y la regulación traslacional controlada por eIF4E. La activación sostenida del eje eIF4E-Nrf2-ABCB1 constituye un mecanismo adaptativo que permite a las células tumorales evadir el estrés quimioterapéutico, manteniendo simultáneamente su capacidad invasiva (Figura 18). Esta visión integradora identifica a eIF4E y a Nrf2 como puntos centrales en el fenómeno de resistencia, y propone nuevas rutas terapéuticas que combinan inhibidores de eIF4E, moduladores de ABCB1 y aproximaciones innovadoras como PROTACs. De esta manera el trabajo aporta una base conceptual y experimental sólida para el desarrollo de estrategias efectivas contra el cáncer de mama triple negativo.



**Figura 18. Modelo integrativo del eje eIF4E-Nrf2-ABCB1 en la resistencia a la doxorubicina.** Resumen grafico del mecanismo propuesto por el cual la activación sostenida de eIF4E en las células MDA<sub>R</sub> promueve la traducción selectiva de Nrf2 y ABCB1, lo que mejora la respuesta antioxidante y la excreción de fármacos. La convergencia del control de la traducción y la señalización adaptativa al estrés reduce la acumulación intracelular de doxorubicina, lo que refuerza el fenotipo quimiorresistente en las células de cáncer de mama triple negativo.



## 9. Conclusiones

- El presente trabajo demuestra que el factor traduccional eIF4E es un componente esencial en el desarrollo de la quimiorresistencia a la doxorubicina en el cáncer de mama triple negativo. La persistencia de su forma activa fosforilada en Ser209 (eIF4E-p-Ser209), incluso bajo concentraciones citotóxicas del fármaco, evidencia su capacidad para mantener la maquinaria traduccional activa y favorecer la síntesis de proteínas relacionadas con la supervivencia y la invasión tumoral. Estos hallazgos refuerzan la idea de que la resistencia no se debe únicamente a mecanismos de desintoxicación o eflujo, sino también de una regulación traduccional sostenida mediada por eIF4E.
- Se confirmó la existencia de un eje funcional entre eIF4E-Nrf2-ABCB1, que opera como un circuito de retroalimentación adaptativo frente al estrés quimioterapéutico. Mientras que Nrf2 promueve la expresión génica de los transportadores de eflujo y enzimas antioxidantes, eIF4E garantiza su eficiente traducción, generando una respuesta coordinada en la reducción de la concentración intracelular de doxorubicina y mantiene la viabilidad celular. Estos hallazgos proponen que este eje constituye un mecanismo importante de la resistencia a diferentes agentes quimioterapéuticos, así como una potencial diana terapéutica para la modulación farmacológica.
- El modelo celular desarrollado MDA<sub>R</sub> permitió establecer un sistema robusto y confiable para estudiar la quimiorresistencia, revelando además un comportamiento biológico más agresivo, caracterizado por una mayor capacidad migratoria e invasiva. Este fenotipo se asoció con la activación de rutas angiogénicas y el aumento de la actividad de MMP-9, lo que sugiere que la quimiorresistencia adquirida va acompañada de una plasticidad tumoral que potencia la progresión y la metástasis.
- Los estudios in silico complementaron la evidencia experimental, mostrando que tanto la doxorubicina como el verapamilo se unen de forma estable y competitiva al sitio de interacción del transportador ABCB1. Estos resultados confirman la base estructural del eflujo de fármacos y apoyan la idea de que

la inhibición de ABCB1 o la modulación de eIF4E pueden participar en una reversión parcial del fenómeno de resistencia. Estas observaciones abren la posibilidad de explorar terapias combinadas más selectivas y posiblemente menos tóxicas.

- En conjunto, los resultados de esta investigación consolidan el eje eIF4E-Nrf2-ABCB1 como un punto regulador crítico de la quimiorresistencia en el TNBC, y posiciona a eIF4E como una diana terapéutica prometedora. Su inhibición farmacológica o genética podría representar una estrategia eficaz para restaurar la sensibilidad a la doxorubicina. Más allá de su valor experimental, este trabajo aporta una visión integradora del control traduccional en la resistencia tumoral, sentando bases para futuros estudios preclínicos/clínicos orientados al desarrollo de tratamientos más precisos y personalizados para pacientes con cáncer de mama triple negativo.

## 10. Referencias

- Amiri, M., Smith, C. J., & Pelletier, J. (2025). eIF4F complex modulation and therapeutic implications in cancer. *Journal of Molecular Oncology*, 19(2), 145–160. <https://doi.org/10.xxxx/jmo.2025.145>
- Andreev, D. E., O'Connor, P. B. F., Fahey, C., Kenny, E. M., Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., ... & Baranov, P. V. (2017). Translation initiation and elongation mechanisms in eukaryotes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(5), 353–369.
- Avdulov, S., Li, S., Michalek, V., et al. (2004). Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer Cell*, 5(6), 553–563.
- Beis, K. (2015). Structural basis for the mechanism of ABC transporters. *Biochemical Society Transactions*, 43(5), 889–893. <https://doi.org/10.1042/BST20150136>
- Beis, K. (2022). ABC transporters: Structure, function, and mechanism. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 55, e6. <https://doi.org/10.1017/S0033583522000064>
- Bhat, M., Robichaud, N., Hulea, L., Sonenberg, N., Pelletier, J., & Topisirovic, I. (2022). Targeting the translation machinery in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(3), 179–200. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00289-3>
- Bianchini, G., De Angelis, C., Licata, L., & Gianni, L. (2022). Treatment landscape of triple-negative breast cancer – Expanded options, evolving needs. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 19(2), 91–113. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00564-6>
- Bottoni, P., Scatena, R., & Giardina, B. (2024). The role of Nrf2 in cancer: from tumor suppression to tumor promotion. *Antioxidants*, 13(1), 122. <https://doi.org/10.3390/antiox13010122>
- Boussemart, L., Malka-Mahieu, H., Girault, I., Allard, D., Hemmingsson, O., Tomasic, G., ... & Tartour, E. (2014). eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies. *Nature*, 513(7516), 105–109.
- Castañeda-Sánchez, J., García-González, V. G., & Frayde-Gómez, H. (2024). Functional activation of eIF4E in doxorubicin-resistant triple-negative breast cancer. *Molecular Oncology*, 18(3), 412–428.
- Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., Huang, C., ... & Hu, T. (2020). MDR1 and resistance mechanisms in triple-negative breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 10, 1419. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01419>
- Chu, J., & Pelletier, J. (2021). Therapeutic targeting of the eIF4F translation initiation complex. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(6), 427–443. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00145-4>

- Dastjerd, N. T., Valibeik, A., Rahimi Monfared, S., Goodarzi, G., Moradi Sarabi, M., Hajabdollahi, F., Maniati, M., Amri, J., & Samavarchi Tehrani, S. (2022). Gene therapy: A promising approach for breast cancer treatment. *Cell biochemistry and function*, 40(1), 28–48. <https://doi.org/10.1002/cbf.3676>
- Denkert, C., Liedtke, C., Tutt, A., & von Minckwitz, G. (2017). Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. *The Lancet*, 389(10087), 2430–2442.
- Fawzy, M. S., El-Sherbiny, R. M., & Abdel-Maksoud, H. A. (2021). Phosphorylated eIF4E as a biomarker for cancer progression. *Oncotargets and Therapy*, 14, 3321–3334.
- Fletcher, J. I., Haber, M., Henderson, M. J., & Norris, M. D. (2010). ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nature Reviews Cancer*, 10(2), 147–156.
- Furic, L., Rong, L., Larsson, O., et al. (2010). eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14134–14139.
- Galindo-Hernández, O., Pulido-Cápiz, A., & González-Ortiz, L. (2019). Cryptotanshinone as an eIF4A modulator in resistant breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 120, 109520.
- Garrido-Castro, A. C., Lin, N. U., & Polyak, K. (2019). Insights into triple-negative breast cancer biology and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(9), 485–498.
- Ge, J., Hsieh, C. Y., Fang, M., Sun, H., & Hou, T. (2024). Development of PROTACs using computational approaches. *Trends in pharmacological sciences*, 45(12), 1162–1174. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2024.10.006>
- Genuth, N. R., & Barna, M. (2018). The discovery of ribosome heterogeneity and its implications for gene regulation and organismal life. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6), 355–378.
- Graff, J. R., Konicek, B. W., Vincent, T. M., et al. (2021). Targeting the eIF4F translation initiation complex in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 21(6), 337–354.
- Guo, H. (2018). Specialized ribosomes and translation control in gene expression. *Trends in Cell Biology*, 28(8), 662–675.
- Hao, Y., Gu, X., Zhao, Y., & Wu, L. (2022). MNK-mediated phosphorylation of eIF4E in tumorigenesis and resistance mechanisms. *Frontiers in Oncology*, 12, 890213.
- Hinnebusch, A. G., Ivanov, I. P., & Sonenberg, N. (2022). Mechanisms and regulation of eukaryotic translation initiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 14(3), a041240.
- Hu, T., Zhang, L., Chen, Z., & Wang, J. (2021). Nrf2-mediated upregulation of ABC transporters in drug resistance. *Cancer Letters*, 500, 1–10.

International Agency for Research on Cancer (IARC)/World Health Organization (WHO). (2026). GLOBOCAN 2022: Cancer incidence and mortality worldwide.

Katayama, K., Noguchi, K., Sugimoto, Y. (2014). Regulation of P-glycoprotein/ABCB1 function by signaling pathways in cancer cells. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 29(1), 1–10.

Kosciuczuk, E. M., Saleiro, D., & Plataniias, L. C. (2017). Dual targeting of eIF4E by blocking MNK and mTOR pathways in leukemia. *Cytokine*, 89, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.01.024>

Kwak, M. K., Wakabayashi, N., Kensler, T. W., & Yamamoto, M. (2020). MicroRNA regulation of ABCB1 and multidrug resistance in breast cancer. *Cancer Research*, 80(4), 675–689.

Lee, J. M., Li, J., & Johnson, J. A. (2023). Nrf2 regulation and its role in tumor progression. *Free Radical Biology and Medicine*, 199, 132–149.

Limniatis, G., & Georges, E. (2022). Down-regulation of ABCB1 by collateral sensitivity drugs reverses multidrug resistance and up-regulates enolase I. *Journal of biochemistry*, 172(1), 37–48. <https://doi.org/10.1093/jb/mvac032>

Lin, Z., Guo, H., & Zhang, H. (2025). Nrf2 inhibition promotes ferroptosis in triple-negative breast cancer cells. *Cell Death & Disease*, 16(3), 205.

Lineham, E., Spencer, J., & Morley, S. J. (2017). Dual abrogation of MNK and mTOR: a novel therapeutic approach for the treatment of aggressive cancers. *Future medicinal chemistry*, 9(13), 1539–1555. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0062>

Martineau, Y., et al. (2013). 4E-BP1 phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with poor prognosis in cancer. *Oncogene*, 32(36), 4376–4385.

Martínez, C., Jiménez, M., & López, L. (2022). Transcriptional regulation of ABCB1 by Nrf2 in breast cancer cells. *Molecular Cancer Research*, 20(7), 1010–1023.

Mohammed, S., Shamseddine, A. A., Newcomb, B., Chavez, R. S., Panzner, T. D., Lee, A. H., Canals, D., Okeoma, C. M., Clarke, C. J., & Hannun, Y. A. (2021). Sublethal doxorubicin promotes migration and invasion of breast cancer cells: role of Src Family non-receptor tyrosine kinases. *Breast cancer research : BCR*, 23(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13058-021-01452-5>

Mokhtarpour, M., Bahrami, A., & Esmaeili, S. (2024). Clinical significance of Nrf2 overexpression in triple-negative breast cancer. *Cancer Cell International*, 24(1), 188.

Nedeljkovic, M., & Damjanovic, A. (2019). Mechanisms of chemotherapy resistance in triple-negative breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 9, 48.

- O'Reilly, E. A., Gubbins, L., Sharma, S., Tully, R., Guang, M. H. Z., Weiner-Gorzel, K., & McCann, A. (2019). The fate of chemoresistance in triple-negative breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 81, 101907.
- Pelletier, J., Sonenberg, N., & Hinnebusch, A. G. (2021). eIF4F and the control of translation in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 21(9), 549–567.
- Pei, S., Shen, C., & Xia, L. (2025). Nrf2 signaling in redox homeostasis and carcinogenesis. *Redox Biology*, 69, 103011.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., ... & Botstein, D. (2019). Molecular portraits of human breast tumors revisited. *Nature*, 490(7418), 346–352.
- Pettersson, F., Delarue, F. L., & Sonenberg, N. (2020). Dysregulation of translational control in tumorigenesis. *Oncogene*, 39(3), 515–531.
- Proud, C. G. (2015). Control of the translational machinery by mTOR. *Biochemical Society Transactions*, 43(5), 813–818.
- Pulido-Cápiz, A., Galindo-Hernández, O., & González-Ortiz, L. (2024). Pharmacological inhibition of eIF4A restores chemosensitivity in TNBC cells. *Molecular Pharmacology*, 106(4), 312–327.
- Robey, R. W., Pluchino, K. M., Hall, M. D., Fojo, A. T., Bates, S. E., & Gottesman, M. M. (2021). Revisiting the role of ABC transporters in multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 21(12), 796–813.
- Saini, P., & Bhattacharyya, S. N. (2021). Structural and regulatory insights into eIF4E function in translation initiation. *FEBS Letters*, 595(12), 1648–1663.
- Sai Kiran Naineni, N., & Shwetha, R. (2020). Small molecule inhibitors of eIF4E and their therapeutic potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 28(15), 115640.
- Schneider, B. P., Winer, E. P., & Carey, L. A. (2021). Triple-negative breast cancer: Clinical and molecular perspectives. *Clinical Cancer Research*, 27(13), 3545–3556.
- Sharom, F. J. (2020). ABC multidrug transporters: Structure, function and role in chemoresistance. *Biochemical Pharmacology*, 177, 113995.
- Shi, Z., Fujii, K., Kovary, K. M., Genuth, N. R., Röst, H. L., Teruel, M. N., & Barna, M. (2017). Heterogeneous ribosomes preferentially translate distinct subpools of mRNAs. *Cell*, 169(3), 478–492.e15.
- Sharma, N., Singh, R., & Sharma, A. (2023). Phosphorylation-dependent activation of eIF4E in cancer and therapeutic perspectives. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10, 1120468.

- Sharma, N., et al. (2024). eIF4E–Nrf2 translational crosstalk in chemoresistant breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 23(5), 912–924.
- Siddiqui, N., et al. (2022). eIF4E phosphorylation and angiogenesis in cancer progression. *Cancer Research*, 82(10), 1867–1879.
- Silvera, D., Formenti, S. C., & Schneider, R. J. (2010). Translational control in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 10(4), 254–266. <https://doi.org/10.1038/nrc2824>
- Sonenberg, N., & Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 136(4), 731–745.
- Sun, Y., Zheng, L., & Zhang, X. (2020). Translational control mechanisms and eIF4E in breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 10, 1555.
- Taddei, M. L., Filippi, I., & Chiarugi, P. (2025). Nrf2 signaling and epithelial–mesenchymal transition in TNBC. *Cancers*, 17(2), 412.
- Tan, H., He, L., & Cheng, Z. (2020). Inhibition of eIF4E signaling by ribavirin selectively targets lung cancer and angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 529(3), 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.127>
- Theile, D., & Witzgall, P. (2021). The role of ABC transporters in cancer progression and multidrug resistance. *Pharmacology & Therapeutics*, 220, 107721.
- Wang, J., Zhao, Y., & Li, Y. (2021). The ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily: Structures, mechanisms and role in chemoresistance. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 690390.
- Wang, L., Huang, R., & Chen, Y. (2023). Nrf2 regulates ABCB1 expression and chemoresistance in breast cancer cells. *Oncogene*, 42(4), 611–626.
- Wang, Z., Wang, M., & Sun, H. (2024). eIF4E dysregulation in cancer: molecular mechanisms and clinical significance. *Molecular Oncology*, 18(1), 123–140.
- Xia, J., Zhang, X., Zhan, C., et al. (2020). PI3K/AKT signaling pathway contributes to multidrug resistance by regulating ABCB1 expression in cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 235(11), 8739–8751.
- Xia, X., Wang, Q., Ye, T., Liu, Y., Liu, D., Song, S., & Zheng, C. (2020). NRF2/ABCB1-mediated efflux and PARP1-mediated dampening of DNA damage contribute to doxorubicin resistance in chronic hypoxic HepG2 cells. *Fundamental & clinical pharmacology*, 34(1), 41–50. <https://doi.org/10.1111/fcp.12505>
- Xu, H., Liu, Y., & Zhao, T. (2023). eIF4E-dependent translation of Nrf2 in anthracycline-resistant TNBC cells. *Oncogenesis*, 12(5), 36.

Yu, L., Zhang, Y., & Wang, H. (2025). Nrf2 activation and clinical outcomes in triple-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Research*, 27(2), 77.

Zhang, Q., Wu, D., & Liu, L. (2023). Nanoparticle-based drug delivery strategies to overcome ABCB1-mediated resistance in TNBC. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 201, 114975.

Zhou, J., Li, Y., & Wang, H. (2022). ABCB1 upregulation mediates doxorubicin resistance in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 194(1), 47–59.

## 11. Perspectivas

Se propone extender el modelo experimental hacia estudios in vivo, utilizando modelos ortotópicos en ratones BALB/c con tumores resistentes a doxorubicina, permitirá evaluar la contribución del eje que se propuso (eIF4E-Nrf2-ABCB1) en la progresión tumoral, la metástasis y la respuesta a la quimioterapia con doxorubicina en condiciones fisiológicas controladas.

Por otro el desarrollo de inhibidores selectivos de eIF4E y Nrf2, dado que ambos factores representan puntos centrales de control, traduccional y antioxidante, respectivamente, dentro del proceso de quimiorresistencia. Planteamos la búsqueda y caracterización de inhibidores duales que modulen al mismo tiempo la actividad de eIF4E y Nrf2. El diseño racional de estas moléculas podría apoyarse en el cribado virtual dentro de bibliotecas químicas. Siendo optimizado por técnicas como las descritas en este trabajo, de acoplamiento y dinámica molecular prolongada.

Por último, los resultados obtenidos sugieren que tanto la inhibición farmacológica de eIF4E (4E1RCat) y del transportador ABCB1 (verapamilo) puede sensibilizar las células resistentes a doxorubicina. Se propone, por lo tanto, explorar esquemas combinados que integren inhibidores traduccionales moduladores redox, con el objetivo de aumentar la especificidad y reducir la toxicidad sistémica.

## 12. Anexos

### 12.1 Autoría de artículo

**Frayde-Gómez, H.**, Chimal-Vega, B., Pulido-Capiz, A., Muñoz-Ayala, A., Galindo-Hernández, O., Vique-Sanchez, J. L., Leija-Montoya, A. G., Díaz-Molina, R., Madero-Ayala, P. A., Ramos-Ibarra, M. A., & García-González, V. (2026). The translation factor eIF4E is a key mediator of doxorubicin resistance: insights from a triple-negative breast cancer model. *Scientific reports*, *16*(1), 1805. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-31313-6>



## OPEN The translation factor eIF4E is a key mediator of doxorubicin resistance: insights from a triple-negative breast cancer model

Héctor Frayde-Gómez<sup>1,2</sup>, Brenda Chimal-Vega<sup>1,2</sup>, Angel Pulido-Capiz<sup>1,2</sup>, Andrea Muñoz-Ayala<sup>1,2</sup>, Octavio Galindo-Hernández<sup>1,2</sup>, José Luis Vique-Sanchez<sup>2,3</sup>, Ana Gabriela Leija-Montoya<sup>2,3</sup>, Raúl Díaz-Molina<sup>4</sup>, Pablo A. Madero-Ayala<sup>5</sup>, Marco A. Ramos-Ibarra<sup>5</sup> & Victor García-González<sup>1,2</sup>✉

Triple-negative breast cancer (TNBC) tumors are highly aggressive and typically associated with poor prognosis due to limited therapeutic options and significant chemoresistance. This study investigated the role of the translation initiation factor eIF4E in doxorubicin (Dox) resistance using a novel TNBC model. A doxorubicin-resistant cell variant, MDA<sub>R</sub> (IC<sub>50</sub> = 1.8 μM), was derived from MDA-MB-231 cells (IC<sub>50</sub> = 0.6 μM) following prolonged exposure to Dox at its IC<sub>25</sub> concentration. Compared to the parental line, MDA<sub>R</sub> cells exhibited enhanced migration, invasion, and drug efflux capabilities. Dox treatment sustained the phosphorylation of eIF4E at Ser209 (eIF4E-p<sup>Ser209</sup>), which promoted activation of the VEGF pathway and secretion of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). This dysregulated phosphorylation correlated with increased expression of the ABCB1 drug transporter, as confirmed by treatment with the eIF4E inhibitor 4E1RCat. In silico molecular docking and dynamics simulations further demonstrated the Dox-binding affinity of ABCB1. Moreover, at higher Dox concentrations, MDA<sub>R</sub> cells showed elevated Nrf2 activation. Conversely, eIF4E knockdown via siRNA reduced both chemoresistance and Nrf2 expression. These findings suggest that Dox resistance enhances cellular invasiveness through an eIF4E-dependent mechanism involving ABCB1 and Nrf2, both of which are overexpressed in TNBC transcriptomic datasets, highlighting their potential clinical relevance.

**Keywords** Triple-negative breast cancer, EIF4E, Chemoresistance, ABCB1, Doxorubicin

Breast cancer (BC) is the most frequently diagnosed malignancy and a leading cause of cancer-related mortality in women worldwide. According to 2022 data from the International Agency for Research on Cancer (IARC), breast cancer accounted for 2.3 million new cases and over 8 million prevalent cases worldwide, with a mortality rate ranging from 9 to 13%<sup>1,2</sup>.

BC is classified into four subtypes: Luminal A, Luminal B, human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2)-positive, and triple-negative breast cancer (TNBC). This classification is based on immunohistochemistry detection of estrogen receptor alpha (ERα), progesterone receptor (PR), HER-2, and the proliferation biomarker, Ki-67<sup>1,3</sup>. Tumors with triple-negative features (TNBC: ERα-, PR-, and HER-2-) are highly aggressive. In this regard, patients who develop metastatic TNBC typically have a short life expectancy, with relapse occurring in less than three years and overall survival not exceeding five years post-diagnosis<sup>4,5</sup>. During tumor progression, several processes, such as cellular invasion, metastasis, angiogenesis<sup>6</sup>, and chemoresistance<sup>7</sup>, are critical for cancer evolution and clinical outcome.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, California 21000, México. <sup>2</sup>Centro de Innovación e Investigación en Salud, CIIS. Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21000, México. <sup>3</sup>Centro de Ciencias de la Salud Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21000, México. <sup>4</sup>Departamento de Educación e Investigación, Centro Cívico y Comercial, Servicios de Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social para el Bienestar (IMSS-BIENESTAR), Av. Pioneros No. 1005, Palacio Federal, 3er piso, Mexicali 21000, Baja California, México. <sup>5</sup>Grupo de Investigación en Biotecnología y Biociencias, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Tijuana 22390, México. ✉email: vgarcia62@uabc.edu.mx

Chemotherapy is the standard clinical treatment for TNBC. However, chemoresistance is the main obstacle to therapeutic success, especially in metastatic tumors, wherein chemotherapy failure accounts for up to 80–90%<sup>8–10</sup>. Chemoresistance mechanisms in TNBC are multifactorial and based on a complex interaction between the tumor microenvironment, the expression of transporters for drug efflux, alteration in signaling pathways such as PI3K/Akt/mTOR<sup>11–13</sup>, and overexpression of targets such as vascular endothelial growth factor (VEGF)<sup>13</sup>. These mechanisms regulate the translational modulator complex eukaryotic initiation factor 4 F (eIF4F)<sup>14</sup>.

Translational control occurs predominantly at the initiation stage, wherein the eIF4F complex plays a key role. eIF4F is a heterotrimeric complex composed of protein eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E), which binds the 7-methylguanosine (m7G) cap; eukaryotic initiation factor 4 A (eIF4A), which unwinds secondary structures on 5' untranslated regions of the mRNA (RNA G-quadruplex), and the scaffold protein eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G). eIF4E has been associated with cancer hallmarks such as invasion capability, impacting metastasis development<sup>15</sup>, and a dependent process on protein translation initiation<sup>16</sup>.

eIF4E represents the limiting factor in the eIF4F complex activity; the primary eIF4E function is to mediate ribosome recruitment on the specific mRNA to begin protein synthesis<sup>17</sup>. The formation of an active initiation complex containing eIF4G is hindered when eIF4E is coupled to the eIF4E-binding proteins 1, 2, and 3 (4EBPs), which inhibit cap-dependent translation in their hypophosphorylated state. Their phosphorylation status, regulated by the rapamycin (mTOR) pathway's mammalian target determines their binding affinity to eIF4E<sup>18</sup>. This process is crucial for activating the translation machinery regulated upstream by the mTOR pathway<sup>18</sup>.

The relative abundance of eIF4G and the regulation of 4EBPs influence cap-dependent translation. Targeting eIF4E is a promising strategy to suppress translation in cancer cells using small interfering RNA (siRNA) or small molecules. 4E1RCat, for example, inhibits eIF4E activity and has shown efficacy in hepatocarcinoma and melanoma cells<sup>19</sup>.

eIF4E is overexpressed in several cancer types<sup>20–22</sup>. Its phosphorylation at Ser209 (eIF4E-p<sup>Ser209</sup>), catalyzed by MAPK-interacting kinases (Mnks)<sup>23</sup>, promotes the translation of genes involved in tumorigenesis. However, its role in chemoresistance remains to be fully elucidated. Components of the eIF4F complex may also participate in the translation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)<sup>24</sup>, a transcription factor involved in stress responses and detoxification<sup>25,26</sup>, functions possibly linked to chemoresistance.

Nrf2 is the master regulator of redox homeostasis and is activated under oxidative stress<sup>27</sup>. Its activation contributes to cancer progression and metastasis<sup>28</sup> and may enhance drug efflux<sup>29</sup>. Upon activation, Nrf2 dissociates from KEAP1, translocates to the nucleus, and heterodimerizes with Maf proteins to promote the transcription of genes with antioxidant response elements (AREs), including ATP-binding cassette (ABC) transporters<sup>30</sup>.

ABC subfamily B member 1 (ABCB1) is implicated in the processing of anthracyclines<sup>31</sup> and in the development of chemoresistance<sup>32</sup>. An Nrf2-dependent regulation of ABCB1, potentially involving eIF4E, has been proposed<sup>33,34</sup>. ABCB1 overexpression correlates with reduced survival, higher relapse rates, and poor prognosis<sup>35</sup>.

Elucidating the role of eIF4E regulation in a doxorubicin-resistant TNBC model could enhance our understanding of the chemoresistance process, particularly those associated with increased migration and invasion, key factors in TNBC malignancy. At a cellular level, breast cancer is heterogeneous, with multiple subpopulations of breast tumor cells<sup>36</sup>. Specifically, the MDA-MB-231 cell line is considered a mesenchymal stem-like model, making it suitable for studying TNBC. Therefore, we developed a novel strategy using the cell viability inhibitory concentration 25 (IC<sub>25</sub>) of the TNBC MDA-MB-231 cells (denominated MDA<sub>N</sub>) to generate a chemoresistant variant named MDA<sub>R</sub>. Critically, this MDA<sub>R</sub> variant showed an inhibitory concentration 50 (IC<sub>50</sub>) value three times higher than MDA<sub>N</sub> and has optimized management of doxorubicin coupled with the high capability for cellular migration and invasion. Mechanisms such as ABCB1 expression and Nrf2 activation, potentially modulated by eIF4E, may underlie this chemoresistance. These findings are supported by eIF4E silencing via siRNA and inhibition by 4E1RCat, suggesting that the eIF4E/Nrf2/ABCB1 axis may play a central role in doxorubicin resistance in TNBC.

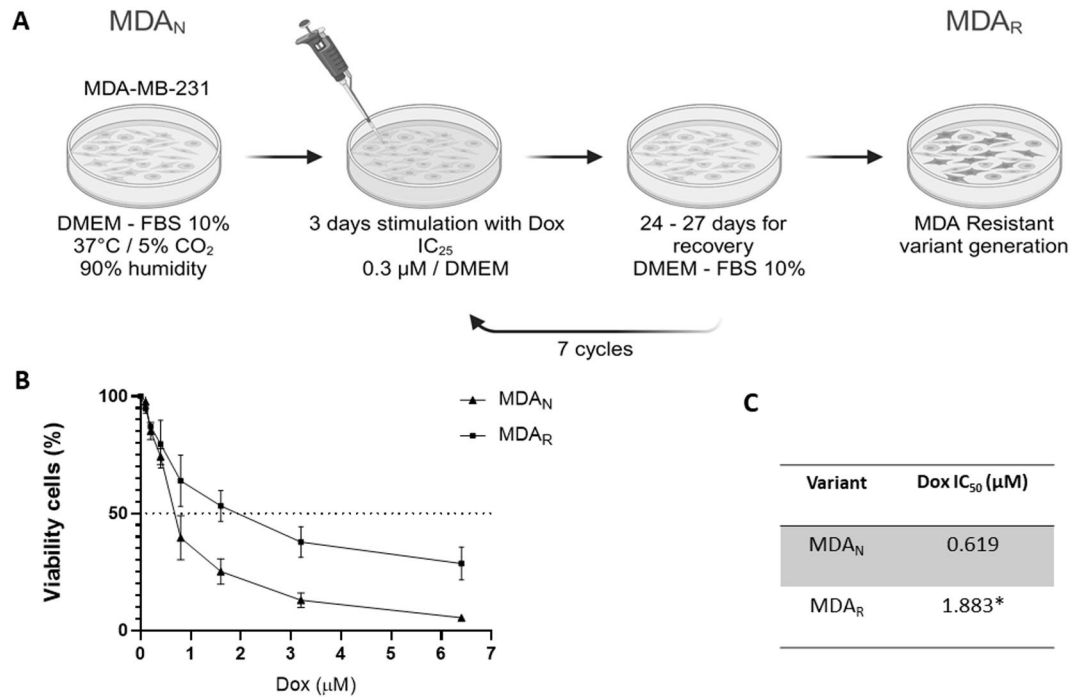
## Results

### Generation of doxorubicin-resistant MDA-MB-231 cells

To generate doxorubicin (Dox)-resistant cellular models, we established two protocols based on the IC<sub>25</sub> (14 months or 7 cycles) and IC<sub>50</sub> (Sup. Figure 1). Considering the high effectiveness of dox, we employed an IC<sub>25</sub> strategy (0.3 μM) to generate a chemoresistant variant referred to as MDA<sub>R</sub> (Fig. 1A). Viability assays assessed MDA<sub>R</sub> chemoresistance at increasing concentrations of dox (0–6.4 μM), and the IC<sub>50</sub> value was subsequently determined. Notably, the MDA<sub>R</sub> cells (IC<sub>50</sub> = 1.883 μM) exhibited significant doxorubicin resistance, displaying an IC<sub>50</sub> value three times higher than MDA<sub>N</sub> cells (IC<sub>50</sub> = 0.619 μM) under the same conditions (Fig. 1B–C). This phenotype may be explained by the cellular processes associated with drug metabolism. MDA<sub>R</sub> variant cells must develop dox-induced mechanisms that favor drug resistance, decreased intracellular accumulation, or enhanced efflux of doxorubicin.

### Chemoresistance is associated with optimized doxorubicin management in MDA<sub>R</sub> cells

To investigate the mechanisms underlying chemoresistance, we analyzed cellular handling of doxorubicin (Dox), by quantifying its concentration in the culture supernatant and through flow cytometry assays. This strategy leveraged the intrinsic fluorescence of Dox. Then, we assessed extracellular Dox levels to characterize drug management related to either increased efflux or decreased intracellular accumulation (Fig. 2A, B). Cell cultures were treated with increasing concentrations of Dox (0–3.2 μM) for 24 h (Fig. 2A) and 48 h (Fig. 2B) to evaluate dose- and time-dependent responses. Supernatants were collected and analyzed by spectrofluorometry using a previously established standard curve. The data revealed significantly higher Dox concentrations in



**Fig. 1.** Generation of chemoresistance phenotype using doxorubicin IC<sub>25</sub> (0.3 μM). **(A)** General scheme of the protocol for chemoresistance generation. **(B)** Dose-response curve under treatment with dox (0–6.4 μM) in MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> variant cells at 48 h treatment. **(C)** IC<sub>50</sub> values for the MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> cell variants, assays corresponding to three biological replicates ( $x \pm S.D$ ). The mean values are presented ( $n = 3$ , mean  $\pm$  SD); data were statistically analyzed using one-way ANOVA and Newman–Keuls’s multiple comparison test, \*  $p < 0.05$ . (1) FBS: Fetal bovine serum; (2) MDA<sub>N</sub>: MDA native 3; MDA<sub>R</sub>: MDA resistant variant.

supernatant media of MDA<sub>R</sub> cells at 24 h from dox concentration 1.6 to 3.2 μM regarding MDA<sub>N</sub> (Fig. 2A). For 48 h of treatment, the difference was significant from dox 1.6 μM (Fig. 2B). In both conditions, 24 h and 48 h, cell cultures of MDA<sub>R</sub> maintained higher dox concentrations in supernatant media compared to MDA<sub>N</sub> cells, suggesting enhanced drug efflux or reduced uptake.

