



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**El papel de las vesículas extracelulares secretadas por células
cancerosas mamarias en los procesos mediadores de
angiogénesis**

PRESENTA:

M. en C. ALEJANDRA PAOLA GARCÍA HERNÁNDEZ

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ EDUARDO PÉREZ SALAZAR

Ciudad de México, diciembre de 2021

Agradecimiento al CONACyT

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la tutoría del Dr. José Eduardo Pérez Salazar siendo becario CONACyT durante el periodo del 01 de agosto de 2016 al 31 de julio de 2020 con número de registro 629297.

Este trabajo fue financiado con el apoyo económico de los donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), otorgados para los proyectos: a) Estudios del papel de las oxigenasas COX y LOX en los procesos de migración e invasión inducidos por el ácido graso linoleico en células cancerosas mamarias, del Subprograma de Ciencias Básicas (No. 255429). b) Estudio para el establecimiento de Bio-marcadores para tamizaje de cáncer de mama, del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (No. 261637).

Dedicatoria

El resultado de este trabajo y de todo mi esfuerzo en cada meta de mi vida es dedicado a mis padres; **María Martha Hernández Hernández** (1955-2020) por tu infinito amor y complicidad, porque mis sueños y los tuyos siempre fueron uno mismo, porque los mejores momentos de mi vida los disfruté a tu lado y los peores los abordamos juntas y porque ahora desde tu dimensión y desde la mía, seguimos unidas con una conexión infinita e inquebrantable. Te amo chinita y por ti siempre seguiré dando mi máximo porque sigues siendo tú, mi mayor inspiración. **Papi**, mi poeta favorito, gracias por siempre apoyarme en todas las decisiones que tomo, por motivarme y consentirme siempre, por haberme inculcado valores sólidos los cuales me han permitido tener un panorama más amplio en mi educación académica. Gracias porque aun cuando tu vida no ha sido fácil, siempre buscaste la forma de brindarnos lo mejor de ti, eres un ejemplo para mí, crecí admirándote y deseo seguir compartiendo más éxitos a tu lado. Te amo suriano soñador.

Este proyecto también lo dedico a mis hermanos; porque la unión en la familia es la clave de todo, porque la perspectiva de cada uno siempre suma y porque el amor que nos tenemos siempre sale a flote ante cualquier circunstancia. **Laura**, eres chispa, eres todo amor, tu sencillez y disposición de ayudar en todo momento, hace que todos nos sintamos respaldados. **Américo**, tus ocurrencias, tu forma tan divertida de ser, tu sinceridad y tus cuidados y amor hacia nosotras desde que nacimos, me obliga a siempre corresponderte con el mismo amor. **Fernando**, eres el hermano que más ha apoyado mi vida profesional, todo lo que necesité siempre lo obtuve de ti y por ti sigo esforzándome todos los días y ambos sabemos que el apoyo siempre será mutuo. **Víctor**, por el apoyo incondicional y la motivación para seguirme preparando. **Yuri**, has sido mi balance en momentos clave, siempre has apoyado y respaldado mis ideas y quizá sin darte cuenta, me has enseñado a no rendirme bajo ninguna circunstancia. **Vicky**, mi corazón es feliz porque tú acompañas y complementas mi vida. Eres la mejor fan, el mejor apoyo en mis momentos de debilidad, retos y frustraciones. Por ti, todos los días me preparo para ser mejor, eres la razón de todo mi esfuerzo y mi motivación.

Agradecimientos

Gracias **Dios** por ser mi fortaleza.

Agradezco enormemente al **Dr. Eduardo Pérez Salazar** porque la dirección y el resultado de este proyecto se ve culminado gracias a usted, gracias por compartir sus conocimientos y experiencia, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por aportar gratamente a mi formación académica.

Gracias a los doctores; **Anthony Boucard, Saúl Villa, Javier Camacho y Adolfo García Sáinz** porque ha sido un verdadero honor compartir este trayecto bajo la asesoría de ustedes, es sencillamente un sueño realizado.

Al auxiliar del laboratorio, el **Dr. Pedro Cortes Reynosa** por la asesoría, por todos los años formativos hacia mi persona y muchos momentos que atesoro.

A la técnico del laboratorio **Norita**, gracias porque su valioso trabajo nos ayudó siempre a poder avanzar en nuestros proyectos y gracias por su hermosa amistad.

A mis **amigos y compañeros del laboratorio 42**, a todos los que estuvieron y continúan en este grupo de trabajo. Gracias por haber hecho un buen ambiente laboral y, por la disponibilidad de ayudarnos mutuamente.

Amigos (as) porque el tenerlos en mi vida es una gran bendición, gracias por creer en mí, por apoyar mis decisiones, compartir sueños y permanecer siempre

Gracias a mi enorme familia; **Abuelita, tíos y primos** porque cada uno ha aportado mucho a mi vida, por sus consejos y porque han sabido justificar muchas veces mi ausencia. A mis **sobrinos** gracias por escucharme y obedecerme, yo solo quiero ser un ejemplo para ustedes y motivarlos a arriesgarse a hacer grandes cosas.

A **Miguel Ángel Borja Benítez** porque hoy por hoy eres la pareja que acompaña y alegra mi vida y con el que anhelo caminar de la mano. Gracias porque siempre me motivas a avanzar y porque sé que acompañas y compartes mis sueños y yo los tuyos. Te amo, te admiro y sé que juntos formaremos un gran equipo.

ÍNDICE

III.1.- CÁNCER	4
III.1.1.- Procesos implicados en el desarrollo tumoral	4
III.2.- CÁNCER MAMARIO	7
III.2.1.- Anatomía de la glándula mamaria	7
III.2.2.- Cáncer de mama	8
III.3.- Epidemiología.....	10
III.4.- Factores de riesgo	11
III.5.- Subtipos de cáncer de mama.....	13
III.6.- Ácido linoleico y cáncer.....	14
III.7.- Vesículas Extracelulares (VEs).....	16
III.7.1.- Tipos de VEs	16
III.7.2.- VEs y su papel en el desarrollo del cáncer	19
III.7.3.- VEs, angiogénesis y cáncer.....	20
III.8.- Vía de señalización Wnt	24
III.8.1.- Vía de señalización Wnt/ β -catenina y cáncer de mama.....	25
IV JUSTIFICACIÓN	29
V HIPÓTESIS.....	30
VI OBJETIVOS.....	31
VI.1.- Objetivo general	31
VI.2.- Objetivos específicos	31
VII MATERIALES Y MÉTODOS	32
VII.1.- Sustancias químicas y reactivos.....	32
VII.2.- Material biológico.....	32
VII.3.- Características de los pacientes.....	33
VII.4.- Cultivos celulares	33
VII.5.- Ensayos de estimulación con ácido linoleico.....	33
VII.6.- Purificación de VEs secretadas por células MDA-MB-231.....	34
VII.7.- Enriquecimiento de VEs a partir del plasma de mujeres.....	34
VII.8.- Determinación del número absoluto de VEs.....	34
VII.9.- Microscopia electrónica de transmisión.....	35

VII.10.- Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)	35
VII.11.- Estimulación de células HUVEC con VEs aisladas de células MDA-MB-231	36
VII.12.- Ensayo de migración de cierre de herida o “scratch”	36
VII.13.- Ensayo de migración e invasión en cámara de Boyden.....	37
VII.14.- Zimografía	37
VII.15.- Ensayo de Inmunodetección.....	38
VII.16.- Ensayo de angiogénesis <i>in vitro</i>	38
VII.17.- Ensayo de Angiogénesis in vivo	39
VII.18.- Ensayo de proliferación celular	40
VII.19.- Microscopía confocal de inmunofluorescencia.	40
VII.20.- Análisis de HPLC acoplado a masas	40
VII.21.- Análisis estadístico.....	41
VIII RESULTADOS	42
VIII.1.- El estímulo con AL sobre células de cáncer de mama MDA-MB-231 incrementa la secreción de VEs en medios condicionados.....	42
VIII.2.- Las VEs derivadas de las células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen migración en las células HUVEC.	44
VIII.3.- Las VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen la activación de FAK y Src en células HUVEC.....	45
VIII.4.- Las VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen migración a través de la actividad de FAK y Src en células HUVEC.....	47
VIII.5.- Papel de los receptores de ácidos grasos libres 1 y 4 (FFAR1 y FFAR4) en la secreción de VEs obtenidas de células MDA-MB-231 tratadas con AL que inducen migración en células HUVEC	49
VIII.6.- Las VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen la secreción de gelatinasas, invasión y proliferación en células HUVEC.....	51
VIII.7.- Las VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen angiogénesis... 53	
VIII.8.- AL induce cambios en la expresión VEGF asociada a VEs derivadas de células MDA-MB-231.....	55
VIII.9.- El estímulo con AL incrementa la expresión de β -catenina P-552 y 675 en células MDA-MB-231.....	56
VIII.10.- El estímulo con AL incrementa la expresión y localización subcelular de β -catenina P-552 y 675 en el citoplasma de células MDA-MB-231.....	58

VIII.11.- El estímulo con AL induce cambios en la expresión de β -catenina P-552 y 675 asociadas a VEs derivadas de células MDA-MB-231.	59
VIII.12.- VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen incremento en la expresión de Wnt3a, Wnt5a y β -catenina en células HUVEC.	61
VIII.13.- El proceso de migración de células HUVEC inducido por VEs secretadas por células MDA-MB-231 estimuladas con AL es mediado por β -catenina.	63
VIII.14.- Fracciones de VEs obtenidas del plasma de mujeres con cáncer mamario se encuentran incrementadas con respecto a las VEs obtenidas de mujeres sanas.	65
VIII.15.- Las VEs presentes en plasma de mujeres con cáncer de mama inducen migración en células HUVEC.	67
VIII.16.- Las VEs obtenidas de plasma de mujeres con cáncer mamario inducen invasión en células HUVEC.	70
VIII.17.- Las VEs obtenidas de plasma de mujeres con cáncer mamario inducen angiogénesis en células HUVEC.	72
VIII.18.- Cambios en la expresión de proteínas pro-angiogénicas asociadas a VEs derivadas del plasma de pacientes con CaMa dependiente del estadio clínico de la enfermedad.....	74
VIII.19.- Cambios en la expresión de β -catenina asociada a VEs obtenidas de plasma de mujeres con CaMa.....	76
VIII.21.- Figuras suplementarias.....	77
IX DISCUSIÓN.....	79
X CONCLUSIONES	92
XI.- REFERENCIAS.....	93

ABREVIATURAS

AL: Ácido linoleico

CaMa: Cáncer de mama

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco

EFAs: Ácidos grasos esenciales

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EGFRvIII: Variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico

FAK: Cinasa de adhesión focal

FFR1: Receptor de ácidos grasos libres 1

FFR2: Receptor de ácidos grasos libres 2

GPCR: Receptores acoplados a proteínas G

MMPs: Metaloproteinasas

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida

PBS: Solución de buffer de fosfatos

SDS: Duodecil sulfato de sodio

SFB: Suero fetal bovino

RTKs: Receptores con actividad de tirosina cinasa

uPA: Activador de plasminógeno tipo urokinasa

MVs: Microvesículas

VEs: Vesículas extracelulares

I. RESUMEN

El cáncer de mama es la principal causa de muerte de mujeres en el mundo, manteniendo tendencias ascendentes en su incidencia y mortalidad. Diversos estudios han establecido una clara asociación entre la obesidad, una dieta rica en ácidos grasos y el desarrollo de cáncer mamario. Uno de los ácidos grasos más abundantes en la dieta, es el ácido linoleico (AL), el cual además de utilizarse como fuente de energía, funciona como ligando, uniéndose a receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), activando vías de señalización intracelular favoreciendo eventos de proliferación, migración e invasión en células de cáncer mamario. Por otro lado, durante la progresión tumoral, la comunicación celular es un evento clave, siendo la comunicación mediada por pequeños fragmentos esféricos de membranas denominados vesículas extracelulares (VEs) de gran importancia. Éstas, son secretadas por células normales y malignas, su función es variable y depende del tipo de cargo que llevan, así como del tipo celular del que fueron originadas. Diversos antecedentes demuestran que las VEs median diversos procesos biológicos asociados a la progresión del cáncer, incluyendo la angiogénesis tumoral, reportándose la participación de la proteína β -catenina en dicho proceso. Sin embargo, no existen estudios que demuestren el efecto que induce el AL sobre células tumorales mamarias que favorezcan la comunicación intercelular mediada por la secreción de VEs, las cuales promuevan procesos mediadores de angiogénesis en células endoteliales a través de la activación no canónica de β -catenina.

II. ABSTRACT

Breast cancer is the leading cause of death for women worldwide maintaining upward trends in incidence and mortality. Several studies have established a clear association between obesity, a high-fat diet and the development of breast cancer. One of the most abundant fatty acids in the diet is linoleic acid (LA), which, in addition to being used as an energy source, functions as a ligand, binding to G protein coupled receptors (GPCRs), activating intracellular signaling pathways favoring proliferation, migration and invasion events in breast cancer cells. On the other hand, during cellular progression, cellular communication is a key event, being the communication mediated by small spherical fragments of membranes called extracellular vesicles (EVs) of great importance. These are secreted by normal and malignant cells, their function is variable and depends on the type of charge they carry, as well as the cell type from which they originated. Various reports demonstrate that EVs mediate various biological processes associated with cancer progression, including tumor angiogenesis, with the involvement of the Wnt/ β -catenin pathway being reported in this process. However, there are no studies that demonstrate the effect that LA induces on mammary tumor cells that favor intercellular communication mediated by the secretion of EVs, which promote angiogenesis mediating processes in endothelial cells through the non-canonical activation of β -catenin.

III. INTRODUCCIÓN

III.1.- CÁNCER

El cáncer comprende un grupo de patologías originadas por alteraciones del material genético que regulan directa o indirectamente el ciclo celular, derivando en un crecimiento anormal y descontrolado de células en el organismo, formando tejidos tumorales que interfieren con la función adecuada de los tejidos y órganos sanos. Dependiendo de la capacidad de invadir el tejido periférico, existen “tumores malignos” por ejemplo: carcinomas, en el caso de células epiteliales transformadas, así como en caso de auto-limitar su crecimiento se denominan “tumores benignos”, por ejemplo: quistes y adenomas. Las células tumorales tienen la capacidad de mantener una proliferación crónica, razón por la cual pueden formar tumores en prácticamente cualquier órgano, los cuales pueden presentar diferentes poblaciones de células transformadas con diferentes mutaciones, denominándose esta cualidad heterogeneidad clonal. Las células transformadas logran establecer relación con las células del estroma, modifican la matriz extracelular y desarrollan capacidades diferentes como la migración e invasión; con esta organización celular logran cierta adaptación, que culmina con la invasión de células tumorales a uno o a varios órganos específicos distantes del tumor primario, proceso denominado metástasis, la cual es la principal causa de muerte en los pacientes oncológicos [1, 2].

III.1.1- Procesos implicados en el desarrollo tumoral

El desarrollo del cáncer consta de múltiples pasos en los que las células tumorales adquieren nuevas capacidades, que incluyen: aumento en la proliferación celular, evasión de la supresión de crecimiento y la resistencia a la muerte celular, lo cual produce inmortalidad replicativa, además, incluye la inducción de angiogénesis y finalmente la invasión y metástasis. Sin embargo, la principal característica

adquirida es la inestabilidad del genoma y la inflamación; que genera diversidad genética (mutaciones) [1, 3].

La adquisición de los rasgos característicos de las células tumorales depende en gran parte de la alteración del genoma, que confiere una ventaja selectiva sobre otras células, permitiendo de esta manera su crecimiento y prevalencia en el entorno local [4]. Los mecanismos de mantenimiento del genoma, para detectar y resolver daños en el ADN, aseguran que la tasa de mutación espontánea sea baja; en las células tumorales dicha tasa aumenta, como resultado de defectos en: I.- La detección de daño en el ADN, II.- La reparación de ADN dañado, y III.- En la inactivación de moléculas anti-mutagénicas, antes de que hayan dañado el ADN [5, 6].

Los tejidos normales regulan cuidadosamente la producción y liberación de señales que promueven el crecimiento, lo cual garantiza la homeostasis respecto al número de células así como el mantenimiento de la arquitectura tisular normal y su función. En las células tumorales, estas señales se encuentran desreguladas, esto permite la producción de factores de crecimiento que incrementan la proliferación por el estímulo autócrino. Además, hay una mayor expresión de receptores a factores de crecimiento, lo que provoca células hiperactivas a bajas concentraciones del ligando. Así mismo, las células tumorales envían señales para estimular a células no tumorales dentro del microambiente, que sirve de soporte, al secretar factores de crecimiento que las células tumorales reciben [1, 7] Las células tumorales evaden los procesos que regulan negativamente la proliferación celular, estos programas celulares dependen de la expresión y activación de genes supresores de tumor tales como; RB1, TP53, NF1, BRCA1, BRCA2, entre otros, los cuales en condiciones normales, limitan el crecimiento y proliferación, activando la senescencia y la apoptosis. La inestabilidad del genoma induce mutaciones en dichos genes, permitiendo la proliferación no controlada de las células tumorales. El desequilibrio en la señalización proliferativa y daño al ADN, induce atenuación de la apoptosis al aumentar la expresión de reguladores antiapoptóticos, por ejemplo; Bcl-2 o mediante la regulación negativa de factores pro-apoptóticos tales como; Bax, Bim y Puma) [1, 8].

En contraste con la apoptosis, la muerte celular necrótica, libera señales pro-inflamatorias en el tejido circundante. Como consecuencia se reclutan células inflamatorias del sistema inmune, cuya función es reparar el daño tisular y eliminar los daños asociados a la necrosis. En el contexto neoplásico, las células inmunes inflamatorias promueven la progresión tumoral al fomentar la angiogénesis, la proliferación de las células tumorales y la invasividad. En consecuencia, las neoplasias incipientes y potencialmente invasivas, pueden obtener ventajas al tolerar cierto grado de muerte por necrosis, para reclutar células inmunes que promoverán el desarrollo tumoral [9-12]

Las células tumorales adquieren la capacidad de evadir la vigilancia inmunológica antitumoral, cabiendo destacar el papel dual que tiene el sistema inmune durante la fisiopatología del cáncer. La vigilancia inmune monitorea constantemente a las células y tejidos de los organismos para mantener la homeostasis y vigilar el crecimiento normal de las células. Esta vigilancia es responsable de reconocer y eliminar a las células tumorales incipientes, por lo tanto, a los tumores nacientes [13] Por lo cual, los tumores consolidados han escapado de la detección del sistema inmune, evitando su erradicación. Las células tumorales pueden evadir la respuesta antitumoral mediante la regulación de algunos componentes del sistema inmune al minimizar la infiltración de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y células NK, así como al secretar TGF- β y citocinas inmunosupresoras [13, 14]. Aunado a lo anterior, la inflamación asociada al tumor, contribuye al suministro de factores de crecimiento que mantienen la señalización proliferativa tales como: factores de supervivencia, factores proangiogénicos, citosinas, especies reactivas de oxígeno y enzimas que modifican la matriz extracelular, favoreciendo la angiogénesis, invasión y metástasis [11, 15]

Para su desarrollo, los tumores requieren intercambio metabólico para la obtención de nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de eliminar desechos y dióxido de carbono. Durante la embriogénesis, el desarrollo de la vasculatura implica la generación de nuevas células endoteliales y su ensamblaje en tubos (vasculogénesis), además de la formación de nuevos vasos a partir de los vasos pre-existentes (angiogénesis); en el adulto, la angiogénesis puede activarse, pero

solo de forma transitoria. Por el contrario, durante la progresión del tumor ocurre un “switch” angiogénico, que causa el surgimiento de nuevos vasos sanguíneos para beneficiar el crecimiento neoplásico. El proceso angiogénico proporciona nutrientes, elimina desechos del microambiente y contribuye a progresión del tumor al facilitar la invasión local y a distancia (metástasis)[16, 17].

III.2.- CÁNCER MAMARIO

III.2.1.- Anatomía de la glándula mamaria

La glándula mamaria humana es una glándula sudorípara modificada, la cual se compone de 15-20 lóbulos separados por una cantidad variable de tejido adiposo; cada lóbulo está formado por lobulillos más pequeños (alveolos) que contienen glándulas secretoras de leche. El epitelio mamario presenta dos linajes celulares: las células luminales (que se diferencian en células alveolares y ductales) y las células mioepiteliales (situadas entre las células luminales y la membrana basal). Un pequeño número de células ductales indiferenciadas representan a las células troncales mamarias que se diferencian en células luminales y mioepiteliales, las cuales proporcionan la capacidad de expansión celular asociada al embarazo y la lactancia. Estas estructuras de la glándula mamaria están embebidas en un estroma altamente vascularizado que conforma cerca del 80% del volumen del seno, compuesto principalmente por tejido adiposo, tejido conectivo, células del sistema inmune y fibroblastos (Figura 1). En condiciones normales, sólo el 20% de las células luminales se encuentran en contacto con la lámina basal y el resto está en contacto directo con las células mioepiteliales [18, 19].

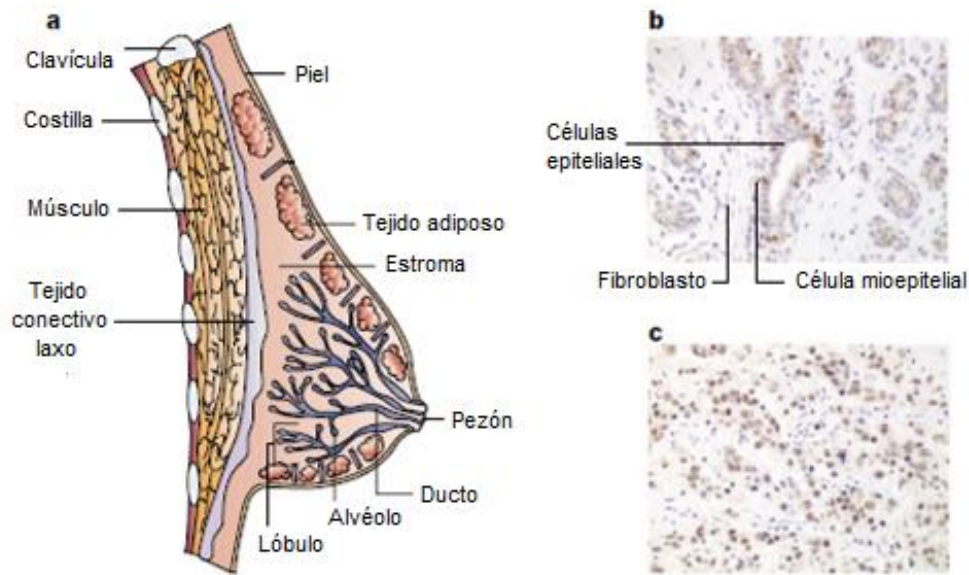


Figura 1. Estructura del tejido mamario normal y maligno. **a.** Anatomía de la glándula mamaria humana. Cada glándula contiene 15-20 lóbulos, cada lóbulo contiene una serie de ductos ramificados que terminan en el pezón. **b.** Cada ducto está recubierto por una capa de células epiteliales, responsables de la producción de leche. Estas células están rodeadas por una capa externa de células mioepiteliales con características contráctiles. Los ductos de la glándula están embebidos en el estroma el cual presenta fibroblastos. **c.** El tejido mamario se altera en el cáncer de mama, resultando en una masa de células epiteliales. **b** y **c** Inmunotinciones donde se usaron anticuerpos para el receptor de estrógeno (RE; núcleos teñidos de café), mostrando que sólo una pequeña porción de células epiteliales son RE positivo en el tejido mamario normal. Modificado de Simak Ali and R. Charles Coombes 2002 [18].

III.2.2.- Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, la cual se origina en las células epiteliales de los ductos o lóbulos de la glándula mamaria, caracterizada por la pérdida de la organización del tejido. La progresión de esta patología se lleva a cabo en diversas etapas, iniciando con la hiperproliferación descontrolada de las células epiteliales generando un carcinoma ductal “*in situ*” (DCIS), en esta etapa el tumor se encuentra confinado en los límites del ducto, posteriormente evoluciona a un carcinoma ductal invasivo (IDC), caracterizando esta etapa por la pérdida de células mioepiteliales y requiere que las células tumorales induzcan la secreción de enzimas que favorezcan la degradación de la membrana basal permitiendo la migración e invasión de estas células al tejido circundante mediado

por eventos de intravasación y extravasación de la vasculatura local, culminando en eventos metastásicos (Figura 2) [20, 21].

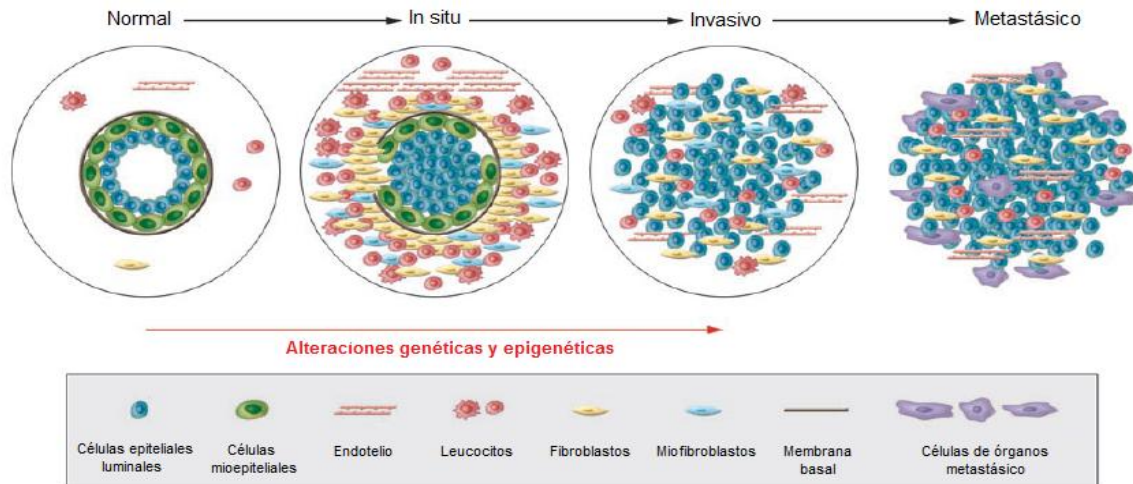


Figura 2. Modelo hipotético de la progresión tumoral mamaria. Vista esquemática de la progresión del carcinoma: normal, “*In situ*”, invasivo y metastásico. Los ductos mamarios normales están conformados por una membrana basal, una capa de células epiteliales luminales y células mioepiteliales. Las células que componen el estroma incluyen varios leucocitos, fibroblastos, miofibroblastos y células endoteliales. En los carcinomas “*In situ*” las células mioepiteliales están epigenéticamente y fenotípicamente alteradas y la cantidad de estas células es menor, principalmente debido a la degradación de la membrana basal. Al mismo tiempo, el número de fibroblastos estromales, miofibroblastos, linfocitos y células endoteliales aumenta. La pérdida de células mioepiteliales y de la membrana basal resulta en un carcinoma invasivo, en el cual las células tumorales pueden invadir tejidos circundantes y pueden migrar a órganos distantes, favoreciendo eventualmente la metástasis. Modificado de Polyak, 2007 [22]

La metástasis se define como la propagación de las células transformadas desde el tumor primario a órganos distantes. Este proceso se manifiesta generalmente como una etapa tardía de la enfermedad, siendo la causa principal de morbilidad y mortalidad por cáncer. La metástasis es un proceso complejo que involucra múltiples etapas secuenciales que incluye la invasión de células del tumor primario a través del sistema linfático y/o sanguíneo, intravasación, sobrevivencia en circulación, extravasación hacia el tejido que lo rodea, colonización en un nuevo órgano, inicio, crecimiento y neovascularización del tumor secundario. En el cáncer de mama, los órganos más afectados son hueso, hígado, cerebro y pulmón. Durante este proceso, las células transformadas se encuentran

interaccionando con diversos componentes entre los que encontramos factores de crecimiento, membranas basales, células sanguíneas en la circulación, proteínas de la matriz extracelular así como células endoteliales de la vasculatura [23-25].

III.3.- Epidemiología

De acuerdo a los datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el CaMa mantiene una alta incidencia y sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer en mujeres de entre 20 y 69 años en el mundo. Se estima que, en los próximos 10 años, habrá 321,343 nuevos casos y 87,078 muertes relacionadas con el cáncer de mama en mujeres en todo el mundo. Siguiendo las estadísticas de la OMS, en el 2018 México mantuvo una incidencia de 60.9 casos de cáncer de mama por cada 100.000 mujeres [26]. De manera alarmante, un número cada vez mayor de mujeres jóvenes son diagnosticadas con cáncer de mama y desarrollan una enfermedad más agresiva, por lo tanto, con una alta probabilidad de muerte. Aunado a esto, la mayoría de las mujeres son diagnosticadas con CaMa en estadios tardíos de la enfermedad, generando un mal pronóstico clínico [27, 28]. Debido a la heterogeneidad del cáncer y al carácter agresivo de los tratamientos radio y quimioterapéuticos, es necesario encontrar nuevos blancos moleculares con alto potencial terapéutico contra esta patología.

Particularmente en México, el cáncer de mama es un problema de salud cada vez más importante por la tendencia ascendente en su incidencia y mortalidad, determinadas por el envejecimiento de la población, el aumento en la prevalencia de los factores de riesgo y la falta de un programa nacional de detección oportuna integral, lo cual resulta evidente por el diagnóstico del cáncer de mama en etapas tardías. De acuerdo a los datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) [29], se ha situado esta patología como la primera causa de muerte por neoplasias malignas en mujeres, ubicándose por encima de las muertes ocasionadas por cáncer cervicouterino desde el año 2006, convirtiéndose en un importante problema de salud pública en

nuestro país. La mortalidad y el número de casos de CaMa nuevos que se presentan cada año, han incrementado paulatinamente, siendo impostergable el control de los factores de riesgo conocidos, así como evidente la necesidad de establecer nuevos métodos de detección que incluyan la garantía de calidad en todos los procesos desde la prevención, detección, tratamiento y seguimiento de pacientes con cáncer [30].

III.4.- Factores de riesgo

Además del sexo, existen diversos factores que contribuyen al desarrollo del cáncer de mama, incluyendo: genéticos, hormonales, reproductivos y de estilo de vida. En las mujeres, la glándula mamaria está sujeta a diversos cambios en cuanto a la forma, tamaño y función, asociados a la pubertad, el embarazo, la lactancia y la regresión post-menopáusica. Estos cambios están altamente influenciados por procesos endocrinos y reproductivos, considerados como un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer mamario [31].

La edad a la que se experimenta la primera menstruación está relacionada con la probabilidad de desarrollar cáncer mamario, puesto que mujeres que tienen su primera menstruación a una edad menor a los 11 años tienen un riesgo del 10-30% de desarrollar cáncer mamario en su vida. Además, la edad a la que se inicia la menopausia es también un factor importante, debido a que, mujeres que la experimentan después de los 55 años, tienen 50% más riesgo de desarrollar cáncer mamario [32].

El embarazo a una edad temprana, particularmente antes de los 30 años reduce la incidencia de cáncer mamario. En contraposición, mujeres que nunca experimentaron un embarazo o cuyo primer hijo nace después de los 30 años, presentan mayor riesgo de desarrollar cáncer mamario [33]. Por otro lado, en estudios epidemiológicos de los últimos 10 años se ha encontrado de forma consistente que, niveles elevados de estrógenos y andrógenos están relacionados con un aumento en el riesgo de padecer esta neoplasia, principalmente en mujeres post-menopáusicas [34, 35]. Esta condición ha sido corroborada

recientemente en mujeres pre-menopáusicas [36], por lo que la exposición a los estrógenos podría aumentar el riesgo de padecer cáncer de mama, puesto que los estrógenos al unirse a sus receptores y estimular la transcripción de genes involucrados en proliferación celular, incrementan la probabilidad de mutaciones [37].

Otro factor de riesgo que predisponen al desarrollo de cáncer mamario es la carga genética; principalmente mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* y *Her-2*. Mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* son responsables de aproximadamente el 5% de los cánceres mamaros. Sin embargo, representan un fenotipo más agresivo. Mientras que, la sobreexpresión de *Her-2* debido a una amplificación del gen, está presente en aproximadamente el 20% de los tumores mamaros primarios y se relaciona con un mal pronóstico; como ya se indicó, otros factores son ambientales y de estilo de vida [38].

