



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ANÁLISIS DEL PAPEL DE EXOSOMAS
DERIVADOS DE MAMOSFERAS DE LA LÍNEA
CELULAR 4T1 DE CÁNCER DE MAMA EN LA
REGULACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

OSCAR OVANDO MARQUEZ



DIRECTOR DE TESIS:
DR. EDUARDO A. GARCÍA ZEPEDA

ASESOR INTERNO:
DR. JORGE HERNÁNDEZ MONTES

CIUDAD DE MÉXICO. MAYO DE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor,
la electricidad y la energía atómica: la voluntad.”

Albert Einstein

“El sabio no dice todo lo que piensa, pero siempre
piensa todo lo que dice.”

Aristóteles

“La verdadera sabiduría está en reconocer la propia
ignorancia.”

Sócrates

Comunicado oficial del examen profesional



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno **OVANDO MARQUEZ OSCAR**, con número de cuenta **308227473**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **03 de mayo de 2016** a las **09:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. LETICIA MORALES LEDESMA

VOCAL Dr. EDUARDO ALBERTO GARCÍA ZEPEDA*

SECRETARIO Dr. JORGE HERNÁNDEZ MONTES

SUPLENTE Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

SUPLENTE Dr. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

El título de la tesis que presenta es: **Análisis del papel de exosomas derivados de mamosferas de la línea celular 4T1 de cáncer de mama en la regulación de la angiogénesis.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 31 de marzo de 2016

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR



RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Investigaciones Biomédicas

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Eduardo A. García Zepeda, en el Laboratorio de Investigación sobre la Biología de las Quimiocinas en el Departamento de Inmunología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Agradezco de manera especial al apoyo y asesoría del **Dr. Eduardo García Zepeda** para el desarrollo de este proyecto, así como brindarme todas las facilidades para los experimentos que reporto en este trabajo, así como sus críticas y consejos para mi desarrollo académico y profesional.

A la Técnico Académico **Q. F. B. Gisela Du Pont** por el soporte técnico y asesoría brindada para el desarrollo de las técnicas y disposición de los reactivos utilizados para el desarrollo de este trabajo.

A la **Dra. Gloria Soldevila** por el apoyo ofrecido durante todo el proyecto, por sus consejos, asesoría en la discusión activa de este trabajo y colaboración con nuestro grupo de investigación.

Al **Dr. Miguel Tapia** de la unidad de microscopia del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por su asesoría en la toma de imágenes y su análisis.

Al **Dr. Jorge Hernández Montes** por su apoyo como asesor interno, por aportar a la discusión de este trabajo que presento.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Quiero agradecer a mi madre Ana Marquez, por estar presente cada día de mi vida, guiándome con su cariño y por enseñarme con su ejemplo a salir adelante sin importar las adversidades, por enseñarme a ser humilde y no olvidar de donde vengo y a donde voy.

A mi padre Oscar Ovando, por motivarme a conseguir mis objetivos, por cuidar de mi y enseñar a mi hermano y a mí a ayudar sin esperar nada a cambio y que en la vida uno es responsable de sus propios actos, éxitos y fracasos.

A mi hermano Omar Ovando por transmitirme esa energía positiva impulsándome para no dejarme caer en los momentos difíciles y sacarme una sonrisa todos los días, por confiar en mí y compartir tantos momentos inolvidables.

A mi tía Ma. Teresa Ovando y a mi tío Sergio Montiel por ofrecerme una segunda casa, apoyarme en cada etapa de mi vida, estando ahí en situaciones difíciles no solo para mí sino para mi familia. Por enseñarme valores con su ejemplo y confiar en mí. Así como a mis primos Sergio y Lubia que son como dos hermanos para mí.

A mi tío Maurilio Marquez con el cual tal vez no he convivido mucho tiempo pero prácticamente crecí con él, y por momentos se convirtió en un hermano mayor más que un tío que me apoyo.

A Marlene Herrera por convertirse en una de las personas más importantes de mi vida, por compartir conmigo muchos de los momentos más felices desde el CCH hasta estos momentos en los que culmino mi formación y sobre todo por estar

conmigo en las buenas y en las malas siendo mi mano derecha y una luz en la oscuridad.

A mi compañero de la FES-Zaragoza Juan Manuel con el que he pasado aventuras inolvidables durante la carrera y me ha dado su apoyo y consejos que nos han llevado a ser muy buenos amigos.

Al Dr. Eduardo A. García Zepeda por aceptarme como integrante en su laboratorio, por motivarme a seguir adelante en la investigación e interesarse en mi formación académica y profesional, y al cual aprecio por demostrar el interés en sus alumnos y tratar de hacer relucir el máximo de nuestras capacidades profesionales.

Al Dr. Jorge Hernández Montes por su apoyo como asesor, por enseñarme como es el trabajo en el laboratorio en mi estancia en el último año de la carrera y ser un buen amigo además de un gran profesor.

A mis compañeros de laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas del grupo de EXORATONES!!! Cynthia, Eduardo, Toño, Scarlett e Ismael que me ayudaron para desarrollar mis experimentos y me brindaron su confianza como amigos más que compañeros.

Por último quiero agradecer a mi abuela Josefina Lira QEPD por siempre pensar en mi familia aunque la distancia nos separaba, siempre pensamos en ti, y lo seguiremos haciendo, porque con tu lucha del día a día motivaste a tus nietos a no darse por vencidos.

Índice

Contenido	Página
Abreviaturas	1
Resumen	3
1. Introducción	4
1.1. Cáncer de mama. Definición, estadísticas, factores de riesgo y tratamiento	4
1.2. Células madre tumorales	6
1.3. Microambiente tumoral	8
1.4. Desarrollo del cáncer	10
1.5. Angiogénesis	13
1.6. Exosomas su biogénesis y sus funciones	15
2. Antecedentes	21
3. Planteamiento del problema y justificación	22
4. Hipótesis	23
5. Objetivos	24
6. Métodos	25
6.1. Preparación de SFB libre de exosomas	
6.2. Cultivos de células 4T1	
6.3. Generación de mamosferas	
6.4. Purificación de exosomas	
6.5. Caracterización de exosomas (Citometría, WB, Microscopía electrónica)	
6.6. Ensayos de angiogénesis (Cultivo de células HUVEC, Ensayos funcionales)	
7. Resultados	32
8. Discusión	46
9. Conclusiones	52
10. Perspectivas	53
11. Referencias	54
12. Anexos	65

Abreviaturas

ATTC	American Type Culture Collection
CM	Cáncer de mama
CTL	Control
CSC	Célula madre tumoral
CXCR	Receptores de quimiocinas
CXCL	Ligandos de quimiocinas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECGS	Suplemento de crecimiento endotelial
EMT	Transición mesenquimal-epitelial
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HUVEC	Células endoteliales de vena umbilical humanas
IL-8	Interleucina 8
mRNA	RNA mensajero
miRNA	micro RNA
MSC	Células troncales mesenquimales
MVB	Cuerpos multivesiculares
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RIPA	Solución de lisis (Ratio-Immunoprecipitation Assay)
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribosomal
SFB	Suero fetal de bovino
TGF-α	Factor de crecimiento tumoral alfa
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa

tRNA	RNA de transferencia
Tregs	Células T reguladoras
TSG	Gen de susceptibilidad tumoral
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

Resumen

En el presente trabajo se evalúa el potencial funcional de exosomas derivados de células (CSC por sus siglas en inglés) de cáncer de mama (CM). Los exosomas son micro-vesículas secretadas por todos los tipos celulares a través de la membrana plasmática y son parte del transporte vesicular, miden entre 30-100 nm de diámetro, tienen una doble membrana lipídica, y son acarreadores de proteínas que se encuentran en el citoplasma celular.

Para evaluar su potencial funcional pro-angiogénico *in vitro*, los exosomas se purificaron de cultivos de mamíferas derivadas de la línea celular de CM murino 4T1. Esta es una línea celular de estadio IV de CM y se asemeja en gran medida a las células humanas. La formación de mamíferas permiten la obtención de CSC *in vitro*. Una vez cuantificados, los exosomas se co-cultivaron con células endoteliales de vena umbilical humanas (HUVEC), y se evaluó la capacidad de regular la formación de vasos *in vitro*.

Los resultados obtenidos muestran que los exosomas de las CSC son capaces de inducir *in vitro* el proceso de la angiogénesis en forma de dosis dependiente.

1.Introducción

1.1 Cáncer de mama. Definición, estadísticas, factores de riesgo y tratamiento

El cáncer es un proceso descontrolado de crecimiento y diseminación de células en el organismo, que provoca la alteración de los mecanismos reguladores de una célula normal, interviniendo en la función adecuada de tejidos y órganos sanos. Esta enfermedad es actualmente de las principales causas de mortalidad en el mundo (OMS, 2013).

El CM hace referencia a un tumor maligno que se desarrolla a partir de células epiteliales mamarias. Generalmente, el CM se origina en las células de los lobulillos, que son las glándulas productoras de leche, o en los conductos, que son las vías que transportan la leche desde los lobulillos hasta el pezón. Con menos frecuencia, el cáncer de mama puede originarse en los tejidos estromales, que incluyen a los tejidos conjuntivos grasos y fibrosos de la mama (Breast Cancer.org).

Actualmente el CM es el cáncer más frecuente en las mujeres tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo. La incidencia del cáncer va en aumento en el nivel global (Figura 1), causando en 2008 la muerte de 7.6 millones de mujeres, de las cuales cerca de 520,000 se debieron al CM (Globocan, 2008).

En México, el CM es el cáncer de mayor incidencia y prevalencia en mujeres mexicanas adultas de 30 a 54 años de edad (cerca de 25%), con una mortalidad de 14.2% (Figura 2).

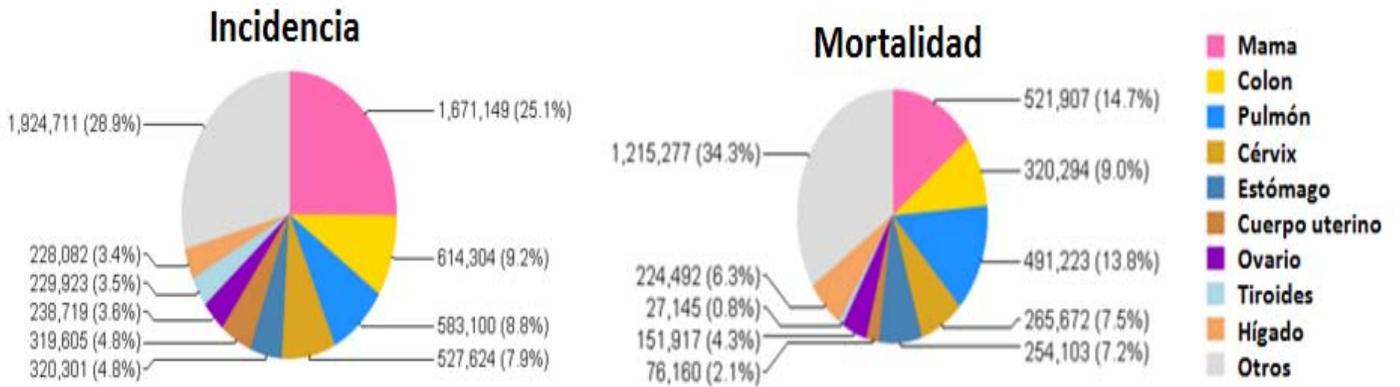


Figura 1. Porcentaje de incidencia y mortalidad de CM a nivel mundial (Globocan, 2012).

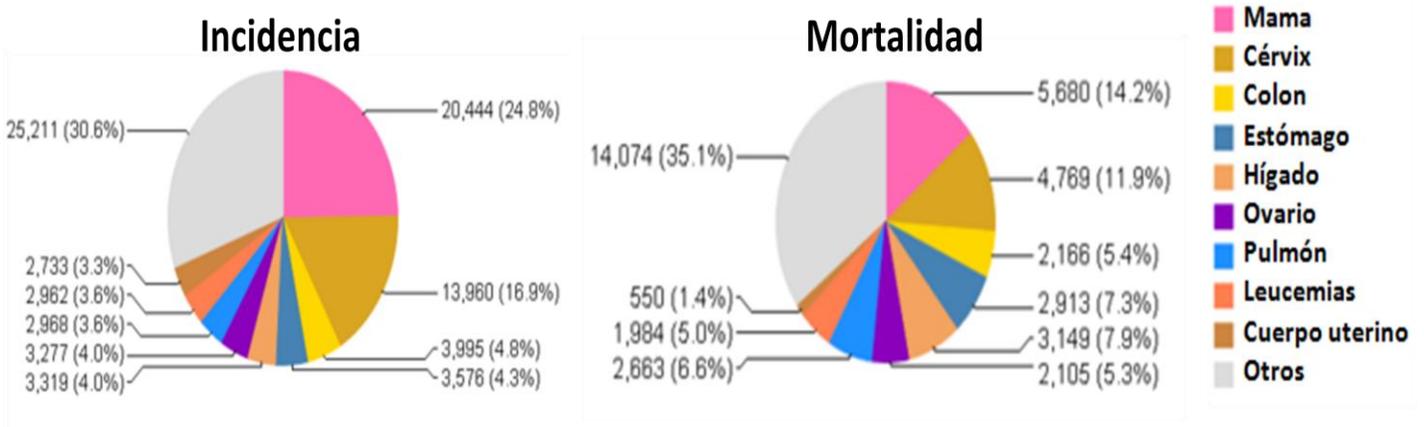


Figura 2. Porcentaje de incidencia y mortalidad de CM en México (Globocan, 2012).

Dentro de los factores de riesgo establecidos para el desarrollo del cáncer de mama, se incluyen factores como: La edad, el primer embarazo en mujeres mayores de 30 años, uso de anticonceptivos hormonales de alta dosis, menopausia tardía, terapias hormonales, alta densidad del tejido de las mamas, factores genéticos, factores nutricionales, no realizar actividad física, la historia y duración de la lactancia materna, obesidad, consumo de tabaco, consumo de alcohol, exposición a radiación ionizante y procesos inflamatorios. Así mismo se ha observado que el nivel socioeconómico influye con el inicio y desarrollo de la patología (American Cancer Society, 2014; Breast Cáncer.org; Kamińska. *et al.* 2015; Navarro. *et al.* 2015; OMS, 2015; Ortíz y Galván. 2007).

A pesar de los diversos tipos de tratamiento contra el cáncer; cirugía (extirpación del tumor), radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia (estimulación del sistema inmune para atacar el cáncer), terapia dirigida (promover cambios en la proliferación y diseminación de células cancerosas) y trasplante de células madre, no es seguro que en años posteriores al tratamiento, el paciente no reincida en la enfermedad (American Cancer Society, 2014; Breast Cáncer.org).

1.2 Células madre tumorales

Los organismos cuentan con diversos tipos de células especializadas, algunas de las cuales tienen la habilidad de auto-renovarse según sus requerimientos. La diferenciación celular es un proceso necesario para el mantenimiento del organismo, y las células que tienen estas habilidades se denominan células madre. Sin embargo, estas células madre se encuentran también en el desarrollo del cáncer y regulando procesos de gran relevancia en la progresión de la enfermedad.

En los tumores se encuentran una gran cantidad de células que tienen diferente potencial de proliferación y diferenciación, por lo cual se dice que el tumor se compone de una población celular heterogénea (Grange. *et al.* 2011; Visvader. 2011), y esta heterogeneidad depende del estadio de desarrollo o crecimiento en el que se encuentra el cáncer. Dentro de esta diversidad celular en los tumores, podemos encontrar a una pequeña población de células madre tumorales (CSC por sus siglas en inglés), las cuales se producen por mutaciones en el genoma de las células madre; las mutaciones se mantienen en las futuras generaciones, al igual que la capacidad de auto-renovación, y tienen gran potencial proliferativo al igual que las células madre sanas, además de que son capaces de promover la generación de nuevos tumores cuando el cáncer es de un estadio metastásico (Figura 3) (Yang. *et al.* 2015).

Así mismo se ha propuesto que las CSC, juegan un papel crucial para la resistencia a los tratamientos contra el cáncer (quimioterapias, fármacos, antígenos tumorales, tratamientos con antagonistas), y la reincidencia de esta enfermedad y la migración a otros tejidos es promovida principalmente por las CSC (Adorno. *et al.* 2015; Shaw. *et al.* 2012; Weinberg. 2007).

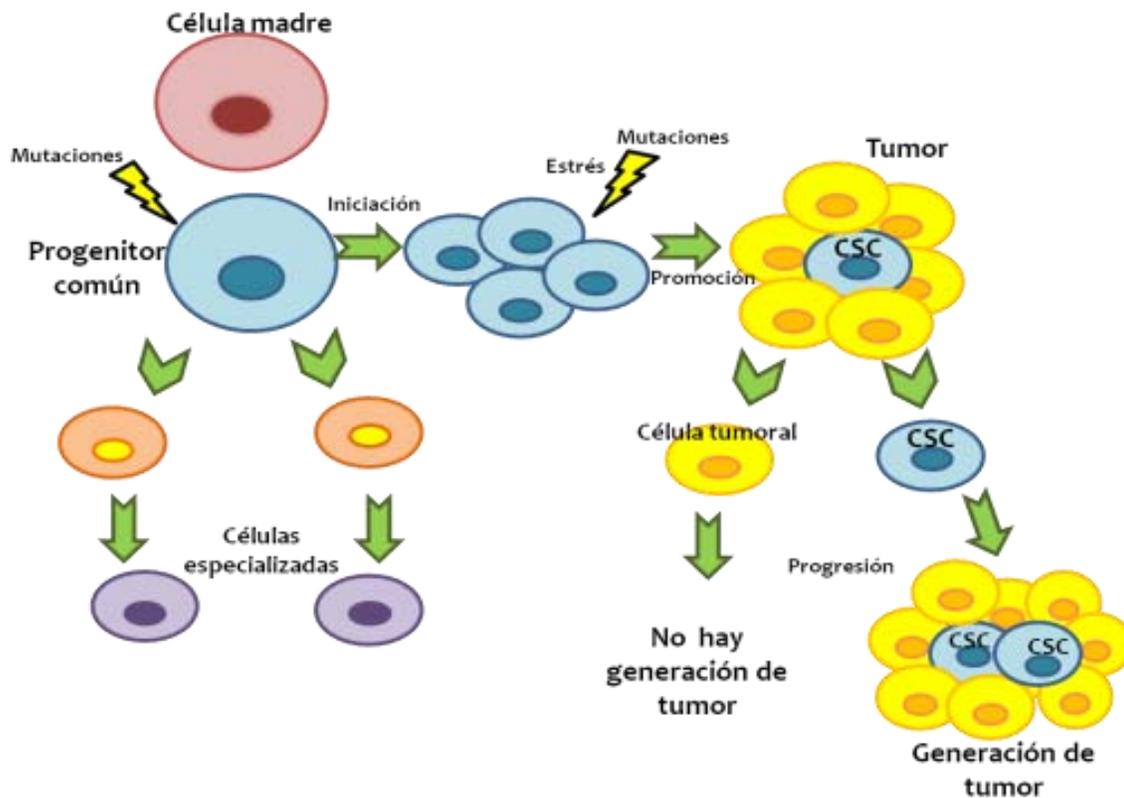


Figura 3. CSC provocan generación de tumores y no así las células tumorales. Tomado y modificado de Visvader. 2011.

Se ha observado también que las CSC tienen la capacidad de crear nichos favorables para su desarrollo. La interacción celular se lleva a cabo célula-célula o mediante la secreción de moléculas reguladoras (Fessler. *et al.* 2012). Por este motivo han sido ampliamente caracterizadas para su identificación (Dontu. *et al.* 2003; Ponti. 2005).