On the other hand, under increasing concentrations of Dox (0–1.6 μM) for 24 h, MDA<sub>N</sub> cells were analyzed by flow cytometry to evaluate their capacity for drug efflux, as cells unable to export Dox would retain it and exhibit fluorescence. A progressive increase in fluorescence was observed up to a concentration of 0.8 μM in both MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> cells (Fig. 2C). However, at higher concentrations (0.8–1.6 μM), a second population of MDA<sub>N</sub> cells emerged in the region of lower fluorescence intensity, compared to MDA<sub>R</sub>. This shift is likely associated with decreased cell viability.

To further evaluate Dox internalization, we measured the mean fluorescence intensity (MFI), which reflects intracellular drug content independently of the number of fluorescent cells.

As shown in the plots, although the MDA<sub>N</sub> population included fewer viable cells, these exhibited higher fluorescence intensity than MDA<sub>R</sub> cells, indicating greater intracellular accumulation of Dox. Conversely, in the MDA<sub>R</sub> variant, fluorescence intensity decreased as the number of viable cells increased (Fig. 2C). These findings suggest that adaptive mechanisms in MDA<sub>R</sub> cells may regulate intracellular Dox levels by enhancing drug efflux, thus contributing to sustained chemoresistance in association with cancer-related hallmarks.

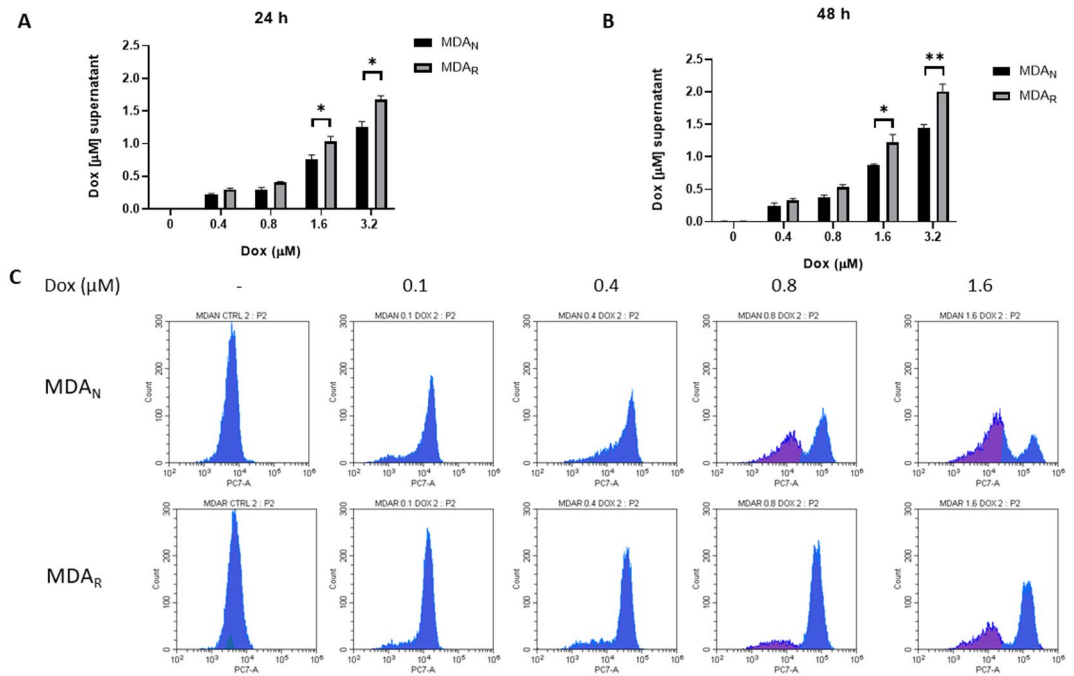
### Chemoresistance impact on cellular migration

A key characteristic of triple-negative breast cancer (TNBC) and chemoresistant cells is their high migratory capacity. To evaluate this, cell migration was assessed in MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> variants under increasing concentrations of doxorubicin (0.05–3.2 μM). Representative images of the migration assay for both cell lines are shown in Fig. 3A.

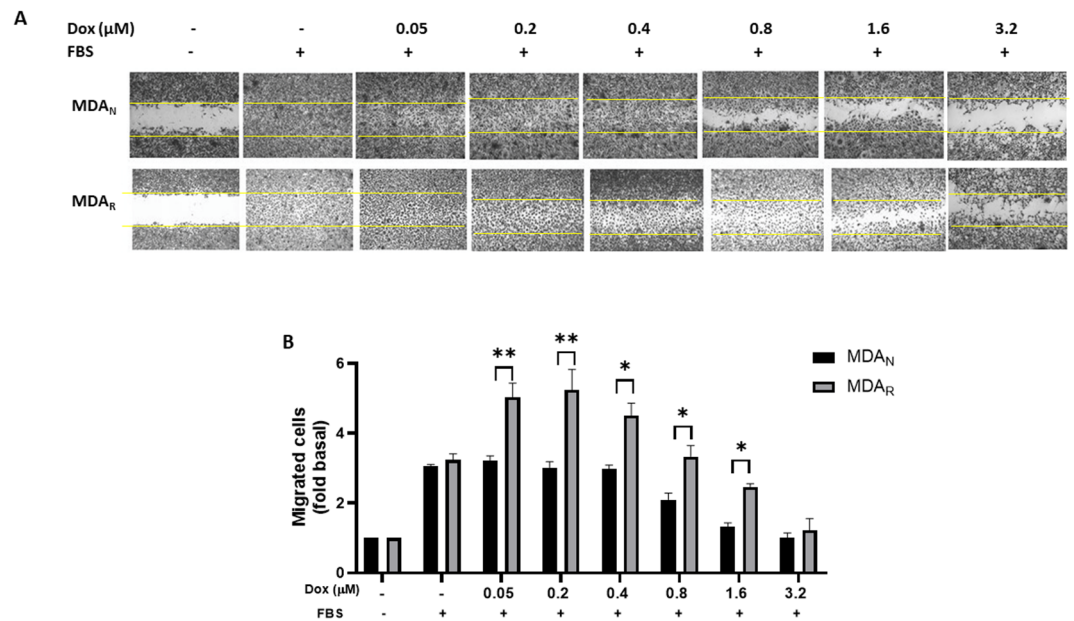
Cells cultured in unsupplemented DMEM were used as a negative control, while cells stimulated with DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) served as a positive control. Treatments with increasing Dox concentrations (0.05–3.2 μM) were performed under positive control conditions for both variants.

In MDA<sub>N</sub> cells, the positive control induced a 2.8-fold increase in cell migration, and exposure to 0.05 μM Dox further enhanced migration to 3.12-fold over the negative control, as determined by densitometric analysis (Fig. 3B). This stimulatory effect was maintained up to 0.4 μM Dox. However, a significant dose-dependent decrease in migration was observed at Dox concentrations ranging from 0.8 to 3.2 μM.

In contrast, MDA<sub>R</sub> cells displayed a different response: low Dox concentrations (0.05–0.8 μM) led to an increase in migration compared to the negative control (5.0 and 5.23-fold respectively), and a reduction in migration was only evident at higher concentrations (1.6 and 3.2 μM) (Fig. 3B).



**Fig. 2.** Doxorubicin chemoresistance in MDA-MB-231 cells is associated with an optimized intracellular dox excretion. Doxorubicin quantification in supernatant media at 24 (A) and 48 h (B) stimuli (0–3.2.2 μM) on MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> cells; values were determined with three replicates, represented as mean and standard deviation ( $n = 3, X \pm S.D.$ ). Data were statistically analyzed using one-way ANOVA and Newman–Keuls’s multiple comparison test, \* represents a  $p$  value < 0.05, \*\* represents a  $p$  value < 0.01. Dox emission values of fluorescence at 560 nm were reported. (C) Cytometry assays were performed to evaluate the effects of dox on MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> cellular variants under 24 h of treatment; for analysis, mean fluorescence intensity (MFI) was evaluated.



**Fig. 3.** Low doxorubicin concentrations promote cellular migration in MDA<sub>R</sub> cells. (A) Representative images of wound-healing assays under treatment with increasing dox concentrations (0.05–3.2 μM) in MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> cell cultures. (B) Densitometric analysis of migration assays in the MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> variants. Results showed three biological replicates’ mean and standard deviation ( $n = 3, X \pm S.D.$ ). To evaluate this process, DMEM plus 10% fetal bovine serum (FBS) was used as a positive control, and a non-supplemented DMEM medium was used as a negative control. Data were statistically analyzed using one-way ANOVA, and Newman–Keuls’s multiple comparison test \* represents a  $p$  value < 0.05, \*\* represents a  $p$  value < 0.01.

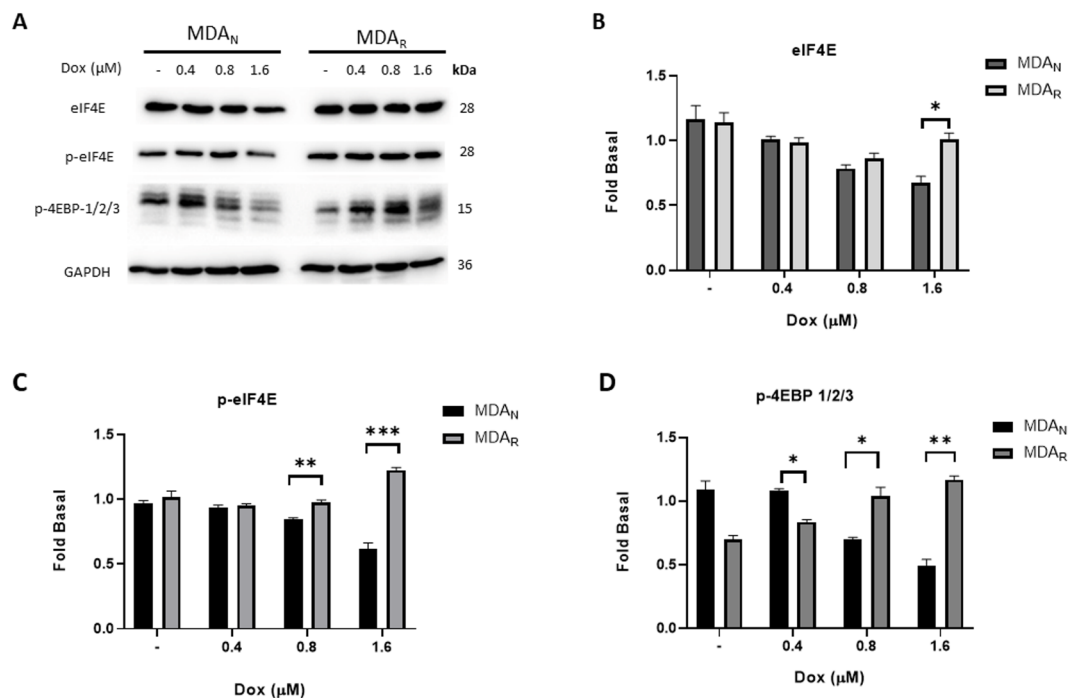
Based on the results, MDA<sub>R</sub> cells exhibited a higher migratory capacity compared to MDA<sub>N</sub> cells. Notably, this increase was more pronounced at low concentrations of doxorubicin (0.05–0.2 μM), potentially reflecting adaptive mechanisms related to drug metabolism. This behavior is consistent with the observed IC<sub>50</sub> values: 1.88 μM for MDA<sub>R</sub> and 0.619 μM for MDA<sub>N</sub>, indicating greater sensitivity of the MDA<sub>N</sub> variant to Dox treatment. These findings suggest that specific signaling pathways may regulate chemoresistance, with mechanisms such as protein translation initiation playing a critical role. Indeed, components of the eukaryotic initiation factor 4 F (eIF4F) complex have been identified as key modulators in the acquisition of chemoresistance<sup>37</sup>.

### Chemoresistance is associated with eIF4E dysregulation

We focused on modulating the eIF4E factor by evaluating its total expression, the phosphorylated form eIF4E-p<sup>Ser-209</sup> mediated by MNK activation and associated regulatory mechanisms. For this characterization, Dox treatments were used under specific increasing doses (0–1.6.6 μM) for 48 h, according to previous results.

As shown in Fig. 4A, the expression levels of total eIF4E and its active phosphorylated form eIF4E-p<sup>Ser-209</sup>, both of which are associated with cancer aggressiveness<sup>16</sup>, were examined. Under the doxorubicin dose-dependent treatment (0–1.6.6 μM), the expression of eIF4E was diminished in the MDA<sub>N</sub> variant. However, its levels were constant in the MDA<sub>R</sub> variant, even at the highest Dox concentration tested (1.6 μM), which approximates the IC<sub>50</sub> for this variant (Fig. 4A, B). This differential expression pattern may be linked to chemoresistance, altered Dox handling, and increased migratory capacity. To explain these phenomena, while a diminution of phosphorylation (eIF4E-p<sup>Ser-209</sup>) dependent on the doxorubicin dose was registered in the MDA<sub>N</sub> variant, the eIF4E-p<sup>Ser-209</sup> levels were maintained constant in the MDA<sub>R</sub> variant. Notably, a slight increase in eIF4E-p<sup>Ser-209</sup> was observed in MDA<sub>R</sub> cells at 1.6 μM Dox (Fig. 4A, C), suggesting sustained eIF4E activation under chemotherapeutic stress.

In addition, a key regulatory mechanism of eIF4E activity is the role of 4EBPs<sup>17</sup>, whose phosphorylation induced by the Akt/mTORC1 pathway blocks the binding to eIF4E. In the evaluation of the phosphorylation levels 4EBP1/2/3, revealed a dose-dependent decrease in phosphorylation in MDA<sub>N</sub> cells as Dox concentration increased (Fig. 4A, D). In contrast, in the MDA<sub>R</sub> variant, an increase in the phosphorylation of these regulatory proteins was registered (Fig. 4A, D). The evidence suggests the conservation of mechanisms such as the Akt/mTORC1 despite the treatment with high dox concentrations, increasing the 4EBP1/2/3 phosphorylation in the MDA<sub>R</sub> variant.



**Fig. 4.** In the chemoresistant variant MDA<sub>R</sub>, eIF4E's higher expression and activity are registered under high dox concentrations. **A**) Characterization of targets eIF4E, eIF4E-p<sup>Ser-209</sup>, and p-4EBP1/2/3 on MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> cellular variants under increasing dox range (0–1.6.6 μM) treatment. Densitometry determinations of eIF4E (**B**) and eIF4E-p<sup>Ser-209</sup> (**C**), respectively. **D**) Detection of phosphorylation levels of eIF4E activity regulator 4E-BP1/2/3 under dox range concentration (0–1.6.6 μM); densitometry analysis is shown using GAPDH as the control. Three replicates data were statistically analyzed using one-way ANOVA, and Newman-Keuls's multiple comparison test \* represents a p-value < 0.05, \*\* represents a p-value < 0.01, and \*\*\* represents a p-value < 0.001.

## eIF4E pathway, a critical factor for chemoresistance

Furthermore, we assessed the expression of the eIF4A and eIF4G factors in the MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> cells under treatment with increasing concentrations of Dox (0–1.6.6 μM) (Fig. 5A, B, C). In MDA<sub>R</sub> cells, eIF4G expression increased at 0.4 and 0.8 μM Dox, but decreased at 1.6 μM (Fig. 5A, B). To examine the formation of the eIF4F complex, eIF4E was immunoprecipitated from whole-cell lysates, and associated eIF4G and eIF4A were detected (Sup. Figure 2 A). Notably, eIF4G recruitment differed between MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> variants, indicating Dox-induced dynamic regulation of eIF4F complex assembly.

Free eIF4E and its phosphorylated form eIF4E-p<sup>Ser-209</sup> are implicated in cancer hallmarks such as cell death resistance and angiogenesis, by promoting the translation of targets such as Bcl-2 and VEGF, respectively<sup>16</sup>. Critically, in melanoma patients with VEGF overexpression, the VEGF/VEGFR axis can be associated with higher levels of tumor invasion and a poor response to therapy<sup>38</sup>. However, this effect has not yet been clearly described in breast cancer models.

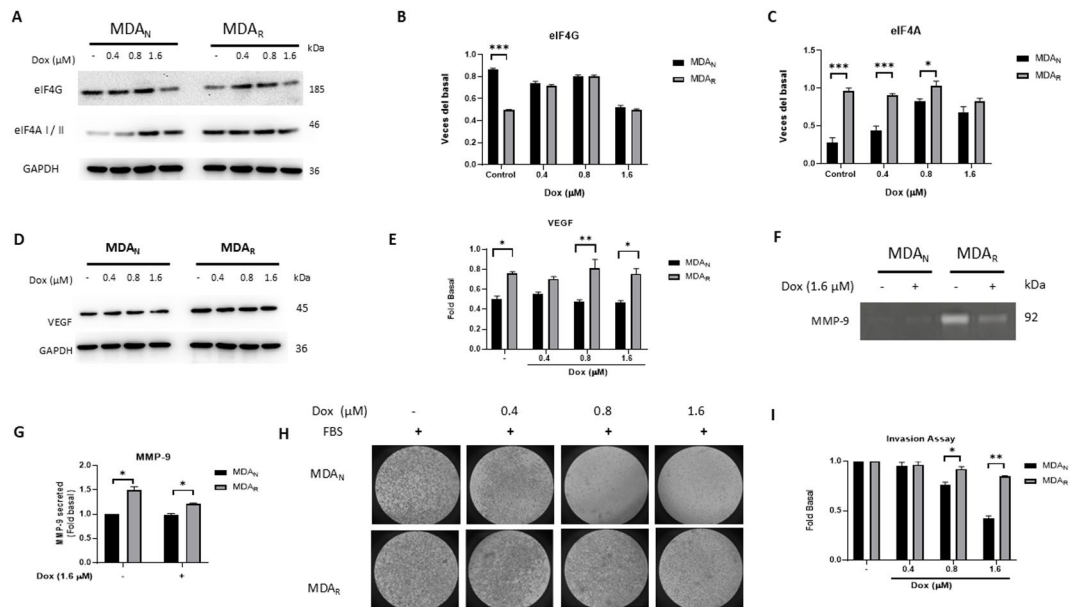
Our results demonstrated a direct association in MDA<sub>R</sub> cells between sustained eIF4E phosphorylation (Fig. 4A, C) and VEGF expression (Fig. 5D, E), even under Dox treatment at high concentrations (1.6 μM), a dose close to the IC<sub>50</sub> (1.88 μM). In contrast, MDA<sub>N</sub> cells exhibited the opposite response: VEGF expression was downregulated in parallel with reduced eIF4E-p<sup>Ser-209</sup> phosphorylation, particularly at 1.6 μM Dox (Fig. 5D, E).

This phenomenon could contribute to a differential response in processes that support the oncogenic pathways, such as cell invasion, and explain the effects of chemoresistance.

The secretion of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is closely associated with enhanced migratory and invasive capabilities in cancer cells<sup>39</sup>. To assess this, we evaluated MMP-9 activity in the extracellular medium of both cell variants under high Dox concentrations (1.6 μM). The results showed elevated MMP-9 activity in MDA<sub>R</sub> cells. In contrast, MMP-9 activity was reduced in MDA<sub>N</sub> cells treated under the same conditions (Fig. 5F, G).

This differential response aligns with the regulation of the translational factor eIF4E and is consistent with the observed variations in invasive behavior. Notably, increasing Dox concentrations (0–1.6 μM) significantly impaired the invasive capacity of MDA<sub>N</sub> cells, whereas MDA<sub>R</sub> cells retained their invasive potential (Fig. 5H).

Moreover, invasion activity in MDA<sub>R</sub> cells was still detected at the highest Dox concentrations (0.8–1.6 μM), correlating with sustained MMP-9 activity (Fig. 5I). These findings highlight a key phenotypic difference in the chemoresistant MDA<sub>R</sub> variant, supporting the notion that invasive properties persist despite exposure to cytotoxic doses of Dox.



**Fig. 5.** eIF4E pathway, a critical factor for chemoresistance. MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> cells were stimulated with dox increasing concentrations (0–1.6.6 μM) at 48 h treatment; (A) Western blot analysis of the scaffold protein eIF4G and helicase protein eIF4A and their densitometric analysis (B) and (C) respectively. (D) Western-blot of VEGF expression in both variants, GAPDH was used as a loading control. (E) Densitometry analysis of VEGF. (F) Metalloproteinase-9 activity evaluated by zymography and respective densitometric analysis (G); results showed the mean and standard deviation ( $X \pm S.D.$ ) of three biological replicates. To assess this process, MDA<sub>N</sub> control sample was used as control. (H) Representative images of cell invasion experiments in MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> cells under treatment with increasing dox concentrations (0–1.6.6 μM) and concomitant FBS (10%). (I) Densitometric analysis of invasion assays in the MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> variant. Results showed three biological replicates' mean and standard deviation ( $n = 3$ ,  $X \pm S.D.$ ). To evaluate this process, DMEM plus 10% fetal bovine serum (FBS) was used as a positive control. Data were statistically analyzed using one-way ANOVA and Newman–Keuls's multiple comparison test, \* represents a  $p$  value  $< 0.05$  \*\* represents a  $p$  value  $< 0.01$ .

## The role of ABC transporters in doxorubicin chemoresistance

We evaluated the implication of the ABC transporters as a determinant of chemoresistance. In the first strategy, we selected representative transporters of this superfamily. We established the conditions for ABCC1 and ABCB1 characterization through qPCR. Under basal conditions, ABCC1 expression was slightly higher in MDA<sub>R</sub> cells compared to MDA<sub>N</sub> cells (Fig. 6A). Upon Dox treatment (0–1.6 μM), a modulation in ABCC1 expression was observed, suggesting a downregulation in MDA<sub>R</sub> cells (Fig. 6A). However, significant differences were not detected between MDA<sub>R</sub> and MDA<sub>N</sub> at any Dox concentration tested (0–1.6 μM). These responses may correspond with other compensatory mechanisms to maintain cell viability in MDA<sub>R</sub> cells.

Under the same Dox treatment (0–1.6.6 μM), we reported a crucial cell response, the ABCB1 overexpression in both cellular variants, which was dependent on Dox concentrations (Fig. 6B). Notably, this effect was more pronounced in the MDA<sub>R</sub> variant. Based on the results, ABCB1 expression was significantly upregulated in MDA<sub>R</sub> cells starting from 0.4 μM Dox, with a substantial increase observed at 1.6 μM (Fig. 6B). In MDA<sub>N</sub> cells, ABCB1 expression also increased in a dose-dependent manner, although to a lesser extent. This response contrasts with ABCC1, whose expression remained marginally higher in MDA<sub>R</sub> cells only under basal conditions and was not significantly modulated by Dox treatment. Data suggested ABCB1 could be the determining transporter in doxorubicin chemoresistance, which has been described in other types of cancer<sup>40</sup>.

In this context, molecular docking simulations further support the involvement of ABCB1 in doxorubicin transport (Fig. 6C, D). Doxorubicin was found to dock within the transmembrane domains 1 and 2 (TMD1/2) of ABCB1, interacting specifically with residues Phe343, Gln347, Glu875, and Gln946, which are known to be critical for substrate recognition and stabilization. The calculated S-score of –8.977 indicates a stable and energetically favorable binding conformation. Key interactions included multiple hydrogen bonds, particularly with Gln195, Gln347, and Glu875, as well as hydrophobic contacts involving aromatic residues such as Phe343, positioning the anthracycline ring within the central substrate-binding cavity of ABCB1.

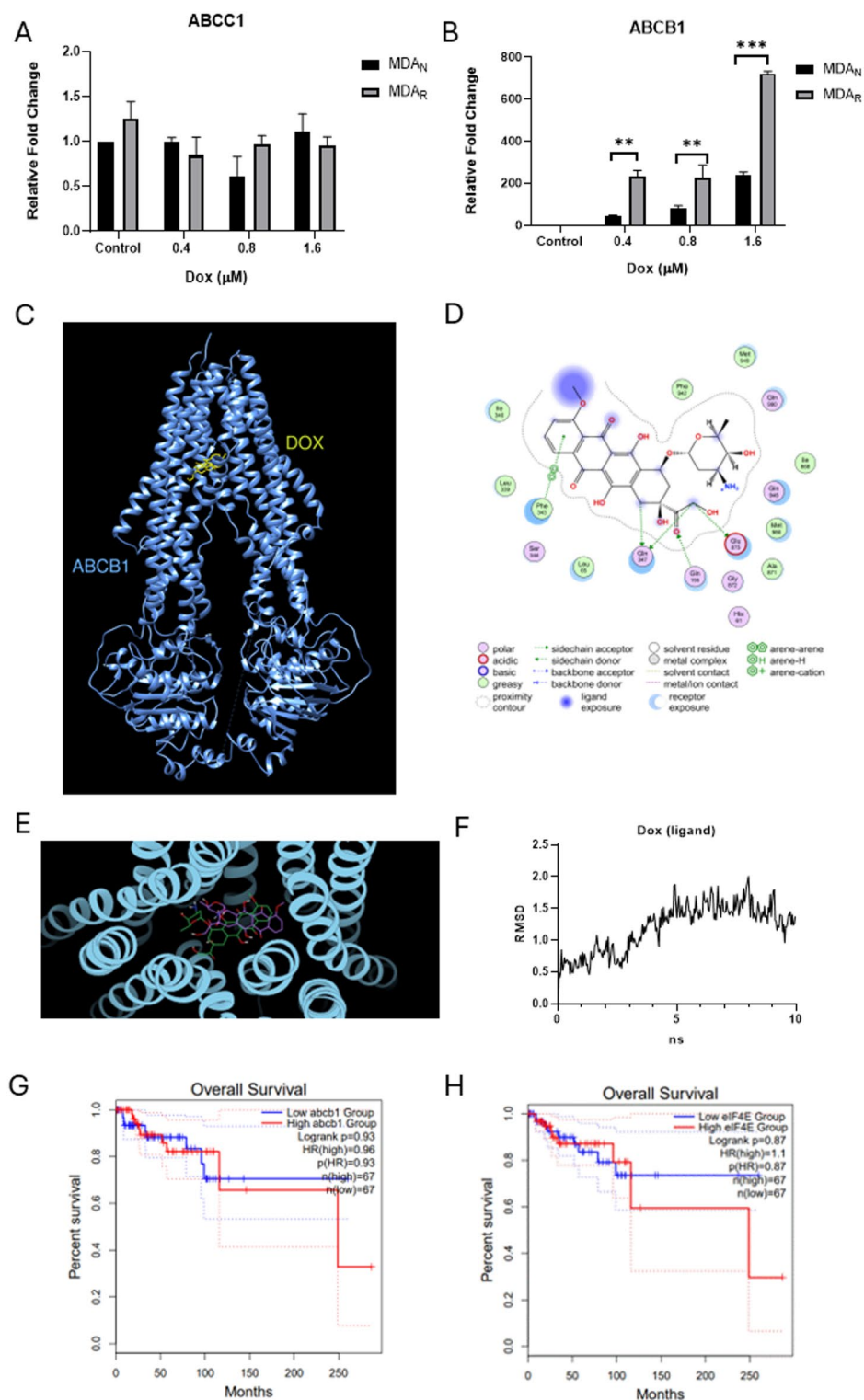
For the validation of the docking results, Rhodamine 123, a well-characterized ABCB1 substrate, was used as a control. Molecular docking simulations revealed that Rhodamine 123 binds within the transmembrane substrate-binding cavity of ABCB1, engaging several key residues including Ile340, Gln990, Gln347, Leu65 and Phe983 (Sup. Figure 3). Notably, several of these residues, particularly Glu875, Gln990 and Phe343 also participate in the binding of doxorubicin, indicating a partial overlap in their binding pockets. However, doxorubicin interacts with a broader and more intricate network of residues, including Gln946, Met986 and Gln195 which are absent in the Rhodamine 123 binding profile. These additional contacts likely contribute to the higher binding affinity and enhanced conformational stability observed for doxorubicin within ABCB1. The partial overlap in binding sites, along with differences in interaction profiles, suggests that doxorubicin and Rhodamine 123 share a common substrate recognition domain within ABCB1, reinforcing the transporter's role in Dox efflux (Fig. 6C).

In a complementary way, we conducted a docking using AutoDock Vina to evaluate further the binding affinities and interaction profiles of doxorubicin and Rhodamine 123 with ABCB1 (Sup Fig. 5). The results revealed a binding affinity of –8.977 kcal/mol for doxorubicin and –7.568 kcal/mol for Rhodamine 123, consistent with the binding trends observed in the MOE analysis. Comparative analysis of the docking poses revealed that doxorubicin forms multiple stabilizing interactions within the ABCB1 binding pocket, including hydrogen bonds with Glu875 and Gln347, as well as hydrophobic interactions with residues Met986 and Phe343, which support a tightly anchored conformation.

Additionally, we assessed the dynamic stability of the doxorubicin-ABCB1 complex using a 10-nanosecond molecular dynamics (MD) simulation. The Root Mean Square Deviation (RMSD) values of the ligand relative to its initial position were calculated (Fig. 6E). As shown in Fig. 6F, these values increased gradually during the first 5 ns, reaching a plateau with an RMSD value of 1.5 Å, and remained stable for the remainder of the trajectory. The absence of large fluctuations or divergence implies that Dox retained a stable pose within the transmembrane domain within the binding site of ABCB1. A structural snapshot of the complex is shown in Fig. 6E, where the initial (green) and final (purple) poses of Dox are shown (overlaid). This illustrates that Dox remained stably embedded within the ABCB1 structure. Additionally, the ligand-binding cavity of ABCB1, formed by multiple α-helices, maintained its shape and continued to enclose the ligand. The overall structural integrity of the complex during the simulation supports the hypothesis that Dox is not only efficiently docked but also retained in a stable conformation, compatible with subsequent translocation, although further simulations would be required to capture the full transport cycle.

To complete the characterization of ABCB1, we analyzed breast cancer prognosis datasets from TCGA and GTEx using the GEPIA database<sup>41</sup>. The data revealed an association between high ABCB1 expression and reduced overall survival in breast cancer patients (Fig. 6G), supporting its role in doxorubicin resistance. Additionally, GEPIA analysis demonstrated a significant correlation between elevated eIF4E expression and poor overall survival in breast cancer patients (Fig. 6H). These observations were further validated using the KM-Plot database<sup>42</sup>. High eIF4E expression was associated with decreased survival in patients treated with doxorubicin across all breast cancer subtypes (Sup. Figure 4 A), with the effect being more pronounced in TNBC patients (Sup. Figure 4B).

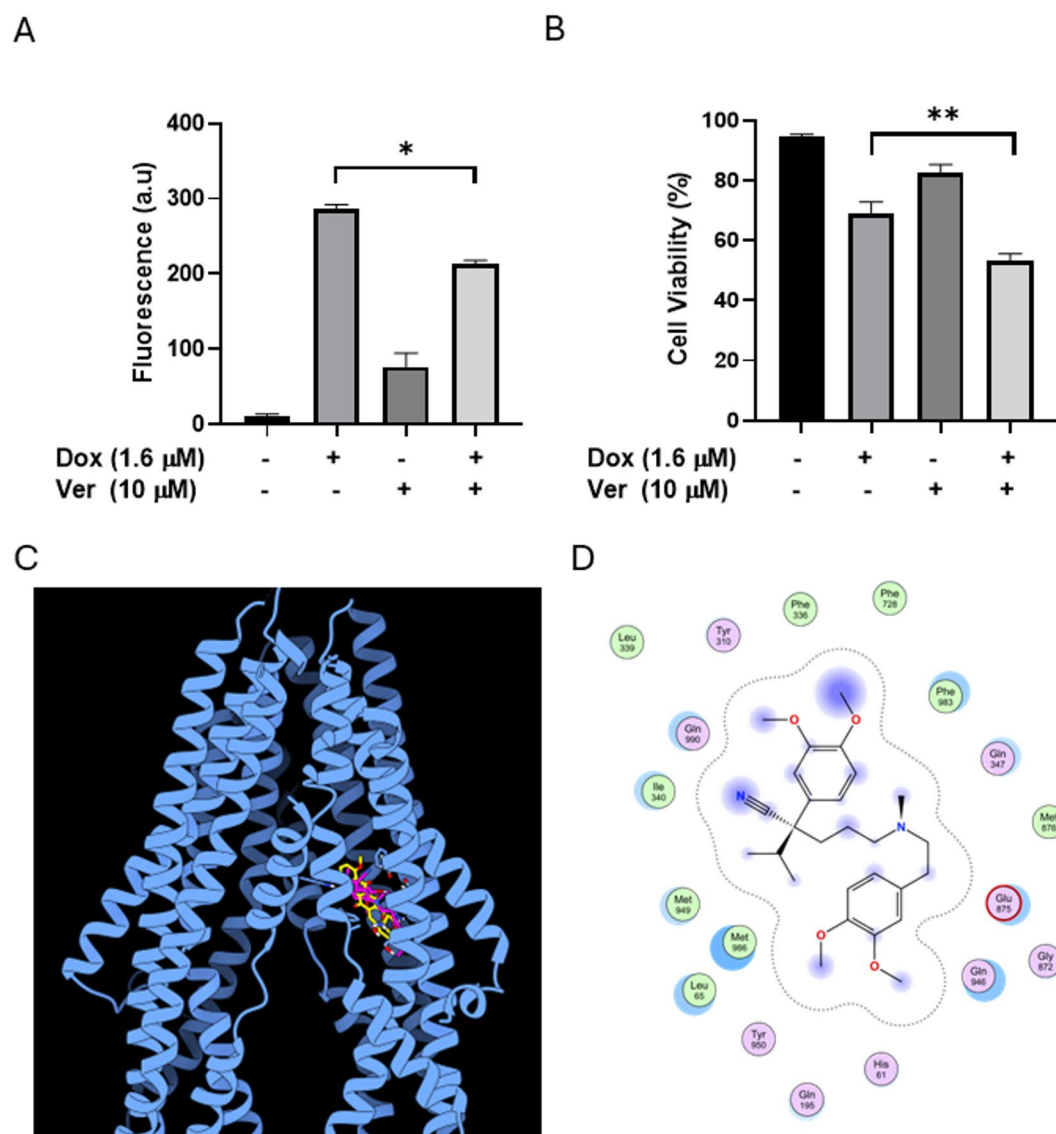
To further elucidate the role of ABCB1 in breast cancer chemoresistance, we used verapamil, a well-recognized inhibitor of ABCB1, in functional and in silico analyses (Fig. 7). Given the high ABCB1 expression observed in the MDA<sub>R</sub> variant, chemoresistant cells were treated with 1.6 μM Dox for 12 h to induce ABCB1 overexpression, followed by co-treatment with verapamil at 10 μM, an inhibitory concentration<sup>43</sup>. Quantification of extracellular Dox levels revealed a significant reduction upon cotreatment (Fig. 7A), suggesting that verapamil effectively inhibited ABCB1-mediated Dox efflux. Moreover, the combined treatment with (Dox-verapamil) resulted in enhanced cytotoxicity under the same conditions (Fig. 7B), supporting the hypothesis that verapamil sensitizes resistant cells by impairing ABCB1 function.



