



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Efecto de exosomas derivados de mamosferas y líneas celulares de cáncer de mama bajo un estímulo pro-inflmatorio por IL-6 e IL-8 en la angiogénesis

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

Biol. Exp. Laura Ivette Fernández Flores

Comité tutorial:

Co-Director Externo Dr. Eduardo García Zepeda

Co- Director Interno Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Asesor Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo

CDMX , Febrero 2017

Comité tutorial:

Co-Director Externo

Dr. Eduardo García Zepeda †

Departamento de Inmunología

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Universidad Nacional Autónoma de México

Co- Director Interno

Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular,

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

mkf@xanum.uam.mx

Asesora Externa

Dra. María Gloria Soldevila Malgarrejo

Departamento de Inmunología

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Universidad Nacional Autónoma de México

soldevi@servidor.unam.mx

Este trabajo fue realizado bajo la co-dirección del Dr. Eduardo García Zepeda y la co-dirección de la Dra. Mina Konigsberg Fainstein en el CBRL (Chemokine Biology Laboratory Research) en el Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT 570863 con CVU 636256 en el periodo 2014-2016.

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I

legq@xanum.uam.mx

Dra. Norma López

Departamento de Ciencias de la Salud UAM-I

norm@xanum.uam.mx

Dr. Benjamín Pérez

Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I

brian_may82@hotmail.com

Dra. Gloria

Departamento de Inmunología

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

soldevi@servidor.unam.mx

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobaron la Tesis Titulada “EFECTO DE EXOSOMAS DERIVADOS DE MAMOSFERAS Y LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA BAJO UN ESTÍMULO PRO-INFLMATORIO POR IL-6 E IL-8 EN LA ANGIOGÉNESIS”, con fecha del 10 de Marzo del 2017.

JURADO DEL EXAMEN

PRESIDENTE

SECRETARIO

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

VOCAL

VOCAL

RESUMEN

El cáncer de mama es una enfermedad de interés global por su alta tasa de incidencia y mortalidad. Actualmente es ampliamente utilizada la presencia de marcadores inmunohistoquímicos. En este trabajo nos centramos en el subtipo Luminal A (ER+/PR+/HER2-) ya que es el de mejor pronóstico y responde a tratamiento, y en el subtipo y estadio más agresivo Triple Negativo (ER-/PR-/HER2-) ya que es el de peor pronóstico y presenta metástasis. En la actualidad el sistema de cultivo de mamíferos es ampliamente utilizado para identificar y enriquecer a células troncales de cáncer de mama (BCSC) a partir de líneas celulares de cáncer de mama o tumores primarios de mama. Se ha reportado que esta población celular es la responsable del inicio y formación de tumores de mama.

Cualquier tipo de cáncer se encuentra inmerso dentro de un microambiente tumoral, en el cual, los distintos tipos celulares producen y secretan citocinas inflamatorias como IL-6, quimiocinas como CXCL 8 (IL-8), metabolitos y microvesículas (exosomas).

La Interleucina 6 (IL-6) juega un papel primario como mediador principal de la respuesta inflamatoria en la fisiopatología del cáncer. Se ha visto que algunas propiedades de BCSC pueden estar reguladas por la IL6. Esta citocina está elevada en tumores y sueros de pacientes con CM. La IL-8 es ampliamente estudiada como un potente mediador de la angiogénesis ya que está altamente expresada en los CM ER-, y aumenta la invasividad y el potencial metastásico de las células de cáncer de mama ER-. Dicho esto nos pareció interesante evaluar el

efecto de un estímulo inflamatorio por estas citocinas in vitro en mamosferas y células en cultivo.

Se ha demostrado que los exosomas promueven la migración celular en líneas celulares de cáncer de mama, tanto de fenotipo Luminal A (MCF7) como de Triple negativo (MDA MB 231, metastásico), y que el efecto se ve aumentado en exosomas aislados de las células MDA MB 231, esto sugiere que los exosomas liberados podrían desempeñar un papel activo en la invasión y la metástasis, lo cual además es dependiente del subtipo molecular de cáncer de mama. Por otro lado, datos no publicados de nuestro grupo demuestran un efecto diferencial de los exosomas derivados de cultivos en monocapa y mamosferas de cáncer de mama en el proceso de angiogénesis in vitro, siendo las microvesículas derivadas de mamosferas las que mostraron un potencial angiogénico incrementado en comparación con los de células en monocapa en la línea celular de CM 4T1 de ratón.

La evidencia que asocia los exosomas y al microambiente tumoral con funciones como angiogénesis y metástasis, sumado a todo lo anterior nos llevó a suponer que la estimulación de mamosferas y líneas celulares de cáncer de mama con IL-6 e IL-8 tendrá un efecto en la función de sus exosomas en procesos fundamentales para la progresión del cáncer como es la angiogénesis, y que habrá un efecto diferencial en los diferentes subtipos moleculares como el Luminal A y el Triple Negativo (metastásico).

Se generaron mamosferas de para la línea MCF7 (fenotipo Luminal A) y para la línea HCC70 (fenotipo Triple Negativo); y se determinó el fenotipo por citometría de flujo FACS para los marcadores de BCSC CD44 y CD24. Se encontró doble

positividad de marcadores (CD24+/CD44+) para las mamosferas de ambas líneas.

A partir de los sobrenadantes de los cultivos de células adherentes y mamosferas se obtuvieron exosomas por ultracentrifugación y se identificaron por Western blot para la tetraspina de membrana CD81 y la proteína cargo de exosomas TSG 101. Las muestras de exosomas fueron observadas por Microscopia Electrónica de Transmisión y la distribución del tamaño de microvesículas fue determinada por NTA encontrando heterogeneidad de microvesículas.

Para determinar el efecto funcional de los exosomas de células y mamosferas estimuladas y no estimuladas con IL-6 e IL-8 se realizaron ensayos de angiogénesis in vitro en células HUVEC. Se observó claramente una mayor inducción de nodos, segmentos y redes de los exosomas derivados de la línea HCC70 (fenotipo Triple Negativo, metastásico) con respecto a los derivados de la línea MCF7 (fenotipo Luminal A).

Se encontró un notorio incremento en la inducción de nodos por parte de los exosomas de células MCF7 y HCC70 estimuladas con IL-8. Incluso la inducción con exosomas de células HCC70 estimuladas con IL8 fue significativamente mayor al control positivo (FGFb). Para HCC70 el estímulo con IL-6 en las mamosferas produjo incremento significativo en la formación de nodos y redes, mientras para las células fue el estímulo con IL-8.

Para MCF7 únicamente el estímulo con IL-8 en las mamosferas produjo un incremento significativo en la formación de redes con respecto al control.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ÍNDICE | 8 |
| 1. INTRODUCCION | 9 |
| 1.1 <i>Cáncer de mama (CM) y su impacto en la actualidad</i> | 9 |
| 1.2 <i>Subtipos moleculares de CM</i> | 10 |
| 1.3 <i>Células troncales cancerosas (CSC)</i> | 12 |
| 1.4 <i>Microambiente tumoral y citocinas pro-inflamatorias</i> | 14 |
| 1.5 <i>IL6 e IL8 en CM</i> | 16 |
| 1.6 <i>Micro vesículas (exosomas) y sus funciones</i> | 17 |
| 1.7 <i>Progresión tumoral: Angiogénesis y Metástasis</i> | 20 |
| 2. ANTECEDENTES | 22 |
| 3. JUSTIFICACION | 24 |
| 4. HIPOTESIS | 25 |
| 5. OBJETIVOS | 25 |
| 5.1 <i>Objetivo General</i> | 25 |
| 5.2 <i>Objetivos particulares</i> | 25 |
| 6. DISEÑO EXPERIMENTAL | 26 |
| 7. RESULTADOS | 30 |
| ✓ <i>Generación de mamosferas</i> | 30 |
| ✓ <i>Determinacion de Fenotipo de mamosferas</i> | 31 |
| ✓ <i>Identificación y caracterización de Exosomas</i> | 32 |
| ✓ <i>Determinación del efecto angiogénico de Exosomas de Líneas Celulares y de Mamosferas</i> | 36 |
| ✓ <i>Determinación del efecto angiogénico de exosomas derivados de línea celular y mamosferas estimuladas con citocinas inflamatorias IL-6 e IL-8</i> | 39 |
| DISCUSIÓN | 45 |
| CONCLUSIÓN | 52 |
| PERSPECTIVAS | 53 |
| REFERENCIAS | 54 |

1. INTRODUCCION

1.1 Cáncer de mama (CM) y su impacto en la actualidad

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al cáncer como un proceso descontrolado de crecimiento y diseminación de células, el cual, puede empezar casi en cualquier lugar del cuerpo humano. Las células al crecer y dividirse sin control pueden formar masas de tejido denominadas tumores, los cuales puede ser a) malignos, y pueden extenderse a tejidos cercanos e incluso moverse a lugares distantes por medio de la circulación sistémica para formar nuevos tumores; o b) benignos, los cuales, no se extienden a los tejidos cercanos y no los invaden (Sharma, Dave, Sanadya, Sharma, & Sharma, 2010).

El cáncer de mama (CM), según el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos, se define como el cáncer que se forma en el tejido de la mama, ya sea invasivo o no invasivo. Generalmente, el CM se origina en las células de los lobulillos, glándulas encargadas de producir la leche durante la lactancia, o en los conductos, que son las vías que transportan la leche desde los lobulillos hasta el pezón. Con menos frecuencia, el CM puede originarse en el tejidos estromal, que incluye a los tejidos conjuntivos grasos y fibrosos de la mama (Sharma et al., 2010).

A nivel mundial se estima que cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos y hay 458 000 decesos por esta causa, siendo el CM el tipo de cáncer de mayor incidencia entre las mujeres (OMS, 2016). Se señala que por tipo de cáncer, el de mama es responsable de más muertes entre las mujeres de 20 a 59 años a nivel mundial, los cuales ocurren principalmente en países en desarrollo (OMS, 2016).

En 2014, del total de casos de cáncer diagnosticados en la población mexicana de 20 años y más, el de mama fue el de mayor presencia con 19.4 por ciento. Por sexo, en los hombres representa 1% del total de casos y tres de cada 10 mujeres de 20 años y más con cáncer, tienen CM. En 2015, la incidencia de tumor maligno de mama entre la población de 20 años y más fue de 14.80 casos nuevos por cada 100 000 personas. En las mujeres, alcanza su punto máximo en las del grupo de 60 a 64 años (68.05 por cada 100 000 mujeres de ese grupo de edad) (Secretaría de Salud, 2016; INEGI, 2014). Por ello es de gran importancia conocer y los procesos y mecanismos asociados al origen y progresión del al cáncer CM para poder tener un diagnóstico temprano para su tratamiento oportuno.

1.2 Subtipos moleculares de CM

Actualmente es ampliamente utilizada la presencia de marcadores inmunohistoquímicos para la determinación de subtipos moleculares de CM. Marcadores como el Receptor de Estrógeno (ER), el Receptor de Progesterona (PR) y el Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal Humano 2 (HER2) se utilizan de manera rutinaria para la subtipificación de tumores de mama. Se sabe que estos receptores hormonales y de crecimiento median la señalización del crecimiento tumoral; el estrógeno promueve el desarrollo de CM y estimula el crecimiento in vitro de las líneas celulares de cáncer de mama que son ER positivo. Los tumores de mama se agrupan en cuatro subgrupos básicos de acuerdo con estos marcadores (Dai, Xiang, Li, & Bai, 2016; Schnitt, 2010; Yang et al., 2011):

ER+/PR+/HER2- (tumores con positividad ER y PR y negatividad HER2) a este fenotipo se le ha denominado Luminal A, tiene bajos niveles de la

proteína Ki-67, lo cual favorece rápido crecimiento de las células cancerosas. Los cánceres tipo Luminal A tienden a crecer lentamente y tienen el mejor pronóstico.

- ER+/PR+/HER2+/- (tumores con positividad ER y PR, que pueden o no expresar HER2, además de expresar altos niveles de Ki-67. Estos se denominan Luminal B y crecen ligeramente más rápido que los cánceres Luminal A, por lo que pronóstico es ligeramente peor (Cheang et al., 2009).
- ER-/PR-/HER2+ (tumores con negatividad ER y PR, y positividad HER2) fenotipo denominado HER2 positivo. En este fenotipo de cáncer los tumores tienden a crecer más rápido que los cánceres luminales y por lo tanto tienen un peor pronóstico, pero a menudo se tratan con éxito con terapias dirigidas a la proteína HER2 (Dai et al., 2016).
- ER-/PR-/HER2- (tumores con negatividad ER, PR y HER2) denominados también Triple Negativo (tabla 1)(Dai et al., 2016). Este tipo de cáncer son los que presentan la peor prognosis, ya que presentan marcadores de transición epitelio mesénquima, invasión y metástasis, e incluso marcadores de células trocales como CD44, CD24, EpCAM, CD49 y ALDH1 (Dai et al., 2016; Yang et al., 2011). Los tumores Triple Negativos se han destacado por su pobre diagnóstico, falta de tratamientos terapéuticos eficientes y una alta heterogeneidad. Se ha sugerido que la expresión de ER puede cambiar de positivo a negativo en hasta el 70% de

los casos que adquieren resistencia, lo cual lleva a la enfermedad a progresar de estado primario a metastásico(Dai et al., 2016).

| Luminal A | Luminal B | HER2 | Triple Negativo |
|-----------|-----------|-------|-----------------|
| ER+ | ER+ | ER+/- | ER- |
| PR+ | PR- | PR+/- | PR- |
| HER2- | HER2- | HER2- | HER2- |

Tabla 1. Subtipos moleculares de CM por presencia de marcadores inmunohistoquímicos.