Se han desarrollado técnicas *in vitro* para la obtención de células madre. A partir del modelo de neuroesferas (Reynolds y Weiss. 1992) desarrollado para detectar células precursoras en cerebro, demostrando que las células que tienen la capacidad de sobrevivir en suspensión forman colonias flotantes en medios de cultivo enriquecidos, y que estas colonias o esferas tienen un número considerable de células madre (Ponti. 2005). Las CSC han sido ampliamente caracterizadas y expresan los marcadores CD133+, CD44+/CD24-/bajo, lo que ha permitido que sean utilizadas como herramientas para evaluar su funcionalidad tanto *in vitro* como *in vivo* (Dontu. *et al.* 2003; Cariaty. *et al.* 2008; Rappa y Lorico. 2010; Hatina. 2012; Liu. *et al.* 2012).

Particularmente en CM, estos agregados celulares con estructuras esféricas que se denominan mamíferas (Rappa y Lorico. 2010; Shaw. *et al.* 2012). Para lograr su formación se requieren medios de cultivo adecuados que favorecen su formación y por ende estimula la diferenciación a células con el fenotipo de CSC.

1.3 Microambiente tumoral

Las células tumorales de cualquier tipo de cáncer, se encuentran dentro de un microambiente, en el cual las células que conforman tumores y tejidos interactúan con otras células adyacentes (células endoteliales, células del sistema inmune, CSC, fibroblastos, adipocitos, vasculatura y matrices extracelulares) (Hu y Polyak. 2008; Klemm y Joyce. 2015). Todas estas células mantienen la comunicación, mediante interacciones celulares, y comunicación parácrina, autócrina y/o endócrina. Para que se lleve a cabo esta comunicación, los distintos tipos celulares del microambiente producen y secretan factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, metabolitos, proteasas y micro-vesículas (Figura 4) (Qian. *et al.* 2015).

La comunicación celular permite que las células lleven a cabo ciertas funciones, y en el caso del microambiente tumoral, las células cancerosas son cruciales para que las funciones que llevan a cabo las células sanas sean favorables y se lleve a cabo el desarrollo tumoral. Por ejemplo, en condiciones de hipoxia, las células tumorales son capaces de secretar el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF por sus siglas en inglés), que es un factor de crecimiento que promueve el reclutamiento de células endoteliales al sitio donde se lleva a cabo el crecimiento tumoral formando vasos sanguíneos; estas células transportarán oxígeno y nutrientes a la masa tumoral.

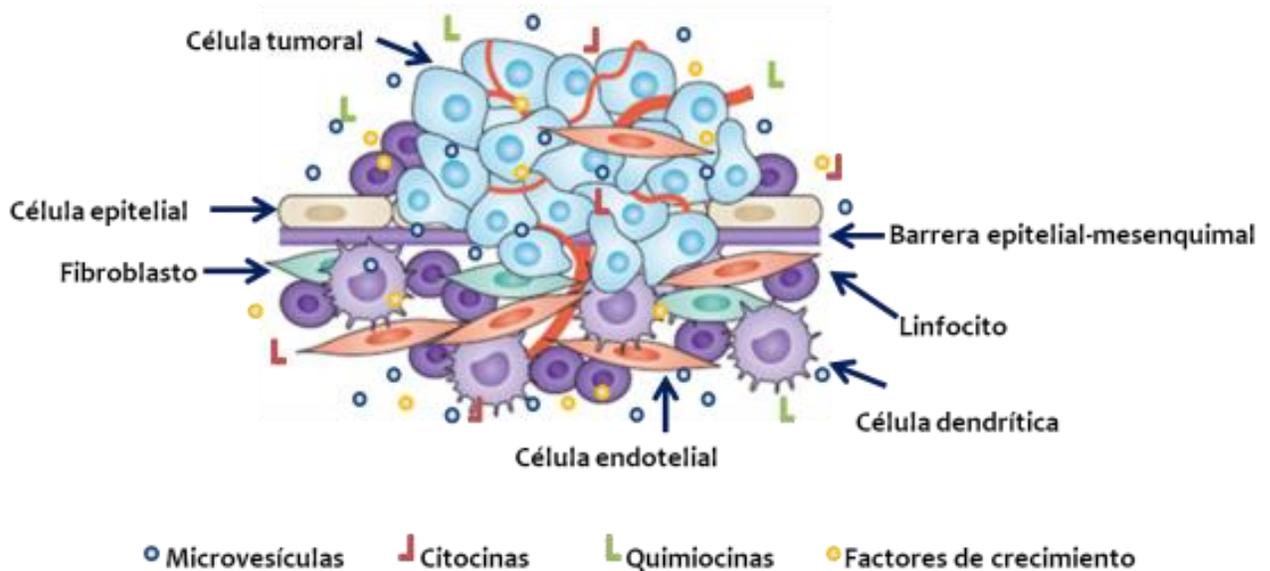


Figura 4. Componentes del microambiente tumoral e interacción. Modificado de Barcellos. et al. 2013.

Las células cancerosas son capaces de modular la actividad de las células del sistema inmune, creando un ambiente inmunosupresor favorable para su desarrollo. Es por ello que, la búsqueda de estrategias que permitan regular el microambiente tumoral, como la inmunoterapia contra el cáncer, que ha sido de gran importancia en los últimos años (Devaud. *et al.* 2013; Sun. 2015).

Es por ello que el microambiente tumoral se convierte en una parte integral para el desarrollo y progresión de la enfermedad, y el cual es variable dependiendo de la etapa en la que se encuentre el cáncer (Hu y Polyak. 2008).

1.4 Desarrollo de cáncer

Se ha descrito que el desarrollo tumoral es un proceso de múltiples pasos, sin embargo, para su estudio se han dividido en 3 grandes etapas: la iniciación, la promoción y la progresión (Figura 5).

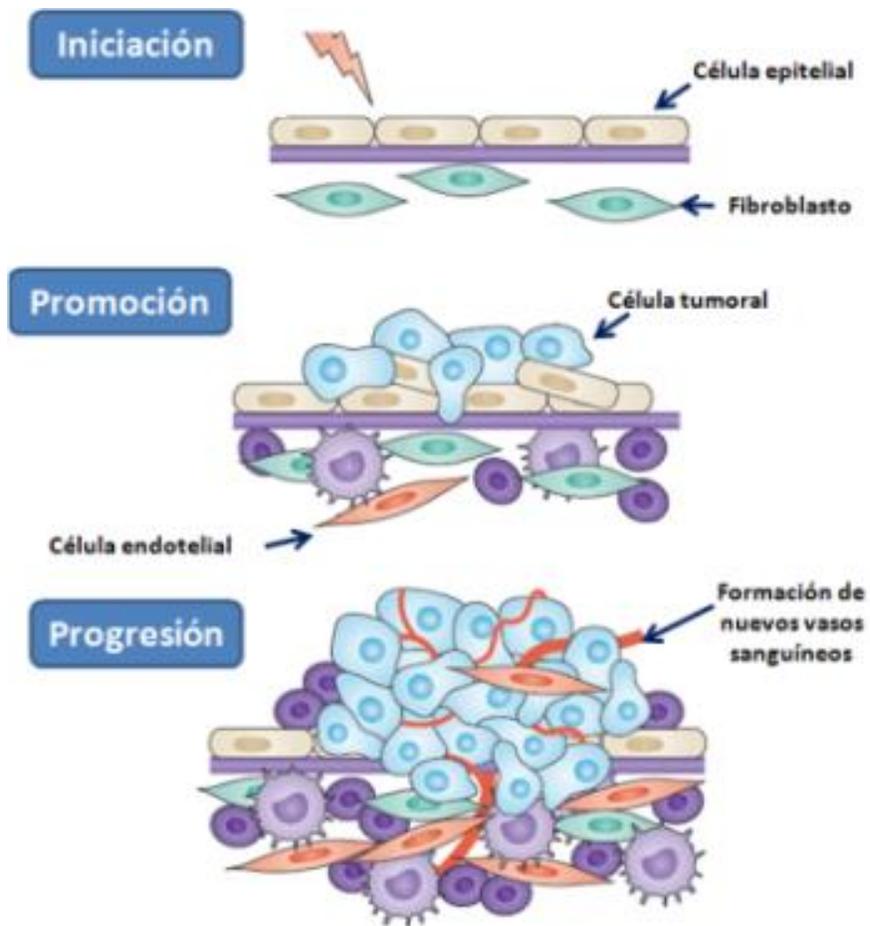


Figura 5. Etapas en desarrollo de cáncer. Modificado de Barcellos. *et al.* 2013.

La iniciación del cáncer es de origen monoclonal, es decir a partir de una célula ó un grupo de células que acumuló múltiples alteraciones en las funciones que regulan el comportamiento celular normal, y comienza por cambios a nivel genético; entre estos cambios se promueve el silenciamiento de genes supresores de tumores y activación de proto-oncogenes (Cuadro 1).

Estos cambios genéticos son influenciados por diferentes circunstancias, la predisposición genética o puede ser promovida por los diversos factores de riesgo.

Cuadro 1.

Oncogenes y genes supresores de tumores en cáncer de mama		
Gen	Clasificación	Función
<i>Oncogenes</i>		
akt		Adhesión, proliferación celular, regula apoptosis
CCND1/ciclina D1		Regula la progresión del ciclo celular
erbB-2 / HER-2		Estimula la división celular
c-myc		Regula la reparación del DNA y proliferación
P13K		Adhesión, proliferación, regulación de apoptosis
<i>Genes supresores de tumores</i>		
BRCA1		Reparación del DNA
BRCA2		Reparación del DNA
p53		Detiene el ciclo celular en respuesta al daño al DNA, regula apoptosis
Rb		Regula el ciclo celular
Modificado de Rebellón. et al.2014.		

Al activarse o inhibir oncogenes y genes supresores de tumor, la célula pierde la capacidad de regular su proliferación y evadir los mecanismos clásicos de muerte controlada como la apoptosis, lo cual contribuye a la iniciación y progresión de cualquier tipo de cáncer.

La promoción se basa en la proliferación descontrolada de las células tumorales en el sitio donde se llevó a cabo la iniciación. Durante el crecimiento, la población de células tumorales inicial, promueve una expansión clonal, en la cual las células con mayor capacidad de crecimiento son las que proliferan descontroladamente, provocando aumento en el volumen tumoral. Esto último ocurre además de que las células cancerosas siguen mutando mientras el cáncer sigue progresando (Bowcock. 1999; Cooper y Hausman. 2010).

La capacidad que tiene el cáncer para diseminarse a órganos distantes, establecerse y proliferar en otro sitio distinto a donde inició, se denomina metástasis y depende de la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos), la cual ocurre en la etapa de progresión. Este evento es crucial para la metástasis, pues permite recibir los nutrientes y el oxígeno necesario para continuar su crecimiento en el nuevo sitio.

El CM en su estadio más avanzado promueve metástasis (Figura 6) principalmente al cerebro, pulmones, hígado y médula ósea. Esto ocurre cuando las células tumorales adquieren la capacidad de atravesar las barreras epiteliales de los tejidos y entrar al torrente sanguíneo. Esta transición implica cambios celulares, entre ellos la pérdida de uniones adherentes, disminución en la expresión de citoqueratina, aumento de motilidad celular, aumento en la capacidad de invasión, secreción de fibronectina, secreción de metaloproteasas, producción de N-cadherina (unión mesenquimal adherente), el cambio de morfología y resistencia a apoptosis (Bowcock. 1999; Hu y Polyak. 2008; Yang. *et al.* 2015).

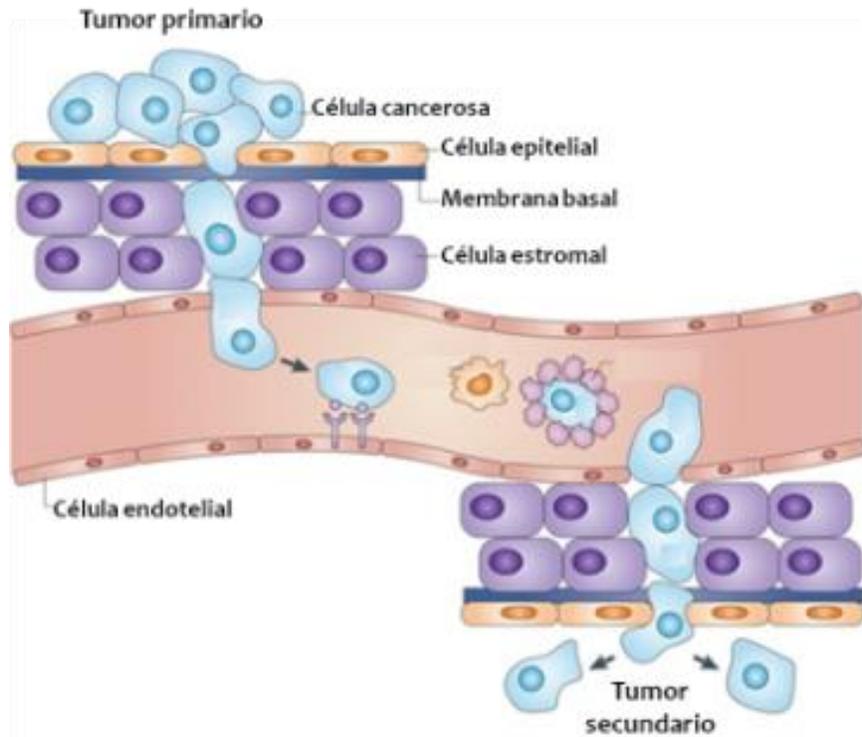


Figura 6. Metástasis. Se observa como las células tumorales son capaces de atravesar las barreras endoteliales para llegar a establecerse en otro sitio y promover la formación de un nuevo tumor. Modificado de Schroeder. *et al.* 2012.

1.5 Angiogénesis

Como se mencionó anteriormente, la angiogénesis se refiere al proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasculatura pre-existente. El término de angiogénesis incluye la migración y proliferación de células endoteliales, la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares que eventualmente se estabilizan formando los vasos sanguíneos. Este proceso se estimula mediante señales químicas, lo cual es regulado por moléculas inhibitoras y activadoras (Nishida. *et al.* 2006; Weis y Cheresh. 2001).

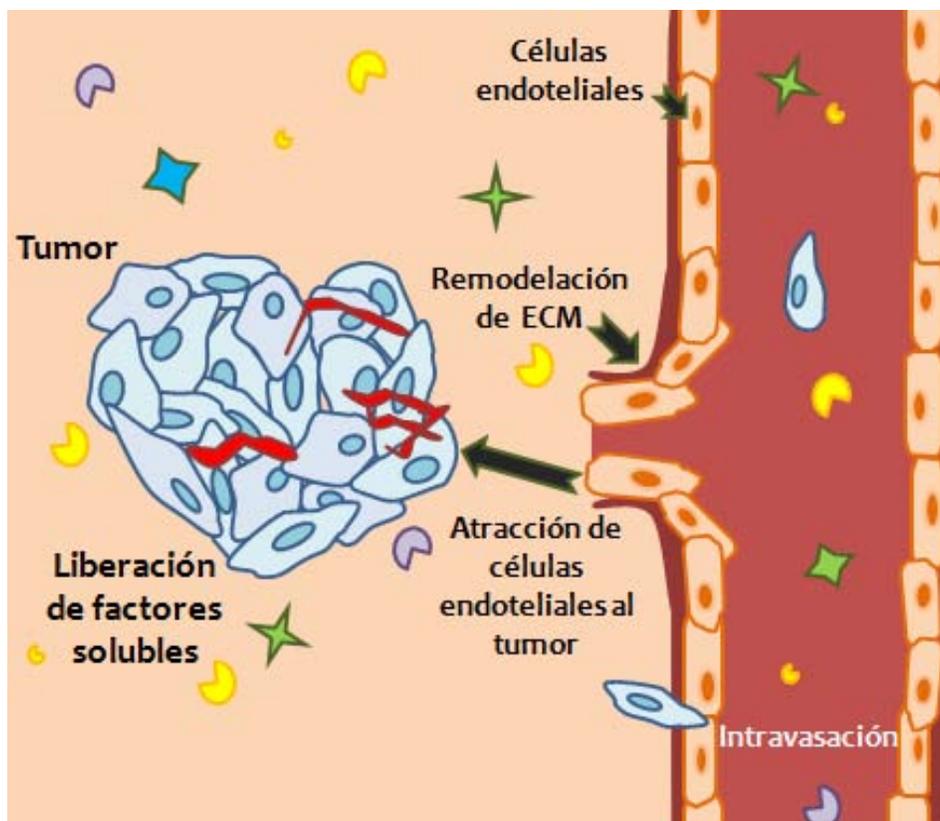


Figura 7. Angiogénesis. Se observa la secreción de factores que permiten la remodelación de la matriz extracelular, y permiten la atracción de células endoteliales a la masa tumoral. Tomado y modificado de Nishida. *et al.* 2006.

En un proceso neoplásico, la intensa proliferación celular requiere de oxígeno y nutrientes, por lo cual las propias células tumorales junto con diversos tipos celulares no transformados, secretan una mayor cantidad de moléculas activadoras, lo cual promueve una desregulación en el equilibrio con las moléculas inhibitoras, promoviendo la migración de las células endoteliales al sitio donde se encuentra creciendo el tumor (Figura 7) (Dameron. *et al.* 1994; Katoh. 2013).

Dentro de los factores que promueven la angiogénesis en CM, el VEGF es la molécula principal implicada en la regulación positiva de este proceso; sin embargo, distintas moléculas están implicadas en la promoción de la angiogénesis (Cuadro 2) (Dvorak. 2005; Hu y Polyak. 2008; Mueller. *et al.* 2001; Nasser. *et al.* 2015; Nishida. *et al.* 2006; Yancopoulos. *et al.* 2000).

Cuadro 2.

Moléculas implicadas en la angiogénesis.	
Factores de crecimiento	VEGF, FGF, HGF, TGF, TNF
Receptores de quimiocinas	(CXCR1, CXCR2, CXCR4, CXCR7 y CXCR 8
Ligandos de quimiocinas	CXCL5, CXCL8, CXCL12 y CXCL14
Tomado de Nishida. <i>et al.</i> 2006; Yancopoulos. <i>et al.</i> 2000.	

Como se mencionó anteriormente, un mecanismo de comunicación importante dentro del microambiente tumoral, es a través de microvesículas, las cuales son parte del transporte vesicular y tienen la capacidad de regular funciones celulares, como se describe a continuación.

1.6 Exosomas, su biogénesis y sus funciones

Los exosomas son micro-vesículas secretadas por todos los tipos celulares (ej. células epiteliales, neuronales, del sistema inmune, células cancerosas, etc.) a través de la membrana plasmática y forman parte del transporte vesicular. Estos exosomas miden entre 30-100 nm de diámetro (Simpson. *et al.* 2009), tienen una doble membrana lipídica, y son acarreadores de proteínas que se encuentran en el citoplasma (Figura 8).

El mecanismo de biogénesis establece que las microvesículas se forman en los endosomas, los cuales encapsulan una gran cantidad de moléculas y proteínas (Cuadro 3) formando a estas microvesículas. Estos endosomas tardíos también llamados cuerpos multivesiculares, pueden ser degradados por los lisosomas producidos por el aparato de Golgi o pueden salir de la célula por exocitosis, liberando los exosomas hacia la circulación (Cocucci y Meldolesi. 2015; Sun y Liu. 2014) (Figura 9).

Los exosomas se pueden encontrar en fluidos biológicos, tales como líquido sinovial, saliva, sangre, orina, leche materna y semen (Kruger. *et al.* 2014; Liu. *et al.* 2012; Reinhardt. *et al.* 2013). Funcionan como sistemas de comunicación a nivel local (microambiente) y sistémico, ya que los exosomas entran fácilmente a la circulación. Los exosomas pueden regular ciertas funciones celulares, principalmente por dos mecanismos; el primero de ellos es mediante la incorporación de exosomas a las células blanco por endocitosis y una vez dentro de la célula, son degradados y liberan las moléculas y proteínas que encapsularon. El segundo mecanismo es mediante la interacción con los receptores y ligandos que expresan los exosomas, con los receptores de la membrana celular. Ambos mecanismos promueven vías de señalización que pueden regular diversas funciones celulares (Brownlee. *et al.* 2014; Frydrychowicz. *et al.* 2014; Théry. 2011; Villarroya. *et al.* 2014).

Cuadro 3.