La diferencia geográfica con respecto a sus índices de incidencia en cáncer mamario se atribuye a la presencia de factores relacionados con el estilo de vida presentes en estas zonas que aumentan el riesgo de desarrollar la enfermedad. Entre los principales factores implicados en el riesgo de padecer cáncer mamario son la obesidad y la dieta rica en ácidos grasos [39-41]. Estudios en modelos animales así como en mujeres pre y postmenopáusicas han revelado que una reducción en el consumo de grasas puede disminuir la incidencia de tumores [42]. Por otro lado, en mujeres postmenopáusicas, la obesidad ha sido asociada con un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer mamario [43]. Esto puede ocurrir porque los reservorios de grasa pueden ser un origen importante de precursores hormonales como estrógenos, además de niveles elevados de ácidos grasos circulantes en plasma [42]. Estudios epidemiológicos indican que mujeres con dietas ricas en ácidos grasos presentan un mayor riesgo de padecer cáncer mamario, el cual puede ser hasta cinco veces mayor con respecto a mujeres con consumos bajos en grasas [44, 45].

III.5.- Subtipos de cáncer de mama

Existen diversas clasificaciones en CaMa, una de ellas considera el origen celular que da inicio a la enfermedad, mientras que la otra, está dada por la expresión de patrones moleculares que presenta, lo que nos ayuda a entender la patología. Además, estas clasificaciones son necesarias para la elección del mejor tratamiento. De acuerdo al origen celular, se identifican en:

- Carcinoma ductal, el cual comienza en un conducto lácteo de la glándula. El carcinoma ductal *in situ* (DCIS), limita su crecimiento al conducto sin invadir más allá de la lámina basal y el carcinoma ductal invasivo (IDC) penetra a través de la pared del conducto, crece en el tejido adiposo y puede propagarse; es el tipo más común de CaMa [46].
- Carcinoma lobular, este comienza en las glándulas productoras de leche (lobulillos). El carcinoma lobular *in situ*, es una lesión poco frecuente, no hay evidencia de que progrese a una forma invasiva; por otra parte el carcinoma lobular invasivo (ILC) puede propagarse a otros tejidos [46].

De acuerdo a la expresión genética, existe la clasificación del CaMa basada en características moleculares, dividiéndose en los siguientes subtipos:

- Luminal A y luminal B: Los tipos luminales son positivos para receptores hormonales (estrógeno y progesterona). El cáncer de tipo luminal A es negativo para la sobreexpresión de HER2 (receptor del factor de crecimiento epidermal 2), es de bajo grado, suele crecer con lentitud y tiene buen pronóstico, El cáncer de tipo luminal B, es positivo para la sobreexpresión de HER2, generalmente crece con mayor rapidez que los luminal A y el pronóstico es menos favorable.
- Tipo HER2: Este tipo de cáncer tiene copias adicionales del gen HER2 y en algunas ocasiones de otros genes relacionados con HER2 (como GRB7 y PGAP3). El tumor crece rápidamente y tiene mal pronóstico, aunque el tratamiento con anticuerpos dirigidos a HER2 es altamente exitoso. Sin

embargo, el porcentaje de recaída es mayor en este subtipo de cáncer que en los de tipo luminal A [46, 47].

- Tipo basal: Es un cáncer triple negativo (negativo para receptor de estrógeno, progesterona y sobreexpresión de HER2). Es el menos frecuente, sin embargo, es el más común con mutaciones en mujeres en el gen BRCA1 y en mujeres jóvenes de raza negra. Es un cáncer de alto riesgo crece rápidamente, tiene mal pronóstico y poca efectividad de los tratamientos [46, 47]

Estas clasificaciones han permitido una administración de tratamientos más adecuada y personalizada para cada paciente. Sin embargo, se necesitan más investigaciones sobre los mecanismos que involucran el desarrollo de esta patología [46, 47]

III.6.- Ácido linoleico y cáncer.

Los ácidos grasos son los componentes estructurales básicos de los triglicéridos celulares, moléculas donde los extremos carboxílico (-COOH) de tres ácidos grasos se esterifican con cada uno de los grupos hidroxilo (-OH) del glicerol (glicerina, propanotriol); siendo los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo [48]. Además, se encuentran también en los fosfolípidos y los ésteres de colesterol. Entre éstos, destacan los ácidos grasos esenciales (EFAs), los cuales, no pueden ser producidos de forma endógena, por lo cual deben ser obtenidos de la dieta y son necesarios para la vida [49, 50]. Los ácidos grasos, desempeñan funciones de suma importancia en los seres vivos, regulando diversos procesos biológicos como el metabolismo, el crecimiento y la diferenciación celular [51-53]. Existen dos tipos principales de EFAs, los de la serie ω -6 y los de la serie ω -3; entre éstos, el ácido graso ω -6 más importante debido a su alto consumo, es el ácido linoleico (AL), un ácido graso poli-insaturado de dieciocho carbonos con dos insaturaciones en los carbonos nueve y doce. Se encuentra en grandes cantidades en el aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de soya y aceite de

cártamo [48]. El AL, así como otros ácidos grasos, regula procesos biológicos como el metabolismo, el crecimiento y la diferenciación celular. Por otro lado, es capaz de inducir respuestas inflamatorias anormales contribuyendo a diversas enfermedades crónicas. Así mismo, estudios epidemiológicos y en modelos animales han relacionado la ingesta de AL con tumorigénesis primaria donde incrementa la proliferación de células tumorales mamarias en cultivo [54].

Los ácidos grasos ejercen sus funciones directamente a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Se ha descrito un grupo de receptores de ácidos grasos acoplados a proteínas G que se encargan de regular diversos procesos biológicos, estos son FFAR1 (receptor de ácidos grasos libres 1, anteriormente denominado como GPR40), FFAR2 (anteriormente denominado GPR43), FFAR3 (anteriormente GPR41) y FFAR4 (anteriormente GPR120) [55]. FFAR2 y FFAR3 son activados por ácidos grasos de cadena corta; mientras que FFAR1 y FFAR4 son activados por ácidos grasos de cadena mediana y larga [56]. Estos receptores se encuentran acoplados a proteínas Gi/G0 y Gq/G11 [57], por lo que su activación con sus respectivos ligandos resulta en la activación de diversas vías de señalización con múltiples efectos biológicos [54, 58]. Además, se ha reportado que FFAR1 y FFAR4 están expresados en líneas celulares de cáncer de mama y su presencia en estas células está asociada con la activación de vías de señalización que dan como resultado la promoción de migración y metástasis [59, 60]. El microambiente tumoral es una estructura dinámica, que se rige principalmente por las señales que envían las células tumorales al resto de células que conforman dicho microambiente, esta comunicación (célula-célula) propicia el progreso de la enfermedad. Sin embargo, recientemente, se ha documentado un nuevo mecanismo de comunicación celular de larga distancia que media a la progresión tumoral, a través de la comunicación mediada por vesículas extracelulares (VEs), las cuales remodelan el nicho y dirigen la metástasis [61-63].

III.7.- Vesículas Extracelulares (VEs).

III.7.1.- Tipos de VEs

La comunicación celular es necesaria para regular procesos celulares como la sobrevivencia y el mantenimiento de la homeostasis. Se ha descrito que estos eventos pueden estar siendo regulados mediante la interacción célula-célula o a través de la secreción de moléculas solubles. Sin embargo, recientemente, diversos estudios han demostrado un nuevo mecanismo de comunicación intercelular mediado por fragmentos esféricos de membrana denominadas VEs, las cuales son secretadas por diferentes tipos de células y son capaces de comunicar a distancias cortas y largas [62-66]. Las VEs están involucradas en procesos de comunicación celular así como en otros procesos fisiológicos como coagulación, inflamación, respuesta inmune, mantenimiento de troncalidad, además de procesos patológicos, entre ellos el cáncer [67]. Las VEs contienen en su membrana fosfolípidos, proteínas transmembranales y componentes proteicos de las balsas lipídicas; mientras que en el interior de las VEs se encuentran diversas proteínas intracelulares, segundos mensajeros y material genético que puede ser empaquetado y distribuido dentro de las VEs. Como consecuencia de esto, las propiedades y el papel biológico de las VEs pueden diferir dependiendo de la célula parental [68].

Las VEs son aisladas en el sobrenadante de células de cultivos celulares y de fluidos biológicos, incluyendo plasma, orina, leche materna, sangre, saliva, semen, bilis, fluido amniótico, fluido cerebroespinal y fluidos ascíticos [62], teniendo como cargo una gran variedad de moléculas de señalización que pueden ser transferidas hacia una amplia gama de células blanco, alterando su comportamiento [62]. La secreción de VEs puede ser de manera constitutiva o bien a través de la activación celular mediada por agonistas solubles, por estrés químico o físico como son el estrés oxidativo y la hipoxia [69]. Se han propuesto varios mecanismos de comunicación intercelular mediada por VEs, los cuales describen que las VEs pueden interaccionar directamente con células blanco, resultando en su captura y endocitosis, posteriormente sus componentes pueden

ser reciclados a la superficie celular; o bien a través de la interacción de moléculas de señalización que funcionan como ligando para diversos receptores de superficie, que una vez que interaccionan pueden inducir la activación de cascadas de señalización que promueven una respuesta en las células blanco. Además, las VEs pueden fusionarse con la membrana plasmática de las células blanco liberando su contenido hacia el espacio intracelular. Por otra parte, también se ha descrito que las VEs secretadas pueden fragmentarse en el espacio extracelular liberando su contenido y alterando la MEC [63]. De acuerdo a su biogénesis y tamaño las VEs se han clasificado en cuerpos apoptóticos, exosomas y microvesículas las cuales exhiben funciones biológicas pleiotrópicas [62, 70].

Los exosomas son vesículas membranosas de origen endocítico que son liberados por una gran variedad de tipos celulares al espacio extracelular, con un tamaño promedio de 40 a 100 nm. La biogénesis de los exosomas incluye un proceso común en las células que involucra la vía endocítica, un mecanismo altamente dinámico [62, 71]. Los endosomas tempranos maduran a endosomas tardíos, durante este proceso acumulan vesículas intraluminales (ILV). En la formación de los cuerpos multivesiculares (MVB) se engloban proteínas, ácidos nucleicos y lípidos del citoplasma; existe evidencia de que la composición de los exosomas influye en la ruta de tránsito. Aquellos ricos en colesterol se dirigen hacia la membrana plasmática (cuerpos multivesiculares exocíticos), donde se fusionan y liberan su contenido (las vesículas intraluminales) al espacio extracelular, denominándose exosomas (figura 3). A diferencia de los carentes en colesterol, en donde los cuerpos multivesiculares pueden dirigirse a los lisosomas (cuerpos multivesiculares degradativos) [67]. Se ha reportado que los complejos de direccionamiento endosomal requeridos para el transporte (ESCRTs) (complejos multiprotéicos) están involucrados en los mecanismos que gobiernan la biogénesis/degradación de los cuerpos multivesiculares de manera dependiente de la ubiquitinación [72]. Este complejo se compone de aproximadamente 30 proteínas que se ensamblan en 4 complejos (ESCRT 0, I, II y III) con proteínas asociadas (por ejemplo VTA1 y ALIX); estos procesos requieren del citoesqueleto (actina y microtúbulos), proteínas motoras (dineína, kinesina y miosinas) y

maquinaria de fusión (SNAREs y factores de anclaje), aunque la maquinaria implicada en la liberación de los MVB aún está en una etapa temprana de comprensión [73]. La participación de proteínas Rab GTPasas en la secreción de exosomas es importante debido a que se ha reportado que Rab 11 (ubiquitin ligasa) se requiere para su secreción; así como Rab27 y Rab35 están involucradas en el transporte y liberación de exosomas [64]. Por otra parte, el aumento en la secreción de exosomas por células tumorales es inducido por la sobreexpresión de Rab3D [74]. Así mismo, el microambiente ácido de los tumores estimulan la liberación de exosomas y mejora su capacidad de fusión con la célula blanco; la captación se logra a través de endocitosis, mediante la interacción ligando-receptor o por fusión directa [62, 75-77]

Las microvesículas son más grandes que los exosomas con un tamaño de 100 a 1000 nm y la formación de éstas inicia con la gemación de pequeñas protrusiones citoplasmáticas seguido por su desprendimiento de la superficie celular. Este proceso es dependiente del influjo de calcio, de la proteína calpaína y de la reorganización del citoesqueleto [78]. Los niveles intracelulares de iones calcio modifican la asimetría de los fosfolípidos de la membrana plasmática por inducir la activación de enzimas específicas como flipasa, flopasa y escramblasa. El incremento en iones calcio inhibe la translocasa e induce la activación de escramblasa que transloca fosfatidilserina de la monocapa interna a la monocapa externa de la membrana plasmática, favoreciendo que las microvesículas expongan en la superficie, fosfatidilserina y son enriquecidos en proteínas asociadas a balsas lipídicas. Además, la vía intracelular que activa la reorganización del citoesqueleto induce la liberación de microvesículas. Esto lo hace a través de los iones calcio mediante la activación de calpaína que degrada a talina y activina. Así mismo, la gelsolina degrada a proteínas de unión a los extremos de los filamentos de actina, favoreciendo así, la reorganización del citoesqueleto. De la misma manera, dependiendo de la célula origen y del mecanismo de formación, las microvesículas varían de acuerdo a su composición molecular y tamaño [62].

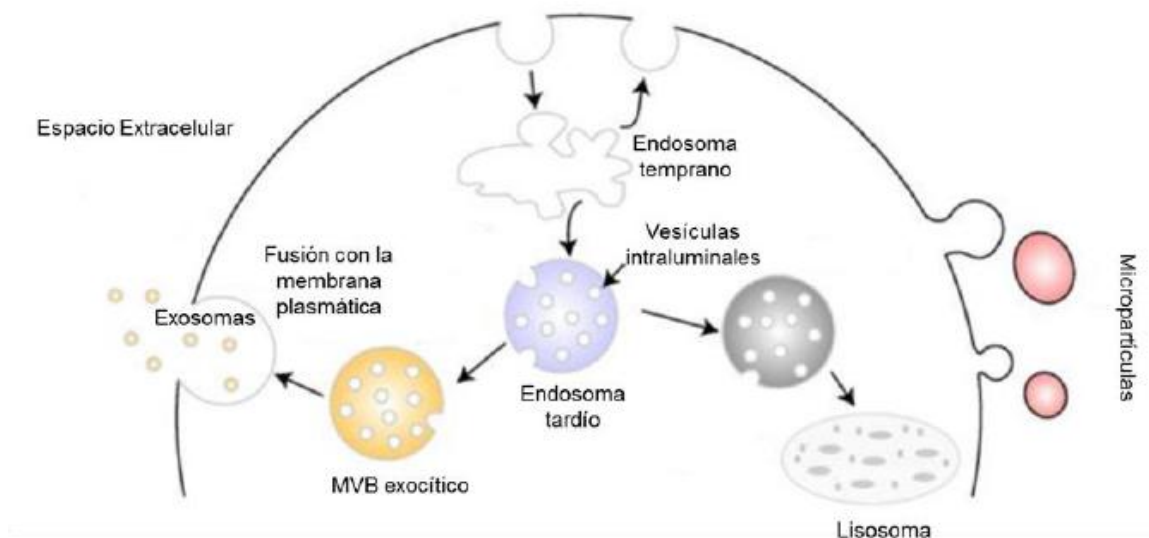


Figura 3. Formación y liberación de exosomas y microvesículas. En los endosomas tempranos, las proteínas pueden ser recicladas a la membrana plasmática o secuestradas en vesículas intraluminales dentro de los cuerpos multivesiculares (MVB). Los MVB pueden seguir una ruta degradativa hacia lisosomas o una ruta exocítica liberando exosomas hacia el espacio extracelular. Las microvesículas son liberadas por un proceso de gemación o de formación de brotes desde la membrana plasmática. Tomada y modificada de Mathivanan, S., 2010 [67].

III.7.2.- VEs y su papel en el desarrollo del cáncer

Las VEs no son liberadas exclusivamente por las células cancerosas, también las células del estroma las pueden liberar contribuyendo a la progresión y metástasis de las células tumorales [79]. Así mismo, las células cancerosas son capaces de influir en el comportamiento de las células estromales que rodean al tumor primario, promoviendo alteraciones en la composición de la matriz extracelular (MEC) e induciendo invasión celular, evasión del sistema inmunológico, sobrevivencia celular, vascularización y metástasis [80, 81].

Durante el proceso invasivo, las células cancerosas continuamente alteran sus moléculas de adhesión en la superficie celular induciendo cambios en las interacciones célula-célula y célula-MEC adaptando el microambiente tumoral durante la invasión y la metástasis. Las moléculas de adhesión son reguladas a nivel de transcripción, traducción, distribución, endocitosis y degradación. Sin embargo, algunas de estas moléculas pueden ser liberadas al espacio extracelular

a través de VEs, regulando de esta manera la adhesión celular, migración e invasión de las células tumorales [82].

La degradación de la MEC es esencial para promover el crecimiento tumoral y la metástasis. Las VEs tumorales pueden contener proteasas que pueden ser liberadas para degradar la MEC y promover la invasión. Algunas MMPs, tales como MMP2, MMP9, MT1-MMP así como sus zimógenos, el activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) y el factor estimulador de colagenasa derivado de células tumorales humanas (EMMPRIN) han sido descritas en VEs tumorales, sugiriendo su participación en la progresión del cáncer [83-85].

La evasión del sistema inmunológico es un mecanismo de escape muy conveniente para las células tumorales, manteniendo estrategias reguladas por la comunicación mediada por VEs. Trabajos recientes demuestran que las células cancerosas secretan VEs que contienen al inhibidor de complemento CD46, el cual promueve la inactivación de las proteínas del complemento C4b y C3b minimizando la inflamación del microambiente y por tanto, evadiendo la respuesta inmune anti-tumoral. Por otra parte, VEs derivadas de diversas células cancerosas exponen el ligando de Fas (CD95L), el cual induce la apoptosis de células T y disminuye la función de la respuesta inmune adaptativa [86-88].

La aplicación de tratamientos oncológicos tiene como objetivo reducir el tamaño de tumor y/o detener la progresión tumoral. Sin embargo, las células tumorales se seleccionan por mecanismos de resistencia al tratamiento. Estudios han demostrado que la sobrevivencia de células tumorales se lleva a cabo mediante la expulsión de drogas a través de las VEs. Específicamente los estudios documentados fueron realizados en células cancerosas resistentes a doxorubicina y al cisplatino, donde encontraron que las células liberan grandes cantidades de estas sustancias asociadas a VEs, por lo que la liberación de VEs contribuye a la supervivencia celular [89, 90].

III.7.3.- VEs, angiogénesis y cáncer.

El sistema vascular es importante para el transporte de gases, líquidos, nutrientes, moléculas de señalización, desechos y células inmunes que circulan por los

tejidos y órganos, siendo fundamental para la comunicación intercelular que garantiza el mantenimiento saludable de un organismo y la sobrevivencia de las células que lo constituyen [91-93]. Está formado por células endoteliales que recubren el interior de la superficie vascular, manteniendo la homeostasis del organismo sano. [91, 92].

Durante el desarrollo embrionario, los vasos sanguíneos son formados *de novo* a partir de precursores de células endoteliales (angioblastos) que se ensamblan dando lugar a un plexo capilar primario, este proceso es conocido como vasculogénesis [92]. Posterior a esta formación primaria, la red vascular se extiende por un proceso de surgimiento, ramificación y remodelado de arterias y venas, formando una red vascular más elaborada y madura, proceso conocido como angiogénesis. La estabilización de la red vascular se produce por reclutamiento de pericitos y células musculares lisas que envuelven los nuevos vasos, proporcionándoles estabilidad y regulando la perfusión [92, 94, 95].

La angiogénesis es por lo tanto una morfogénesis vascular que involucra la ramificación de células endoteliales formando una nueva red vascular. La angiogénesis es un evento estrechamente regulado que incluye la participación de integrinas, quimiocinas, angiopoyetinas y agentes de detección de oxígeno [96]. Una vez que las señales pro-angiogénicas como el FGF, VEGF y EGF activan los receptores de células endoteliales, éstas liberan proteasas para degradar la membrana basal, luego proliferan y migran formando nuevas ramificaciones a una velocidad de varios milímetros por día [97]. Las células endoteliales depositan una nueva membrana basal y secretan factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que atrae a las células de soporte como pericitos, garantizando la estabilidad del nuevo vaso sanguíneo [98]. Este es un proceso complejo que involucra la acción concentrada de muchos factores más, como las angiopoyetinas y las efrinas, que actúan sobre receptores específicos para regular la estabilidad de los vasos [99].

En condiciones fisiológicas, tales como el desarrollo embrionario, el crecimiento normal de tejidos, el ciclo menstrual de la mujer y eventos de reparación de heridas, la angiogénesis ocurre de manera gradual involucrando la

desestabilización de vasos, la migración de células endoteliales, proliferación, el brote, la estabilización y organización de los nuevos vasos. Sin embargo, la angiogénesis tumoral difiere en que los vasos están altamente desordenados, no obstante el desarrollo de estos es crítico para el crecimiento tumoral, proporcionando nutrientes esenciales; oxígeno y factores de crecimiento, además de proporcionar un conducto para eliminar los desechos [100, 101]

Una diversidad de mecanismos moleculares y vías de señalización han sido involucradas directa o indirectamente en la inducción de angiogénesis en estadios tempranos y tardíos del desarrollo tumoral. Diversos tipos celulares del entorno del tumor contribuyen a la producción de factores proangiogénicos (activadores), difundiéndose en el microambiente tumoral y logrando la activación de las células endoteliales de la vasculatura próxima al tumor. Entre ellos, las propias células tumorales, las células del estroma y las células del sistema inmune. [102, 103]. Diferentes grupos de investigación han identificado una extensa variedad de cargos proangiogénicos en VEs tumorales favoreciendo el crecimiento, sobrevivencia y metástasis de las células tumorales, entre los cuales se encuentra: el ligando de Noct1 (Delta-like4), tetraspaninas CD9, TSPAN8, locus-1 de desarrollo endotelial (DEL-1), lactaderina (MFGE8), interleucinas como IL-6 e IL-8, angiogenina, VEGF, FGF, inhibidores de MMPs como TIMP1 y TIMP2, miR-210, TGF- β , miembros de la familia Wnt entre otros [79, 104-106].

Inicialmente se demostró que los lípidos presentes en las microvesículas afectan la migración de células endoteliales y potencian la angiogénesis. Como mecanismo propusieron y demostraron que la esfingomiélin, un componente principal identificado en microvesículas secretadas por la línea celular de fibrosarcoma HT1080, junto con VEGF, confieren propiedades inductoras de angiogénesis en las células endoteliales [107]. Años más tarde se reportó que los exosomas de pacientes con glioblastoma, estimulan la angiogénesis debido a que modifican el perfil de traducción de las células endoteliales de cerebro humano (HBMVEC) al transferir exosomas que contienen moléculas proangiogénicas como FGF, IL-6, IL-8, TIMP-1, VEGF y TIMP-2 [108].

Además, se ha destacado la importancia de la hipoxia sobre el efecto angiogénico. En glioblastoma, la hipoxia potenció el efecto proangiogénico de los exosomas y modificó su contenido. Curiosamente, los exosomas secretados en condiciones hipóxicas potenciaron la angiogénesis al incrementar la longitud de vasos formados en comparación con exosomas normóxicos, además de potenciar la proliferación de células endoteliales. [109].

Feng y colaboradores demostraron la asociación de una nueva forma de VEGF_{90KD} a las MVs secretadas por células tumorales mamarias, las cuales favorecen la actividad angiogénica a través de la activación del receptor a factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) en células HUVEC, además del crecimiento tumoral en modelos *in vivo* [110]. Así mismo, se ha demostrado que las VEs tumorales pueden transferir la forma truncada y constitutivamente activa de EGFR variante III (EGFRvIII) a células endoteliales circundantes que no lo expresan, regulando así la expresión del VEGFR y su ligando VEGF para inducir angiogénesis [111]. Adicional a la evidencia anteriormente demostrada, se ha reportado que las VEs contienen ARNm que codifican para factores de crecimiento tales como VEGF y HGF, los cuales son transferidos a monocitos y de esa manera inducen la síntesis de estos factores de crecimiento y por consecuencia la angiogénesis [112-115].

Con respecto al enfoque clínico, Estudios han reportado que las células tumorales pueden liberar grandes cantidades de VEs, por lo que el número de VEs circulantes en sangre se encuentra incrementado en pacientes con cáncer en comparación con individuos sanos y esto se correlaciona con un mal pronóstico [62, 65, 116, 117] Además, el número, origen celular y composición depende del estadio de la enfermedad [63]. En cáncer de ovario se ha concluido que, la etapa clínica en la que se encuentre el paciente es fundamental para la inducción de angiogénesis, demostrándose que el contenido de los exosomas derivados del cáncer de ovario de alto riesgo (displasia moderada a severa) tiene un profundo impacto en la angiogénesis, comparado con el cáncer de ovario de bajo grado (displasia leve). Señalando que ATF2 y MTA1 desempeñan un papel clave en dicho proceso [118]. Concretamente, las VEs tumorales pueden participar en la

regulación de varios procesos celulares asociados al cáncer como: la sobrevivencia, resistencia a agentes quimioterapéuticos antitumorales, evasión de la respuesta inmune, remodelación de la MEC, migración, invasión, angiogénesis y metástasis [90, 119]. Sin embargo, no han sido extensamente esclarecidos los mecanismos moleculares que conducen a la angiogénesis tumoral a través de VEs derivadas de tumor mamario y el papel tan importante de los ácidos grasos ω -6 durante la progresión tumoral.

III.8.- Vía de señalización Wnt

La vía de Wnt juega un papel decisivo en los procesos de regulación, diferenciación, proliferación y muerte celular; como consecuencia, está involucrada en numerosas anomalías del desarrollo embrionario, del crecimiento y la homeostasis. Las proteínas Wnt comprenden una gran familia de lipoglicoproteínas de secreción transductores de señales, que se unen a GPCRs denominados Frizzled (Fzd) y a proteínas relacionadas con receptores de lipoproteínas de baja densidad (LRP) tipo 5 o 6 [120]. En la actualidad, existen reportados 19 ligandos homólogos Wnt, agrupados en función de su homología de aminoácidos más que por su funcionalidad. Todos estos ligandos presentan una secuencia señal de secreción y un patrón conservado de 22 a 23 cisteínas, además de diversos sitios de glicosilación y, ordinariamente, un sitio de lipidación (palmitoilación). La complejidad de esta vía radica en que cada ligando tiene la capacidad de unirse a diferentes receptores. Actualmente se han descrito 10 receptores Fzd [120].

La vía de señalización Wnt es un mecanismo fundamental que regula la proliferación y la polaridad, así como también determina el destino de las células durante el desarrollo embrionario y la homeostasis de los tejidos [121]. La señalización intracelular activada por Wnt ocurre de dos maneras: la forma canónica (Wnt/ β -catenina) la cual involucra a la β -catenina como intermediario principal y es altamente conservada en la evolución, y la forma no canónica que a su vez se ha dividido en dos vías que no involucran a β -catenina [122]: Wnt/PCP

(Polaridad Celular Plana) que modula elementos del citoesqueleto [123] y, Wnt/Ca²⁺ que conduce a la liberación de calcio intracelular afectando la actividad de las cinasas moduladas por calcio [124].

III.8.1.- Vía de señalización Wnt/ β -catenina y cáncer de mama

La reducción en la expresión de E-cadherina en células epiteliales produce la liberación de la proteína β -catenina, un componente de las uniones adherentes y un efector clave de la vía de señalización Wnt. β -catenina es una proteína multifuncional que pertenece a la familia de proteínas *Armadillo*, el gen que codifica para β -catenina en el humano, *CTNNB1*, se encuentra localizado en la región cromosómica 3p22p21.3 y la proteína tiene un peso molecular de 92 kDa. La unión de β -catenina a las cadherinas es esencial para la adhesión intercelular, ya que esta proteína protege al dominio citoplasmático de las cadherinas de una degradación rápida, aumenta la eficiencia del transporte del retículo a la superficie celular y recluta a α -catenina a los sitios de contacto célula- célula para permitir la interacción con el citoesqueleto de actina. Mientras que la proteína β -catenina que se encuentra libre en el citoplasma, es fosforilada por un complejo multiprotéico formado por la caseína cinasa 1 (CK1), la glucógeno sintasa cinasa 3 β (GSK3 β), la proteína de Poliposis Adenomatosa de Colon (APC) y la axina. Este complejo induce la fosforilación secuencial de β -catenina, primer por CK1 α en la Ser-45 y luego por GSK3 β las Ser-33, Ser-37 y Thr-41, lo que permite su reconocimiento por la ubiquitin-ligasa β -TrCP, un componente del complejo de ubiquitinación E3, ser poliubiquitinada y posteriormente degradada en el proteosoma 26S [125, 126]. La vía de señalización Wnt es activada por la unión de éstas al receptor Fzd y su correceptor LRP. Esos receptores potencian la actividad de la señalización liberando una proteína conocida como Disheveled (Dsh). Tanto los receptores Fzd y RLP como Dsh pueden antagonizar al complejo de axina en múltiples niveles. Dsh puede inhibir la actividad de GSK3 β resultando en una disminución de la fosforilación de axina y su unión a β -catenina, mientras que RLP activa, puede unirse a axina, lo que destruye el complejo de andamiaje necesario para que β -catenina sea marcada para su degradación [127]. La inhibición de la degradación

de β -catenina resulta en su acumulación citoplasmática y su translocación al núcleo en donde interacciona con factores de transcripción de la familia del factor potenciador del linfocito (LEF)/ factor de la célula T (TCF). Una vez que β -catenina se une a TCF/LEF, las regiones amino y carboxilo terminal de β -catenina reclutan complejos remodeladores de la cromatina que promueven la actividad transcripcional, activando la expresión de ciclina D1, c-Myc, MMP-2 y 9, Twist, proteínas involucradas en proliferación, migración, invasión y morfogénesis de las células [128-132].

Debido a la importancia de las diversas funciones biológicas de la vía de señalización Wnt, es fácil imaginar que defectos en la regulación de esta, conduzcan al desarrollo de enfermedades humanas, incluyendo algunos tipos de cáncer, como el cáncer de colon y el de mama.

En diversas líneas celulares cancerosas se ha observado que la maquinaria de degradación de β -catenina se encuentra disfuncional debido a mutaciones en algunos de sus miembros, lo que también permite la acumulación nuclear de esta proteína [132]. Particularmente, en tumores mamarios, alrededor del 60% presentan elevada actividad transcripcional de β -catenina, observándose en ciertas líneas celulares de cáncer mamario un alto rango de proliferación, migración y expresión de proteasas degradadoras de matriz extracelular. Es por esto que, la presencia de β -catenina nuclear es considerada un factor de mal pronóstico en este tipo de tumor [133]. En cáncer de mama triple negativo la vía de señalización Wnt/ β -catenina se encuentra muy activa [134], reportándose la sobreexpresión del receptor de Wnt, FZD7 [135]. El silenciamiento de FZD7 en los modelos celulares de cáncer de mama triple negativo, reduce la expresión de los genes blanco de la vía Wnt, inhibe la tumorigenicidad *in vitro* y retarda la capacidad de las células MDA-MB-231 para formar tumores en los ratones [136]. Estos datos sugieren que los ligandos Wnt participan en la promoción del desarrollo del cáncer de mama triple negativo.

Numerosos estudios han reportado que la desregulación de la vía Wnt/ β -catenina contribuye en la expresión de VEGF y a la angiogénesis tumoral. Así mismo, esta vía de señalización influye en la permeabilidad vascular en células HUVEC [137,

138]. Además, mutaciones en el dominio N-terminal de β -catenina, conducen a la estabilidad de la proteína, incrementando los niveles proteicos de la misma e induciendo su translocación al núcleo. Sin embargo, mutaciones de proteínas de la vía de Wnt que alteran la estabilidad de β -catenina no es el único factor que contribuye a la activación de esta proteína, debido a que también se puede activar por vías independientes a través de factores de crecimiento incluyendo EGF, FGF, HGF, IGF-I, IGF II e insulina. Por ejemplo, EGF o HGF inducen la activación de β -catenina para estimular la motilidad celular. El estímulo con EGF, permite que la proteína β -catenina escape de la degradación en el citoplasma y se transloca al núcleo para transactivar la expresión de genes implicados en migración e invasión tumoral [139, 140]. Así mismo, se han descrito nuevos sitios de fosforilación de β -catenina en su extremo carboxilo terminal en Ser-552 y Ser-675. En células de músculo liso vascular (VSMC), el ATP induce la fosforilación endógena de β -catenina en ambos residuos de serina mediada por PKA promoviendo la interacción con TCF-4, lo que resulta en un incremento en la actividad transcripcional [141]. Aunado a este antecedente se demostró que AKT que es activada río debajo de la señalización de EGFR, induce la fosforilación de β -catenina en Ser-552 *in vitro* e *in vivo* causando la disociación de contactos célula-célula y su posterior acumulación en el citoplasma y núcleo, incrementando la actividad transcripcional y promoviendo la invasión de células tumorales, indicando que la regulación de β -catenina dependiente de AKT juega un papel crítico en el desarrollo tumoral [140].