1.3 Células troncales cancerosas (CSC)

Para explicar el origen y la formación de tumores se han propuesto dos modelos acerca de la iniciación de células tumorales: a) el modelo estocástico, en el que cada célula tiene una, baja pero similar, probabilidad de adquirir las mutaciones genéticas accidentales resultantes en la capacidad de proliferación y la supervivencia, y b) el modelo de células troncales, en el que la iniciación de un tumor es impulsada por células troncales cancerosas o Cancer Stem Cell (CSC), proponiendo que un pequeño conjunto de células tumorales con características de células madre o troncales son capaces de iniciar el crecimiento del tumor y dar origen a la heterogeneidad de células que lo conforman. El término “célula troncal” se refiere a las células indiferenciadas que tienen dos propiedades básicas: la capacidad de auto-renovación y la capacidad de generar células hijas que pueden diferenciarse en diferentes linajes celulares (Alison, Islam, & Wright, 2010). Las principales características de CSC son sus propiedades de auto-renovación, su capacidad de generar tumores a partir de muy pocas células, su baja tasa de

división celular, su capacidad de dar lugar a una progenie fenotípicamente diversa, y su resistencia selectiva a radio y quimioterapia (Nguyen, Vanner, Dirks, & Eaves, 2012; Reya, Morrison, Clarke, & Weissman, 2001; S. K. Singh, Clarke, Hide, & Dirks, 2004).

Las células troncales de CM (BCSCs, por sus siglas en inglés Breast Cancer Stem Cell) se identificaron por primera vez cuando al inocular células de CM humano en tejido de adiposo mamario a ratones con enfermedad de inmunodeficiencia severa combinada (SCID), sólo una minoría de las células cancerosas tuvo la capacidad de formar nuevos tumores. Estas células presentaron el marcador de membrana CD44 alto, y la ausencia o una baja presencia del marcador CD24, a este fenotipo se le denominó CD44+/CD24-. Esta pequeña población celular dio lugar a toda la heterogeneidad del tumor de origen (Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez, Morrison, & Clarke, 2003).

A partir de estos resultados, diversos investigadores desarrollaron un sistema de cultivo in vitro que permitió la propagación de las células epiteliales mamarias humanas en condiciones de cultivo no adherentes y de no diferenciación. Las células capaces de sobrevivir y proliferar en tales condiciones forman pequeñas agrupaciones de células denominadas "mamosferas". Tales esferoides contienen células progenitoras capaces de diferenciarse en múltiples linajes mamarios (luminal, mioepitelial y alveolar) y presentaron el fenotipo CD44+/CD24-, además de ser resistentes a radio y quimioterapia, al igual que las BCSC (Bussolati, Grange, Sapino, & Camussi, 2009; Dey et al., 2009; Dontu et al., 2003; Ponti et al., 2005). En la actualidad el sistema de cultivo de mamosferas es ampliamente utilizado para identificar y enriquecer BCSC a partir de líneas celulares de cáncer

de mama o tumores primarios de mama (Wang et al., 2014). Sin embargo, ahora se utilizan varios marcadores de superficie celular, tales como CD34, CD133, CD24, CD44, CD166 y la Molécula de Adhesión de Células Epiteliales (EpCAM), para identificar CSC, ya que se ha encontrado que en mamosferas en cultivo no siempre se enriquece el fenotipo CD24-/CD44+, y que ello puede depender del estadio y del fenotipo de la línea celular (Fatima & Nawaz, 2015; Jaggupilli & Elkord, 2012).

1.4 Microambiente tumoral y citocinas pro-inflamatorias

La intercomunicación entre las células tumorales y su microambiente es esencial para la progresión tumoral (Mao, Keller, Garfield, Shen, & Wang, 2013). En el caso de los tumores epiteliales (como es en el CM), la combinación de células tumorigénicas y células estromales dicta la composición de la matriz extracelular del carcinoma. Varios componentes del microambiente del CM, tales como células inmunes supresoras, factores solubles y matriz extracelular alterada, actúan conjuntamente para impedir una eficiente inmunidad antitumoral y promover la progresión del cáncer. La comunicación intracelular e intercelular entre el tumor y el estroma se realiza a través de interacciones célula-célula (mediadas por uniones GAP), mecanismos parácrinos que implican factores de crecimiento, quimiocinas y proteasas, así como por vesículas extracelulares (Grivennikov, Greten, & Karin, 2010; Roma-Rodrigues, Fernandes, & Baptista, 2014).

Las células estromales en el microambiente del CM se caracterizan por alteraciones moleculares y vías de señalización aberrantes, que pueden incluso modular la resistencia del tumor a drogas. (Pontiggia et al., 2012; Soysal,

Tzankov, & Muenst, 2015) Los Fibroblastos Asociados al Cáncer (CAF) constituyen la mayor parte del estroma del cáncer y afectan al microambiente del tumor de tal manera que promueven la iniciación del cáncer, la angiogénesis, la invasión y la metástasis. Hay evidencia que sugiere que la activación de fibroblastos residentes en el microambiente tumoral es inducida por muchos factores secretados por el cáncer, como TGF- β y CXCL12 / SDF-1 e IL6; o por la pérdida de los genes supresores, como PTEN, CAV-1, p53 y p21 (Aboussekhra, 2011). Los macrófagos asociados a tumores (TAM) se consideran principalmente como el fenotipo M2, que secretan factores de crecimiento que promueven la angiogénesis, el crecimiento, la invasión, la migración, la diseminación metastásica y la inmunosupresión (Mao et al., 2013).

La activación de las células de la respuesta inmune antitumoral está regulada por moléculas solubles llamadas citocinas, las cuáles a su vez regulan proliferación, diferenciación y quimiotaxis. Las citocinas son secretadas por la mayoría de las células del sistema inmune como macrófagos, linfocitos B y T, monocitos, entre otras, en respuesta a una amplia variedad de estímulos como: estrés celular, lesiones inducidas por carcinógenos, infecciones o inflamación, etc (Sadelain, Riviere, & Brentjens, 2003). Las citocinas que están directa o indirectamente involucradas en los procesos inflamatorios reciben el nombre de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1, IL-2, IL-6, el interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), estas moléculas están implicadas en el control de la apoptosis (Salgado et al., 2003), la proliferación y migración celular (Coussens & Werb, 2002). En pacientes con CM, se ha asociado un alto nivel de citocinas pro-inflamatorias, principalmente IL-6, con la progresión del tumor, infiltración a

nódulos linfáticos, recurrencia, y la resistencia a tratamiento (Salgado et al., 2003).

1.5 IL6 e IL8 en CM

La Interleucina 6 (IL-6) juega un papel primario como mediador principal de la respuesta inflamatoria en la fisiopatología del cáncer. Esta citocina está elevada en tumores y sueros de pacientes con CM. Las células cancerosas expuestas a IL-6 o que secretan la citocina como un factor autocrino, muestran características malignas, tales como una capacidad aumentada para invadir la matriz extracelular y una resistencia a los fármacos incrementada. Se ha encontrado que la inactivación de la proteína gp130, que transduce la señalización de la citocina IL-6, reduce la agresividad de las CSC in vivo. Recientemente, la IL-6 se ha descrito como un potente inductor de la Transición Epitelio-Mesenquimal (TEM) en células de CM con un fenotipo epitelial. Además, la TEM induce características de CSC en células mamarias normales y transformadas (Hodge, Hurt, & Farrar, 2005; Sanguinetti, Santini, Bonafe, Taffurelli, & Avenia, 2015; Xie et al., 2012).

La IL-8, también conocida como ligando con motivos CXCL8, es una proteína soluble pequeña y pertenece a la familia de quimiocinas CXC cuyos receptores son CXCR1/2. La evidencia más reciente indica que esta quimiocina es un regulador clave de la actividad de CSC. En un estudio utilizando ensayos in vitro y modelos de ratón, se demostró que la adición de IL-8 a líneas celulares de CM promovía la invasión y quimiotaxis de CSC y el bloqueo de CXCR1. El uso de un inhibidor molecular, repertaxina, o anticuerpos específicos de CXCR1, reducen la población de células madre de cáncer e induce la apoptosis in vitro e in vivo (J. K. Singh, Farnie, et al., 2013; J. K. Singh, Simoes, Clarke, & Bundred, 2013).

La IL-8 es ampliamente estudiada como un potente mediador de la angiogénesis ya que está altamente expresada en los CM ER-, y aumenta la invasividad y el potencial metastásico de las células de cáncer de mama ER- y ER +. También está altamente expresado en cáncer de mama HER2+. La expresión de CXCR-1 está elevada en poblaciones de BCSC, como en líneas celulares de cáncer de mama con mayores frecuencias de células CD44 + / CD24-, lo que sugiere que esta quimiocina podría considerarse un marcador para la identificación de BCSC (Todorovic-Rakovic & Milovanovic, 2013; Yao et al., 2007).

1.6 Micro vesículas (exosomas) y sus funciones

Cualquier tipo de cáncer se encuentra inmerso dentro de un microambiente tumoral, en el cual, los distintos tipos celulares producen y secretan citocinas, quimiocinas, metabolitos y micro-vesículas (exosomas), los cuales, permiten la comunicación celular. Estas micro-vesículas o exosomas funcionan como sistemas de comunicación a nivel local (microambiente) y sistémico, ya que entran fácilmente a circulación (Lotvall et al., 2014).

Los exosomas son secretados por todos los tipos celulares (células epiteliales, neuronales, del sistema inmune, células cancerosas, etc.) a través de la membrana plasmática y son parte del transporte vesicular. Los exosomas pueden medir entre 30-200 nm de diámetro y acarrean proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas que encapsulan desde el citosol (Simpson, Lim, Moritz, & Mathivanan, 2009; Villarroja-Beltri, Baixauli, Gutierrez-Vazquez, Sanchez-Madrid, & Mittelbrunn, 2014). Los exosomas pueden formarse por un brote interno de las membranas endosómicas, dando lugar a Cuerpos Multivasculares (MVBs) intracelulares que luego se fusionan con la membrana plasmática, liberándolos al

exterior. El proceso de liberación de los exosomas es inducible, y es un proceso altamente regulado que implica varios componentes de la maquinaria endocítica, incluyendo las GTPasas de Rab, tales como Rab11, Rab35, Rab27a y Rab27b y proteínas reguladoras del citoesqueleto (Penfornis, Vallabhaneni, Whitt, & Pochampally, 2016; Roma-Rodrigues et al., 2014).

Debido a una ruta de biogénesis común, la mayor parte de los exosomas contienen proteínas implicadas en la red endosomal, incluyendo (i) proteínas de transporte y de fusión de membrana, tales como GTPasas, anexinas, proteínas Rab, flotillina y proteínas SNARES; (ii) tetraspaninas, tales como CD9, CD63, CD81 y CD82; (iii) proteínas de choque térmico (HSP), tales como Hsp60, Hsp70 y Hsp90; (iv) proteínas implicadas en la biogénesis de MVBs, tales como Alix y TSG101; (v) proteínas citoesqueléticas, tales como actina y tubulina; (vi) fosfolipasas.

Debido a que las proteínas, CD63, CD81, Alix, flotillina, TSG101 y Rab5b presentan la mayor frecuencia, se han utilizado frecuentemente como marcadores para la identificación y confirmación de la presencia de exosomas (Pant, Hilton, & Burczynski, 2012; Roma-Rodrigues et al., 2014). En los últimos años se ha encontrado que los exosomas son importantes en el desarrollo y progresión del cáncer, ya que pueden activar funciones proliferativas, de supervivencia, de adhesión celular, de promoción de angiogénesis y de migración (Penfornis, Vallabhaneni, Whitt, & Pochampally, 2015), por lo que su caracterización ha adquirido gran interés en la investigación del cáncer, debido a que contienen una gran variedad de elementos oncogénicos como son las proteínas y los microRNAs

(miRNAs) oncogénicos (Brownlee, Lynn, Thorpe, & Schroit, 2014; Kruger et al., 2014; M. Li et al., 2014).

Los exosomas derivados de células cancerosas (CCE) y de CSC expresan una variedad de moléculas, que comprenden miRNAs, factores de crecimiento y moléculas de adhesión que genera un nicho pro-metastático y pro-angiogénico (Figura 1) (Fatima & Nawaz, 2015; Roma-Rodrigues et al., 2014). Los exosomas están involucrados no sólo en la comunicación célula-célula en el microambiente tumoral local, sino también entre las células tumorales y distantes, favoreciendo la secreción de factores de crecimiento, citocinas y factores angiogénicos por células estromales, inducción de proliferación de células endoteliales, metástasis e inmunidad (Roma-Rodrigues et al., 2014).

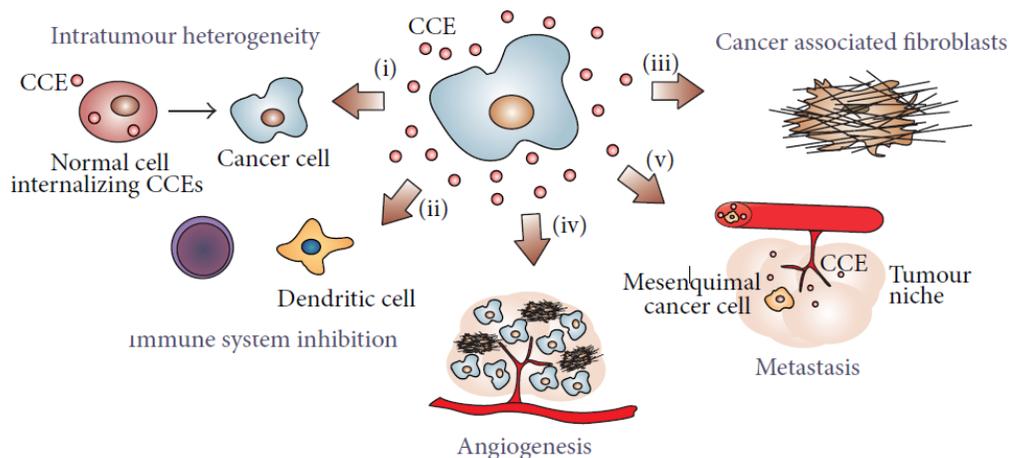


Figura1. Procesos tumorales mediados por exosomas derivados de células cancerosas (CCE): (i) heterogeneidad intratumoral resultante de la modificación de fenotipo de células normales después de la internalización de CCEs; (ii) inhibición de la respuesta inmune contra células tumorales por inhibición de la respuesta proliferativa de linfocitos; (iii) activación de la diferenciación de fibroblastos en CAF; (iv) estimulación angiogénesis; y (v) TEM y preparación de un nicho premetastático en un sitio distante (Roma-Rodrigues et al., 2014).