Contenidos de exosomas
Tetraspaninas (CD9, CD63, CD81)
Moléculas MHC I, MHC II
Integrinas (ITG)
Moléculas de adhesión (CAM)
Receptores de factores de crecimiento
Enzimas (ATPasas, isomerassas, glucosa-6-fosfato)
Micro RNA's (miRNAs) mRNA, rRNA, tRNA
Proteínas de citoesqueleto (actina, tubulina, miosina)
Lípidos (colesterol, flotilina)
Ligando y receptores de quimiocinas
Modificado de Lötval. <i>et al.</i> 2014; Frydrychowicz. <i>et al.</i> 2014.

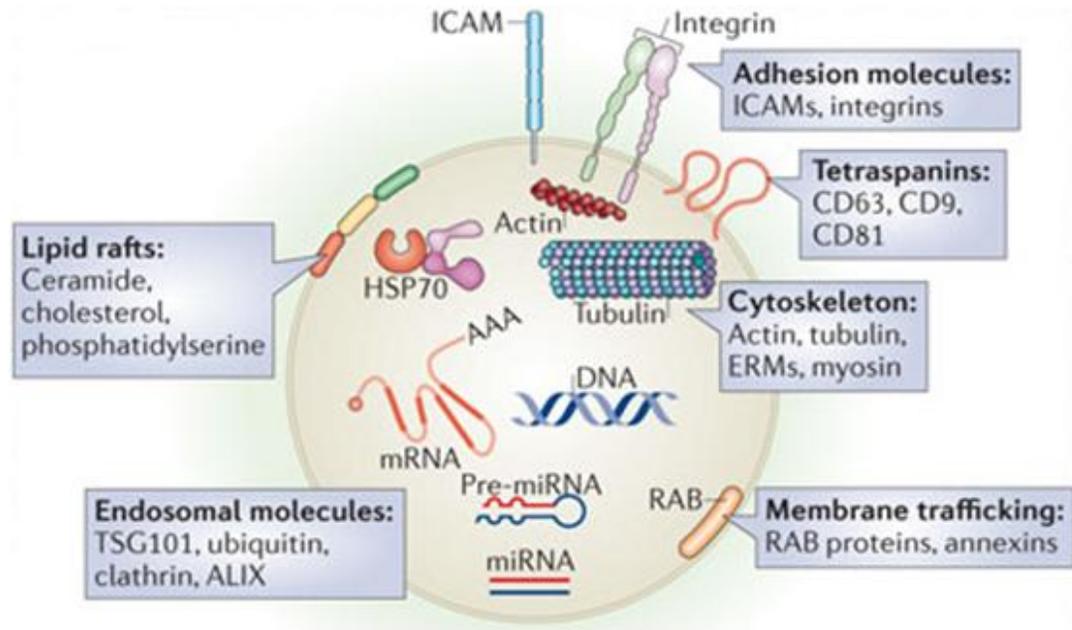


Figura 8. Estructura y contenido de los exosomas. Tomado de Mittelbrunn y Sánchez. 2012.

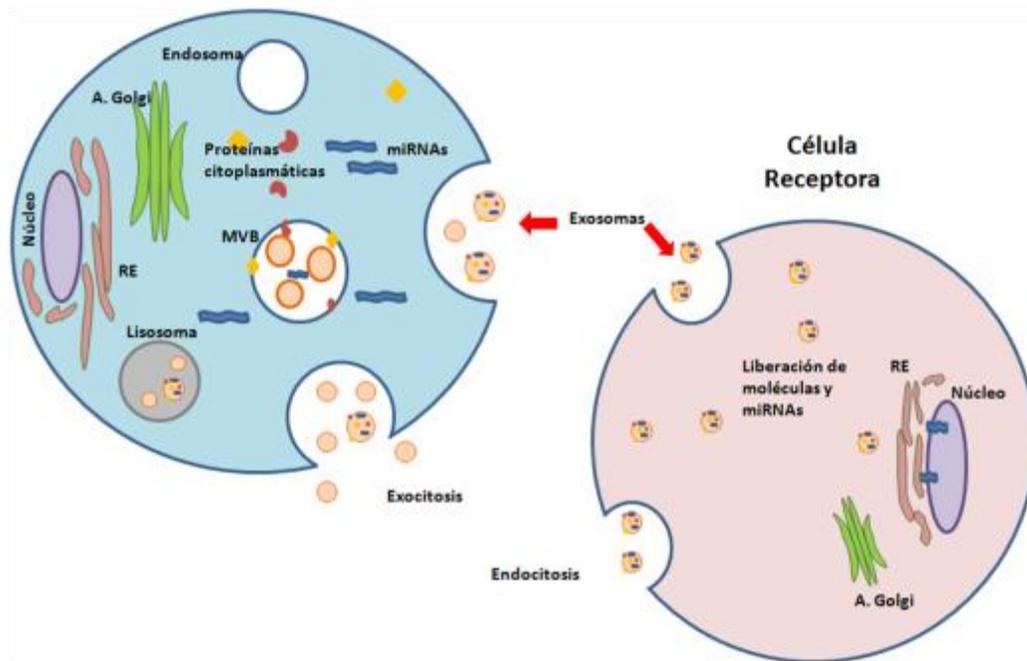


Figura 9. Biogénesis de exosomas. Los endosomas encapsulan proteínas y moléculas como miRNAs formando los MVB, los cuales pueden ser degradados o liberados. Así mismo otras células los incorporan y pueden o no regular funciones en la célula receptora. Modificado de Milane. *et al.* 2015.

Las funciones de los exosomas dependen del tipo celular del cual se derivan, pues también son distintas las moléculas contenidas en estas microvesículas. Estas vesículas han sido implicadas en una gran variedad de procesos fisiológicos (proliferación, diferenciación celular, muerte programada, desarrollo y progresión del cáncer) que son importantes para la comunicación celular.

La caracterización de estos exosomas, ha adquirido gran interés en la investigación del cáncer, debido a que las microvesículas de las células cancerosas contienen una gran variedad de elementos oncogénicos que son liberados por las células cancerosas, como son las proteínas y los microRNA's (miRNAs). Los RNA's y miRNA's aislados de los exosomas pueden regular directamente procesos como la apoptosis de células del sistema inmune (mediante la expresión de ligandos o receptores de muerte que interactúan con los de las células receptoras), la progresión tumoral (promoviendo el silenciamiento o sobre-expresión de genes que regulan la producción de factores angiogénicos), y la supresión inmune (promoviendo la diferenciación y disminuyendo la proliferación de las células del sistema inmune) (Figura 10) (Lindau. *et al.* 2013; Parolini. *et al.* 2009). La liberación de elementos oncogénicos regula funciones en varios tipos celulares, tales como la expresión de genes por la degradación del mRNA o inhibición de la traducción génica (Selbach. *et al.* 2008; Kruger. *et al.* 2014; Valadi. *et al.* 2007).

Algunos de los elementos oncogénicos se encuentran en los exosomas son los miRNA's, pequeñas secuencias de RNA no codificantes y están involucrados en el silenciamiento génico. Entre los miRNA's aislados de exosomas de células cancerosas, se incluye la familia miRNA-155 que tienen un papel oncogénico en CM y otros tipos de cáncer, regulando procesos como la angiogénesis, la apoptosis y la diferenciación celular (Mattiske. *et al.* 2012; Brownlee. *et al.* 2014).

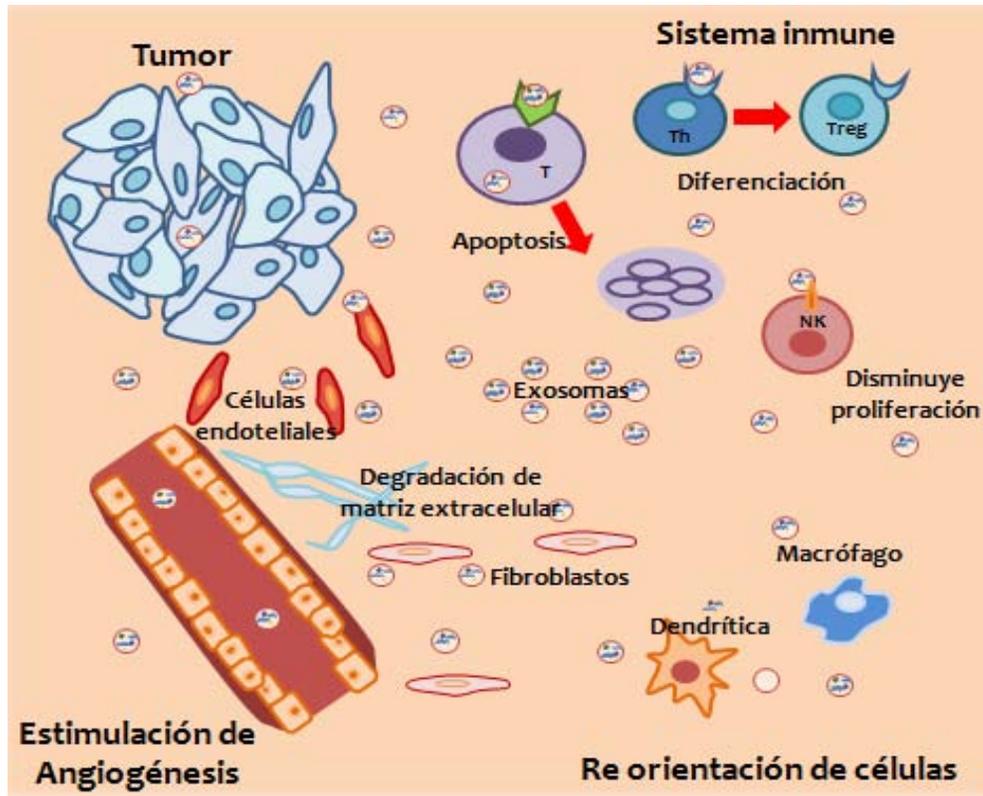


Figura 10. Exosomas de células tumorales, son capaces de promover diferenciación y disminuir proliferación de las células del sistema inmune, promover cambios en la matriz extracelular ayudando a la progresión de las células tumorales, estimular procesos como la angiogénesis. Tomado y modificado de Tickner. *et al.* 2014.

Varios estudios demuestran que los exosomas derivados de células tumorales son capaces de inducir la expansión de células T reguladoras (Szajnik. *et al.* 2010; Wieckowski. *et al.* 2009) y provocan la muerte de las células T específicas de antígenos tumorales a través de vías de señalización mediadas por unión de ligandos a receptores de muerte, afectando así la capacidad de los linfocitos efectores que ejercen su actividad citolítica contra los blancos tumorales (Abusamra. *et al.* 2005). Como consecuencia, los exosomas crean un medio ambiente inmuno-privilegiado con condiciones fisiológicas favorables para el desarrollo tumoral (Kim. 2005; Altevogt. *et al.* 2014).

En un ambiente hipóxico, los exosomas de las células tumorales inducen en células estromales la proliferación, lo cual se refleja en el crecimiento tumoral, promoviendo la diferenciación de MSC, induciendo la EMT. Con esta interacción, el tumor y las células estromales pueden regular la capacidad de invasión de las células tumorales mediante la incorporación de proteínas y miRNAs en las células blanco (Jayne. 2014).

Por todo lo anterior, se han implementado diversas técnicas para el aislamiento y la purificación de exosomas. Entre algunos métodos se encuentran técnicas como la centrifugación diferencial, cromatografías de afinidad, la captura por medio de membranas y precipitaciones mediadas por solventes (Brownlee. *et al.* 2014). La identificación de exosomas es sencilla en la actualidad porque ha sido posible identificar los marcadores que se encuentran en estas microvesículas, entre ellos se encuentran las tetraspaninas CD9, CD63, CD81 y la proteína TSG-101 (Cocucci y Meldolesi. 2015; Frydrychowicz. *et al.* 2014; Kumar. *et al.* 2014; Melo. *et al.* 2014).

Las tetraspaninas son proteínas transmembranales, cuyo peso molecular se encuentra entre 25-50 kDa, y están implicadas en una gran cantidad de procesos como la fusión celular, la motilidad y el contacto célula-célula (Parthasarathy. *et al.* 2008).

2. Antecedentes

Los exosomas contienen una gran variedad de moléculas con gran capacidad moduladora de los procesos tumorales. En los últimos años se ha identificado que los exosomas son importantes en el desarrollo y progresión del cáncer, ya que pueden activar funciones proliferativas, de supervivencia, adhesión celular, promoción de angiogénesis y migración en las diferentes etapas del cáncer; por este motivo, en el diagnóstico molecular de cáncer, se considera que los exosomas presentan potencial como biomarcadores, debido a sus contenidos moleculares, entre los que se encuentran miRNA's, quimiocinas, factores de crecimiento y tetraspaninas (Brase. *et al.* 2010; Melo. *et al.* 2014; Sun y Liu. 2014; Ueda. *et al.* 2014).

Umezu y colaboradores (2014) describieron un mecanismo mediante el cuál los exosomas de células tumorales regulan el proceso de la angiogénesis en melanoma y demostraron que esta regulación ocurre principalmente cuando el tumor se encuentra en un microambiente hipóxico. Otros estudios muestran que CXCL8 está presente en exosomas y éstos inducen la proliferación de células endoteliales promoviendo angiogénesis (Waugh y Wilson. 2008).

Se ha identificado que cuando las células 4T1 son estimuladas con exosomas derivados de células madre mesenquimales, son capaces de inhibir la angiogénesis (Lee. *et al.* 2013).

3. Planteamiento del problema y justificación

Las células madre cancerosas participan de manera importante en la generación de tumores en pacientes con CM, debido a que estas CSC tienen una mayor capacidad de sobrevivencia ante tratamientos como la quimioterapia. Por este motivo, el cultivo de mamíferas se ha utilizado ampliamente para identificar CSC y analizar detalladamente el papel en la regulación del CM tanto *in vivo* como *in vitro*.

Se ha descrito ampliamente que los exosomas de las células tumorales están implicados en procesos de promoción de angiogénesis por su contenido; sin embargo, se desconoce el papel funcional de los exosomas derivados de mamíferas en la inducción y regulación del proceso angiogénico.

Es necesario entender los mecanismos mediante los cuales los exosomas regulan procesos implicados en la invasión y desarrollo del CM; por este motivo, el presente trabajo analiza la participación de estos exosomas en la regulación de la angiogénesis. Para ello el uso de líneas celulares de CM ha servido como modelo de formación de mamíferas *in vitro*, permitiendo la obtención de CSC simulando un microambiente *in vitro*, a partir del cual se pueden obtener y purificar exosomas, sin embargo la línea celular 4T1 es derivada de CM de ratón BALB/C, no se ha analizado profundamente en el proceso de diferenciación de CSC y en la regulación de la angiogénesis mediada por exosomas.

4. Hipótesis

Los exosomas derivados de mamíferos generados a partir de la línea celular 4T1 tendrán un efecto promotor de angiogénesis.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Analizar el papel de los exosomas derivados de mamosferas de la línea celular 4T1, en la regulación (inducción) del proceso de angiogénesis utilizando células HUVEC.

5.2 Objetivos particulares

1. Establecer cultivos de la línea celular 4T1 y estandarizar la formación de mamosferas.
2. Obtener y caracterizar por las técnicas de citometría, westernblot, y microscopia electrónica, los exosomas derivados de mamosferas de la línea celular 4T1.
3. Establecer cultivos de células HUVEC.
4. Analizar la función angiogénica de los exosomas derivados de mamosferas de la línea celular 4T1 en co-cultivos con células HUVEC.

6. Métodos

6.1 Preparación de suero libre de exosomas

El suero fetal de bovino (SFB por sus siglas en inglés) se filtró con una membrana de 0.2 μm ; posteriormente, con una jeringa se colocó el SFB en tubos de ultracentrifuga, y se siguió el protocolo de aislamiento de exosomas descrito por Théry y colaboradores (2006). Los tubos se sellaron y balancearon para colocarlos en el rotor y se centrifugaron a 100,000 g por toda la noche a 4°C. Al final de la ultracentrifugación se recuperó el sobrenadante y se descartó el precipitado (exosomas). El SFB se filtró nuevamente y se guardó a 4°C para la preparación de los medios de cultivo.

6.2 Cultivos de células 4T1

Para ello se utilizó el medio RPMI-1640, el cual se preparó con SFB libre de exosomas (10%). Una vez preparado el medio se filtró para asegurar su esterilidad.

Se cultivaron las células 4T1 con el medio libre de microvesículas, una vez obtenido un 80-90% de confluencia en placas de cultivo se recuperó el sobrenadante, se filtró y se guardó a 4°C.

6.3 Generación de mamosferas

Con las células de cáncer de mama 4T1 de los cultivos se generaron las mamosferas. Para ello, las células cultivadas con 80-90% de confluencia se despegaron con PBS-EDTA 1x. Se contaron en cámara de Neubauer y se resuspendieron en el medio selectivo para mamosferas Mammocult (StemCell Technologies). En placas de bacterias (por su baja adherencia) se cultivaron 100, 200, 400 u 800 mil células, con 8 mL de medio Mammocult, para observar la mejor concentración celular para la generación de mamosferas. Luego de 5 días de

incubación se obtuvo la primera generación de mamosferas, a partir de las cuales se recuperó el sobrenadante, se filtró para quitar restos celulares y se guardó a 4°C.

6.4 Identificación de expresión de marcadores de CSC de mamosferas por citometría de flujo

Para analizar la expresión de los marcadores de CSC, CD24 y CD44, las mamosferas se re-suspendieron en PBS-EDTA 1x, posteriormente se disgregaron con una jeringa, permitiendo obtener a las células individuales, estas se incubaron con los anticuerpos anti-CD24 y anti-CD44 (Santa Cruz) permitiendo su identificación por citometría de flujo.

6.5 Purificación de exosomas

A partir de sobrenadantes de cultivos de mamosferas de la línea celular 4T1, se obtuvieron los exosomas ultra-centrifugando las muestras de los sobrenadantes de cultivos de 4T1 así como de mamosferas. Los sobrenadantes se introdujeron en los tubos de ultracentrífuga con una jeringa y se balancearon. Se realizaron una serie de centrifugaciones (Figura 11) para la obtención de los exosomas, siguiendo el protocolo previamente descrito (Théry C. *et a.* 2006).

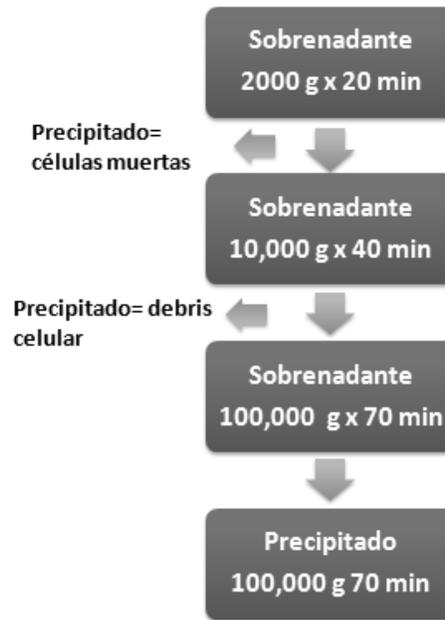


Figura 11. Ultra-centrifugaciones para obtención de exosomas. Modificado de Théry, *et al.* 2006.

Por último se decantó el sobrenadante y el precipitado (exosomas) se resuspendió en 200 μ l de PBS estéril y se guardó en alícuotas a 4°C.

6.6 Caracterización de exosomas

Citometría de flujo.

Para caracterizar a los exosomas por citometría, se utilizó el kit Exo-FLOW (System Biociences), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Para ello, los exosomas se incubaron con perlas magnéticas cubiertas de estreptavidina que tienen el anticuerpo biotinizado anti-CD63, molécula presente en los exosomas. Una vez conjugados, se incubaron con anticuerpos secundarios o fluorocromos específicos que permitieron la detección de los exosomas capturados, utilizando el citómetro *Attune red/blue* (Applied Biosystems). Los datos se analizaron con el programa computacional FlowJo V10.

Microscopía electrónica.