Respecto a la participación de esta vía de señalización y su asociación con VEs; recientemente el grupo del Dr. Zhe Huang demostró la participación de esta vía en angiogénesis tumoral a partir de exosomas obtenidos de células de cáncer colorrectal en condiciones hipóxicas, los cuales una vez colocados en contacto con células HUVEC, incrementan los niveles proteicos de Wnt4 y β -catenina además de favorecer eventos de migración, proliferación y angiogénesis [142]. Sin embargo, hasta el momento se desconoce el mecanismo de la regulación de β -catenina independiente de Wnt en la comunicación intercelular mediada por la secreción de vesículas extracelulares que pudieran estar favoreciendo la

angiogénesis tumoral mediante el estímulo con AL sobre líneas celulares tumorales mamarias.

IV JUSTIFICACIÓN

El cáncer mamario es el tumor maligno más frecuente y la principal causa de muerte en mujeres de todo el mundo, la incidencia y mortalidad causada por esta neoplasia cada vez va en aumento estimándose un millón de casos nuevos cada año, razón por la cual es considerada un importante problema de salud pública en países desarrollados y en vías de desarrollo. Diversos estudios indican que una dieta rica en ácidos grasos incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Particularmente, el AL es un ácido graso poliinsaturado esencial y uno de los más abundantes en la dieta y su ingesta se ha relacionado con la progresión tumoral, promoviendo procesos como proliferación, migración e invasión. Por otro lado, la angiogénesis es un proceso esencial durante el crecimiento tumoral y la metástasis. Durante este proceso participan de manera conjunta diversos mecanismos moleculares de comunicación celular. En las últimas décadas, se ha descrito la comunicación celular mediada por VEs como un mecanismo importante en la progresión del cáncer. Estas VEs pueden ser liberadas por las células tumorales encontrándose en la sangre de las mujeres con cáncer de mama, transfiriendo diversas moléculas de señalización que favorecen el crecimiento tumoral, migración e invasión. Diversos estudios han reportado que la desregulación de la vía Wnt/ β -catenina contribuye en la progresión tumoral, particularmente, se han descrito fosforilaciones no canónicas en residuos de Ser 552 y Ser 675 de β -catenina que favorecen la desregulación tumoral. Por lo cual, es de gran importancia estudiar si el AL es capaz de promover la secreción de VEs que contengan cargos proangiogénicos en células de cáncer mamario MDA-MB-231 y en modelos *in vivo*, que involucren la participación de la vía Wnt- β -catenina en los mecanismos celulares y moleculares que regulan la angiogénesis tumoral. Por ello, es de particular interés analizar las moléculas bioactivas presentes en VEs participantes en la progresión tumoral, puesto que su análisis posibilitaría el desarrollo de técnicas diagnósticas complementarias que permitan la detección temprana de cáncer mamario.

V HIPÓTESIS

Las VEs secretadas por células tumorales mamarias estimuladas con AL y de plasma de mujeres con cáncer de mama, al interactuar y/o fusionarse con células endoteliales promueven procesos celulares relacionados con la angiogénesis.

VI OBJETIVOS

VI.1.- Objetivo general

Evaluar el efecto del AL en la secreción de VEs provenientes de células tumorales mamarias y de plasma de pacientes con cáncer de mama sobre procesos angiogénicos en células endoteliales.

VI.2.- Objetivos específicos

- Demostrar si las VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL ejercen efectos pro-angiogénicos (proliferación, migración, invasión y angiogénesis).
- Determinar si el AL induce la fosforilación de β -catenina (Ser-552 y Ser-675) dentro de VEs y favorece cambios en su localización sobre células MDA-MB-231.
- Determinar si la migración en células endoteliales inducida por VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL es dependiente de la señalización mediada por GPR40, GPR120 y β -Catenina.
- Estudiar el efecto que inducen las VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL respecto a los niveles proteicos de Wnt5a, Wnt3a p-Src (Tyr-418) y p-FAK (Tyr-397) en células HUVEC.
- Determinar si VEs de pacientes con CaMa inducen efectos pro-angiogénicos y si tienen diferencias proteicas de β -catenina fosforilada y otros cargos con respecto a VEs de mujeres sin cáncer mamario.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1.- Sustancias químicas y reactivos.

El estímulo celular se prepara a partir de la solución stock de ácido linoleico (Sigma Aldrich, Cat. L8134), en alícuotas a una concentración de 90 mM utilizando como diluyente metanol, las alícuotas son almacenadas a -20 °C. El anticuerpo anti-CD9 (Ab) fue de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). El factor de crecimiento anti-fibroblastos (FGF) Ab fue de Cell Signaling Technology (Camarillo, CA). AH7614 fue de TOCRIS (Minneapolis, MN). Ab anti-flotillina-2 y BD Matrigel fue de BD Biosciences (Bedford, MA). Ab anti-factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Ab anti-factor de crecimiento epidérmico (EGF), Abs fosfoespecífico contra tirosina (Tyr) -397 de FAK (anti-p-FAK) y contra Tyr-418 de Src, Ab fosfoespecífico contra Ser 552 (Bioassay Technology Laboratory) y 675 (Invitrogen) de β -catenina, Ab anti-Wnt3a y Wnt5a (abcam), proteína recombinante de VEGF humano (VEGFrh), la proteína recombinante EGF humana (EGFrh) y la proteína recombinante FGF humana (FGFrh) fueron de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Inc). Anti-actin Ab fue proporcionado por el Dr. Manuel Hernandez (CINVESTAV-IPN). Para ensayos de migración se utilizó mitomicina C previamente diluida en medio de cultivo y almacenada a 4 °C. (Sigma Aldrich, Cat. 50-07-7).

VII.2.- Material biológico

Material biológico	Características
Células MDA-MB-231	Línea celular humana invasiva de cáncer mamario.
Células HUVEC	Línea celular transformada derivada del endotelio de la vena umbilical humana.

Plasma sanguíneo	Plasma obtenido de mujeres mexicanas con cáncer mamario sin tratamiento médico previo y de mujeres sanas (grupo control)
------------------	--

VII.3.- Características de los pacientes.

Se obtuvieron muestras de sangre total de 37 mujeres con cáncer de mama (promedio de edad 52.08 años, con rango de edad 23-72 años) en diferentes estadios clínicos de la enfermedad sin tratamiento médico previo. El grupo control estuvo integrado de 31 mujeres sanas (edad promedio 48.6 años, intervalo de edad entre 26 a 77 años). Todas las participantes firmaron la carta de consentimiento informado y el comité de ética del ISSSTE Hospital Regional 1° de Octubre y el Instituto Nacional de Cancerología aprobaron el protocolo de estudio en dichas instituciones.

VII.4.- Cultivos celulares

Las células triple negativo de cáncer de mama MDA-MB-231 y células de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC) fueron mantenidas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 3.7 g/L de bicarbonato de sodio, 10% de suero fetal bovino (SFB), Anfotericina B y antibióticos en una atmósfera que contenía 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa a 37 °C. Las células MDA-MB- se colocaron en supresión con medio DMEM sin suero durante 24 h y las células HUVEC se colocaron en supresión durante 18 horas previo al tratamiento con AL o VEs, respectivamente

VII.5.- Ensayos de estimulación con ácido linoleico

Una vez que los cultivos celulares de la línea MDA-MB-231 alcanzaron el 100% de confluencia, se colocaron en supresión con medio DMEM sin suero durante 24

horas. Posterior a este tiempo, los cultivos fueron lavados dos veces con PBS 1X estéril (K₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 10 mM, NaCl 150 mM pH 7.4, a pH 7.2). A continuación, se les adicionó medio fresco DMEM con AL a una concentración de 90 µM durante 48 horas. Concluida la estimulación, el sobrenadante se retiró al tiempo indicado y se continuó con la purificación de VEs (Fig. 1S).

VII.6.- Purificación de VEs secretadas por células MDA-MB-231

El medio condicionado fue centrifugado dos veces a 600xg durante 10 minutos a 4°C para remover restos celulares. Enseguida se centrifugó a 2,000xg dos veces durante 15 minutos, una vez a 10,000xg durante 30 minutos y por ultimo a 100,000xg durante 60 minutos, con lo cual se obtuvo la pastilla enriquecida en VEs. A continuación, el sobrenadante fue desechado, la pastilla resuspendida en PBS 1X, RIPA o en medio DMEM adicionado con antibióticos, para cuantificar VEs, obtención de proteínas en VEs y para colocar las VEs en contacto con células HUVEC, respectivamente.

VII.7.- Enriquecimiento de VEs a partir del plasma de mujeres

Para el caso de las VEs en plasma de mujeres con o sin cáncer de mama, la sangre periférica obtenida por punción venosa fue procesada inmediatamente por 15 min a 1,500xg, el plasma recolectado y centrifugado por 30 min a 3000xg. A continuación, el plasma fue centrifugado a 15,000xg por 30 min. El sobrenadante obtenido fue posteriormente centrifugado a 100,000xg por 2 h para obtener la fracción de VEs. La pastilla resultante fue resuspendida en PBS 1X para cuantificar VEs, resuspendida con RIPA para obtención de proteínas en VEs o alternativamente resuspendida en medio DMEM adicionado con antibióticos para colocar las VEs en células HUVEC.

VII.8.- Determinación del número absoluto de VEs

La determinación del número absoluto de VEs fue realizada mediante citometría de flujo, utilizando tubos BD TruCOUNT (BD Biosciences) como se describe

previamente [116]. Brevemente, una vez obtenidas las fracciones de VEs, estas fueron colocadas a volúmenes constantes en los tubos TruCOUNT, los cuales presentan un número determinado de perlas fluorescentes, para posteriormente ser analizados mediante citometría de flujo. El número absoluto de VEs fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula: Número absoluto de VEs = (número de eventos en la región de VEs/número de eventos en la región de perlas) X (número de perlas por ensayo/volumen final del ensayo).

VII.9.- Microscopia electrónica de transmisión

Las VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL fueron obtenidas por centrifugación diferencial y resuspendidas en PBS 1X estéril. Posteriormente, fueron colocadas y absorbidas (10 µl) durante 3-5 minutos en rejillas de cobre cubiertas con una capa de Formvar al 0.3% y estabilizadas con carbono. A continuación, las rejillas fueron expuestas durante 30 segundos sobre una gota de acetato de uranilo al 2%, el exceso de fluido fue removido utilizando papel filtro, y las rejillas se dejaron secar al aire libre. Finalmente, las rejillas fueron analizadas utilizando un microscopio electrónico de transmisión modelo JEM 1400, acoplado a una cámara digital.

VII.10.- Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)

Se empleó NTA para determinar la distribución de tamaño de las fracciones de VEs. Las fracciones de VEs se diluyeron en 10 ml de PBS filtrado y se analizaron con el NanoSight NS300 (Malvern instruments Ltd.), con un láser de 488 nm y una cámara sCMOS. Se obtuvieron tres videos de cada muestra con una duración de 60 segundos, y los datos se analizaron con el software NTA 3.0 (Malvern Instruments Ltd.).

VII.11.- Estimulación de células HUVEC con VEs aisladas de células MDA-MB-231

Cultivos confluentes de células HUVEC fueron ayunados con medio DMEM sin suero durante 18 horas. Una vez concluido este procedimiento, los cultivos se lavaron dos veces con PBS 1X estéril (K₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 10 mM, NaCl 150 mM pH 7.4, a pH 7.2). Consecutivamente, se les adicionó medio fresco DMEM sin suero el cual contenía VEs secretadas por células MDA-MB-231 estimuladas con AL, o alternativamente con fracciones de VEs obtenidas de mujeres con/sin cáncer mamario. Después del estímulo, el medio de cultivo fue aspirado y las células fueron lisadas en 500 µl de RIPA (HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM, glicerol 10%, Triton X-100 1%, desoxicolato de sodio 1%, MgCl₂ 1.5 mM, SDS 0.1% y PMSF 1 mM) para obtener extractos de proteínas totales. Los lisados fueron centrifugados a 12,000 rpm por 12 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante, el cual se almacenó a -20°C para ensayos posteriores.

VII.12.- Ensayo de migración de cierre de herida o “scratch”

Una vez que los cultivos celulares de células HUVEC alcanzaron el 100% de confluencia, estas fueron sometidas a supresión con DMEM sin suero durante 18 horas y 2 horas previas al término de la supresión fueron tratadas con mitomicina C. En seguida, se realizó la rayadura o “herida” utilizando la punta estéril de una pipeta de 200 µL, posteriormente se lavaron los cultivos dos veces con PBS 1X para remover las células suspendidas. A continuación, las células HUVEC fueron estimuladas durante 48 horas con las VEs derivadas de la línea celular MDA-MB-231 estimuladas con ácido linoleico obtenidas a los tiempos especificados, o alternativamente con fracciones de VEs obtenidas de plasma de mujeres sanas o VEs aisladas de plasma mujeres con cáncer mamario. Posterior a las 48 horas de estímulo, las células fueron fijadas y teñidas con azul de comassie. La migración celular dentro de la herida fue fotografiada usando un microscopio invertido acoplado a cámara.

VII.13.- Ensayo de migración e invasión en cámara de Boyden

Los ensayos de migración e invasión se realizaron en cámaras de Boyden con filtros que presentan poros de 8 μm de diámetro. Para ensayos de invasión se colocaron 30 μL de Matrigel BD en los insertos de la parte superior de la cámara, para migración este paso no se realiza. Las células HUVEC se sometieron a supresión de suero durante 18 horas. Posteriormente, las células fueron desprendidas con tripsina 0.25% y verseno 0.02%, y se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer para posteriormente colocar 100,000 células en la parte superior de la cámara de Boyden en medio DMEM sin suero. En la parte inferior de la cámara se colocó un volumen final 500 μl de medio DMEM con las diferentes condiciones de estimulación (VEs derivadas de plasma de mujeres con o sin cáncer de mama o de la línea MDA-MB-231 estimuladas con AL). Las células fueron incubadas durante 48 horas a 37°C, tras lo cual se aspiró el medio de los dos compartimientos; las células se fijaron con metanol frío durante 5 minutos para posteriormente remover de la parte superior de la cámara a las células que no migraron utilizando un hisopo de algodón. Una vez realizado este procedimiento, las células presentes en la parte inferior fueron teñidas con cristal violeta 0.1% durante 10 minutos. Las membranas se lavaron 4 veces con agua bidestilada, posteriormente fueron desteñidas con 200 μl de ácido acético al 10% y la solución resultante se analizó empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Los resultados se graficaron como promedio de las absorbancias.

VII.14.- Zimografía

Cultivos confluentes de células HUVEC fueron tratados con VEs derivadas de plasma de mujeres con o sin cáncer de mama o de la línea MDA-MB-231 estimuladas con AL (etanol y PDB fueron utilizados como controles positivos de secreción de MMPs). Los medios condicionados fueron colectados y concentrados usando filtros centricon (Millipore) a 2,500 rpm durante 2 hrs. Volúmenes iguales de medio condicionado concentrado fueron mezclados con

buffer de muestra (SDS 2.5%, sacarosa 1% y rojo de fenol 4 µg/ml) sin agentes reductores y cargados en geles de acrilamida al 8% copolimerizados con gelatina a 1 mg/ml. Los geles fueron lavados dos veces en Triton X-100 al 2.5% e incubados en buffer de activación (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7.4) a 37 °C durante 48 hrs. Posteriormente, los geles fueron fijados y teñidos con Azul de Coomassie Brillante G-250 en ácido acético al 10% y metanol al 30%. La actividad proteolítica fue detectada como bandas claras contra el fondo teñido de sustrato no digerido.

VII.15.- Ensayo de Inmunodetección

Los lisados celulares fueron cuantificados con el método de micro-bradford. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE al 10% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con leche al 3% durante 1 hora, para después colocar el anticuerpo correspondiente (dilución 1:1000) e incubarlo durante toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS-Tween al 0.05% y posteriormente se incubaron con anticuerpo secundario especie-específico peroxidado (dilución 1:5000) durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados durante 5 minutos con PBS-Tween al 0.05% y revelando mediante quimioluminiscencia (ECL). Las autorradiografías fueron escaneadas y las bandas cuantificadas usando el programa ImageJ.

VII.16.- Ensayo de angiogénesis *in vitro*

Cultivos confluentes de células HUVEC EA fueron ayunados de SFB durante 24 h previo al ensayo. En condiciones de esterilidad y en hielo se colocó una caja de cultivo con 24 pozos y fueron agregados 200 µl de matrigel/pozo (BD No. Cat. 354234) a una concentración de 8 mg/ml. Posteriormente, la placa fue incubada a 37°C durante 1h para solidificar la base de matrigel. Enseguida, las células HUVEC fueron levantadas con tripsina, cuantificadas para tener una densidad final de 30,000 células/pozo y colocadas sobre la base de matrigel. Después, 50 µl de

la suspensión de VEs derivadas de células MDA-MB-231 o del plasma de pacientes con o sin CaMa (aprox. 40,000 VEs/condición) fueron agregadas y medio de cultivo DMEM sin SFB fue adicionado para tener un volumen final de 200 µl/pozo. Como estímulo positivo, se colocaron 50 µl de SFB o VEGF a una concentración de 50 ng/ml. A continuación, la caja fue incubada a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% de oxígeno durante 8 h. Posteriormente, las células fueron teñidas y fijadas con cristal violeta 0.5% en una solución de 50% etanol/PBS conteniendo 1.25% de paraformaldehído. Finalmente, las fotografías fueron tomadas con un microscopio invertido acoplado a una cámara con el objetivo 40X. El índice angiogénico de cada campo fue calculado mediante el uso de la siguiente fórmula [143].

$$\text{Angiogenic score} = \left[\frac{(\text{No. of sprouting cells})1 + (\text{No. of connected cells})2 + (\text{Number of polygons})3}{\text{Total number of cells}} \right] + [0, 1 \text{ or } 2]$$

VII.17.- Ensayo de Angiogénesis in vivo

Se incubaron embriones de pollo fertilizados libres de patógenos humanos (ALPES, México) a 37 °C bajo humedad constante. Al séptimo día de incubación, se creó un pequeño orificio en el extremo romo de los huevos donde está presente el saco de aire. Utilizando un método de succión, se eliminó el aire del saco para evadir la unión del embrión a la corteza superior. Se creó una ventana en la cáscara de huevo para exponer la membrana corioalantoidea (CAM) y, antes del estímulo, se colocaron discos pequeños que contenían hidrocortisona en una región relativamente avascular pero que contenía vasos sanguíneos preexistentes. A continuación, se colocaron fracciones de VEs en los discos de papel (35.000 VEs/condición experimental), se selló la ventana y se incubaron los huevos durante 3 días a 37 °C. Al final de la incubación, los huevos se colocaron en hielo durante 30 minutos, se retiraron los discos de papel y se cortó la CAM alrededor del perímetro de los discos. La angiogénesis se cuantificó en el área de CAM cubierta con discos de papel.

VII.18.- Ensayo de proliferación celular

Se sembraron células HUVEC (5.000 células / pocillo) en placas de 96 pocillos en medio DMEM suplementado con SFB al 1%, después de 6 horas se agregaron fracciones de VEs a las células HUVEC (10,000 VEs / condición experimental) y se incubaron a 37 °C durante 24, 48 y 72 h. A continuación, se añadió MTT (0,5 mg / ml) 4 h antes de completar todo el tiempo de incubación y se añadieron 100 µl de SDS al 10% por pocillo. La absorbancia de cada pocillo se midió a 540 nm.

VII.19.- Microscopía confocal de inmunofluorescencia.

Células MDA-MB-231 ($1,5 \times 10^5$ células) se cultivaron sobre cubreobjetos, se lavaron con PBS, se colocó medio DMEM y se trataron con fracciones de VEs (20.000 VEs / condición) durante 30 min a 37°C. Las células fueron fijadas con paraformaldehído (4%) durante 20 min a temperatura ambiente, permeabilizado con 0.5% de Triton X-100 y luego bloqueado por 30 min a temperatura ambiente con SFB (10%) disuelto en PBS. A continuación, las células se incubaron durante la noche a 4 °C con anti-p-β-catenina S552 y 675 (1: 250), posteriormente se coloca el Ab secundario anti-ratón marcado con FITC (cat. no. 115-095-003; Jackson ImmunoResearch, Inc) durante 2 h a 4°C. La tinción de células para la actina fibrilar se realizó mediante incubación durante 2 horas a 4°C con faloidina conjugada con TRITC (cat. No. R415; Thermo Fisher Scientific, Inc.) Las células luego se analizaron por microscopía confocal (Modelo TCS SP2; Leica Microsystems, Inc.).

VII.20.- Análisis de HPLC acoplado a masas

Para la determinación de proteínas se realizó un análisis de HPLC acoplado a masas, para abordar esta técnica, se procesó un grupo de muestras de suero de pacientes con cáncer de mama y una de controles sanos para el aislamiento de vesículas extracelulares. Se lisaron muestras de vesículas extracelulares para el

aislamiento de proteínas totales y se determinó la concentración de proteína de cada muestra con el ensayo de proteína de Bradford (BioRad). Se mezcló una cantidad de 50 µg de proteína con 4 volúmenes de acetona fría y se mantuvo durante la noche a -80°C. Después de la centrifugación (14000 g, 10 min, 4 ° C), las proteínas sedimentadas se lavaron con acetona fría, se secaron a temperatura ambiente y se disolvieron en 20 µL de NH₄HCO₃ 50 mM (Sigma-Aldrich) suplementado con 0.1% Protease Max Surfactant (Promega) y ditiotreitól 10 mM (Sigma-Aldrich). Después de la reducción a 40 ° C durante 30 min, las proteínas se alquilaron con yodoacetamida 20 mM (Sigma-Aldrich), Tris-HCl 30 mM pH 8,6 (Promega) durante 30 min a temperatura ambiente, en la oscuridad. La digestión se realizó con 2 µg de tripsina de calidad para espectrometría de masas (Promega) a 37°C durante la noche y luego se dejó de añadir ácido trifluoroacético para alcanzar el 0,5%. Los péptidos se desalaron con cartuchos Sep-Pak tC18 (Waters), se secaron en un concentrador SpeedVac (Thermo Scientific) y se mantuvieron a -80 ° C. Las muestras se reconstituyeron en 50 µl de ácido fórmico al 0,1%, se centrifugaron a 20.000 g a 4°C durante 5 min y se inyectaron en una columna C18 Nano HPLC para la separación de péptidos [144]

VII.21.- Análisis estadístico

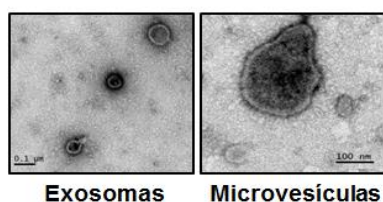
Los resultados son expresados como promedio ± D.E. de al menos tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados estadísticamente usando la prueba ANOVA de una vía y comprada mediante la prueba múltiple Newman-Keuls. La probabilidad estadística $P < 0.05$ se consideró significativa

VIII RESULTADOS

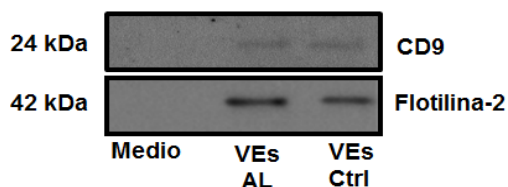
VIII.1.- El estímulo con AL sobre células de cáncer de mama MDA-MB-231 incrementa la secreción de VEs en medios condicionados.

Las fracciones de VEs obtenidas de medios condicionados de células MDA-MB-231 estimuladas y no estimuladas con 90 μ M AL durante 48 h fueron caracterizadas por microscopía electrónica de transmisión, Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) y Western blot con anti-CD9 Ab y anti-Flotilina-2 Ab, debido a que estas proteínas están asociadas con los diferentes tipos de VEs [145, 146]. Las fracciones de VEs mostraron una población heterogénea de vesículas esféricas que expresan las proteínas CD9 y flotilina-2 (Fig. 1A y B). A continuación, analizamos si la estimulación de células MDA-MB-231 con 90 μ M de AL durante 48 h potencia la secreción de VEs. La determinación del número de VEs en medios condicionados de células MDA-MB-231 no estimuladas y estimuladas con AL mostró que el tratamiento con AL aumenta el número de VEs secretadas (Fig. 1C).

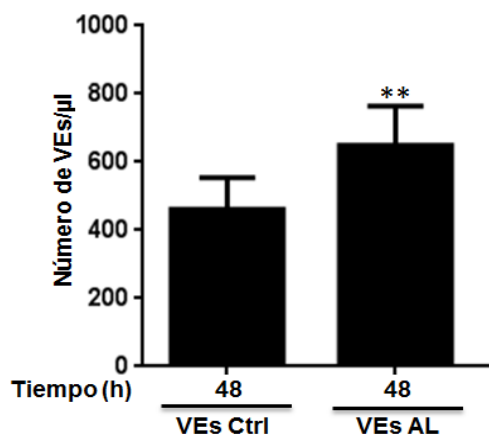
A) MDA-MB-231



B) MDA-MB-231

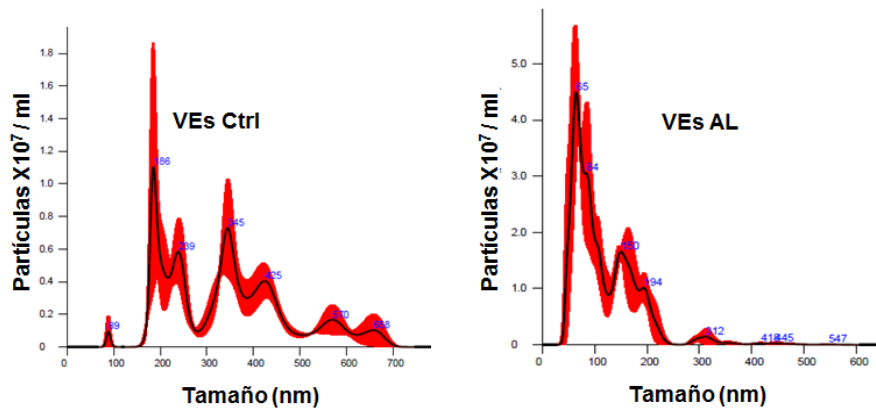


C) MDA-MB-231



En seguida, aplicamos un NTA, el cual mostró que las células MDA-MB-231 liberan VEs con tamaños entre 80-700 nm, mientras que las células MDA-MB-231 estimuladas con AL liberan VEs con tamaños entre 30-350 nm. Además, el estímulo con AL induce un incremento en el número de VEs respecto al número de VEs obtenidas de células MDA-MB-231 sin estímulo (Fig. 1D). Esto demostrado también en las gráficas representativas de la Fig. 1E, observando incrementos significativos en la media y moda relativa por tamaño de VEs obtenidas de células MDA-MB-231 comparado con VEs control.

D) MDA-MB-231



E) MDA-MB-231

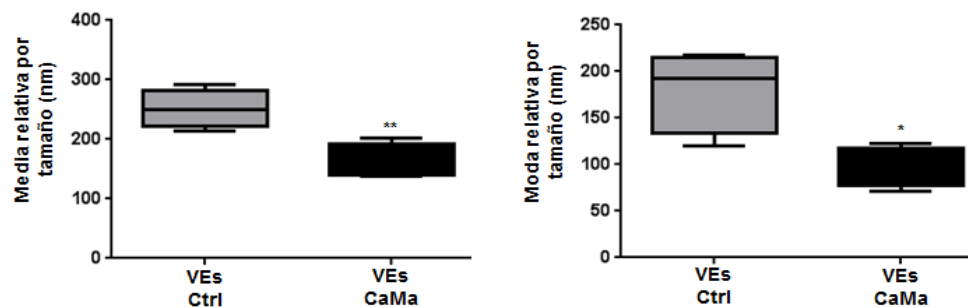
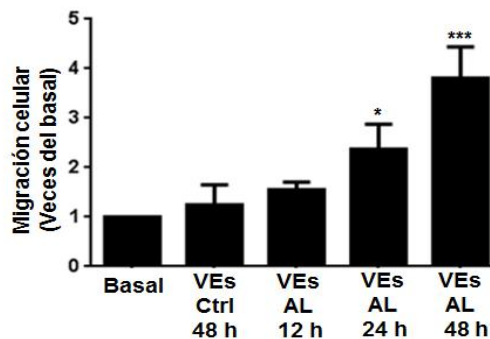
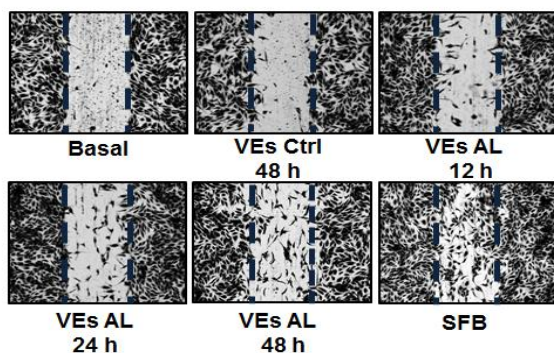


Fig.1 El estímulo con AL sobre células de cáncer de mama MDA-MB-231 incrementa la secreción de VEs en medios acondicionados. (A y B) VEs secretadas por células MDA-MB-231 no estimuladas (VEs Ctrl) y de células MDA.MB-231 estimuladas con AL (VEs AL) se analizaron mediante TEM e Inmunodetección con anti-CD9 y anti-flotilina-2. (C, D y E) Inmunofluorescencia y NTA para determinar el número y tamaño, respectivamente, de VEs Ctrl y VEs AL. Los gráficos representan la media \pm DE derivada del análisis de al menos tres experimentos independientes y expresa el número de VEs/ μ l. Los asteriscos denotan significancia estadística. ** P <0,001.

VIII.2.- Las VEs derivadas de las células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen migración en las células HUVEC.

Las fracciones de VEs se obtuvieron a partir de medios condicionados de células MDA-MB-231 no estimuladas y estimuladas con 90 μ M de AL durante 12, 24 y 48 h. A continuación, se realizó una herida sobre la monocapa de células HUVEC y se trataron durante 48 h con fracciones de VEs de células MDA-MB-231 no estimuladas y estimuladas con AL (Fig. 2S, suplementaria) Los hallazgos mostraron que solo las VEs de las células MDA-MB-231 estimuladas con AL durante 24 y 48 h indujeron migración en células HUVEC (Fig. 2A). Para corroborar aún más nuestros hallazgos, se realizaron ensayos de migración utilizando el método por cámara de Boyden con células HUVEC tratadas con fracciones de VEs de células MDA-MB-231 estimuladas o no, con 90 μ M de AL durante 12, 24 y 48 h. De acuerdo con nuestro resultado anterior, solo las VEs de las células MDA-MB-231 estimuladas con AL durante 24 y 48 h inducen la migración en las células HUVEC (Fig. 2B). Por otro lado, nos cuestionamos si la migración observada en células HUVEC se presenta únicamente en VEs obtenidas de células triple negativo (MDA-MB-231) estimuladas con AL o efectos similares podrían observarse con otras células de CaMa con características diferentes. En ese sentido, obtuvimos VEs provenientes de células de cáncer de mama MCF-7 estimuladas con 90 μ M de AL durante 48 h. Nuestros hallazgos demuestran que las VEs obtenidas bajo estas condiciones inducen la migración en las células HUVEC (Fig. 3S, suplementaria).