Se ha reportado que un aumento en la liberación de exosomas puede ser desencadenado por varios tipos de estrés, tales como hipoxia, estrés oxidativo, cambios térmicos, así como activación de la proteína supresora de tumores p53 (Yu, Harris, & Levine, 2006).

1.7 Progresión tumoral: Angiogénesis y Metástasis

El proceso de metástasis del cáncer consiste en una serie de pasos secuenciales interrelacionados, siendo los más destacados los siguientes: (a) después del evento de transformación inicial, el crecimiento de células neoplásicas debe ser progresivo, lo que requiere una vascularización extensa si una masa tumoral excede los 2 mm de diámetro; (b) la invasión local del estroma por algunas células tumorales ocurre cuando las vénulas de pared delgada, como los canales linfáticos que ofrecen muy poca resistencia a la penetración de las células tumorales, proporcionan la vía más común para la entrada de células tumorales en la circulación; (c) el desprendimiento de los agregados celulares tumorales; (d) la extravasación a un órgano secundario; y (e) la proliferación y neovascularización en el órgano distante para producir lesiones metastásicas detectables.

Las propiedades intrínsecas de las células tumorales, así como del estroma de su microambiente son cruciales para definir la progresión del cáncer y el destino de las metástasis (S. Singh, Sadanandam, & Singh, 2007).

La angiogénesis es un proceso biológico de la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos sanguíneos preexistentes y, por lo tanto, también se conoce como neovascularización. Dicho evento es fundamental para muchos procesos fisiológicos y patológicos, y en el cáncer es un prerrequisito para la

metástasis (S. Singh et al., 2007). La formación vascular inherente a la progresión del cáncer puede desencadenarse por condiciones de hipoxia y nutrientes en el microambiente tumoral, así como por respuestas inflamatorias, usualmente observadas en carcinomas de células epiteliales. Los factores de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), FGF, TGF- β , PDGF e IL-8 son algunos de los factores angiogénicos que actúan sobre la regulación de la quiescencia, migración y proliferación de células endoteliales, necesarias para la estimulación de la angiogénesis (Katoh, 2013).

Estudios recientes han demostrado que los exosomas liberados en condiciones hipóxicas contribuyen a la estimulación de la angiogénesis. Se ha reportado que los exosomas derivados de células de melanoma al ser internalizados por las células endoteliales promueven la metástasis y la angiogénesis por la activación de la vía JAK-STAT (Gajos-Michniewicz, Duechler, & Czyz, 2014; Katoh, 2013).

2. ANTECEDENTES

Se ha reportado que la IL-6 es capaz de promover la formación de CSC y mamosferas (Korkaya et al., 2012; Sansone et al., 2007). Reportes de nuestro grupo de trabajo muestran que la estimulación con citocinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6 y TNF- α provocan cambios en los niveles de expresión de ciertos receptores de quimiocinas asociadas a migración celular en líneas celulares de CM humano (Valdivia-Silva et al., 2009). Así mismo, se ha demostrado que IL-6 es capaz de generar células CD44+ con propiedades troncales a través de la inducción de la TEM en las células de cáncer de mama T47D (Xie et al., 2012), y que la transcripción de este marcador de CSC incrementa en células MDA MB 230, aunque no así la cantidad de proteína; lo cual se ve acompañado de un aumento en la tasa de migración de las células (J. Li et al., 2012). Evidencia reciente indica que la IL-8, regula actividad la actividad de CSC promoviendo la invasión y la quimiotaxis, y que el bloqueo de su receptor reduce CSC induciendo apoptosis. (J. K. Singh, Farnie, et al., 2013; J. K. Singh, Simoes, et al., 2013). En conjunto esto indica que un microambiente tumoral pro-inflamatorio está ampliamente relacionado a la progresión tumoral, así como a la invasión y migración de células cancerosas, sin embargo la relación de estímulos inflamatorios con la secreción y función de microvesículas (exosomas) no es clara.

Recientemente se caracterizó el tráfico exosomal de microRNAs en DCIS, estos datos mostraron que varios miRNAs incluyendo el miR-140, miR-29a y miR-21, se expresan diferencialmente en mamosferas (CSC) en comparación con células que no presentan características de troncalidad, lo cual apoya la idea de que los

exosomas de células y de mamosferas además de expresar diferencialmente contenido de miRNAs pueden estar afectando diferencialmente funciones como la angiogénesis (Q. Li, Eades, Yao, Zhang, & Zhou, 2014).

Se ha demostrado que los exosomas promueven la migración celular en líneas celulares de cáncer de mama, tanto de fenotipo Luminal A (MCF7) como de Triple negativo (MDA MB 231), y que el efecto se ve aumentado en exosomas aislados de las células MDA MB 231 con mayor potencial metastásico y esto sugiere que los exosomas liberados podrían desempeñar un papel activo en la invasión y la metástasis, lo cual además es dependiente del subtipo molecular de CM (Harris et al., 2015).

Por otro lado, se sabe que exosomas derivados de la línea MCF7 de CM (fenotipo Luminal) tratada con DHA inhiben la angiogénesis in vitro, lo cual no ocurría en microvesículas derivadas de la línea MDA MB 231 (Triple Negativo, metastásico). Sin embargo el tratamiento provocó una incrementada secreción de exosomas en ambas líneas celulares (Hannafon et al., 2015).

Datos no publicados de nuestro grupo demuestran un efecto diferencial de los exosomas derivados de cultivos en monocapa y esferoides de cáncer de mama en el proceso de angiogénesis in vitro, siendo las microvesículas derivadas de mamosferas las que mostraron un potencial angiogénico incrementado en comparación con los de células en monocapa en la línea celular de CM 4T1 de ratón.

3. JUSTIFICACION

El cáncer de mama es una enfermedad de interés global por su alta tasa de incidencia y mortalidad. Los subtipos moleculares de cáncer de mama presentan diferentes fenotipos de marcadores inmunohistoquímicos, siendo el Fenotipo Luminal A el subtipo menos agresivo y el Triple Negativo el más agresivo y estas características se han encontrado relacionadas con los exosomas que secretan en funciones como migración, invasión y angiogénesis.

También se han encontrado diferencia en cuanto a contenido de los exosomas derivados de cultivo en monocapa y mamosferas (BCSC), lo cual podría estar asociado a su efecto diferencial en la progresión tumoral. Actualmente, a pesar de la evidencia que asocia los exosomas y al microambiente tumoral con funciones como angiogénesis y metástasis, aún no hay un estudio que evalúe y compare el efecto de un ambiente inflamatorio, rico en citocinas pro-inflamatorias como IL-6 e IL-8, en la función angiogénica de exosomas derivados de mamosferas y líneas celulares de CM en los diferentes subtipos moleculares como el Luminal (menos agresivo) y el Triple Negativo (más agresivo, metastásico).

4. HIPOTESIS

La estimulación de mamosferas y líneas celulares de cáncer de mama por IL-6 e IL-8 tendrá un efecto en la función de sus exosomas en la angiogénesis.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto de exosomas derivados de mamosferas y líneas celulares bajo un estímulo pro-inflmatorio por IL-6 e IL-8 en la angiogénesis.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar el fenotipo de mamosferas derivadas de las líneas celulares MCF7 (Luminal A) y HCC70 (Triple Negativo) por la presencia de los marcadores CD44 y CD24.
- Caracterizar exosomas derivados de líneas celulares y mamosferas por microscopía electrónica, Western blot y conteo de partículas.
- Determinar el efecto angiogénico de exosomas de mamosferas derivada de las líneas celulares MCF7 (Luminal) y HCC70 (Triple Negativo) estimuladas y no estimuladas con IL-6 e IL-8.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Establecimiento de cultivo de líneas celulares adherentes.

Se emplearon las líneas celulares de CM humano: MCF7 (ATCC® HTB-22) y HCC70. La línea MCF7 es de tipo epitelial y tiene fenotipo Luminal (ER+/PR+). Las células MCF7 se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified eagle médium) adicionado con Penicilina/estreptomicina 1% enriquecido con Suero Fetal Bovino 10% (v/v) (ByProductos), a 37° C con 5% de CO₂.

La línea HCC70, fenotipo Triple Negativo (ER-/PR-), metastásica con morfología tipo epitelial, se cultivó en medio RPMI adicionado con Penicilina/estreptomicina 1%, enriquecido con Suero Fetal Bovino 10% (v/v) (ByProductos) a 37° con 5% de CO₂.

6.2 Cultivo de mamosferas

Las células en cultivos adherentes a una confluencia del 70-80 %, se lavaron con PBS pH 7.4, seguido de una solución EDTA 0.5mM y Tripsina 0.25% (Gibco-Life Technologies) para despegarlas. Se estableció el cultivo de mamosferas en condiciones no adherentes según Shaw et al., 2012. Brevemente, se partió de diferente densidad celular para cada línea celular: se sembraron 350 000 células para MCF7 y 250 000 células para HCC70; posteriormente se incubaron con medio de mamosferas (DMEM/F12 (1:1), B27 2% (v/v) y hrEGF (20ng/ml)) a 37°C con 5 % de CO₂ por 4 días para MCF7 y 3 días para HCC70 en una placa con baja adherencia. Una vez formadas las mamosferas se recuperó el sobrenadante y se le añadió el estímulo con las citocinas pro- inflamatorias.

6.3 Estímulo IL-6 e IL-8

Una vez que el cultivo adherente alcanzó un 80% se lavaron con PBS pH 7.4 y se despegaron con una solución EDTA 0.5mM y Tripsina 0.25% (Gibco-Life Technologies) y se sembraron las células para los estímulos a la misma densidad celular que para las mamosferas (MCF7 350 000 células y HCC70 250 000 células) en placas adherentes con sus respectivos medios de cultivo. A las 72 h de incubación se les cambió medio por medio sin suero (DMEM para MCF7 y RPMI para HCC70) con las citocinas IL-6 e IL-8 a 20 ng/ml por separado. Para las mamosferas, una vez formadas se recuperó el sobrenadante e igualmente añadieron las citocinas en las mismas concentraciones en medio DMEM sin suero. Tanto para células como para las mamosferas se colectó el sobrenadante a las 72 h de haber iniciado el estímulo y guardo a 4° C.

6.4 Determinación del fenotipo de mamosferas por citometría de flujo

Los cultivos en monocapa, así como las mamosferas, se analizaron por citometría de flujo FACS para los marcadores CD44 y CD24. Para ellos se lavaron con PBS y se disgregaron con EDTA 0.5mM y Tripsina 0.25% (Gibco-Life Technologies) para obtener una solución single-cel, posteriormente se bloquearon en buffer FACS (SFB 2% (v/v) en PBS) por 20 min. Se adicionaron los anticuerpos primarios para α -CD24-APC y CD44-FITC (Santa Cruz) diluidos en buffer FACS (1:400) y se incubaron por 30 min. Posteriormente se realizarán tres lavados con buffer FACS y se fijaron en paraformaldehído 1% (v/v) en buffer FACS, y fueron adquiridas en el citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Las lecturas adquiridas fueron después analizadas en el software FlowJo V10.

6.5 Obtención de exosomas por ultracentrifugación.

La obtención de exosomas se realizó por el método de ultracentrifugación modificado de Théry C. *et al* 2006 (Thery, Amigorena, Raposo, & Clayton, 2006). Los sobrenadantes de cultivos adherentes y de mamíferas, con y sin citocinas pro-inflamatorias se filtraron con una membrana de 0.2 micras (Millipore) y posteriormente se centrifugaron a 10 000 g en un rotor 70 Ti 40 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante en nuevos tubos y se ultracentrifugó durante 2 h a 100 000 g a 4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 100 µl de PBS para almacenarse a 4°C, ya que no se recomienda congelarlos.

6.6 Caracterización de exosomas por Western blot.

Se determinó la presencia de exosomas obtenidos por ultracentrifugación con la proteína de superficie de Exosomas CD81 y la proteína cargo TSG 101 la cual participa en la biogénesis de estas microvesículas. Para identificar los exosomas por Western blot, una vez obtenidos dichos exosomas, se lisaron con buffer RIPA y se agregó 1 µl de inhibidor de proteasas. Se cuantificó la proteína total con el kit micro-BCA (Thermo Scientific) y posteriormente se incubó a 95°C durante 5 min para desnaturalizar a las proteínas. La proteína total se separó por SDS-PAGE al 15% y se transfirió a membrana de PVDF. Se bloqueó la membrana con leche svelty en polvo 5% (m/v) por 2h. Se incubó con anticuerpo primario para CD81 y TSG 101 (1:500) (Santa Cruz) toda la noche. Finalmente se incubó con el anticuerpo secundario (conjugado con peroxidasa (1:5000) por 2 h y se reveló la membrana en placas fotográficas (Thermo scientific).

6.8 Ensayo de Angiogénesis.

Para los ensayos de angiogénesis in vitro se usó un cultivo primario de Células de Vena Umbilical Humana (HUVEC). Las células HUVEC se incubaron en medio F12K Heparina (SIGMA) 0.1 mg/ml y Suplemento para Celulas Endoteliales (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS) (SIGMA) 0.05 mg/ml enriquecido con SFB 10% (Gibco). Cuando alcanzaron un 80% de confluencia se despegaron para hacer los ensayos en matrigel. Se sembraron 15 000 células HUVEC en 40 μ l de matrigel (Corning) y 100 μ l de su medio de cultivo sin suero en placas de 96 pozos. Se etiquetaron los grupos según la tabla 2 y se agregaron 30 μ g de exosomas del tratamiento correspondiente. Se incubó la placa por 6 h a 37° C en atmósfera con 5% de CO₂. Finalmente se tomó la imagen del pozo obtenida con un microscopio invertido Olympus IX71. Las fotos fueron analizadas con el software ImageJ con el complemento Angiogenesis Analyzer, y se contabilizaron los nodos (puntos de mínimo triple ramificaciones), segmentos (unión de dos nodos) y redes (círculos cerrados).