Para analizar la presencia y morfología de los exosomas mediante microscopía electrónica, se tomó una muestra de los exosomas purificados se colocó en una solución de acetato de uranilo 2%, y se analizaron en el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 12000 EII a 80kv, 15,000 aumentos y una escala de 200 nm, equipado con cámara digital de 11 mega. Se analizaron en total 20 imágenes y con el programa del microscopio se determinó el tamaño de los exosomas de las imágenes. Posteriormente se determinó el tamaño promedio de estas microvesículas.

Westernblot.

Una muestra de exosomas se analizó mediante westernblot, con la finalidad de detectar la presencia de las proteínas CD9, CD81 y TSG-101, los cuales son marcadores de exosomas.

Para realizar esta técnica, primero se lisaron los exosomas con solución de lisis (RIPA). Se cuantificó la proteína de los lisados utilizando el kit micro-BCA (Thermo Scientific) y posteriormente se incubó a 95°C durante 5 min para desnaturalizar a las proteínas y mezcló con solución de carga Laemli 2x para completar su linearización al romper enlaces disulfuro, conferirles una carga negativa, así como dar color a la muestra para visualizarla mientras corre en el gel de acrilamida. Luego de correr las muestras, se realizó la transferencia en una membrana de PVDF, y enseguida la membrana se bloqueó con leche Svelty (5%) para disminuir las uniones inespecíficas y transcurrido el tiempo de bloqueo se incubó con anticuerpos primarios CD9, CD81 y TSG-101 (Santa Cruz Biotechnology) a la concentración de 1:500 para los tres anticuerpos durante toda la noche. Al siguiente día se incubó con el anticuerpo secundario (conjugado con peroxidasa) por 2 h. y se reveló la membrana en placas fotográficas (Thermo scientific).

6.7 Ensayos de angiogénesis

Cultivo de células HUVEC.

Para ello se siguieron las condiciones de cultivo recomendadas por ATCC.

Se preparó medio de cultivo F-12K, complementado con 0.1 mg/ml de heparina y 0.03-0.05 mg/ml de ECGS y SFB libre de exosomas 10%.

Se cultivaron células HUVEC, una vez obtenido 80-90% de confluencia, las células se utilizaron para los ensayos funcionales correspondientes.

Ensayo funcional de angiogénesis

Para realizar el ensayo funcional de angiogénesis, se realizaron co-cultivos de los exosomas derivados de mamíferos 4T1 con la línea celular HUVEC para evaluar angiogénesis mediante ensayos en Matrigel (BD Biosciences), el cual consiste en la formación de cultivos 3D (Arnaoutova I. y Kleinman H. 2010 ; DeCicco K. *et al.* 2014).

Una vez obtenido el 80-90% de confluencia de las células HUVEC, se despegaron con PBS-EDTA 1x, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 ml de PBS. Las células se centrifugaron nuevamente (2000 rpm durante 5 min). Se decantó el sobrenadante y se re suspendieron las células en 1 ml de medio de cultivo F12K. Las células se contaron para tener 30,000 células en 400 μ L de medio.

En placas de 48 pozos se colocó 130 μ L de matrigel por pozo y se dejaron incubar por 30 min a 37° C. En tubos de eppendorf se colocaron 30,000 células en 400 μ l de medio F12K y se etiquetaron conforme a los grupos mostrados en el cuadro 4. Una vez preparados los tubos se tomaron 200 μ L de las células resuspendidas para cada pozo y por duplicado, se dejaron en incubación 6 h a 37°C y 5% CO₂ (3 experimentos por duplicado n=6).

Análisis.

Se analizaron las placas en un microscopio invertido Olympus IX71 y se tomaron 2 fotos por cada uno de los pozos en un campo aleatorio.

Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se cuantificó a partir de las fotos tomadas, el número de nodos, segmentos y redes que se formaron en los cultivos. Para ello se utilizó el programa *Image J* y el complemento *Angiogenesis Analyzer*. Los datos fueron procesados y se realizó una *t student* pareada. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron como significativos.

Cuadro 4.

Diseño experimental para ensayos de angiogénesis
HUVEC + Medio
HUVEC + Medio + Sulforafano¹ (CTL -)
HUVEC + Medio + FGF² (CTL +)
HUVEC + Medio + Exosomas de mamosferas 4T1
HUVEC + Medio + Exosomas de la línea celular 4T1
¹ Sulforafano (inhibidor de angiogénesis). Se preparó una solución stock de Sulforafano (Sigma-Aldrich) 10 mM en 1 ml de DMSO y se guardó a 4°C.
² Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF por sus siglas en inglés) (promotor de angiogénesis). Se preparó una solución stock de FGF (Gibco) de 10 ng μl^{-1} en PBS.

7.Resultados

7.1 Establecer cultivo de la línea celular 4T1 y estandarización de la formación de mamosferas.

7.1.1 Cultivo de la línea celular 4T1.

Se establecieron los cultivos de la línea celular 4T1 (Figura 12) con medio de cultivo RPMI libre de exosomas. De estos cultivos se recolectó el sobrenadante, y se utilizaron estas mismas células para la formación de mamosferas. Las células se observan con la morfología característica de las células epiteliales adherentes; una vez obtenido un 80% de confluencia, se recuperaron los sobrenadantes de cultivo para la purificación de exosomas y las células se ocuparon para formar mamosferas.

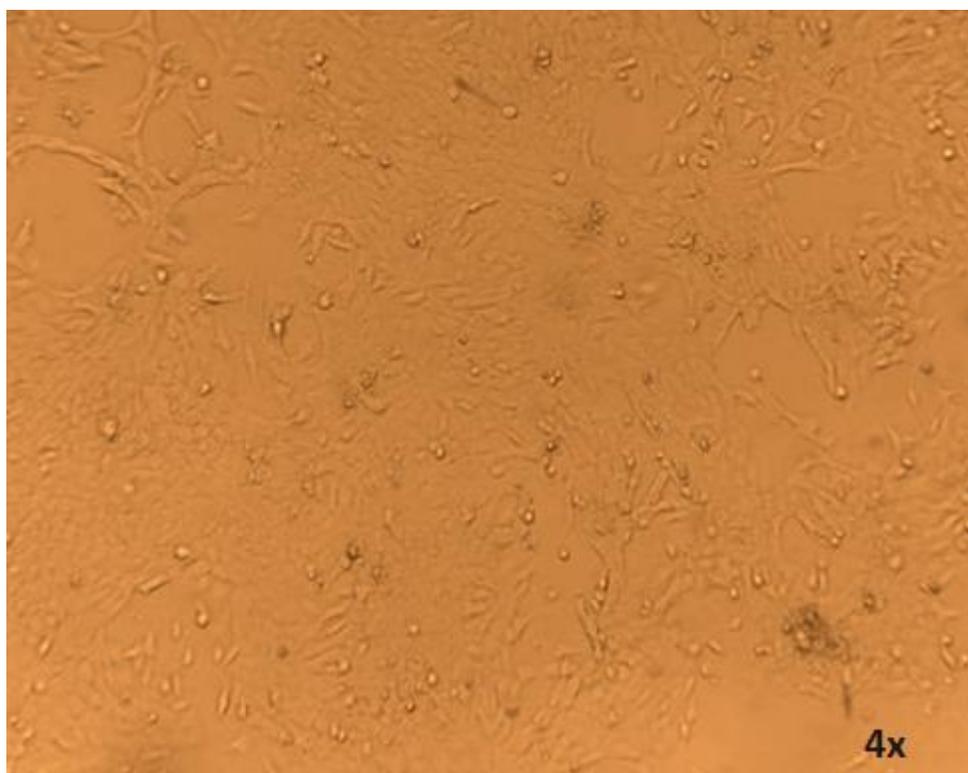


Figura 12. Células 4T1 a 80% de confluencia, son células alargadas y adherentes.

7.1.2 Estandarización de formación de mamosferas.

Para cumplir con este objetivo se cultivaron las células 4T1 a diferentes concentraciones para determinar la concentración óptima para la formación de mamosferas (Figura 13). Se eligió la cantidad de 400 mil células ya que en ella se obtuvieron una mayor cantidad de mamosferas morfológicamente más definidas, en comparación con las otras concentraciones.

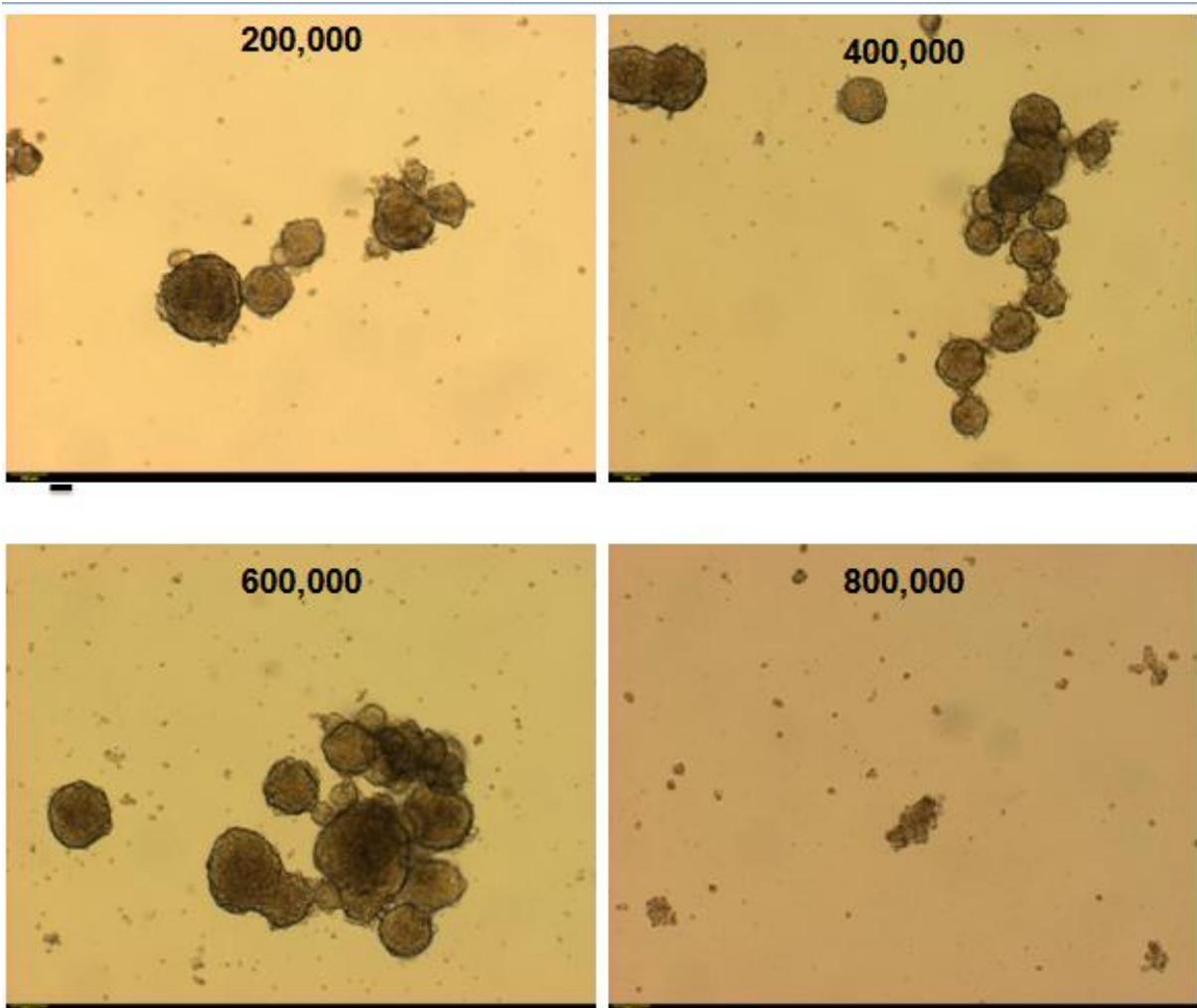


Figura 13. Formación de mamosferas. Se observa que en 400,000 células, las mamosferas tienen una estructura esférica más definida y no hay demasiados agregados en comparación de 600,000 células. Con 800,000 células no se lleva a cabo la formación de mamosferas y estas células mueren.

Se identificó la expresión de marcadores de CSC presentes en las mamosferas; para ello, se disgregaron las células de las mamosferas y se incubaron con los anticuerpos anti-CD24 y anti-CD44 para observar el fenotipo de CSC por citometría de flujo (Figura 14). El fenotipo de las CSC corresponde a las células CD44+/CD24-, donde se observa que se obtienen un 0.33% de células con el fenotipo de CSC.

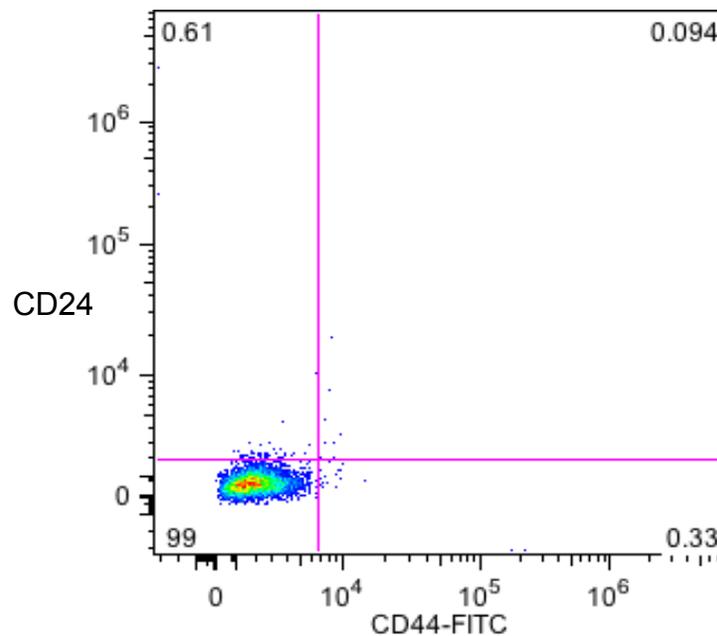


Figura 14. Caracterización por citometría de flujo de CSC. Se observa que sólo se tiene un 0.33% de CSC.

7.2 Obtención y caracterización por microscopia electrónica, westernblot y citometría de los exosomas derivados de mamosferas de la línea celular 4T1.

7.2.1 Caracterización de exosomas por citometría de flujo.

De los sobrenadantes tanto de los cultivos de la línea celular 4T1, así como de las mamosferas se extrajeron y purificaron los exosomas. Se identificaron en un inicio por citometría de flujo utilizando con el anticuerpo anti-CD63, obteniendo un 88.5%

de positividad, confirmando la unión de los exosomas a las perlas (Figura 15). Se muestran los histogramas representativos de las muestras de los exosomas derivados de mamíferos de la línea celular 4T1, comparados con las perlas acopladas al anti-CD63.

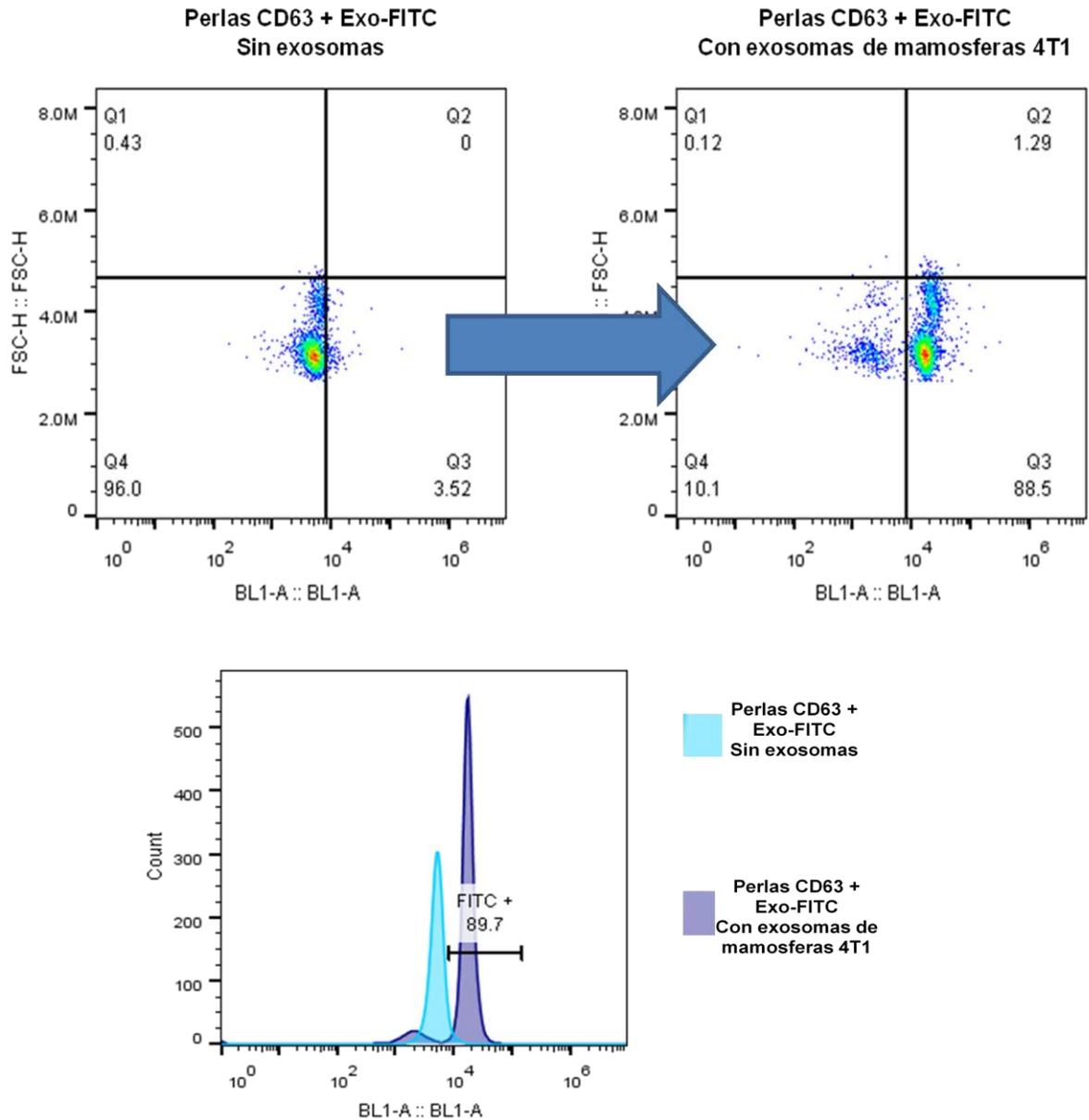


Figura 15. Identificación de exosomas de mamíferos 4T1 por citometría de flujo, utilizando el marcador CD63. Se obtiene un 88.5% de positividad en las perlas a las cuales se unieron los exosomas.

7.2.2 Caracterización de exosomas por microscopía electrónica.

Se caracterizaron por microscopía electrónica 3 muestras, para tener un análisis morfológico de exosomas. Del total de las fotos de microscopía se contaron y midieron cada una de las microvesículas, obteniendo diferencias en el tamaño promedio entre exosomas de mamosferas (44 nm) (Figura 17) y los exosomas de la línea celular 4T1 (61 nm) (Figura 17). Se muestra una imagen representativa de la muestra de exosomas.