To better understand the molecular basis of this inhibition, we performed molecular docking studies using the ABCB1 structure (PDB: 7A69) with Dox and verapamil (Fig. 7C, D). Both ligands were localized within the transmembrane domains (TMD1/2) of ABCB1, interacting with key residues, such as Gln347, Glu875, and Gln946, and positioning the anthracycline ring within the central substrate-binding cavity of ABCB1. A visual representation of the binding poses shows that doxorubicin (yellow) and verapamil (magenta) occupy nearly identical spatial positions within the ABCB1 binding site (blue), consistent with the overlapping interaction profile described above.

These findings reinforce the relevance of eIF4E as a contributor to chemoresistance and to tumor progression traits such as increased cell invasion. Notably, eIF4E may also play a regulatory role in the expression of the transcription factor Nrf2, a key target in antioxidant responses and chemoresistance. This potential interaction

**Fig. 6.** Doxorubicin chemoresistance is associated with the ABCB1 transporter. **(A)** Expression levels of ABCB1 in MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> cells under treatment with doxorubicin concentration range (0–1.6.6  $\mu$ M) through qPCR determination; **(B)** under the same conditions, characterization of ABCB1 levels. In both cases, GAPDH was used as a reference gene, Results showed three biological replicates' mean and standard deviation ( $n=3$ ,  $X \pm S.D.$ ). Molecular docking assay of ABCB1 (PDB: 7A69) under dox interaction, an increment in the interaction region is shown **(C)**, and prediction of ABCB1 residues determinants of doxorubicin interaction obtained by MOE program **(D)**. **(E)** Overlay of the ligand (doxorubicin) in its initial (green) and final (purple) conformations within the transmembrane binding pocket after a 10 ns molecular dynamics simulation. **(F)** RMSD of the ligand over the simulation time (10 ns), calculated with respect to the initial docking pose. **(G)** Overall survival plot for low and high expression of the ABCB1 gene in BC patients from GEPIA. **(H)** The overall survival plot for low and high expression of eIF4E in breast cancer patients was obtained from the GEPIA database (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>). Data were statistically analyzed using one-way ANOVA and Newman–Keuls's multiple comparison test \*\*represents a  $p$  value  $< 0.01$  and \*\*\*  $p$ -value  $< 0.001$ .



**Fig. 7.** Inhibition of ABCB1 with verapamil promotes significant cytotoxicity in MDA<sub>R</sub> cells. **(A)** Evaluation of Dox efflux under 24 h treatment with dox (1.6  $\mu$ M) and concomitant treatment with the ABCB1 inhibitor (Verapamil) (10  $\mu$ M). **(B)** MTT viability assay under the same conditions. Molecular docking assay of ABCB1 (PDB: 7A69) under dox and verapamil interaction **(C)**, an approach to the interaction region of the ligands dox (yellow) and verapamil (magenta) is shown **(D)**, and prediction of ABCB1 residues determinants of verapamil interaction obtained by the MOE program. Results showed three biological replicates' mean and standard deviation ( $n=3$ ,  $X \pm S.D.$ ). Data were statistically analyzed using one-way ANOVA and Newman–Keuls's multiple comparison test, \* represents a  $p$  value  $< 0.05$ \*\* represents a  $p$  value  $< 0.01$ .

could influence the expression of ABC transporters, further impacting therapeutic response (personal communication).

### Nrf2, a key factor in regulating chemoresistance

We evaluated Nrf2 expression to determine its potential association with ABCB1 regulation in MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> cells under the same range of doxorubicin concentrations (0–1.6  $\mu$ M) (Fig. 8A, B). The results suggest a correlation between Nrf2 and ABCB1 responses, particularly in MDA<sub>R</sub> cells, wherein Nrf2 expression increased at the highest Dox dose (1.6  $\mu$ M). This phenomenon coincided with sustained eIF4E activity under the same treatment conditions. Complementary findings from a spheroid formation assay, used to assess proliferation capacity, supported this observation. At high Dox concentrations (1.6  $\mu$ M), spheroid formation was completely suppressed in MDA<sub>N</sub> cells, whereas only a slight reduction in spheroid size was observed in MDA<sub>R</sub> cells (Sup. Figure 5), suggesting preserved proliferative potential in the chemoresistant variant. This evidence suggests differential regulation of Nrf2 and ABCB1 mRNAs by the eIF4E/eIF4F complex in MDA<sub>R</sub> cells, based on previous cytometry data and extracellular doxorubicin quantification assays.

To further investigate this regulatory axis, we employed siRNA-mediated knockdown of eIF4E to assess its downstream effects. Optimal knockdown conditions were established after 7 h of siRNA treatment, resulting in a reduction of eIF4E expression to 28% relative to control levels (Fig. 8C, D). Notably, this downregulation was accompanied by a significant decrease in MMP-9 activity in the extracellular medium (Fig. 8E, F), indicating a functional impact on invasive capacity.

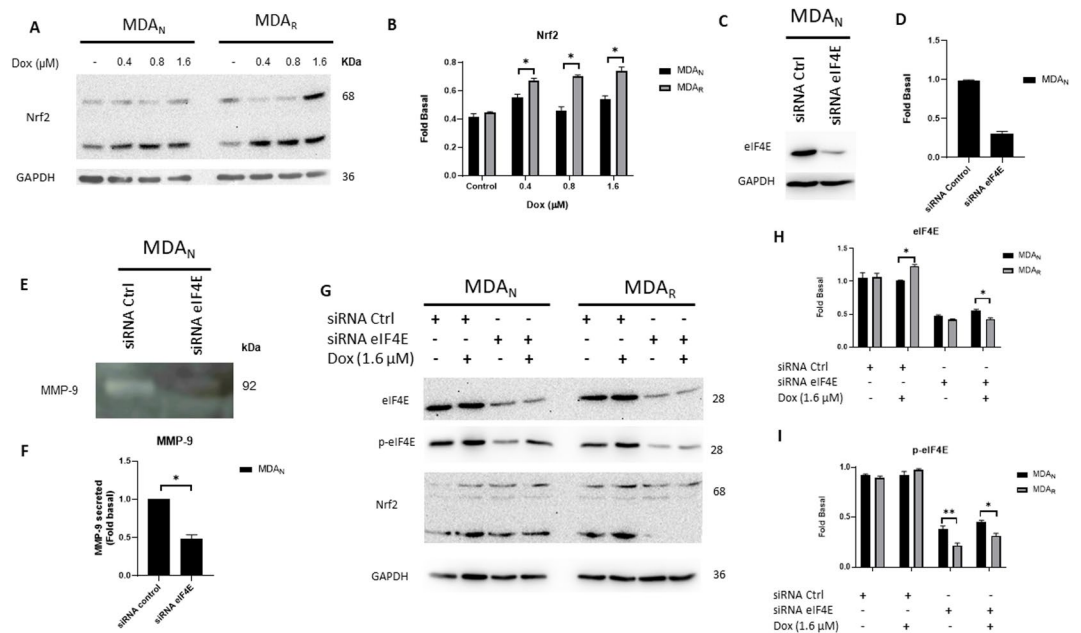
We next evaluated the protein levels of eIF4E, eIF4E-p<sup>Ser-209</sup>, and Nrf2 combined treatment with eIF4E siRNA and doxorubicin (1.6  $\mu$ M) for 12 h in both cell variants (Fig. 8G). Both MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> cells responded to siRNA treatment with a marked reduction in total eIF4E protein (Fig. 8G, H) and its phosphorylated form eIF4E-p<sup>Ser-209</sup> (Fig. 8G, I), with the effect being particularly pronounced in MDA<sub>R</sub> cells.

Importantly, under these same conditions, Nrf2 expression was also reduced in response to eIF4E knockdown, even in the presence of Dox (Fig. 8G). These results support the existence of a functional eIF4E/Nrf2 regulatory axis in doxorubicin-treated TNBC cells.

Interestingly, we have previously reported the involvement of Nrf2 in tamoxifen resistance in ER<sup>+</sup> breast cancer cells<sup>44</sup>, further reinforcing its role in treatment response across BC subtypes.

### Effect of eIF4E regulation mediated by the molecule 4E1RCat

As a complementary approach to studying eIF4E regulation, we evaluated the effect of the eIF4E inhibitor 4E1RCat on TNBC cellular variants. We evaluated a range of doses of 4E1RCat (0.5–4  $\mu$ M) on key cell processes, including cell migration using the wound closure assay, as well as MMP-9 secretion in MDA<sub>R</sub> cells. The results



**Fig. 8.** Nrf2 is associated with the eIF4E expression. (A) WB evaluated Nrf2 protein expression levels in MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> variants under increasing dox concentrations (0–1.6  $\mu$ M); (B) Densitometry analysis of Nrf2. (C) WB of control eIF4E expression using siRNA on MDA<sub>N</sub> cells with respective densitometric analysis (D). (E) MMP-9 activity was evaluated by zymography after treatment with siRNA eIF4E and densitometric analysis (F). (G) WB evaluated eIF4E, p-eIF4E, and Nrf2 expression under eIF4E siRNA and concomitant treatment with dox (1.6  $\mu$ M). Densitometric analysis of eIF4E (H) and p-eIF4E (I). Results showed three biological replicates mean and standard deviation ( $n = 3$ ,  $X \pm S.D.$ ). Data were statistically analyzed using one-way ANOVA and Newman–Keuls’s multiple comparison test, \*represents a  $p$ -value  $< 0.05$ , and \*\*represents a  $p$  value  $< 0.01$  concerning the control. GAPDH was used as a loading control for WB.

led to the selection of 3  $\mu\text{M}$  as the optimal dose for eIF4E inhibition (Sup. Figure 7). Therefore, to further explore the relationship between ABCB1 expression and eIF4E activity, we analyzed the effect of 4E1RCat in the context of Dox treatment (1.6  $\mu\text{M}$ ). As expected, Dox alone induced ABCB1 expression in both MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> cells, with a more pronounced effect in MDA<sub>R</sub> (Fig. 9A). Interestingly, co-treatment with 4E1RCat (3  $\mu\text{M}$ ) led to a decrease in ABCB1 expression only in MDA<sub>N</sub> cells. In contrast, expression remained elevated in MDA<sub>R</sub> cells despite treatment with the inhibitor (Fig. 9A).

These observations suggest that ABCB1 regulation in MDA<sub>R</sub> cells may be less sensitive to eIF4E inhibition, possibly due to sustained phosphorylation of eIF4E at Ser209. Supporting this hypothesis, we detected higher eIF4E-p<sup>Ser-209</sup> levels in MDA<sub>R</sub> cells compared to MDA<sub>N</sub> cells under both Dox (1.6  $\mu\text{M}$ ) and Dox + 4E1RCat (3  $\mu\text{M}$ ) treatments (Fig. 9B, C). This phenomenon indicates that the phosphorylation stage of eIF4E may play a pivotal role in maintaining ABCB1 expression in chemoresistant TNBC cells.

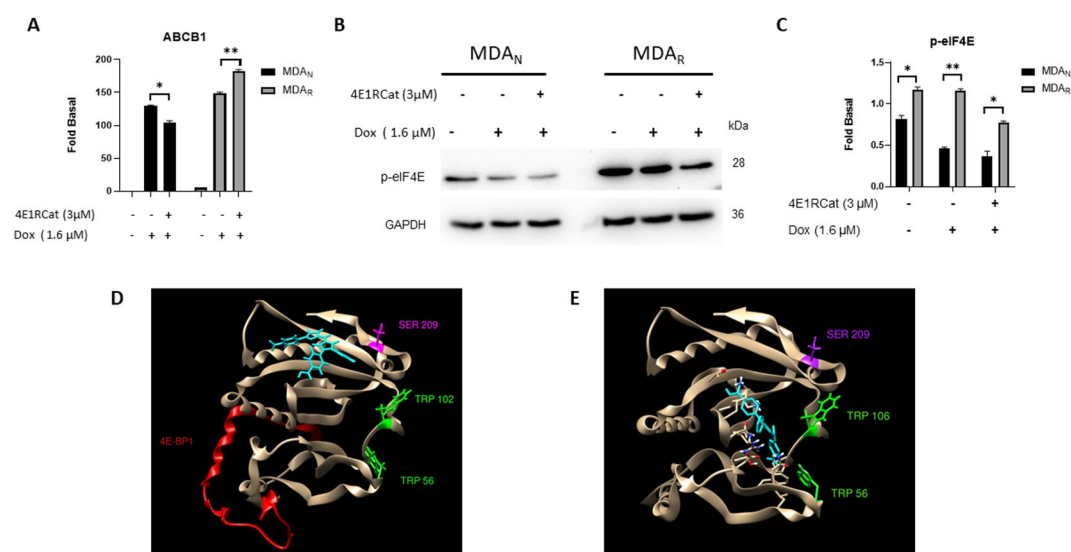
In silico docking simulations revealed that the binding site of 4E1RCat on the eIF4E structure (PDB: 4UED) shifts depending on the presence of the 4EBP1 peptide bound to the N-terminal region of eIF4E (Fig. 9D, E). The interaction between 4EBP1 and eIF4E is likely promoted under conditions of low 4EBP1 phosphorylation, as observed in MDA<sub>N</sub> cells treated with increasing concentrations of doxorubicin (1.6  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 4A, D).

When 4EBP1 was included in the docking simulation, 4E1RCat was found to bind near Ser209, a residue associated with eIF4E activation through phosphorylation (Fig. 9D). In contrast, when 4EBP1 was excluded, representing a condition akin to MDA<sub>R</sub> cells, where 4EBP1/2/3 phosphorylation prevents its binding to eIF4E; 4E1RCat was located near the cap-binding pocket, interacting with key residues such as Trp102 and Trp56 on the eIF4E structure (Fig. 9E).

These structural insights support the hypothesis that phosphorylation-dependent accessibility of eIF4E domains modulates the binding mode of 4E1RCat, potentially influencing its inhibitory efficacy in different TNBC cellular contexts.

## Discussion

TNBC is characterized by poor prognosis and frequent development of chemoresistance. To model this clinically relevant feature, we established a new strategy to generate a doxorubicin-resistant variant of the MDA-MB-231 TNBC cell line. By treating the parental line (referred to as MDA<sub>N</sub>) with the IC<sub>25</sub> dose of doxorubicin, we were able to develop a chemoresistant variant, MDA<sub>R</sub> (Fig. 1). The MDA<sub>R</sub> cells exhibited a 3.1-fold increase in IC<sub>50</sub> compared to MDA<sub>N</sub> cells, suggesting their resistant phenotype. Significantly, the IC<sub>50</sub> of doxorubicin in MDA<sub>N</sub> cells (0.619  $\mu\text{M}$ ) falls within the range reported in breast cancer patients (0.023–1.14  $\mu\text{M}$ )<sup>45</sup>. In contrast, the MDA<sub>R</sub> IC<sub>50</sub> (1.8  $\mu\text{M}$ ) exceeds this clinical range, further supporting its resistance status. This approach appears to provide an innovative platform for modeling acquired chemoresistance, particularly for compounds or regimens



**Fig. 9.** The eIF4E/ABCB1 axis in chemoresistance, the role of the 4E1RCat molecule. **(A)** Expression levels of ABCB1 in MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> cells under treatment with dox (1.6  $\mu\text{M}$ ) and 4E1RCat (3  $\mu\text{M}$ ) for 48 h through qPCR determination, GAPDH was used as a reference gene. **(B)** p-eIF4E expression levels evaluated by WB under dox (1.6  $\mu\text{M}$ ) and 4E1RCat (3  $\mu\text{M}$ ) concomitant treatment, MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> variants were treated for 48 h. **(C)** Densitometry analysis of p-eIF4E; Results showed three biological replicates' mean and standard deviation ( $n = 3$ ,  $X \pm \text{S.D.}$ ) and expressed as % of control; data were statistically analyzed using one-way ANOVA and Newman–Keuls's multiple comparison test \*\* represents a  $p$ -value  $< 0.01$  concerning the control. GAPDH was used as a control. **(D, E)** Molecular docking assay of eIF4E (PDB used 4UED) under 4E1RCat and concomitant interaction of 4E1RCat and 4EBP-1. Cyan: eIF4E, Green: Tryptophan, Red: 4E Binding Protein – 1.

with high cytotoxicity, wherein resistance development is often limited under standard culture conditions<sup>46</sup>. Our model could serve as a foundation for testing therapeutic strategies targeting resistance mechanisms in TNBC.

Evidence suggested improved doxorubicin handling in the MDA<sub>R</sub> variant compared to the parental MDA<sub>N</sub> cells (Fig. 2). Despite its well-documented side effects, doxorubicin remains a first-line anthracycline used in breast cancer treatment. However, while initially effective, the development of chemoresistance can reduce its efficacy and is often associated with increased tumor aggressiveness<sup>47</sup>. To explore this phenomenon, we performed a series of cell biology assays aimed at characterizing key features of resistance. Notably, TNBC is known for its high metastatic potential, a trait that is further exacerbated in cases of chemoresistance<sup>48</sup>.

The development of chemoresistance following prolonged exposure to chemotherapeutic agents is commonly associated with an enhanced ability of tumor cells to migrate and metastasize<sup>44,49</sup>. The data obtained in this study are consistent with these observations, as demonstrated by our *in vitro* experiments (Fig. 3). However, additional validation using *in vivo* models would be necessary to gain a more comprehensive understanding of the mechanisms involved.

The results indicate enhanced migratory activity in MDA<sub>R</sub> cells compared to the parental MDA<sub>N</sub> variant. Notably, low concentrations of doxorubicin (0.05–0.8 μM) promoted migration in MDA<sub>R</sub> cells. This finding is in agreement with previous reports showing that sub-cytotoxic doses of Dox can activate the Src signaling pathway, thereby promoting cell motility<sup>50</sup>. The concentrations used in this study are within the range reported in plasma samples from breast cancer patients<sup>43</sup>, suggesting clinical relevance. Importantly, invasive behavior and MMP-9 secretion were maintained in MDA<sub>R</sub> cells even under high Dox concentrations (0.8–1.6 μM) (Fig. 5), in contrast to the marked suppression observed in MDA<sub>N</sub> cells. This pattern was further supported by spheroid formation assays, in which MDA<sub>R</sub> cells retained the ability to form spheroids despite Dox exposure, whereas MDA<sub>N</sub> cells showed complete suppression (Sup. Figure 5).

Additionally, we evaluated doxorubicin internalization and elimination. MDA<sub>N</sub> cells showed a reduced capacity for drug efflux, as evidenced by lower levels of extracellular Dox. In contrast, MDA<sub>R</sub> cells retained greater viability and higher extracellular Dox levels following treatment, particularly at elevated concentrations (Fig. 2). These findings may indicate that MDA<sub>R</sub> cells have acquired adaptive mechanisms that counteract the cytotoxic effects of high Dox concentrations. One key contributor to this phenotype could be the ABCB1 transporter, which may mediate enhanced drug efflux and confer chemoresistance.

The implication of the ABC transporters as a determinant of chemoresistance, in this instance ABCB1 expression, was significantly induced by Dox in a dose-dependent manner, with MDA<sub>R</sub> cells exhibiting significantly greater upregulation in comparison with MDA<sub>N</sub> cells. This supports the notion that ABCB1 acts as a major mediator of Dox efflux and resistance. Molecular docking simulations confirmed a specific interaction between Dox and key residues in ABCB1's transmembrane domains, including Leu236, Glu243, and Lys826. These interactions were stabilized by hydrogen bonding and van der Waals forces, suggesting a high-affinity binding conformation. Further validation with Rhodamine 123, a known ABCB1 substrate, showed a partial overlapping, reinforcing the selectivity of Dox for this transporter. AutoDock Vina simulations revealed a stronger binding affinity for Dox (−8.977 kcal/mol) compared to Rhodamine 123 (−7.568 kcal/mol), which is consistent with its tighter docking profile. Importantly, molecular dynamics simulations over a 10- nanosecond trajectory supported these findings, revealing minimal ligand displacement and sustained retention of Dox within the transmembrane cavity.

Moreover, despite the importance of verapamil, the exact site where it binds to the ABCB1 structure has not been described. Importantly, we observed that the inhibition of ABCB1 with verapamil at the MDA<sub>R</sub> reduces the export of Dox. This process was coupled with cell viability (Fig. 7). A Molecular Docking assay supported this interpretation, revealing that Doxorubicin and verapamil bound to the same region of the ABCB1 binding pocket, which is consistent with the hypothesis that verapamil inhibits Doxorubicin efflux by competitively occupying the same site. Although we do not rule out the possibility that other transporters and Dox resistance mechanisms may be involved, the data underscore the likely importance of ABCB1, and therefore of the mechanisms that regulate its expression.

Results suggest that ABCB1 mediated drug efflux represents one axis of chemoresistance, which might be further reinforced by translational control mechanisms, such as eIF4E regulation and changes in 4EBP activity in the presence of doxorubicin. Therefore, we investigated how eIF4E is modulated in response to doxorubicin. Our data indicates that both eIF4E expression and its phosphorylated form (eIF4E-p<sup>Ser-209</sup>) were maintained as Dox concentration increased, particularly in the MDA<sub>R</sub> variant. This may suggest that eIF4E activity is preserved in chemoresistant cells under therapeutic stress. While our primary focus was on eIF4E, we acknowledge that further exploration of the MAPK signaling pathway, including p38/MNK activation<sup>50</sup>, could provide additional insight into the mechanisms sustaining eIF4E phosphorylation. In parallel, eIF4E regulation appears to be linked to a reduction in the phosphorylation of its modulatory binding proteins, 4EBP1/2/3, as evidenced by our data (Fig. 4A, D). These findings point toward an adaptive response in the eIF4F complex in MDA<sub>R</sub> cells, reflecting dynamic regulation in response to Dox treatment.

Moreover, our analysis of protein–protein interactions using the STRING database (<https://string-db.org/>)<sup>51</sup> supports the potential functional relevance of the MNK–eIF4E signaling axis in the context of chemoresistance. The interaction network highlights high-confidence associations among eIF4E, its upstream kinases MNK1 and MNK2, and the scaffolding protein eIF4G1, which facilitates eIF4E phosphorylation at Ser209. This post-translational modification has been implicated in the selective translation of mRNAs involved in cell survival and stress response pathways (Sup. Figure 6). Among the candidate downstream targets, Nrf2 emerges as a plausible effector, as previous studies have suggested its translation may be regulated by eIF4E activity<sup>16</sup>. In turn, Nrf2 is known to transcriptionally activate ABCB1, a key transporter associated with drug efflux and chemotherapy resistance<sup>52,53</sup>. This interaction patterns align with the model proposed in this study, in which sustained eIF4E

activity could contribute to increased ABCB1 expression via a Nrf2-dependent mechanism, ultimately reducing intracellular doxorubicin levels and contributing to the chemoresistant phenotype observed in MDA<sub>R</sub> cells.

Our data suggests that the translation factor eIF4E remains functionally active at elevated doxorubicin concentrations in MDA<sub>R</sub> cells, promoting the selective translation of targets such as Nrf2 and ABCB1. The sustained activity of the mTOR/eIF4E axis at 1.6  $\mu\text{M}$ , above clinically reported plasma concentrations, appears to correlate with increased cellular invasion (Fig. 5). Additionally, lipid overload has been proposed to potentiate these oncogenic processes<sup>13,54</sup>. In previous work, we demonstrated the role of eIF4E as a key regulator of protein synthesis and lipogenesis, establishing a link between eIF4E activity, mRNA processing, and carcinogenesis, with potential implications for chemoresistance. This hypothesis is further supported by the results of our eIF4E siRNA experiments, which showed that silencing eIF4E impairs downstream targets and reduces cellular invasion and survival pathways (Fig. 8), reinforcing its possible role as a central mediator of the chemoresistant phenotype.

As a complementary approach, we employed a small molecule-based regulatory strategy targeting eIF4E. Treatment with the eIF4E inhibitor 4E1RCat<sup>55</sup> further support the potential involvement eIF4E in chemoresistance mechanisms, as evidenced by changes in ABCB1 expression (Fig. 9). Additionally, our docking simulations provided further insight into the structural interactions between eIF4E, 4EBP1, and 4E1RCat. The results suggest that the presence of 4EBP1 promotes the localization of 4E1RCat near Ser209, a key regulatory site on eIF4E, thereby potentially inhibiting its activity. This observation is consistent with the experimental data presented in Fig. 9. Nonetheless, further validation using three-dimensional structural analyses, such as crystallography, would help to strengthen our understanding of the binding interactions and inhibitory mechanism of 4E1RCat on eIF4E.

4E1RCat inhibits the translation process by competing with the eIF4G binding site on eIF4E, thereby preventing the formation of the eIF4F complex. This mechanism allows for the direct evaluation of eIF4E functional involvement and its regulatory relationship with downstream proteins that rely on its activity<sup>55</sup>. Other molecules, such as Ribavirin, have shown similar effects on eIF4E function, although through indirect mechanisms<sup>56</sup>. Our findings support the activation hypothesis of the eIF4E–Nrf2–ABCB1 axis in MDA<sub>R</sub> cells, which may contribute to the observed chemoresistance phenotype. Previous data from our group have also indicated a Nrf2-dependent transition from an ER<sup>+</sup> phenotype to a TNBC-like profile in response to tamoxifen-derived metabolites<sup>44</sup>. Building on this evidence, our team is currently developing Nrf2 inhibitors through in silico screening and molecular docking approaches using a large chemical compound library. These efforts aim to identify compounds capable of targeting Nrf2 as a strategy to overcome doxorubicin resistance in TNBC MDA<sub>R</sub> cells (personal communication).

An additional therapeutic strategy might involve the concomitant inhibition of eIF4E and MNK kinases, which could effectively disrupt eIF4E function and allow for a more precise assessment of its impact on ABCB1 expression. Alternatively, the use of Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) represents a promising approach to selectively degrade eIF4E, thereby enabling functional studies on the eIF4E–Nrf2–ABCB1 axis. Such strategies could provide valuable insights into the translational regulation underlying doxorubicin resistance in TNBC, supporting the development of targeted therapeutic interventions.

Our research team plans to further evaluate the eIF4E–Nrf2–ABCB1 axis in *in vivo* models to validate the functional relevance of our findings. We will use the BALB/c murine model, in which 4T1 cells will be orthotopically inoculated. To assess the specific role of eIF4E, we will employ CRISPR-Cas9 genome editing to generate eIF4E knockout in 4T1 cells, enabling the evaluation of its impact on chemoresistance and metastatic potential. These experiments are expected to provide essential validation of our *in vitro* observations.

Specifically, our results suggest that sustained eIF4E expression in MDA<sub>R</sub> cells is associated with the enhanced translation of the drug efflux transporter ABCB1, contributing to reduced intracellular doxorubicin accumulation. Therefore, our findings point toward the involvement of the eIF4E–Nrf2–ABCB1 axis in chemoresistance and identify potential molecular targets for both pharmacological and genetic modulation. To provide an integrative perspective, Fig. 10 summarizes the main mechanisms proposed in this work, highlighting the interplay between eIF4E activation, Nrf2 regulation, and ABCB1-mediated efflux. This schematic representation offers a visual overview of our proposed model of chemoresistance, facilitating the interpretation of how translational control and stress response pathways converge in TNBC.

## Methods

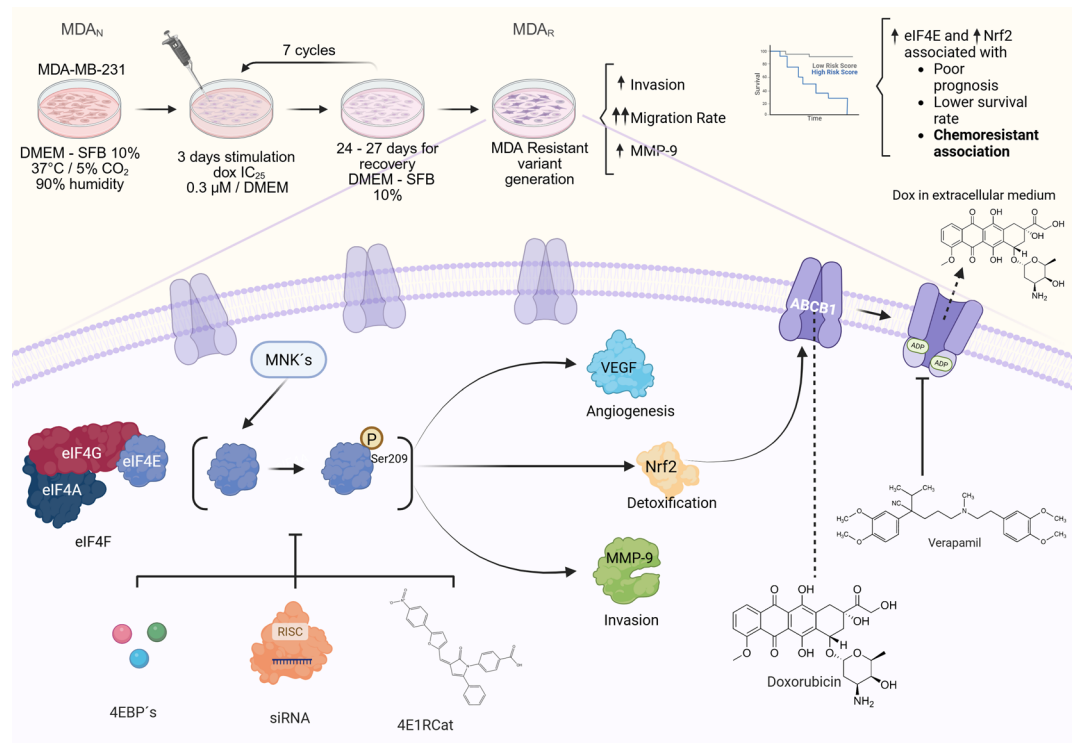
### Cell culture

The triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 from the American Type Culture Collection (ATCC HTB-26) was used as the parental cell line to generate the doxorubicin-resistant cell variant and the internal control to perform comparative studies. Unless otherwise stated, cells were proliferated in a DMEM medium supplemented with fetal bovine serum (FBS) and 10% and antibiotics (50 U/mL penicillin and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin).

### Generation of the doxorubicin-resistant cell variant

In this work, we decided to evaluate the MDA-MB-231 cell line since it is classified as a mesenchymal stem-like cell, which allows us to study the molecular phenomena associated with chemoresistance<sup>57</sup>. Then, we implemented three protocols to generate the doxorubicin-resistant cell variant. The first consisted of treatment with increased concentrations of doxorubicin, with an initial dose of 0.05  $\mu\text{M}$ . Treatment periods of 4–6 days were performed, and a recovery period of 20–30 days was made. In this case, the protocol was based on the experimental approach established by García-Gonzalez et al.<sup>54</sup> with modifications.