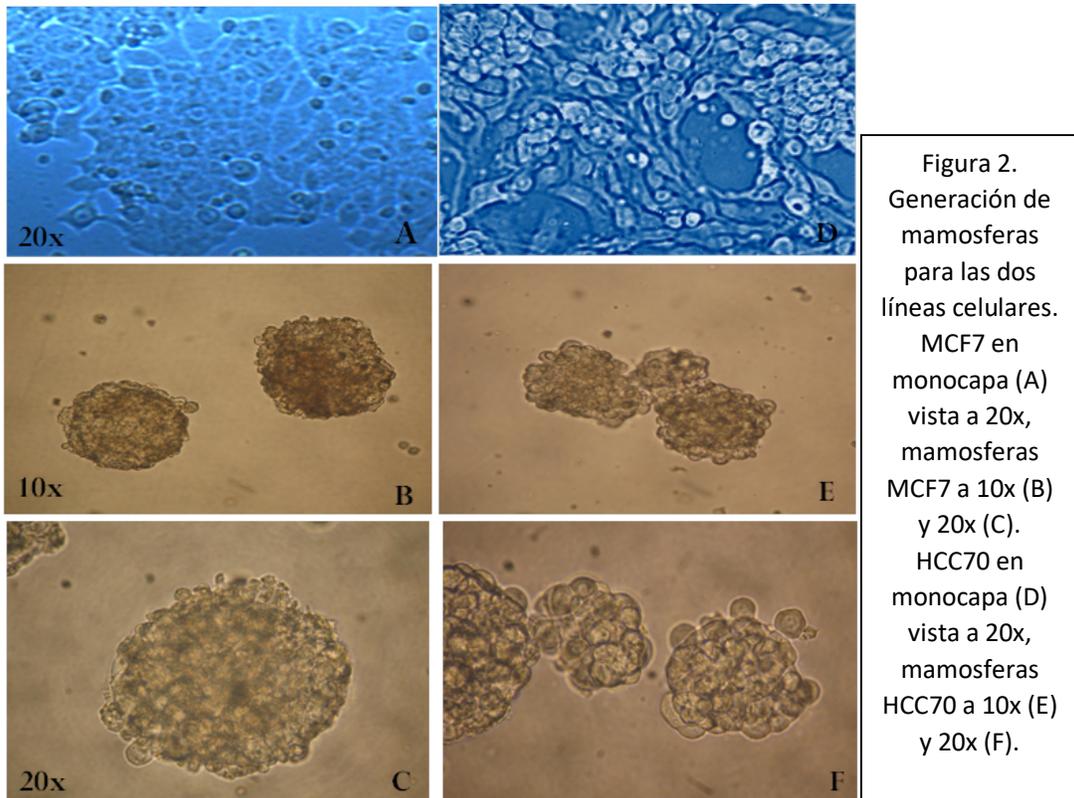
6.9 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza (ANOVA de dos vías) para comparar las diferencias entre medias de los tratamientos (estímulos IL-6, IL-8) en ambos grupos (células adherentes y mamíferas) con respecto al control con una significancia con un nivel de significancia de $p < 0.05$; complementada con una prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre grupos, con una n de tres. Este análisis se realizó en el programa GraphPad Prism 6.

7. RESULTADOS

✓ Generación de mamosferas

Para la generación de mamosferas de ambas líneas celulares se partió de diferentes densidades celulares según para una optima generacion de esferoides según fue el caso. Para la línea MCF7 (fenotipo Luminal A) una vez que alcanzo el 70-80% de confluencia en cultivo de monocapa (Figura 2A) se sembraron 350 mil células y se incubaron por 4 días para una optima generación de esferoides (Figura 2B y C) . En el caso de la línea HCC70 (fenotipo Triple Negativo) una vez que alcanzo el 70-80% de confluencia en cultivo de monocapa (Figura 2D) se sembraron 250 mil células y se incubaron por 3 días para una optima generación de esferoides (Figura 2E y F)



✓ **Determinacion de Fenotipo de mamosferas**

La determinación del fenotipo de las líneas celulares y mamosferas se realizó por citometría de flujo FACS para los marcadores de BCSC CD44 y CD24. Para MCF7 (fenotipo Luminal A) se encontró expresión del marcador CD24 pero negatividad al marcador CD44, sin embargo los esferoides derivados tienen positividad para ambos marcadores (CD24+/CD44+). Para HCC70 (fenotipo Triple Negativo) se encontró expresión de ambos marcadores desde su cultivo en monocapa (CD24+/CD44+), fenotipo que se conservó en sus mamosferas derivadas.

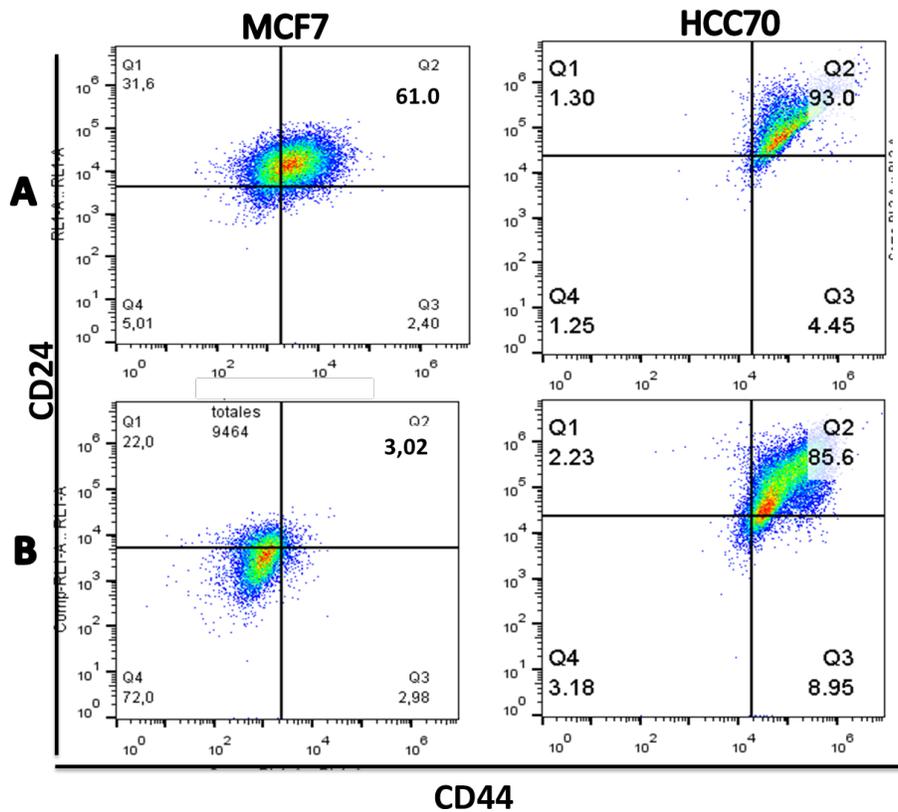


Figura 3. Fenotipo de ambas línea celulares. De cultivo en monocapa (abajo) y sus esferoides derivados (mamosferas arriba) para los marcadores de BCSC CD24 y CD44.

✓ **Identificación y caracterización de Exosomas**

- Por Western Blot

Se identificó por Western blot la presencia de exosomas por el enriquecimiento de proteínas de marcaje de exosomas. Se usaron anticuerpos para la tetraspina de membrana CD81 y la proteína cargo de exosomas TSG 101, ambas se identificaron en los exosomas de células y mamosferas derivados de línea celular y mamosferas MCF7 y HCC70, dicho enriquecimiento de marcadores no se observa en el lisado de proteína de células (Figura 4).

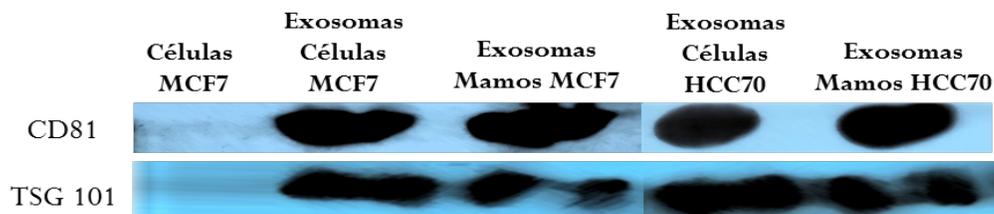


Figura 4. Identificación de marcadores de exosomas por Western blot para exosomas de células y mamosferas MCF7 y HCC70. n=3

- Microscopía Electrónica de Transmisión

Los exosomas de células MCF7 y HCC70 fueron teñidos con una solución de Acetato de Uranilo 2% y fueron observados por en el Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL JEM 12000 EII. Se observó en ambas líneas una población de microvesículas entre los 80 y los 200 nm (Figura 5).

Los exosomas de mamosferas MCF7 y HCC70 fueron teñidos con una solución de Ácido Fosfotúngstico al 2% y fueron observados en el Microscopio Electrónico

de Transmisión JEOL JEM-1010. Se observó en ambas líneas una población de microvesículas entre los 80 y los 300 nm (Figura 6).

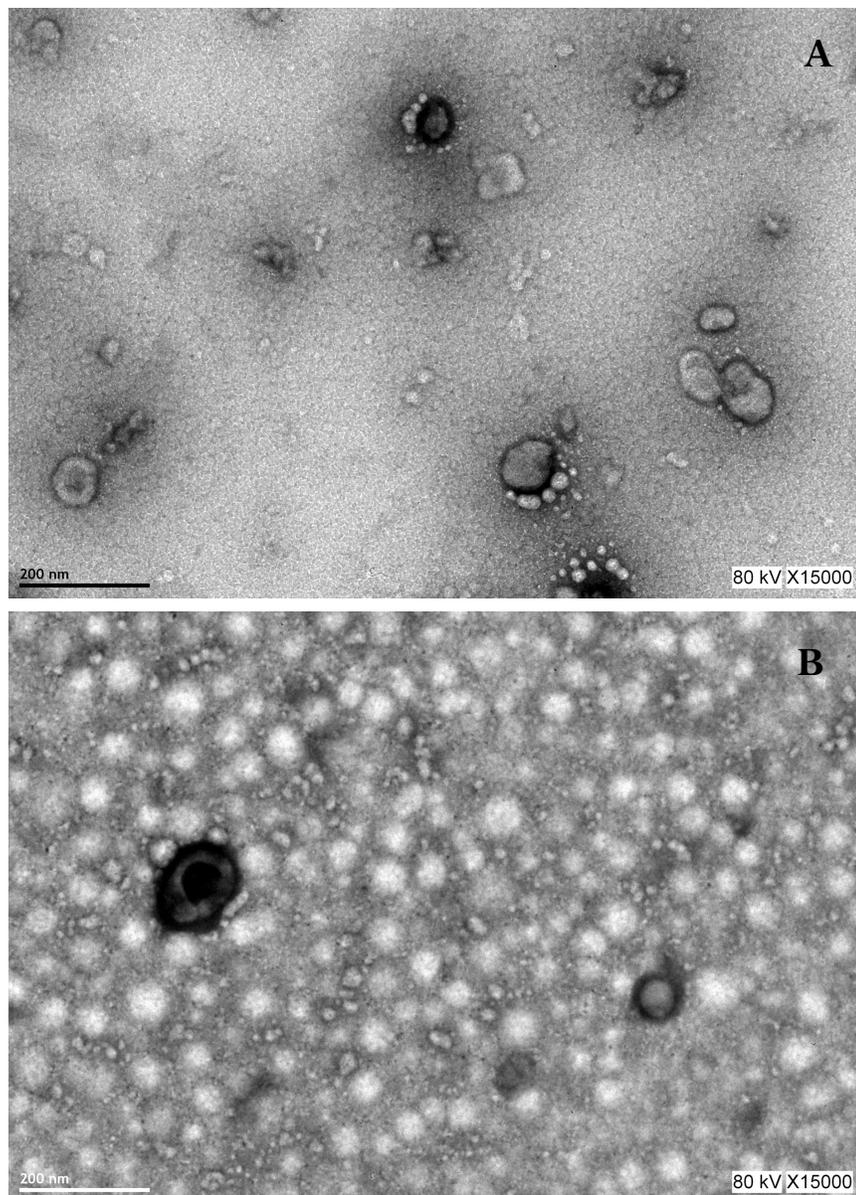
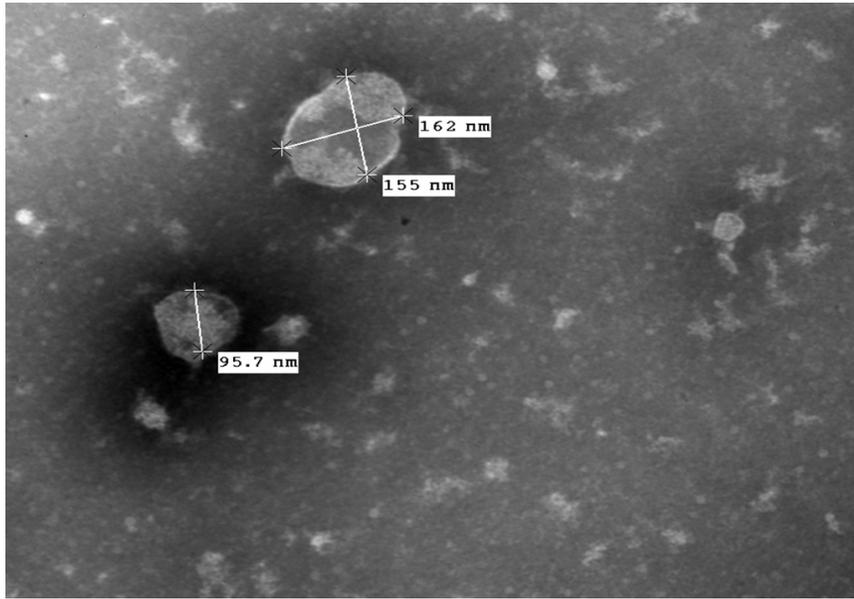
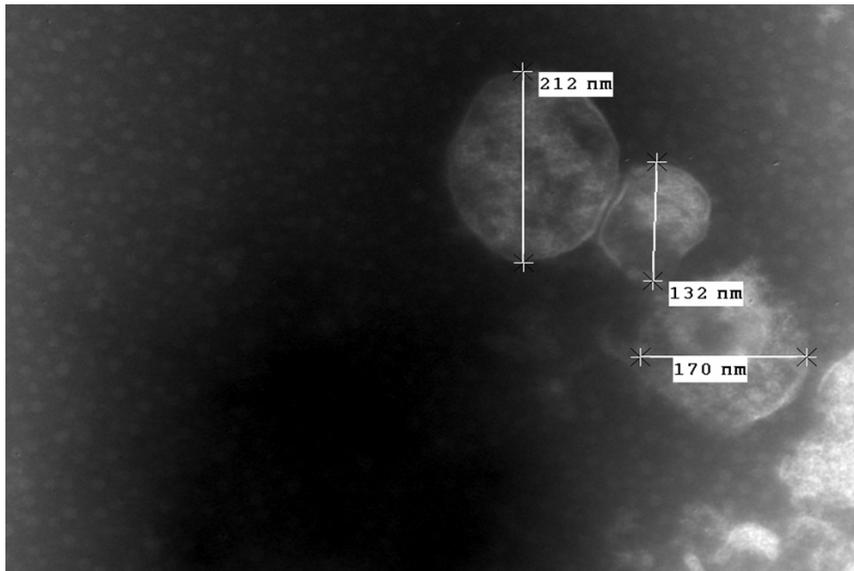


Figura 5. Microscopía Electrónica de Transmisión de exosomas de células MCF7 (A) y HCC70 (B) teñidos con solución de Acetato de Uranió 2%.