Exosomas Mamosferas 4T1

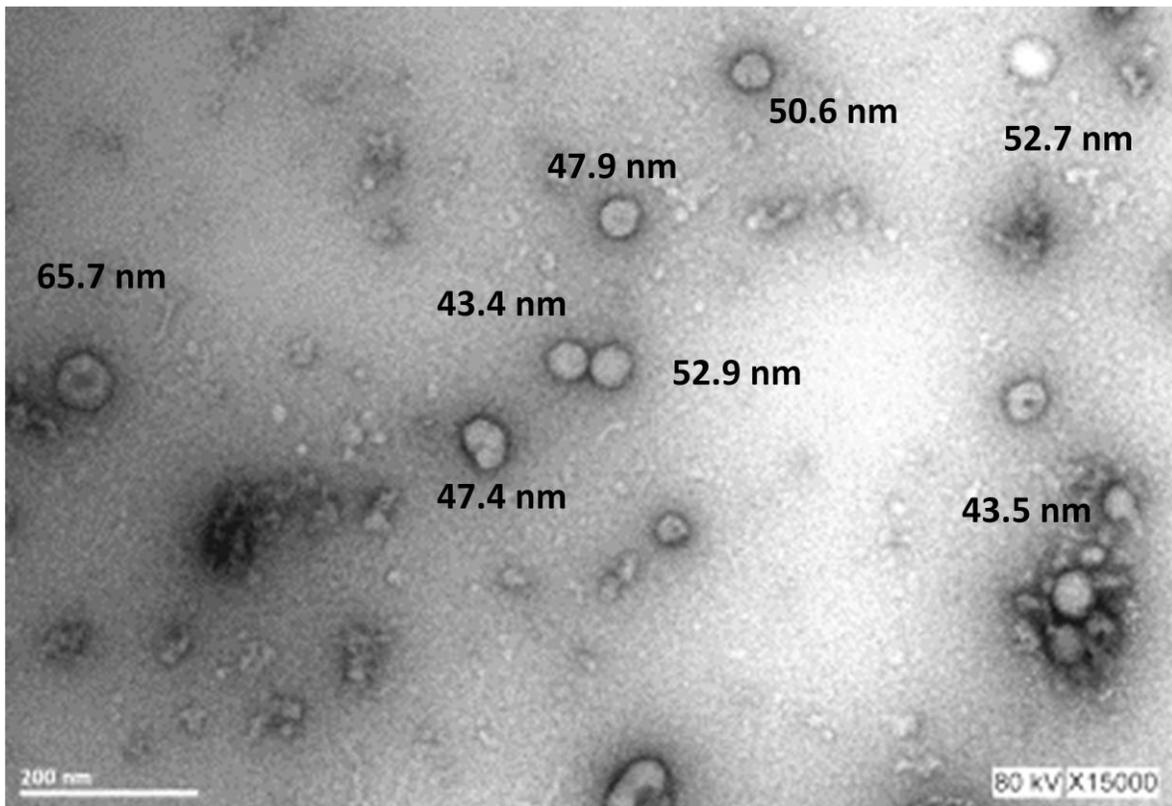


Figura16. Microscopía electrónica. Se analizaron los exosomas tanto de las mamosferas 4T1, y se muestra el diámetro correspondiente de cada microvesícula.

Exosomas Línea Celular 4T1

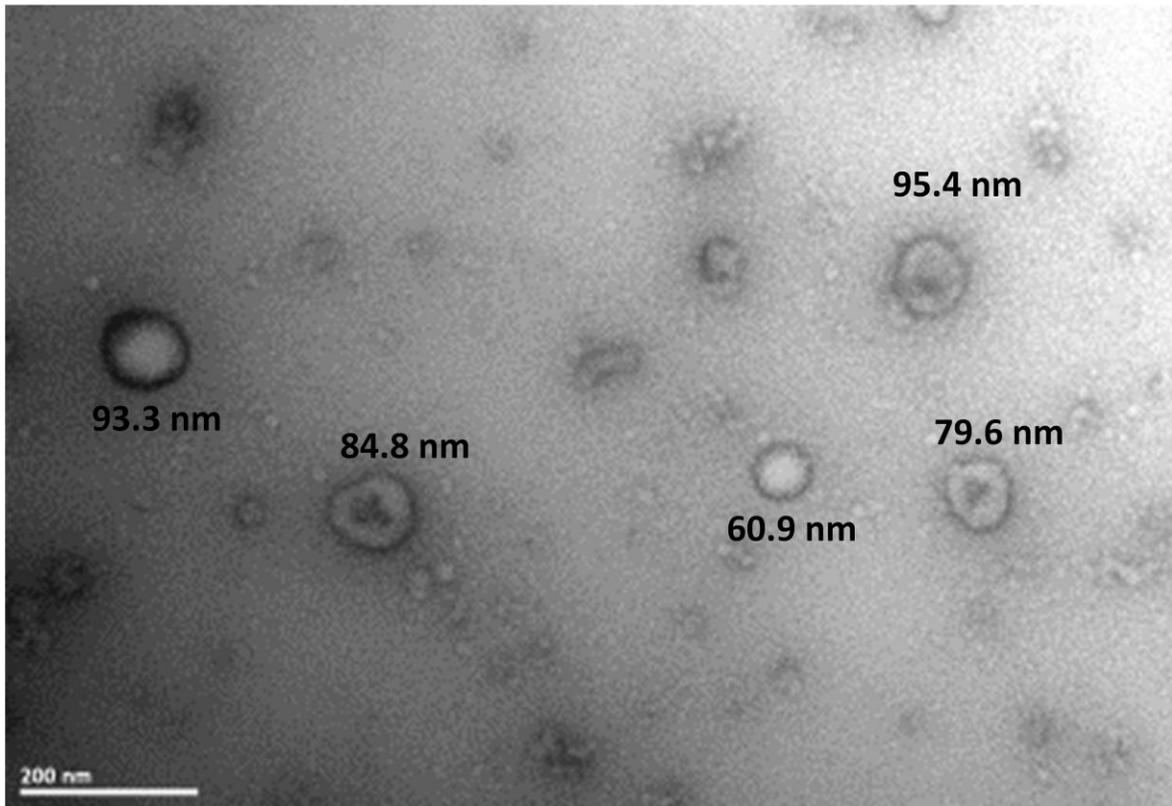


Figura 17. Microscopía electrónica de exosomas de la línea celular 4T1, se muestra el diámetro correspondiente de cada microvesícula.

7.2.3 Caracterización de exosomas por Westernblot.

Para confirmar que los exosomas derivados tanto de la línea celular 4T1 y las mamosferas expresan moléculas características de éstos, se realizaron ensayos de westernblot para identificar la presencia de estas proteínas. Para ello los exosomas fueron lisados y se cuantificó la proteína total. Para los exosomas de mamosferas se obtiene de 50-180 $\mu\text{g/mL}$, en el caso de los exosomas de la línea celular 4T1 se obtiene en promedio 500 $\mu\text{g/mL}$ de proteína total por el método de BSA.

Se encontró que tanto los exosomas de mamosferas y de la línea celular expresan las tetraspaninas CD9 y CD81 (25 kDa), así como la proteína TSG-101 (44 kDa) marcadores clásicos presentes en microvesículas derivadas de células cancerosas (Figura 18).

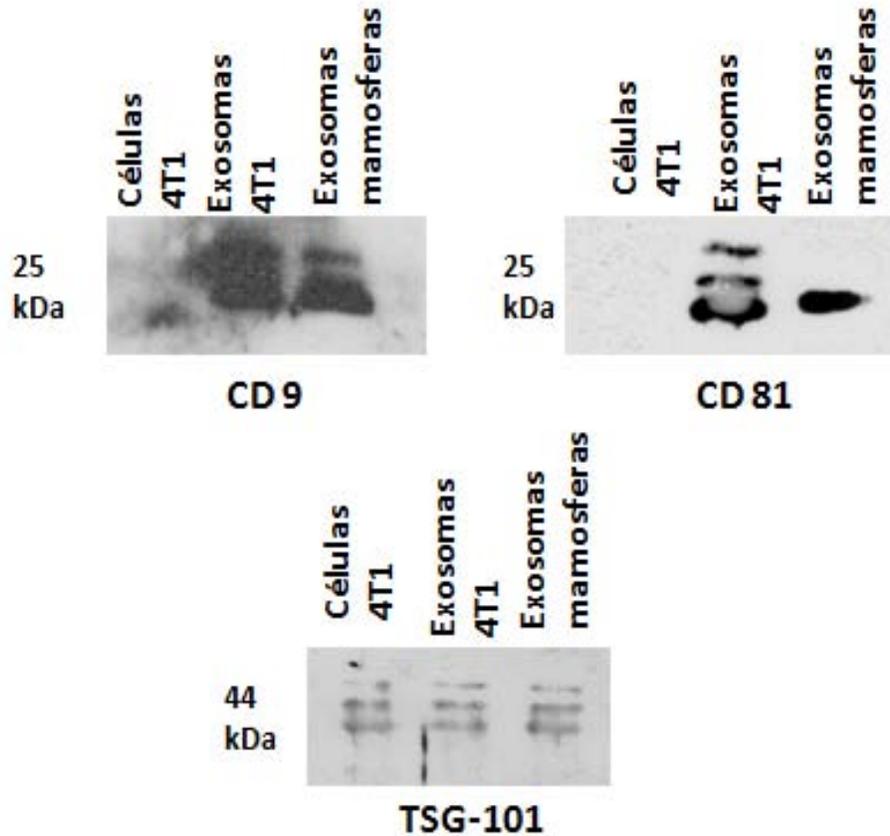


Figura 18. Identificación por westernblot de los marcadores de exosomas. Correspondiente a las proteínas CD9, CD 81 y TSG-101.

También se observa que en los lisados de la línea células 4T1, la expresión de las proteínas CD9 como TSG-101 es evidente, pero no así CD81.

7.3 Establecimiento cultivos de células HUVEC.

7.3.1 Cultivos de células HUVEC

Se establecieron los cultivos con medio de cultivo F12K, y estas células se utilizaron para los ensayos funcionales de angiogénesis (Figura 19). Se muestra una fotografía de un cultivo de células HUVEC con una confluencia de 70 %, las células muestran la morfología alargada, clásica del fenotipo endotelial.

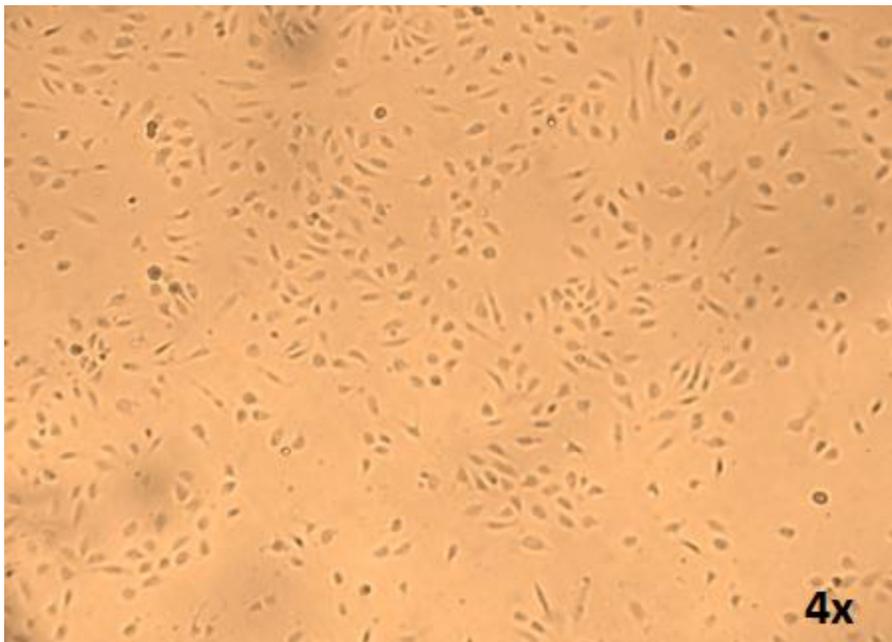


Figura 19. Cultivos de células HUVEC. Aumento de 4x.

7.4 Análisis de la función de los exosomas derivados de mamíferos de la línea celular 4T1 en angiogénesis.

7.4.1 Cinética de formación de tubos

Se realizó un ensayo funcional de angiogénesis en matrigel, en placas de 96 pozos y se monitoreó la formación de tubos desde la primera hora de cultivo hasta las 6 h.

Se observó que las células HUVEC co-cultivadas con los exosomas promueven la formación de vasos con una concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de exosomas forman vasos a partir de la primera hora de co-cultivo, que alcanzó un máximo de formación a las 6 h.

Las células HUVEC tienen la capacidad de formar tubos en ausencia de estímulo, sin embargo, éstos, en comparación de las células estimuladas con un promotor de angiogénesis como lo es FGF, presentan estructuras que no son evidentes a simple vista. También se observa que el control negativo (Sulforafano) inhibe completamente la formación de tubos (Figura 20).

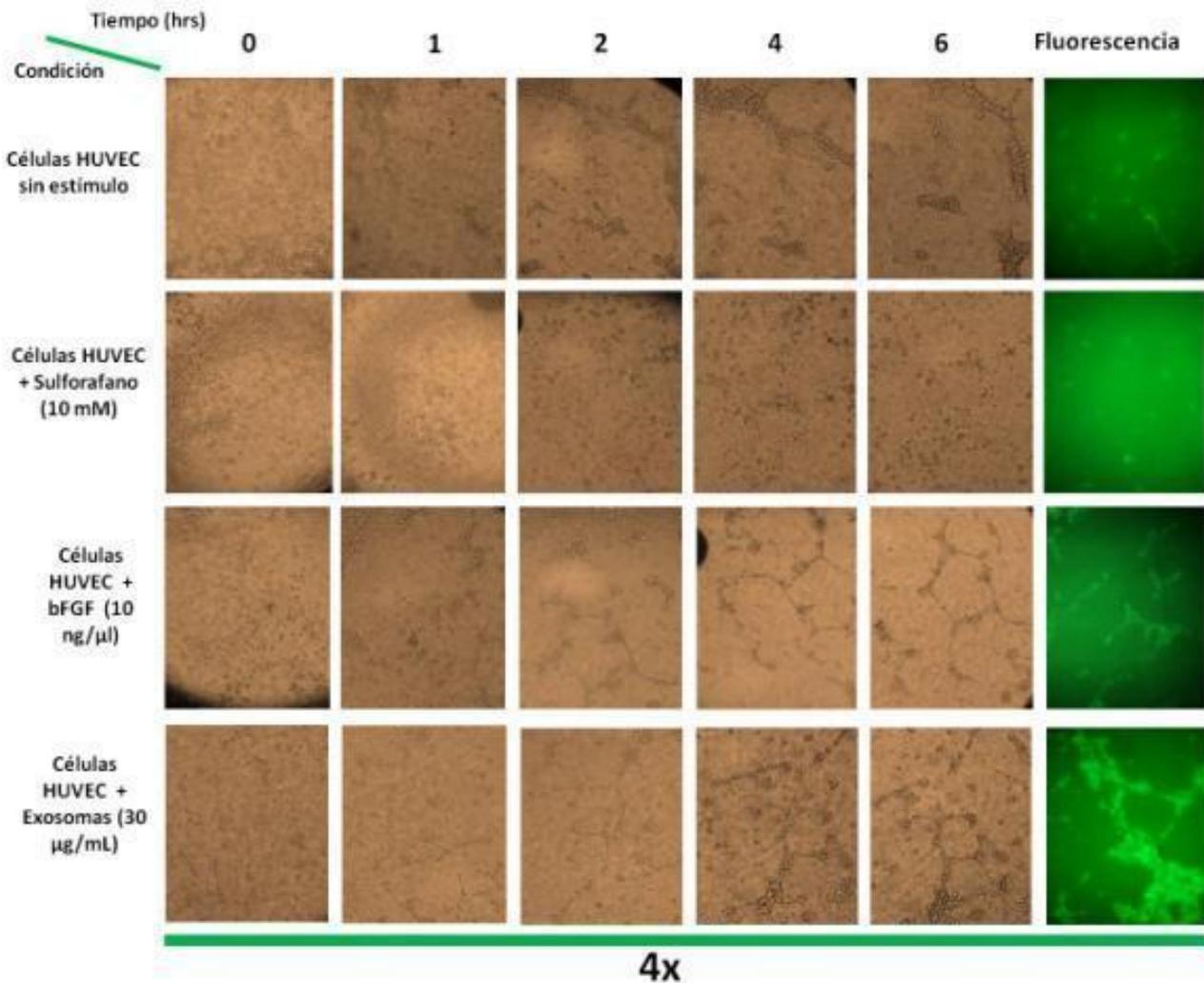


Figura 20. Cinética de angiogénesis de 0-6 h. Se observa que tanto las células estimuladas con FGF y exosomas desde la primer hora de cultivo comienzan con la formación de tubos, y no así las células estimuladas con el inhibidor de angiogénesis (Sulforafano).

Los ensayos de angiogénesis se optimizaron, utilizando placas de 48 pozos con la base de matrigel, y 30 mil células HUVEC por pozo. Se observó la formación de tubos a 6 h, con los mismos grupos de estudio (Figura 21).

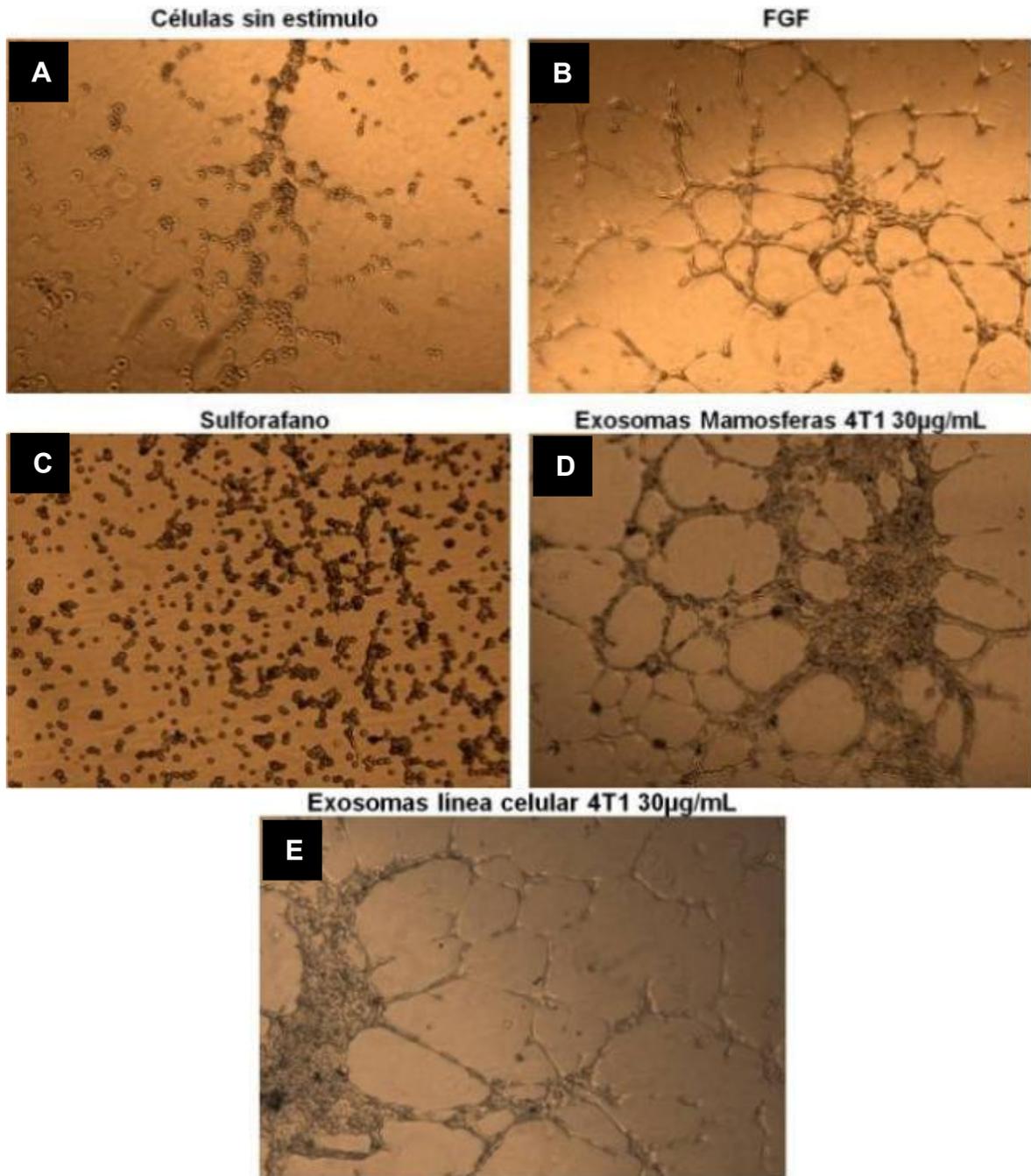


Figura 21. Ensayos de angiogénesis a 6 h de cultivo a 4x. A) Se observa que las células sin estímulo tienden a formar tubos. B) FGF Induce la formación de tubos. C) Sulforafano inhibe la formación de vasos manteniendo a las células individuales. D) Los exosomas de mamosferas inducen un mayor reclutamiento de células endoteliales manteniendo la formación de tubos. E) Los exosomas de la línea celular estimulan la formación de tubos a un nivel similar que las mamosferas.