In the second one, the IC<sub>50</sub> of the parental cell line was confirmed (0.6  $\mu\text{M}$ ) by performing a dose-response assay using increasing concentrations of doxorubicin (0–3.2.2  $\mu\text{M}$ ). Later, cells were treated with half-maximal



**Fig. 10.** Integrative model of the eIF4E–Nrf2–ABCB1 axis in doxorubicin resistance. Schematic summary of the proposed mechanism by which sustained eIF4E activation in MDA<sub>R</sub> cells promotes the selective translation of Nrf2 and ABCB1, enhancing antioxidant response and drug efflux. The convergence of translational control and stress-adaptive signaling reduces intracellular doxorubicin accumulation, thereby reinforcing the chemoresistant phenotype in triple-negative breast cancer cells.

inhibitory concentration IC<sub>50</sub> (0.6 μM of doxorubicin) for 3 days and a recovery period of 3–4 weeks; this protocol was performed seven times. However, for this protocol, only the IC<sub>50</sub> value was suitable. Finally, in the third protocol (Fig. 1A), the doxorubicin-resistant cells obtained were reached using treatments with the doxorubicin IC<sub>25</sub> (0.3 μM) for 72 h and a recovery period of 24–27 days. This treatment scheme was implemented for 7 cycles. Cells were maintained under a low dox concentration (15 nM) during the recovery and proliferation periods. This variant generated under the scheme of IC<sub>25</sub> was named MDA<sub>R</sub>, and as a control, we evaluated the parental MDA-MB-231 cells denominated as MDA<sub>N</sub>.

### Cell viability assays

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assays were used with a modification to the protocol of Hernandez-Valencia et al.<sup>46</sup> to evaluate the chemoresistance. Proliferating cells were seeded in 24-well plates at a density of 40,000 cells per well with 500 μL of supplemented DMEM medium for 24 h at 37 °C/5% CO<sub>2</sub>. Cell cultures were maintained in a non-supplemented DMEM medium for 24 h. Then, cell cultures were treated with increasing doxorubicin concentrations (0.05–6.4 μM) for 48 h. In addition, the effect of concomitant treatment of Dox (1.6 μM) and verapamil (10 μM) for 24 h was characterized. Later, 250 μL per well of MTT solution (0.5 mg/mL of MTT dissolved in non-supplemented DMEM medium) was added, and the plate was incubated at 37 °C/5% CO<sub>2</sub> for 3 h. The medium was removed, and the cell monolayer was lysed with 250 μL of DMSO, collected in 1.5 mL conical tubes, and centrifuged at 2504 *xg* for 10 min at 20 °C. Absorbance measures were collected at 595 nm.

### Doxorubicin internalization by cytometer analysis

Cells were incubated under several treatments with doxorubicin in a DMEM medium for 24 h, with a previous fasting period of 24 h. Next, the cells were washed twice with PBS 1X. The monolayer recovered in PBS (300 μL), and the cell suspension was mixed gently. Cellular characterization was performed in a Beckman-Coulter cytometer Cytoflex (Pasadena, CA, USA); 15,000 events were characterized using the PC7-A filter to record doxorubicin-associated fluorescence, and median fluorescence intensity was used for analysis<sup>37,58,59</sup>.

### Dox quantification in extracellular media

Cell cultures were grown to reach a confluence of 90% in the complete DMEM medium. Cultures were fasted for 24 h with a non-supplemented medium. Stimuli with increasing dox concentrations (0–1.6.6 μM) were prepared in OptiMEM medium, low in phenol-Red. Cells were incubated for 24 and 48 h. Likewise, we performed experiments under the treatment with verapamil molecule (10 μM), a reported ABCB1 inhibitor; we evaluated

its effect on Dox cellular exportation. Supernatants were collected and centrifuged at 3170 xg at 4 °C for 10 min, for cellular detritus elimination. Supernatants were collected and centrifuged at 3170 x g at 4 °C for 5 min. The supernatant was collected and evaluated in a CaryEclipse Variant fluorometer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) with a 470 nm and 595 nm excitation and emission wavelength, respectively. A standard curve was constructed to ascertain the concentration.

### Wound-healing migration assays

The effect of doxorubicin chemoresistance on migration was evaluated by wound healing assay as described by Leal-Orta et al.<sup>60</sup>. Cells were seeded in 6-well dishes at a density of 200,000 cells per well and incubated at 37 °C/5% CO<sub>2</sub> for 48 h until complete confluence was reached. The medium was removed, and 1 mL of non-supplemented DMEM medium was plated for 24 h. Before stimulation, cells were pretreated with mitomycin-C for 2 h (8 µg/mL). Wound healing was performed using a sterile 200 µL tip, two washes with PBS were performed, and cells were incubated for 48 h with several treatments. Positive control DMEM medium supplemented with 10% FBS and negative control with non-supplemented DMEM were included. After 48 h, supernatant media was collected for zymogram assays, and the cells were fixed with cold methanol for 10 min under gentle agitation at 4 °C. Methanol was removed, and the cells were stained with Coomassie blue for 10 min under gentle agitation at 4 °C. Final washes were performed with cold PBS and observed under an inverted microscope.

### Invasion assays

The modified transwell method performed invasion experiments in 24-well plates containing 12 cell culture inserts with 8 µm pore size (NEST, Wuxi Nest Biotechnology Co. Jiangsu, China). Briefly, 50 µL of BD Matrigel (Corning, Somerville, MA, USA) was added into culture inserts and maintained at 37 °C for 45 min. MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> cells were plated at 1 × 10<sup>5</sup> cells per insert in serum-free DMEM on the top chamber. The lower chamber contained 600 µL DMEM and FBS 10% with the doxorubicin range treatment concentration (0–1.6.6 µM). DMEM medium with FBS 10% was used as a positive control; Boyden chambers were incubated for 48 h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Then, cells and matrigel on the upper surface of the membranes were removed with cotton swabs, and the cells on the lower surface of the membrane were washed and fixed in methanol for 5 min<sup>61</sup>; three biological replicates were performed for statistical analysis.

### qPCR

MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> cellular variants under 90% confluence were treated under the specific schemes. Then, total RNA from cellular variants was obtained with Trizol reagent, following the supplier's instructions. cDNA was synthesized using 1 µg of RNA and the Primer Script RT-PCR Kit (Takara Inc, Tokyo, Japan). cDNA concentration was standardized for qPCR with the PowerUp Sybr Green Master Mix 2X (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions, and 4 µL of the resultant cDNAs were used for each PCR reaction (62). Primers sequences were ABCB1 forward 5'-GCCAGCTGAACTCCTTAGAC-3', ABCB1 reverse 5'-GATTCGTGCACAGCAGCA-3', ABCC1 forward 5'-GGCTCAAGGAGTATTCAGAG-3', ABCC1 reverse 5'-CCATCG ATGATGATCTCTCC-3', GAPDH forward 5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT3', and GAPDH reverse 5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT3'. qPCR reactions were performed in triplicate using an ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystem); data were analyzed using the 2-ΔΔCt method with GAPDH as a reference calibrator and reported as fold change.

### Immunoprecipitation (IP) assays

MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> cell cultures were treated under an increasing doxorubicin concentration range (0–1.6.6 µM). For these experiments, 250 µg of protein cell lysates were used. For the total protein lysates, 2 µL of anti-eIF4E (sc-9976) was employed. All samples were incubated for 3 h at 4 °C with mild agitation. Further, 10 µL of protein A/G plus agarose (sc-2003) was added, and incubation was maintained for 12 h at 4 °C with mild agitation. Then, samples were centrifuged at 1,409 xg for 5 min at 4 °C. The supernatant was discarded. The obtained pellets were resuspended and washed with mild agitation using STE 1x buffer (TBS, EDTA 100 mM, NP40 10%), and centrifugation at 1,409 x g for 5 min was made. This process was performed twice. Next, 40 µL of Laemmli buffer 1x was added to the pellet, mild mixing, and heated for 2 min at 90 °C. The solution was centrifuged at 1,409 x g for 3 min. Immune complexes were evaluated, as well as SDS-PAGE, PVDF transference, and western-blot identification by processing 20 µL of the supernatant samples. GAPDH was used as a loading protein.

### Molecular docking

The atomic coordinates of the protein ABCB1, Protein Data Bank (PDB) ID: 7A69, with a resolution of 3.2 Å, were used for molecular docking experimentation. The structure of doxorubicin (CID 31703) and verapamil (2520) was obtained from the PubChem database. The protein structure was prepared; water and small molecules were removed. Ligands and proteins were 3D protonated, and energy was minimized using a Molecular Operating Environment (MOE) with default parameters (Placement: Triangle Matcher, Rescoring 1: London G, AMBER99 forcefield). Each ligand was generated by many different conformations, and the protein was visualized using the ligand interactions implemented in MOE. A similar strategy was used for ABCC1 characterization (PDB 6UY0) with doxorubicin. For the characterization of the eIF4E factor, the PDB structure 4UED was evaluated, including the interaction with 4E-BP1 and the small molecule 4E1RCat (CID 1619554). Docking results are analyzed using the S-score values.

The S-score in the Molecular Operating Environment (MOE) is a composite scoring function used to estimate the binding affinity between a ligand and a protein target during molecular docking simulations. It integrates multiple energetic terms, including van der Waals interactions, electrostatics, hydrogen bonding, desolvation, and torsional strain, to approximate the free energy of binding. The score is expressed in arbitrary

units correlating with binding strength, where more negative values suggest more favorable ligand-receptor interactions.

AutoDock Vina (version 1.2.7). The crystal structure of human ABCB1 is the same as MOE and was prepared by removing water molecules and non-essential co-crystallized ligands. Polar hydrogens were added, and Gasteiger charges were assigned using AutoDock Tools 1.5.7 (ADT). Ligands, including Doxorubicin and Rhodamine 123, were prepared in their energy-minimized conformations, and torsional flexibility was defined within ADT.

A grid box was defined to encompass the transmembrane substrate-binding region of ABCB1, with dimensions of  $73 \times 92 \times 82$  Å. Docking was performed using default Vina parameters with an exhaustiveness level of 8, and the top-scoring binding pose (lowest binding free energy) was selected for further analysis. Binding affinities were recorded in kcal/mol, and ligand-protein interactions were visualized using MOE.

### SiRNA experimentation

Cells were seeded at a density of  $7.5 \times 10^4$  cells/plates and incubated overnight in a standard growth medium without antibiotics. eIF4E siRNA (h) (sc-35284) and control siRNA-A (sc-37007) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Transfection was performed according to the following conditions: 4 µL of siRNA was diluted on 50 µL of transfection medium (Solution A), on the other hand, the transfection reagent (3 µL) was homogenized with 50 µL of transfection (Solution B). Then, solution A was added to solution B, mixed kindly, and incubated for 30 min at room temperature. Next, 400 µL of transfection was added and mixed, and 500 µL of total solution was added per well. Cells were incubated at 37 °C for 6 h, and 500 µL of complete medium (2x) was added and incubated for 24 h. The medium was withdrawn, and 500 µL of complete medium (1x) for 12 h, subsequently dox treatment was added. After verifying the transfection efficiency by WB, experimentation with dox was performed using a final concentration of dox 1.6 µM and 12 h treatment.

### Zymography

MDA<sub>N</sub> and MDA<sub>R</sub> cell cultures were incubated under different treatments, and the conditioned medium was collected. Volumes of 40 µL non-heated conditioned medium samples were mixed with 5× sample buffer (0.313 M Tris pH 6.8, 10% SDS, 50% glycerol, and 0.05% bromophenol blue) and processed on 8% polyacrylamide gels copolymerized with gelatin (1% w/v). Gels were rinsed twice with 2.5% Triton X-100 and then incubated in a development buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, and 0.02% NaN<sub>3</sub>) for 48 h at 37 °C. Gels were fixed and stained with 0.25% Coomassie Brilliant Blue G-250 in 10% acetic acid and 30% methanol. Proteolytic activity was detected as clear bands against the background stain of the unprocessed substrate.

### GEPIA analysis

We used the GEPIA database to evaluate the potential implications of protein targets eIF4E and ABCB1 in breast cancer. We analyzed the mRNA expression levels of eIF4E (EIF4E coding gene, Gene ID: 1977) and ABCB1 (ABCB1 coding gene, Gene ID: 5243) and their relationship with overall survival in BC patients using GEPIA, which collects information from the The Cancer Genome Atlas (TCGA) and GTEx (Genotype-Tissue-Expression)<sup>41,63</sup>.

### KM-PLOT analysis

Similarly, we use the KM-plot database<sup>42</sup> to evaluate the implication of eIF4E protein (UniProt ID: P06730) expression and its relationship with survival TNBC patients and TNBC patients with dox treatment. We selected the TCGA-RPPA database for the KM analysis.

### Molecular dynamics (MD)

MD simulation was performed using the QwikMD 1.3 plugin<sup>64</sup> in VMD and the NAMD 2.14 simulation engine<sup>65</sup> to evaluate the stability of the ABCB1-Dox complex derived from molecular docking. The simulation was carried out in an explicit solvent to streamline the analysis and avoid the added complexity of embedding the transmembrane protein in a lipid bilayer. Harmonic positional restraints were applied to the Ca atoms of the protein throughout the simulation to preserve the overall architecture of the transmembrane pore in the absence of a bilayer membrane environment.

The ABCB1-Dox complex was solvated in a rectangular box of TIP3P water molecules with an 18 Å buffer, and the system was neutralized with Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions to achieve a physiological ionic strength of 0.15 M. The CHARMM36 force field was used for the ABCB1 protein. The Dox topology and parameters were generated using CHARMM-GUI<sup>66</sup> however, due to the structural complexity of this ligand, several parameters were missing or incorrect, including bond definitions, angles, dihedrals, and improper torsions, which all were manually corrected prior to simulation.

The ligand-receptor system was subjected to energy minimization (20,000 steps), followed by annealing in the NPT ensemble (0.24 ns, heating from 60 K to 298 K), and equilibration (1.0 ns) at 298 K and 1 atm using the Nosé-Hoover Langevin piston. A production MD run of 10 ns was then performed under NPT conditions at 298 K. The r-RESPA multiple time step scheme was used, with short-range interactions updated every single step and long-range electrostatics every two steps. A 2 fs integration time step was used, and long-range electrostatic interactions were computed using the particle mesh Ewald (PME) method. All bonds involving hydrogen atoms were constrained using the SHAKE algorithm. The analysis tools included in QwikMD were used to calculate RMSD.

### Data availability

Data is contained within the article.

Received: 28 February 2025; Accepted: 2 December 2025

Published online: 07 January 2026

## References

- Lukasiewicz, S. et al. Breast cancer—epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—An updated review. *Cancers* **13**. <https://doi.org/10.3390/cancers13174287> Preprint at (2021).
- Siegel, R. L., Giaquinto, A. N. & Jemal, A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J. Clin.* **74**, 12–49 (2024).
- Kunc, M., Biernat, W. & Senkus-Konefka, E. Estrogen receptor-negative progesterone receptor-positive breast cancer – Nobody's land or just an artifact? *Cancer Treatment Reviews* vol. 67 78–87 Preprint at (2018). <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.05.005>
- Kumar, P. & Aggarwal, R. An overview of triple-negative breast cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics* vol. 293 247–269 Preprint at (2016). <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3859-y>
- Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W. & Yu, S. C. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research* **22** <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5> Preprint at (2020).
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144** 646–674 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013> Preprint at (2011).
- Kannampuzha, S. & Gopalakrishnan, A. V. Cancer chemoresistance and its mechanisms: associated molecular factors and its regulatory role. *Med. Oncol.* **40**, 264 (2023).
- Palomeras, S., Ruiz-Martínez, S. & Puig, T. Targeting breast cancer stem cells to overcome treatment resistance. *Molecules* vol. 23 Preprint at. <https://doi.org/10.3390/molecules23092193> (2018).
- Fisusi, F. A. & Akala, E. O. Drug combinations in breast cancer therapy. *Pharm. Nanotechnol.* **7**, 3–23 (2019).
- Bai, X., Ni, J., Beretov, J., Graham, P. & Li, Y. Triple-negative breast cancer therapeutic resistance: Where is the Achilles' heel? *Cancer Letters* vol. 497 100–111 Preprint at. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.10.016> (2021).
- Nedeljković M, Damjanović A. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. *Cells*. 2019 Aug 22;8(9):957. doi: 10.3390/cells8090957
- An, J., Peng, C., Tang, H., Liu, X. & Peng, F. New advances in the research of resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 22 Preprint at. <https://doi.org/10.3390/ijms22179644>(2021).
- González-Ortiz, A., Galindo-Hernández, O., Hernández-Acevedo, G. N., Hurtado-Ureta, G. & García-González, V. Impact of cholesterol-pathways on breast cancer development, a metabolic landscape. *Journal of Cancer* vol. 12 4307–4321 Preprint at. <https://doi.org/10.7150/jca.54637> (2021).
- Malka-Mahieu, H., Newman, M., Désaubry, L., Robert, C. & Vagner, S. Molecular pathways: The eIF4F translation initiation complex-newopportunities for cancer treatment. *Clinical Cancer Research* vol. 23 21–25 Preprint at. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2362> (2017).
- Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* vol. 12 31–46 Preprint at. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059> (2022).
- Muñoz-Ayala, A. & Chimal-Vega, B. García-González, V. Translation initiation and its relationship with metabolic mechanisms in cancer development, progression and chemoresistance. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **132**, 111–141 (2022).
- Romagnoli, A. et al. Control of the eIF4E activity: structural insights and pharmacological implications. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 78 6869–6885 Preprint at. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03938-z> (2021).
- Peter, D. et al. Molecular architecture of 4E-BP translational inhibitors bound to eIF4E. *Mol. Cell.* **57**, 1074–1087 (2015).
- Maracci, C. et al. The mTOR/4E-BP1/eIF4E signalling pathway as a source of cancer drug targets. *Curr. Med. Chem.* **29**, 3501–3529 (2022).
- Yang, X., Zhong, W. & Cao, R. Phosphorylation of the mRNA cap-binding protein eIF4E and cancer. *Cell. Signal.* **73**, Preprintat<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109689> (2020).
- Zheng, J., Li, X., Zhang, C. & Zhang, Y. eIF4E Overexpression Is Associated with Poor Prognoses of Ovarian Cancer. *Analytical Cellular Pathology* **2020**. (2020).
- Tang, Y. et al. Overexpression of p-4EBP1 associates with peIF4E and predicts poor prognosis for non-small cell lung cancer patients with resection. *PLoS One* **17**(6): e0265465. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265465> (2022).
- Shveygert, M., Kaiser, C., Bradrick, S. S. & Gromeier, M. Regulation of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) phosphorylation by Mitogen-Activated protein kinase occurs through modulation of Mnk1-eIF4G interaction. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 5160–5167 (2010).
- Lee, S. C. et al. G-Quadruplex in the NRF2 mRNA 5' untranslated region regulates de Novo NRF2 protein translation under oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* **37**(1), e00122-16. <https://doi.org/10.1128/MCB.00122-16> (2017).
- Ma, Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* vol. 53 401–426 Preprint at (2013). <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>
- Almeida Lima, K. et al. Temozolomide Resistance in Glioblastoma by NRF2: Protecting the Evil. *Biomedicines* vol. 11 Preprint at. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11041081> (2023).
- Robertson, H., Dinkova-Kostova, A. T. & Hayes, J. D. Nrf2 and the ambiguous consequences of its activation during initiation and the subsequent stages of tumorigenesis. *Cancers (Basel)*. **12**, 1–48 (2020).
- de la Rojo, M., Chapman, E. & Zhang, D. D. NRF2 and the Hallmarks of Cancer. *Cancer Cell* vol. 34 21–43 Preprint at. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.022> (2018).
- Adinolfi, S. et al. The KEAP1-NRF2 pathway: targets for therapy and role in cancer. *Redox Biology* Vol. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102726> (2023). 63 Preprint at.
- Lin, T. Y., Cantley, L. C. & DeNicola, G. M. NRF2 rewires cellular metabolism to support the antioxidant Response. In A master regulator of oxidative Stress - The transcription factor Nrf2 (InTech, <https://doi.org/10.5772/65141>) (2016).
- Piska, K. et al. Comparative study on ABCB1-dependent efflux of anthracyclines and their metabolites: consequences for cancer resistance. *Xenobiotica* **53**, 507–514 (2023).
- Engle, K. & Kumar, G. Cancer multidrug-resistance reversal by ABCB1 inhibition: A recent update. *Eur. J. Med. Chem.* **239**, Preprintat<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114542> (2022).
- Ji, L. et al. Nrf2 pathway regulates Multidrug-Resistance-Associated protein 1 in small cell lung cancer. *PLoS One* **8**(5), e63404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063404> (2013).
- Tang, Y. C. et al. How to deal with frenemy NRF2: Targeting NRF2 for chemoprevention and cancer therapy. *Journal of Food and Drug Analysis* vol. 31 387–407 Preprint at. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.3463> (2023).
- Abd El-Aziz, Y. S., Spillane, A. J., Jansson, P. J. & Sahni, S. Role of ABCB1 in mediating chemoresistance of triple-negative breast cancers. *Biosci Rep* **41**(2):BSR20204092. doi:10.1042/BSR20204092 (2021).
- Miđragović, Đ. et al. Iodide analogs of arsenoplatins—potential drug candidates for triple negative breast cancers. *Molecules* **26**(17), 5421; <https://doi.org/10.3390/molecules26175421> (2021).
- González-Ortiz, A. et al. eIF4A/PDCD4 Pathway, a Factor for Doxorubicin Chemoresistance in a Triple-Negative Breast Cancer Cell Model. *Cells* **11**, (2022).
- Malekan, M. et al. VEGF/VEGFR axis and its signaling in melanoma: current knowledge toward therapeutic targeting agents and future perspectives. *Life Sci.* **345**, 122563 (2024).
- Jiang, H. & Li, H. Prognostic values of tumoral MMP2 and MMP9 overexpression in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* **21**(1), 149. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-07860-2> (2021).

40. Blukacz, L. et al. Inhibition of the transmembrane transporter ABCB1 overcomes resistance to doxorubicin in patient-derived organoid models of HCC. *Hepatol Commun* **8**(5), e0437. <https://doi.org/10.1097/HCG9.0000000000000437> (2024).
41. Tang, Z. et al. A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* **45**. GEPIA, W98–W102 (2017).
42. Györfi, B. Integrated analysis of public datasets for the discovery and validation of survival-associated genes in solid tumors. *Innovation* **5**(3), 100625. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2024.100625> (2024).
43. Elefantova, K., Lakatos, B., Kubickova, J., Sulova, Z. & Breier, A. Detection of the mitochondrial membrane potential by the cationic dye JC-1 in I1210 cells with massive overexpression of the plasma membrane ABCB1 drug transporter. *Int J. Mol. Sci* **19**(7), 1985. <https://doi.org/10.3390/ijms19071985> (2018).
44. Muñoz-Ayala, A. et al. Tamoxifen metabolites treatment promotes ERα + transition to triple negative phenotype in vitro, effects of LDL in chemoresistance. *Biosci Rep* **44**(8), BSR20240444. <https://doi.org/10.1042/BSR20240444> (2024).
45. Harahap, Y., Ardiningsih, P., Winarti, A. C. & Purwanto, D. J. Analysis of the doxorubicin and doxorubicinol in the plasma of breast cancer patients for monitoring the toxicity of doxorubicin. *Drug Des. Devel Ther.* **14**, 3469–3475 (2020).
46. Hernández-Valencia, J. et al. Lapatinib-Resistant HER2 + Breast cancer cells are associated with dysregulation of MAPK and p70S6K/PDCD4 pathways and calcium Management, influence of Cryptotanshinone. *Int J. Mol. Sci* **26**(8), 3763. <https://doi.org/10.3390/ijms26083763> (2025).
47. Mattioli, R. et al. Doxorubicin and other anthracyclines in cancers: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Mol. Aspects Med.* **93**, 101205 (2023).
48. Won, K. A. & Spruck, C. Triple-negative breast cancer therapy: current and future perspectives. *Int. J. Oncol.* **57**, 1245–1261 (2020).
49. Paramanatham, A. et al. Doxorubicin-resistant Tnbc cells exhibit rapid growth with cancer stem cell-like properties and Emt phenotype, which can be transferred to parental cells through autocrine signaling. *Int J. Mol. Sci* **22**(22), 12438. <https://doi.org/10.3390/ijms222212438> (2021).
50. Mohammed, S. et al. Sublethal doxorubicin promotes migration and invasion of breast cancer cells: role of Src family non-receptor tyrosine kinases. *Breast Cancer Research* **23**(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13058-021-01452-5>, (2021).
51. Szklarczyk, D. et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **47**, D607–D613 (2019).
52. Sadeghi, M. R. et al. Nrf2/P-glycoprotein axis is associated with clinicopathological characteristics in colorectal cancer. *Biomed. Pharmacotherapy.* **104**, 458–464 (2018).
53. Sajadimajid, S. & Khazaei, M. Oxidative stress and cancer: the role of Nrf2. *Curr. Cancer Drug Targets.* **18**, 538–557 (2017).
54. García-González, V. et al. Ceramide metabolism balance, a multifaceted factor in critical steps of breast cancer development. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 Preprint at. <https://doi.org/10.3390/ijms19092527> (2018).
55. Fang, C. et al. EIF4E-eIF4G complex Inhibition synergistically enhances the effect of Sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Drugs.* **32**, 822–828 (2021).
56. Tan, J., Ye, J., Song, M., Zhou, M. & Hu, Y. Ribavirin augments doxorubicin's efficacy in human hepatocellular carcinoma through inhibiting doxorubicin-induced eIF4E activation. *J Biochem. Mol. Toxicol* **32**(1), 10.1002/jbt.22007. <https://doi.org/10.1002/jbt.22007> (2018).
57. Park, J. et al. Using comparative proteomics to identify protein signatures in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Genomics Proteom.* **20**, 592–601 (2023).
58. dos Reis, S. B. et al. Mechanistic insights into the intracellular release of doxorubicin from pH-sensitive liposomes. *Biomedicine Pharmacotherapy* **134**, 110952. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110952> (2021).
59. de Amorim, Í. S. S. et al. APX2009 sensitizes hypoxic breast cancer cells to doxorubicin by increasing its accumulation and caspase-3/7-mediated apoptosis. *Breast Cancer Res. Treat.* <https://doi.org/10.1007/s10549-024-07512-6> (2024).
60. Leal-Orta, E., Ramirez-Ricardo, J., Cortes-Reynosa, P., Galindo-Hernandez, O. & Salazar, E. P. Role of PI3K/Akt on migration and invasion of MCF10A cells treated with extracellular vesicles from MDA-MB-231 cells stimulated with Linoleic acid. *J. Cell. Commun. Signal.* **13**, 235–244 (2019).
61. Oregel-Cortez, M. I. et al. Resistin induces migration and invasion in PC3 prostate cancer cells: role of extracellular vesicles. *Life* **13**(12), 2321. <https://doi.org/10.3390/life13122321> (2023).
62. Guevara-Olaya, L. et al. LDL Promotes Disorders in β-Cell Cholesterol Metabolism, Implications on Insulin Cellular Communication Mediated by EVs. *Metabolites* **12**(8), 754. <https://doi.org/10.3390/metabo12080754> (2022).
63. Lonsdale, J. et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nature Genetics* vol. 45 580–585 Preprint at. <https://doi.org/10.1038/ng.2653> (2013).
64. Ribeiro, J. V. et al. QwikMD - Integrative molecular dynamics toolkit for novices and experts. *Sci Rep* **6**, 26536. <https://doi.org/10.1038/srep26536> (2016).
65. Phillips, J. C. et al. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *Journal Chem. Physics* **153**(4), 044130. <https://doi.org/10.1063/5.0014475>, (2020).
66. Kim, S. et al. CHARMM-GUI ligand reader and modeler for CHARMM force field generation of small molecules. *J. Comput. Chem.* **38**, 1879–1886 (2017).

## Acknowledgements

The authors recognize the administrative support of Josue Villegas-Sandoval and Liliana García-Hernández. The authors recognize the antibody donations of Sta. Cruz Biotechnology Inc. (Antibodies anti-VEGF, anti-p-4E-BP1/2/3). The authors thank Dr. Nicolás Serafin-Higuera for the support in the flow cytometer experimentation.

## Author contributions

Formal analysis, O.G.H, A.L.M and M.R.I.; Investigation, H.F.G, B.C.V, A.P.C., A.M.A. and V.G.G; Methodology, H.F.G, B.C.V, A.P.C., A.M.A. and V.G.G; Resources, V.G.G; Writing – original draft, H.F.G and V.G.G; All authors reviewed the manuscript.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-025-31313-6>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to V.G.-G.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

© The Author(s) 2026

## 12.2 Coautoría de Artículo

Oregel-Cortez MI, **Frayde-Gómez H**, Quintana-González G, García-González V, Vazquez-Jimenez JG, Galindo-Hernández O. Resistin Induces Migration and Invasion in PC3 Prostate Cancer Cells: Role of Extracellular Vesicles. *Life (Basel)*. 2023 Dec 10;13(12):2321. doi: 10.3390/life13122321. PMID: 38137922; PMCID: PMC10744490.

## Article

# Resistin Induces Migration and Invasion in PC3 Prostate Cancer Cells: Role of Extracellular Vesicles

Mario Israel Oregel-Cortez <sup>1,2,3</sup> , Héctor Frayde-Gómez <sup>1,2,4</sup>, Georgina Quintana-González <sup>1,2</sup>,  
Victor García-González <sup>1,2</sup> , Jose Gustavo Vazquez-Jimenez <sup>5</sup> and Octavio Galindo-Hernández <sup>1,2,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21100, Baja California, Mexico; mario.israel.oregel.cortez@uabc.edu.mx (M.I.O.-C.); fraydeh@uabc.edu.mx (H.F.-G.); quintanag@uabc.edu.mx (G.Q.-G.); vgarcia62@uabc.edu.mx (V.G.-G.)
- <sup>2</sup> Laboratorio Multidisciplinario de Estudios Metabólicos y Cáncer, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21100, Baja California, Mexico
- <sup>3</sup> Facultad de Deportes, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21289, Baja California, Mexico
- <sup>4</sup> Hospital Regional de Especialidad No. 30, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexicali 21100, Baja California, Mexico
- <sup>5</sup> Laboratorio de Fisiología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21100, Baja California, Mexico; gustavo.vazquez@uabc.edu.mx
- \* Correspondence: octavio.galindo@uabc.edu.mx

**Abstract:** Resistin is an adipokine with metabolic and inflammatory functions. Epidemiological and translational studies report that an increase in plasma levels and tissue expression of resistin increases the aggressiveness of prostate tumor cells. Extracellular vesicles (EVs) are secreted constitutively and induced by cytokines, growth factors, and calcium and are found in multiple biological fluids such as saliva, serum, semen, and urine. In particular, EVs have been shown to promote tumor progression through the induction of proliferation, growth, angiogenesis, resistance to chemotherapy, and metastasis. However, the role of resistin in the migration, invasion, and secretion of EVs in invasive prostate tumor cells remains to be studied. In the present study, we demonstrate that resistin induces increased migration and invasion in PC3 cells. In addition, these phenomena are accompanied by increased p-FAK levels and increased secretion of MMP-2 and MMP-9 in resistin-treated PC3 cells. Interestingly, EVs isolated from supernatants of PC3 cells treated with resistin induce an increase in migration and invasion accompanied by high MMP-2 and MMP-9 secretion in an autocrine stimulation model. In summary, our data for the first time demonstrate that resistin induces migration and invasion, partly through the secretion of EVs with pro-invasive characteristics in PC3 cells.

**Keywords:** resistin; prostate cancer; extracellular vesicles; FAK; invasion



**Citation:** Oregel-Cortez, M.I.; Frayde-Gómez, H.; Quintana-González, G.; García-González, V.; Vazquez-Jimenez, J.G.; Galindo-Hernández, O. Resistin Induces Migration and Invasion in PC3 Prostate Cancer Cells: Role of Extracellular Vesicles. *Life* **2023**, *13*, 2321. <https://doi.org/10.3390/life13122321>

Academic Editor: Juan Pablo Rigalli

Received: 15 May 2023

Revised: 10 July 2023

Accepted: 20 July 2023

Published: 10 December 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Prostate cancer is a global public health problem. According to the Global Cancer Observatory, in 2020, more than 1 million new diagnoses were reported, resulting in the deaths of more than 375,000 men worldwide [1–3]. Prostate cancer is caused by mutations in tumor suppressor genes and oncogenes such as p53, Src, FAK, and Akt, resulting in uncontrolled growth and proliferation [4]. Although prostate cancer can originate from any prostate cell, 95% of tumors originate from luminal epithelial cells [5].

Evidence links obesity with the development of multiple types of cancer [6] because adipose tissue can secrete different molecules that can regulate metabolism [7]. In addition, obesity is associated with various pathologies such as hypertension, diabetes, and prostate cancer [8]. Evidence suggests that at least 20% of all tumors are caused by excess weight, causing a more aggressive disease [9]. Adipose tissue releases more than 20 different types of adipokines, including leptin, adiponectin, TNF- $\alpha$ , and resistin, which can promote

tumor growth, proliferation, and metastasis [10]. In obesity, the paracrine communication between adipocytes and cells of the immune system is altered due, among other factors, to the deregulation of adipokine secretion, leading to low-grade chronic inflammation. The increase or decrease in the secretion of hormones, growth factors, and adipokines derived from adipose tissue promotes tumor growth, proliferation, migration, and invasion, with subsequent metastasis. In particular, in prostate cancer, the adipokines leptin, visfatin, and resistin have been related as promoters of various stages of tumor progression. However, the molecular mechanisms involved have not been fully elucidated [11,12].