31.tif
MCF7
Mamosferas
Print Mag: 39200x @ 51 mm
11:33 12/01/16
TEM Mode: Imaging

100 nm
HV=60kV
Direct Mag: 100000x



9.tif
HCC70
Mamosferas
Print Mag: 47100x @ 51 mm
11:02 12/01/16
TEM Mode: Imaging

100 nm
HV=60kV
Direct Mag: 120000x

Figura 6. Microscopía Electrónica de Transmisión de exosomas de mammosferas MCF7 (A) y HCC70 (B) teñidos con solución de Ácido Fosfotúngstico al 2%.

- Conteo de partículas (Nanoparticle Tracking Analysis)

NanoSight300 (Malvern,USA). El conteo de partículas o Análisis de Rastreo de Nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)) se basa en la medición de la tasa del movimiento Browniano para determinar la distribución en tamaño de nanopartículas así como su concentración por mililitro (Figura 7 y 8). Las mediciones observadas por NTA concordaron con lo observado por Microscopia Electrónica de Transmisión, a excepción del caso de las microvesículas de la línea celular MCF7 donde en el conteo de partículas se encontró una gran heterogeneidad en la distribución del tamaño de las microvesículas en esta muestra (Figura 8).

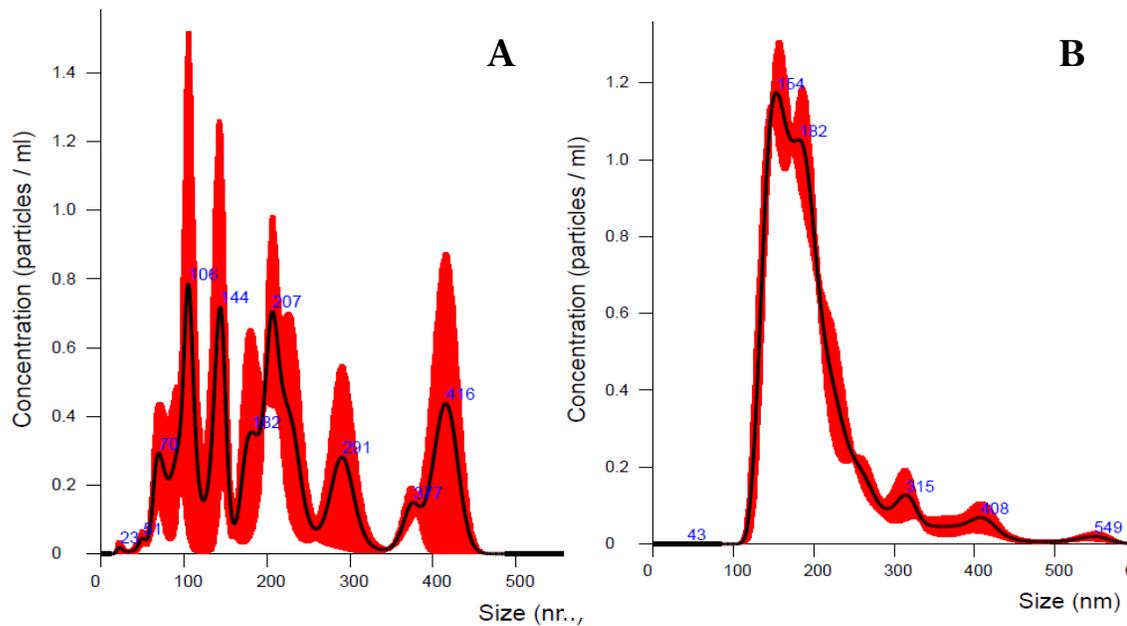


Figura 7. Lectura del conteo de partículas (Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)) para exosomas de línea celular (A) y mamosferas (B) de MCF7 donde se observó una distribución heterogénea en el tamaño de microvesículas en las muestras sobre todo en las células MCF7. n=3

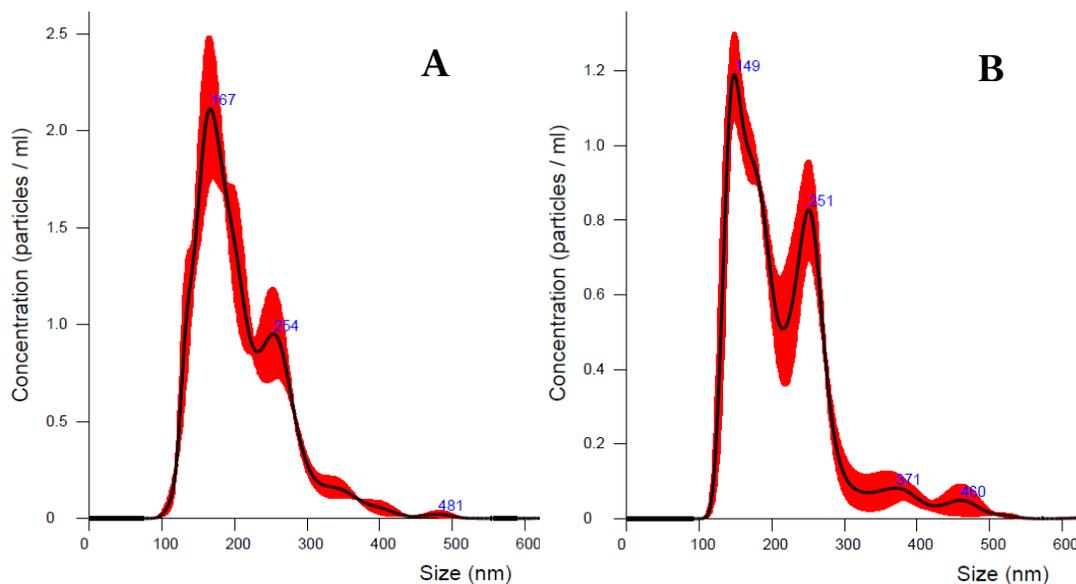


Figura 8. Lectura del conteo de partículas (Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)) para exosomas de línea celular (A) y mamosferas HCC70 donde se observó una distribución homogénea de microvesículas. n=3

✓ **Determinación del efecto angiogénico de Exosomas de Líneas Celulares y de Mamosferas**

Para determinar el efecto inductor de angiogénesis in vitro, se incubaron 15 000 células HUVEC en matrigel y se adicionaron 50 ug/ml de proteína total de exosomas de células y mamosferas MCF7 y HCC70 por separado. Se colocaron también control positivo (FGF) y negativo (DMSO) para validar nuestros ensayos (Figura 9). El efecto inductor de angiogénesis fue reportado como la formación de nodos (puntos de al menos triple ramificación),, segmentos (unión de nodos) y redes (formación de circuitos cerrados) (Figura 10)) en porcentaje de incremento con respecto al control (células HUVEC sin estimular (SE)).

Se observó claramente una mayor inducción de nodos, segmentos y redes de los exosomas derivados de la línea HCC70 (fenotipo Triple Negativo, metastásico) con respecto a los derivados de la línea MCF7 (fenotipo Luminal A).

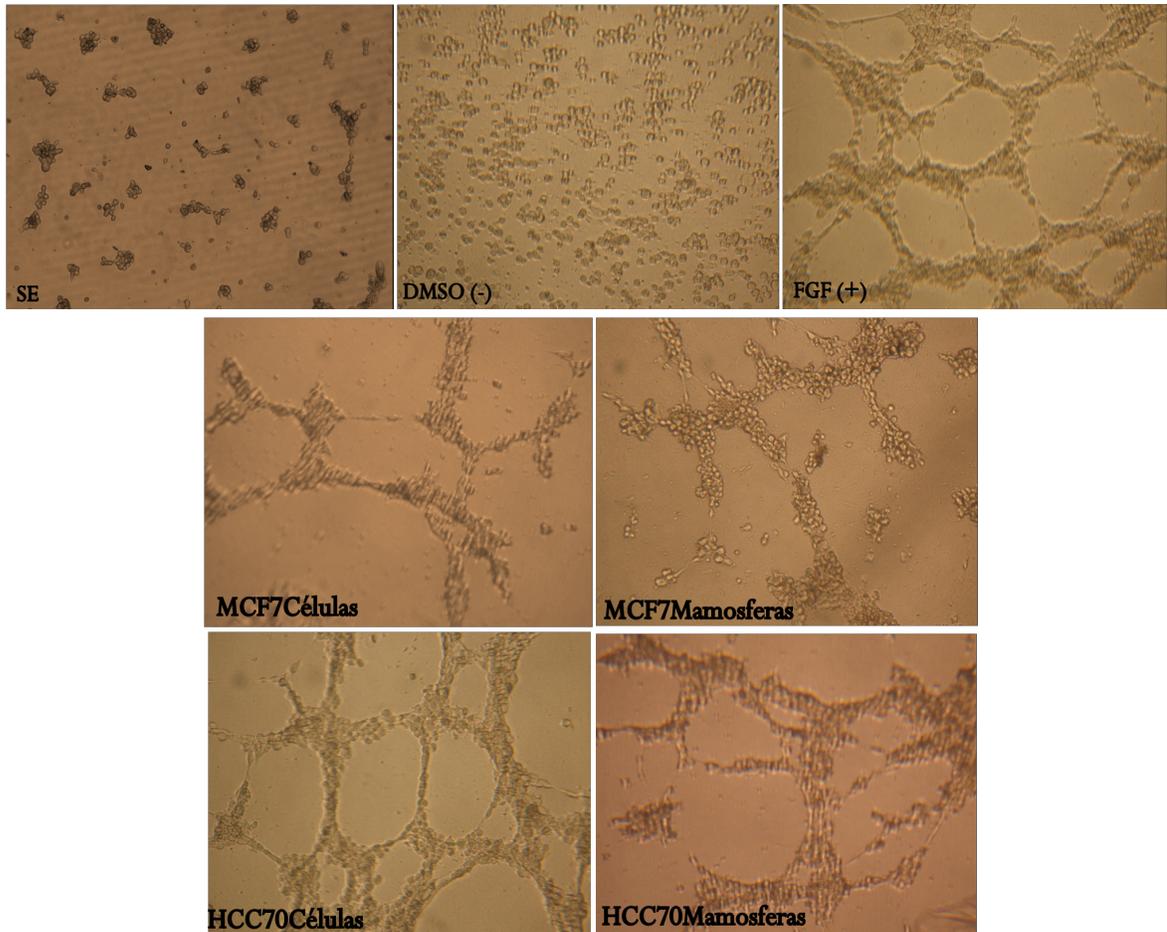


Figura 9. Ensayo de angiogénesis con células HUVEC más 50ug/ml (proteína total) de exosomas de células y mamosferas de ambas líneas celulares a las 6 horas. Los grupos de estudio fueron células HUVEC Sin Estimar (SE), células HUVEC más: Control Negativo DMSO (-), Control Positivo Factor de Crecimiento De Fibroblastos Humano (FGF)(+), Exosomas de Células y Mamosferas MCF7 (fenotipo Luminal A) y Exosomas de Células y Mamosferas HCC70 (fenotipo Triple Negativo). n=3