A) HUVEC



B) HUVEC

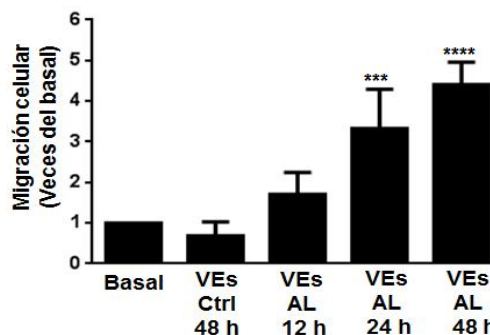
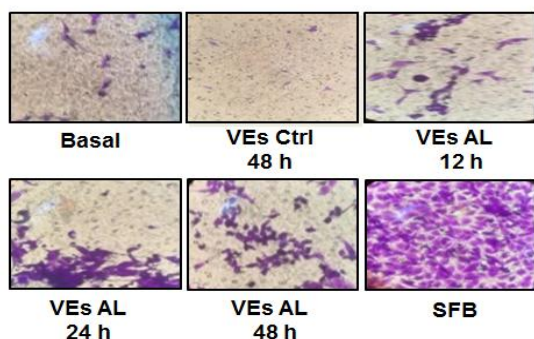
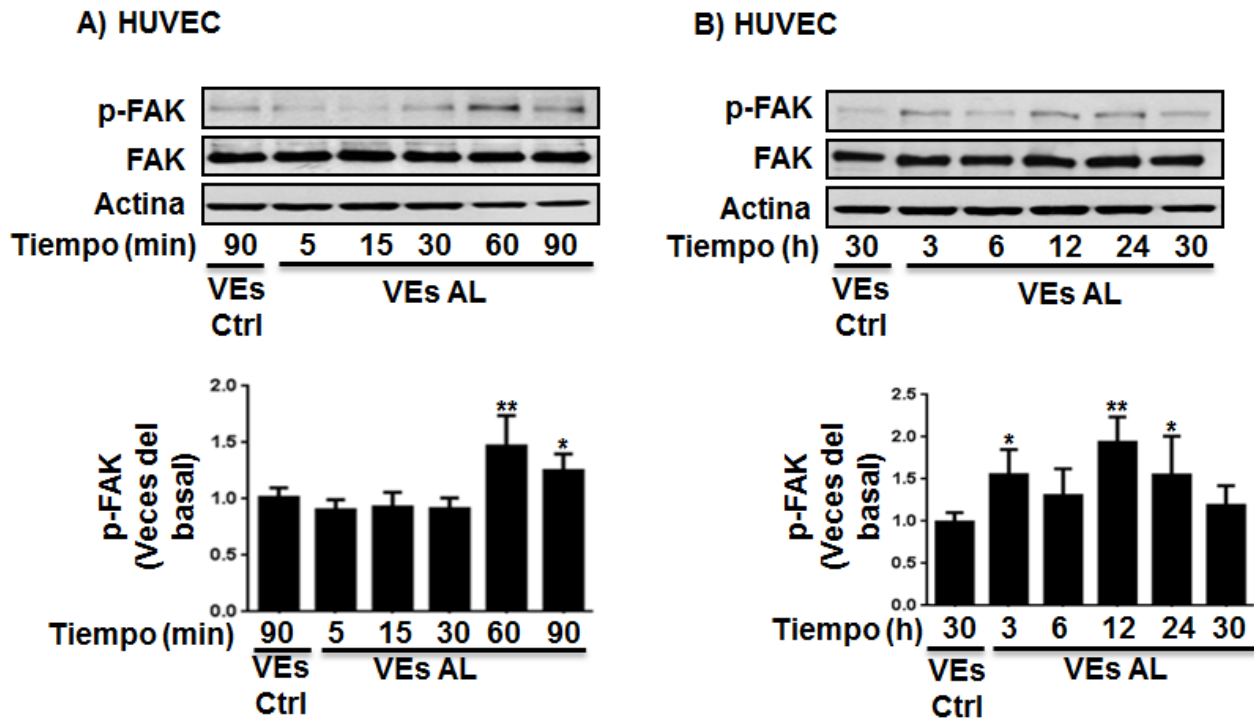


Fig.2 Las VEs secretadas por células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen la migración de células HUVEC. (A) Células HUVEC fueron cultivadas en cajas de 35 mm y pretratadas con 12 μ M de mitomicina C por 2 horas. Posteriormente, se realizó una rayadura sobre la monocapa celular y se trataron durante 12, 24 y / o 48 h con VEs Ctrl y VEs AL. (B) Ensayos de migración utilizando el método de cámara de Boyden con células HUVEC tratadas durante 12, 24 y / o 48 h con VEs Ctrl y VEs AL. Se incluyó un control de células HUVEC sin tratamiento con VE (Basal). Los gráficos representan la media \pm DE y expresan las veces de incremento en la migración con respecto de VEs Ctrl. Los asteriscos denotan significancia estadística. * $P < 0,05$, *** $P < 0,0001$.

VIII.3.- Las VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen la activación de FAK y Src en células HUVEC

Las células HUVEC se trataron durante varios tiempos con VEs de células MDA-MB-23 previamente estimuladas o no con 90 μ M de AL durante 48 h y posteriormente se lisaron. Los lisados celulares se analizaron mediante inmunodetección con anti-p-FAK y anti-p-Src. Los hallazgos mostraron que el

tratamiento sobre células HUVEC con VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL, inducen la fosforilación de FAK en Tyr-397 (p-FAK) en períodos cortos (60 y 90 min) y largos (3, 12 y 24 h) de estimulación (Fig. 3A y B). Además, el tratamiento de células HUVEC con VEs obtenidas de células MDA-MB-231 tratadas con AL, indujo fosforilación de Src en Tyr-418 (p-Src) en periodos cortos (15 y 30 min) y largos (3 h) de estimulación (Fig. 3C y D).



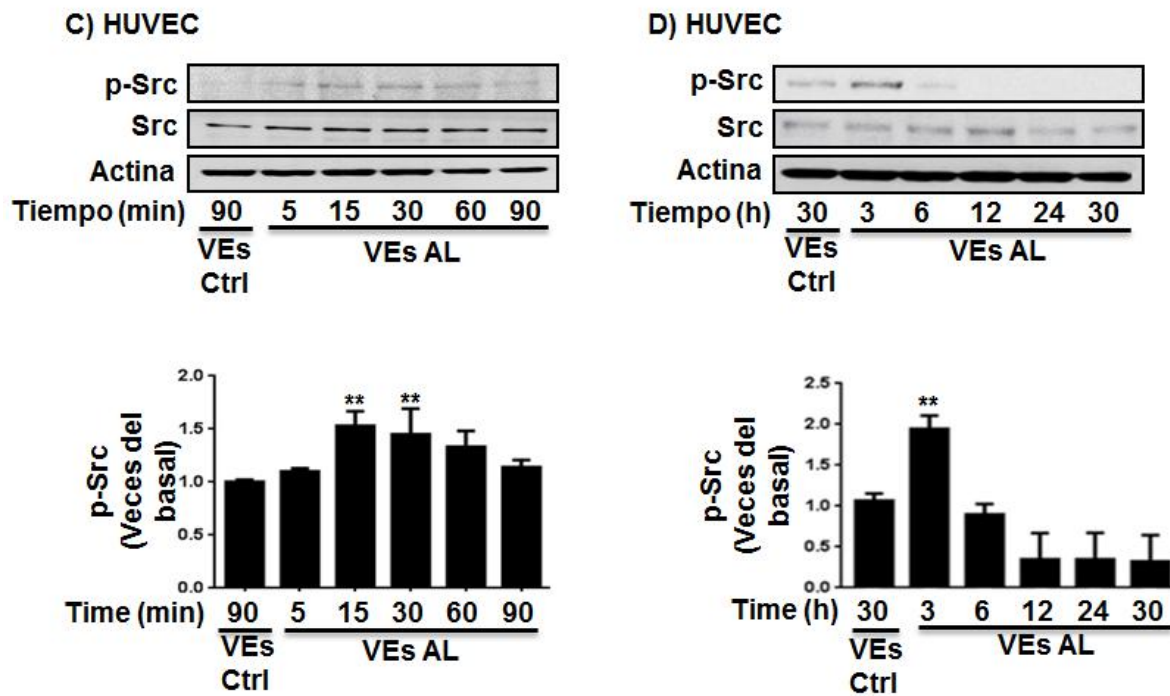


Fig. 3 Las VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen la activación de FAK y Src en células HUVEC. (A y B) Las células HUVEC se trataron durante períodos cortos de tiempo (5, 15, 30, 60 y / o 90 min) y períodos largos de tiempo (3, 6, 12, 24 y / o 30 h) con VEs Ctrl y VEs AL y posteriormente lisados. Los lisados se analizaron mediante Inmunoblot con anti-p-FAK y anti-p-Src. Las membranas se analizaron adicionalmente con anti-FAK, anti-Src y anti-Actin. Los gráficos representan la media \pm DE y expresan las veces de incremento en la expresión de p-FAK o p-Src con respecto a VEs Ctrl. Los asteriscos denotan significancia estadística. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$.

VIII.4.- Las VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen migración a través de la actividad de FAK y Src en células HUVEC

Los ensayos de cierre de herida se realizaron con células HUVEC pre-tratadas durante 1 h con 10 μ M de PP2 y 10 μ M de PF-573228, los cuales son inhibidores selectivos de la actividad de Src y FAK, respectivamente [147, 148], enseguida, las células fueron tratadas durante 48 h con VEs obtenidas de células MDA -MB-231 estimuladas o no, con 90 μ M de AL durante 48 h. Los resultados mostraron que el tratamiento sobre células HUVEC con PP2 y PF-573228 inhibe la migración inducida por VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL (Fig. 4).

HUVEC

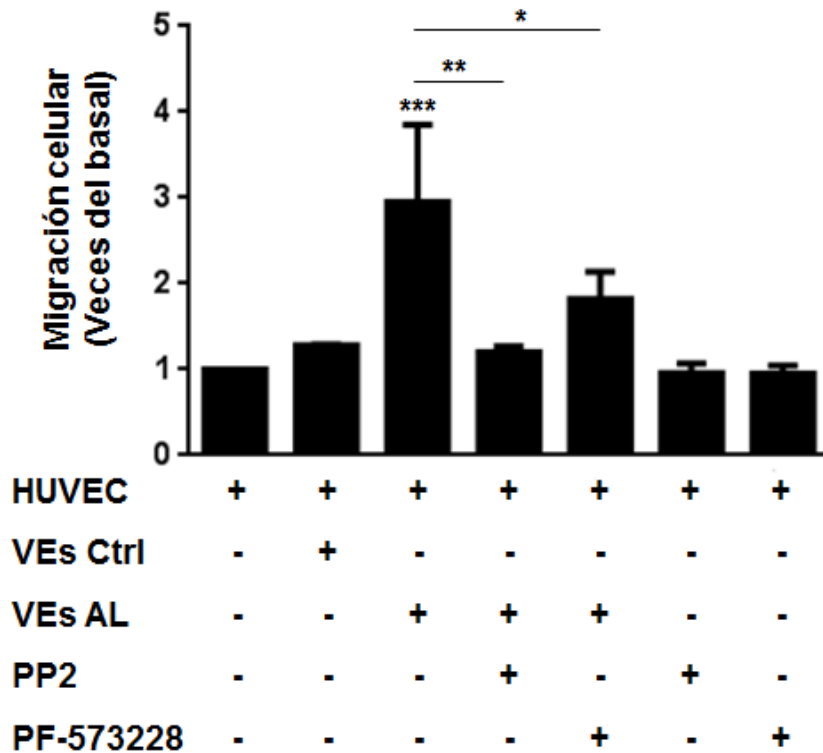
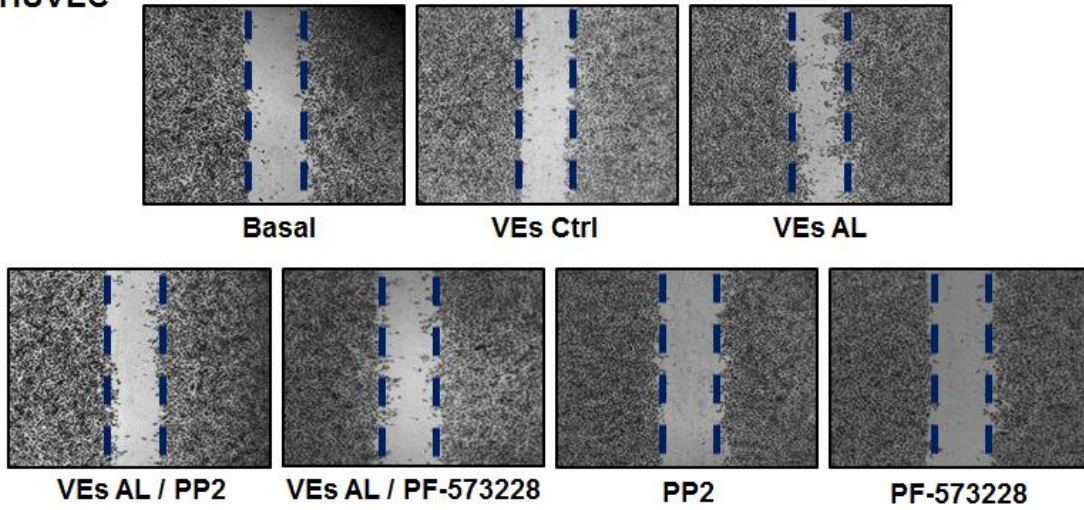
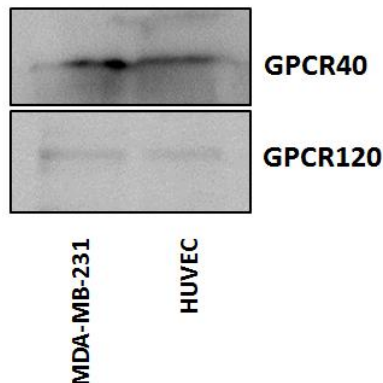


Fig.4 Las VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen la migración a través de la actividad Src y FAK en células HUVEC. Los cultivos de células HUVEC fueron tratadas y no durante 1 h con PP2 y PF-573228, se realizó la rayadura sobre la monocapa celular y se estimularon durante 48 h con VEs Ctrl y VEs AL. Se incluyó un control de células HUVEC sin tratamiento con VEs (Basal). Los gráficos representan la media \pm DE y expresan el incremento en la migración con respecto a VEs Ctrl. Los asteriscos denotan significancia estadística. *** P <0,0001.

VIII.5.- Papel de los receptores de ácidos grasos libres 1 y 4 (FFAR1 y FFAR4) en la secreción de VEs obtenidas de células MDA-MB-231 tratadas con AL que inducen migración en células HUVEC

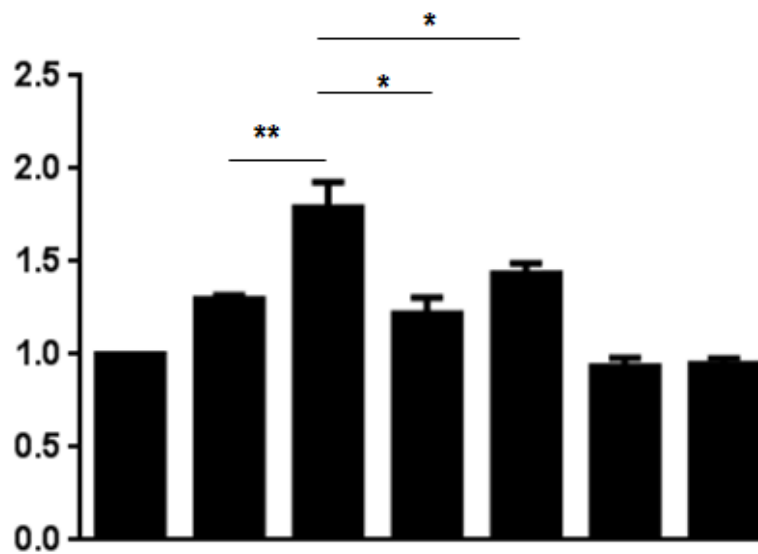
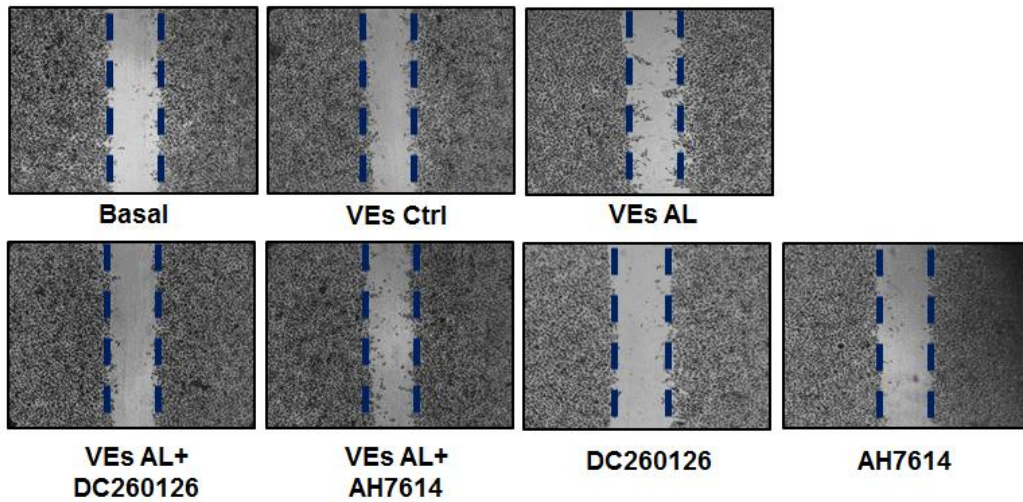
Para determinar el papel de FFAR1 y FFAR4 en la secreción de VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL que inducen la migración de células HUVEC. Para ello, primero determinamos mediante inmunodetección (Fig. 5A), que las líneas celulares, secretoras y receptoras (MDA-MB-231 y HUVEC), expresan de manera endógena ambos receptores (GPCR40 y 120). Posteriormente, las células MDA-MB-231 se pretrataron durante 1 h con DC260126 3 μ M y 20 μ M AH7614, los cuales son inhibidores específicos de FFAR1 y FFAR4 respectivamente [149, 150]. Se trataron durante 48 h con 90 μ M de AL y enseguida se obtuvieron los medios condicionados para el aislamiento de las VEs. A continuación, se realizaron ensayos de cierre de herida sobre células HUVEC tratadas con VEs de células MDA-MB-231 estimuladas o no durante 48 h con 90 μ M de AL en ausencia o presencia de DC260126 y AH7614. Los hallazgos demostraron que las VEs obtenidas de células MDA-MB-231 tratadas con DC260126 y AH7614 y estimuladas con AL, disminuyen significativamente la migración inducida por VEs estimuladas con AL sobre células HUVEC (Fig. 5B).

A)



B)

HUVEC



HUVEC	+	+	+	+	+	+	+
VEs Ctrl	-	+	-	-	-	-	-
VEs AL	-	-	+	+	+	-	-
DC260126	-	-	-	+	-	+	-
AH7614	-	-	-	-	+	-	+

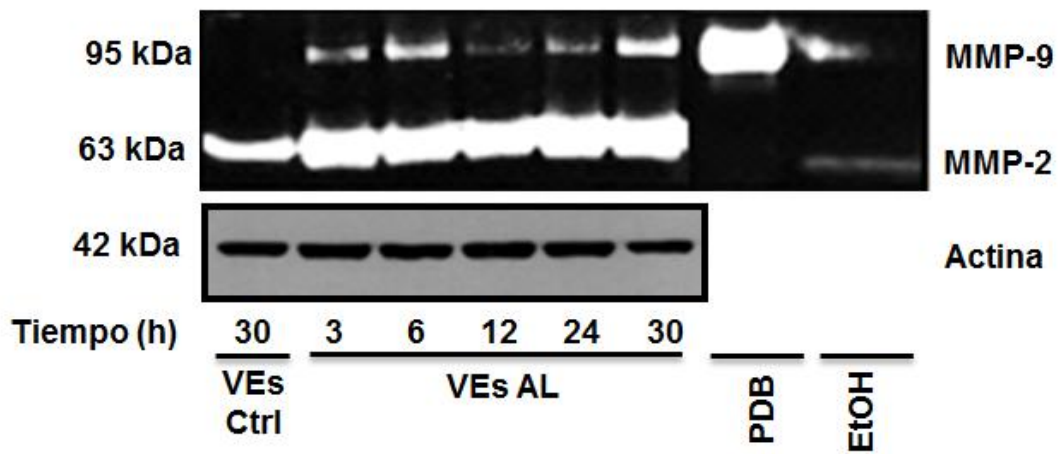
Fig.5 Papel de FFAR1 y FFAR4 en la secreción de VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL que inducen migración en células HUVEC. A. Inmunodetección endógena de FFAR 1 y 2 en células MDA-MB-231 y células HUVEC. B. Cultivos de células HUVEC se les realizó una rayadura sobre la monocapa celular y se trataron con VEs de células MDA-MB-231 estimuladas o

no durante 1 h con DC260126 y AH7614, se estimularon con 90 μ M de AL durante 48 h. Se incluyó un control de células HUVEC sin tratamiento con VEs (Basal). Los gráficos representan la media \pm DE y expresan las veces de migración con respecto de VEs Ctrl. Los asteriscos denotan significancia estadística. ** P <0,001.

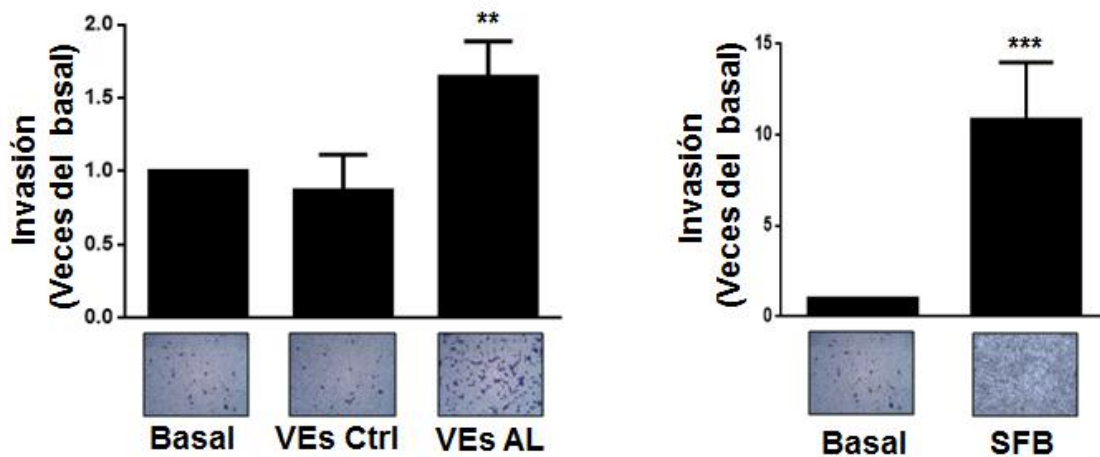
VIII.6.- Las VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen la secreción de gelatinasas, invasión y proliferación en células HUVEC.

Para determinar si el estímulo con VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen la secreción de gelatinasas (MMP-2 y MMP-9). Se trataron células HUVEC durante varios períodos de tiempo con VEs de células MDA-MB-231 estimuladas o no, con 90 μ M de AL durante 48 h, se obtuvieron los medios condicionados y se analizaron mediante zimografía en gelatina. Los resultados demostraron que las VEs de células MDA-MB-231 no tratadas indujeron la secreción de MMP-2 (gelatinasa-A) en células HUVEC, mientras que la estimulación de células HUVEC con VEs obtenidas de células MDA-MB-231 tratadas con AL indujeron un aumento evidente en la secreción de MMP -2 y la secreción de MMP-9 (gelatinasa-B) (Fig. 6A). Una vez observada la secreción de MMPs. Evaluamos la invasión de células HUVEC, utilizando el método de la cámara de Boyden con células HUVEC tratadas con VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas o no con 90 μ M de AL durante 48 h. Los hallazgos demostraron que solo las VEs obtenidas de las células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen la capacidad de invasión en las células HUVEC (Fig. 6B). Además, se realizaron ensayos de proliferación durante 24, 48 y 72 h en presencia o ausencia de SFB con células HUVEC tratadas con VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas y no con 90 μ M de AL durante 48 h. Los hallazgos demostraron que las VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen una mayor proliferación en las células HUVEC a las 48 y 72 h de tratamiento en comparación con las células HUVEC tratadas con VEs de células MDA-MB-231 sin estimular. Interesantemente, este efecto se mantuvo tanto en ausencia como en presencia de SFB (Figura 6C).

A) HUVEC



B) HUVEC



C) HUVEC

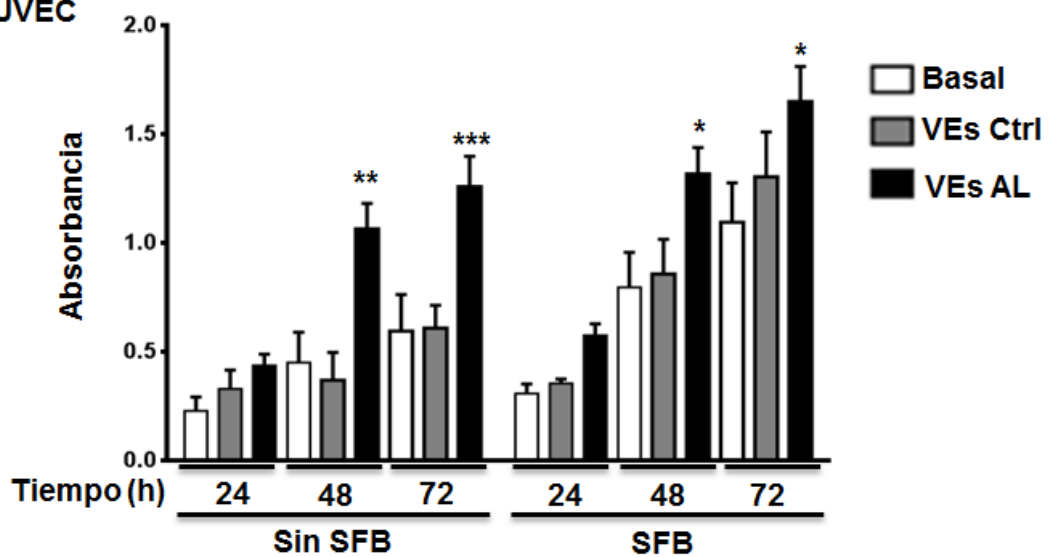
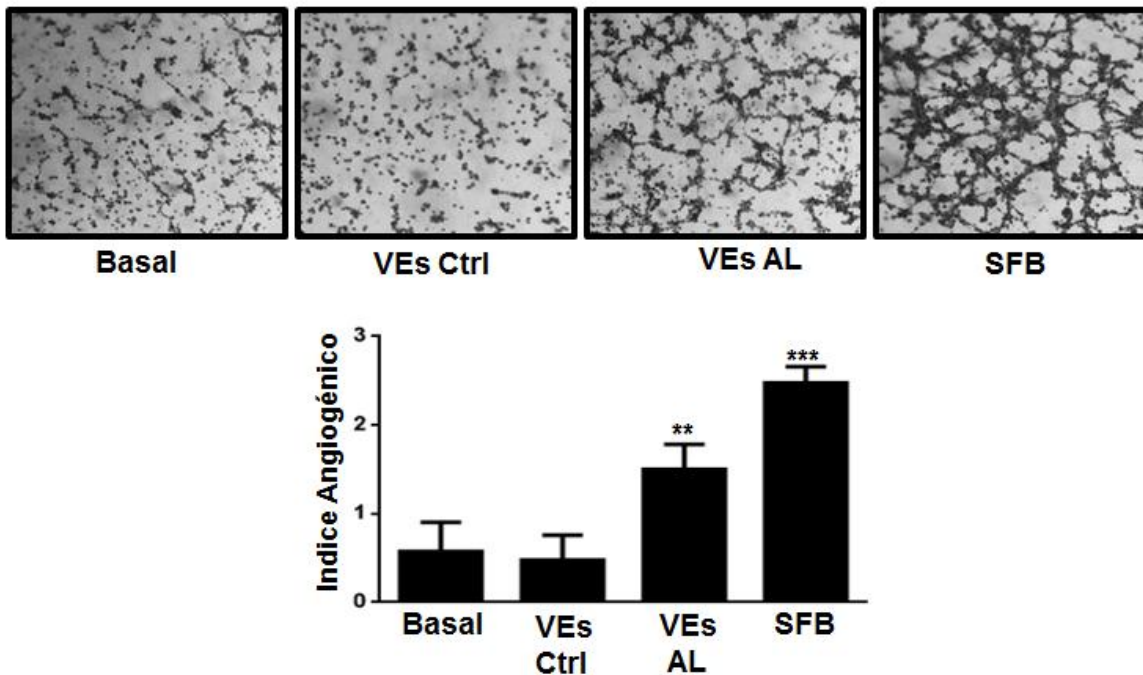


Fig.6 VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen secreción de gelatinasas, invasión y proliferación. (A) Ensayos de zimografía en gelatina utilizando medios condicionados de células HUVEC tratadas durante 3, 6, 12, 24 y / o 30 h con VEs Ctrl y VEs AL. (B) Ensayos de invasión utilizando células HUVEC tratadas con VEs Ctrl y VEs AL. Se incluyó un control de invasión celular (SFB). (C) Ensayos de proliferación en ausencia o presencia de SFB utilizando células HUVEC tratadas con VEs Ctrl y VEs AL. Los gráficos representan la media \pm DE y expresan las veces de incremento en la secreción de MMPs, invasión o proliferación comparado con VEs Ctrl. Los asteriscos denotan significancia estadística. * P <0,05, ** P <0,001, *** P <0,0001.

VIII.7.- Las VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen angiogénesis

Se realizaron ensayos angiogénicos en matrigel con células HUVEC tratadas con VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas y no con 90 μ M de AL durante 48 h. Los hallazgos demostraron que las VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL promueven la formación de estructuras tubulares, que forman una red de células HUVEC. Por el contrario, el tratamiento con VEs obtenidas de células MDA-MB-231 sin estímulo, no promueve la formación de estructuras tubulares en las células HUVEC (Fig. 7A). Para corroborar aún más nuestros hallazgos, se realizaron ensayos angiogénicos utilizando un sistema "*in vivo*". Los embriones de pollo se trataron con VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas o no con 90 μ M de AL durante 48 h. De acuerdo con nuestros resultados anteriores, las VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen una formación clara de estructuras similares a capilares en los embriones, mientras que el tratamiento con VEs de células MDA-MB-231 sin estímulo no induce la formación de capilares como estructura (Fig. 7B).

A) HUVEC



B) HUVEC

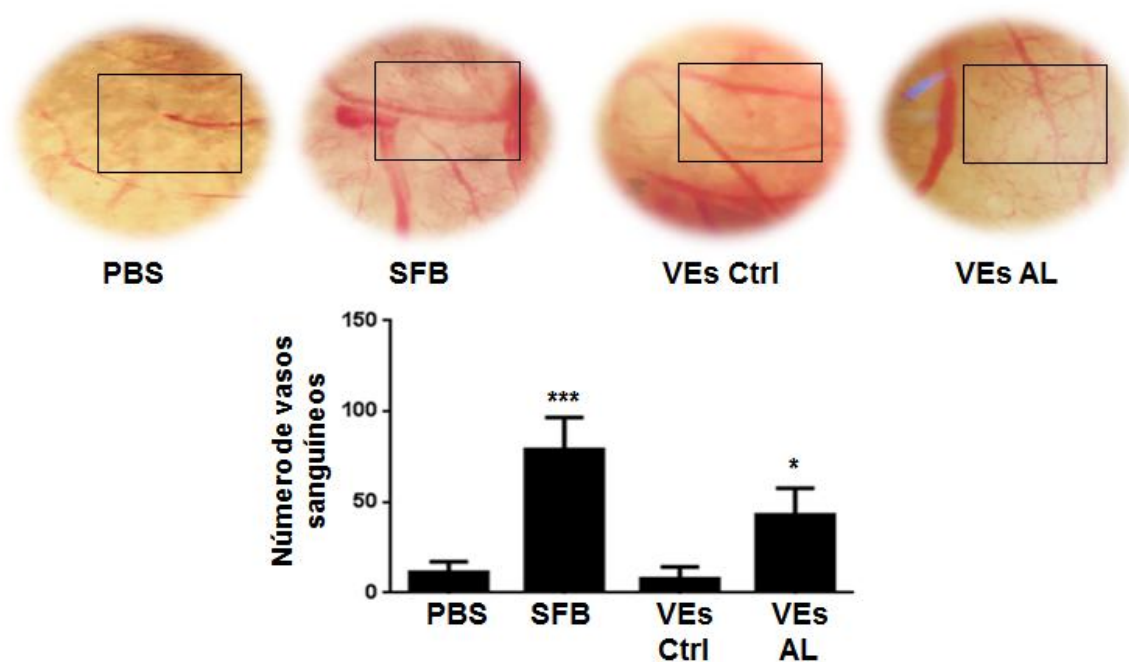


Fig.7 Las VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen angiogénesis in vitro e in vivo. (A) Ensayos de angiogénesis in vitro e (B) in vivo utilizando células HUVEC tratadas con VEs Ctrl y VEs AL. Se incluyó un control de angiogénesis (SFB). Los gráficos representan la media ±

DE del índice angiogénico y expresaron el doble de aumento por encima del valor de VEs Ctrl. Los asteriscos denotan significancia estadística. * P <0,05, ** P <0,001, *** P <0,0001.

VIII.8.- AL induce cambios en la expresión VEGF asociada a VEs derivadas de células MDA-MB-231.

Las fracciones de VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas o no con 90 μ M de AL durante 48 h se analizaron mediante Inmunodetección con anticuerpos anti-VEGF, anti-EGF y anti-FGF. Los resultados mostraron que las VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL expresan mayores cantidades de VEGF comparado con las VEs de células no estimuladas (Figura 8A). Por el contrario, las VEs de células MDA-MB-231 no estimuladas y estimuladas con AL no expresan EGF y FGF (Fig. 8B y C).