Resistin (an adipose tissue-specific secretory factor) is a protein rich in cysteine residues and was originally proposed as a link between obesity and diabetes. In humans, this adipokine is found in blood circulation (2–40 ng/mL) as an oligomer and is widely expressed and secreted by macrophages infiltrating visceral adipose tissue. In contrast, adipocytes and preadipocytes express minimal protein levels [13]. Structurally, resistin has several subunits that are held together by non-covalent interactions. This characteristic allows the origination of a multimeric complex consisting of hexamer-forming disulfide bonds. Resistin-mediated transduction pathways have been described in various cancer cells, including signaling through toll-like receptor 4 (TLR4) and activation of the PI3K/Akt/NFκB pathway. Activation of these pathways can cause a chronic inflammatory state to be maintained through the constant secretion of pro-inflammatory cytokines. This can lead to a favorable tumor microenvironment. Cytokines, in turn, can activate specific pathways such as MAPKs and JAK/STAT that will promote cellular responses such as tumor proliferation [13,14]. Likewise, resistin induces the activation of PI3K concomitant with the phosphorylation and activation of Akt, resulting in increased cell proliferation in prostate cancer cells [15].

Migration and invasion are associated with cancer pathophysiology, giving rise to metastasis. Migration is associated with cell motility promoted by the participation of proteins such as Arp2/3, WASP, and Cdc42 [10]. Integrins are transmembrane receptors that couple the extracellular matrix with the cytoskeleton. Therefore, they promote cell survival and migration and promote the activation/phosphorylation of FAK at the Y397 residue, which is associated with the metastasis process [16]. Additionally, FAK overexpression and amplification are associated with tumor progression, favoring migration, invasion, metastasis, and a poor prognosis. Gelatinases are enzymes that degrade extracellular matrix components, such as collagen. It has been observed that the overexpression and increase in the secretion of MMP-2 and MMP-9 are associated with processes such as invasion, metastasis, and a poor prognosis, resulting in key factors in tumor progression [17,18].

Extracellular vesicles (EVs) are a group of vesicles bounded by a lipid bilayer and secreted by multiple cell types, including exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies. EVs secreted by tumor cells have been related to different stages of tumor progression, such as proliferation, migration, invasion, angiogenesis, metastasis, and resistance to infection and chemotherapy [19]. EV secretion is a constitutive process present in multiple cell types. However, exogenous stimuli such as growth factors, epinephrine, and adenosine diphosphate induce an increase in secretion and the differential expression of associated molecules in EVs from different cancer cell lines. The cargo molecules present in EVs, including proteins, lipids, miRNA, mRNA, and DNA, are responsible for promoting the different stages of tumor development [20]. Therefore, the composition and function of EVs as intercellular information packets depend on various factors present in the tumor microenvironment (cytokines, hormones, and growth factors, among others) [19,20].

In this work, we show that treatment with resistin induces an increase in FAK phosphorylation levels and an increase in MMP-2 and MMP-9 secretion in PC3 cancer cells. In addition, resistin promotes increased migration and invasion of PC3 cells. Interestingly, EVs isolated from supernatants from PC3 stimulated with resistin promote migration and invasion in a model of autocrine cell communication. Therefore, our data for the first time indicate that resistin induces increased migration and invasion in PC3 cells. This is

accompanied by the secretion of EVs with cargo molecules that induce processes associated with metastasis.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals

Resistin, FAK antibody (sc-271126), anti-phospho-FAK antibody (Tyr-397, sc-81493), anti-CD63 antibody (sc-5275), anti-actin antibody, and agarose were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-Flotillin-2 antibody and basement membrane matrix (BD Matrigel) were obtained from BD Biosciences (Bedford, MA, USA).

### 2.2. Cell Culture

The PC3 prostate cancer cells were cultured in 100 mm Petri dishes with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 3.7 g/L sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum (FBS), and antibiotics in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37 °C. For experimental purposes, PC3 cells were starved in DMEM without FBS for 18 h before treatment with resistin.

### 2.3. Stimulation of PC3 Cancer Cells with Resistin

After starvation,  $8 \times 10^6$  PC3 cells (confluent cultures) were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), re-fed in DMEM without FBS, and then untreated or treated with resistin at various concentrations and times indicated. The stimulation was terminated by aspirating the conditioned medium.

### 2.4. Isolation of EVs from Conditioned Medium of PC3 Cells Stimulated with Resistin

PC3 cells were maintained and cultured in DMEM with 10% FBS (with serum EVs). Once the cultures reached 80–90% confluence ( $8 \times 10^6$  cells/dish), they were starved by removing this DMEM-FBS and replacing it with DMEM only (without FBS) for 18 h. At the end of this period, the cells were treated with and without resistin using only DMEM (without FBS) medium for 48 h. Therefore, our experimental conditions do not include the presence of FBS. Conditioned medium (supernatant) was collected from PC3 cells that were unstimulated and stimulated with resistin (25 ng/mL). Isolation of EVs was performed as described previously [21–23]. Briefly, the conditioned medium was centrifuged twice for 15 min at  $200 \times g$ . Supernatants were then sequentially centrifuged at  $600 \times g$  twice for 30 min, once at  $2000 \times g$  for 30 min, once at  $10,000 \times g$  for 30 min, and once at  $120,000 \times g$  for 75 min. Finally, the EVs were washed once with PBS 1X at  $120,000 \times g$  for 75 min. After centrifugation at  $120,000 \times g$ , the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 1X PBS ( $\approx 100 \mu\text{L}/\text{condition}$ ). The EV fractions were enriched in exosomes and microvesicles. Finally, the protein levels in the EV fraction were analyzed using the micro-Bradford protein assay.

### 2.5. Treatment of PC3 Cells with EV Fractions Isolated from Supernatants of PC3 Cells Stimulated with Resistin

Confluent cultures of PC3 cells were washed twice with PBS, re-fed in DMEM for 30 min, and then stimulated with EV fractions obtained from  $8 \times 10^6$  PC3 cells unstimulated or stimulated with resistin (25 ng/mL). Each condition was treated with  $30 \mu\text{g}/\text{mL}$  of EVs. EVs stimulation was terminated by aspirating the medium, and/or cells were solubilized in 0.5 mL of ice-cold RIPA buffer (1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 10 mM sodium pyrophosphates, 1 mM sodium orthovanadate, 100 mM NaF, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, 50 mM HEPES, pH 7.4). The micro-Bradford protein assay analyzed the protein concentration of each sample.

### 2.6. Western Blotting

Proteins ( $\approx 20 \mu\text{g}/\text{condition}$ ) were processed by PAGE under denaturing conditions with 10% gels and transferred to nitrocellulose membranes or, alternatively, PVDF. Membranes were stained with Ponceau red to confirm protein transfer to the membrane. Next,

the membranes were blocked with 5% non-fat dried milk in PBS pH 7.2/0.1% Tween 20 (wash buffer) and incubated with the indicated primary antibody at 4 °C overnight. The membranes were washed three or four times with the washing buffer for 15 min and incubated with the secondary antibody (horseradish peroxidase-conjugated) at room temperature. After incubation, the membranes were washed to remove excess antibodies and visualize the bands with ECL detection reagent. Autoradiograms were scanned or photographed with the ChemiDoc XRS+. The bands were analyzed with the ImageJ software (1.54c version, NIH, Bethesda, MD, USA), while the statistical analysis was performed with GraphPad Prism (version 8.0.2, 263, January 2019).

### 2.7. Scratch Wound Assay

Cultures of PC3 cells (100% confluent) were exposed to 12 µM mitomycin C to block cell proliferation.

Cell cultures were scratch-wounded using a sterile 200 µL pipette tip, washed twice with PBS, and re-fed with DMEM stimulated or unstimulated with resistin or EV fractions from  $8 \times 10^6$  PC3 cells stimulated or unstimulated with resistin. The progress of cell migration into the wound was photographed at the end of the experiment (48 h) using an inverted microscope coupled to a camera. Each experimental condition was repeated three times.

### 2.8. Zymography

Confluent cultures of PC3 cells were treated with resistin or EV fractions obtained from  $8 \times 10^6$  PC3 cells unstimulated or stimulated with 25 ng/mL resistin for 48 h (experimental condition), and conditioned medium was collected and concentrated using centricon filters (Millipore, Burlington, MA, USA). An equal volume of non-heated conditioned medium samples was mixed with 5X non-reducing sample buffer (2.5% SDS, 1% sucrose, and 4 µg/mL phenol red) without reducing agent and loaded onto 8% acrylamide gels copolymerized with gelatin at 1 mg/mL. Gels were rinsed thrice in 2.5% Triton X-100 and then incubated in incubation buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4 and 5 mM CaCl<sub>2</sub>) at 37 °C for 48 h. Gels were fixed and stained with a staining solution (0.25% Coomassie Brilliant Blue G-250 in 10% acetic acid and 30% methanol). The gels were washed twice with the destaining solution (40% methanol and 10% acetic acid) to remove the excess stain. Proteolytic activity was detected as clear bands against the background stain of the undigested substrate.

### 2.9. Invasion Assays

Invasion assays were performed by the modified Boyden chamber method in 24-well plates containing 12 cell culture inserts with 8 µm pore size (Costar, Corning Inc., Corning, NY, USA). Briefly, 30 µL of BD Matrigel was added to culture inserts and incubated for 30 min at 37 °C. Cells were plated at  $1 \times 10^5$  per insert in 100 µL serum-free DMEM in the top chamber. The lower chamber contained 600 µL DMEM with resistin (25 ng/mL) or EV fractions from PC3 cells unstimulated or stimulated with resistin. After 48 h of incubation, PC3 cells and the Matrigel were removed from the upper surface with cotton swabs, while the cells that invaded were fixed with 100% methanol for 5 min. Next, the cells were stained with 0.1% crystal violet in PBS. The dye was eluted with 500 µL of 10% acetic acid, and the absorbance at 600 nm was measured. Background values were obtained from wells without cells.

### 2.10. Spheroid Growth Assay (3D Culture)

The development of the spheroid assay was based on the protocol of Saraiva et al. [24], with some modifications. Briefly, 24-well plates were coated with 1.5% agarose dissolved in 1X PBS (400 µL/well). PC3 cell cultures (90% confluence) were trypsinized, and the cell suspension ( $1 \times 10^5$  cells/well) was placed on the agarose-coated wells. The spheroids were cultured under the indicated conditions (DMEM with 5% FBS alone or DMEM supplemented with 25 ng/mL resistin + 5% FBS) for seven days, changing the fresh

medium every 48 h. During the experiment, photos were taken on days 3, 5, and 7 with a camera-coupled microscope. The spheroidal area was analyzed with the ImageJ software (Bethesda, MD, USA; 1.54c version). For each time point, the areas of four spheroids were averaged. Statistical analyzes were performed using Student's *t*-tests.

### 2.11. Statistical Analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. Data were statistically analyzed using one-way ANOVA and Newman–Keuls's multiple comparison test. A statistical probability of  $p < 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Resistin Induces an Increase in the Migration in PC3 Cancer Cells

Resistin overexpression has been reported in high-grade tumor tissue compared with low-grade lesions and benign prostatic hyperplasia [15,25]. High-grade lesions are associated with a high metastatic capacity, involving cell migration and invasion [15,25]. Therefore, we decided to evaluate the effect of resistin on cell migration in PC3 cells by scratch wound assay. PC3 cell cultures were scratch-wounded and stimulated at different resistin concentrations (10, 25, 50, and 100 ng/mL) and 10% FBS as a positive control for 48 h. As observed in Figure 1A, resistin promotes an increase in the migration of PC3 cells, with a maximum migration at 25 ng/mL of resistin. Since a high migratory capacity of PC3 cells treated with resistin at 25 ng/mL was observed, we decided to use this condition for all subsequent experiments. FAK is a non-receptor tyrosine kinase that is overexpressed in prostate cancer and regulates processes such as migration and invasion by modulating the dynamics of focal adhesions. Therefore, we decided to evaluate the effect of resistin on the levels of Tyr-397 phosphorylation of FAK, indicative of maximum catalytic activity [26]. Cell lysates from PC3 cells stimulated with and without resistin at 25 ng/mL at the indicated times were obtained and processed by Western blotting with anti-p-FAK (Tyr-397), anti-FAK, and anti-actin antibodies as loading controls. Our data indicate that treatment of PC3 cells with resistin induces a time-dependent increase in FAK phosphorylation levels, with a maximum phosphorylation level at 60 min of treatment (Figure 1B). As an inhibitor of cell proliferation, they were pre-treated with mitomycin C (Figure S1).

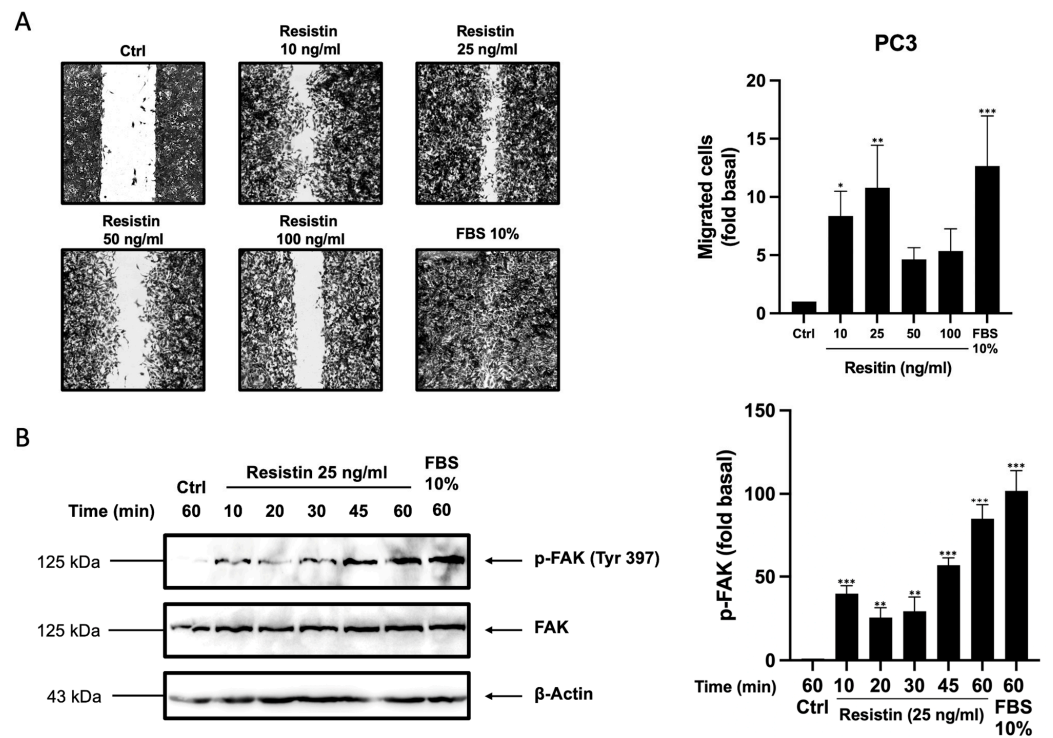
### 3.2. Resistin Promotes an Increase in the Invasion in PC3 Cells

MMP-2 and MMP-9 are gelatinases involved in the invasion and metastasis of cancer cells, and their synthesis and secretion are regulated by pathways such as MAPK and FAK/Src. In line with this notion, we determined the impact of resistin on the secretion of MMP-2 and MMP-9. Briefly, confluent PC3 cell cultures were treated with or without 25 ng/mL resistin for 48 h, at which time the conditioned medium was obtained and processed by zymography. As shown in Figure 2A, resistin-treated PC3 cells significantly increase the secretion of MMP-2 and MMP-9 in conditioned medium. High expression and secretion of MMP-2 and MMP-9 have been associated with increased prostatic tumor invasion, an important phenomenon for subsequent tumor metastasis [27,28]. Based on previous data indicating that resistin induces the secretion of MMPs, the role of resistin in tumor invasion was evaluated. The invasion assay was performed by the Boyden chamber method. The inserts were coated with Matrigel, and  $1 \times 10^5$  cells/well were placed, while in the lower chamber was added DMEM supplemented or not with resistin and FBS as a positive control. Our data indicate that resistin induces a significant increase in the invasive capacity of PC3 cells (Figure 2B).

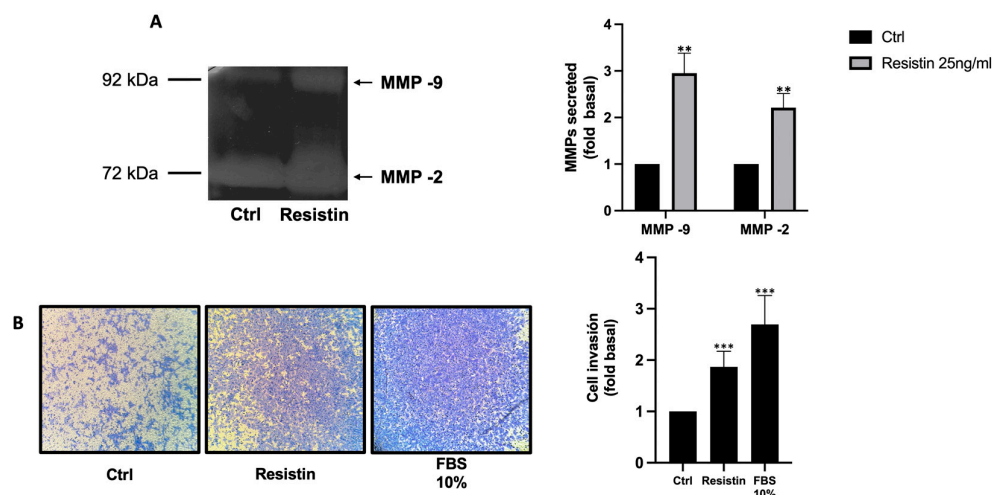
### 3.3. Resistin Induces an Increase in 3D Culture Spheroid Growth in PC3 Cells

Our previous data show that resistin increases PC3 cell invasion. Therefore, we decided to examine the role of resistin in spheroid formation (3D cultures) in PC3 cells. PC3 cells were seeded in 24-well plates coated with 1.5% agarose. PC3 cells ( $1 \times 10^5$  cells/well) were treated with 5% FBS or resistin (25 ng/mL) + 5% FBS for 7 days. Finally, photos were taken on days 3, 5, and 7. As shown in Figure 3, our data indicate that resistin + 5% FBS

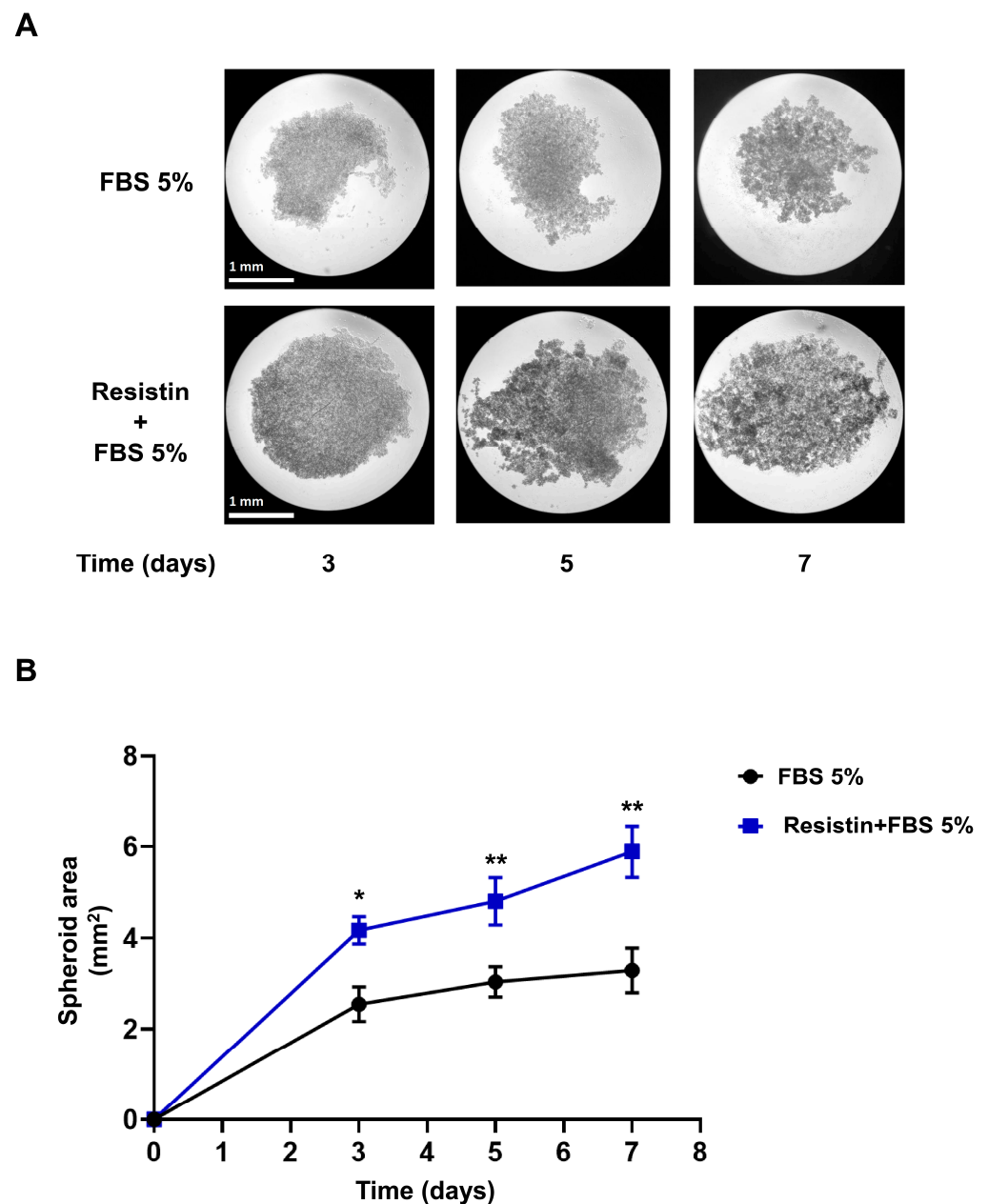
induces a significant growth of the spheroids, doubling the area of the spheroid on day 7 of treatment with respect to the condition with 5% FBS alone.



**Figure 1.** Resistin induces migration in prostate cancer cells. (A) Cell migration was evaluated through a scratch wound assay. Cells were treated with different concentrations of resistin, and the migration of cells was analyzed after 48 h. (B) Cell lysates of PC3 cells treated with or without resistin were analyzed with Western blotting to evaluate p-FAK and FAK levels and actin as a loading control. The graphs represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments and are expressed as the fold of migration above the control value. Asterisks indicate comparisons made to control. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 2.** Resistin increases PC3 cell invasiveness by upregulating MMP-2 and MMP-9 secretion. (A) PC3 cells were treated for 48 h with resistin, at which time a conditioned medium was obtained and processed through zymography to evaluate MMP-2 and MMP-9 secretion; (B) Boyden chamber method was used to evaluate PC3 cell invasion. Cells were seeded in the upper chamber precoated with Matrigel, and treatment with resistin was added to the lower chamber. After 48 h, cell invasion was analyzed. The graph represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments and is expressed as the fold of invasion above the control value. \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ .

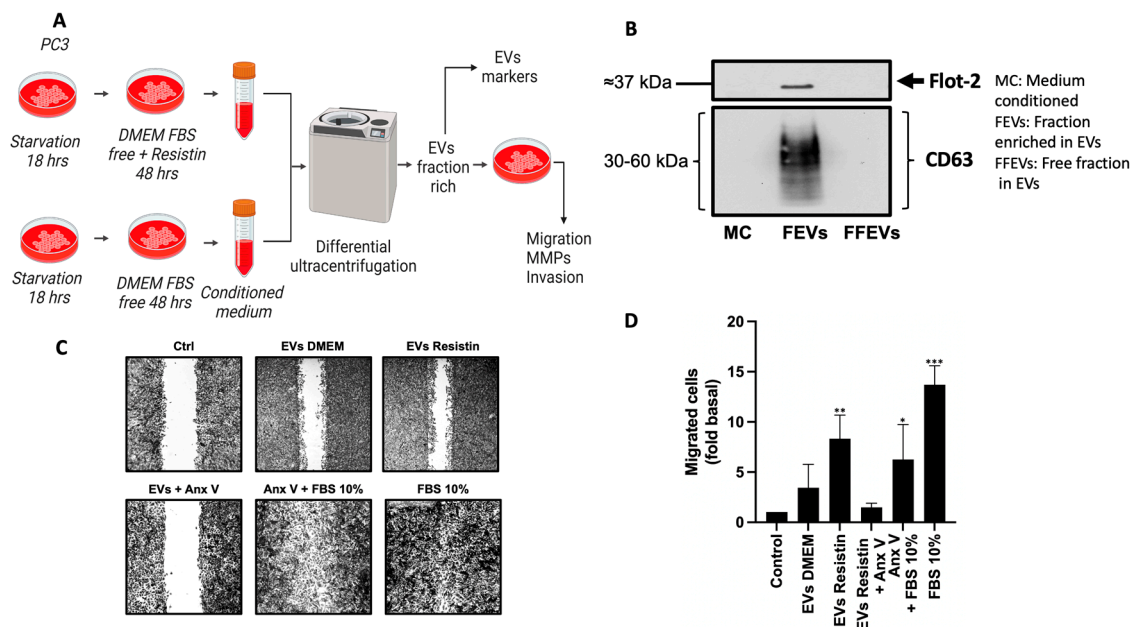


**Figure 3.** Resistin promotes an increase in the area of spheroids in PC3 cells. **(A)** 24-well plates were coated with 400  $\mu$ L of 1.5% agarose. Subsequently, about  $1 \times 10^5$  PC3 cells were placed per well/condition, which were treated with 5% FBS alone or with 5% FBS + resistin (25 ng/mL) for seven days. During the assay, follow-up was maintained by taking photos of the spheroids on days 3, 5, and 7. Finally, the spheroidal area was analyzed with the ImageJ software. **(B)** The graph represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments and is expressed as spheroid area ( $\text{mm}^2$ ). The scale bar is equal to 1 mm. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ .

### 3.4. Resistin Induces the Secretion of EVs That Promote PC3 Cell Migration

EVs are vesicles that contain multiple cargo molecules, which are determined according to the cell type secreting the EVs and the particular signals to which the cell is exposed [29,30]. Multiple factors, such as physical signals, hypoxia, low glucose levels, cytokines, and growth factors, induce EV secretion. Therefore, we decided to analyze whether resistin modulates the function of EVs in PC3 cells. First, we obtained a fraction enriched in EVs by differential centrifugation, according to the strategy schematized in Figure 4A. To verify that the EV fractions were properly obtained, they were processed by Western blotting using anti-CD63

and anti-flotillin-2 antibodies since these proteins are considered EV markers. The results show that we obtained an EVs fraction positive for flotillin-2 and CD63, indicating that these fractions are enriched in EVs (Figure 4B). EVs have been involved in tumor progression, participating in the modulation of the tumor microenvironment and favoring tumor growth, proliferation, migration, and invasion. However, the role of resistin in EV secretion remains to be studied. Thus, we decided to evaluate the effect of resistin on the secretion of EVs. PC3 cultures were treated without or with resistin for 48 h, a conditioned medium was obtained, and EV fractions were isolated (Figure 4A). We decided to study whether the EV fractions from PC3 cells treated with resistin regulate cell migration. Our data indicate that EVs derived from resistin-treated PC3 cells induce an increase in PC3 cell migration compared to migration promoted by EVs from PC3 cells not stimulated with resistin (Figure 4C). In this assay, we included control of uptake inhibition with EVs pre-treated with annexin V [31–33], a protein that binds to phosphatidylserine on EVs and regulates uptake. This indicates that EVs stimulate cell migration.

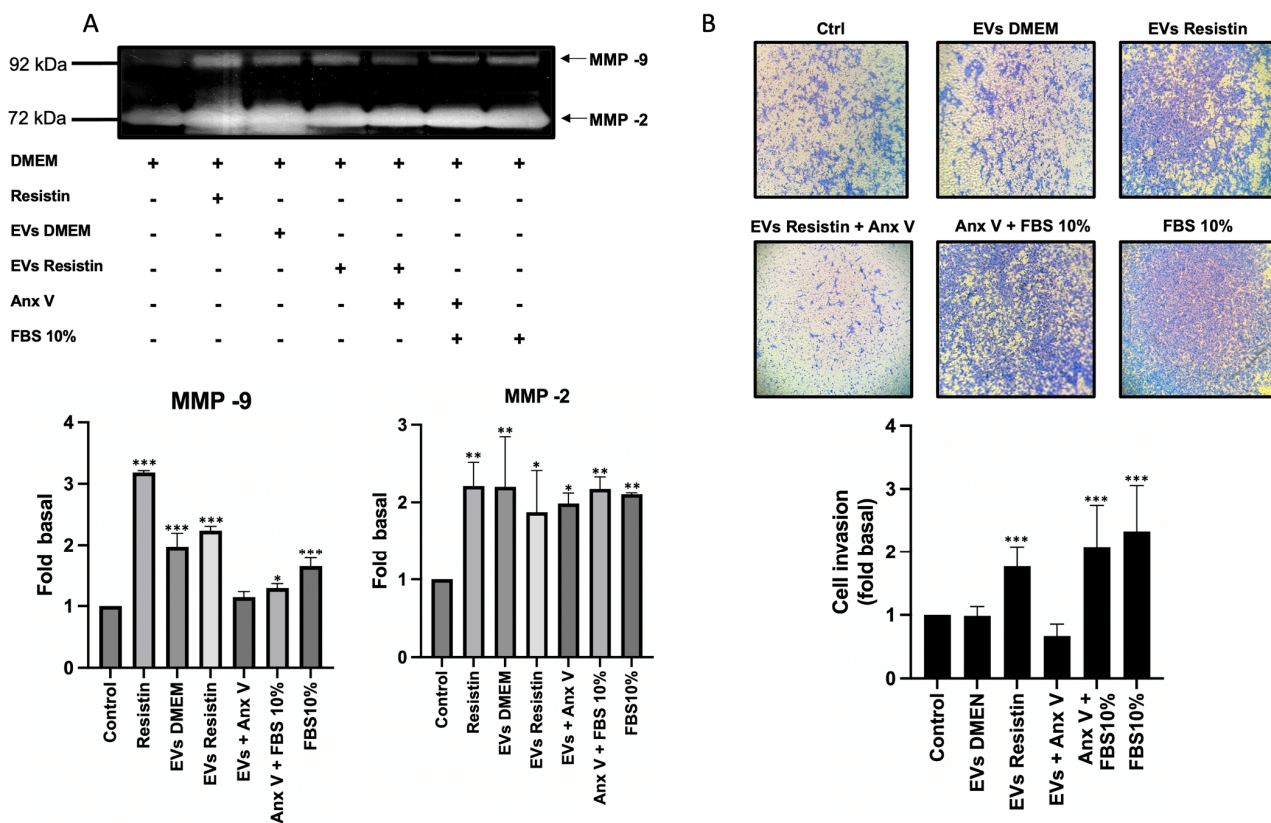


**Figure 4.** EVs derived from resistin-treated PC3 cells induce cell migration in PC3 cells. (A) Differential ultracentrifugation was used to isolate a fraction enriched with EVs. (B) EVs fraction was processed by Western blot assay using anti-flotillin-2 and anti-CD63 as EV markers; (C) cell migration was evaluated through scratch wound assay. Cells were treated with EVs derived from resistin-treated PC3 cells or without resistin treatment (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  per condition). After 48 h, the migration of cells was analyzed. (D) Graphs are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments and are expressed as the fold value of migrated cells above the control value. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 3.5. EVs Derived from Resistin Treatment Induce Cell Invasion

MMP-2 and MMP-9 are involved in the remodeling process of the extracellular matrix, increasing its secretion during invasion and tumor metastasis. Therefore, we determined whether EVs from PC3 cells regulate the secretion of MMPs. PC3 cultures were treated for 48 h with EVs isolated from the supernatant of PC3 cells treated with or without resistin. Subsequently, the supernatants were collected and analyzed by zymography. Consistent with our previous data, resistin induces the secretion of MMP-2 and MMP-9 compared to the control group (Figure 5A). In addition, treatment of PC3 cells with DMEM EVs induces the secretion of MMP-2 and MMP-9 to a lesser extent. Interestingly, treating PC3 cells with resistin EVs promotes the secretion of MMP-2 and MMP-9 without reaching the levels of DMEM EVs. We included EVs pre-incubated with annexin V, which significantly decreased the secretion of MMP-9 into the conditioned medium without affecting MMP-2

levels (Figure 5A). We decided to evaluate the EVs by zymography. Our data suggest that EVs carry MMP-9, with a slight increase in the EVs resistin fraction; while MMP-2 is not detectable in both fractions. As controls we added the conditioned medium and the free fraction of EVs. These data suggest that MMP-9 is an cargo enzyme in PC3 cell-derived EVs (Figure S2). Since the secretion of MMPs in the extracellular space is strongly associated with cancer invasion, we decided to evaluate the impact of EVs isolated from PC3 cells on cell invasion by Boyden chamber assays. The inserts were coated with Matrigel, placing PC3 cells on this extracellular matrix surface. In the lower chamber, EVs isolated from PC3 cells treated or not with resistin were placed. As shown in Figure 5B, EVs isolated from resistin-treated PC3 cells induce a significant increase in cell invasion compared to PC3 cells stimulated with EVs isolated from PC3 cells without resistin treatment or DMEM alone (control group).