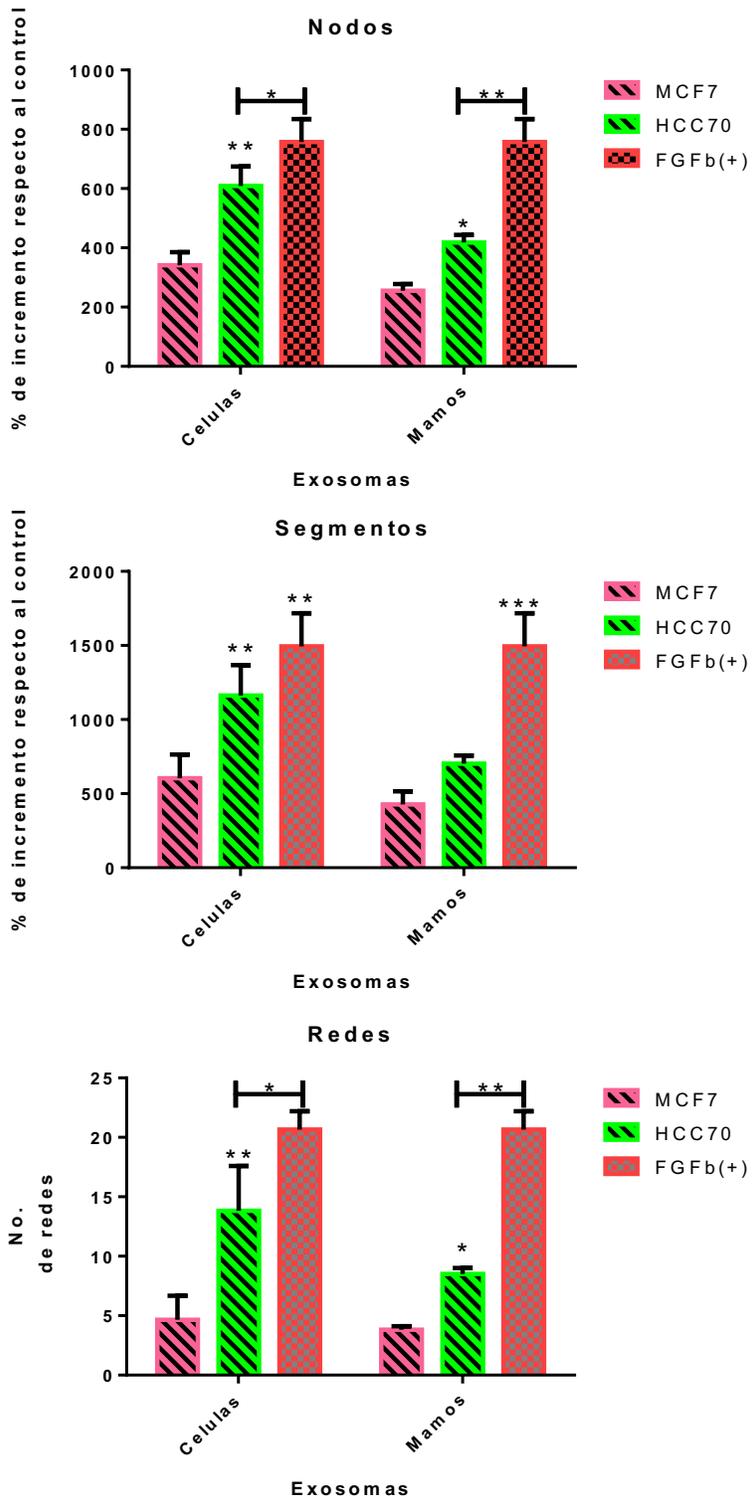


Figura 10. Cuantificación de inducción de nodos (puntos de al menos triple ramificación), segmentos (líneas de unión de nodos) y de redes (circuitos cerrados) en las células HUVEC a las 6 horas después de adicionar 50ug/ml de proteína de exosomas de células y mamosferas de MCF7 y HCC70. $p < 0.05$, $n = 3$

✓ **Determinación del efecto angiogénico de exosomas derivados de línea celular y mamosferas estimuladas con citocinas inflamatorias IL-6 e IL-8**

- Inducción de Angiogénesis con Exosomas derivados de MCF7 estimuladas y no estimuladas.

Para determinar el efecto en la angiogénesis in vitro de los exosomas derivados de células y mamosferas MCF7 (fenotipo Luminal A) estimuladas pro inflamatoriamente, se incubaron las células HUVEC con las microvesículas de células y mamosferas control (sin estímulo) y se denominaron como CelCtrl y MamCtrl, así como con exosomas de células y mamosferas estimuladas con las citocinas inflamatorias IL-6 e IL-8 por separado. El ensayo fue validado con los controles de la técnica (positivo FGF y negativo DMSO) (Figura 11). Se cuantificaron los mismos indicadores para inducción de angiogénesis: formación de nodos, segmentos y redes, para posteriormente reportarse en porcentaje de incremento con respecto al control (células HUVEC sin estimular (SE)). Se encontró la mayor inducción de nodos en los exosomas de células y mamosferas estimuladas con IL-8, al igual que en las redes (Figura 12). En la formación de segmentos, la mayor inducción se observó en presencia de los exosomas de mamosferas estimuladas con IL8 (Figura 12). Sin embargo en ningún caso alguno de los grupos de estudio tuvo un efecto semejante al control positivo (FGF).

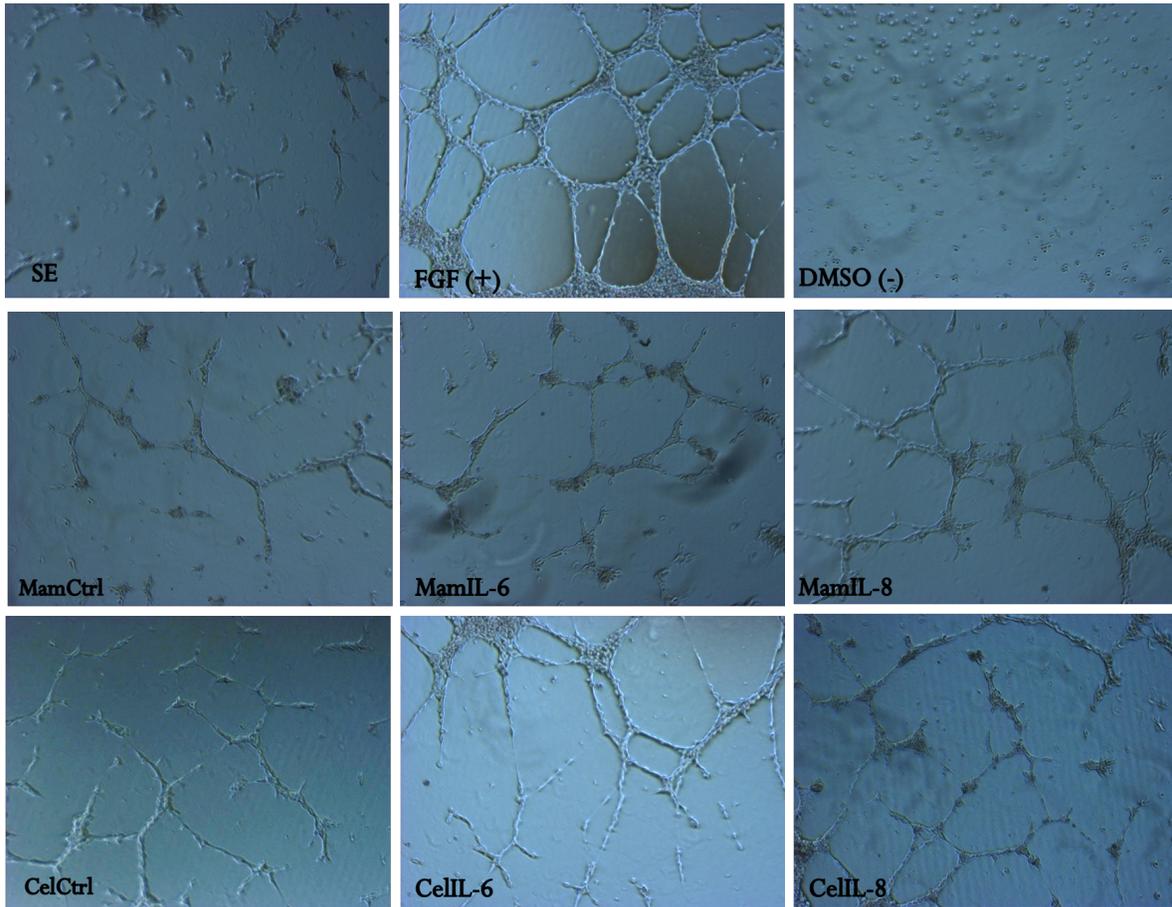


Figura 11. Ensayo de angiogénesis in vitro en células HUVEC a las 6 horas de haber adicionado 50 ug/ml (proteína total) de exosomas de células y mamosferas MCF7 estimuladas y no estimuladas con IL-6 e IL-8. Células HUVEC Sin Estimular (SE), células HUVEC más: Control Negativo DMSO (-), FGF (+), Exosomas de Células sin estímulo (CelCtrl), estimuladas con IL-6 (CellL-6) e IL8 (CellL8) y Mamosferas Células sin estímulo (MamCtrl), estimuladas con IL-6 (MamIL-6) e IL8 (MamIL-8). n=3

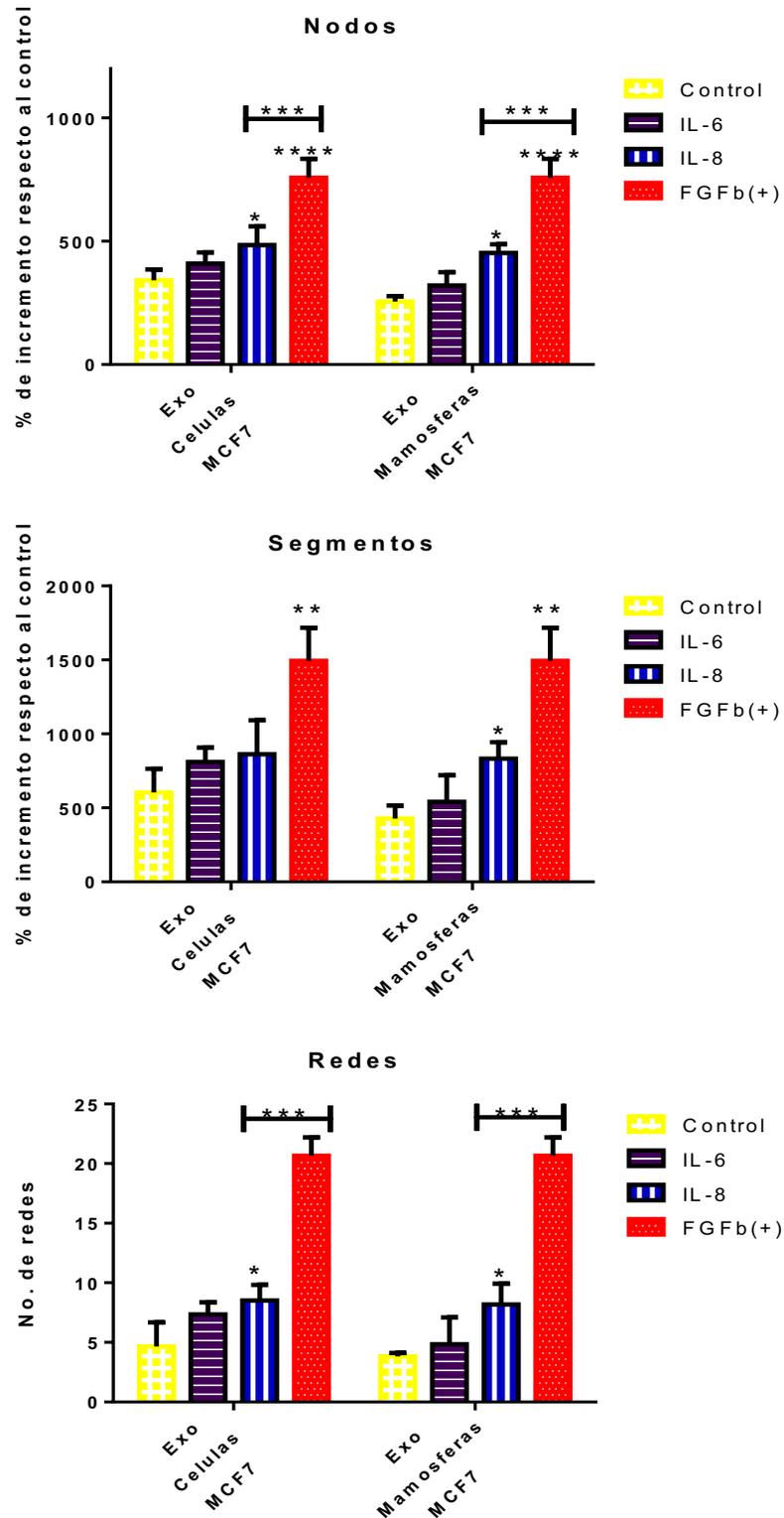


Figura 12. Cuantificación de inducción de nodos, segmentos y redes por exosomas de células y mamosferas MCF7 estimuladas y no estimuladas con IL-6 e IL-8 a las 6 horas. $p < 0.05$, $n = 3$

- Inducción de Angiogénesis con Exosomas derivados de HCC70 estimuladas y no estimuladas.

Para determinar el efecto en la angiogénesis in vitro de los exosomas derivados de células y mamosferas HCC70 (fenotipo Triple Negativo) estimuladas pro inflamatoriamente, se incubaron las células HUVEC con las microvesículas de células y mamosferas control (sin estímulo, CelCtrl y MamCtrl) así como con exosomas de células y mamosferas bajo estimulación pro inflamatoria de IL-6 e IL-8 (Figura 13).

Se encontró un notorio incremento en la inducción de nodos por parte de los exosomas de células estimuladas con IL6 e IL-8 (Figura 14), incluso habiendo un incremento significativo del grupo con exosomas de células estimuladas con IL8 respecto al control positivo (FGFb). La inducción de nodos por exosomas de mamosferas para esta línea fue incrementado de forma significativa solo bajo estímulo de IL-6. En la formación de segmento y redes la mayor inducción se observó para los exosomas de células estimuladas con IL-8 y exosomas de mamosferas estimuladas con IL6 (Figura 14). En el caso de los segmentos y las redes se observó claramente mayor formación de estos elementos en presencia de exosomas derivados de mamosferas estimuladas con IL-6 que cuando las mamosferas permanecen sin estímulo (Figura 14). Para esta línea celular los exosomas derivados de células adherentes bajo estímulo de IL-8 tuvieron inducción de redes y segmentos de forma significativamente parecida al FGF (+).