7.4.2 Cuantificación de tubos

La cuantificación de tubos se realizó utilizando el programa *Image J*, con la característica de *Angiogenesis Analyzer*. Esta aplicación permite cuantificar entre otros parámetros, el número de nodos (zona en la que interceptan dos o más segmentos), segmentos y redes (interacción entre segmentos y nodos) que se forman en estos ensayos (Figura 22).

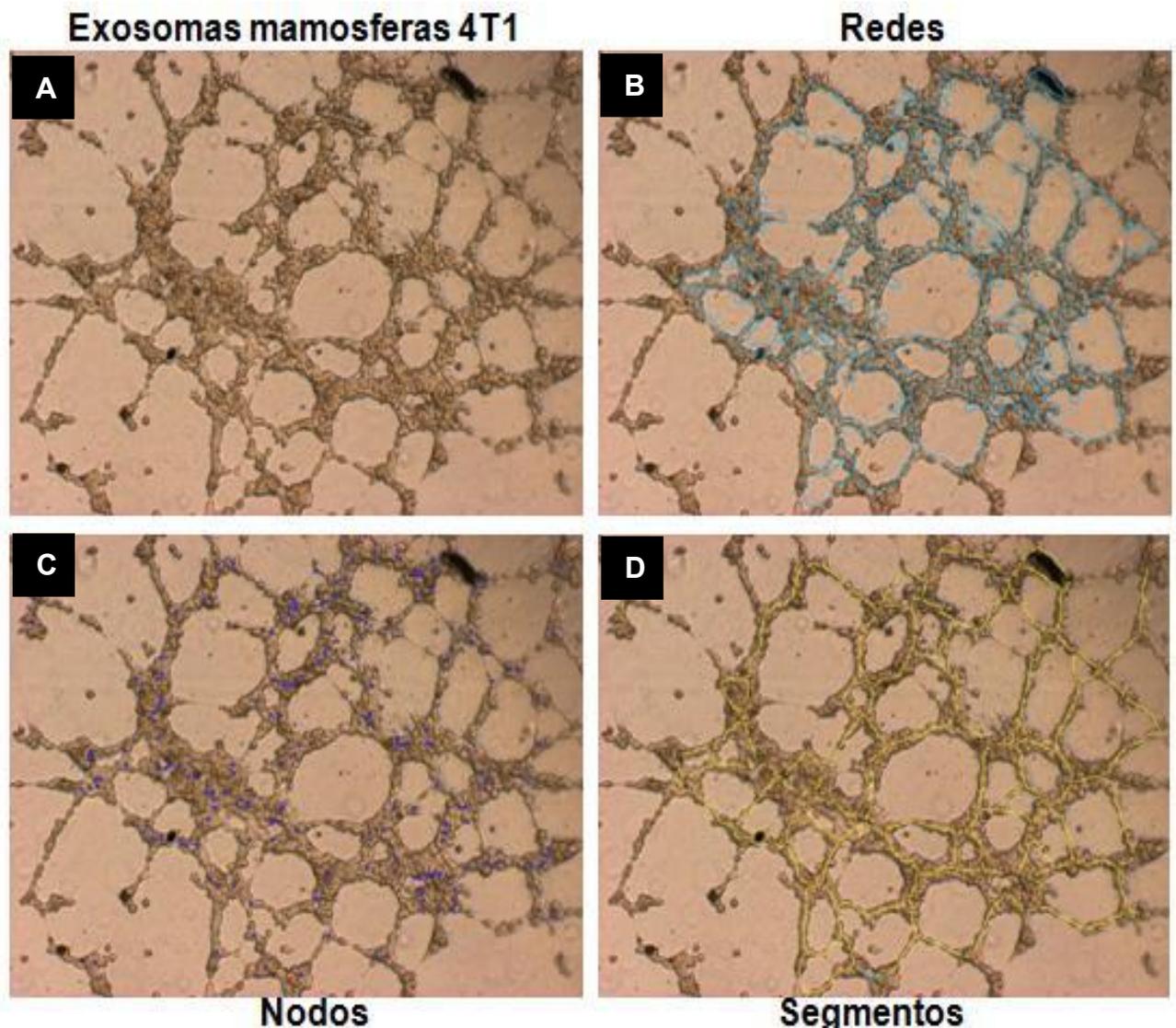


Figura 22. Análisis de imágenes de angiogénesis utilizando *Angiogenesis Analyzer* del programa *Image J*. A) Se observa una foto sin analizar. B) Se observan las redes (interacción entre segmentos y nodos) que cuantifica el programa. C) Los nodos (zona en la que interceptan dos o más segmentos). D) Segmentos.

7.4.4 Análisis de angiogénesis

De los ensayos de angiogénesis previamente descritos, se realizó la cuantificación para confirmar un efecto angiogénico. Se realizaron 3 ensayos por duplicado (n=6) a 6 h de co-cultivos con los exosomas y los controles. Todas las imágenes obtenidas se procesaron con el programa *Angiogenesis Analyzer*. Se cuantificó la cantidad de nodos, segmentos y redes formadas. Se encontró que hay diferencias significativas en los co-cultivos de exosomas de mamíferos en comparación con las células estimuladas con FGF y las células que no son estimuladas (Figura 23). Así mismo se observó que la formación de tubos en los co-cultivos con exosomas es dependiente de la dosis (Figura 24).

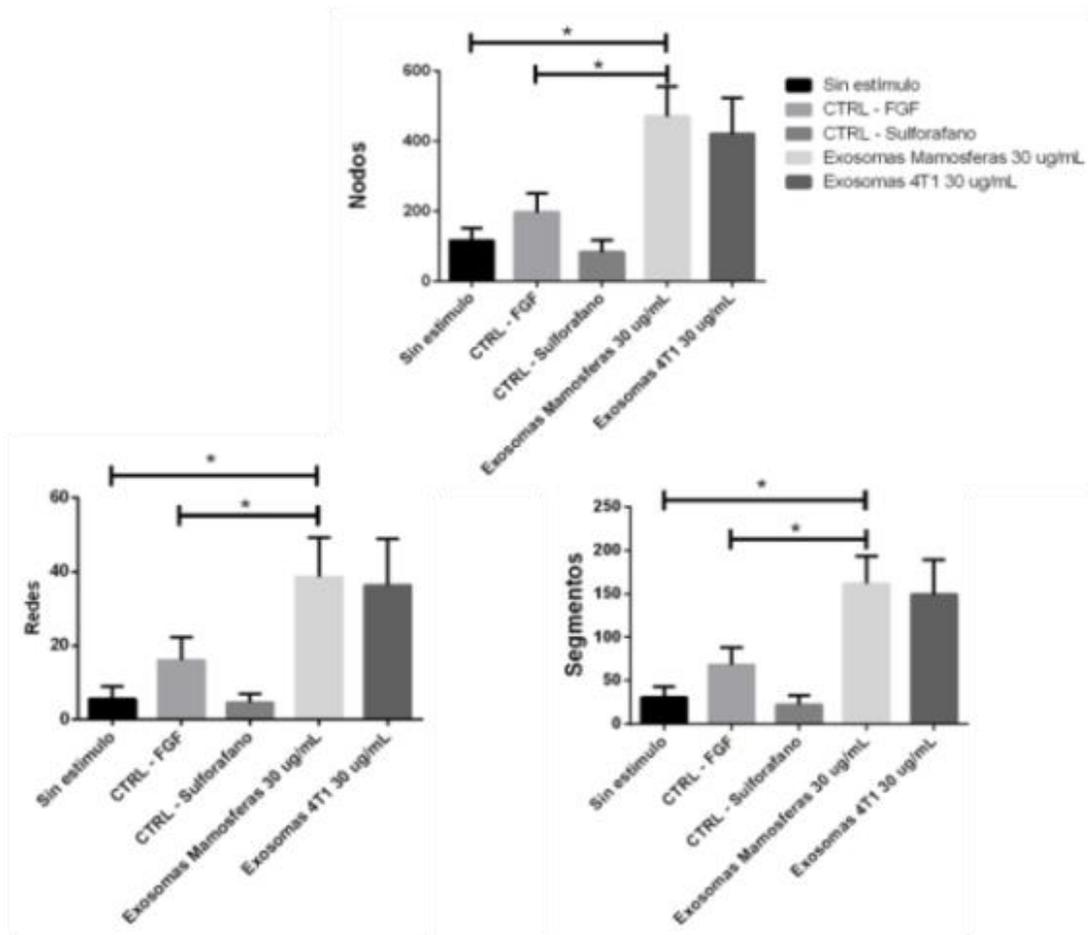


Figura 23. Análisis cuantitativo de la formación de tubos (n=6). El número de nodos, redes y segmentos de las células HUVEC estimuladas con exosomas de mamíferos 4T1 es significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación con las células que no fueron estimuladas y las células estimuladas con el control positivo (FGF).

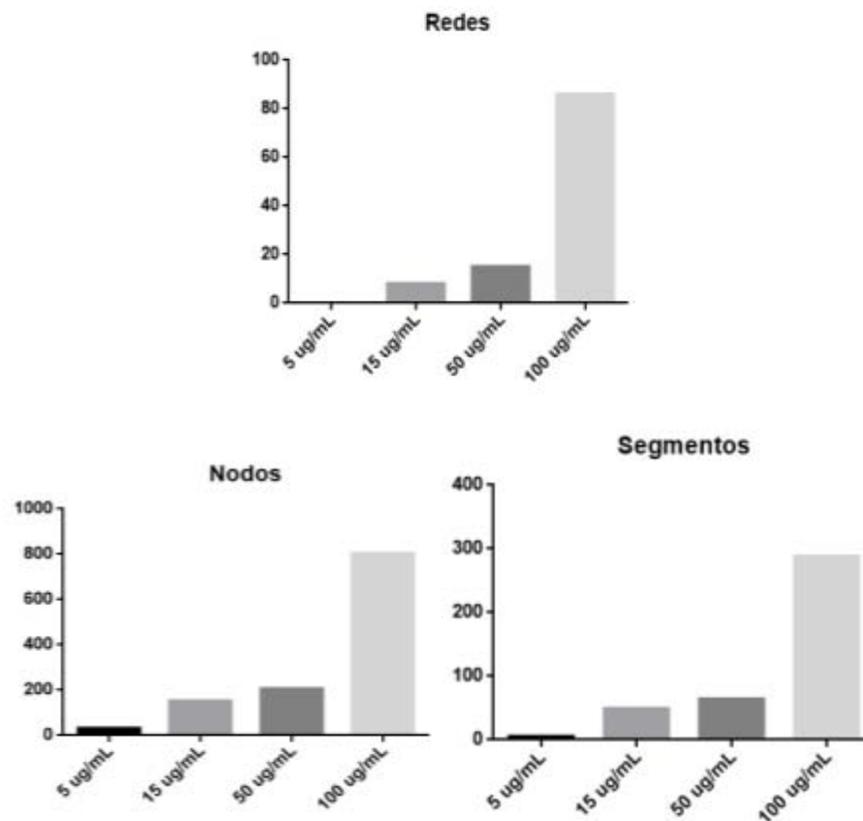
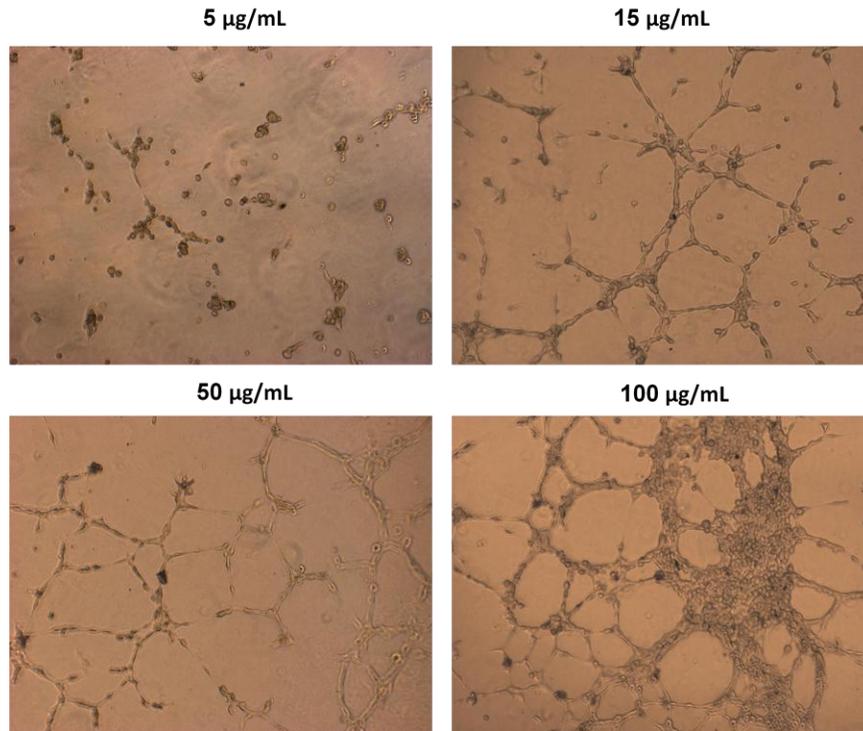


Figura 24. Efecto de los exosomas en angiogénesis es dosis dependiente. A partir de 5 µg/mL de exosomas se observa un efecto promotor de angiogénesis. En las gráficas se representan los números totales.

8. Discusión

El cultivo de mamíferas es una herramienta ampliamente utilizada para estudiar la participación y los cambios moleculares de las CSC en CM. La formación de mamíferas con la línea celular 4T1 es posible, y de acuerdo con los resultados obtenidos, la densidad celular adecuada para la formación de estas es de 400,000 células por placa después de cinco días de cultivo. En el presente trabajo se ha demostrado que estas mamíferas miden entre 50 y 300 μm y nuestros resultados concuerdan con otros estudios previos y sugieren que la morfología esferoide es más definida que en células MA-11, MCF-7 y MDA-231 (Chen. *et al.* 2012). En otros trabajos se ha demostrado la formación de mamíferas con células 4T1 y que estas estructuras contienen células con fenotipo CSC, y son resistentes a la quimioterapia y radioterapia provocando la reincidencia de la enfermedad (Conti. *et al.* 2013; Chen. *et al.* 2012).

Como se observa en la figura 14, la expresión de CD44 en las células que conforman las mamíferas es del 0.33% en células CD24^{-bajo}, y disminuye en las células CD24⁺. Sin embargo, debe considerarse que CD44 es una molécula implicada en la adhesión celular y que se puede perder al disgregar las mamíferas enzimáticamente para el análisis en citometría. CD44 es una molécula que tiene un gran número de variantes (al menos 11) y dependiendo de los tipos celulares es la expresión de esta molécula, por ejemplo en células MA-11 de cáncer de mama CD44 es expresado en el 100% de las células que forman las mamíferas, en cambio en células MCF-7 solo el 20-40% expresan (Rappa y Lorico. 2010), por lo que la expresión de CD44 en las mamíferas 4T1 es menor.

Por otra parte, CD24 es una molécula que puede o no expresarse en líneas celulares de cáncer de mama (Hatina. 2012) y cuando se forman mamíferas con estas líneas celulares (MDA-231, MCF-7 y MA-11), es variable la expresión de

esta molécula; sin embargo, en experimentos de formación de tumores se observa que independientemente de la expresión de CD24, la tumorigenicidad no cambia, lo cual sugiere, junto con nuestro trabajo que no son moléculas totalmente adecuadas para la identificación de CSC. Por otro lado, se puede considerar el empleo de CD133, que es una molécula que se ha sugerido en los últimos años como alternativa para identificar células madre y se ha utilizado como marcadora en mamíferos de la línea celular 4T1 (Fatima y Nawas. 2015; González. *et al.* 2014; Rappa y Lorico. 2010).

Uno de los mecanismos de tumorigénesis de las CSC, es la liberación de moléculas asociadas a procesos tumorales al microambiente a través de exosomas. Los exosomas son acarreadores de proteínas, y otras moléculas implicadas en el desarrollo tumoral. Como ha sido reportado ampliamente, estas microvesículas pueden ser purificadas a partir de sobrenadantes de cultivos celulares (Simpson. *et al.* 2009).

En este trabajo se logró la purificación de exosomas derivados de sobrenadantes de cultivos de mamíferos, los cuales se caracterizaron morfológicamente por microscopía electrónica. Estos exosomas de las mamíferos miden entre 31 y 94 nm lo cual concuerda con lo que mencionan diversos grupos de investigación (Brase. *et al.* 2010; Brownlee. *et al.* 2014; Chen. *et al.* 2015; Cocucci y Meldolesi. 2015; Frydrychowicz. *et al.* 2014; Kumar. *et al.* 2014; Melo. *et al.* 2014; Simpson. *et al.* 2009; Sun y Liu. 2014; Théry. 2011; Ueda. *et al.* 2014; Villarroya. *et al.* 2014).

Del mismo modo, para la identificación molecular de los exosomas, se logró identificar por citometría de flujo que los exosomas expresan la molécula CD63 y en los lisados de estas microvesículas se identificó las moléculas biomarcadoras CD9, CD81 y TSG-101 confirmando lo reportado por otros grupos de investigación (Cocucci y Meldolesi. 2015; Frydrychowicz. *et al.* 2014; Kumar. *et al.* 2014; Melo. *et al.* 2014; Rodríguez. *et al.* 2015). CD81 no se encontró en los lisados de la línea celular 4T1. Esto posiblemente se debe a que la línea celular proviene de un

estadio metastásico, en el cual las moléculas involucradas en la adhesión celular no se encuentran a nivel proteína pero sí a nivel de mRNA; ó que en algún momento CD81 también se expresó como proteína y quedó encapsulada en los exosomas derivados de mamíferos donde se identificó la presencia de CD81. Esto pudiera estar relacionado con el hecho de que las tetraspaninas que están involucradas en procesos de invasividad y metástasis, incrementan su expresión en CSC en comparación con otras células (Kumar. *et al.* 2014).

Uno de los eventos que favorece al desarrollo tumoral en CM es la angiogénesis. Este es un proceso crítico donde progresa la enfermedad, permite la invasión a otros órganos, y es regulado por un proceso dinámico de comunicación entre las células tumorales y su microambiente, y en cual hay una gran cantidad de moléculas involucradas. Los mecanismos por los cuales los exosomas son capaces de promover la angiogénesis dependen del tipo celular que secreta, sin embargo exosomas derivados de CSC no han sido estudiados a detalle.

En este trabajo se reporta que los exosomas de las mamíferos como de la línea celular 4T1 en co-cultivos con células HUVEC, son capaces de inducir la formación de tubos desde la primer hora de incubación y que esta formación es dependiente de la cantidad de proteína, y es a partir de 5 µg/mL como también lo muestran otros grupos de investigación con exosomas de células de cáncer nasofaríngeo (Chan. *et al.* 2015; Yi. *et al.* 2015). Se observa que en éstos co-cultivos de células HUVEC con exosomas derivados de mamíferos y de la línea celular, comparados con las células estimuladas con FGF (inductor de angiogénesis), los tubos formados son más gruesos, lo que sugiere que hay una mayor inducción en el reclutamiento celular, y que desde 6 y hasta las 24 h se consigue la máxima formación de tubos. Lo anterior indica que el potencial pro-angiogénico de los exosomas juega un papel crucial en el desarrollo y progresión del cáncer.