**Figure 5.** EVs derived from resistin-treated PC3 cells induce cell invasion in PC3 in an autocrine way. (A) PC3 cells were treated for 48 h with EVs derived from resistin-treated PC3 cells or without resistin treatment. Supernatants were collected and analyzed by zymography to evaluate MMP-2 and MMP-9 secretion; (B) Boyden chamber method was used to evaluate PC3 cell invasion when stimulated with EVs derived from resistin-treated PC3 cells or without resistin treatment. Cells were seeded in the upper chamber precoated with Matrigel, and treatment with EVs was added to the lower chamber. After 48 h, cell invasion was analyzed. The graph represents the mean ± SD of three independent experiments and is expressed as the fold of invasion above the control value. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4. Discussion

Resistin is an adipokine involved in metabolic and inflammatory processes. Studies have indicated a relationship between high levels of circulating resistin with overweight and obesity. These conditions are associated with the development of diabetes, hypertension, dyslipidemia, metabolic syndrome, and an increased risk of cancer [34,35]. There is evidence that resistin increases aggressiveness in breast cancer, favoring processes such as tumor growth by increasing BCL-2 and BCL-xL activity, accompanied by a decrease

in cleaved caspase-7 and -3. Interestingly, resistin promotes breast cancer metastasis by increasing Src activity and phosphorylation and favoring PKC $\alpha$  translocation to the nucleus [36]. Resistin has been linked to tumor progression in patients with prostate cancer. In a study in which Korean patients participated, it was observed that as the Gleason score increased, there was an increase in the expression of resistin in prostate tumor tissue. This was accompanied by an increase in the proliferation and phosphorylation of Akt in the prostate cancer cell lines PC3 and DU-145 [15]. Therefore, we decided to evaluate whether resistin impacts other cellular processes associated with prostatic cancer progression. Here, we show that resistin induces an increase in migration and invasion in PC3 cells, concomitant with an increase in the secretion of MMP-2 and MMP-9 and high levels of FAK phosphorylation (Tyr-397) [15,35]. FAK overexpression (and high phosphorylation levels) is associated with increased tumor aggressiveness in processes such as migration, invasion, and metastasis [37–39]. It has been shown that the phosphorylation of FAK at its Tyr-397 residue is related to its maximum catalytic activity, activating proteins such as PI3K, Src, Grb7, and N-WASP [40,41]. Resulting in a high migratory and invasive capacity in cancer cells [41].

The secretion of MMP-2 and MMP-9 by cancer cells is an important mechanism of the cell invasion process since these enzymes degrade basal membrane components such as type IV collagen, a process associated with highly invasive and metastatic tumors [24]. The secretion of MMPs can be induced by the activation of the PI3K/Akt pathway, which leads to the activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B. The transcription factor NF $\kappa$ B regulates the expression of multiple proteins that modulate cell invasion, among which are Snail1 and 2, Twist1 and 2, vimentin, MMP-9, and MT1-MMP, which induces the activation of MMP-2 [24,25]. Our group confirmed that exposure of PC3 cells to resistin increases the secretion level of MMP-2 and MMP-9 in the conditioned medium, favoring invasion in prostate cancer cells.

EVs are involved in cellular communication processes as well as physiological processes. EVs contain in their membrane phospholipids, transmembrane proteins, and proteins that are components of lipid rafts. At the same time, inside the EVs, there are various intracellular proteins, second messengers, and genetic material that can be packaged in the EVs [42,43]. As a consequence, the properties and biological role of EVs may differ depending on the parent cell and the microenvironment to which they are exposed. EVs can fuse with the plasma membrane of target cells, transferring genetic information, second messengers, and receptors that can induce cell signaling, whereby the recipient cell acquires new functions [42,43]. The secretion of EVs by cancer cells represents a mechanism by which bioactive molecules such as nucleic acids, chemokine receptors, growth factor receptors, functional transcription factors, enzymes, and various intracellular proteins that modulate signaling pathways are transferred. In addition, EVs are secreted in response to a wide variety of stimuli, released at high concentrations by cancer cells. Thus, we hypothesized that resistin could regulate cell–cell communication mediated by EVs in the PC3 cells. Our results indicate that resistin induces the secretion of EVs that promote migration and invasion in PC3 cells, simulating a model of autocrine communication. Resistin-mediated EVs secretion can be supported by the fact that, in MDA-MB-231 invasive mammary cancer cells, resistin promotes an increase in intracellular calcium concentration, a phenomenon known to induce EV secretion [42,43]. EVs contain a variety of cargo molecules that promote invasion and metastasis, including PI3K/AKT,  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin, EGFRvIII, and a wide variety of miRNAs [36,37]. This strongly suggests that resistin-exposed PC3 cells secrete EVs with cargo molecules that induce invasion and metastasis, highlighting the importance of resistin in prostatic tumor progression. However, further assays are required to support these events. Our data indicate that the EVs-enriched fraction presents Flot-2 and CD63; however, it is necessary to characterize the EVs populations by electron microscopy and/or nanoparticle tracking analysis.

Resistin is a protein secreted by cells such as macrophages, and it regulates the inflammatory response by promoting the secretion of TNF-alpha and IL-12 in macrophages [44]. These

effects could be induced by their possible interaction with and activation of TLR4 [42,45]. It has been observed that the activation of TLR4 generates an increase in calcium release [46,47] from the endoplasmic reticulum to the cytoplasm (intracellular calcium). In cancer cells, resistin promotes phosphorylation of Src (a downstream target of FAK kinase) and increases intracellular calcium levels [42]. It has been shown that the FAK/Src pathway induces Akt activation in cancer cells. This results in increased secretion of MMP-2 and MMP-9, favoring proliferation, migration, invasion, and metastasis [48]. Particularly, an increase in intracellular calcium levels is a key event in microvesicle and exosome biogenesis and secretion by tumor cells [43]. In line with this notion, we hypothesize that, in PC3 cells, resistin interacts with and activates TLR4, increasing p-FAK and intracellular calcium levels. FAK activation promotes the phosphorylation of p-Src and the PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B pathway, which increases the secretion of MMP-2 and MMP-9, favoring proliferation, migration, and invasion in PC3 cells. Furthermore, the increase in intracellular calcium levels generates an increase in the EV biogenesis and secretion of cargo molecules that induce the invasion process of PC3 cells.

In summary, our data show for the first time that resistin triggers invasion in PC3 cells. In addition, PC3 cells exposed to resistin secrete EVs that induce migration and invasion in PC3 cells. This highlights resistin as an important adipokine in prostate cancer progression and metastasis.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/life13122321/s1>, Figure S1: Effect of resistin and mitomycin C on the proliferation of PC3 cells. Cell proliferation was evaluated at 48 h using the MTT assay. Figure S2: Analysis of EVs fractions by zymography. Protein levels in EVs were quantified by micro-Bradford protein assay. In each condition, 25  $\mu$ g of protein were analyzed. Figure S3: The effect of resistin EVs on migration is dependent on protein levels. Cell migration was evaluated through scratch-wound assay. Cells were treated with different protein levels from EVs fraction (30, 60 and 100  $\mu$ g/mL) and migration of cells was analyzed after 48 h.

**Author Contributions:** Conceptualization, O.G.-H.; data curation, M.I.O.-C.; formal analysis, M.I.O.-C. and G.Q.-G.; funding acquisition, O.G.-H.; investigation, M.I.O.-C. and V.G.-G.; methodology, M.I.O.-C. and H.F.-G.; project administration, O.G.-H.; resources, O.G.-H.; software, J.G.V.-J.; supervision, O.G.-H.; validation, J.G.V.-J.; writing—original draft, M.I.O.-C., G.Q.-G. and O.G.-H.; writing—review and editing, M.I.O.-C., H.F.-G., G.Q.-G., V.G.-G., J.G.V.-J. and O.G.-H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the 22nd Convocatoria Interna de Proyectos de Investigación (Internal Call for Research Projects, grant number 106/2/C/33/22) from the Universidad Autónoma de Baja California (UABC) and partially by the Convocatoria 2019 Apoyos para Adquisición y Mantenimiento de Infraestructura en Instituciones y Laboratorios de Investigación Especializada (CONAHCYT, grant number 300015).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data obtained throughout the experiments can be provided by O.G.-H. upon reasonable request.

**Acknowledgments:** The first author thanks the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) of Mexico for the Ph.D. scholarship. We gratefully acknowledge the Universidad Autónoma de Baja California for the funding provided to carry out this project.

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

## References

1. Murillo-Garzon, V.; Kypta, R. WNT signalling in prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* **2017**, *14*, 683–696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Ku, S.Y.; Gleave, M.E.; Beltran, H. Towards precision oncology in advanced prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* **2019**, *16*, 645–654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Wu, D.; Ni, J.; Beretov, J.; Cozzi, P.; Willcox, M.; Wasinger, V.; Walsh, B.; Graham, P.; Li, Y. Urinary biomarkers in prostate cancer detection and monitoring progression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2017**, *118*, 15–26. [[CrossRef](#)]

4. Sonpavde, G. The biology of prostate cancer metastases: Does oligo differ from polymetastatic? *Curr. Opin. Urol.* **2017**, *27*, 542–546. [[CrossRef](#)]
5. Pernar, C.H.; Ebot, E.M.; Wilson, K.M.; Mucci, L.A. The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2018**, *8*, a030361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kothari, C.; Diorio, C.; Durocher, F. The Importance of Breast Adipose Tissue in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5760. [[CrossRef](#)]
7. Unamuno, X.; Gomez-Ambrosi, J.; Rodriguez, A.; Becerril, S.; Fruhbeck, G.; Catalan, V. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. *Eur. J. Clin. Investig.* **2018**, *48*, e12997. [[CrossRef](#)]
8. Tripathi, D.; Kant, S.; Pandey, S.; Ehtesham, N.Z. Resistin in metabolism, inflammation, and disease. *FEBS J.* **2020**, *287*, 3141–3149. [[CrossRef](#)]
9. Avgerinos, K.I.; Spyrou, N.; Mantzoros, C.S.; Dalamaga, M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism* **2019**, *92*, 121–135. [[CrossRef](#)]
10. Kwakwa, K.A.; Sterling, J.A. Integrin alphavbeta3 Signaling in Tumor-Induced Bone Disease. *Cancers* **2017**, *9*, 84. [[CrossRef](#)]
11. Cancel, M.; Pouillot, W.; Maheo, K.; Fontaine, A.; Crottes, D.; Fromont, G. Interplay between Prostate Cancer and Adipose Microenvironment: A Complex and Flexible Scenario. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ahmad, A.E.; Mohammed, A.; Bhindi, B.; Richard, P.O.; Fadaak, K.; Leao, R.; Finelli, A.; Fleshner, N.E.; Kulkarni, G.S. Serum Adipokines as Predictors for the Outcome of Prostate Biopsies at Early Stage Prostate Cancer Diagnosis. *Cancer Manag. Res.* **2019**, *11*, 10043–10050. [[CrossRef](#)]
13. Codoner-Franch, P.; Alonso-Iglesias, E. Resistin: Insulin resistance to malignancy. *Clin. Chim. Acta* **2015**, *438*, 46–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Booth, A.; Magnuson, A.; Fouts, J.; Foster, M. Adipose tissue, obesity and adipokines: Role in cancer promotion. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2015**, *21*, 57–74. [[CrossRef](#)]
15. Kim, H.J.; Lee, Y.S.; Won, E.H.; Chang, I.H.; Kim, T.H.; Park, E.S.; Kim, M.K.; Kim, W.; Myung, S.C. Expression of resistin in the prostate and its stimulatory effect on prostate cancer cell proliferation. *BJU Int.* **2011**, *108*, E77–E83. [[CrossRef](#)]
16. Tapial Martinez, P.; Lopez Navajas, P.; Lietha, D. FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions. *Biomolecules* **2020**, *10*, 179. [[CrossRef](#)]
17. Karmakar, D.; Maity, J.; Mondal, P.; Shyam Chowdhury, P.; Sikdar, N.; Karmakar, P.; Das, C.; Sengupta, S. E2F5 promotes prostate cancer cell migration and invasion through regulation of TFPI2, MMP-2 and MMP-9. *Carcinogenesis* **2020**, *41*, 1767–1780. [[CrossRef](#)]
18. Taghizadeh, S.; Soheili, Z.S.; Sadeghi, M.; Samiei, S.; Ranaei Pirmardan, E.; Kashanian, A.; Zakeri, F.; Latifi-Navid, H.; Shams Najafabadi, H. sFLT01 modulates invasion and metastasis in prostate cancer DU145 cells by inhibition of VEGF/GRP78/MMP2&9 axis. *BMC Mol. Cell Biol.* **2021**, *22*, 30. [[CrossRef](#)]
19. Bebelman, M.P.; Smit, M.J.; Pegtel, D.M.; Baglio, S.R. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *188*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Ortiz, A. Extracellular vesicles in cancer progression. *Semin. Cancer Biol.* **2021**, *76*, 139–142. [[CrossRef](#)]
21. Galindo-Hernandez, O.; Serna-Marquez, N.; Castillo-Sanchez, R.; Salazar, E.P. Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with linoleic acid promote an EMT-like process in MCF10A cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2014**, *91*, 299–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Chhoy, P.; Brown, C.W.; Amante, J.J.; Mercurio, A.M. Protocol for the separation of extracellular vesicles by ultracentrifugation from in vitro cell culture models. *STAR Protoc.* **2021**, *2*, 100303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Livshits, M.A.; Khomyakova, E.; Evtushenko, E.G.; Lazarev, V.N.; Kulemin, N.A.; Semina, S.E.; Generozov, E.V.; Govorun, V.M. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17319. [[CrossRef](#)]
24. Saraiva, D.P.; Matias, A.T.; Braga, S.; Jacinto, A.; Cabral, M.G. Establishment of a 3D Co-culture With MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line and Patient-Derived Immune Cells for Application in the Development of Immunotherapies. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 1543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Chung, W.H.; Kim, T.H.; Chang, I.H.; Myung, S.C. Relation of Resistin to Prostate Cancer Differentiation and Aggressiveness. *Korean J. Urol.* **2009**, *50*, 540–546. [[CrossRef](#)]
26. Sulzmaier, F.J.; Jean, C.; Schlaepfer, D.D. FAK in cancer: Mechanistic findings and clinical applications. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 598–610. [[CrossRef](#)]
27. Klein, G.; Vellenga, E.; Fraaije, M.W.; Kamps, W.A.; de Bont, E.S. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g., acute leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2004**, *50*, 87–100. [[CrossRef](#)]
28. Xiao, L.J.; Lin, P.; Lin, F.; Liu, X.; Qin, W.; Zou, H.F.; Guo, L.; Liu, W.; Wang, S.J.; Yu, X.G. ADAM17 targets MMP-2 and MMP-9 via EGFR-MEK-ERK pathway activation to promote prostate cancer cell invasion. *Int. J. Oncol.* **2012**, *40*, 1714–1724. [[CrossRef](#)]
29. Zhang, L.; Yu, D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2019**, *1871*, 455–468. [[CrossRef](#)]
30. Bebelman, M.P.; Janssen, E.; Pegtel, D.M.; Crudden, C. The forces driving cancer extracellular vesicle secretion. *Neoplasia* **2021**, *23*, 149–157. [[CrossRef](#)]

31. Catalano, M.; O'Driscoll, L. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: A review of EV inhibitors. *J. Extracell. Vesicles* **2020**, *9*, 1703244. [[CrossRef](#)]
32. Galindo-Hernandez, O.; Gonzales-Vazquez, C.; Cortes-Reynosa, P.; Reyes-Urbe, E.; Chavez-Ocana, S.; Reyes-Hernandez, O.; Sierra-Martinez, M.; Salazar, E.P. Extracellular vesicles from women with breast cancer promote an epithelial-mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Tumour Biol.* **2015**, *36*, 9649–9659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Arraud, N.; Gounou, C.; Linares, R.; Brisson, A.R. A simple flow cytometry method improves the detection of phosphatidylserine-exposing extracellular vesicles. *J. Thromb. Haemost.* **2015**, *13*, 237–247. [[CrossRef](#)]
34. Acquarone, E.; Monacelli, F.; Borghi, R.; Nencioni, A.; Odetti, P. Resistin: A reappraisal. *Mech. Ageing Dev.* **2019**, *178*, 46–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lazar, M.A. Resistin- and Obesity-associated metabolic diseases. *Horm. Metab. Res.* **2007**, *39*, 710–716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Wang, Y.Y.; Hung, A.C.; Lo, S.; Yuan, S.F. Adipocytokines visfatin and resistin in breast cancer: Clinical relevance, biological mechanisms, and therapeutic potential. *Cancer Lett.* **2021**, *498*, 229–239. [[CrossRef](#)]
37. Guarino, M. Src signaling in cancer invasion. *J. Cell Physiol.* **2010**, *223*, 14–26. [[CrossRef](#)]
38. Zhou, J.; Yi, Q.; Tang, L. The roles of nuclear focal adhesion kinase (FAK) on Cancer: A focused review. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 250. [[CrossRef](#)]
39. Hamidi, H.; Ivaska, J. Every step of the way: Integrins in cancer progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 533–548. [[CrossRef](#)]
40. Mitra, S.K.; Schlaepfer, D.D. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18*, 516–523. [[CrossRef](#)]
41. Zhao, X.; Guan, J.L. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 610–615. [[CrossRef](#)]
42. Lee, J.O.; Kim, N.; Lee, H.J.; Lee, Y.W.; Kim, S.J.; Park, S.H.; Kim, H.S. Resistin, a fat-derived secretory factor, promotes metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells through ERM activation. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 18923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Taylor, J.; Azimi, I.; Monteith, G.; Bebawy, M. Ca<sup>2+</sup> mediates extracellular vesicle biogenesis through alternate pathways in malignancy. *J. Extracell. Vesicles* **2020**, *9*, 1734326. [[CrossRef](#)]
44. Silswal, N.; Singh, A.K.; Aruna, B.; Mukhopadhyay, S.; Ghosh, S.; Ehtesham, N.Z. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *334*, 1092–1101. [[CrossRef](#)]
45. Wang, C.H.; Wang, P.J.; Hsieh, Y.C.; Lo, S.; Lee, Y.C.; Chen, Y.C.; Tsai, C.H.; Chiu, W.C.; Chu-Sung Hu, S.; Lu, C.W.; et al. Resistin facilitates breast cancer progression via TLR4-mediated induction of mesenchymal phenotypes and stemness properties. *Oncogene* **2018**, *37*, 589–600. [[CrossRef](#)]
46. Tauseef, M.; Knezevic, N.; Chava, K.R.; Smith, M.; Sukriti, S.; Gianaris, N.; Obukhov, A.G.; Vogel, S.M.; Schraufnagel, D.E.; Dietrich, A.; et al. TLR4 activation of TRPC6-dependent calcium signaling mediates endotoxin-induced lung vascular permeability and inflammation. *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 1953–1968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Chiang, C.Y.; Veckman, V.; Limmer, K.; David, M. Phospholipase Cgamma-2 and intracellular calcium are required for lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor 4 (TLR4) endocytosis and interferon regulatory factor 3 (IRF3) activation. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 3704–3709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Jing, Y.; Liang, W.; Liu, J.; Zhang, L.; Wei, J.; Zhu, Y.; Yang, J.; Ji, K.; Zhang, Y.; Huang, Z. Stress-induced phosphoprotein 1 promotes pancreatic cancer progression through activation of the FAK/AKT/MMP signaling axis. *Pathol. Res. Pract.* **2019**, *215*, 152564. [[CrossRef](#)]

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

### 12.3 Coautoría de Artículo

Pino YC, Aguilera JA, García-González V, Alatorre-Meda M, Rodríguez-Velázquez E, Espinoza KA, **Frayde-Gómez H**, Rivero IA. Synthesis of Aza-BODIPYs, Their Differential Binding for Cu (II), and Results of Bioimaging as Fluorescent Dyes of Langerhans  $\beta$ -Cells. ACS Omega. 2022 Nov 15;7(47):42752-42762. doi: 10.1021/acsomega.2c04151. PMID: 36467934; PMCID: PMC9713790.

# Synthesis of Aza-BODIPYs, Their Differential Binding for Cu(II), and Results of Bioimaging as Fluorescent Dyes of Langerhans $\beta$ -Cells

Yaneth C. Pino, Jorge A. Aguilera, Víctor García-González, Manuel Alatorre-Meda, Eustolia Rodríguez-Velázquez, Karla A. Espinoza, Héctor Frayde-Gómez, and Ignacio A. Rivero\*



Cite This: *ACS Omega* 2022, 7, 42752–42762



Read Online

ACCESS |



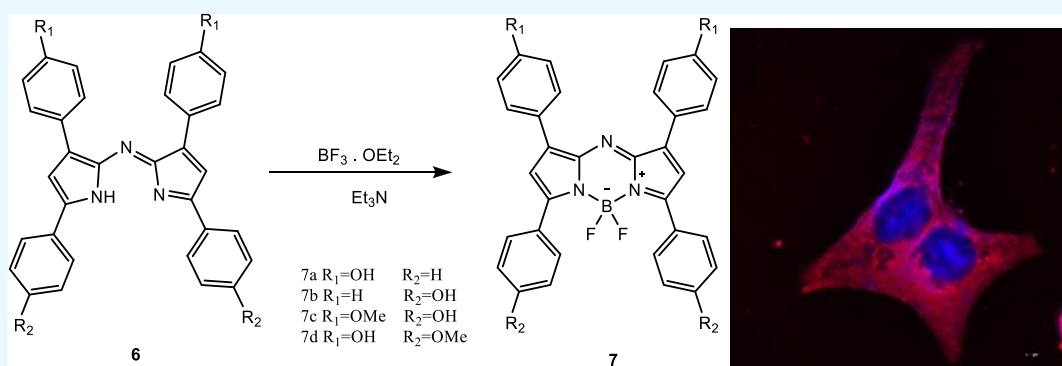
Metrics & More



Article Recommendations



Supporting Information



**ABSTRACT:** Cellular labeling through the use of dyes is of great interest to the biomedical sciences for the characterization of the location and distribution of biomolecules and also for the tracking of the course of biological processes in both health and illness. This paper reports the synthesis, characterization, and subsequent evaluation as metal sensors and cell staining probes of four aza-BODIPY compounds [herein referred to as 7(a–d)]. Compounds 7(b–d) were found to display an outstanding selectivity for Cu(II) because their emission band at 720 nm was progressively quenched by this metal, presenting fluorescence quenching between 75 and 95%. On the other hand, cell imaging studies with pancreatic  $\beta$ -cells proved that aza-BODIPYs 7a and 7b showed selectivity for the cytoplasm, while 7c and 7d were selective for the cell membrane. Moreover, aza-BODIPY 7b allowed to characterize in a clear way a lipotoxic condition mediated by saturated fatty acids, a critical phenomenon on  $\beta$ -cell damage associated with diabetes mellitus type II. Taken together, the presented results highlight the obtained aza-BODIPY compounds as selective sensing/staining probes with the potential to be used in the biomedical field.

## 1. INTRODUCTION

Diabetes mellitus types I and II are diseases that are characterized by hyperglycemia, resistance, and lack of insulin. The latter is due to the destruction of pancreatic islets; therefore, studies to determine the health of these cells are very important. The use of dyes to determine the status of Langerhans  $\beta$ -cells is very important to study the factors that affect their proliferation because these cells are responsible for the production of insulin required for the functions of the body.<sup>1</sup> Aza-BODIPY compounds are outstanding dyes that have been developed for cell characterization. These dyes have unique spectral properties such as intense absorption in the UV region, intense fluorescence, and high quantum yield. Moreover, these compounds are of great interest to many researchers because structural modifications modulate their optical properties such as fluorescence. In this context, synthesis and the exploration of their potential use in bioimaging, cancer therapy, and diagnosis have proven

important information for the design of novel aza-BODIPY photosensitizers for biomedical applications.<sup>2–7</sup>

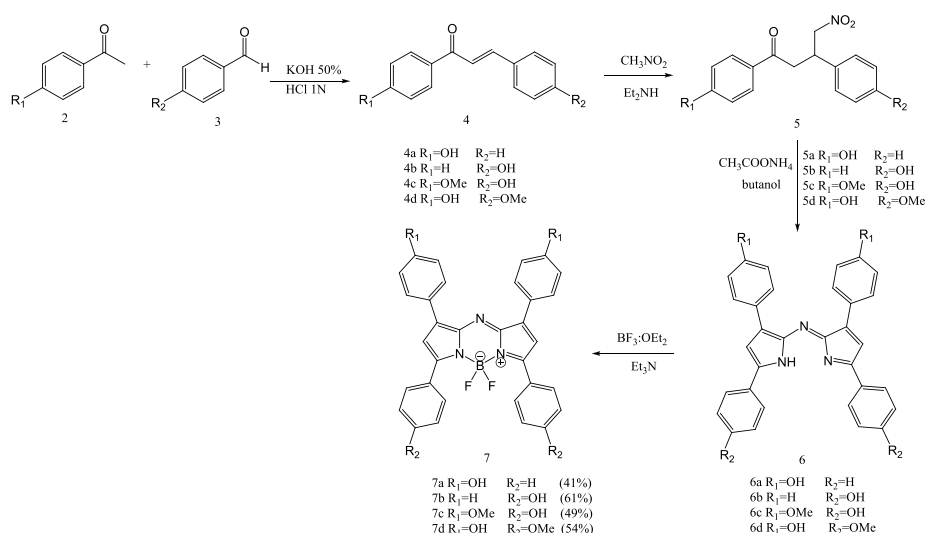
The aza-BODIPY is obtained from the substitution of the *meso*-carbon atom (position 8) with one hydrogen atom. Nowadays, the development of fluorescent aza-BODIPY dyes has increased.<sup>8–17</sup> However, they have not been widely explored hitherto as fluorescent sensors.<sup>12,18</sup> According to the excellent characteristics described above, the aza-BODIPYs are recognized as molecules that offer a great opportunity to be used as fluorescent probes for organelle characterization, as well as in the evaluation of endocytosis.<sup>11</sup> In addition, aza-BODIPYs are good candidates for use in phototherapy because

**Received:** July 1, 2022

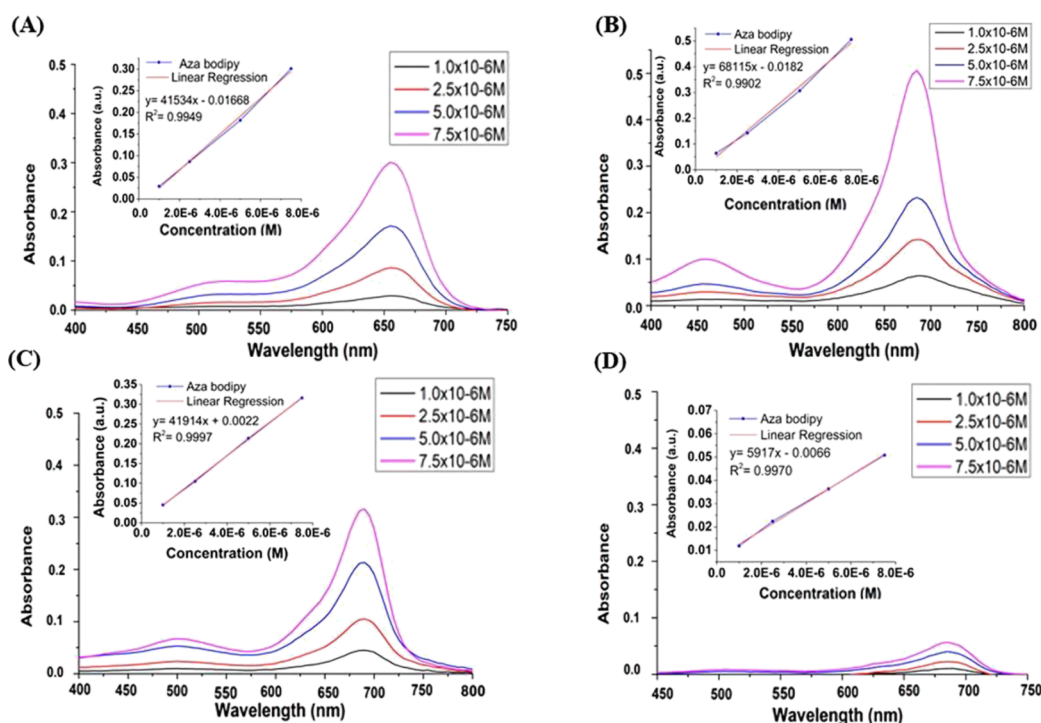
**Accepted:** November 1, 2022

**Published:** November 15, 2022





**Figure 1.** Synthesis route for the four aza-BODIPY products. The chalcones (4) were condensed with nitromethane to obtain (5), which were reacted with ammonium acetate to obtain the dipyrrole imine groups (6), and finally with BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O to obtain the aza-BODIPYs (7).



**Figure 2.** UV-vis absorption graphs of the aza-BODIPY compounds: (A) 7a, (B) 7b, (C) 7c, and (D) 7d. Insets in each graph show the linear regression of the absorption maxima with concentration.

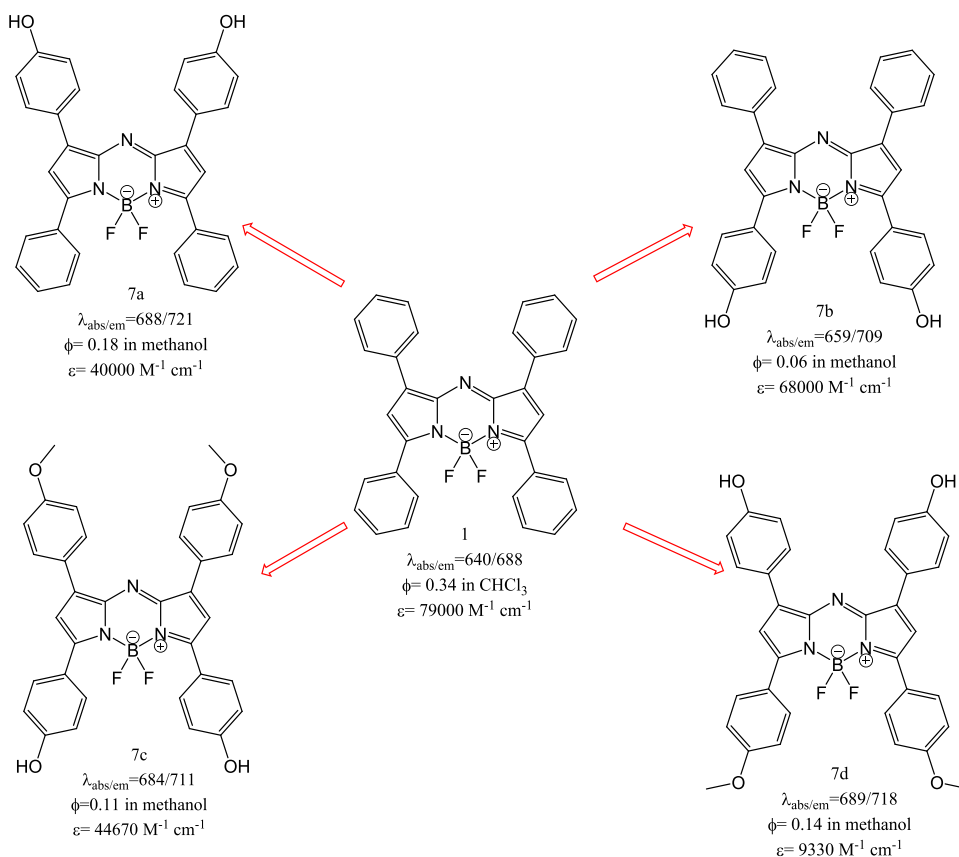
of their structural similarity to phthalocyanines. Phthalocyanines have already been tested for photodynamic therapy (PDT),<sup>19,20</sup> a soft and noninvasive technique that has been used in conjunction with medications for the successful treatment of several types of cancer.<sup>20</sup>

In this work, four aza-BODIPY compounds were synthesized and evaluated in terms of their photophysical properties, metal sensing by fluorescence quenching, and fluorescence staining of pancreatic Langerhans  $\beta$ -cells at healthy and induced lipotoxic conditions. The characterization was carried out by a battery of theoretical/experimental techniques including UV-vis and attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), <sup>1</sup>H and <sup>19</sup>F NMR, mass

spectrometry, cell culture/staining, and confocal laser scanning microscopy (CLSM), among others.