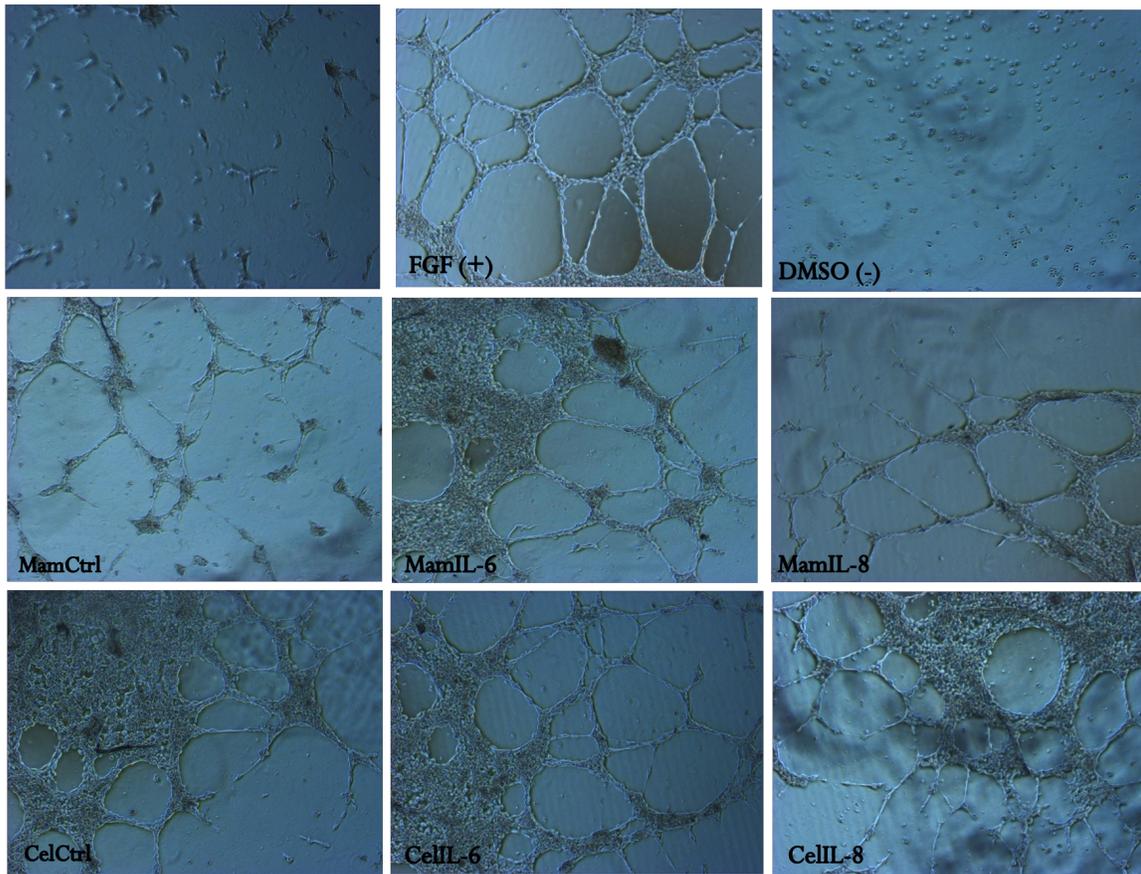


Figura 13. Ensayo de angiogénesis in vitro en células HUVEC a las 6 horas de haber adicionado 50ug/ml (proteína total) de exosomas de células y mamosferas HCC70 estimuladas y no estimuladas con IL-6 e IL-8. Células HUVEC Sin Estimular (SE), células HUVEC más: Control Negativo DMSO (-), FGF (+), Exosomas de Células sin estímulo (CelCtrl), estimuladas con IL-6 (CellIL-6) e IL8 (CellIL-8) y Mamosferas Células sin estímulo (MamCtrl), estimuladas con IL-6 (MamIL-6) e IL8 (MamIL-8). n=3

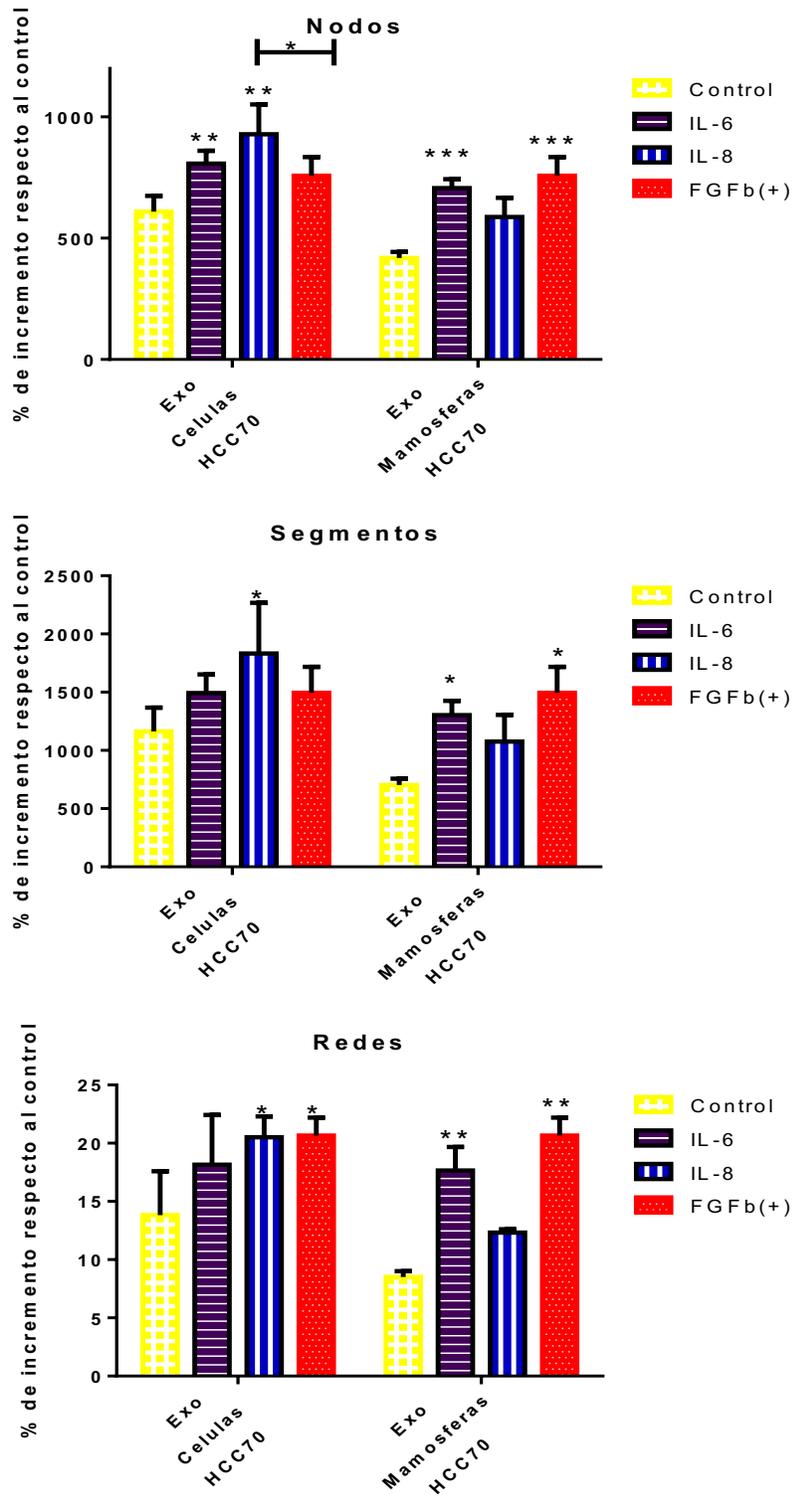


Figura 14. Cuantificación de inducción de nodos, segmentos y redes por exosomas de células y mamosferas HCC70 estimuladas y no estimuladas con IL-6 e IL-8 a las 6 horas. $p < 0.05$. $n = 3$

DISCUSIÓN

La presencia de marcadores inmunohistoquímicos como el ER, PR y HER2; es hoy en día ampliamente utilizada para la determinación de subtipos moleculares de CM, y se ha observado que los tumores con negatividad a estos receptores son lo que tienen a menudo peor pronóstico y menor respuesta a terapia.

Hoy en día el cultivo de esferoides es ampliamente usado para el enriquecimiento de células con características "stem like", sin embargo se ha observado entre cultivos primarios y líneas celulares de CM diferentes densidades celulares para la óptima formación de esferoides lo cual puede depender del fenotipo, estadio y morfología del cultivo (Shaw et al., 2012). Para la generación de mamíferas de líneas celulares con diferente fenotipo y estadio de CM se partió de diferentes densidades celulares, para la línea MCF7 (fenotipo Luminal A, estadio II) se sembraron 350 mil células y se incubaron por 4 días para una óptima generación de esferoides (Figura 2B y C). En el caso de la línea HCC70 (fenotipo Triple Negativo) se sembraron 250 mil células y se incubaron por 3 días para una óptima generación de esferoides (Figura 2E y F), es decir este fenotipo requirió de una densidad celular y un periodo de incubación menor que el fenotipo Luminal, como se ha visto que sucede con líneas tumorales de fenotipos agresivos cuando forman esferoides apoyando la teoría que asocia a estos tipos celulares con características tipo CSC (Kapucuoglu et al., 2015; Shaw et al., 2012).

El enriquecimiento de BCSC inicialmente se atribuía a la presencia del fenotipo CD24-/CD44+, sin embargo en la actualidad se sabe que esto no siempre ocurre en el cultivo de mamíferas, y que más bien está asociado al fenotipo inicial de la línea celular en monocapa, y el enriquecimiento de dicho fenotipo puede estar

asociado a u otros estímulos externos como IL6, cultivo prolongado, hipoxia, Transición Epitelio Mesenquima, etc (Guttilla et al., 2012; Jaggupilli & Elkord, 2012; Xie et al., 2012). La determinación del fenotipo de las líneas celulares y mamosferas se realizó por citometría de flujo FACS para los marcadores de BCSC CD44 y CD24, Para la línea celular MCF7 (fenotipo Luminal A) se encontró un fenotipo inicial CD24+/CD44-, sin embargo los esferoides derivados tienen positividad para ambos marcadores (CD24+/CD44+). Para HCC70 (fenotipo Triple Negativo) se encontró una doble positividad de marcadores en su cultivo en monocapa (CD24+/CD44+), fenotipo que se conservó en sus mamosferas derivadas. Esto concuerda con el fenotipo reportado para esferoides de MCF7 y otras líneas celulares de cáncer de mama (Guttilla et al., 2012; Xie et al., 2012).

Una vez establecido el cultivo en monocapa y de mamosferas para ambas líneas celulares se extrajeron los exosomas por ultracentrifugación a partir de sus sobrenadantes. Tomando en cuenta que se ha reportado la presencia de varios tipos de microvesículas cuando son obtenidos por ultracentrifugación (Elin J Ekström, 2014; Roma-Rodrigues et al., 2014; Yu et al., 2006), para comprobar e identificar el enriquecimiento de exosomas se identificó por Western blot la presencia de proteínas de marcaje en nuestras muestras. Se usaron anticuerpos para la tetraspina de membrana CD81 y la proteína cargo de exosomas TSG 101, ambas se identificaron en los exosomas de células y mamosferas derivados de línea célula y mamosferas MCF7 y HCC70, dicho enriquecimiento de marcadores no se observa en el lisado de proteína de células (Figura 4), lo cual sustenta un enriquecimiento de exosomas en nuestra muestra (Thery et al., 2006).

Los exosomas de células y mamosferas MCF7 y fueron observados por Microscopia Electrónica de Transmisión y todos se encontraron en una rango de tamaño entre los 80 y 259 nm.

Se identificó la distribución de microvesículas en las muestras obtenidas por ultracentrifugación con un conteo de partículas (por triplicado) o Análisis de Rastreo de Nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)). La lecturas se realizaron en el equipo NanoSight300 (Malvern,USA), el cual se basa en la medición de la tasa del movimiento Browniano para determinar la distribución en tamaño de nanopartículas así como su concentración por mililitro (Figura 7 y 8). Las mediciones observadas por NTA concordaron con lo observado por Microscopia Electrónica de Transmisión y en ambos casos se encontró una homogeneidad en el taño de micro vesículas entre los 100 y los 350 nm, a excepción del caso de las microvesículas de la línea celular MCF7 donde en el conteo de partículas se encontró una gran heterogeneidad en la distribución del tamaño de las microvesículas en esta muestra (Figura 8). Esto es consistente con el enriquecimiento de varios tipos de microvesículas, sin embargo esta heterogénea distribución podría deberse a la fusión de los exosomas durante la extracción(Altevogt, Bretz, Ridinger, Utikal, & Umansky, 2014; Pant et al., 2012).

Para determinar el efecto inductor de angiogénesis in vitro, se realizaron ensayos con células HUVEC en matrigel, se adicionaron 50 ug/ml de proteína total de exosomas de células o mamosferas MCF7 y HCC70 por separado. Para validar el sistema se usaron FGFb como control positivo ya que es conocido su gran potencial angiogénico y DMSO como control negativo (Figura 9). El efecto inductor de angiogénesis fue reportado como la formación de nodos (puntos de al

menos triple ramificación), segmentos (unión de nodos) y redes (formación de circuitos cerrado) en porcentaje de incremento con respecto al control. (Figura 10)

Se encontró una mayor inducción de nodos, segmentos y redes de los exosomas derivados de la línea HCC70 (fenotipo Triple Negativo, metastásico) con respecto a los derivados de la línea MCF7 (fenotipo Luminal A). Estos datos concuerdan con otros ensayos funcionales (migración, invasión e incluso angiogénesis) en donde se ha reportado que líneas celulares con fenotipo Triple Negativo (metastásico, más agresivo) secretan exosomas con mayor efecto funcional (mayor invasión, mayor carga oncogénica, mayor potencial angiogénico) .con respecto a fenotipos Luminales (Hannafon et al., 2015; Harris et al., 2015) . Además, en la línea Triple Negativo (HCC70) se observó un efecto diferencial entre exosomas de células y de mamosferas, siendo estas últimas cuyos exosomas tuvieron un efecto menor con respecto a los cultivos celulares en monocapa. En datos recientes no publicados de nuestro grupo se encontró un efecto diferencial de exosomas derivados de células en monocapa y mamosferas de la línea 4T1 de cáncer de mama de ratón en la angiogénesis, sin embargo para esta línea el mayor potencial angiogénico fue presentado por los exosomas derivados de mamosferas. Esto puede deberse a que el efecto angiogénico de los exosomas depende de la línea celular tumoral así como del estadio y fenotipo del tumor, e incluso la especie de donde derivo el tumor.

Se determinó el efecto en la angiogénesis in vitro de los exosomas derivados de células y mamosferas MCF7 (fenotipo Luminal A) bajo un estímulo pro inflamatorio con citocinas IL-6 e IL-8 (Figura 13).