Estudios previos han demostrado que los exosomas de CSC promueven la formación de un nicho que favorece el crecimiento tumoral. Entre las moléculas involucradas en la angiogénesis se ha observado que VEGF, ICAM-1 y la variante 5 de CD44 (CD44v5) están sobre-expresadas en exosomas de cáncer nasofaríngeo, y a su vez esta expresión se favorece cuando las células están expuestas a un microambiente hipóxico donde hay un estrés oxidativo, procesos de muerte celular y exposición ante una respuesta inmune (Chan. *et al.* 2015). Otras moléculas como MMP-2 y MMP-9 además de VEGF se han encontrado en cáncer de ovario, y se ha observado que estas son capaces de estimular la proliferación, motilidad e invasión de las células endoteliales, donde se ha observado que la expresión de VEGF se favorece cuando las células se encuentran inmersas dentro de un microambiente con un pH ligeramente ácido (Taraboletti. *et al.* 2006). Estas condiciones hipóxicas en cáncer de mama incrementan la expresión de MMP-2 y 9, ayudando a degradar la matriz extracelular y promover metástasis (Park. *et al.* 2010) principalmente por las CSC.

Como se mencionó antes, CD44 es una proteína marcadora de CSC, sin embargo también participa en procesos como la migración celular y metástasis. Se encuentra altamente expresada en algunos tipos de cáncer, y en angiogénesis está involucrada en las uniones entre las células endoteliales y los compartimientos de la matriz extracelular ayudando a la estabilización de las redes que forman las células endoteliales *in vivo* (Cao. *et al.* 2006; Trochon. *et al.* 1996). CD44 se ha detectado en exosomas de diversos tipos de cáncer (Colon, melanoma, nasofaríngeo, ovario, próstata) (Exo carta) y como se observó en nuestros resultados, CD44 se encuentra en los exosomas derivados de las mamosferas de la línea 4T1. Esta tetraspanina podría estar promoviendo la proliferación y formación de tubos de las células HUVEC. Así mismo CD44 es sobre expresado cuando las células se encuentran en un ambiente rico en factores pro-angiogénicos tales como FGF y VEGF (Griffioen. *et al.* 1997).

En cuanto a CD9, CD63 y CD81, moléculas biomarcadoras de los exosomas, también cumplen funciones que están involucradas directamente con la angiogénesis ya que regulan la migración celular (Harris. *et al.* 2015; Kamisasanuki. *et al.* 2011; Tejera. *et al.* 2013). CD81 es capaz de promover el crecimiento tumoral y metástasis (Vences. *et al.* 2015), y es capaz de formar complejos con integrinas regulando así la adhesión celular. En cuanto a CD9, cuando es bloqueado con anticuerpos específicos en las células endoteliales, éstas no son capaces de migrar hacia el sitio en el cual son requeridas, por lo que *in vitro*, inhibe la angiogénesis aún en presencia de VEGF (Klein. *et al.* 1999). Por tanto, estas moléculas no pueden ser descartadas como mediadoras del proceso angiogénico.

La capacidad angiogénica de los exosomas oncogénicos también puede atribuirse a otras moléculas, como lo son algunas quimiocinas. Rodríguez y colaboradores (2015) encontraron que células de cáncer de mama sobre-expresan CXCR4 incrementando su capacidad de proliferación, migración e invasión y que los exosomas derivados de estas mismas células tienen las mismas capacidades al acarrear este receptor de quimiocinas lo cual promueve la progresión tumoral al interactuar con su ligando, y pudiese ser que este receptor de quimiocinas a su vez esté involucrado en angiogénesis.

También se ha reportado que exosomas de células leucémicas, son capaces de promover angiogénesis. En un estudio previo (Taverna. *et al.* 2012) se encontró que estas vesículas contienen CXCL8, y que cuando esta molécula es bloqueada *in vitro* la angiogénesis es inhibida. Normalmente las células endoteliales que se encuentran en proliferación sobre-expresan CXCL8, lo cual permite llevar a cabo el proceso de formación de tubos. CXCL8 participa ampliamente en otros procesos, tales como la proliferación celular, invasión, migración y sobrevivencia regulando a través de las diferentes vías de señalización de genes tales como HIF-1, NF- κ B y STAT3 (Waugh y Wilson. 2008).

Igualmente, se ha determinado que los miRNA's también son cruciales en la regulación del proceso angiogénico, y entre ellos destacan los miRNA's pro-angiogénicos let7, 27b, 100, 128, 130a, 132, 135b, 210, 296 y 378 (Yin. *et al.* 2015), algunos de los cuales se han encontrado dentro de exosomas derivados de diferentes tipos de cáncer regulando negativamente la expresión de genes como FIH-1, un factor de transcripción que regula a su vez a HIF-1, el cual es importante ya que promueve la sobreproducción de factores de crecimiento angiogénicos como VEGF y HGF (Umezu. *et al.* 2014).

Por tanto, es importante continuar caracterizando a los exosomas derivados de mamíferos de la línea celular 4T1, para determinar de manera más precisa el papel de estas vesículas como acarreadores de moléculas (factores de crecimiento, quimiocinas, tetraspaninas y miRNA's) que se han descrito y se encuentran en los exosomas y que pueden estar regulando directa o indirectamente procesos pro-oncogénicos, como la angiogénesis. Todo esto es importante debido a que la angiogénesis es un evento crucial en el desarrollo del cáncer y esta caracterización podría facilitar la búsqueda de posibles marcadores diagnósticos en el cáncer de mama.

9. Conclusiones

- Se estableció el ensayo para la formación de mamíferas derivadas de la línea celular 4T1 en cultivos *in vitro*, las cuales pocas células muestran un fenotipo CD44+/CD24- de células madre tumorales.
- Se caracterizó a los exosomas derivados de mamíferas por microscopía electrónica, tienen un tamaño promedio de 41 nm y 63 nm para exosomas derivados de mamíferas y de la línea celular 4T1 respectivamente.
- Por análisis de citometría de flujo y westernblot, los exosomas expresan las proteínas CD9, CD63, CD81 y TSG-101.
- Los exosomas derivadas de mamíferas inducen la formación de tubos característicos del proceso de angiogénesis desde las primeras h de co-cultivo con las células HUVEC y es dosis dependiente.
- Los exosomas de mamíferas son importantes mediadores de la comunicación celular a nivel local, tienen marcadores con potencial pronóstico en cáncer y su contenido es capaz de inducir el proceso de angiogénesis *in vitro*.

10.Perspectivas

1. Analizar la incorporación de exosomas en células HUVEC mediante microscopía confocal.
2. Realizar ensayos de migración celular utilizando exosomas de mamíferos como estímulo.
3. Realizar todos estos ensayos utilizando exosomas de líneas celulares humanas.
4. Realizar ensayos *in vivo* de angiogénesis.

11.Referencias

1. Abusamra AJ., Zhong Z., Zheng X., Li M., Ichim T., Chin J., Min WP. (2005). Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol Dis.* 35:169–73.
2. Adorno V., Kibria G., Liu X., Doherty M., Junk D., Guan D., Hubert C., Venere M., Mulkearns E., Sinyuk M., Alvarado A., Caplan A., Rich J., Gerson S., Lathia J., Liu H. (2015). Cancer stem cells: targeting the roots of cancer, seeds of metastasis, and sources of therapy resistance. *Cancer Res.* 15; 75 (6): 924-9.
3. Altevogt P., Bretz N., Ridinger J., Utikalb J., Umansky V. (2014). Novel insights into exosome-induced, tumor-associated inflammation and immunomodulation. *Seminars in Cancer Biology.* 28: 51-57.
4. *American Cancer Society.* (2014). Recuperado el 22 de Agosto de 2014: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-deseno-what-is-breast-cancer-types>
5. *American Type Culture Collection.* (2014). Recuperado el 22 de Agosto de 2014, de American Type Culture Collection: <http://www.atcc.org/>.
6. Arnaoutova I. y Kleinman H. (2010). *In vitro* angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nature protocols.* Vol5: 4.
7. Barcellos M., Lyden. D., Wang T. (2013). The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer,* 13: 511-518.
8. Bowcock A. (1999). *Breast Cancer: Molecular Genetics, Pathogenesis, and therapeutics.* New Jersey. USA. Human Press.
9. Brase J., Wuttig D., Kuner R., Sülthmann H. (2010). Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Molecular Cancer.* 9: 306-314.
10. Breastcancer.org

-
11. Brownlee Z., Lynn K., Thorpe P., Schroit A. (2014). A novel “salting-out” procedure for the isolation of tumor-derived exosomes. *Journal of Immunological Methods*. 407: 120-126.
 12. Cao G., Savani R., Fehrenbach M., Lyons C., Zhang L., Coukos G., DeLisser H. (2006). Involvement of endothelial CD44 during *in vivo* angiogenesis. *Ame. Jour. of Pathology*. 169:1 325-336.
 13. Cariati M., Naderi A., Brown J., Smalley M., Pinder S., Caldas C., Purushotham A. (2008). Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *Int. Journal of Cancer*. 122: 298-304.
 14. Chan Y., Zhang H., Liu P., Tsao S., Lung M., Mak N., Wong R., Yue P. (2015). Proteomic analysis of exosomes from nasopharyngeal carcinoma cell identifies intercellular transfer of angiogenic proteins. *Int. Journal of Cancer*. 137:1830-41
 15. Chen Y., Wang S., Liu R., Wang H., Chen J., Chiou S., Chang C., Lin L., Tan D., Lee Y. (2012). Remnant living cells that escape cell loss in late-stage tumors exhibit cancer stem cell-like characteristics. *Cell Death Disease*. 3:e399.
 16. Cocucci E. y Meldosi J. (2015). Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology*. 30: 10.
 17. Cooper G. y Hausman R. (2010). *La Célula*. Whashington, USA.: Márban.
 18. Conti L., Lanzardo S., Arigoni M., Antonazzo R., Randaelli E., Cantarella D., Calogero R., Cavallo F. (2013). The noninflammatory role of high mobility group box 1/toll-like receptor 2 axis in the self-renewal of mammary cancer stem cells. *FASEB J*. 27, 4731–4744.
 19. Dameron K., Volpert O., Tainsky M., Bouck N. (1994). Control of angiogenesis in fibroblast by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*. 265: 1582-1585.
-

-
20. Devaud C. John L., Westwood J., Darcy P., Kershaw M. (2013) Immune modulation of the tumor microenvironment for enhancing cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2 (8) e25961.
21. DeCicco K., Henry G., Cataisson C., Tabib T., Gwilliam J., Watson N., Bullwinkle E., Falkenburg L., O'Neill R., Morin A., Wiest J. (2014). Endothelial Cell Tube Formation Assay for the *In Vitro* Study of Angiogenesis. *Journal of Visualized Experiments*. (91), e51312.
22. Dontu G., Abdallah W., Foley J., Jackson K., Clarke M., Kawamura M., Wicha M. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Development*. 17: 1253-1270.
23. Dvorak H. (2005). Angiogenesis. *J Thromb Haemost*, 3: 1835-1842.
24. Eguiara A., Elorriaga K., Rezola R., García A. (2012). Células madre tumorales: una diana terapéutica en el cáncer de mama. *Rev Senol Patol Mamar*. 2012;25(3):107-115.
25. *ExoCarta*. (2015). Recuperado el 24 de mayo de 2015, de Exocarta: <http://www.exocarta.org/>.
26. Fatima F., Nawar M. (2015). Stem cell-derived exosomes roles in stromal remodeling, tumor progression, and cancer immunotherapy. *Chin. Journal Cancer*. 34:46.
27. Fessler E., Dijkgraaf F., Melo F., Medema JP. (2012). Cancer stem cell dynamics in tumor progression and metastasis: Is the microenvironment to blame?. *Cancer Letters* 341: 97–104.
28. Frydrychowicz M., Kolecka A., Madejczyk M., Yasar S., Dworacki G. (2014). Exosomes – Structure, Biogenesis and Biological Role in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Scandinavian Journal of Immunology*. 12247.
-

-
29. Globocan. (2012). Recuperado el 22 de agosto de 2014 de Globocan: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
30. González E., Piva M., Rodríguez E., Gil D., Royo F., Elortza F., Falcon J. M., Vivanco M. (2014). Human mammospheres secrete hormone-regulated active extracellular vesicles. *PLOS ONE*. 9(1): e83955. doi:10.1371.
31. Grange C., Tapparo M., Collino F., Vitillo L., Damasco C., Deregibus M., Ciro Tetta C., Bussolati B., Camussi G. (2011). Microvesicles Released from Human Renal Cancer Stem Cells Stimulate angiogenesis and Formation of Lung Premetastatic Niche. *Cancer Research*. 71: 5346-5356.
32. Griffioen A., Marieke J.H., Coenen C., Damen S., Hellwig D., van Weering W., Vooy G., Blijham, and Groenewegen G. CD44 Is Involved in Tumor Angiogenesis; an Activation Antigen on Human Endothelial Cells (1997). *Blood*, 90:3 1150-1159.
33. Harris D., Patel S., Gucek M., Hendrix A., Westbrook W., Tarask J. (2015). Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement. *PLOS ONE*. 10:3. 1-18.
34. Hatina J. (2012). The dynamics of cancer stem cell. *Neoplasma* 59: 700-707.
35. Hu M. y Polyak K. (2008). Molecular characterisation of the tumour microenvironment in breast cancer. *European Journal of Cancer* 44: 2760-2765.
36. Jayne L. (2014). The emerging role of exosomes in epithelial-mesenchymal-transition in cancer. *Frontiers in Oncology*. 4: 361.
37. Kamińska M., Ciszewski T., Łopacka-Szatan K., Miotła P., Starosławska P. 2015. Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny* 14(3): 196-202.
-

-
38. Kamisasanuki T., Tokushije S., Tevasaki H., Khai N., Wang Y., Sakamoto T., Kosai K. (2011). Targeting CD9 produces stimulus-independent antiangiogenic effects predominantly in activated endothelial cells during angiogenesis: A novel antiangiogenic therapy. *Biomedical and Biophysical Research Communications*. 413:1. 128-135.
39. Katoh M. (2013). Therapeutics targeting angiogenesis: Genetics and epigenetics, extracellular miRNAs and signaling networks. *International Journal of Molecular Medicine*. 32: 763-767.
40. Kim J., Wieckowski E., Taylor D., Reichert T., Watkins S., Whiteside T. (2005). Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Cancer Research*. 11: 1010-1020.
41. Klein C., Azorsa D., Cazenave J., Lanza F. (1999). CD9 participates in endothelial cell migration during in vitro wound repair. *Arterios Thromb Vase Biol*. 20:1. 360-369.
42. Klemm F., Joyce J. (2015) Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. *Trends Cell Biol*. 25 (4) 198–213.
43. Kumar D., Gupta D., Shankar S., Srivastava R. (2014). Biomolecular characterization of exosomes released from cancer stem cells: Possible implications for biomarker and treatment of cancer. *Octotarget*. 6:5.
44. Kruger S., Abd Elmageed Z., Hawke D., Wörner P., Jansen D., Abdel Mageed A., Alt E., Izadpanah R. (2014). Molecular characterization of exosome-like vesicles from breast cancer cells. *BMC Cáncer*. 14: 44-54.
45. Lee J., Park S., Jung B., Jeon Y., Lee Y., Kim M., Kim Y., Jang J., Kim C. (2013). Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppressed angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells. *PLOS ONE*. 8(12).
-

-
46. Lindau D., Gielen P., Kroesen M., Wesseling P., Adema GJ. (2013). The immunosuppressive tumor network: MDSCs, Tregs and NKT cells. *Immunology*. 138:105–15.
47. Liu S., Clouthier S., Wicha M. (2012). Role of microRNAs in the Regulation of Breast Cancer Stem Cells. *Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia*. 17: 15-21.
48. Lötvall J., et al. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the international Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* . 3: 26913 - <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v3.26913>
49. Mattiske S., Suetani R., Neilsen P., Callen D. (2012). The Oncogenic Role of miR-155 in Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers and Prevention*. 21: 1236-1243
50. Milane L., Singh A., Mattheolabakis G., Suresh M., Amiji M. (2015). Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *Journal of Controlled Release*. 219: 278-294.
51. Mittelbrunn M. y Sánchez F. (2012). Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Vol 13. 328-335.
52. Melo S., Sugimoto H., O'Connell J., Kato N., Villanueva A., Vidal A., Qiu L., Vitkin E., Perelman L., Melo C., Lucci A., Ivan C., Calin G., Kalluri R. (2014). Cancer Exosomes Perform Cell- Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell*. 26: 707-721.
53. Müller A., Homey B., Soto H., Ge N., Catron D., Buchanan M., McClanahan T., Murphy E., Yuan W., Wagner S., Barrera J.L., Mohar A., Verástegui E., Zlotnik A. (2001). Involvement of chemokine receptor in breast cancer metastasis. *Nature*. 410: (6824) 50-6.
-

-
54. Nasser M., Elbaz M., Ahirwar D., Ganju R. (2015). Conditioning solid tumor microenvironment through inflammatory chemokines and S100 family proteins. *Cancer letters*. 365:11-22.
55. Nishida N., Yano H., Nishida T., Kamura T., Kojiro M. (2006). Angiogenesis in Cancer. *Vascular Health and Risk Management*. 2(3) 213–219
56. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2015). Cáncer de mama: prevención y control. Versión actual 2015. Disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/> (Consultado el 08 de Noviembre, 2015).
57. Ortiz C., Galván E. (2007). Factores de riesgo reproductivo para cáncer de mama en pacientes atendidas en un hospital urbano de segundo nivel. *Ginecol Obstet Mex* 75:11-16.
58. Park J., Tan H., Datta A., Lai R., Zhang H., Meng W., Lim S., Sze S. (2010). Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Molecular and Cellular Proteomics*. 9:6. 1085-1099.
59. Parolini I., Federici C., Lugini L., Palleschi S., De Milito A., Coscia C., Iessi E., Logozzi M., Molinari A., Colone M., Tatti M., Sargiacomo M., Fais S. (2009). Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry* , 4;284(49):34211-22. doi: 10.1074/jbc.M109.041152. Epub 2009 Sep 30.
60. Parthasarathy V., Martin F., Higginbottom A., Murray H., Moseley G., Read R., Mal G., Hulme R., Monk P., Partridge L. (2008). Distinct roles for tetraspanins CD9, CD63 and CD81 in the formation of multinucleated giant cells. *Immunology*. 127: 237-248.

-
61. Ponti D., Costa A., Zaffaroni N., Pratesi G., Petrangolini G., Coradini D. (2005) Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 65:5506-11.
62. Qian Z., Shen Q., Yang X., Qiu Y., Zhang W. (2015). The role of extracellular vesicles: an epigenetic view of the cancer microenvironment. *BioMed Research International*. Volume 2015, Article ID 649161, 8 pages.
63. Rappa G., Lorico A. (2010). Phenotypic characterization of mammosphere-forming cells from human MA-11 breast carcinoma cell line. *Experimental Cell Research*. 316: 1576-1586.
64. Rebellón D., Parra T., Moreno J., Castro J., Bernal B. (2014). Alteraciones moleculares implicadas en la fisiopatología del cáncer y su utilidad para la investigación en medicina. *Rev Cient Cienc Méd.* Vol. 17:2. 44-52.
65. Reinhardt T., Sacco R., Nonnecke B., Lippolis J. (2013). Bovine milk proteome: Quantitative changes in normal milk fat globule membranes and whey proteomes resulting from *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Proteomics*. 82: 141-154.
66. Reynolds B., Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992;255:1707-10.
67. Rodríguez S., Silva J., Herrera M., Peña C., Martín P., Gil B., Coronado M., Soldevilla B., Turrión V. (2015). Exosomes enriched in stemness/metastatic-related mRNAs promote oncogenic potential in breast cancer. *Oncotarget*. 6:38 40575-87.
68. Schroeder A., Heller D., Winslow M., Dahlman J., Pratt G., Langer R., Jacks T., Anderson G. (2012). Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nature Reviews Cancer* 12, 39-50.
-

-
69. Selbach M., Schwanhäusser B., Thierfelder N., Fang Z., Khanin R., Rajewsky N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. Sep 4;455(7209):58-63. doi: 10.1038/nature07228. Epub 2008 Jul 30.
70. Shaw F., Harrison H., Spence K., Ablett M., Simões B., Farnie G., Clarke R. (2012). A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity. *Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia*. 17: 111-117.
71. Simpson R., Lim J., Moritz R., Mathivanan S. (2009). Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics*. Jun;6(3):267-83. doi: 10.1586/epr.09.17.
72. Sun T. y Liu J. (2014). Potential of Cancer Cell-Derived exosomes in Clinical application: A review of recent research advances. *Clinical Therapeutics*. 36: 6.
73. Sun Y. (2015). Tumor microenvironment and cancer therapy resistance. *Cancer letters*. 2015.
74. Szajnik M., Czystowska M., Szczepanski MJ., Mandapathil M., Whiteside TL. (2010). Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PLOS ONE*. 5:11469.
75. Taraboletti G., D'Ascenzo S., Giusti I., Marchetti D., Borsoth P., Millimaggi D., Giarazzi R., Pavan A., Dolo V. (2006). Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH. *Neoplasia*. (2) 96-103.
76. Taverna S., Flugy A., Saieva L., Kohn E., Santoro A., Meraviglia S., De Leo G., Alessandro R. (2012). Role of exosomes released by chronic myelogenous leukemia cells in angiogenesis. *International Journal of Cancer*. 130:9. 2033-43.
77. Tejera E., Rocha V., López S., Pérez D., Bachir A., Horwits A., Vázquez J., Sánchez F., Yáñez M. (2013). CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase. *Mol Biol Cell*. 24:3. 261-73.