## 2. RESULTS AND DISCUSSION

The selection of the aza-BODIPY as a molecule of interest relies on the fact that it is a fluorophore that when emitting at wavelengths greater than 700 nm allows a clear contrast against plenty of cell staining agents. Aza-BODIPYs are chemically stable and capable of penetrating the cytoplasm membrane with very little damage to the biological systems that are being studied when processing the images by fluorescence. Also, they present a high quantum yield.<sup>12</sup>

Scheme 1. Structures of the Synthesized Aza-BODIPY 7(a–d)<sup>a</sup>

<sup>a</sup>The red arrows indicate a bathochromic shift of the emission bands of each product relative to compound 1 whose photophysical properties were determined elsewhere.<sup>22</sup>

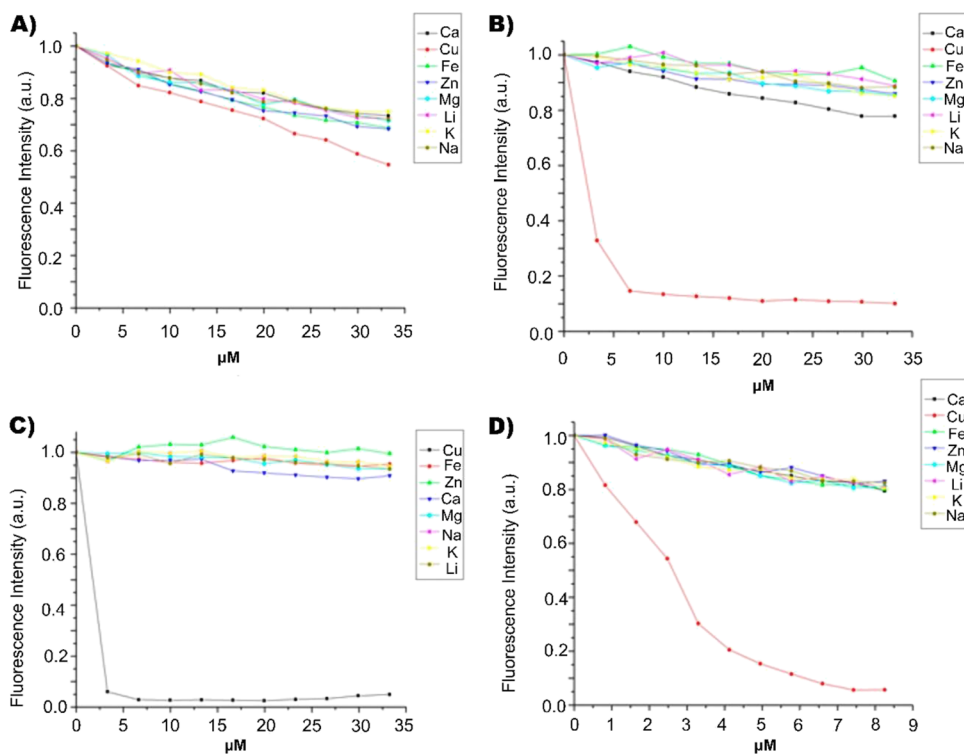
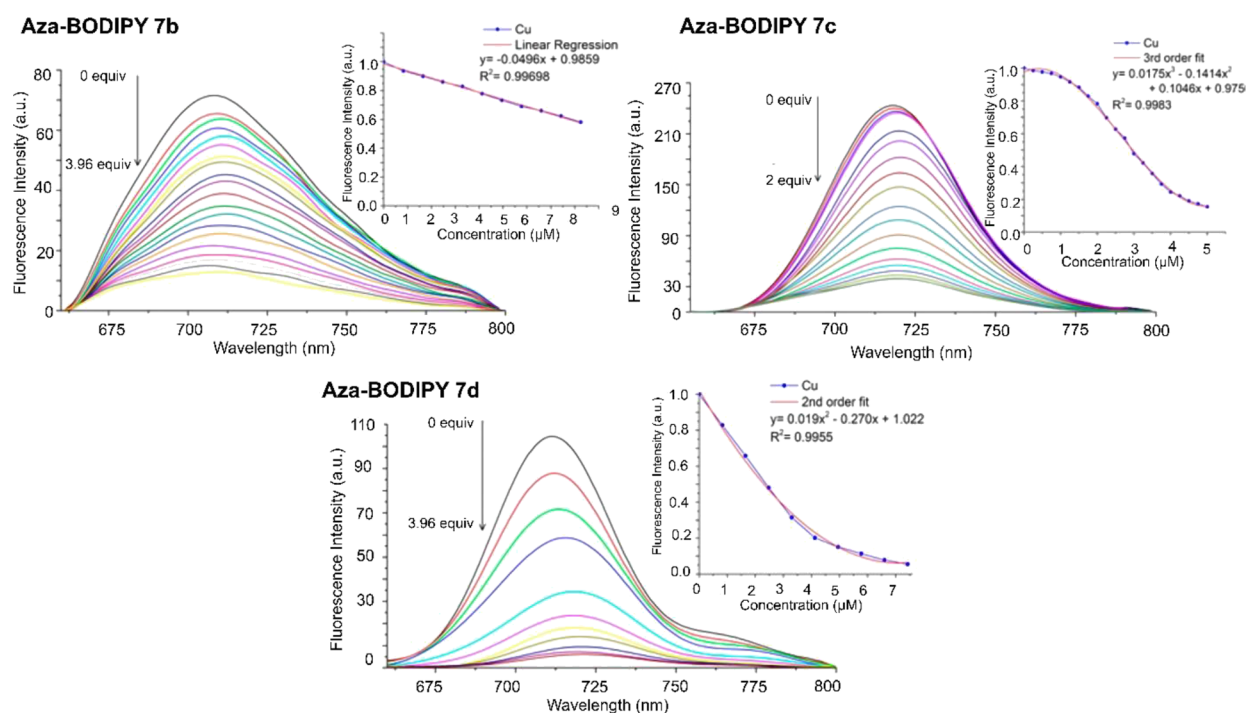
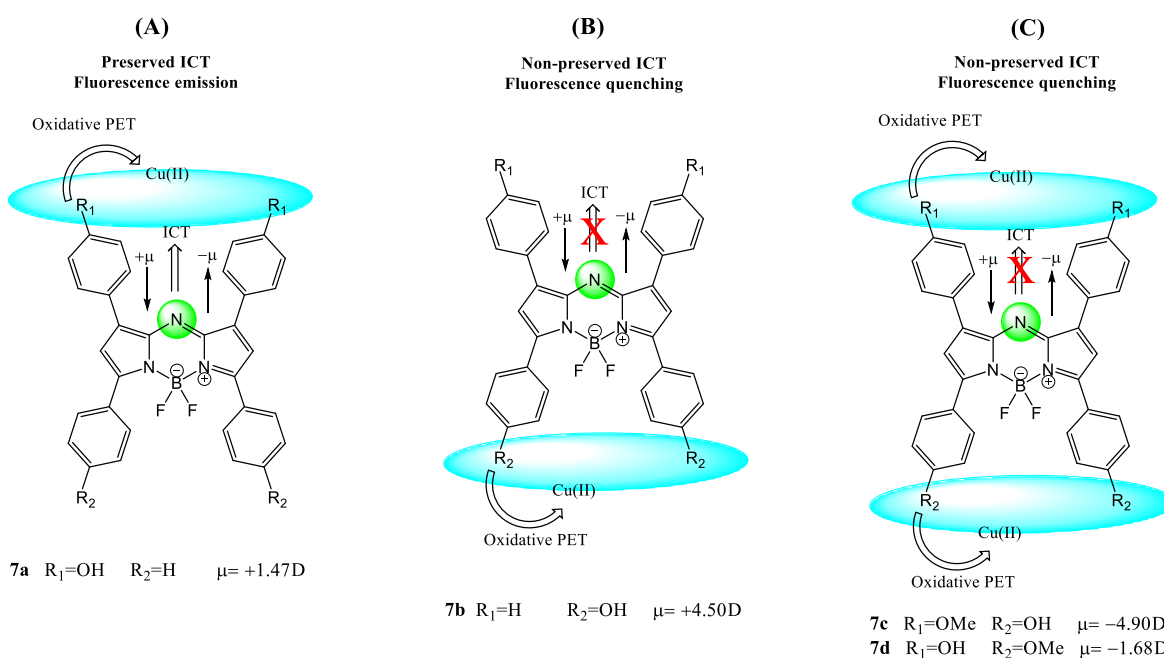


Figure 3. Fluorescence emission of aza-BODIPY compounds upon interaction with different metal ions: (A) 7a, (B) 7b, (C) 7c, and (D) 7d.



**Figure 4.** Fluorescence quenching of aza-BODIPY compounds with Cu(II) concentrations of  $7.5 \times 10^{-4} \mu\text{M}$  (**7b**),  $7.5 \times 10^{-4} \mu\text{M}$  (**7c**), and  $10 \mu\text{M}$  (**7d**). Insets show the mathematical fitting of the experimental data.

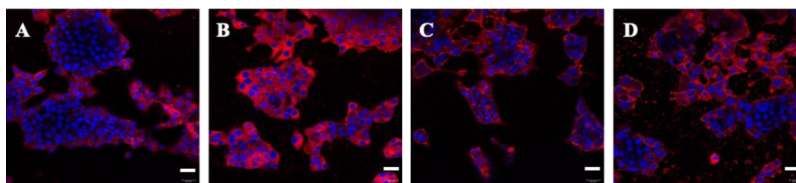


**Figure 5.** Proposed mechanism of the established aza-BODIPY:Cu(II) interactions and concomitant photophysical processes. Straight, small arrows denote the dipolar moment vectors ( $\mu$ ). Straight, empty arrows stand for the orientation of the expected ICT process. Red crosses denote the absence of the process. Green circles highlight the position of the nitrogen bridge (N8).

**2.1. Synthesis of Aza-BODIPY.** The aza-BODIPY compounds (**7a**, **7b**, **7c**, and **7d**) were synthesized as described in Figure 1, starting with the Claisen-Schmidt condensation reaction of different acetophenones (**2**) and benzaldehydes (**3**) to obtain the corresponding chalcones (**4**) to subsequently carry out a Michael reaction with the addition of the nitro group in the  $\beta$  proton of the chalcone (**5**), followed by the synthesis to obtain the aza-dipyromethenes (**6**) using ammonium acetate in butanol, which were finally reacted

with triethylamine and  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  for the synthesis of aza-BODIPYs (**7**).

**2.2. Aza-BODIPY Spectroscopic Evaluation.** **2.2.1. UV-Visible Spectroscopy.** UV-vis experiments were performed to obtain the calibration curve of each aza-BODIPY with the following concentrations in acetonitrile  $1 \times 10^{-6}$ ,  $2.5 \times 10^{-6}$ ,  $5.0 \times 10^{-6}$ , and  $7.5 \times 10^{-6}$  M. Figure 2 shows the obtained results, presenting absorption bands at 655, 689, 688, and 684 nm for **7a**, **7b**, **7c**, and **7d**, respectively; the insets of each graph



**Figure 6.** Cellular distribution of aza-BODIPY compounds on cultures of  $\beta$ -cells: (A) 7a, (B) 7b, (C) 7c, and (D) 7d. Hoechst 33342 was used as counterstain to identify the cell nuclei (blue staining). Scale bars stand for 20  $\mu\text{m}$ .

show the linear regression of each absorption maxima as a function of concentration.

**2.2.2. Fluorescence Spectroscopy.** Scheme 1 shows the synthesized aza-BODIPY compounds 7(a–d) containing protic (OH) and aprotic ( $-\text{OCH}_3$ ) polar donor groups, their photophysical properties, and the effect of each group on their emission band relative to compound 1 (denoted by the red portrayed arrows). Fluorescence spectral data for all Aza-BODIPYs are summarized in Table S1, which also includes the calculation of quantum yields (Supporting Information).<sup>21</sup> In general, the emission maxima of all aza-BODIPYs were detected to occur within the 709–721 nm range, demonstrating a rather similar fluorescence response. As observed, the incorporation of oxygen induces a red shift of all compounds 7(a–d) with respect to compound 1 and also modifies the quantum yield.<sup>22</sup> Interestingly, aza-BODIPY 7b was found to present its absorption/emission bands at the shortest wavelengths (659/709 nm) and the largest Stokes shift (50 nm) (see Table S1). According to the literature, these changes are indicative of an intramolecular charge transfer (ICT) process between the aromatic rings at the 3,5-positions (donor) and the nitrogen bridge at the 8-position (N8, acceptor).<sup>22</sup> This ICT process is the key factor behind the fluorescence emission.<sup>23</sup>

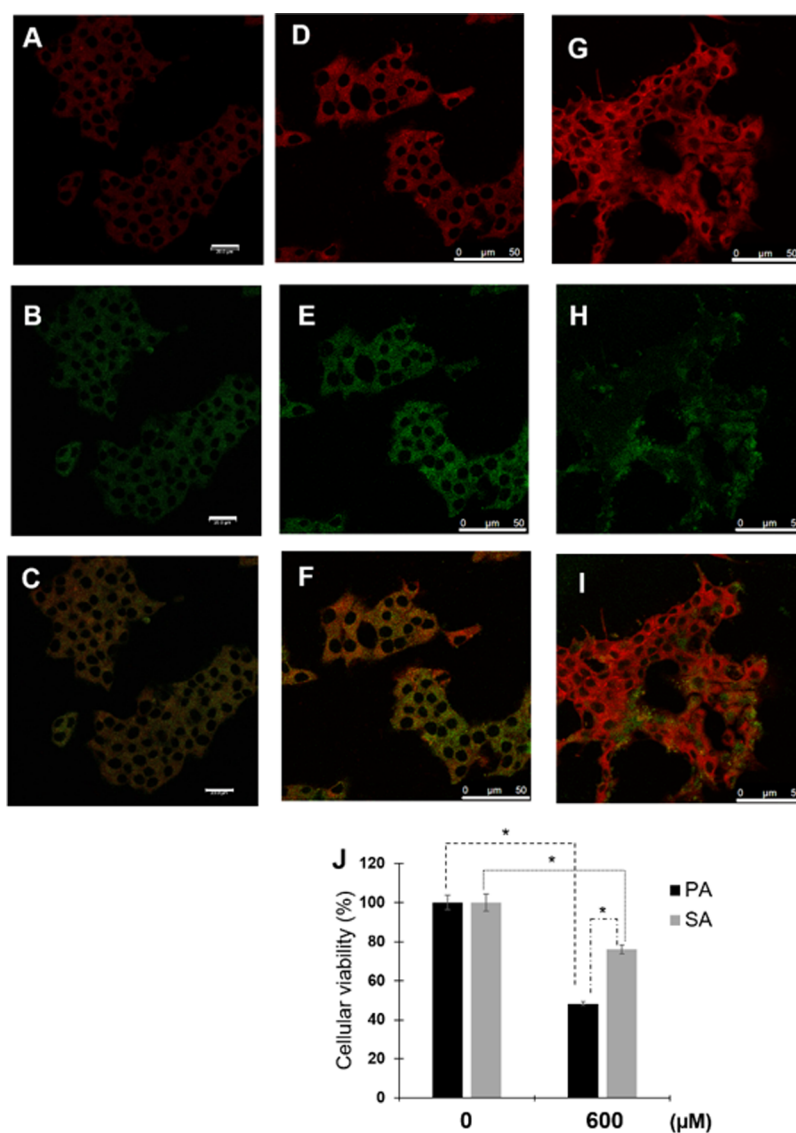
As a next step in our study, we committed to characterize possible effects of the  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe(III)}$ , and  $\text{Cu(II)}$  metal ions on the fluorescence emission of the aza-BODIPY compounds. These ions are of interest to the biomedical and environmental fields; the obtained results are shown in Figures 3 and 4. Figure 3A shows that aza-BODIPY 7a is completely transparent to all ions under study, as evidenced by a mere slight decrease of the fluorescence signal with the metal concentration in all cases. By contrast, the rest of the aza-BODIPY compounds 7(b–d) proved to present a high selectivity for the  $\text{Cu(II)}$  ion, as depicted by the sharp decrease of the fluorescence signal with  $\text{Cu(II)}$  concentration, nonobserved for the other metals (Figure 3B–D). Chemically speaking, aza-BODIPYs 7(b–d) contain oxygen atoms in the methoxy and hydroxy groups positioned at the bottom of the structure in all cases (see Figure 1). In our opinion, this result reveals that these oxygen-bearing groups might promote quenching in the fluorescence signal by a competitive photo electron transfer oxidation process (PET) when interacting with the  $\text{Cu(II)}$  ion as a heavy atom, as discussed below. Interestingly, aza-BODIPY 7b was found to present the greatest sensitivity for  $\text{Cu(II)}$  and very good linearity upon the metal titration (Figure 4). The fluorescence quenching of the aza-BODIPY 7b: $\text{Cu(II)}$  complex was determined to occur at a low  $\text{Cu(II)}$  concentration of 0.4 nM, proving to be lower than values previously reported for other systems.<sup>24–29</sup>

Figure 5 shows the possible driving mechanisms for the aza-BODIPY: $\text{Cu(II)}$  interactions, which might explain the preservation or quenching of the fluorescence emission of

the aza-BODIPY products. In general, it appears that the presence and positions of oxygen atoms along the aza-BODIPY structure play a key role.

First, a photo electron transfer oxidation process (PET) is anticipated to occur with  $\text{Cu(II)}$  as it interacts with aza-BODIPY functional groups bearing oxygen atoms, as has been postulated in other similar models.<sup>30</sup> Next, the position of the oxygen atoms seems to govern a subsequent preservation or perturbation of the already established ICT process between the aromatic rings at the 3,5-positions (donor) and N8 (acceptor). Namely, the ICT process is preserved when the oxygen atoms are present in the 1,7-aromatic rings, thus keeping the fluorescence emission (see Figure 3, panel A). By contrast, when oxygen atoms are present in the 3,5-aromatic rings (see Figure 3, panels B and C), the ICT process is most likely perturbed by the oxidative PET process of  $\text{Cu(II)}$ , which redistributes the electronic density of the aza-BODIPY: $\text{Cu(II)}$  complex toward the  $\text{Cu(II)}$  ions in the opposite direction of the N8 atom, thereby quenching the fluorescence emission. This PET process is established between  $\text{Cu(II)}$  (acceptor) and oxygen ( $-\text{OH}$  and  $-\text{OCH}_3$ ; donor),<sup>30</sup> making the  $\text{Cu(II)}$  ion to become paramagnetic while no interaction of  $\text{Cu(II)}$  with the nitrogen bridge (N8) is predicted because no increase in the fluorescence signal was observed.<sup>31</sup> In sum, the conjunction of these processes is involved in the fluorescence quenching of the aza-BODIPYs compounds 7(b–d) as they interact with  $\text{Cu(II)}$ .<sup>32</sup>

Hartree–Fock calculations were carried out with the Gaussian 09 program to investigate, confirm, and support the driving mechanism of the binding between aza-BODIPY and  $\text{Cu(II)}$ . Table S2 (Supporting Information) describes the performed calculations, including the dipole moments ( $\mu$ ) as well as the direction of the resulting vector. The obtained results demonstrated a fluctuation of  $\mu$  for all aza-BODIPY compounds 7(a–d), from  $-4.90$  to  $+4.50$  Debye, and the resulting vector is directed toward positions 1 and 7, located on the nitrogen bridge (N8).<sup>31</sup> The effect of the oxygen atoms in the 3,5-positions when comparing structures 7a and 7b with compound 1 was that  $\mu$  increased. In the particular case of structure 7b,  $\mu$  is greater than that in 7a. The interaction of the  $\text{Cu(II)}$  cation with the aza-BODIPY strongly increases the  $\mu$  of the latter structure and is clearly dependent on the position of the phenol groups. The difference in  $\mu$  between base structure 1 and compounds 7(a–d) denotes that the values are lower in polarity when having the hydroxy groups in the 1,7-positions and increase when they are in the 3,5-positions. The interaction of  $\text{Cu(II)}$  cations with the hydroxy of the 1,7-positions intensifies the magnitude of  $\mu$ , with the resulting vector being oriented toward the nitrogen bridge (N8), but it does not promote the fluorescence quenching (7a); meanwhile, when interacting with the hydroxy groups of the rings at the 3,5-positions, the magnitude of  $\mu$  increases in a similar proportion but obviously inverting its orientation. This



**Figure 7.** Aza-BODIPY **7b** colocalizes on endoplasmic reticulum and allows identifying Langerhans  $\beta$ -cell damage under lipotoxicity conditions.  $\beta$ -cells were incubated under the specific ER-probe, the ER-tracker (1  $\mu$ M) (A), PA-BDP (25  $\mu$ M) (B) and merge is showed (C). Scale bar in all images corresponds to 20  $\mu$ m. Under the same PA-lipotoxicity induced, Aza-BODIPY **7b** was evaluated; cell images correspond to aza-BODIPY **7b** (0.8  $\mu$ M) (D), PA-BDP (25  $\mu$ M) (E), and merge (F). In a parallel way, SA-BDP was characterized; cell images correspond to aza-BODIPY **7b** (0.8  $\mu$ M) (G), SA-BDP (25  $\mu$ M) (H), and merge (I). As a complementary experimentation (J), lipotoxicity was characterized under standardized MTT assay (upon incubation for 20 h). The percentage of cell viability is shown. Mean values are presented ( $n = 6$ , mean  $\pm$  SD), \* $p < 0.01$ .

observation is consistent with the fact that **7b** is the structure that presents the greatest decrease in the fluorescence signal when in contact with Cu(II).

**2.2.3. Confocal Microscopy Analysis.** In previous results of our group,<sup>33,34</sup> we characterized the role of lipotoxicity induced by free fatty acids on the deregulation of proteostasis of Langerhans  $\beta$ -cells (RIN-m5F cells), then in the control of their metabolism. Langerhans  $\beta$ -cells are well known as a model that maintains an active metabolism and insulin secretion. Having this in mind, we herein employed this cell line to evaluate the four synthesized aza-BODIPYs as staining agents. Results suggest a differential distribution of the products (Figure 6). Cell cultures treated with aza-BODIPYs **7c** and **7d** (0.4  $\mu$ M) exhibited a membrane distribution of the probes (Figure 6A,C; red staining). Meanwhile, in the case of aza-BODIPYs **7a** and **7b**, the distribution was localized in the cytoplasm (Figure 6A,B), being more evident for aza-BODIPY

**7b**. Apparently, the presence of  $-\text{OH}$  groups in the aza-BODIPY structures favors their cytoplasmic localization of the probe, with greater efficiency in the case of compound **7b**. By contrast, the presence of the  $-\text{OMe}$  group in molecules **7c** and **7d** very likely promotes the impediment to permeabilize the cell membrane in the periphery of the cell clusters (Figure 6, panels A–E), leading to a preferential spatial ordering at the membrane level. Worth mentioning, the low concentration employed in this characterization (0.4  $\mu$ M) highlights the aza-BODIPY products as having a high cell affinity. More micrographs at different magnifications can be found in the Supporting Information.

Considering the clear distribution of aza-BODIPY **7b** along the cytoplasm, the experimentation with this probe was extended to elucidate its localization and response at induced lipotoxic conditions, which are known to affect critical functions of Langerhans  $\beta$ -cells such as insulin secretion

(Figure 7).<sup>33</sup> Induced lipotoxicity and intracellular co-localization assays were carried out as reported previously,<sup>33,34</sup> employing fluorescent probes of palmitic (18C) and stearic acid (16C) coupled to BODIPY (PA-BDP and SA-BDP, respectively), along with commercial ER-tracker as a control (a fluorescent agent with high selectivity for the endoplasmic reticulum). We have identified PA and SA saturated fatty acids as inducers of endoplasmic reticulum stress, a phenomenon associated with alterations in insulin metabolism and cell toxicity.<sup>33,34</sup> The obtained results revealed that aza-BODIPY 7b (red staining) co-localized indeed with ER-tracker, PA-BDP, and SA-BDP (all in green staining) on the endoplasmic reticulum, as evidenced by the red and green merge in the three cases (Figure 7; panels C, F, and I, respectively). As expected in these lipotoxic conditions, the cell viability was confirmed impaired upon incubation with PA and SA (Figure 7J).

Interestingly, these findings might be attractive for research in cell and molecular biology considering the already outlined affinity of aza-BODIPY 7b for Cu(II) (see Figure 4B) and the well-known biological functions and localization of this metal at the intracellular level.<sup>35,36</sup> Copper is critical for the function of proteins involved in connective tissue formation, oxidative phosphorylation process, antioxidant mechanisms, and catecholamine synthesis.<sup>37</sup> For instance, ATP7A protein is a regulator of cell copper homeostasis, involving the supply of copper to copper-dependent enzymes within the *trans*-golgi network (TGN),<sup>38,39</sup> and copper efflux on the plasma membrane.<sup>37</sup> In an important way, several of these proteins are situated on the endoplasmic reticulum, highlighting the future exploration of these aza-BODIPY compounds as promising for the tracking of changes in Cu(II) levels at the cytoplasmic domain.

### 3. CONCLUSIONS

Four aza-BODIPY compounds containing protic (OH) and aprotic ( $-\text{OCH}_3$ ) terminal groups (7a–d) were synthesized and characterized in terms of their photophysical properties, metal sensing by fluorescence quenching, and cell staining functionality in pancreatic Langerhans  $\beta$ -cells at healthy and induced lipotoxic conditions. Concerning their photophysical properties, all synthesized compounds presented a red shift in fluorescence emission and modified quantum yields relative to compound 1 (absent of terminal groups), with emission maxima in the 709–721 nm range. These changes were attributed to an ICT process most likely occurring between the aromatic rings at the 3,5-positions (donor) and the nitrogen bridge at the 8-position (N8, acceptor). On the other hand, with respect to metal sensing, aza-BODIPYs 7(b–d) were found to present a high selectivity for the Cu(II) ion, as depicted by the sharp decrease of the fluorescence signal with Cu(II) concentration, nonobserved for the other metals under study ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe(III)}$ ). These compounds (7b–d) bear oxygen atoms in the methoxy and hydroxy terminal groups, positioned at the bottom of the structure in all cases, which might promote a quenching in the fluorescence signal by a competitive PET oxidation process when interacting with the Cu(II). Worth mentioning, The fluorescence quenching of the aza-BODIPY 7b: Cu(II) complex was determined to occur at the low Cu(II) concentration of 0.4 nM (Figure 4B), proving to be lower than values previously reported for other systems. Finally, with respect to their cell staining functionality, it was verified that

the aza-BODIPYs 7(a, b) selectively stained the cytoplasm, while aza-BODIPYs 7(c, d) containing methoxy groups demonstrated a greater affinity to the cellular membrane. This finding suggests that the position of hydroxy and methoxy terminal groups plays a very important role in the cell affinity of the studied aza-BODIPY compounds. Taken together, the obtained results highlight the synthesized aza-BODIPY compounds as versatile cell staining agents with high selectivity for the cytoplasm and cell membrane, with additional capability of being sensitive for Cu(II) detection.

### 4. MATERIALS AND METHODS

**4.1. General Procedures.** All reagents and solvents were purchased from a commercial source (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), and used without further purification. Anhydrous solvents for organics synthesis were prepared by passing through a solvent purification tower. Silica gel 60 (230–400 mesh) was used to purify the products. Thin-layer chromatography (TLC) was performed on silica gel F254 plates (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). All compounds were detected using UV light. Melting points were obtained with an Electrothermal 88629 apparatus and were not corrected. Fourier transform infrared (FTIR) spectra were recorded with a PerkinElmer FTIR 1600 spectrometer.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{19}\text{F}$  nuclear magnetic resonance (NMR) spectra at 400, 101, and 376 MHz were recorded, respectively, using a Bruker Avance III spectrometer in  $\text{CDCl}_3$ , dimethyl sulfoxide ( $\text{DMSO}-d_6$ ), or  $\text{CD}_3\text{OD}$  with tetramethylsilane (TMS) as an internal standard, and trifluoroacetic acid was the reference for  $^{19}\text{F}$  spectra. Mass spectra were obtained with an Agilent Technologies 5975C MS spectrometer at 70 eV by direct insertion and an Agilent HPLC (Mod 1100) coupled to mass selective detector (MSD) version SL. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained with an Agilent ESI-QTOF (Mod G6530B). UV–vis absorption spectra were obtained with a Varian Cary 50 SCAN spectrophotometer. Fluorescence spectra were recorded with a Photon Technology International Fluorescence System with a 1 cm standard quartz cell.

**4.2. General Method for Preparing Chalcones.** In a 250 mL ball flask fitted with magnetic stirring, *p*-hydroxy acetophenone (5.0 g, 36.72 mmol) and benzaldehyde (3.73 mL, 36.72 mmol) in acetic acid (180 mL) were added and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (6.0 mL) was gradually added. The reaction mixture is left for 12 h. The product (4a) was washed with distilled  $\text{H}_2\text{O}$ .

**4.2.1. (*E*)-1-(4-Hydroxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one (4a).** A red solid was obtained (1.2 g, 5.35 mmol, 69% yield). Mp 162–164 °C. IR (ATR, neat): 3105, 3060, 1644, 1599, 1562, 1442, 1283, 981  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  10.42 (br, s, 1H), 8.09 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.91 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H,  $\beta$ -H), 7.86 (m, 3H), 7.7 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H,  $\alpha$ -H), 7.4 (dd,  $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 4.0$  Hz, 2H), 6.93 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  187.8, 162.2, 142.9, 134.9, 130.8, 130.1, 129.4, 128.8, 128.2, 121.9, 115.5. ESI-MS  $m/z$ :  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_2$  found 222.71 (M $^-$ ).

**4.2.2. (*E*)-3-(4-Hydroxyphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one (4b).** A red solid was obtained (1.66 g, 7.4 mmol, 89% yield). Mp 162–164 °C. IR (ATR, neat): 3200, 3057, 1643, 1577, 1349, 1211, 972  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  10.1 (br, s, 1H), 8.1 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.74 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.89 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H,  $\beta$ -H), 7.64 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.57 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.53 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H,  $\alpha$ -H), 6.87 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3/$

DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  189.9, 160.4, 145.2, 138.5, 132.6, 130.4, 128.4, 128.0, 125.9, 118.5, 116.3. ESI-MS  $m/z$ :  $C_{15}H_{12}O_2$  found 223.06 (M $-$ ).

**4.2.3. (E)-3-(4-Hydroxyphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (4c).** A pink solid was obtained (3.9 g, 11.8 mmol, 92% yield). Mp 170–172 °C. IR (neat): 3153, 3068, 1641, 1575, 1434.2, 1224, 1164, 1023, 827  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3/DMSO-d_6$ ):  $\delta$  9.6 (br, s, 1H), 8.03 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 7.72 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1H,  $\beta$ -H), 7.53 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 7.43 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1H,  $\alpha$ -H), 6.99 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 6.88 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 3.9 (s, H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3/DMSO-d_6$ ):  $\delta$  188.0, 163.1, 144.0, 131.1, 130.5, 130.3, 126.0, 118.3, 116.0, 113.7. ESI-MS  $m/z$ :  $C_{16}H_{14}O_3$  found 252.62 (M $-$ ).

**4.2.4. (E)-1-(4-Hydroxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (4d).** A pink solid was obtained (1.2 g, 5.35 mmol, 73% yield). Mp 179–181 °C. IR (neat): 3153, 3068, 1641, 1575, 1434.2, 1224, 1164, 1023, 827  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3/DMSO-d_6$ ):  $\delta$  9.88 (bs, 1H, OH), 7.96 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H, Ar-H), 7.73 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1H,  $\beta$ -H), 7.61 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H, Ar-H), 7.46 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1H,  $\alpha$ -H), 6.93 (dd,  $J_1$  = 8.0 Hz,  $J_2$  = 2 Hz, 4H, Ar-H), 3.85 (s, 3H, methoxy).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3/DMSO-d_6$ ):  $\delta$  194.0, 167.6, 167.0, 148.8, 136.4, 135.4, 133.2, 125.2, 120.1, 120.0, 119.8, 60.8. ESI-MS  $m/z$ :  $C_{16}H_{14}O_3$  found 252.62 (M $-$ ).

### 4.3. General Method for Preparing Nitro Chalcones.

In a 250 mL ball flask equipped with magnetic stirring, the chalcone (**4a**) (3.4 g, 14.9 mmol),  $CH_3NO_2$  (4.0 mL, 74.56 mmol), and  $Et_2NH$  (7.7 mL) were added. The reaction mixture was maintained at a temperature of 60 °C for 15 h. It was kept at room temperature for half an hour and placed in a 250 mL separatory funnel, dissolved in ethyl acetate, and extractions were carried out with saturated NaCl (3  $\times$  30 mL). The organic phase was dried with anhydrous  $Na_2SO_4$ ; finally, the excess solvent was removed. Purification is carried out by flash chromatography using a mobile phase 7.0–3.0 petroleum ether–ethyl acetate.

**4.3.1. 1-(4-Hydroxyphenyl)-4-nitro-3-phenylbutan-1-one (5a).** Brown oil was obtained (3.0 g, 10.5 mmol, 70.0% yield). IR (ATR, neat): 3248.3, 1662.3, 1585.4, 1545.6, 1508.5, 1367.9, 1206.1, 834.8  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3/DMSO-d_6$ ):  $\delta$  7.80 (d,  $J_1$  = 8.0 Hz, 2H), 7.32–7.24 (m, 5H), 6.83 (d,  $J_1$  = 8.0, 2H), 5.50 (bs, 1H), 4.72 (dddd,  $J_1$  = 12.0 Hz,  $J_2$  = 8.0 Hz 2H), 4.22–4.15 (m, 1H), 3.43–3.30 (m, 2H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3/DMSO-d_6$ ):  $\delta$  196.6, 161.4, 139.2, 130.8, 129.1, 127.9, 127.4, 115.7, 79.7, 41.2, 39.6 ppm. ESI-MS  $m/z$ :  $C_{16}H_{15}NO_4$  found 283.72 (M $-$ ).