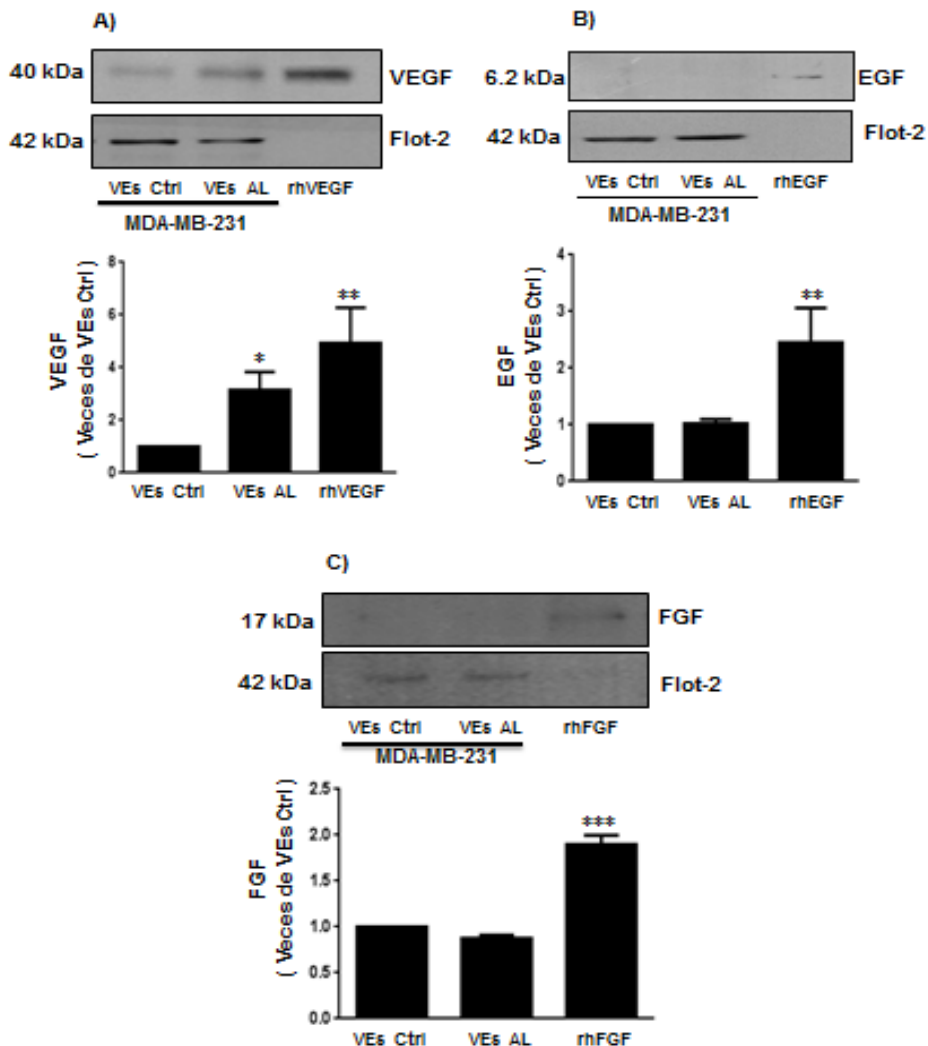


Fig.8 AL induce cambios en la expresión VEGF asociadas a VEs derivadas de células MDA-MB-231. (A-C) Las fracciones de VEs Ctrl y VEs AL se analizaron mediante Inmunodetección con anti-VEGF, anti-EGF, anti-FGF y anti-Flotillina-2. Se incluyeron controles positivos (VEGFrh, EGFrh, FGFrh). Los gráficos representan la media \pm SD y expresan el incremento en la expresión de VEGF, EGF o FGF comparado con VEs Ctrl. Los asteriscos denotan significancia estadística. * P <0,05, ** P <0,001, *** P <0,0001.

VIII.9.- El estímulo con AL incrementa la expresión de β -catenina P-552 y 675 en células MDA-MB-231.

Existe suficiente evidencia que indica que moléculas de la vía Wnt- β -catenina se encuentra alterada en diversos tipos de cáncer jugando un papel crucial en la progresión tumoral [151]. Particularmente, en los últimos años se le ha dado énfasis a nuevas fosforilaciones no canónicas en la proteína β -catenina (Ser-552 y 675) de las cuales se sabe que generan cambios en la localización subcelular de β -catenina y una rápida transcripción de genes de la vía, generando mayor agresividad tumoral [140, 152]. Bajo estos antecedentes, evaluamos si células MDA-MB-231 expresan a la proteína β -catenina fosforilada en Ser-552 y 675 y si el estímulo con AL durante 3 y 6 horas sobre estas células inducen un cambio de expresión en las fosforilaciones no canónicas de β -catenina. En primer lugar mediante Inmunoblot analizamos a la proteína β -catenina defosforilada. Los hallazgos demostraron que el estímulo con AL inducen un incremento significativo en la estabilidad de β -catenina desde las 3 h observándose un pico de activación máximo a las 6 h después del estímulo (Fig.A). Así mismo, al analizar las fosforilaciones en residuos no canónicos mediante la misma estrategia experimental, observamos un incremento significativo en la fosforilación de β -catenina en Ser 552 y 675 a las 6 h después del estímulo con AL (Fig.B y C)

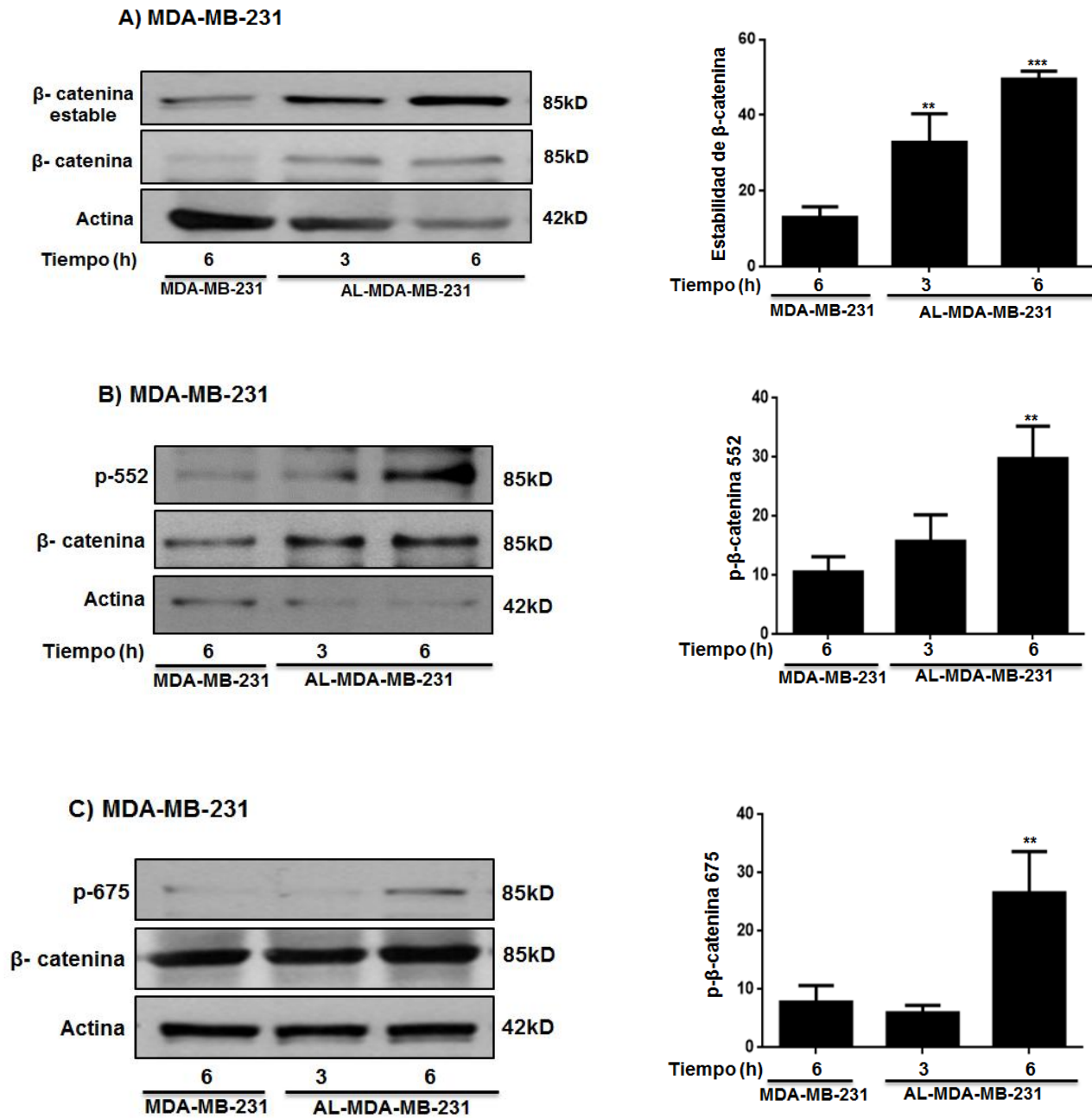


Fig.9 El estímulo con AL incrementa la expresión de β -catenina P-552 y 675 en células MDA-MB-231. Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron estimuladas o no con AL 90 μ M durante 3 y 6 horas y los lisados fueron obtenidos. (A, B, C) Los lisados fueron analizados mediante Inmunodetección utilizando anticuerpos anti- β -catenina defosforilada (Ab ABC), anti- β -catenina P-552, anti- β -catenina 675 y con anticuerpo anti-actina como control de carga. Los gráficos representan la media \pm SD y expresan el incremento en la expresión de β -catenina defosforilado o fosforilado en Ser 553 y 675 comparado con células MDA-MB-231 sin estímulo con AL. Los asteriscos denotan significancia estadística. ** P <0,001, *** P <0,0001.

VIII.10.- El estímulo con AL incrementa la expresión y localización subcelular de β -catenina P-552 y 675 en el citoplasma de células MDA-MB-231.

Considerando que el estímulo con AL sobre células MDA-MB-231 durante 6 horas, induce un incremento en la fosforilación de β -catenina en residuos no canónicos y tomando en cuenta que la localización subcelular de dicha proteína es indispensable para comprender el funcionamiento de la misma, analizamos la expresión y localización de β -catenina en células MDA-MB-231 después del estímulo con AL durante 6 horas. A través de ensayos de Inmunofluorescencia nuestros hallazgos indican que el estímulo con AL inducen un incremento en la expresión de β -catenina en Ser 552 y 675, tal y como lo habíamos observado mediante Inmunodetección. Pero además, estas condiciones favorecieron el acúmulo de P- β -catenina en la zona citoplasmática y perinuclear (Fig. A y B). Estos resultados nos muestran por primera vez, el efecto del AL respecto a los cambios en la localización subcelular de P- β -catenina, lo cual es de suma importancia considerando que, β -catenina citoplásmico es un componente crítico en el complejo de adhesión cadherina/catenina regulando las interacciones célula-célula. Sin embargo, cuando se localiza en el núcleo, β -catenina regula la unión a factores de transcripción, activando la transcripción de genes de la vía.

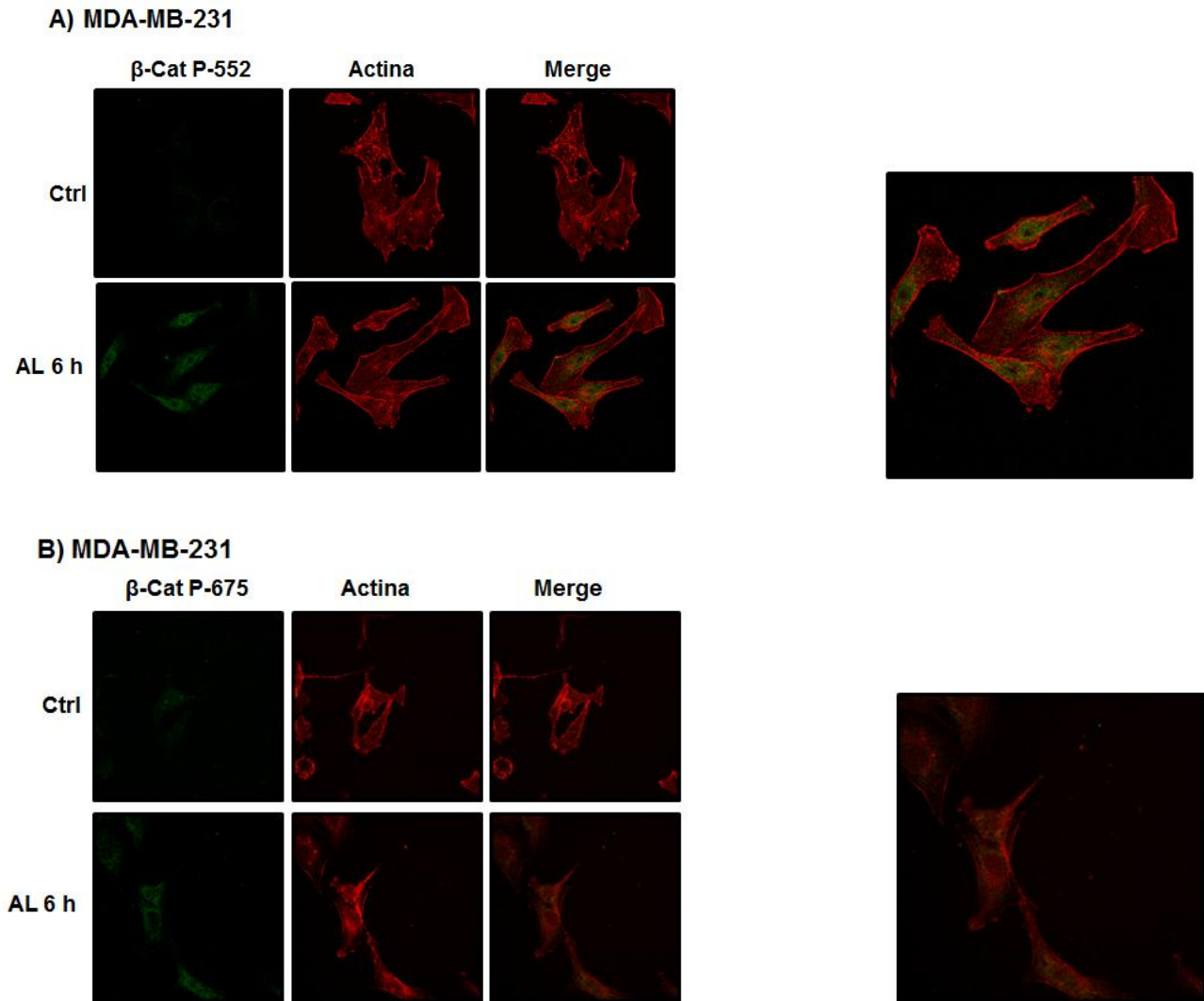


Fig. 10 El estímulo con AL incrementa la expresión y localización de β -catenina P-552 y 675 en el citoplasma de células MDA-MB-231. La localización subcelular de β -catenina P-552 y 675 se analizó mediante Inmunofluorescencia con anticuerpos que reconocen la forma fosforilada de β -catenina en los residuos de Ser-552 (A) y Ser-675 (B) (se tiñó citoesqueleto de actina con faloidina β -catenina P-552 y 675 con FITC). Células MDA-MB-231 fueron estimuladas con o sin AL a una concentración de 90 μ M durante 6 horas

VIII.11.- El estímulo con AL induce cambios en la expresión de β -catenina P-552 y 675 asociadas a VEs derivadas de células MDA-MB-231.

Tomando en cuenta nuestros hallazgos los cuales demuestran que las células secretoras de VEs (MDA-MB-231-AL) inducen cambios en la expresión y localización de β -catenina fosforilada en residuos de Ser-552 y 675, y

considerando que evidencias recientes indican que β -catenina está inmersa dentro de VEs en condiciones hipóxicas obtenidas de células de cáncer de colon generando mayor agresividad tumoral [142], Evaluamos si bajo nuestras condiciones experimentales, el AL induce cambios en los cargos proteicos de VEs, particularmente en la expresión de β -catenina fosforilada en residuos de Ser-552 y 675. Para ello, la obtención de VEs se llevó a cabo a través del estímulo con AL durante 3, 6 y 48 h (este último, considerando el tiempo de obtención de VEs en la mayoría de nuestros experimentos). Las proteínas fueron analizadas mediante Inmunodetección. Nuestros resultados demuestran que la proteína β -catenina fosforilada en residuos de Ser-552 y 675 se encuentra expresada dentro de VEs obtenidas a las 6 y 48 horas después del estímulo con AL sobre células MDA-MB-231 (Fig. A y B).

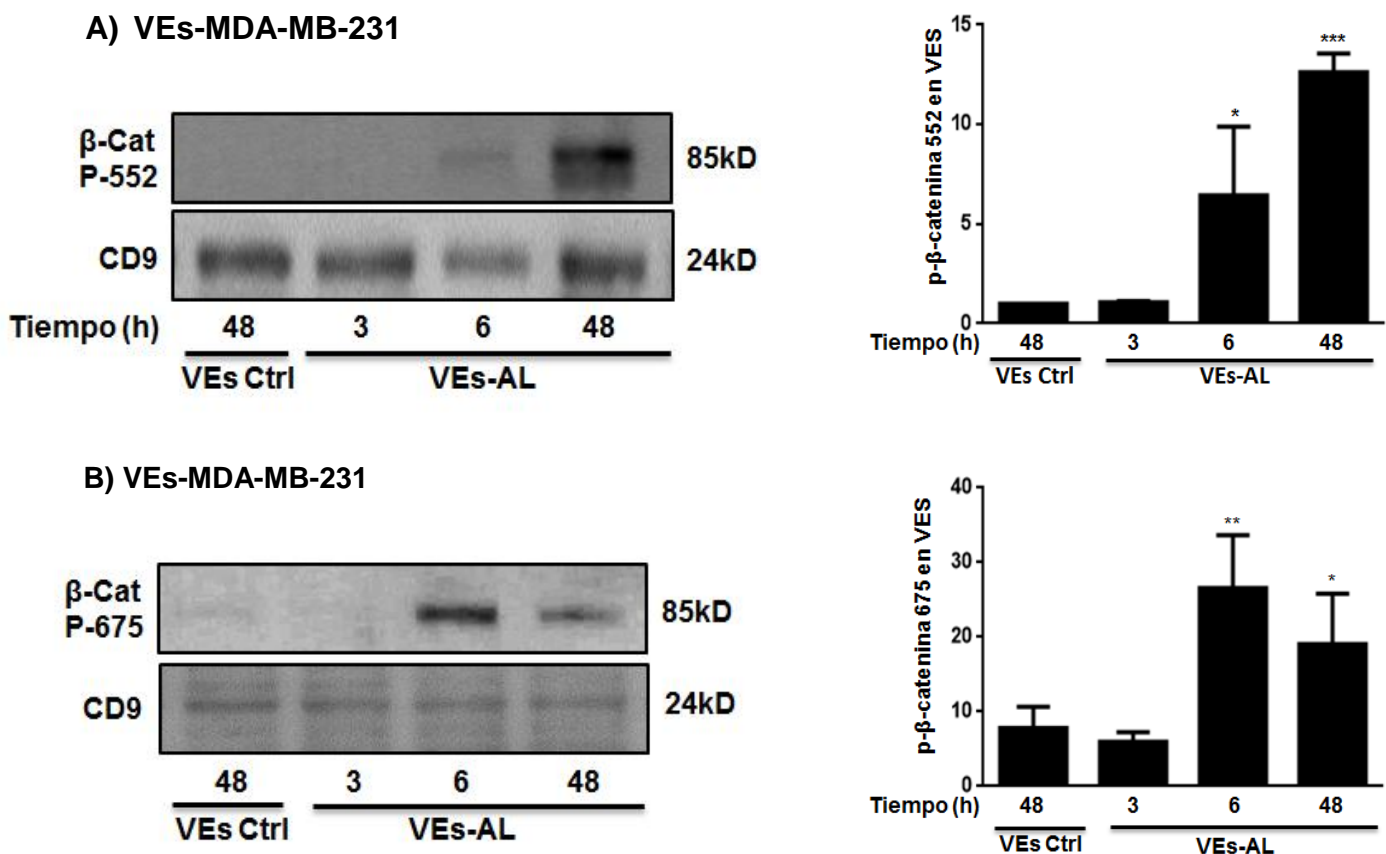


Fig. 11 El estímulo con AL induce cambios en la expresión β -catenina P-552 y 675 asociadas a VEs derivadas de células MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 fueron estimuladas con o sin AL a una concentración de 90 μ M durante 48 h. Los medios condicionados fueron obtenidos y las fracciones de VEs fueron aisladas. Las VEs fueron lisadas para obtener proteínas totales las

cuales fueron cuantificadas y analizadas mediante Inmunodetección con anti- β -catenina P-552 (A) y 675 (B). Los gráficos representan la media \pm SD y expresan el incremento en la expresión de VEGF, EGF o FGF comparado con VEs Ctrl. Los asteriscos denotan significancia estadística. * P <0,05, ** P <0,001, *** P <0,0001.

VIII.12.- VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen incremento en la expresión de Wnt3a, Wnt5a y β -catenina en células HUVEC.

La alteración de Wnt/ β -catenina facilita la acumulación de β -catenina en el núcleo y genera una activación permanente de esta vía de señalización. Este evento desencadena la expresión de genes que codifican proteínas que participan en proliferación celular, diferenciación, mantenimiento de células troncales y por tanto condiciones para el crecimiento descontrolado característico del cáncer [153]. Mediante este análisis, evaluamos los cambios en la expresión proteica de Wnt3a, Wnt5a y β -catenina total en células HUVEC cuando estas, son estimuladas durante 3, 6, 12, 24 y 30 horas con VEs obtenidas de células MDA-MB-231 tratadas con AL. Las proteínas fueron analizadas mediante Inmunodetección. Nuestros resultados demuestran que la proteína Wnt3a incrementa de manera significativa a las 6, 24 y 30 horas (Fig. 12A). Con respecto a la proteína Wnt5a, observamos un incremento en sus niveles proteicos a las 12, 24 y 30 horas (Fig. 12B). Por su parte, la expresión de la proteína β -catenina demuestran que el estímulo con VEs obtenidas de células MDA-MB-231 tratadas con AL induce un acumulo de β -catenina a partir de las 6 horas y dicho efecto se mantiene hasta las 30 horas comparado con el efecto observado en células HUVEC estimuladas con VEs control (Fig. 12C).

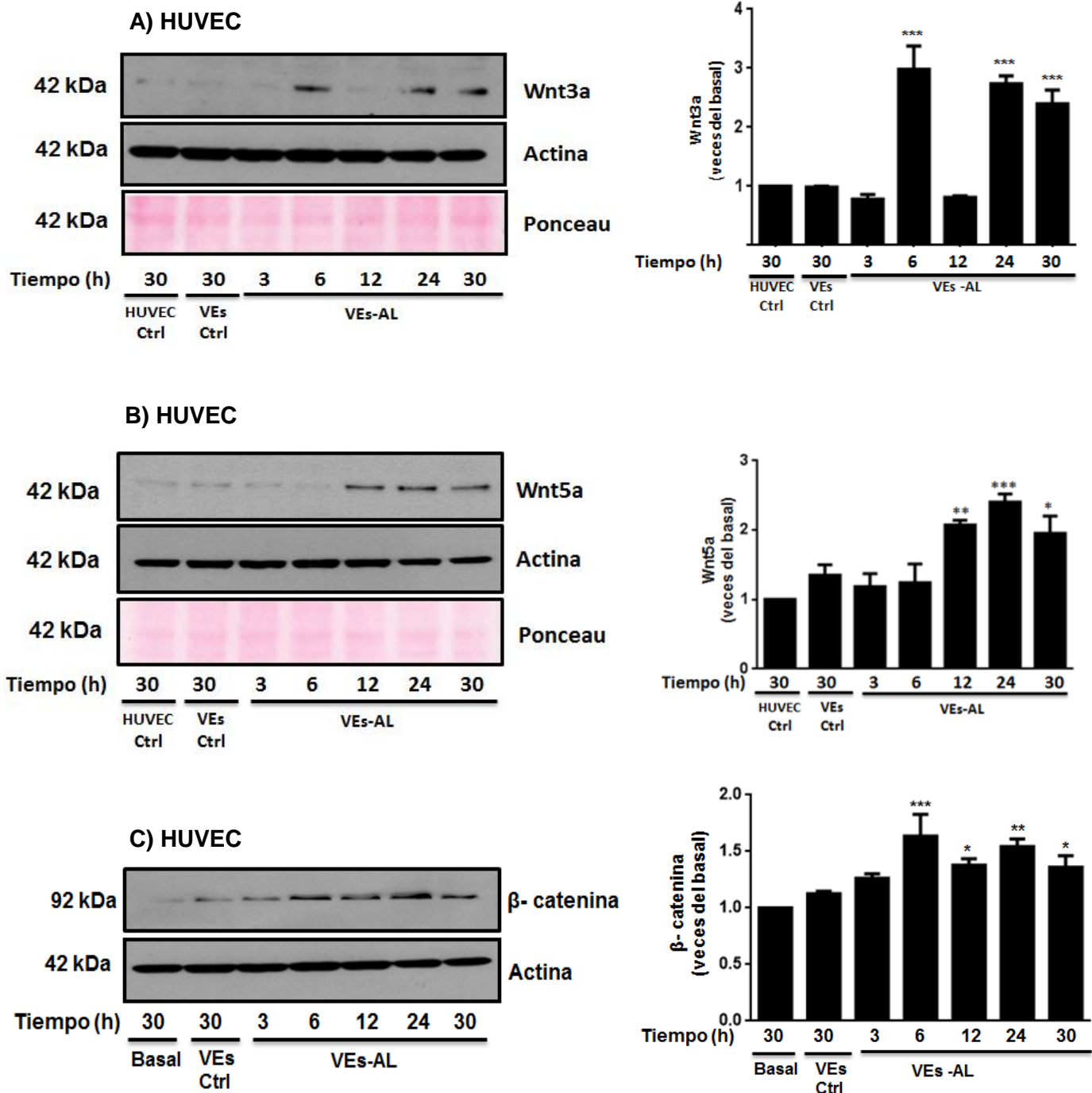


Fig. 12 VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen incremento en la expresión de Wnt3a, Wnt5a y β-catenina en células HUVEC. Células HUVEC fueron cultivadas en cajas de 35 mm de diámetro, ayunadas por 18 horas y tratadas con VEs de células MDA-MB-231 sin estímulo (VEs Ctrl) o estimuladas con AL 90 μM, durante 48 horas (VEs AL) a diferentes tiempos. Las células fueron lisadas y analizadas por Inmunodetección con el anticuerpo anti-Wnt3a, anti- Wnt5a y anti- β-catenina. Las membranas también fueron analizadas por Inmunodetección con el anticuerpo anti-actina como control de carga. Las gráficas representan la media ± D.E. de tres experimentos independientes y los valores fueron expresados como número de veces de incremento con respecto al control. Los asteriscos denotan significancia estadística. * P < 0,05, ** P < 0,001, *** P < 0,0001.

VIII.13.- El proceso de migración de células HUVEC inducido por VEs secretadas por células MDA-MB-231 estimuladas con AL es mediado por β -catenina.

Considerando la importante participación de la proteína β -catenina en la progresión de diferentes tipos de cáncer y tomando en cuenta nuestros resultados con respecto al efecto que induce el AL sobre los cambios en la expresión y localización de dicha proteína en respuesta a las VEs (MDA-MB-231), la presencia de esta proteína en VEs y las modificaciones proteicas de la vía de Wnt (Wnt3a, Wnt5a y β -catenina) en las células receptoras (HUVEC), evaluamos si la migración de células endoteliales podría estar siendo regulado por la proteína β -catenina. Se realizaron ensayos de cierre de herida utilizando los inhibidores de β -catenina. Cultivos confluentes de células HUVEC fueron pre-tratadas con 10 nM de XAV939 durante 4 horas. Después del tratamiento, se realizó una rayadura en el centro de los cultivos y fueron estimulados con VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con o sin AL, durante 48 horas. Los resultados mostraron que el tratamiento sobre células HUVEC con XAV939 inhibe la migración inducida por VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL. Este resultado indica que las VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL promueven migración de células HUVEC a través de la proteína β -catenina (Fig. A)

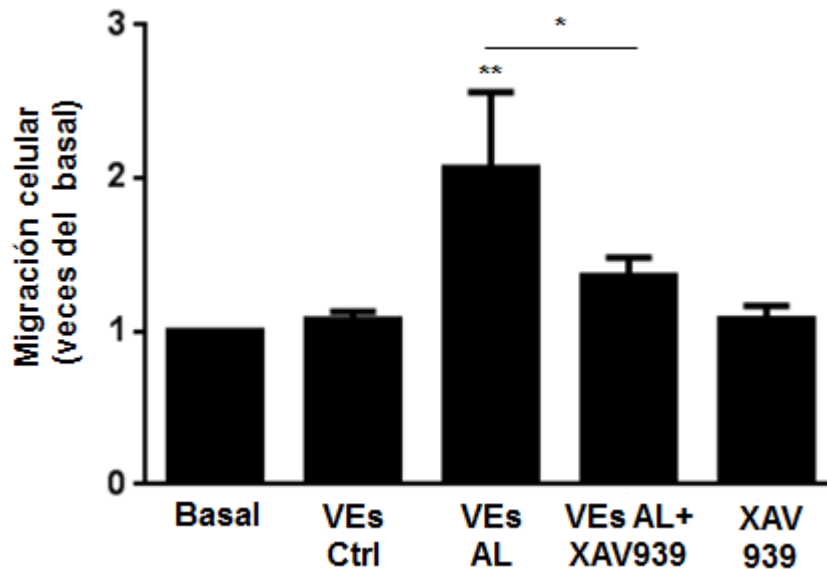
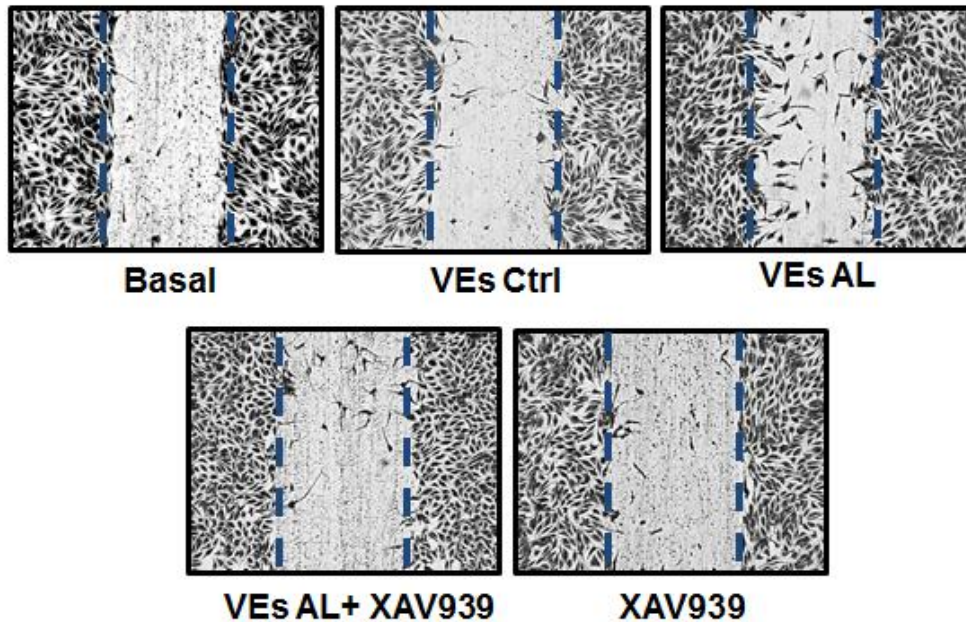
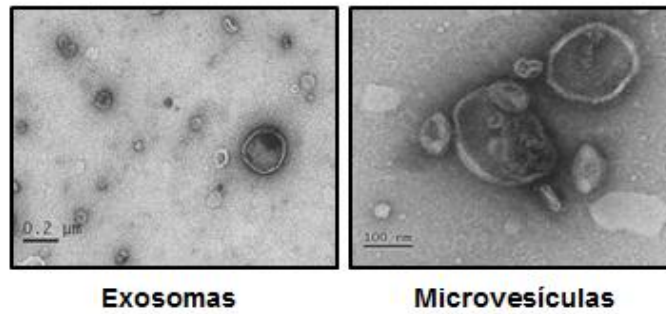


Fig. 13 El proceso de migración de células HUVEC inducido por VEs secretadas por células MDA-MB-231 estimuladas con AL es mediado por β -catenina. Células HUVEC fueron sembradas en cajas de 35 mm de diámetro, ayunadas durante 18 horas, pretratadas con 12 μ M de mitomicina C y tratadas con o sin XAV939 (10 μ M) durante 4 horas. Posteriormente, se realizó una rayadura en la monocapa de las células, con una punta estéril, y fueron estimuladas con VEs de células MDA-MB-231 sin estímulo (VEs Ctrl), VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL (VEs AL), VEs AL+ XAV939 durante 48 horas. Células HUVEC sin estímulo (basal), y tratadas solo con XAV939 fueron utilizados como controles. Las fotografías fueron tomadas 48 horas después del tratamiento. La gráfica representa la media \pm D.E. de tres experimentos independientes y los valores fueron expresados como número de veces de incremento con respecto al control (células HUVEC tratadas con VEs Ctrl). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía. Los asteriscos denotan significancia estadística con respecto al control. * P <0,05, ** P <0,001.