-
78. Théry C. (2011). Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol. Rep.* 3, 15.
79. Théry C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* Apr;Chapter 3:Unit 3.22.
80. Tickner J., Urquhart A., Stephenson S., Richard D., O'Byrne K. (2014). Functions and therapeutic roles of exosomes in cancer. *Frontiers in oncology.* 4: 127: 1-8.
81. Trochon V., Mabilat C., Bertrand P., Legrand Y., Smadja F., Soria C., Delpech B., Lu H. (1996). Evidence of involvement of CD44 in endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro. *Int. Journal Cancer.* 66:664-78.
82. Ueda K., Ishikawa N., Tatsuguchi A., Saichi N., Fujii R., Nakagawa H. (2014). Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes. *Scientific Reports.* 4 : 6232 DOI: 10.1038/srep062321.
83. Umezu T., Tadokoro H., Azuma K., Yoshizawa S., Ohyashiki K., Ohyashiki JH. (2014). Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood.* 124(25):3748-3757.
84. Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee JJ., Lötvall J. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNA is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* (6):654-9. Epub 2007 May 7.
85. Vences F., Rajapaksa R., Srivastava M., Marabelle A., Kuo C., Levy R., Levy S. (2015). Tetraspanin CD81 Promotes Tumor Growth and Metastasis by Modulating the Functions of T Regulatory and Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res.* 75(21):4517-26.
86. Villarroya C., Baixauli F., Gutierrez C., Sánchez F. (2014). Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Seminars in Cancer Biology.* 28: 3-13.
87. Visvader J. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature.* 469: 314-322.
-

-
88. Waugh D. y Wilson C. (2008), The interleukine-8 pathway in cancer. *Clinical Cancer Research*. 14: 6735-41.
89. Weinberg R. (2007). The biology of Cancer. NY. USA. Garland Science.
90. Weis S., Cheresh D. (2001). Tumor angiogenesis molecular pathways and therapeutic targets. *Nature Medicine*. 17: 1359-1370.
91. Wieckowski EU., Visus C., Szajnik M., Szczepanski MJ., Storkus WJ., Whiteside TL. (2009). Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8+ T lymphocytes. *J Immunol*. 183:3720–30.
92. Yancopoulos G., Davis S., Gale N., Rudge J., Wiegand S., Holash J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 407: 242-248.
93. Yang M., Imrali A., Heeschen C. (2015). Circulating cancer stem cells: the importance to select. *Chin J Cancer Res*. 27(5):437-449.
94. Yi H., Ye J., Yang X., Zhang L., Zhang Z., Chen Y. (2015). High-grade ovarian cancer secreting effective exosomes in tumor angiogenesis. *Inter Journal Clin Exp Pathol*. 8:5. 5062-5070.
95. Yin R., Guo L., Zhang W., Zheng J. (2015). The pleiotropic effects of miRNAs on tumor angiogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 116: 1807-1815.

12.Anexos

Mamosferas

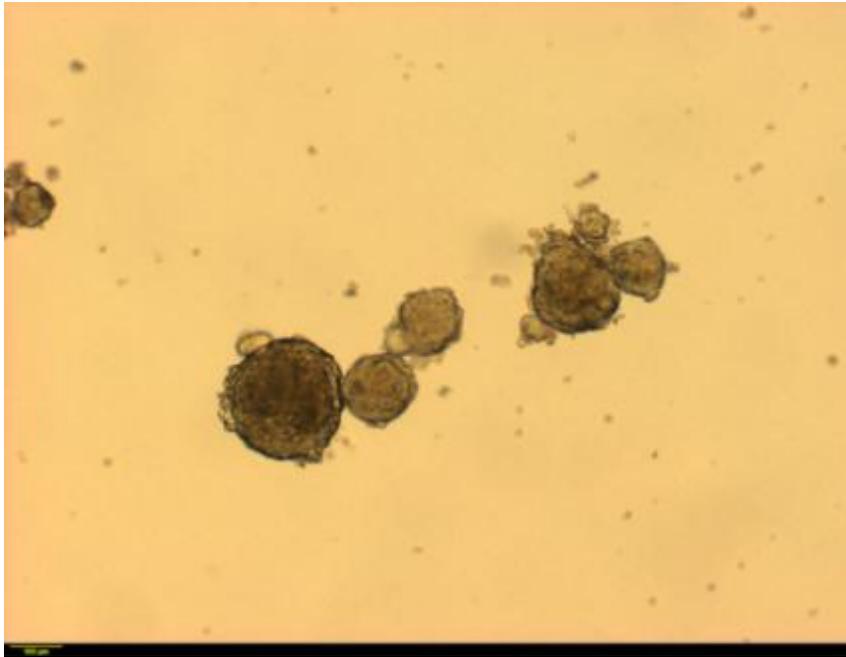


Figura 24. 200,000 células por placa

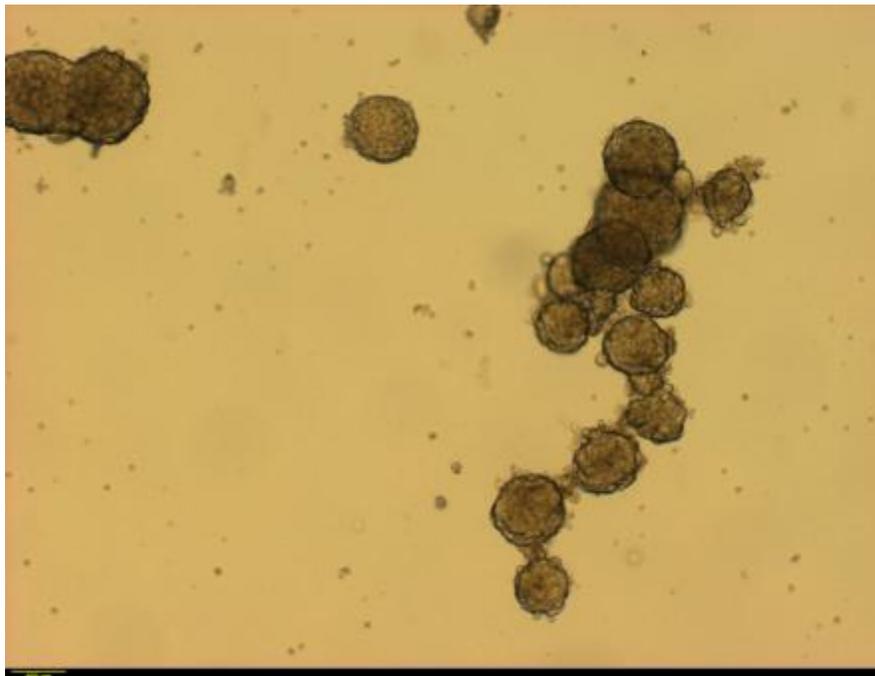


Figura 25. 400,000 células por placa

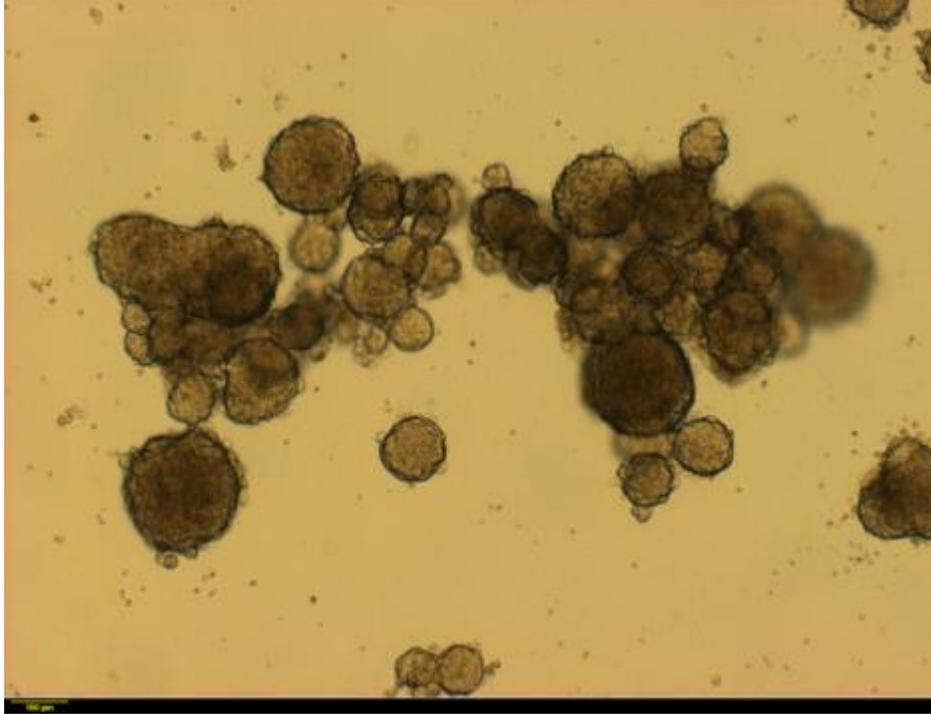


Figura 25. 600,000 células por placa

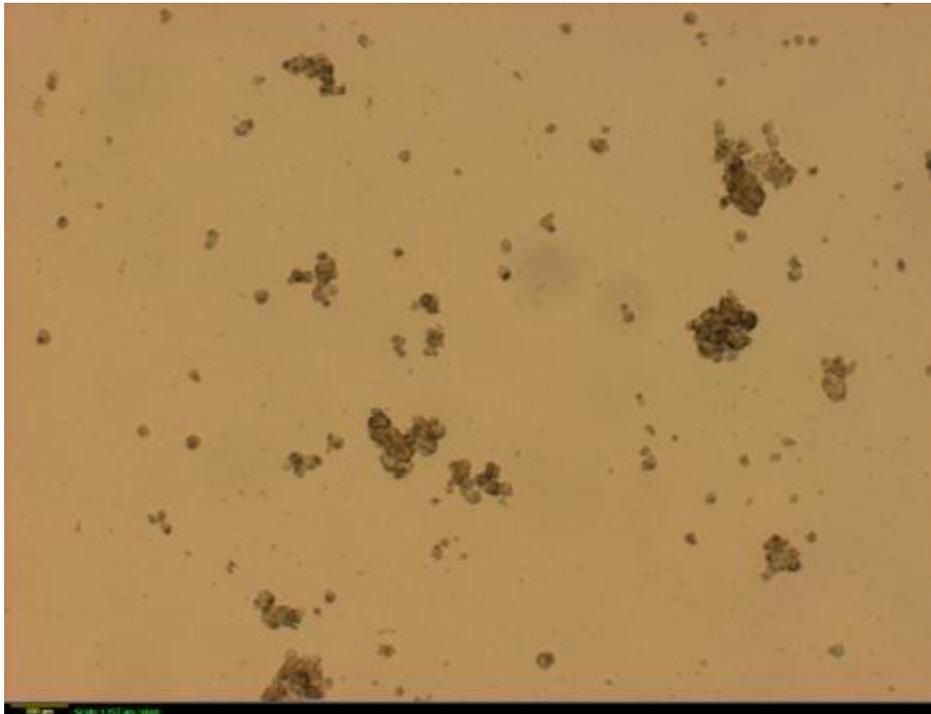
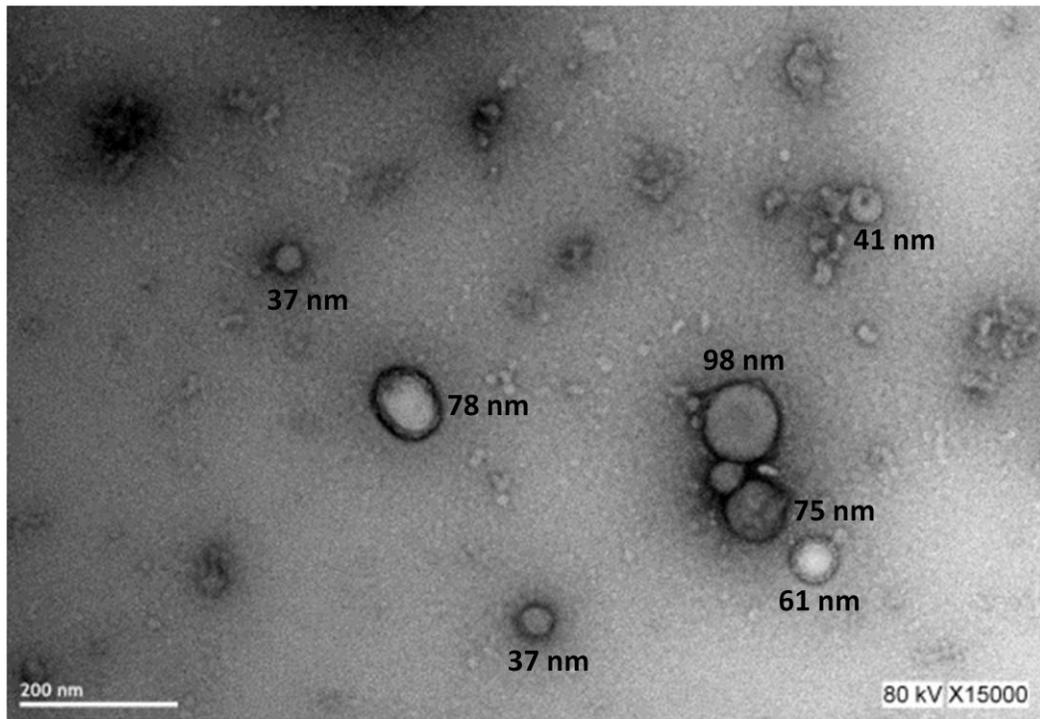
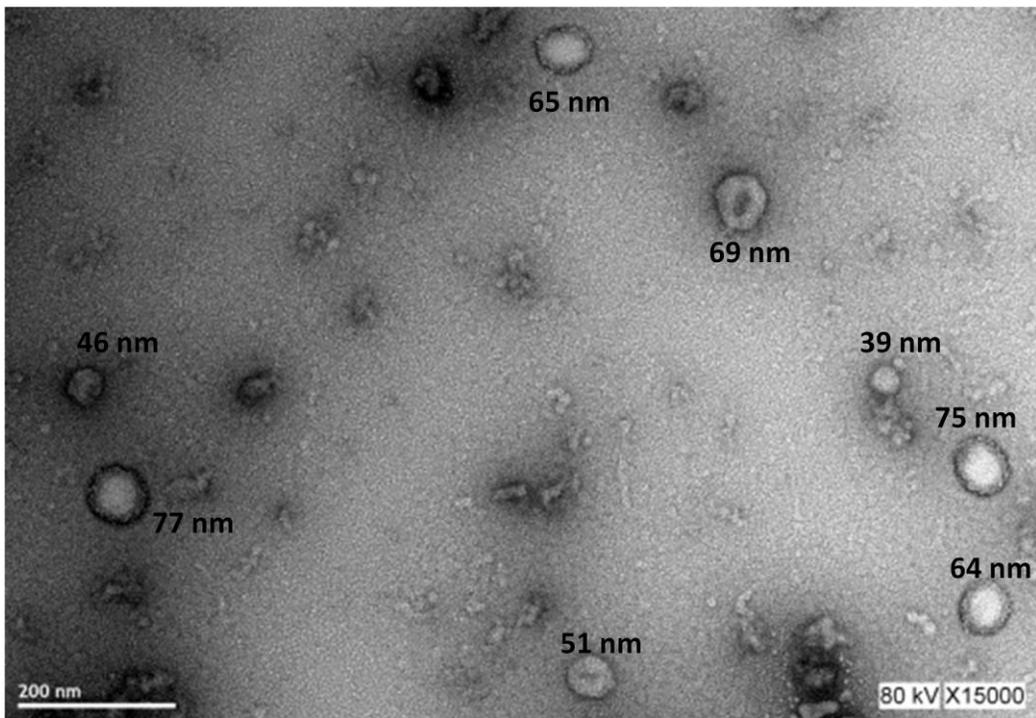


Figura 26. 800,000 células por placa

Exosomas línea celular 4T1



Exosomas mamosferas 4T1



Reactivos

- SFB (Gibco, USA)
- Heparina (Sigma Aldrich, USA)
- Hidrocortisona (Sigma Aldrich, USA)
- RPMI-1640 (Gibco, USA)
- EDTA
- HEPES 1M (Gibco, USA)
- Mammocult (StemCell Technologies, Cánada)
- Exo-FLOW (System Biocences, USA)
- Anticuerpos CD9, CD81 y TSG-101 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- F12K (ATCC, USA)
- ECGS (Sigma Aldrich, USA)
- Matrigel (BD Biociences, USA)
- DMSO (Sigma Aldrich, USA)
- Sulforafano (Sigma Aldrich, USA)
- bFGF (Invitrogen, USA)
- Micro BCA Protein (Thermo Scientific, USA)
- Antibioticos 100x
- B-Mercaptoetanol
- KitSuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA)

Soluciones

Medio de Cultivo RPMI-1640	Medio de Cultivo F12K
RPMI-1640 Bicarbonato de sodio - 1.5g Antibióticos 100x - 10 mL HEPES 1M – 10 mL B-Mercaptoetanol – 4 µL H ₂ O megapura SFB 10%	Medio F12K 500 mL ECGS – 0.05 mg/mL Heparina – 0.1 mg/mL SFB 10%

Medio de cultivo Mammocult	PBS 1x
Mammocult basal médium 450 mL Mammocult suplemento de proliferación 50mL Heparina 4 µg/mL Hidrocortisona 0.48 µg/mL	KCl - 0.2g NaCl – 8g KH ₂ PO ₄ – 0.2g Na ₂ HPO ₄ – 1.15g H ₂ O – 1000 mL

PBS-EDTA 1x	Solución RIPA (100 mL)
NaCl KCl Dextrosa EDTA H ₂ O	Tris HCl pH 8 – 0.788g NaCl - 0.877g Triton X-100 – 1mL (1%) SDS – 0.1g (0.1%) Desoxicolato de sodio – 1g (1%)

Material

- Tubos de ultracentrífuga (Quik-Seal Beckman Coulter)
- Filtros 0.2 μm (Corning)
- Tubos eppendorf 0.6 mL (Corning)
- Placas de bacterias
- Placas de cultivo 30x100 mm (Corning)
- Botellas de cultivo 75 cm^2 (Corning)
- Membranas PVDF
- Placas fotográficas (Thermoscientific)

Equipo

- Rotor de ultracentrífuga Type 70 ITI
- Centrifuga Beckman L80
- Citómetro Attune red/blue
- Microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 12000 EII
- Microscopio invertido Olympus IX71
- Cámara digital 11 megapíxeles

Programas

- *FlowJo V10*
- *Image J* y complemento *Angiogenesis Analyzer*
- *GraphPad Prism 6*