**4.3.2. 3-(4-Hydroxyphenyl)-4-nitro-1-phenylbutan-1-one (5b).** Brown oil was obtained (0.74 g, 2.6 mmol, 73.0% yield). IR (ATR, neat): 3375.7, 1678.2, 1593.4, 1545.6, 1450.1, 1375.9, 1206.1, 834.8  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3/DMSO-d_6$ ):  $\delta$  7.90 (d,  $J_1$  = 8.0 Hz, 2H), 7.56 (t,  $J_1$  = 8.0 Hz, 1H), 7.44 (t,  $J_1$  = 8.0, 2H), 7.09 (d,  $J_1$  = 8.0, 2H), 6.73 (d,  $J_1$  = 8.0, 2H), 6.08 (bs, 1H), 4.69 (dddd,  $J_1$  = 12.0 Hz,  $J_2$  = 8.0 Hz 1H), 4.1 (m, 2H), 3.41 (dd,  $J_1$  = 8.0 Hz,  $J_2$  = 4.0 Hz 2H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3/DMSO-d_6$ ):  $\delta$  197.7, 155.5, 136.4, 133.4, 130.6, 128.8, 128.1, 116.0, 79.9, 41.7, 38.8. ESI-MS  $m/z$ :  $C_{16}H_{15}NO_4$  found 283.72 (M $-$ ).

**4.3.3. 3-(4-Hydroxyphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-4-nitrobutan-1-one (5c).** Brown oil was obtained (3.25 g, 10.31 mmol, 88.0% yield). IR (ATR, neat): 3341.1, 1654.4, 1596.0, 1513.8, 1442.2, 1264.5, 1163.7, 1031.1, 824.2  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3/DMSO-d_6$ ):  $\delta$  7.88 (dd,  $J_1$  = 8.0 Hz,  $J_1$  =

4.0 Hz, 2H), 7.08 (dd,  $J_1$  = 8.0 Hz,  $J_1$  = 4.0 Hz, 2H), 6.91 (dd,  $J_1$  = 8.0 Hz,  $J_1$  = 4.0 Hz, 2H), 6.79 (dd,  $J_1$  = 8.0 Hz,  $J_1$  = 4.0 Hz, 2H), 4.87–4.54 (m, 2H), 4.17–4.02 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.44–3.19 (m, 1H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3/DMSO-d_6$ ):  $\delta$  195.7, 163.7, 156.7, 130.3, 129.8, 129.6, 128.4, 115.9, 113.8, 80.0, 55.5, 41.4, 38.9. ESI-MS  $m/z$ :  $C_{17}H_{17}NO_5$  found 313.63 (M $-$ ).

**4.3.4. 1-(4-Hydroxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-4-nitrobutan-1-one (5d).** Brown oil was obtained (1.6 g, 5.1 mmol, 68.0% yield). IR (ATR, neat): 3277.5, 1662.3, 1601.3, 1585.4, 1511.1, 1436.9, 1248.6, 1163.7, 1025.8, 826.9  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3/DMSO-d_6$ ):  $\delta$  7.82 (d,  $J_1$  = 8.0 Hz, 2H), 7.17 (d,  $J_1$  = 8.0 Hz, 2H), 6.93–6.74 (m, 4H), 4.69 (dddd,  $J_1$  = 12.0 Hz,  $J_2$  = 8.0 Hz 2H), 4.18–4.10 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.40–3.28 (m, 2H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3/DMSO-d_6$ ):  $\delta$  196.0, 161.2, 159.1, 131.1, 130.7, 129.3, 128.5, 115.6, 114.5, 79.9, 55.3, 41.3, 38.9. ESI-MS  $m/z$ :  $C_{17}H_{17}NO_5$  found 313.76 (M $-$ ).

**4.4. General Method for Preparing Aza-Dipyrromethenes.** In a 250 mL ball flask equipped with magnetic stirring, nitro chalcone (**5a**) (1.2 g, 4.2 mmol) and  $CH_3COONH_4$  (10.9 g, 141.4 mmol) in butanol (100 mL) were added. The reaction mixture was refluxed for 24 h. It was kept at room temperature for half an hour. The excess solvent was removed.

**4.4.1. (Z)-4-(2-((5-(4-Hydroxyphenyl)-3-phenyl-1H-pyrrol-2-yl)imino)-3-phenyl-2H-pyrrol-5-yl)phenol (6a).** A golden metallic solid was obtained (0.914 g, 1.7 mmol, 42.0% yield). Mp 274–276 °C. IR (ATR, neat): 3150.2, 1590.7, 1542.9, 1463.4, 1346.7, 1224.7, 906.4, 760.6  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3COCD_3$ ):  $\delta$  8.06 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 4H), 7.86 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 4H), 7.50–7.35 (m, 6H), 7.33 (s, 2H), 7.00 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 4H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CD_3COCD_3$ ):  $\delta$  160.1, 154.7, 149.1, 142.0, 134.0, 128.8, 128.5, 128.2, 127.7, 123.5, 116.3, 114.5. ESI-MS  $m/z$ :  $C_{32}H_{23}N_3O_2$  found 480.02 (M $-$ ).

**4.4.2. (Z)-4-(2-((3-(4-Hydroxyphenyl)-5-phenyl-1H-pyrrol-2-yl)imino)-5-phenyl-2H-pyrrol-3-yl)phenol (6b).** A golden metallic solid was obtained (0.534 g, 0.98 mmol, 44.0% yield). Mp 320–322 °C. IR (neat): 3304.0, 1598.6, 1535.0, 1489.9, 1232.7, 898.5, 760.6  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3COCD_3$ ):  $\delta$  7.96 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 4H), 7.92 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 4H), 7.46 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3H), 7.38 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 3H), 7.26 (s, 2H), 6.81 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 4H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CD_3COCD_3$ ):  $\delta$  157.9, 155.1, 149.3, 142.6, 132.2, 130.5, 130.1, 129.2, 126.5, 125.5, 115.3, 113.4. ESI-MS  $m/z$ :  $C_{32}H_{23}N_3O_2$  found 480.25 (M $+$ ).

**4.4.3. (Z)-4-(2-((3-(4-Hydroxyphenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrrol-2-yl)imino)-5-(4-methoxyphenyl)-2H-pyrrol-3-yl)phenol (6c).** A golden metallic was obtained (0.712 g, 1.3 mmol, 47.0% yield). Mp 274–276 °C. IR (neat): 3330.6, 2839.9, 1598.7, 1497.8, 1460.8, 1243.3, 1023.1, 903, 792.0  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3COCD_3$ ):  $\delta$  7.95 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 8H), 7.30 (s, 2H), 7.2 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 4H), 6.93 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 4H), 3.90 (s, 6H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CD_3COCD_3$ ):  $\delta$  162.4, 157.7, 150.8, 146.5, 141.7, 130.3, 128.1, 127.7, 123.0, 115.2, 114.8, 112.8, 55.0. ESI-MS  $m/z$ :  $C_{34}H_{27}N_3O_4$  found 540.02 (M $-$ ).

**4.4.4. (Z)-4-(2-((5-(4-Hydroxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrrol-2-yl)imino)-3-(4-methoxyphenyl)-2H-pyrrol-5-yl)phenol (6d).** A golden metallic solid was obtained (2.11 g, 3.8 mmol, 48.0% yield). Mp 260–262 °C. IR (ATR, neat): 3190.0, 2881.9, 1590.7, 1542.9, 1450.1, 1237.9, 1020.5, 898.5, 803.0  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3COCD_3$ ):  $\delta$  8.18 (s, 2H), 7.95 (d,  $J_1$  = 6.3 Hz, 8H), 7.3 (s, 2H), 7.2 (d,  $J$  = 8.1 Hz,

4H), 6.90 (d,  $J = 7.9$  Hz, 4H), 3.90 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ):  $\delta$  164.6, 159.5, 155.6, 146.2, 131.1, 130.2, 128.3, 124.0, 116.2, 115.0, 113.7, 55.0. ESI-MS  $m/z$ :  $\text{C}_{34}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4$  found 540.04 (M $^-$ ).

**4.5. General Method for Preparing Aza-BODIPYs.** Aza-dipyromethene (**6a**) was added to a 50 mL ball flask equipped with magnetic stirring (0.08 g, 0.17 mmol), DIPEA (0.50 mL, 2.88 mmol),  $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$  (0.44 mL, 14.1 mmol), and DCM dry (15 mL) under inert conditions using argon. The reaction mixture was left in magnetic stirring at room temperature for 24 h. The excess solvent was removed to reduced pressure. The product was purified by prep-plate chromatography using a mobile phase of petroleum ether–ethyl acetate (7:3).

**4.5.1. 4,4'-(5,5-Difluoro-3,7-diphenyl-5H-4 $\lambda$ 4,5 $\lambda$ 4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,5,2]triazaborinine-1,9-diyldiphenol (**7a**).**<sup>40</sup> Metallic solid red, (0.036 g, 0.07 mmol, 41.0% yield). Mp >330 °C. IR (ATR, neat): 3351.8, 1599.0, 1508.5, 1017.8, 816.3, 742.0  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ):  $\delta$  8.20 (dd,  $J_1 = 17.4$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 8H), 7.55–7.46 (m, 6H), 7.44 (s, 2H), 7.01 (d,  $J = 8.9$  Hz, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ):  $\delta$  160.2, 156.0, 145.1, 142.7, 133.1, 132.0, 130.1, 129.5, 128.0, 125.1, 118.2, 116.6.  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ):  $\delta$  -131.93 (q,  $J = 36.0$  Hz). ESI-MS  $m/z$ :  $\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_2$  found 510.5 (M-H $_2\text{O}$ -1).

**4.5.2. 4,4'-(5,5-Difluoro-1,9-diphenyl-5H-4 $\lambda$ 4,5 $\lambda$ 4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,5,2]triazaborinine-3,7-diyldiphenol (**7b**).**<sup>41</sup> Metallic solid red, (0.038 g, 0.07 mmol, 61.0% yield). Mp >314 °C. IR (ATR, neat): 3370.3, 1604.0, 1582.8, 1484.6, 1227.4, 1025.8, 805.7, 742.0  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ):  $\delta$  8.29–8.07 (m, 8H), 7.63–7.45 (m, 6H), 7.26 (s, 2H), 7.02 (d,  $J = 48.6$  Hz, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ):  $\delta$  160.4, 159.8, 146.1, 145.0, 133.0, 132.2, 131.5, 130.5, 129.3, 125.0, 118.3, 116.7.  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ):  $\delta$  -130.29 (q,  $J = 32.0$  Hz). ESI-MS  $m/z$ :  $\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_2$  found 528.21 (M-1).

**4.5.3. 4,4'-(5,5-Difluoro-1,9-bis(4-methoxyphenyl)-5H-4 $\lambda$ 4,5 $\lambda$ 4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,5,2]triazaborinine-3,7-diyldiphenol (**7c**).**<sup>42</sup> Metallic solid red, (0.55 g, 0.93 mmol, 49.0% yield). Mp 218–220 °C. IR (ATR, neat): 3513.6, 3396.9, 1599.0, 1474.0, 1232.7, 1076.2, 813.6, 742.0  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ):  $\delta$  8.9 (bs, 1H), 8.15 (dd,  $J_1 = 12.0$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 8H), 7.25 (s, 2H), 7.07 (d,  $J = 8.0$  Hz, 4H), 7.00 (d,  $J_1 = 8.0$  Hz, 4H), 3.91 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ):  $\delta$  162.9, 158.6, 145.8, 143.9, 132.5, 131.9, 125.2, 125.1, 118.0, 116.6, 114.9, 55.9.  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ):  $\delta$  -130.99 (q,  $J = 36.0$  Hz). ESI-MS  $m/z$ :  $\text{C}_{34}\text{H}_{26}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_4$  found 588.28 (M $^-$ ). HRMS (EI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{34}\text{H}_{26}\text{BF}_2\text{N}_3\text{NaO}_4$  [M] + 612.1877, found 612.1880.

**4.5.4. 4,4'-(5,5-Difluoro-3,7-bis(4-methoxyphenyl)-5H-4 $\lambda$ 4,5 $\lambda$ 4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,5,2]triazaborinine-1,9-diyldiphenol (**7d**).** Metallic solid red, (0.2 g, 0.33 mmol, 54.0% yield). Mp >252 °C. IR (ATR, neat): 3192.6, 1601.3, 1489.9, 1230.0, 1097.4, 805.7, 747.3  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ):  $\delta$  8.20 (d,  $J = 9.0$  Hz, 4H), 8.13 (d,  $J = 9.0$  Hz, 4H), 7.29 (s, 2H), 7.10 (d,  $J = 9.0$  Hz, 4H), 7.00 (d,  $J = 9.0$  Hz, 4H), 3.90 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ):  $\delta$  161.9, 161.3, 145.0, 143.2, 132.8, 132.4, 131.7, 121.2, 124.2, 118.4, 115.1, 55.8.  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ):  $\delta$  -131.22 (q,  $J = 32.0$  Hz). ESI-MS  $m/z$ :  $\text{C}_{34}\text{H}_{26}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_4$  found 587.83 (M-1).

**4.6. Computational Calculations.** Hartree–Fock calculations were carried out with the Gaussian 09 program,

employing the following conditions: RHF calculation method, 6-31G\* basis set, charge 0, spin singlet.

Table S2 (Supporting Information) describes the performed calculations.

**4.7. Cell Culture.** In this study, a model of Langerhans  $\beta$ -cell was employed (RIN-m5F), and it comes from the American Type Cell Culture. RIN-m5F was proliferated in RPMI 1640 medium supplemented with glutamine and 10% fetal bovine serum. Penicillin (50 U/mL) and streptomycin (50  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) were added to the media. The culture conditions were at a temperature of 37 °C and a 5%  $\text{CO}_2$  humidified atmosphere, according to the previous protocols.<sup>33,34,43</sup>

**4.8. Preparation of Fatty Acids.** Models of lipotoxicity were evaluated according to previous work.<sup>33,44</sup> Palmitic (PA) and stearic acid (SA) were prepared in an ethanol/ $\text{H}_2\text{O}$  solution (1:1; vol:vol) at 60 °C to reach a final concentration of 75 mM. Subsequently, fatty acids (FA) were incubated with free FA-bovine serum albumin (BSA) for 2 h at 37 °C, filtered by 0.22  $\mu\text{m}$ , and then diluted in a culture medium under different concentrations with a final molar ratio of 4:1 (FA/BSA),<sup>16</sup> before adding the different treatments to the culture plates.

**4.9. Synthesis of BDP-FA.** Based on a methodology developed by our group, BDP coupled to palmitic acid (BDP-PA) and BODIPY coupled to stearic acid (BDP-SA) were synthesized.<sup>14</sup> Briefly, BODIPY-8-ethylendiamine (0.436 mM) in dichloromethane anhydrous (8 mL) was added to  $N'$ -ethylcarbodiimide hydrochloride (0.524 mM), hydroxybenzotriazole (0.524 mM),  $N$ -methylmorpholine (1.308 mM), and the corresponding FA (0.48 mM). The mixture reaction was stirred for 5 h under the argon atmosphere at 25 °C. The solvent was eliminated under reduced pressure, and the product was dissolved in water (20 mL) and extracted with dichloromethane. The combined organic extracts were washed with brine and dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and later, the product was concentrated. The crude product was purified by flash chromatography. All structures were confirmed by mass spectroscopy and nuclear magnetic resonance (NMR).

**4.10. Confocal Microscopy.** A LEICA TCS-SP8 confocal laser scanning microscope (LEICA Microsystems Heidelberg GmbH) was employed to characterize the cellular distribution of the Aza-BODIPYs under different metabolic overload conditions. For these experiments, cells were proliferated to reach 90% of confluence on glass coverslips, previously treated with UV radiation for 30 min. Then, during 1 h, cells were maintained in starving conditions without PBS and treated under different experimental conditions. Later, cell cultures were washed with PBS three times, incubated with aza-BODIPY (**7b**) for 30 min (0.8  $\mu\text{M}$ ), and then, the Hoechst probe was added to the cultures and incubated for 30 min. Later, cells were washed extensively and fixed with cold paraformaldehyde and mounted for observation. Macroscopically different zones were recorded, preferentially at the center of the specimens, to depict representative images. Images were recorded at excitation/emission wavelengths of 405/430–550 and 638/650–750 nm for the detection of Hoechst (blue) and aza-BODIPY (**7b**) (red), respectively.

**4.10.1. Colocalization of the ER-Tracker Probe and BDP-FA.** RIN-m5F cells were proliferated to 90% of confluence and treated with BDP-PA and SA (5–25  $\mu\text{M}$ ) for 12 h. Later, culture cells were washed with HBSS buffer, and then, ER-tracker (1  $\mu\text{M}$ ) was added and incubated for 25 min at 37 °C. ER-tracker is a fluorescent probe that colocalizes on

endoplasmic reticulum. Cells were washed once with HBSS buffer and fixed with 4% formaldehyde for 2 min at 37 °C. Finally, cells were washed twice with PBS 1X. Images were recorded at excitation/emission wavelengths of 488/495–545 and 587/615 nm for the detection of BDP-PA, BDP-SA (green), and ER-tracker (red), respectively.

**4.11. Cell Viability Assays.** Cell viability was evaluated using the MTT assay according to previous protocols of our group.<sup>45</sup>

First, cells were seeded onto 96-well plates at a density of 23,000 cells/well and allowed to grow at 90% of confluence. Next, the culture medium was replaced with an Opti-MEM medium. After 2 h under this condition, cells were treated under the desired experimental conditions. Later, 30  $\mu$ L of an MTT stock solution (2.1 mg/mL) was added to the culture media to obtain a final concentration of 0.5 mg/mL. Formazan crystals formed after 4 h of incubation were further dissolved by adding buffer lysis (20% sodium dodecyl sulfate, 50% *N,N*-dimethylformamide, pH 4.0). Finally, the optical density was measured at 570 nm using a microplate reader. Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

**4.12. Statistical Analysis.** Statistical analyses were conducted by the one-way analysis of variance (ANOVA) protocol, and differences among means were compared with the Bonferroni assay using a significance level of  $p < 0.01$ .

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.2c04151>.

The included file contains the following results: <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, <sup>19</sup>F NMR, FTIR, UV–vis, MF, MS, and HRMS spectra; microscopy confocal images; and the results of theoretical calculations of aza-BODIPYs (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

**Ignacio A. Rivero** – Centro de Graduados e Investigación en Química, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tijuana, Tijuana, BC 22510, México; [orcid.org/0000-0003-4920-6379](https://orcid.org/0000-0003-4920-6379); Email: [irivero@tectijuana.mx](mailto:irivero@tectijuana.mx)

### Authors

**Yaneth C. Pino** – Centro de Graduados e Investigación en Química, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tijuana, Tijuana, BC 22510, México

**Jorge A. Aguilera** – Centro de Graduados e Investigación en Química, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tijuana, Tijuana, BC 22510, México

**Víctor García-González** – Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, BC 21100, México

**Manuel Alatorre-Meda** – Centro de Graduados e Investigación en Química-Grupo de Biomateriales y Nanomedicina, CONACyT-Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tijuana, Tijuana, BC 22510, México; [orcid.org/0000-0002-3301-9619](https://orcid.org/0000-0002-3301-9619)

**Eustolia Rodríguez-Velázquez** – Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Baja California, Tijuana, BC 22390, México; Centro de Graduados e Investigación en

Química-Grupo de Biomateriales y Nanomedicina, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tijuana, Tijuana, BC 22510, México

**Karla A. Espinoza** – Centro de Graduados e Investigación en Química, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tijuana, Tijuana, BC 22510, México

**Héctor Frayde-Gómez** – Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, BC 21100, México

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acsomega.2c04151>

## Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the support for this project by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, GRANT No. 242823) and graduate scholarship (No. D06211335). We also acknowledge Tecnológico Nacional de México for the support to this project (Clave 7814.20-P) and 21a Convocatoria Interna de Apoyo a Proyectos de Investigación (Coordinación General de Posgrado e Investigación/UABC). M.A.-M. thanks funding from CONACyT (Mexico) through Research Projects INFR-2015-251863 and PDCPN-2015-89.

## ■ REFERENCES

- (1) Ávila-Cossío, M. E.; Rivero, I. A.; García-González, V.; Alatorre-Meda, M.; Rodríguez-Velázquez, E.; Calva-Yáñez, J. C.; Espinoza, K. A.; Pulido-Capiz, A. Preparation of Polymeric Films of PVDMA-PEI Functionalized with Fatty Acids for Studying the Adherence and Proliferation of Langerhans  $\beta$ -Cells. *ACS Omega* **2020**, *5*, 5249–5257.
- (2) Zhang, T.; Ma, C.; Sun, T.; Xie, Z. Unadulterated BODIPY Nanoparticles for Biomedical Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *390*, 76–85.
- (3) Kolemen, S.; Akkaya, E. U. Reaction-Based BODIPY Probes for Selective Bio-Imaging. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *354*, 121–134.
- (4) Konken, C. P.; Haufe, G.; Brömmel, K.; Wunsch, B.; Schäfers, M.; Wagner, S.; Hugenberg, V. Development of Symmetric O-BODIPYs with Different Optical Properties as Building Blocks for the Synthesis of Ligands for Multimodal Imaging. *Dyes Pigm.* **2018**, *158*, 88–96.
- (5) Bertrand, B.; Passador, K.; Goze, C.; Denat, F.; Bodio, E.; Salmain, M. Metal-Based BODIPY Derivatives as Multimodal Tools for Life Sciences. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *358*, 108–124.
- (6) Kue, C. S.; Ng, S. Y.; Voon, S. H.; Kamkaew, A.; Chung, L. Y.; Kiew, L. V.; Lee, H. B. Recent Strategies to Improve Boron Dipyrromethene (BODIPY) for Photodynamic Cancer Therapy: An Updated Review. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2018**, *17*, 1691–1708.
- (7) Ni, Y.; Wu, J. Far-Red and near Infrared BODIPY Dyes: Synthesis and Applications for Fluorescent PH Probes and Bio-Imaging. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3774–3791.
- (8) Loudet, A.; Burgess, K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891–4932.
- (9) Loudet, A.; Bandichhor, R.; Wu, L.; Burgess, K. Functionalized BF<sub>2</sub> Chelated Azadipyrromethene Dyes. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 3642–3654.
- (10) Bandodkar, A. J.; Wang, J. Non-Invasive Wearable Electrochemical Sensors: A Review. *Trends Biotechnol.* **2014**, *32*, 363–371.
- (11) Zhao, W.; Carreira, E. M. Conformationally Restricted Aza-BODIPY: Highly Fluorescent, Stable Near-Infrared Absorbing Dyes. *Chem. – Eur. J.* **2006**, *12*, 7254–7263.
- (12) Gorman, A.; Killoran, J.; O’Shea, C.; Kenna, T.; Gallagher, W. M.; O’Shea, D. F. In Vitro Demonstration of the Heavy-Atom Effect

- for Photodynamic Therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10619–10631.
- (13) McDonnell, S. O.; Hall, M. J.; Allen, L. T.; Byrne, A.; Gallagher, W. M.; O'Shea, D. F. Supramolecular Photonic Therapeutic Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16360–16361.
- (14) Hall, M. J.; Allen, L. T.; O'Shea, D. F. PET Modulated Fluorescent Sensing from the BF<sub>2</sub> Chelated Azadipyromethene Platform. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 776–780.
- (15) Kamkaew, A.; Thavornpradit, S.; Puangsamlee, T.; Xin, D.; Wanichacheva, N.; Burgess, K. Oligoethylene Glycol-Substituted Aza-BODIPY Dyes as Red Emitting ER-Probes. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 8271–8276.
- (16) McDonnell, S. O.; O'Shea, D. F. Near-Infrared Sensing Properties of Dimethylamino-Substituted BF<sub>2</sub>-Azadipyromethenes. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3493–3496.
- (17) Coskun, A.; Yilmaz, M. D.; Akkaya, E. U. Bis(2-Pyridyl)-Substituted Boratriazaindacene as an NIR-Emitting Chemosensor for Hg(II). *Org. Lett.* **2007**, *9*, 607–609.
- (18) Killoran, J.; Allen, L.; Gallagher, J. F.; Gallagher, W. M.; O'Shea, D. F. Synthesis of BF<sub>2</sub> Chelates of Tetraarylazadipyromethenes and Evidence for Their Photodynamic Therapeutic Behaviour. *Chem. Commun.* **2002**, *17*, 1862–1863.
- (19) Lopez, T.; Ortiz, E.; Alvarez, M.; Navarrete, J.; Odrizola, J. A.; Martinez-Ortega, F.; Páez-Mozo, E. A.; Escobar, P.; Espinoza, K. A.; Rivero, I. A. Study of the Stabilization of Zinc Phthalocyanine in Sol-Gel TiO<sub>2</sub> for Photodynamic Therapy Applications. *Nanomedicine* **2010**, *6*, 777.
- (20) Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K. Photodynamic Therapy for Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 380–387.
- (21) Zhang, X. F.; Zhang, Y.; Liu, L. Fluorescence Lifetimes and Quantum Yields of Ten Rhodamine Derivatives: Structural Effect on Emission Mechanism in Different Solvents. *J. Lumin.* **2014**, *145*, 448–453.
- (22) Shi, Z.; Han, X.; Hu, W.; Bai, H.; Peng, B.; Ji, L.; Fan, Q.; Li, L.; Huang, W. Bioapplications of Small Molecule Aza-BODIPY: From Rational Structural Design to in Vivo Investigations. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 7533–7567.
- (23) Ma, D.; Hou, S.; Bae, C.; Pham, T. C.; Lee, S.; Zhou, X. Aza-BODIPY Based Probe for Photoacoustic Imaging of ONOO<sup>-</sup> in Vivo. *Chin. Chem. Lett.* **2021**, *32*, 3886–3889.
- (24) Vopálenská, I.; Váňková, L.; Palková, Z. New Biosensor for Detection of Copper Ions in Water Based on Immobilized Genetically Modified Yeast Cells. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *72*, 160–167.
- (25) Sun, S.; Wu, X.; Huang, Y.; Jiang, Q.; Zhu, S.; Sun, S. Visual Detection of Cu<sup>2+</sup> in High-Copper Feed Based on a Fluorescent Derivative of Rhodamine B. *Microchem. J.* **2021**, *171*, No. 106858.
- (26) Ren, M.; Xu, Q.; Bai, Y.; Wang, S.; Kong, F. Construction of a Dual-Response Fluorescent Probe for Copper (II) Ions and Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S) Detection in Cells and Its Application in Exploring the Increased Copper-Dependent Cytotoxicity in Presence of H<sub>2</sub>S. *Spectrochim. Acta, Part A* **2021**, *249*, No. 119299.
- (27) Durgadas, C. V.; Sharma, C. P.; Sreenivasan, K. Fluorescent Gold Clusters as Nanosensors for Copper Ions in Live Cells. *Analyst* **2011**, *136*, 933–940.
- (28) Liu, M.; Wang, K.; Wang, H.; Lu, J.; Xu, S.; Zhao, L.; Wang, X.; Du, J. Simple and Sensitive Colorimetric Sensors for the Selective Detection of Cu(II). *RSC Adv.* **2021**, *11*, 11732–11738.
- (29) Saleh, S. M.; Ali, R.; Alminderej, F.; Ali, I. A. I. Ultrasensitive Optical Chemosensor for Cu(II) Detection. *Int. J. Anal. Chem.* **2019**, *2019*, 1.
- (30) Xie, X.; Qin, Y. A Dual Functional near Infrared Fluorescent Probe Based on the Bodipy Fluorophores for Selective Detection of Copper and Aluminum Ions. *Sens. Actuators, B* **2011**, *156*, 213–217.
- (31) Gawale, Y.; Mangalath, S.; Adarsh, N.; Joseph, J.; Ramaiah, D.; Sekar, N. Novel Aza-BODIPY Based Turn on Selective and Sensitive Probe for on-Site Visual Detection of Bivalent Copper Ions. *Dyes Pigm.* **2019**, *171*, No. 107684.
- (32) Praikaew, P.; Roongcharoen, T.; Charoenpanich, A.; Kungwan, N.; Wanichacheva, N. Near-IR Aza-BODIPY-Based Probe for the Selective Simultaneous Detection of Cu<sup>2+</sup> in Aqueous Buffer Solutions and Its Application in Biological Samples. *J. Photochem. Photobiol., A* **2020**, *400*, No. 112641.
- (33) Acosta-Montaño, P.; Rodríguez-Velázquez, E.; Ibarra-López, E.; Frayde-Gómez, H.; Mas-Oliva, J.; Delgado-Coello, B.; Rivero, I. A.; Alatorre-Meda, M.; Aguilera, J.; Guevara-Olaya, L.; García-González, V. Fatty Acid and Lipopolysaccharide Effect on Beta Cells Proteostasis and Its Impact on Insulin Secretion. *Cell* **2019**, *8*, 884.
- (34) Pulido-Capiz, A.; Díaz-Molina, R.; Martínez-Navarro, I.; Guevara-Olaya, L. A.; Casanueva-Pérez, E.; Mas-Oliva, J.; Rivero, I. A.; García-González, V. Modulation of Amyloidogenesis Controlled by the C-Terminal Domain of Islet Amyloid Polypeptide Shows New Functions on Hepatocyte Cholesterol Metabolism. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 331.
- (35) Acosta-Montaño, P.; García-González, V. Effects of Dietary Fatty Acids in Pancreatic Beta Cell Metabolism, Implications in Homeostasis. *Nutrients* **2018**, *10*, 393.
- (36) García-González, V.; Gutiérrez-Quintanar, N.; Mas-Oliva, J. The C-Terminal Domain Supports a Novel Function for CETPI as a New Plasma Lipopolysaccharide-Binding Protein. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16091.
- (37) Prohaska, J. R.; Gybina, A. A. Intracellular Copper Transport in Mammals. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 1003–1006.
- (38) Petris, M. J.; Mercer, J. F. B.; Culvenor, J. G.; Lockhart, P.; Gleeson, P. A.; Camakaris, J. Ligand-Regulated Transport of the Menkes Copper P-Type ATPase Efflux Pump from the Golgi Apparatus to the Plasma Membrane: A Novel Mechanism of Regulated Trafficking. *EMBO J.* **1996**, *15*, 6084–6095.
- (39) Yamaguchi, Y.; Heiny, M. E.; Suzuki, M.; Gitlin, J. D. Biochemical Characterization and Intracellular Localization of the Menkes Disease Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 14030–14035.
- (40) Bandi, V.; El-Khouly, M. E.; Ohkubo, K.; Nesterov, V. N.; Zandler, M. E.; Fukuzumi, S.; D'Souza, F. Excitation-Wavelength-Dependent, Ultrafast Photoinduced Electron Transfer in Bisferrocene/BF<sub>2</sub>-Chelated-Azadipyromethene/Fullerene Tetrads. *Chem. – Eur. J.* **2013**, *19*, 7221–7230.
- (41) Xu, J.; Zhai, J.; Xu, Y.; Zhu, J.; Qin, Y.; Jiang, D. A Near-Infrared Fluorescent Aza-Bodipy Probe for Dual-Wavelength Detection of Hydrogen Peroxide in Living Cells. *Analyst* **2016**, *141*, 2380–2383.
- (42) Xiang, H. J.; Tham, H. P.; Nguyen, M. D.; Fiona Phua, S. Z.; Lim, W. Q.; Liu, J. G.; Zhao, Y. An Aza-BODIPY Based near-Infrared Fluorescent Probe for Sensitive Discrimination of Cysteine/Homocysteine and Glutathione in Living Cells. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 5220–5223.
- (43) Martínez-Navarro, I.; Díaz-Molina, R.; Pulido-Capiz, A.; Mas-Oliva, J.; Luna-Reyes, I.; Rodríguez-Velázquez, E.; Rivero, I. A.; Ramos-Ibarra, M. A.; Alatorre-Meda, M.; García-González, V. Lipid Modulation in the Formation of  $\beta$ -Sheet Structures. Implications for De Novo Design of Human Islet Amyloid Polypeptide and the Impact on  $\beta$ -Cell Homeostasis. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1–21.
- (44) Galindo-Hernández, O.; Córdova-Guerrero, I.; Díaz-Rubio, L. J.; Pulido-Capiz, A.; Díaz-Villanueva, J. F.; Castañeda-Sánchez, C. Y.; Serafín-Higuera, N.; García-González, V. Protein Translation Associated to PERK Arm Is a New Target for Regulation of Metainflammation: A Connection with Hepatocyte Cholesterol. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120*, 4158–4171.
- (45) García-González, V.; Mas-Oliva, J. Amyloidogenic Properties of a D/N Mutated 12 Amino Acid Fragment of the C-Terminal Domain of the Cholesteryl-Ester Transfer Protein (CETP). *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 2019–2035.