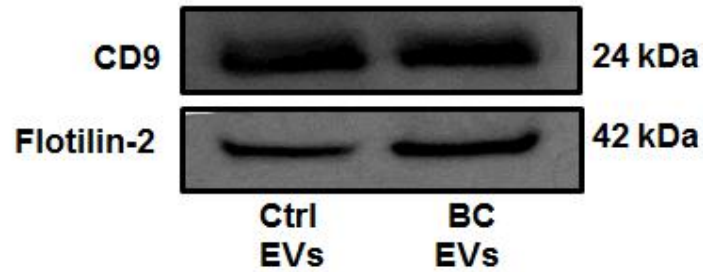
VIII.14.- Fracciones de VEs obtenidas del plasma de mujeres con cáncer mamario se encuentran incrementadas con respecto a las VEs obtenidas de mujeres sanas.

Las VEs se encuentran presentes en múltiples fluidos corporales, tales como orina, sudor, saliva, fluido cerebrospinal, placenta y sangre periférica. En humanos, las VEs tienen un papel central en la comunicación celular tanto para el mantenimiento de la homeostasis, así como para el desarrollo y progresión de múltiples patologías entre las que se encuentran las infecciones, desordenes cardiovasculares, enfermedades autoinmunes y cáncer [116]. Para confirmar la presencia de VEs en plasma de mujeres con CaMa y mujeres de referencia, las VEs fueron obtenidas por centrifugación diferencial a partir de sangre periférica de mujeres sin o con cáncer mamario y observadas por microscopia electrónica de transmisión por el método de tinción negativa. En la figura 14 A se muestra la estructura típica de las VEs, las cuales están formadas por una doble membrana, así mismo, se observan diferentes tamaños como se ha reportado en la literatura. En seguida, para demostrar que la fracción obtenida se encontraba enriquecida en VEs, mediante ensayo de Inmunodetección determinamos la presencia de marcadores proteicos asociados a diferentes poblaciones de VEs como CD9 y flotilina-2 [154]. Como se observa en la Figura 14B, bandas correspondientes a estas proteínas son detectables en la fracción de VEs de mujeres con o sin cáncer mamario, indicando que el método de centrifugación diferencial utilizado nos permite obtener una fracción enriquecida con VEs a partir de sangre periférica. En seguida, estas fueron analizadas mediante NTA, mostrando un claro incremento en el número de VEs obtenidas del plasma de mujeres con CaMa comparado con VEs de pacientes sanas, Pero además, al analizar el tamaño de las partículas, de manera interesante, observamos que la secreción de estas VEs de acuerdo a los tamaños, corresponden a la población de exosomas (71-97 nm) con respecto a lo observado con VEs obtenidas de plasma de mujeres de referencia las cuales secretan VEs de tamaños a partir de 176 nm (Fig. 14C).

A)



B)



C)

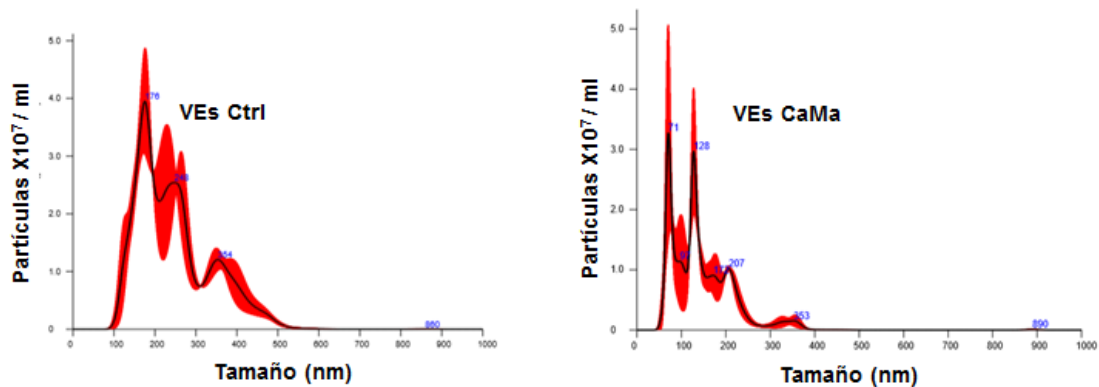


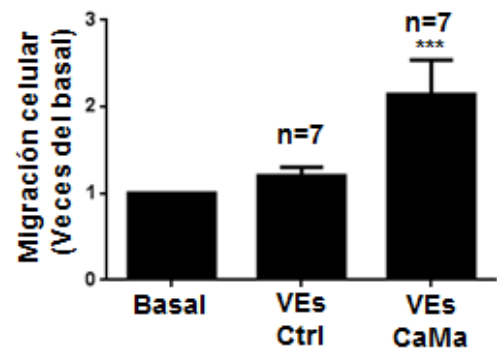
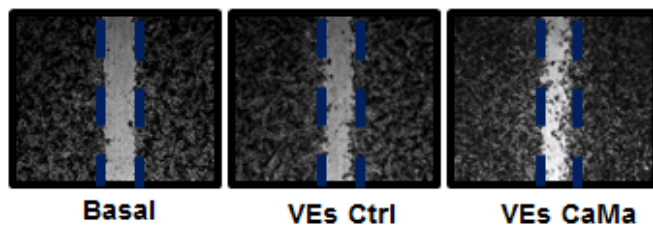
Fig.14 Fracciones de VEs obtenidas del plasma de mujeres con cáncer mamario se encuentran incrementadas con respecto a las VEs obtenidas de mujeres sanas. Sangre periférica fue obtenida mediante punción venosa y fue procesada mediante centrifugación diferencial para obtener la fracción de VEs libre de VEs de origen plaquetario. (A y B) Las fracciones de VEs (VEs) fueron analizadas mediante TEM e Inmunodetección utilizando anticuerpos anti-flotilina-2 y anti-CD9. (C) VEs obtenidas de plasma de mujeres con CaMa y de mujeres sanas se analizaron mediante NTA para determinar el número y tamaño de VEs.

VIII.15.- Las VEs presentes en plasma de mujeres con cáncer de mama inducen migración en células HUVEC.

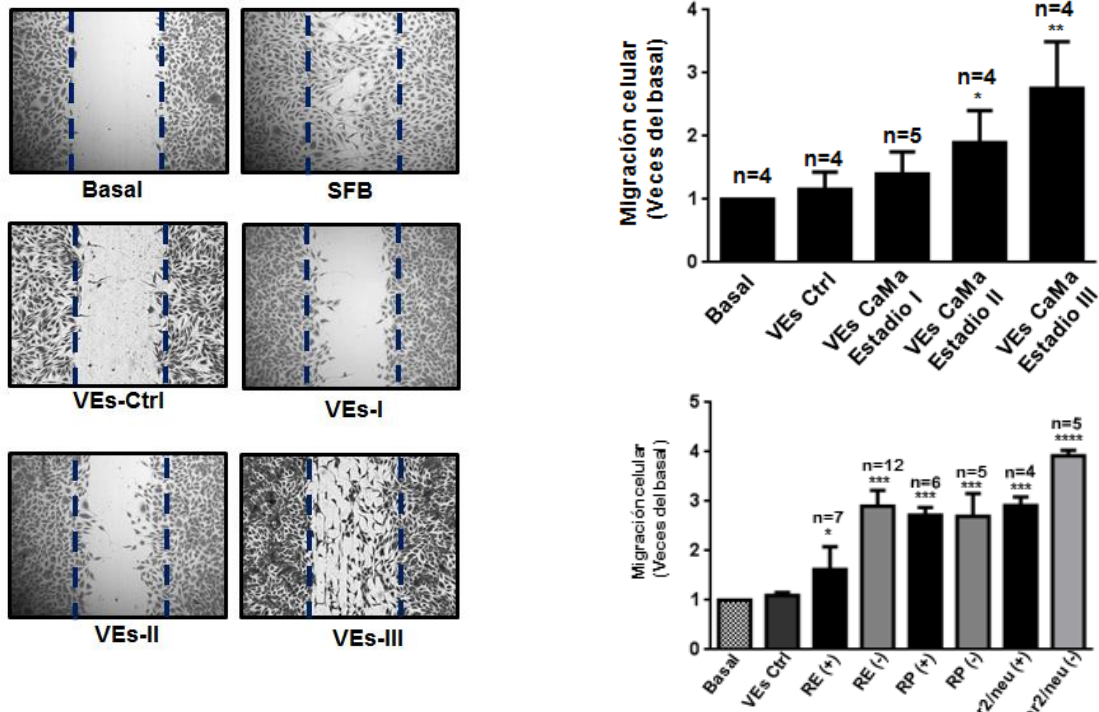
La migración endotelial es un proceso biológico que juega un papel fundamental durante la formación del sistema circulatorio en la embriogénesis, en la cicatrización de las heridas y promoviendo el crecimiento tumoral y metástasis. Diversos estudios han demostrado que las VEs tumorales son capaces de activar células endoteliales, induciendo la formación de vasos sanguíneos que irrigan al tumor para favorecer su crecimiento, sobrevivencia y metástasis [104]. Bajo este contexto, decidimos evaluar si VEs derivadas del plasma de mujeres con o sin CaMa son capaces de promover migración en células endoteliales humanas. Para lo cual, cultivos de células HUVEC fueron estimulados durante 48 horas con siete fracciones de VEs presentes en plasma de mujeres del grupo control siete fracciones de VEs obtenidas del plasma de mujeres con cáncer mamario (30 μ g de proteína/1.2x10⁶ células), y la migración celular fue analizada mediante ensayos de cierre de herida. Los resultados demuestran que VEs presentes en plasma de mujeres del grupo control no promueven la migración de células HUVEC. Por otro lado, VEs obtenidas de mujeres con CaMa inducen un incremento significativo en la migración de células HUVEC (Fig. 15A). Posteriormente, evaluamos el efecto de la migración de células HUVEC con respecto al estadio clínico de la enfermedad; VEs obtenidas del plasma de cuatro mujeres del grupo control, cinco del plasma de mujeres con CaMa en estadio I, cuatro en estadio II y cuatro en estadio III. Nuestros hallazgos demuestran que solo las VEs obtenidas de mujeres con CaMa en estadio II y III inducen un incremento significativo en la migración de células HUVEC comparado con VEs control (Fig. 15B). De la misma manera, el análisis de este efecto dependiente de la expresión de receptores moleculares (RE+, RE-, RP+, RP-, Her2/neu +, Her2/neu-) nos indica que la expresión por separado de todos los receptores moleculares inducen en mayor o menor medida la migración de células HUVEC, siendo más evidente dicho efecto, en VEs obtenidas de pacientes con CaMa que presentan Her2/neu- y menos agresivo en pacientes con RE+ (Fig. 15B).

Finalmente, evaluamos la migración de células HUVEC con respecto al sistema TNM (Tamaño del tumor, diseminación a nódulos linfáticos y Metástasis). Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en la migración celular de VEs de pacientes con tamaño de tumor (T) T2, T3 y T4 comprado con VEs del grupo control. Por otro lado, no se presentaron diferencias significativas entre VEs del grupo control y pacientes con tamaños de tumor T1 (Fig. 15C). Con respecto a la diseminación a nódulos linfáticos (N) y metástasis (M), observamos incremento significativo en la migración celular cuando se estimula a células HUVEC con VEs de pacientes que presentaron diseminación a nódulos linfáticos en estadios patológicos N0, N1, N2, N3 y M0 y M1 comparado con la migración observada de VEs del grupo control (Fig. 15C).

A)



B



C

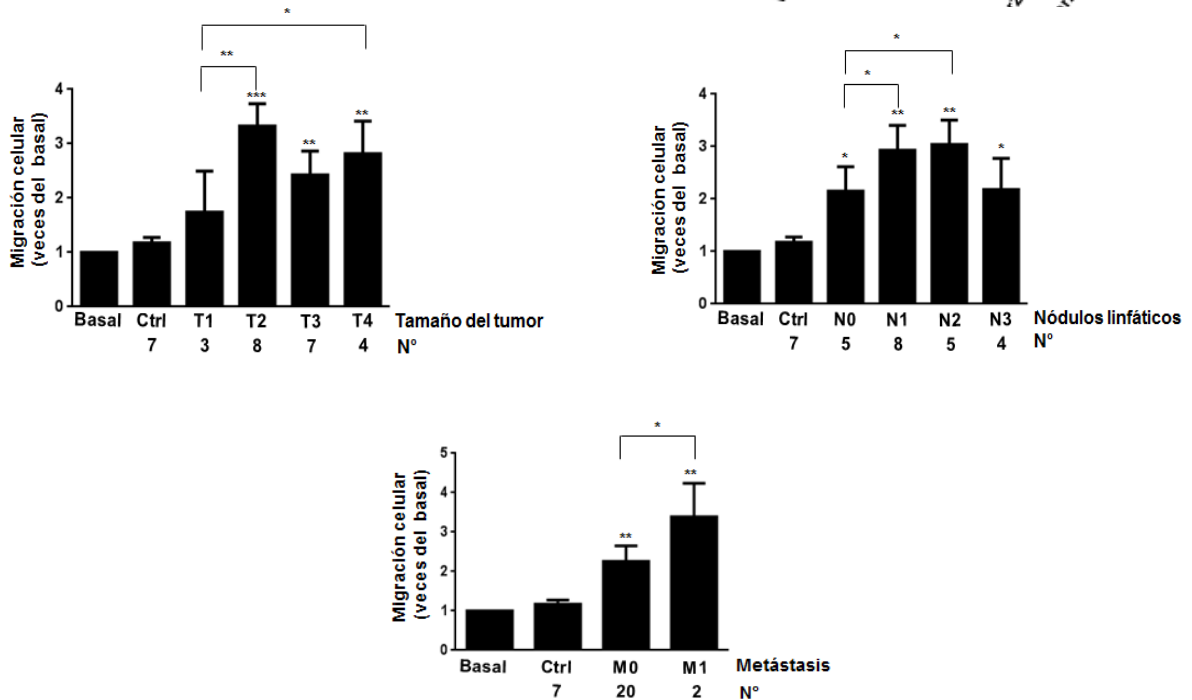


Fig. 15 Las VEs presentes en plasma de mujeres con cáncer de mama inducen migración en células HUVEC. (A y B) Las células HUVEC fueron cultivadas en cajas de 35 mm y pretratadas con 12 μ M de mitomicina C por 2 horas. Posteriormente se realizó una rayadura sobre la monocapa celular. Los cultivos fueron estimulados durante 48 horas con fracciones de VEs obtenidas de mujeres del grupo control (VEs Ctrl) o con fracciones de VEs obtenidas de mujeres con cáncer mamario de acuerdo al estadio clínico de la enfermedad (VEs CaMa). Las fotografías

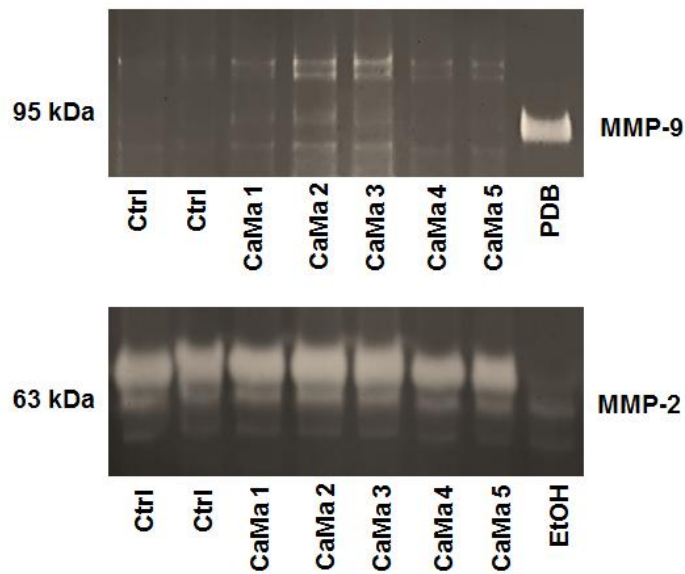
fueron tomadas 48 horas después del estímulo. (C) Estadística de migración celular de acuerdo a la expresión de receptores moleculares de pacientes con CaMa., (D, E y F) Estadística de migración celular de acuerdo al tamaño del tumor(D), invasión a nódulos linfáticos (E) y metástasis de pacientes (F) con CaMa. La gráfica representa la media \pm D.E. y son expresados como las veces de migración con respecto al control (células HUVEC estimuladas con VEs Ctrl). Los asteriscos denotan significancia estadística. * P <0,01, ** P <0,001, *** P <0,0001, **** P <0,00001.

VIII.16.- Las VEs obtenidas de plasma de mujeres con cáncer mamario inducen invasión en células HUVEC.

En el ensayo previo, se demostró que solo las VEs obtenidas de plasma de mujeres con cáncer mamario indujeron la migración de células HUVEC. En el proceso angiogénico, las células presentan un aumento en la secreción de MMPs al espacio extracelular conjuntamente con la capacidad de invadir el tejido circundante para dar lugar a la nueva vasculatura, un fenómeno asociado a cáncer [155, 156]. Por lo tanto, se evaluó si las VEs presentes en plasma de mujeres con cáncer de mama promueven la secreción de MMP-2 y -9. Para cumplir con este objetivo, células HUVEC fueron tratadas a diferentes tiempos con fracciones de VEs de dos mujeres del grupo control y cinco fracciones de mujeres con cáncer mamario (CaMa 1, 2, 3, 4 y 5). Los medios condicionados fueron obtenidos y analizados mediante zimografía en gelatina. Como se observa en la (Fig. 16A). Los resultados demuestran que el tratamiento con VEs presentes en mujeres del grupo control y VEs de pacientes con CaMa, promueven la secreción de MMP-2 (gelatinasa-A) sin evidentes cambios entre ambas condiciones. Sin embargo, el tratamiento a células HUVEC con VEs obtenidas de pacientes con CaMa 1, 2 y 3 inducen una evidente secreción de MMP-9 (gelatinasa-B), no siendo así con VEs obtenidas de las pacientes con CaMa 4 y 5 y las VEs presentes en mujeres del grupo control. Considerando los resultados anteriores con respecto a la secreción de MMPs por células HUVEC, decidimos determinar la participación de VEs en invasión celular. Para ello, células HUVEC fueron colocadas en la parte superior de la cámara de Boyden previamente recubierta con matrigel, mientras que en la parte inferior de la cámara fueron colocadas las fracciones de VEs obtenidas del plasma de mujeres del grupo control (n=3) o fracciones de VEs aisladas de

plasma de mujeres con cáncer mamario (n=8; 4 estadio I y 4 e estadio II). Como se observa en la Fig. 16B, las fracciones de VEs de mujeres con cáncer de mama en estadio clínico I y II, inducen un incremento significativo en la invasión de células HUVEC comparado con el estímulo generado por VEs presentes en mujeres del grupo control.

A)



B)

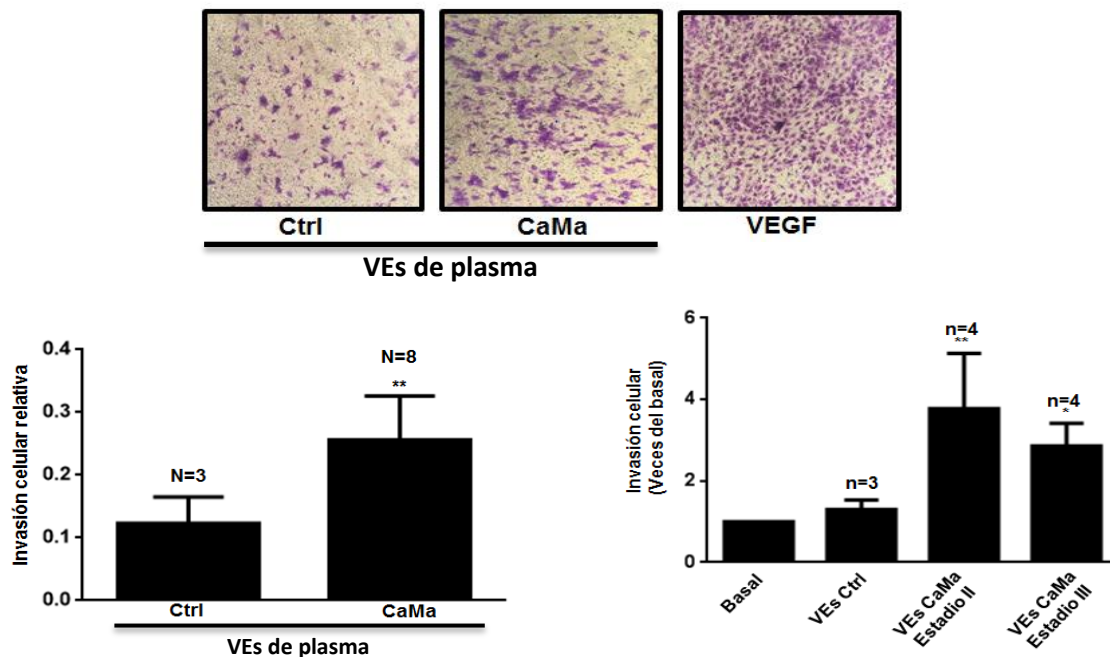


Fig.16 Las VEs obtenidas de plasma de mujeres con cáncer mamario inducen invasión en células HUVEC. (A) Cultivos de células HUVEC fueron tratadas durante 12 horas con fracciones de VEs obtenidas de 2 mujeres del grupo control y fracciones de VEs obtenidas de 5 mujeres con cáncer mamario. A continuación, se obtuvieron y concentraron los medios condicionados, y fueron analizados mediante zimografía en gelatina. Se incluyeron controles positivos; células HUVEC tratadas con PDB durante 12 horas fueron utilizadas como control positivo de la secreción de MMP-9 y etanol para la secreción de MMP2. (B) Células HUVEC fueron colocadas sobre el matrigel en cámaras de Boyden y estimuladas con fracciones de VEs obtenidas de 3 mujeres del grupo control y fracciones de VEs obtenidas de 8 mujeres con cáncer mamario. La invasión celular fue evaluada a las 48 horas después del estímulo. (C) Grafica que representa la capacidad invasiva de las células HUVEC con respecto al estadio clínico de la enfermedad. Las gráficas representan la media \pm D.E. y es expresada como las veces de invasión con respecto al control (células HUVEC estimuladas con VEs Ctrl). Los asteriscos denotan significancia estadística. * P <0,01, ** P <0,001

VIII.17.- Las VEs obtenidas de plasma de mujeres con cáncer mamario inducen angiogénesis en células HUVEC.

Para evaluar la capacidad angiogénica de las VEs presentes en mujeres del grupo control y VEs de pacientes con CaMa sobre células HUVEC, se realizaron ensayos de angiogénesis en matrigel in vitro. Como se observa en la Fig. 17A, las células endoteliales que fueron estimuladas con las VEs obtenidas de plasma de pacientes con CaMa formaron estructuras de tipo capilar en forma de red, por el contrario, las células endoteliales que fueron estimuladas con VEs presentes en mujeres del grupo control, no promueven la formación de estructuras tubulares en las células HUVEC. Además, el estímulo con VEs obtenidas de mujeres con CaMa de acuerdo al estadio clínico de la enfermedad nos indica que VEs de carcinoma ductal *in situ* (CDIS) inducen la formación de estructuras tubulares menos complejas y sin cambios estadísticamente significativos con respecto a VEs control. Sin embargo, de manera interesante observamos que VEs obtenidas de mujeres con CaMa en estadio II y III favorecen la formación de estructuras tubulares que forman una red de células HUVEC y este efecto es estadísticamente significativo (Fig. 17B). Estos resultados nos sugieren que, VEs obtenidas de plasma de pacientes con CaMa podrían tener cargos proangiogénicos que comunican a células endoteliales, generando angiogénesis.

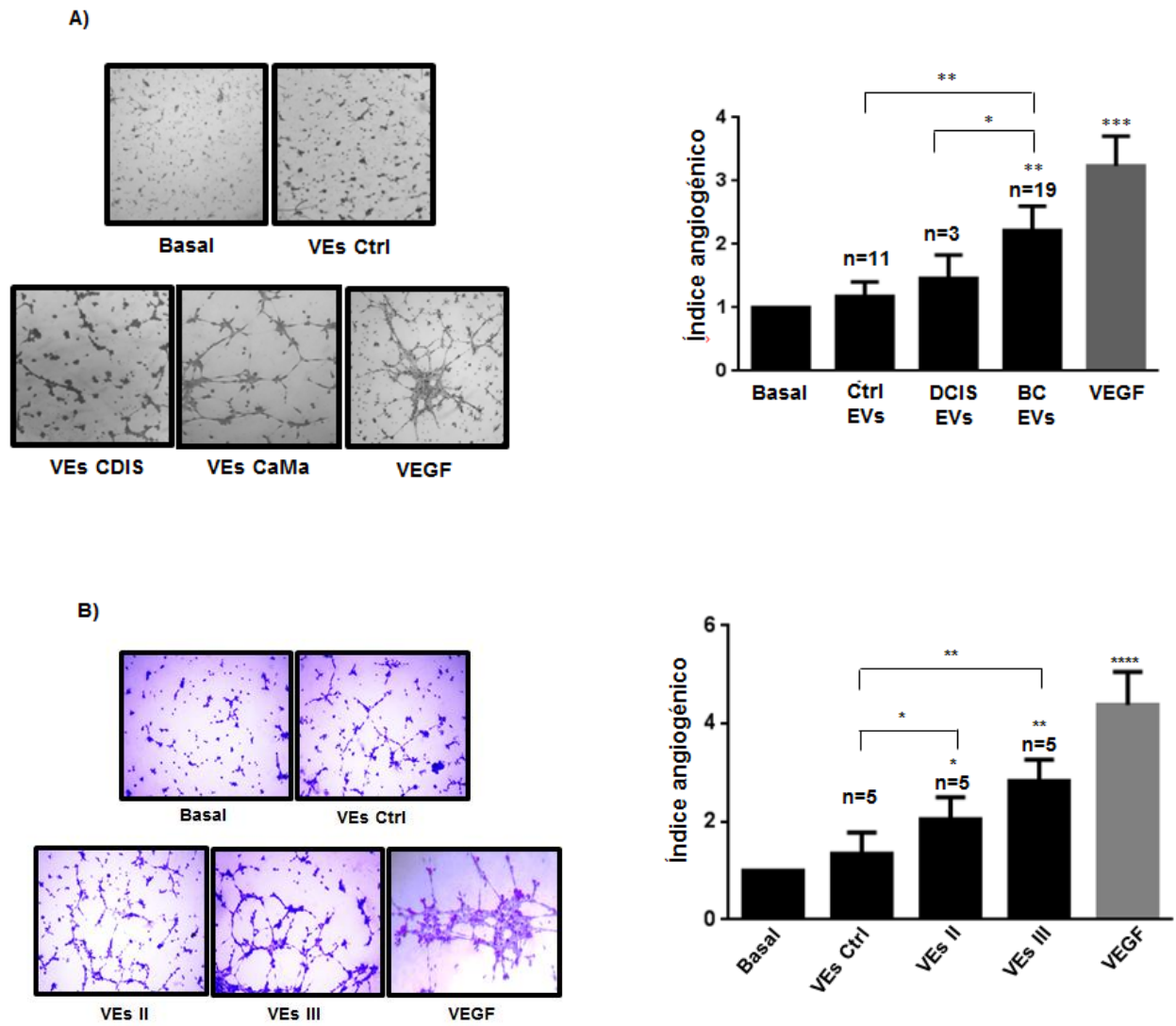


Fig. 17 Las VEs obtenidas de plasma de mujeres con cáncer mamario inducen angiogénesis en células HUVEC. Los medios condicionados fueron obtenidos del plasma de pacientes con CaMa y pacientes control, mediante centrifugación diferencial se aisló y purificó la fracción enriquecida de VEs. A) Cajas de cultivo de 24 pozos fueron recubiertas con matrigel y células HUVEC fueron colocadas con una densidad de 30,000 cel/pozo. Las células fueron estimuladas con 40,000 VEs por 8 h, teñidas y fotografiadas. B) La gráfica representa la media +/- D.E. del análisis del índice angiogénico, expresada como veces de aumento respecto a VEs control.). Los asteriscos denotan significancia estadística. * P <0,01, ** P <0,001, **** P <0,00001.

VIII.18.- Cambios en la expresión de proteínas pro-angiogénicas asociadas a VEs derivadas del plasma de pacientes con CaMa dependiente del estadio clínico de la enfermedad.

Considerando los efectos de las fracciones de VEs de pacientes con CaMa sobre los procesos angiogénicos y la posibilidad de que en ellas vayan inmersas algunas moléculas proangiogénicas de acuerdo al estadio clínico de la enfermedad, decidimos analizar la presencia de estas mediante Inmunodetección con anticuerpos anti-VEGF, anti-EGF y anti-FGF. Los resultados mostraron que únicamente las VEs de pacientes con CaMa en estadio III expresan significativamente mayores cantidades de VEGF comparado con las VEs de pacientes control (Fig. 18A). Además, observamos de manera interesante que VEs de pacientes con CaMa en estadio I y III expresan cantidades significativas de FGF. Con respecto a EGF, en la Fig. 18A observamos que esta se encuentra incrementada sobre todo en VEs de pacientes con CaMa en estadio II con respecto a las VEs de pacientes control. Estos resultados nos sugieren que los efectos observados de VEs obtenidas de pacientes con CaMa sobre los diferentes procesos angiogénicos, se debe a la diversidad de cambios en los cargos moleculares dentro de VEs de acuerdo al estadio clínico de la enfermedad, jugando un papel clave en la progresión tumoral (Fig. 18A).

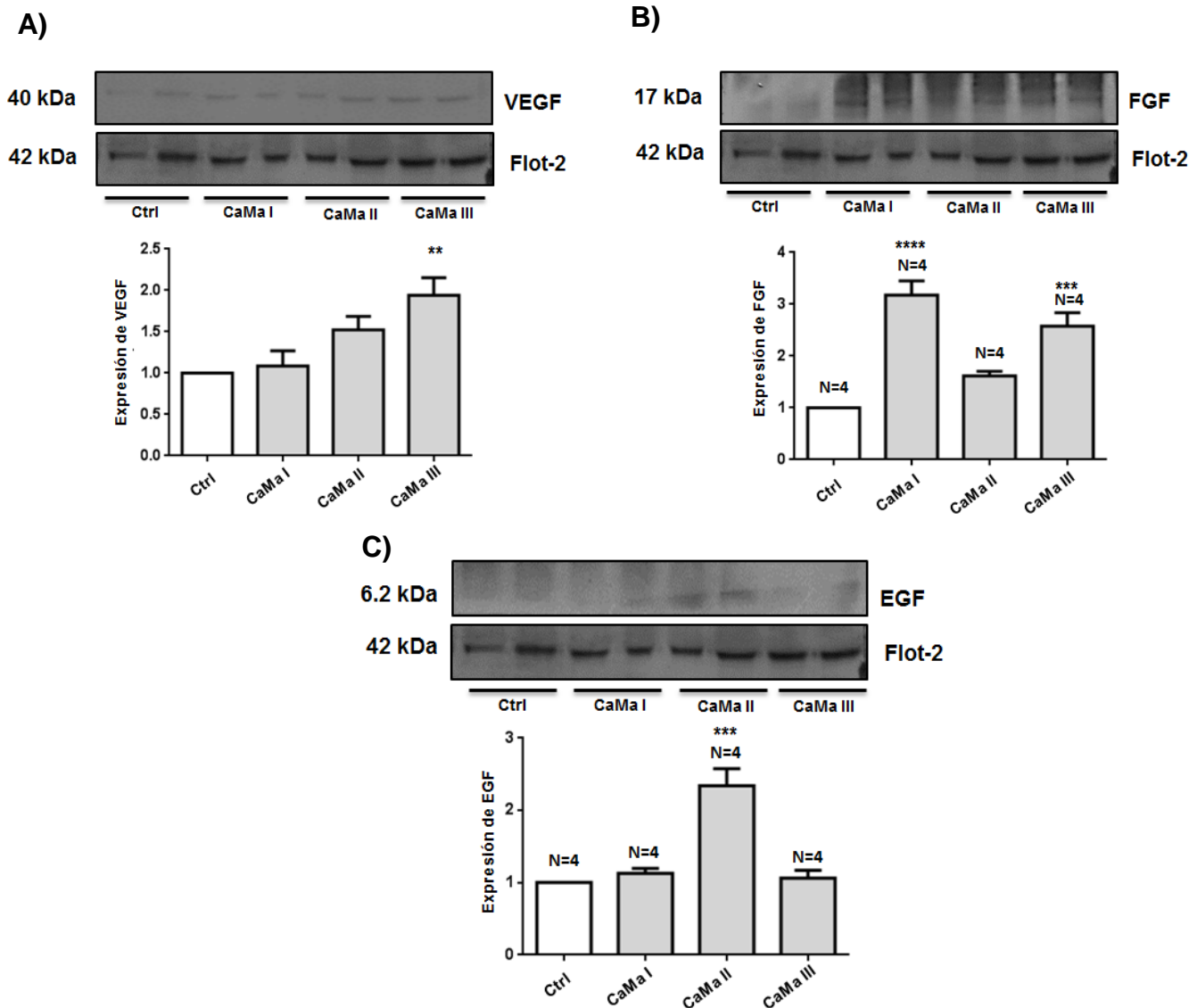


Fig.18 Cambios en la expresión de proteínas pro-angiogénicas asociadas a VEs derivadas del plasma de pacientes con CaMa dependiente del estadio clínico de la enfermedad. (A-C) Las fracciones de VEs obtenidas del plasma de pacientes con CaMa dependiente del estadio clínico de la enfermedad se analizaron mediante Inmunodetección con anti-VEGF, anti-EGF, anti-FGF y anti-Flotillina-2. Se incluyeron controles positivos (VEGFrh, EGFrh, FGFrh). Los gráficos representan la media \pm SD y expresan el incremento en la expresión de VEGF, EGF o FGF comparado con el Ctrl. Los asteriscos denotan significancia estadística. ** P <0,001, *** P <0,0001, **** P <0,00001.

VIII.19.- Cambios en la expresión de β -catenina asociada a VEs obtenidas de plasma de mujeres con CaMa.

Debido a que se ha determinado que β -catenina fosforilada en Ser 675 favorece la transcripción de genes blanco que conducen a un incremento en la angiogénesis tumoral [152], analizamos la presencia de esta proteína fosforilada dentro de VEs obtenidas de pacientes con CaMa en diferentes estadios clínicos de la enfermedad (CM I-IV). Nuestros hallazgos demuestran la presencia de β -catenina fosforilada en Ser 675 en VEs de pacientes control y VEs de pacientes con CaMa en todos los estadios clínicos, sin embargo, se observan cambios significativos únicamente en VEs de CaMa en estadios III y IV con respecto a las VEs de pacientes control (Fig. 19).

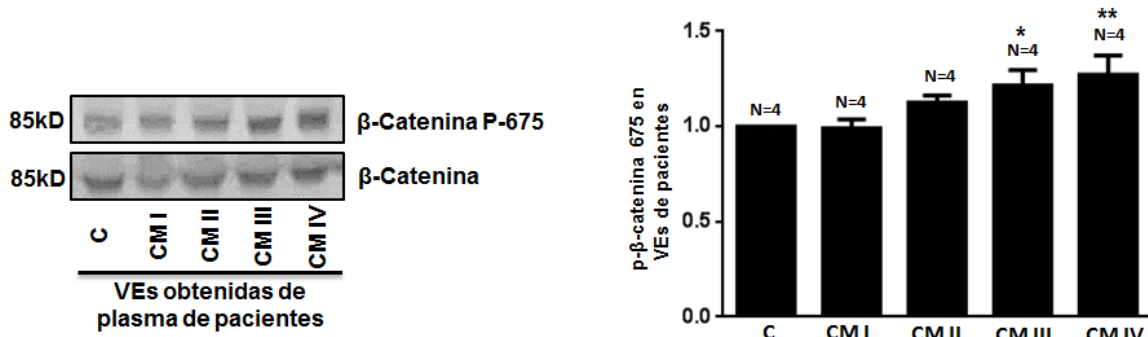


Fig.19 Cambios en la expresión de β -catenina asociada a VEs obtenidas de plasma de mujeres con CaMa. Los medios condicionados fueron obtenidos y las fracciones de VEs fueron aisladas a partir de 16 pacientes en con CaMa; 4 pacientes por cada estadio clínico (I-IV). Las VEs fueron lisadas para obtener proteínas totales las cuales fueron cuantificadas y analizadas mediante Inmunodetección con anti- β -catenina. Los gráficos representan la media \pm SD y expresan el incremento en la expresión de β -catenina comparado con VEs obtenidas de pacientes Ctrl. Los asteriscos denotan significancia estadística. * P <0,05, ** P <0,001.

VIII.21.- Figuras suplementarias

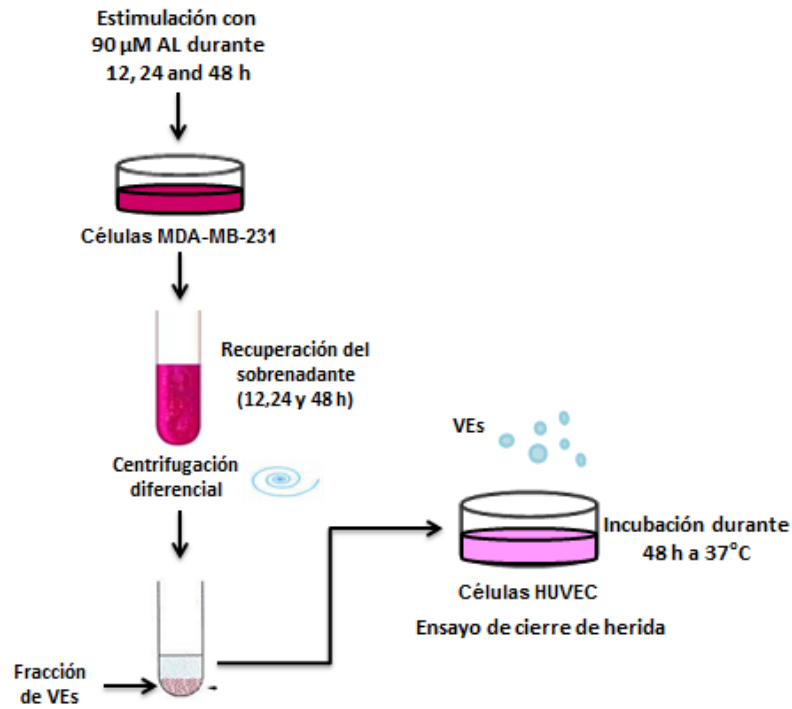


Fig.1S Diagrama esquemático que muestra el procedimiento experimental general

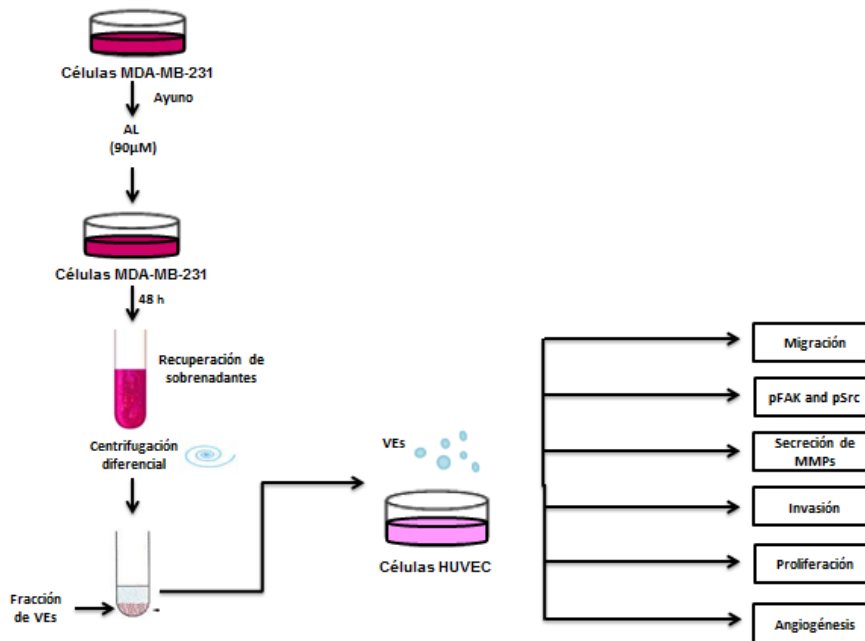


Fig.2S Diagrama esquemático que muestra el procedimiento experimental general de estimulación de células HUVEC con VEs

C) HUVEC

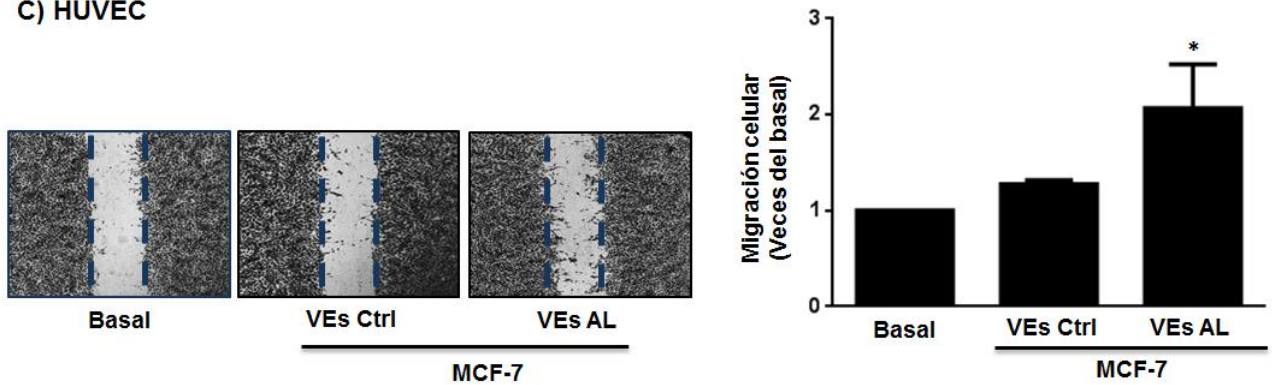


Fig.3S VEs de células MCF-7 estimuladas con AL inducen migración en células HUVEC. Los cultivos de células HUVEC se rasparon y se trataron durante 48 h con EV de células MCF-7 no estimuladas (VEs Ctrl) y se estimularon con 90 μ M de AL durante 48 (VEs AL). Se incluyó un control de células HUVEC sin tratamiento con VEs (Basal). Los gráficos representan la media \pm DE y expresan el incremento de migración con respecto a VEs Ctrl. Los asteriscos denotan significancia estadística. * P <0,05,

IX DISCUSIÓN

Estudios epidemiológicos y en modelos animales han demostrado una correlación entre la alta ingesta de grasas en la dieta y el riesgo de desarrollar cáncer de mama [157, 158]. En particular, las dietas occidentales caracterizadas por un bajo consumo de ácidos grasos omega-3 asociado a un alto consumo de ácidos grasos omega-6 están relacionadas con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama [159]. El AL es un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-6 y un componente importante de los aceites vegetales, estimándose una ingesta en las dietas occidentales de alrededor de 15-20 g por día por persona, con una concentración plasmática de ~ 275 μM [160, 161]. Previamente, se demostró en células de cáncer de mama MDA-MB-231 que el AL promueve una variedad de procesos celulares que incluyen migración e invasión a través de la actividad de PLD 11-13. Además, el tratamiento de las células MDA-MB-231 con 90 μM de AL induce la secreción de VEs, que promueven un proceso similar a la TEM en las células epiteliales mamarias MCF10A [162]. Por esa razón, en este estudio, determinamos si las VEs inducidas por el estímulo con AL en células MDA-MB-231 y VEs de plasma de pacientes con CaMa favorecen otros eventos biológicos que son importantes para la progresión del tumor de cáncer de mama, como la angiogénesis y evaluar las vías de señalización por las cuales las VEs inducen dicho efecto en células endoteliales.

Una variedad de enfermedades que incluyen trastornos cardiovasculares, infecciones, enfermedades autoinmunes y cáncer, incluido el cáncer de mama, se caracterizan por un mayor número de VEs en sangre periférica [163-165]. Mediante resultados previamente reportados, demostramos, a través del uso del citómetro FACScan (Dako Cytomations) [162], que la estimulación de las células MDA-MB-231 con 90 μM de AL, no induce un aumento en el número de VEs en medios condicionados, comparado con células MDA-MB-231 no estimuladas. Sin embargo, en una caracterización adicional utilizando el citómetro BD LSRFortessa, en este estudio, demostramos, en contraste con nuestros resultados anteriores, que la estimulación con AL sobre células MDA-MB-231 induce eficazmente un aumento en el número de VEs en los medios condicionados. En relación a estas

observaciones y dado que el citómetro FACScan no es capaz de detectar a las VEs más pequeñas (exosomas), proponemos que el tratamiento sobre células MDA-MB-231 con AL induce principalmente un aumento en la secreción de exosomas. Razón por la que anteriormente no encontramos ningún aumento en el número de VEs en los medios condicionados. Apoyando nuestra propuesta, el análisis mediante NTA de medios condicionados muestran que el tratamiento de células MDA-MB-231 con AL induce un aumento en la secreción de VEs de tamaños entre 30-350 nm.

La angiogénesis es un proceso que involucra una variedad de factores que incluyen la comunicación entre las células endoteliales (CE) y su microambiente, factores paracrinós, interacciones célula a célula y unión de las CE a la MEC [104, 166]. Durante la angiogénesis, las CE brotan y crecen hacia el estímulo angiogénico, implicando una variedad de procesos que incluyen la proliferación de CE, degradación de la membrana basal de los vasos, migración, sobrevivencia y la diferenciación de células endoteliales, las cuales se organizan y forman estructuras tubulares que eventualmente se unirán, para finalizar con la formación de vasos sanguíneos [167]. De acuerdo con esos preceptos, ahora revelamos que las VEs liberadas por las células epiteliales pueden estimular la angiogénesis probablemente en los vasos vecinos. El mecanismo subyacente al proceso necesita una mayor aclaración, pero podría implicar la estimulación o inhibición, que depende de su origen, carga y estímulo utilizado para inducir la liberación de estas [166, 168]. De acuerdo con esos antecedentes, demostramos que las VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen migración, secreción de MMP-9, aumento de secreción de MMP-2, invasión, proliferación y angiogénesis en células HUVEC comparado con los efectos de VEs obtenidas de células MDA-MB-231 no estimuladas. Además, las células de cáncer de mama MCF-7, las cuales expresan receptores de estrógeno y progesterona fueron estimuladas con VEs-AL favoreciendo la migración en las células HUVEC. Estos resultados sugieren fuertemente que el tratamiento con AL induce la liberación de VEs que median los procesos celulares involucrados en la angiogénesis en diferentes tipos de células de cáncer de mama, incluidas las células TNBC; MDA-MB-231 y las

células de cáncer de mama MCF-7. De acuerdo con esta idea, informes anteriores demuestran que las MVs obtenidas de células MDA-MB-231 promueven la activación de los receptores de VEGF y la angiogénesis tumoral a través de una forma única de 90 kDa de VEGF (VEGF90K) [110]. Por lo tanto, es fácil especular que el AL pueda promover la formación y liberación de VEs que expresen una gran variedad de factores pro-angiogénicos, que inducen procesos biológicos endoteliales acompañando al proceso angiogénico per se. Por el contrario, las VEs de células MDA-MB-231 no estimuladas, expresan niveles muy bajos de factores angiogénicos y, por lo tanto, median la angiogénesis más lentamente. Apoyando nuestra propuesta, también demostramos que las VEs secretadas por células MDA-MB-231 no estimuladas expresan niveles bajos de VEGF y la estimulación de estas células con AL induce un aumento en la expresión de VEGF en las VEs.

El microambiente del cáncer de mama está compuesto por una variedad de células que incluyen; células cancerosas, fibroblastos, leucocitos, adipocitos, células mioepiteliales y endoteliales, además de una variedad de componentes, tales como MEC, citocinas, hormonas, factores de crecimiento y enzimas [169]. Para determinar si las VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL pueden inducir proliferación en ausencia o presencia de una variedad de citocinas, hormonas y factores de crecimiento, determinamos dicho proceso celular en ausencia y/o presencia de SFB en células HUVEC. Nuestros resultados demuestran que las VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen una fuerte proliferación en ausencia y en presencia de SFB en las células HUVEC. Estos resultados apoyan la propuesta de que las VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL juegan un papel importante en el proceso de angiogénesis en el tumor. Pero, además, nos sugiere que el AL podrían estar induciendo cambios en las células secretoras, de tal manera que modifican los cargos moleculares que son secretados a través de VEs, las cuales comunican a células HUVEC favoreciendo la proliferación de estas, incluso en niveles similares a lo observado en presencia de SFB, esto con respecto a los resultados observados cuando se estimula con VEs Control.

Durante la angiogénesis, las CE son móviles e invasivas, razón por la cual forman numerosos filopodios. Las cinasas FAK y Src están implicadas en la tumorigénesis y la metástasis, debido a que median la supervivencia, la migración, la invasión, la angiogénesis y el proceso de TEM [170]. La activación de FAK está mediada por la autofosforilación en Tyr-397, creando un sitio de unión para las cinasas de la familia Src y promueve la formación del complejo FAK-Src. Src fosforila a FAK en otros residuos de Tyr, incluidos Tyr-576 y Tyr-577, que activa las vías de transducción de señales descendentes que modulan varios procesos biológicos, incluida la migración e invasión [171, 172]. Nuestros hallazgos demuestran que las VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen activación de FAK y Src a tiempos cortos y largos de estimulación en células HUVEC. Además, las VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen la migración a través de la actividad de FAK y Src en las células HUVEC. En concordancia con nuestros resultados, en otros modelos se ha reportado que, los exosomas del plasma de mujeres sanas inducen la activación de FAK en células MDA-MB-231, mientras que las VEs obtenidas de fibroblastos inducen un fenotipo invasivo a través de la activación de FAK y Src en fibroblastos receptores [173, 174]. Dado que la angiogénesis requiere migración e invasión de CE, proponemos que las VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen la angiogénesis a través de la actividad de FAK y Src en células HUVEC. Apoyando nuestra propuesta, demostramos previamente que las VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen migración e invasión en células epiteliales mamarias MCF10A [162, 175]. Sin embargo, no se puede descartar la implicación de un sistema más complejo en el proceso. De hecho, nuestros resultados muestran que las VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL estimularon la liberación de MMP-2 y -9, dos metaloproteasas que se han relacionado directamente con la invasión celular río abajo de Src [176]. Además, dado que la activación de FAK y Src mostró disparidades a lo largo del tiempo en las células HUVEC estimuladas con VEs, proponemos que se establece una interacción compleja entre ambas proteínas durante la angiogénesis y este mecanismo podría ser esencial en el proceso de migración e invasión [174, 177], así como también en el proceso de TEM en células epiteliales mamarias [162,

175]. Por lo tanto, la activación de FAK y Src debido a las VEs liberadas por las células tumorales mamarias expuestas a AL podrían estar mediando el mantenimiento y desarrollo del tumor mamario.

FFAR1 y FFAR4 son receptores acoplados a proteínas G (GPCR) activados por ácidos grasos de cadena media y larga y expresados en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7, además de células epiteliales mamarias humanas MCF10A [56, 57, 59, 60]. En particular, el AL media la migración, invasión, un aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico, la activación de la vía PLD y PI3K/Akt a través de FFAR1 acoplado a Gi/Go y/o FFAR4 acoplado a proteínas Gq/11 en células de cáncer de mama [56, 60, 178-181]. Así mismo el AL induce una elevación de Ca^{2+} citosólico a través de FFAR1 y Gi/Go en células MCF-7, y el ácido oleico induce la proliferación a través de FFAR1 y Gi/Go en células MDA-MB-231 [180, 182]. En este estudio demostramos que el AL, a través de la activación de FFAR1 y FFAR4, induce la liberación de VEs secretadas por células MDA-MB-231 que median la migración en células HUVEC. Dado que la angiogénesis requiere migración celular, proponemos que las VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen la angiogénesis a través de la activación de FFAR1/FFAR4 y la consecuente activación de Gq/11, Gi/Go en células HUVEC. Se ha demostrado que las VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen la migración y un proceso similar a la TEM en células epiteliales mamarias no tumorigénicas MCF10A [162]. Curiosamente, las VEs de células MDA-MB-231 tratadas con ácido oleico no son capaces de inducir migración en células epiteliales mamarias MCF10A [162]. Por tanto, proponemos que los ácidos grasos libres inducen la liberación de VEs con cargos específicos en células de cáncer de mama, que son capaces de mediar respuestas celulares específicas en otros tipos celulares, como las células MFC10A y las células HUVEC.

Las VEs han sido activamente liberadas dentro del microambiente tumoral con papeles pleiotrópicos en el crecimiento tumoral y metástasis, incluyendo angiogénesis y modulación inmune. Sin embargo, las funciones y el subyacente mecanismo de liberación de exosomas mediante células de cáncer de mama expuestas al tratamiento con AL se mantiene desconocido. Recientes estudios

han mostrado que las VEs median la comunicación célula-célula mediante la transferencia horizontal de RNAs y proteínas, las cuales juegan un significativo papel en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo el cáncer [142, 183-185]. En este estudio nosotros investigamos el mecanismo de señalización que es activado sobre células secretoras (MDA-MB-231) cuando estas son expuestas al tratamiento con AL, además, los cambios proteicos dentro de VEs, cambios proteicos generados sobre células receptoras (HUVEC) y su efecto funcional.

Con base a las evidencias que determinan nuevos sitios de fosforilación no canónicos de la proteína β -catenina, efector clave en la cascada de señalización de Wnt [186] y los antecedentes que demuestran la implicación de esta vía en angiogénesis. En nuestros resultados determinamos que el AL expuesto sobre células MDA-MB-231 incrementa los niveles proteicos de β -catenina fosforilada en Ser 552 y 675 a las 6 horas después del estímulo. Además, esta proteína fosforilada se localiza preferentemente en la parte citoplasmática y peri-nuclear de las células. Adicionalmente, demostramos que las VEs liberadas por células MDA-MB-231 bajo el estímulo con AL durante 6 y 48 horas, fueron enriquecidas también con β -catenina fosforilada en Ser 552 y 675. Nosotros proponemos que la fosforilación en estos residuos no canónicos de β -catenina en células MDA-MB-231 bajo el estímulo con AL se llevan a cabo a través de la activación de GPR40 y 120 los cuales, a través de las proteínas G α q/11, dímero $\beta\gamma$ y/o trans-activaciones con otros receptores, conducen a la activación de AKT y PKA, induciendo la fosforilación de β -catenina en ser 552 y 675, respectivamente, favoreciendo así, los cambios en su localización subcelular, permitiendo por un lado, su acumulación en el citoplasma y núcleo, regulando la transcripción de genes blanco de la vía de Wnt y por otro lado favoreciendo la selección de cargos y el direccionamiento de los cuerpos multivesiculares hacia la membrana celular para su posterior liberación de VEs a través de una posible asociación con las proteínas 14-3-3. Sin embargo, se requiere realizar experimentos adicionales para sustentar esta hipótesis [140, 141, 179, 186]. Así mismo, determinamos que las VEs-AL expuestas sobre células receptoras (HUVEC) incrementan los niveles proteicos de

wnt3a, wnt5a y β -catenina total en disparidad de tiempos. En ese sentido, se ha reportado que durante el proceso angiogénico se requiere de cambios en la morfología de las células endoteliales a través del proceso de Transición Endotelio Mesénquima en donde las uniones adherentes lideradas principalmente por la expresión de VE-cadherina, se encuentran disminuidas y esto le permite a las células endoteliales, tener un fenotipo alargado, facilitando la migración e invasión de las células rumbo a la formación de nuevos vasos, sin embargo, una vez que es suficiente el reclutamiento de las células rumbo a la formación de la nueva vasculatura, la morfología de las células, experimentan un nuevo cambio a través del proceso de Transición-Mesénquima-Endotelio [142, 187-192]. En ese tenor y considerando que se ha reportado que, la proteína wnt3a participa principalmente en la proliferación y wnt5a en la diferenciación celular, proponemos que a las 6 horas post-estímulo sobre células endoteliales, el incremento en los niveles de wnt3a se deba a la señalización que lleva a cabo para la proliferación de las mismas, efecto celular que evaluamos en este estudio, y el segundo pico de expresión de wnt3a observado a las 24 y 30 horas se deba a que, esta induce la actividad de wnt5a favoreciendo ahora la diferenciación celular a través de la secreción de calcio. Este incremento de la secreción de calcio podría estar asociándose a las cadherinas que a su vez interaccionan con la proteína β -catenina, de esta manera mantiene las uniones celulares para que los vasos sanguíneos se formen. Sin embargo, el incremento en los niveles proteicos de β -catenina podría tener otra participación en los efectos celulares endoteliales considerando que las VEs-AL llevan como cargo a la proteína β -catenina fosforilada en ser 552 y 675, por lo cual, resultaría importante evaluar los niveles de VE-cadherina y β -catenina fosforilada en células blanco, así como también su localización subcelular en las mismas.

Para reforzar la idea respecto a la participación de β -catenina en la regulación de angiogénesis, demostramos que las VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL promueven migración inducida por la señalización de β -catenina en células endoteliales. Evidenciando que las VEs median la señalización de la vía Wnt/ β -catenina en células endoteliales posiblemente a través de su

translocación al núcleo favoreciendo la interacción con factores de transcripción que regulan la expresión de genes blanco de la vía, potenciando la migración endotelial. En resumen, demostramos que el AL induce la liberación de VEs de las células MDA-MB-231 que a su vez son responsables de inducir migración, invasión y angiogénesis en células endoteliales a través de la señalización de wnt/ β -catenina. Por lo tanto, nuestros hallazgos respaldan el papel del AL como actor fundamental en la formación y el desarrollo del cáncer de mama.

Las vesículas extracelulares (VEs) derivadas del cáncer contienen varias moléculas asociadas al tumor, como proteínas con mutaciones, oncoproteínas sobreexpresadas, glicoproteínas, ARNm, ARN no codificantes y fragmentos de ADN. Se ha demostrado que, al liberar su contenido a células blanco, propagan características fenotípicas, favoreciendo resistencia a los medicamentos, aumento en la tasa de proliferación e invasividad en las células cancerosas y media la inmunosupresión inducida por cáncer. Por lo tanto, Las VEs derivadas del cáncer han ganado una atención cada vez mayor como biomarcadores y dianas terapéuticas. A diferencia de las células tumorales circulantes, las VEs son muy abundantes en biofluidos y protegen su carga molecular contra la degradación y pueden acarrear moléculas asociadas con fenotipos específicos [193]. Los métodos invasivos y el dolor que causa a los pacientes la obtención de muestras a través de biopsias de tejidos, inhiben el uso rutinario de procedimientos para el diagnóstico y la vigilancia del cáncer. En ese sentido y con la intención de abordar con mayor claridad la importancia en la comunicación intercelular regulada por VEs obtenidas de suero de pacientes con CaMa y su papel en angiogénesis, en este trabajo, en primera instancia, determinamos el número de VEs presentes en suero de mujeres mexicanas con/sin cáncer de mama. El método de aislamiento de VEs utilizado permite eliminar las VEs de origen plaquetario, puesto que estas representan la mayoría ($\approx 80\%$) de VEs presentes en el plasma [194]. Nuestros resultados demostraron que el número de VEs presentes en plasma de mujeres con cáncer mamario es significativamente mayor con respecto a mujeres sanas del grupo control. Además, las VEs obtenidas de plasma de pacientes con CaMa presentan un tamaño de entre 71-128 nm y las VEs de pacientes control de 176 a

248 nm. Proponemos que las células de CaMa median principalmente la comunicación entre las células tumorales y el estroma a través de la liberación y captación de exosomas. Como sustento a la propuesta, se ha demostrado que el número de VEs se encuentra elevado en pacientes con cáncer gástrico en diferentes estadios, con respecto al grupo control [194]. Así mismo, estos hallazgos concuerdan con lo anteriormente reportado por nuestro grupo de trabajo en donde se demostró que pacientes con cáncer mamario en los estadios I a IV las células cancerosas secretan mayores cantidades de VEs a la circulación [163]. La angiogénesis comprende cuatro pasos secuenciales: a) Degradación de la membrana basa y la matriz extracelular, b) Activación y migración de las células endoteliales, c) Proliferación de las células endoteliales y d) Las células endoteliales se transforman en estructuras en forma de tubo y forman tubos capilares [17, 195]. Nuestros hallazgos demuestran que las VEs de mujeres con CaMa en diferentes estadios clínicos de la enfermedad y tumores con expresión diferencial de los receptores; RE, RP y Her2/neu median la migración diferencial en células HUVEC.

La migración de células endoteliales es esencial para la angiogénesis. Este proceso móvil está regulado direccionalmente por estímulos quimiotácticos, haptotácticos y mecanotácticos y además implica la degradación de la matriz extracelular para permitir la progresión de las células migratorias [196]. Nuestros hallazgos demuestran que la migración de células HUVEC inducida por VEs obtenidas de plasma de pacientes con CaMa también está relacionada con el tamaño de los tumores (T2-T4); sin embargo, la migración no está relacionada con la invasión de los ganglios linfáticos y la metástasis, esto debido a que los hallazgos muestran migración en N0 y M0. Además, las VEs de pacientes control, no inducen migración de células HUVEC, efecto similar a lo observado en células no tratadas (basal). Curiosamente, las VEs de cáncer de mama en estadio I y tumores T1 no inducen la migración de células HUVEC. Dado que, el estadio I es el estadio más temprano de cáncer de mama invasivo, donde el tumor tiene 2 cm o menos y/o pequeños grupos de células cancerosas que se encuentran en ganglios linfáticos que miden no más de 2 mm, además, T1 corresponde a un

tumor con un tamaño de 2 cm o menos [197]. Proponemos que las mujeres con CaMa durante las primeras etapas de la neoplasia liberan VEs sin factores angiogénicos o niveles muy bajos de estos, los cuales no son capaces de mediar la migración de células endoteliales ni angiogénesis. Por el contrario, las mujeres con CaMa durante los estadios II-IV y los tamaños de tumor T2-T4 liberan VEs que median la migración de células endoteliales y en seguida, median el proceso angiogénico.

Durante el brote angiogénico, las células endoteliales secretan proteasas que degradan la membrana basal, la matriz extracelular y posteriormente brotan y crecen hacia el gradiente de factores angiogénicos [198]. En este proyecto demostramos que VEs de mujeres sanas inducen invasión y angiogénesis de una manera similar a las células no tratadas (basal), mientras que, las VEs obtenidas de pacientes con CaMa favorecen significativamente la invasión y angiogénesis en células HUVEC. Además, las VEs de mujeres con CaMa en estadio II y III incrementan la invasión y angiogénesis de manera similar. Interesantemente las VEs obtenidas de pacientes con CDIS inducen angiogénesis similar a lo observado cuando estimulamos a células HUVEC con VEs control o células sin tratamiento. Dado que el CDIS es una proliferación neoplásica de células epiteliales ductales mamarias confinadas al sistema ductal-lobulillar sin invasión de la membrana basal [199], proponemos que solo las VEs secretadas por pacientes con CaMa de tumores invasivos liberan VEs que inducen la invasión y luego la angiogénesis. Apoyando nuestra propuesta, en este mismo trabajo demostramos que las VEs de CaMa MDA-MB-231 estimuladas con AL incrementan la secreción de MMP-2 y MMP-9, invasión y angiogénesis, mientras que los exosomas hipóxicos de las células cancerosas esofágicas promueven la invasión y angiogénesis en células HUVEC [200].

El inicio y la progresión de la angiogénesis tumoral se debe principalmente a factores de crecimiento pro-angiogénicos, incluidos VEGF, FGF, EGF y factor de crecimiento derivado de plaquetas [17, 195] y Nuestros hallazgos demuestran que las VEs de CaMa en diferentes etapas clínicas de la enfermedad expresan niveles diferenciales de VEGF, FGF y EGF. Con este conjunto de resultados, proponemos

que existen variaciones en los cargos moleculares que van inmersos en las VEs y estos cambios son dependientes de la etapa clínica de la enfermedad, características moleculares y estructurales del tumor, esto debido a la estrecha comunicación del microambiente tumoral; entre todas las células, vías de señalización, MMPs y citosinas involucradas que desde su funcionamiento juegan un papel clave en la agresividad del tumor, siendo estas, características que hacen que los tratamientos tengan éxito o no en las pacientes. Aunado a esto, proponemos que en mujeres mexicanas con cáncer mamario en los diferentes estadios (I a IV) las células cancerosas secretan mayores cantidades de VEs a la circulación, en donde las VEs inducen múltiples procesos de progresión tumoral como angiogénesis, resistencia a la respuesta inmune antitumoral, invasión y metástasis. Como sustento a la propuesta, se ha demostrado que la cantidad de VEs secretadas por células tumorales se correlaciona con la capacidad invasiva y metastásica [201, 202]. Además, en otro estudio se demostró que en comparación con el grupo control, el número de VEs en pacientes con cáncer gástrico está significativamente elevada en todas las etapas clínicas [116, 203].

La cantidad de VEs liberadas por las células tumorales se ha correlacionado con su invasividad *in vitro* e *in vivo*, así como el hecho de que las cargas moleculares en VEs median la transferencia de estas a células adyacentes o distantes participando en diversas etapas permitiendo la progresión del tumor, incluida la angiogénesis [145, 204] Con base a estos antecedentes, en este trabajo demostramos que las VEs obtenidas del plasma de pacientes con CaMa inducen invasión de células endoteliales siendo más evidente en VEs obtenidas en etapa II de la enfermedad, para soportar estos resultados, observamos, además, que estas VEs obtenidas de pacientes, inducen un incremento en la secreción de MMP-9. Proponemos que las VEs llevan como cargo proteínas de adhesión celular y MMPs que una vez colocadas sobre células endoteliales, transfieren sus cargos y modifican la señalización de estas, permitiendo la secreción de MMPs, facilitando la degradación de la MEC lo cual permite que las células invadan hacia la formación de la nueva vasculatura. Para respaldar nuestra propuesta, se ha demostrado que, en tumores de línea celular de cáncer de colon mediante el

análisis proteómico cuantitativo, demostraron que los exosomas son VEs enriquecidas de proteínas que participan en uniones célula-célula, adhesión célula- matriz extracelular, maquinaria que participa en la biogénesis de los exosomas y proteínas de vías de señalización, por su parte, la población de MVs son enriquecidas con proteínas asociadas al metabolismo [205]. Además, investigaciones recientes de perfiles proteicos han revelado la presencia de metaloproteinasas como las metaloproteinasas de matriz (MMP) en VEs de varios tipos de células y fluidos corporales. Las MMP asociadas a las VEs pueden alterar los cargos de las VEs mediante el desprendimiento del ectodominio, ejerciendo una actividad proteolítica o contribuyendo directamente a la degradación de las proteínas de la matriz extracelular que rodean las células favoreciendo eventos de migración e invasión en células tumorales [206, 207].

Las VEs ofrecen un panorama "Instantáneo" de sus células precursoras en tiempo real y contienen una colección rica en información de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, etc. El análisis de la fosforilación de proteínas, como un marcador de la señalización celular y la progresión de la enfermedad podría ser un importante trampolín para aplicaciones exitosas mediante la obtención de suero, plasma, biopsia líquida y otro fluidos corporales [208] Con ese enfoque, nosotros observamos que en VEs obtenidas de mujeres con CaMa únicamente en estadio III y IV se expresa significativamente la proteína β -Catenina fosforilada en Ser 675, siendo este, un hallazgo importante debido a que por primera vez se reporta la participación de esta proteína fosforilada y nos abre el panorama para incrementar el número de muestras a evaluar y poder analizar otros posibles candidatos que pudieran expresarse de forma variable de acuerdo a la etapa clínica de la enfermedad y conocer sus funciones celulares. Por ello, proponemos que las VEs presentes en mujeres con cáncer mamario en etapas tardías median comunicación intercelular a través de la transferencia de β -Catenina P-Ser 675, regulando procesos involucrados en la migración e invasión de células endoteliales, siendo estos, eventos celulares finales para la formación de la neovasculatura y en consecuencia una etapa previa a la metástasis.

En resumen, las VEs secretadas por células MDA-MB-231 estimuladas con AL y VEs de mujeres con CaMa en diferentes etapas clínicas, promueven procesos celulares involucrados en angiogénesis, participando activamente la proteína β -catenina

X CONCLUSIONES

- Las VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL ejercen efectos pro-angiogénicos (proliferación, migración, invasión y angiogénesis) sobre células endoteliales
- El AL induce la fosforilación y localización citoplásmica / peri-nuclear de P- β -Catenina (552 y 675) sobre células MDA-MB-231.
- Las VEs secretadas por células MDA-MB-231 estimuladas con AL, llevan como cargo a la proteína VEGF y P- β -Catenina (552 y 675).
- VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen incremento en los niveles proteicos de Wnt3a, Wnt5a, p-Src, p-FAK y β -Catenina en células HUVEC.
- El proceso de migración de células HUVEC inducido por VEs secretadas por células MDA-MB-231 estimuladas con AL es regulado a través de la línea; GPR40/GPR120 en células secretoras y β -Catenina, pFAK y pSrc en células receptoras
- VEs obtenidas de plasma de pacientes con CaMa llevan como cargo a la proteína β -Catenina p675, VEGF, EGF y FGF e inducen efectos pro-angiogénicos variables de acuerdo al estadio clínico de la enfermedad

XI.- REFERENCIAS

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
2. McGranahan, N. and C. Swanton, *Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future*. Cell, 2017. **168**(4): p. 613-628.
3. Klein, C.A., *Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization*. Nat Rev Cancer, 2020. **20**(11): p. 681-694.
4. Salk, J.J., E.J. Fox, and L.A. Loeb, *Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 51-75.
5. Ciccia, A. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: making it safe to play with knives*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 179-204.
6. Negrini, S., V.G. Gorgoulis, and T.D. Halazonetis, *Genomic instability--an evolving hallmark of cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(3): p. 220-8.
7. Cheng, N., et al., *Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(10): p. 1521-33.
8. Chatterjee, N. and G.C. Walker, *Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis*. Environ Mol Mutagen, 2017. **58**(5): p. 235-263.
9. Wu, W.K., et al., *The autophagic paradox in cancer therapy*. Oncogene, 2012. **31**(8): p. 939-53.
10. Galluzzi, L. and G. Kroemer, *Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis*. Cell, 2008. **135**(7): p. 1161-3.
11. Greten, F.R. and S.I. Grivennikov, *Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences*. Immunity, 2019. **51**(1): p. 27-41.
12. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. **140**(6): p. 883-99.
13. Shields, J.D., et al., *Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21*. Science, 2010. **328**(5979): p. 749-52.
14. Thommen, D.S. and T.N. Schumacher, *T Cell Dysfunction in Cancer*. Cancer Cell, 2018. **33**(4): p. 547-562.
15. Singh, R., M.K. Mishra, and H. Aggarwal, *Inflammation, Immunity, and Cancer*. Mediators Inflamm, 2017. **2017**: p. 6027305.
16. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
17. Lugano, R., M. Ramachandran, and A. Dimberg, *Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities*. Cell Mol Life Sci, 2020. **77**(9): p. 1745-1770.
18. Ali, S. and R.C. Coombes, *Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(2): p. 101-12.
19. Hansen, R.K. and M.J. Bissell, *Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones*. Endocr Relat Cancer, 2000. **7**(2): p. 95-113.
20. McSherry, E.A., et al., *Molecular basis of invasion in breast cancer*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(24): p. 3201-18.
21. Place, A.E., S. Jin Huh, and K. Polyak, *The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(6): p. 227.
22. Polyak, K., *Breast cancer: origins and evolution*. J Clin Invest, 2007. **117**(11): p. 3155-63.

23. Palmieri, D., et al., *The biology of metastasis to a sanctuary site*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(6): p. 1656-62.
24. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 563-72.
25. Deryugina, E.I. and J.P. Quigley, *Matrix metalloproteinases and tumor metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(1): p. 9-34.
26. Ferlay, J., et al., *Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods*. Int J Cancer, 2019. **144**(8): p. 1941-1953.
27. Tao, Z., et al., *Breast Cancer: Epidemiology and Etiology*. Cell Biochem Biophys, 2015. **72**(2): p. 333-8.
28. Winters, S., et al., *Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2017. **151**: p. 1-32.
29. INEGI, *Statistics about the world day against cancer national data*. INEGI. 2011.
30. Bright, K., et al., *The role of health system factors in delaying final diagnosis and treatment of breast cancer in Mexico City, Mexico*. Breast, 2011. **20 Suppl 2**: p. S54-9.
31. Russo, J., et al., *Cancer risk related to mammary gland structure and development*. Microsc Res Tech, 2001. **52**(2): p. 204-23.
32. Barnard, M.E., C.E. Boeke, and R.M. Tamimi, *Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1856**(1): p. 73-85.
33. Vogel, V.G., *Breast cancer prevention: a review of current evidence*. CA Cancer J Clin, 2000. **50**(3): p. 156-70.
34. Toniolo, P.G., et al., *A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(3): p. 190-7.
35. Hankinson, S.E., et al., *Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(17): p. 1292-9.
36. Kaaks, R., et al., *Serum sex steroids in premenopausal women and breast cancer risk within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(10): p. 755-65.
37. Feigelson, H.S. and B.E. Henderson, *Estrogens and breast cancer*. Carcinogenesis, 1996. **17**(11): p. 2279-84.
38. Nathanson, K.L., R. Wooster, and B.L. Weber, *Breast cancer genetics: what we know and what we need*. Nat Med, 2001. **7**(5): p. 552-6.
39. Maccio, A. and C. Madeddu, *Obesity, inflammation, and postmenopausal breast cancer: therapeutic implications*. ScientificWorldJournal, 2011. **11**: p. 2020-36.
40. Venkitaraman, A.R., *Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2*. Cell, 2002. **108**(2): p. 171-82.
41. Rodriguez-Cuevas, S., C.G. Macias Martinez, and S. Labastida Almendaro, *[Breast cancer in Mexico. Is it a young women disease?]*. Ginecol Obstet Mex, 2000. **68**: p. 185-90.
42. Wu, A.H., M.C. Pike, and D.O. Stram, *Meta-analysis: dietary fat intake, serum estrogen levels, and the risk of breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(6): p. 529-34.
43. Calle, E.E. and R. Kaaks, *Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(8): p. 579-91.
44. Pariza, M.W., *Calorie restriction, ad libitum feeding, and cancer*. Proc Soc Exp Biol Med, 1986. **183**(3): p. 293-8.
45. Welsch, C.W., *Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: a review and critique*. Cancer Res, 1992. **52**(7 Suppl): p. 2040s-2048s.
46. Sun, Y.S., et al., *Risk Factors and Preventions of Breast Cancer*. Int J Biol Sci, 2017. **13**(11): p. 1387-1397.

47. Allinen, M., et al., *Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer*. *Cancer Cell*, 2004. **6**(1): p. 17-32.
48. Benatti, P., et al., *Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties*. *J Am Coll Nutr*, 2004. **23**(4): p. 281-302.
49. Arab, L., *Biomarkers of fat and fatty acid intake*. *J Nutr*, 2003. **133** Suppl 3: p. 925S-932S.
50. Das, U.N., *Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology*. *Biotechnol J*, 2006. **1**(4): p. 420-39.
51. Prentki, M. and S.R. Madiraju, *Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease*. *Endocr Rev*, 2008. **29**(6): p. 647-76.
52. Khan, S.A. and J.P. Vanden Heuvel, *Role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids (review)*. *J Nutr Biochem*, 2003. **14**(10): p. 554-67.
53. Jump, D.B., *Fatty acid regulation of gene transcription*. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2004. **41**(1): p. 41-78.
54. Matsuoka, T., et al., *Elevated dietary linoleic acid increases gastric carcinoma cell invasion and metastasis in mice*. *Br J Cancer*, 2010. **103**(8): p. 1182-91.
55. Tanaka, T., et al., *Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2008. **377**(4-6): p. 523-7.
56. Hirasawa, A., et al., *Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120*. *Nat Med*, 2005. **11**(1): p. 90-4.
57. Briscoe, C.P., et al., *The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(13): p. 11303-11.
58. Wettschureck, N. and S. Offermanns, *Mammalian G proteins and their cell type specific functions*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(4): p. 1159-204.
59. Navarro-Tito, N., T. Robledo, and E.P. Salazar, *Arachidonic acid promotes FAK activation and migration in MDA-MB-231 breast cancer cells*. *Exp Cell Res*, 2008. **314**(18): p. 3340-55.
60. Soto-Guzman, A., et al., *Oleic acid induces ERK1/2 activation and AP-1 DNA binding activity through a mechanism involving Src kinase and EGFR transactivation in breast cancer cells*. *Mol Cell Endocrinol*, 2008. **294**(1-2): p. 81-91.
61. Barcellos-Hoff, M.H., D. Lyden, and T.C. Wang, *The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(7): p. 511-8.
62. Camussi, G., et al., *Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication*. *Kidney Int*, 2010. **78**(9): p. 838-48.
63. Turturici, G., et al., *Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014. **306**(7): p. C621-33.
64. Raposo, G. and W. Stoorvogel, *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. *J Cell Biol*, 2013. **200**(4): p. 373-83.
65. Vader, P., X.O. Breakefield, and M.J. Wood, *Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy*. *Trends Mol Med*, 2014. **20**(7): p. 385-93.
66. Kalra, H., G.P. Drummen, and S. Mathivanan, *Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(2): p. 170.
67. Mathivanan, S., H. Ji, and R.J. Simpson, *Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication*. *J Proteomics*, 2010. **73**(10): p. 1907-20.
68. van Doormaal, F.F., et al., *Cell-derived microvesicles and cancer*. *Neth J Med*, 2009. **67**(7): p. 266-73.
69. Ratajczak, J., et al., *Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication*. *Leukemia*, 2006. **20**(9): p. 1487-95.

70. Vlassov, A.V., et al., *Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1820**(7): p. 940-8.
71. Pegtel, D.M. and S.J. Gould, *Exosomes*. *Annu Rev Biochem*, 2019. **88**: p. 487-514.
72. Hurley, J.H., *ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies*. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(1): p. 4-11.
73. Hanson, P.I. and A. Cashikar, *Multivesicular body morphogenesis*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2012. **28**: p. 337-62.
74. Yang, J., et al., *High expression of small GTPase Rab3D promotes cancer progression and metastasis*. *Oncotarget*, 2015. **6**(13): p. 11125-38.
75. Simpson, R.J., S.S. Jensen, and J.W. Lim, *Proteomic profiling of exosomes: current perspectives*. *Proteomics*, 2008. **8**(19): p. 4083-99.
76. Zhang, X., et al., *Exosomes in cancer: small particle, big player*. *J Hematol Oncol*, 2015. **8**: p. 83.
77. Parolini, I., et al., *Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(49): p. 34211-22.
78. Piccin, A., W.G. Murphy, and O.P. Smith, *Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications*. *Blood Rev*, 2007. **21**(3): p. 157-71.
79. Hendrix, A. and A.N. Hume, *Exosome signaling in mammary gland development and cancer*. *Int J Dev Biol*, 2011. **55**(7-9): p. 879-87.
80. Webber, J., et al., *Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation*. *Cancer Res*, 2010. **70**(23): p. 9621-30.
81. Orimo, A., et al., *Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion*. *Cell*, 2005. **121**(3): p. 335-48.
82. van Kilsdonk, J.W., et al., *Soluble adhesion molecules in human cancers: sources and fates*. *Eur J Cell Biol*, 2010. **89**(6): p. 415-27.
83. Angelucci, A., et al., *Vesicle-associated urokinase plasminogen activator promotes invasion in prostate cancer cell lines*. *Clin Exp Metastasis*, 2000. **18**(2): p. 163-70.
84. Baj-Krzyworzeka, M., et al., *Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes*. *Cancer Immunol Immunother*, 2006. **55**(7): p. 808-18.
85. Biswas, C., et al., *The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily*. *Cancer Res*, 1995. **55**(2): p. 434-9.
86. Andreola, G., et al., *Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles*. *J Exp Med*, 2002. **195**(10): p. 1303-16.
87. Huber, V., et al., *Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape*. *Gastroenterology*, 2005. **128**(7): p. 1796-804.
88. Kim, J.W., et al., *Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(3): p. 1010-20.
89. Safaei, R., et al., *Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells*. *Mol Cancer Ther*, 2005. **4**(10): p. 1595-604.
90. Shedden, K., et al., *Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles*. *Cancer Res*, 2003. **63**(15): p. 4331-7.

91. Adams, R.H. and K. Alitalo, *Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(6): p. 464-78.
92. Potente, M., H. Gerhardt, and P. Carmeliet, *Basic and therapeutic aspects of angiogenesis*. Cell, 2011. **146**(6): p. 873-87.
93. Stapor, P., et al., *Angiogenesis revisited - role and therapeutic potential of targeting endothelial metabolism*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 20): p. 4331-41.
94. Fraisl, P., et al., *Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism*. Dev Cell, 2009. **16**(2): p. 167-79.
95. Egginton, S. and R. Bicknell, *Advances in the cellular and molecular biology of angiogenesis*. Biochem Soc Trans, 2011. **39**(6): p. 1551-5.
96. Bouis, D., et al., *A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention*. Pharmacol Res, 2006. **53**(2): p. 89-103.
97. Chung, A.S., J. Lee, and N. Ferrara, *Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(7): p. 505-14.
98. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-95.
99. Yancopoulos, G.D., et al., *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 242-8.
100. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 653-60.
101. Ribatti, D., B. Nico, and E. Crivellato, *The development of the vascular system: a historical overview*. Methods Mol Biol, 2015. **1214**: p. 1-14.
102. Deryugina, E.I. and J.P. Quigley, *Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculature*. Matrix Biol, 2015. **44-46**: p. 94-112.
103. Folkman, J., *The role of angiogenesis in tumor growth*. Semin Cancer Biol, 1992. **3**(2): p. 65-71.
104. Webber, J., V. Yeung, and A. Clayton, *Extracellular vesicles as modulators of the cancer microenvironment*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **40**: p. 27-34.
105. Gangoda, L., et al., *Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: are they protective or pathogenic?* Proteomics, 2015. **15**(2-3): p. 260-71.
106. Zhang, B., et al., *Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/beta-catenin pathway*. Stem Cells Transl Med, 2015. **4**(5): p. 513-22.
107. Kim, C.W., et al., *Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin*. Cancer Res, 2002. **62**(21): p. 6312-7.
108. Skog, J., et al., *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(12): p. 1470-6.
109. Kucharzewska, P., et al., *Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(18): p. 7312-7.
110. Feng, Q., et al., *A class of extracellular vesicles from breast cancer cells activates VEGF receptors and tumour angiogenesis*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14450.
111. Al-Nedawi, K., et al., *Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(5): p. 619-24.
112. Al-Nedawi, K., et al., *Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(10): p. 3794-9.

113. Deregibus, M.C., et al., *Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA*. *Blood*, 2007. **110**(7): p. 2440-8.
114. Hong, B.S., et al., *Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells*. *BMC Genomics*, 2009. **10**: p. 556.
115. Kawamoto, T., et al., *Tumor-derived microvesicles induce proangiogenic phenotype in endothelial cells via endocytosis*. *PLoS One*. **7**(3): p. e34045.
116. Baran, J., et al., *Circulating tumour-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients*. *Cancer Immunol Immunother*, 2010. **59**(6): p. 841-50.
117. Galindo-Hernandez, O., et al., *Extracellular vesicles from women with breast cancer promote an epithelial-mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A*. *Tumour Biol*, 2015. **36**(12): p. 9649-59.
118. Yi, H., et al., *High-grade ovarian cancer secreting effective exosomes in tumor angiogenesis*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. **8**(5): p. 5062-70.
119. Abid Hussein, M.N., et al., *Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment*. *Thromb Haemost*, 2007. **98**(5): p. 1096-107.
120. Nusse, R., *Wnt signaling and stem cell control*. *Cell Res*, 2008. **18**(5): p. 523-7.
121. MacDonald, B.T., K. Tamai, and X. He, *Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases*. *Dev Cell*, 2009. **17**(1): p. 9-26.
122. Brennan, K.R. and A.M. Brown, *Wnt proteins in mammary development and cancer*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2004. **9**(2): p. 119-31.
123. Veeman, M.T., J.D. Axelrod, and R.T. Moon, *A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling*. *Dev Cell*, 2003. **5**(3): p. 367-77.
124. Kuhl, M., et al., *The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape*. *Trends Genet*, 2000. **16**(7): p. 279-83.
125. Willert, K. and K.A. Jones, *Wnt signaling: is the party in the nucleus?* *Genes Dev*, 2006. **20**(11): p. 1394-404.
126. Price, M.A., *CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling*. *Genes Dev*, 2006. **20**(4): p. 399-410.
127. Clevers, H. and R. Nusse, *Wnt/beta-catenin signaling and disease*. *Cell*, 2012. **149**(6): p. 1192-205.
128. Hatsell, S., et al., *Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2003. **8**(2): p. 145-58.
129. You, Z., et al., *Wnt signaling promotes oncogenic transformation by inhibiting c-Myc-induced apoptosis*. *J Cell Biol*, 2002. **157**(3): p. 429-40.
130. Wu, B., S.P. Crampton, and C.C. Hughes, *Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration*. *Immunity*, 2007. **26**(2): p. 227-39.
131. Howe, L.R., et al., *Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation*. *Cancer Res*, 2003. **63**(8): p. 1906-13.
132. Li, Y.J., et al., *Beta-catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: relationships with carcinogenesis and metastasis*. *World J Gastroenterol*, 2005. **11**(14): p. 2117-23.
133. Lin, S.Y., et al., *Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(8): p. 4262-6.
134. Chung, G.G., et al., *beta-Catenin and p53 analyses of a breast carcinoma tissue microarray*. *Cancer*, 2004. **100**(10): p. 2084-92.

135. Sorlie, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8418-23.
136. Yang, L., et al., *FZD7 has a critical role in cell proliferation in triple negative breast cancer*. Oncogene, 2011. **30**(43): p. 4437-46.
137. Mu, J., et al., *The repressive effect of miR-148a on Wnt/beta-catenin signaling involved in Glabridin-induced anti-angiogenesis in human breast cancer cells*. BMC Cancer, 2017. **17**(1): p. 307.
138. Song, X., et al., *Wogonin influences vascular permeability via Wnt/beta-catenin pathway*. Mol Carcinog, 2015. **54**(7): p. 501-12.
139. Yang, F., et al., *FBXW2 suppresses migration and invasion of lung cancer cells via promoting beta-catenin ubiquitylation and degradation*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 1382.
140. Fang, D., et al., *Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity*. J Biol Chem, 2007. **282**(15): p. 11221-9.
141. Taurin, S., et al., *Phosphorylation of beta-catenin by PKA promotes ATP-induced proliferation of vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **294**(5): p. C1169-74.
142. Huang, Z. and Y. Feng, *Exosomes Derived From Hypoxic Colorectal Cancer Cells Promote Angiogenesis Through Wnt4-Induced beta-Catenin Signaling in Endothelial Cells*. Oncol Res, 2017. **25**(5): p. 651-661.
143. Aranda, E. and G.I. Owen, *A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line*. Biol Res, 2009. **42**(3): p. 377-89.
144. Taniguchi-Ponciano, K., et al., *Proteomic and Transcriptomic Analysis Identify Spliceosome as a Significant Component of the Molecular Machinery in the Pituitary Tumors Derived from POU1F1- and NR5A1-Cell Lineages*. Genes (Basel), 2020. **11**(12).
145. Muralidharan-Chari, V., et al., *Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 10): p. 1603-11.
146. Lee, T.H., et al., *Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer--the emerging science of cellular 'debris'*. Semin Immunopathol, 2011. **33**(5): p. 455-67.
147. Slack-Davis, J.K., et al., *Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor*. J Biol Chem, 2007. **282**(20): p. 14845-52.
148. Hanke, J.H., et al., *Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation*. J Biol Chem, 1996. **271**(2): p. 695-701.
149. Hu, H., et al., *A novel class of antagonists for the FFAs receptor GPR40*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **390**(3): p. 557-63.
150. Sparks, S.M., et al., *Identification of diarylsulfonamides as agonists of the free fatty acid receptor 4 (FFA4/GPR120)*. Bioorg Med Chem Lett, 2014. **24**(14): p. 3100-3.
151. Katoh, M., *Multilayered prevention and treatment of chronic inflammation, organ fibrosis and cancer associated with canonical WNT/betacatenin signaling activation (Review)*. Int J Mol Med, 2018. **42**(2): p. 713-725.
152. Taurin, S., et al., *Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 2006. **281**(15): p. 9971-6.
153. Shang, S., F. Hua, and Z.W. Hu, *The regulation of beta-catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities*. Oncotarget, 2017. **8**(20): p. 33972-33989.
154. Gyorgy, B., et al., *Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(16): p. 2667-88.

155. Radisky, E.S. and D.C. Radisky, *Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**(2): p. 201-12.
156. Stallings-Mann, M. and D. Radisky, *Matrix metalloproteinase-induced malignancy in mammary epithelial cells*. Cells Tissues Organs, 2007. **185**(1-3): p. 104-10.
157. Binukumar, B. and A. Mathew, *Dietary fat and risk of breast cancer*. World J Surg Oncol, 2005. **3**: p. 45.
158. Abel, S., S. Riedel, and W.C. Gelderblom, *Dietary PUFA and cancer*. Proc Nutr Soc, 2014. **73**(3): p. 361-7.
159. Simopoulos, A.P., *The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(6): p. 674-88.
160. Kris-Etherton, P.M., et al., *Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(1 Suppl): p. 179S-88S.
161. Anderson, S.G., T.A. Sanders, and J.K. Cruickshank, *Plasma fatty acid composition as a predictor of arterial stiffness and mortality*. Hypertension, 2009. **53**(5): p. 839-45.
162. Galindo-Hernandez, O., et al., *Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with linoleic acid promote an EMT-like process in MCF10A cells*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2014. **91**(6): p. 299-310.
163. Galindo-Hernandez, O., et al., *Elevated concentration of microvesicles isolated from peripheral blood in breast cancer patients*. Arch Med Res, 2013. **44**(3): p. 208-14.
164. Von Buddenbrock, W., I. Mollerracke, and F. Schaller, *[New experiments on movements of optic peduncles in Carcinus maenas]*. Experientia, 1954. **10**(8): p. 333-4.
165. Distler, J.H., et al., *Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(11): p. 3337-48.
166. Todorova, D., et al., *Extracellular Vesicles in Angiogenesis*. Circ Res, 2017. **120**(10): p. 1658-1673.
167. Viallard, C. and B. Larrivee, *Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets*. Angiogenesis, 2017. **20**(4): p. 409-426.
168. Kikuchi, S., et al., *Involvement of Extracellular Vesicles in Vascular-Related Functions in Cancer Progression and Metastasis*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(10).
169. Soysal, S.D., A. Tzankov, and S.E. Muenst, *Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer*. Pathobiology, 2015. **82**(3-4): p. 142-52.
170. Zhao, X. and J.L. Guan, *Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(8): p. 610-5.
171. Parsons, J.T., et al., *Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5606-13.
172. Parsons, J.T., *Focal adhesion kinase: the first ten years*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 8): p. 1409-16.
173. Homoya, B.J., et al., *Uncertainty as a Key Influence in the Decision To Admit Patients with Transient Ischemic Attack*. J Gen Intern Med, 2019. **34**(9): p. 1715-1723.
174. Chanda, D., et al., *Fibronectin on the Surface of Extracellular Vesicles Mediates Fibroblast Invasion*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2019. **60**(3): p. 279-288.
175. Leal-Orta, E., et al., *Role of PI3K/Akt on migration and invasion of MCF10A cells treated with extracellular vesicles from MDA-MB-231 cells stimulated with linoleic acid*. J Cell Commun Signal, 2019. **13**(2): p. 235-244.
176. Kuo, L., et al., *Src oncogene activates MMP-2 expression via the ERK/Sp1 pathway*. J Cell Physiol, 2006. **207**(3): p. 729-34.

177. Shtam, T., et al., *Plasma exosomes stimulate breast cancer metastasis through surface interactions and activation of FAK signaling*. Breast Cancer Res Treat, 2019. **174**(1): p. 129-141.
178. Serna-Marquez, N., et al., *Linoleic acid induces migration and invasion through FFAR4- and PI3K-/Akt-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells*. Med Oncol, 2017. **34**(6): p. 111.
179. Diaz-Aragon, R., et al., *Role of phospholipase D in migration and invasion induced by linoleic acid in breast cancer cells*. Mol Cell Biochem, 2019. **457**(1-2): p. 119-132.
180. Yonezawa, T., K. Katoh, and Y. Obara, *Existence of GPR40 functioning in a human breast cancer cell line, MCF-7*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**(3): p. 805-9.
181. Miyauchi, S., et al., *Distribution and regulation of protein expression of the free fatty acid receptor GPR120*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2009. **379**(4): p. 427-34.
182. Hardy, S., et al., *Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40*. J Biol Chem, 2005. **280**(14): p. 13285-91.
183. Weis, S.M. and D.A. Cheresh, *Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1359-70.
184. Moriya, J. and T. Minamino, *Angiogenesis, Cancer, and Vascular Aging*. Front Cardiovasc Med, 2017. **4**: p. 65.
185. Cocucci, E., G. Racchetti, and J. Meldolesi, *Shedding microvesicles: artefacts no more*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(2): p. 43-51.
186. Dovrat, S., et al., *14-3-3 and beta-catenin are secreted on extracellular vesicles to activate the oncogenic Wnt pathway*. Mol Oncol, 2014. **8**(5): p. 894-911.
187. He, S., et al., *Wnt3a: functions and implications in cancer*. Chin J Cancer, 2015. **34**(12): p. 554-62.
188. Asem, M.S., et al., *Wnt5a Signaling in Cancer*. Cancers (Basel), 2016. **8**(9).
189. Jiang, L., et al., *Bach1 Represses Wnt/beta-Catenin Signaling and Angiogenesis*. Circ Res, 2015. **117**(4): p. 364-375.
190. Cooley, B.C., et al., *TGF-beta signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling*. Sci Transl Med, 2014. **6**(227): p. 227ra34.
191. Gurzu, S., et al., *Epithelial Mesenchymal and Endothelial Mesenchymal Transitions in Hepatocellular Carcinoma: A Review*. Biomed Res Int, 2019. **2019**: p. 2962580.
192. Sanchez-Duffhues, G., et al., *Inflammation induces endothelial-to-mesenchymal transition and promotes vascular calcification through downregulation of BMPR2*. J Pathol, 2019. **247**(3): p. 333-346.
193. Sadovska, L., J. Eglitis, and A. Line, *Extracellular Vesicles as Biomarkers and Therapeutic Targets in Breast Cancer*. Anticancer Res, 2015. **35**(12): p. 6379-90.
194. Banuelos, M.G., et al., *Genomic analysis of severe hypersensitivity to hygromycin B reveals linkage to vacuolar defects and new vacuolar gene functions in Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet, 2010. **56**(2): p. 121-37.
195. Li, T., et al., *Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer*. Oncol Lett, 2018. **16**(1): p. 687-702.
196. Lamalice, L., F. Le Boeuf, and J. Huot, *Endothelial cell migration during angiogenesis*. Circ Res, 2007. **100**(6): p. 782-94.
197. Sawaki, M., T. Shien, and H. Iwata, *TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group)*. Jpn J Clin Oncol, 2019. **49**(3): p. 228-231.
198. Gerhardt, H., et al., *VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia*. J Cell Biol, 2003. **161**(6): p. 1163-77.
199. Lee, C.S., *Breast cancer pathology*. Pathology, 2005. **37**(5): p. 339-40.

200. Mao, Y., et al., *Hypoxic exosomes facilitate angiogenesis and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma through altering the phenotype and transcriptome of endothelial cells*. J Exp Clin Cancer Res, 2019. **38**(1): p. 389.
201. Revenfeld, A.L., et al., *Diagnostic and prognostic potential of extracellular vesicles in peripheral blood*. Clin Ther, 2014. **36**(6): p. 830-46.
202. Minciacchi, V.R., M.R. Freeman, and D. Di Vizio, *Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **40**: p. 41-51.
203. Kim, H.K., et al., *Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor*. Eur J Cancer, 2003. **39**(2): p. 184-91.
204. D'Souza-Schorey, C. and J.W. Clancy, *Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers*. Genes Dev, 2012. **26**(12): p. 1287-99.
205. Jimenez, L., et al., *Quantitative Proteomic Analysis of Small and Large Extracellular Vesicles (EVs) Reveals Enrichment of Adhesion Proteins in Small EVs*. J Proteome Res, 2019. **18**(3): p. 947-959.
206. Shimoda, M., *Extracellular vesicle-associated MMPs: A modulator of the tissue microenvironment*. Adv Clin Chem, 2019. **88**: p. 35-66.
207. Campos, A., et al., *Caveolin-1-containing extracellular vesicles transport adhesion proteins and promote malignancy in breast cancer cell lines*. Nanomedicine (Lond), 2018. **13**(20): p. 2597-2609.
208. Iliuk, A., et al., *Plasma-Derived Extracellular Vesicle Phosphoproteomics through Chemical Affinity Purification*. J Proteome Res, 2020. **19**(7): p. 2563-2574.