Se observó cómo era esperado una mayor inducción de nodos (Figura 12), en los exosomas de células y mamosferas estimuladas con IL-8, al igual que en las redes (Figura 12), ya que es bien conocido el papel de la IL8 en la angiogénesis, podría entonces proponer que dicho efecto tanto local como sistémico es mediado por microvesículas(S. Singh et al., 2007). En la formación de segmentos, la mayor inducción se observó en presencia de los exosomas de mamosferas estimuladas con IL8 (Figura 12). Cabe mencionar que los exosomas derivados de células y mamosferas MCF7 (fenotipo Luminal) aún bajo estímulo inflamatorio por estas citocinas, no tuvieron un efecto semejante al control positivo (FGF) en la inducción de alguno de los elementos de la angiogénesis.

También se determinó el efecto en la angiogénesis in vitro de los exosomas derivados de células y mamosferas HCC70 (fenotipo Triple Negativo) estimuladas con IL-6 e IL-8 (Figura 13). Se observó un claro incremento en la inducción de nodos por parte de los exosomas de células estimuladas con IL-6 e IL-8 (Figura 14), incluso se observó incremento significativo de exosomas de células estimuladas con IL8 respecto al control positivo (FGFb). Esto es de suma importancia ya que aunque es bien conocido el papel de IL8 en la inducción de angiogénesis no hay reportes que asocien dicho efecto a la presencia de microvesículas o exosomas. Estos datos apoyan el importante papel de un microambiente inflamatorio para la angiogénesis mediado por microvesículas (Altevogt et al., 2014).

En la formación de segmentos y redes la mayor inducción se observó para los exosomas de células estimuladas con IL-8 y exosomas de mamosferas estimuladas con IL6 (Figura 19). Para estos dos indicadores angiogénicos se

observó claramente mayor formación de estos elementos en presencia de exosomas derivados de mamíferos cuando estas son estimuladas pro inflamatoriamente con IL-6 (Figura 14). Se ha asociado a esta citocina con la progresión tumoral activar la expresión de VEGF vía STAT3 lo cual desemboca en inducción de angiogénesis (Wei et al., 2003), lo cual se asocia a nuestros datos ya que la inducción de nodos por exosomas de mamíferos HCC70 aumentó de forma significativa por el estímulo de IL-6. Esto es un hallazgo importante pues poco se ha descrito del papel de la IL6 en la angiogénesis mediada por microvesículas.

Para la línea HCC70 (Triple Negativo, metastásico) a diferencia de MCF7 (Luminal A), los exosomas derivados de células adherentes bajo estímulo de IL-8 tuvieron inducción de redes y segmentos de forma significativamente parecida al FGF (+) e incluso hubo incremento significativo de la inducción de nodos por exosomas de células estimuladas con IL8 respecto al control positivo. Esto concuerda con que los exosomas de fenotipos más agresivos como el Triple Negativo de cáncer secretan microvesículas con mayor cantidad de elementos oncogénicos (proteínas, miRNAs, remodeladores de matriz extracelular, RNAs largo no codificantes), lo cual en este trabajo se observó es potenciado por la presencia de factores inflamatorios como citocinas (IL-6) y quimiocinas (IL-8) incrementando su efecto funcional en procesos para la progresión tumoral como la inducción de angiogénesis (Hannafon et al., 2015; Harris et al., 2015)

Reportes de exosomas derivados de fibroblastos afirman que la estimulación con IL1-b, otra citocina pro inflamatoria, incrementa la angiogénesis con respecto de los fibroblastos sin estímulo por aumentar el contenido de IL-6, la

Metaloproteinasa de Matriz extracelular 3 (MMP-3) y VEGF en los exosomas (Kato et al., 2014).

Con este trabajo se ha demostrado que los exosomas derivados de células tumorales tienen una importante contribución en la estimulación de la angiogénesis (Gajos-Michniewicz et al., 2014; Katoh, 2013; Roma-Rodrigues et al., 2014), y que además las condiciones en que son liberadas estas microvesículas son clave en la inducción de los elementos angiogénicos, tal como se ha reportado en la literatura con estímulos como hipoxia, tratamiento con DHA (anti-tumoral) y otras citocinas como IL-1b (Hannafon et al., 2015; Kato et al., 2014).

Se comprobó un aumento del potencial angiogénico de exosomas de células y mamosferas de ambos fenotipos de cáncer de mama, tanto Luminal A (MCF7) como Triple Negativo(HCC70), secretados bajo estímulo inflamatorio por las citocinas IL6 e IL8, lo cual, retomando otros reportes(Hannafon et al., 2015; Kato et al., 2014), podría estar sucediendo debido a que el tratamiento con citocinas modifica el contenido de los exosomas (en cuanto a citocinas, metaloproteinasas de matriz extracelular, RNAs no codificantes) potenciando su función en la angiogénesis y favoreciendo la metástasis y la progresión tumoral.

CONCLUSIÓN

- Se estableció el cultivo de mamíferas a partir de las líneas celulares MCF7, y HCC70, así como su fenotipo encontrando en ambas líneas doble positividad de marcadores CSC (CD24+/CD44+) para sus esferoides.
- Los exosomas de líneas celulares así como de mamíferas fueron caracterizados para las proteínas marcadoras de exosomas CD81 y TSG 101, así como por microscopía Electrónica de Transmisión y NTA para la identificación de la distribución y el tamaño de microvesículas, encontrando heterogeneidad de microvesículas.
- Los exosomas de células y mamíferas HCC70 (Triple Negativo) inducen una mayor inducción de angiogénesis con respecto a microvesículas derivadas MCF7 (Fenotipos Luminal A).
- Se encontró un notorio incremento en la inducción de nodos por exosomas por parte de los exosomas de células MCF7 y HCC70 estimuladas con IL-8. Incluso la inducción por parte de los exosomas HCC70 con estímulo de IL8 fue significativamente mayor al control positivo (FGFb)
- Para HCC70 el estímulo con IL-6 en las mamíferas produjo inducción significativamente mayor de nodos y redes, mientras para las células fue el estímulo con IL-8.
- Para MCF7 únicamente el estímulo con IL-8 en las mamíferas produjo un incremento significativo en la formación de redes con respecto al control.

PERSPECTIVAS

- Probar la estimulación con otras citocinas pro inflamatorias (como IL-1 e IFN) y quimiocinas (CCL12, CCL21, CXCL12) en mamosferas derivadas de otras líneas celulares de CM de los demás subtipos moleculares de CM.
- Determinar si el incremento en la inducción de angiogénesis por exosomas de células y mamosferas estimuladas con IL-6 e IL-8 está dado por un cambio en el contenido de proteína (citocinas, quimiocinas, metaloproteinasas de matriz, VEGF) y RNAs pequeños y largos no codificantes.
- Evaluar la inducción de angiogénesis por exosomas de células y mamosferas in vitro.

REFERENCIAS

- Aboussekhra, A. (2011). Role of cancer-associated fibroblasts in breast cancer development and prognosis. *Int J Dev Biol*, 55(7-9), 841-849. doi: 10.1387/ijdb.113362aa
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7), 3983-3988. doi: 10.1073/pnas.0530291100
- Alison, M. R., Islam, S., & Wright, N. A. (2010). Stem cells in cancer: instigators and propagators? *J Cell Sci*, 123(Pt 14), 2357-2368. doi: 10.1242/jcs.054296
- Altevogt, P., Bretz, N. P., Ridinger, J., Utikal, J., & Umansky, V. (2014). Novel insights into exosome-induced, tumor-associated inflammation and immunomodulation. *Semin Cancer Biol*, 28, 51-57. doi: 10.1016/j.semcancer.2014.04.008
- Brownlee, Z., Lynn, K. D., Thorpe, P. E., & Schroit, A. J. (2014). A novel "salting-out" procedure for the isolation of tumor-derived exosomes. *J Immunol Methods*, 407, 120-126. doi: 10.1016/j.jim.2014.04.003
- Bussolati, B., Grange, C., Sapino, A., & Camussi, G. (2009). Endothelial cell differentiation of human breast tumour stem/progenitor cells. *J Cell Mol Med*, 13(2), 309-319. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00338.x
- Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860-867. doi: 10.1038/nature01322
- Cheang, M. C., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., . . . Nielsen, T. O. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with

- luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 101(10), 736-750. doi: 10.1093/jnci/djp082
- Dai, X., Xiang, L., Li, T., & Bai, Z. (2016). Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J Cancer*, 7(10), 1281-1294. doi: 10.7150/jca.13141
- Dey, D., Saxena, M., Paranjape, A. N., Krishnan, V., Giraddi, R., Kumar, M. V., . . . Rangarajan, A. (2009). Phenotypic and functional characterization of human mammary stem/progenitor cells in long term culture. *PLoS One*, 4(4), e5329. doi: 10.1371/journal.pone.0005329
- Dontu, G., Abdallah, W. M., Foley, J. M., Jackson, K. W., Clarke, M. F., Kawamura, M. J., & Wicha, M. S. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*, 17(10), 1253-1270. doi: 10.1101/gad.1061803
- Elin J Ekström, C. B., Verena von Bülow, Filiz Serifler, Eric Carlemalm, Göran Jönsson, Tommy Andersson and Karin Leandersson. (2014). WNT5A induces release of exosomes containing pro-angiogenic and immunosuppressive factors from malignant melanoma cells. *Mol Cancer*, 13(88).
- Fatima, F., & Nawaz, M. (2015). Stem cell-derived exosomes: roles in stromal remodeling, tumor progression, and cancer immunotherapy. *Chin J Cancer*, 34(12), 541-553. doi: 10.1186/s40880-015-0051-5
- Gajos-Michniewicz, A., Duechler, M., & Czyz, M. (2014). MiRNA in melanoma-derived exosomes. *Cancer Lett*, 347(1), 29-37. doi: 10.1016/j.canlet.2014.02.004

- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, *140*(6), 883-899. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025
- Guttilla, I. K., Phoenix, K. N., Hong, X., Tirnauer, J. S., Claffey, K. P., & White, B. A. (2012). Prolonged mammosphere culture of MCF-7 cells induces an EMT and repression of the estrogen receptor by microRNAs. *Breast Cancer Res Treat*, *132*(1), 75-85. doi: 10.1007/s10549-011-1534-y
- Hannafon, B. N., Carpenter, K. J., Berry, W. L., Janknecht, R., Dooley, W. C., & Ding, W. Q. (2015). Exosome-mediated microRNA signaling from breast cancer cells is altered by the anti-angiogenesis agent docosahexaenoic acid (DHA). *Mol Cancer*, *14*, 133. doi: 10.1186/s12943-015-0400-7
- Harris, D. A., Patel, S. H., Gucek, M., Hendrix, A., Westbroek, W., & Taraska, J. W. (2015). Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement. *PLoS One*, *10*(3), e0117495. doi: 10.1371/journal.pone.0117495
- Hodge, D. R., Hurt, E. M., & Farrar, W. L. (2005). The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer*, *41*(16), 2502-2512. doi: 10.1016/j.ejca.2005.08.016
- Jaggupilli, A., & Elkord, E. (2012). Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol*, *2012*, 708036. doi: 10.1155/2012/708036
- Kapucuoglu, N., Bozkurt, K. K., Baspinar, S., Kocer, M., Eroglu, H. E., Akdeniz, R., & Akcil, M. (2015). The clinicopathological and prognostic significance of CD24, CD44, CD133, ALDH1 expressions in invasive ductal carcinoma of the breast: CD44/CD24 expression in breast cancer. *Pathol Res Pract*, *211*(10), 740-747. doi: 10.1016/j.prp.2015.05.011

- Kato, T., Miyaki, S., Ishitobi, H., Nakamura, Y., Nakasa, T., Lotz, M. K., & Ochi, M. (2014). Exosomes from IL-1beta stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, 16(4), R163. doi: 10.1186/ar4679
- Katoh, M. (2013). Therapeutics targeting angiogenesis: genetics and epigenetics, extracellular miRNAs and signaling networks (Review). *Int J Mol Med*, 32(4), 763-767. doi: 10.3892/ijmm.2013.1444
- Korkaya, H., Kim, G. I., Davis, A., Malik, F., Henry, N. L., Ithimakin, S., . . . Wicha, M. S. (2012). Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. *Mol Cell*, 47(4), 570-584. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.014
- Kruger, S., Abd Elmageed, Z. Y., Hawke, D. H., Worner, P. M., Jansen, D. A., Abdel-Mageed, A. B., . . . Izadpanah, R. (2014). Molecular characterization of exosome-like vesicles from breast cancer cells. *BMC Cancer*, 14, 44. doi: 10.1186/1471-2407-14-44
- Li, J., Zha, X. M., Wang, R., Li, X. D., Xu, B., Xu, Y. J., & Yin, Y. M. (2012). Regulation of CD44 expression by tumor necrosis factor-alpha and its potential role in breast cancer cell migration. *Biomed Pharmacother*, 66(2), 144-150. doi: 10.1016/j.biopha.2011.11.021
- Li, M., Zeringer, E., Barta, T., Schageman, J., Cheng, A., & Vlassov, A. V. (2014). Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1652). doi: 10.1098/rstb.2013.0502

- Li, Q., Eades, G., Yao, Y., Zhang, Y., & Zhou, Q. (2014). Characterization of a stem-like subpopulation in basal-like ductal carcinoma in situ (DCIS) lesions. *J Biol Chem*, 289(3), 1303-1312. doi: 10.1074/jbc.M113.502278
- Lotvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzas, E. I., Di Vizio, D., Gardiner, C., . . . They, C. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*, 3, 26913. doi: 10.3402/jev.v3.26913
- Mao, Y., Keller, E. T., Garfield, D. H., Shen, K., & Wang, J. (2013). Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 32(1-2), 303-315. doi: 10.1007/s10555-012-9415-3
- Nguyen, L. V., Vanner, R., Dirks, P., & Eaves, C. J. (2012). Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer*, 12(2), 133-143. doi: 10.1038/nrc3184
- Pant, S., Hilton, H., & Burczynski, M. E. (2012). The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem Pharmacol*, 83(11), 1484-1494. doi: 10.1016/j.bcp.2011.12.037
- Penforis, P., Vallabhaneni, K. C., Whitt, J., & Pochampally, R. (2015). Extracellular vesicles as carriers of microRNA, proteins and lipids in tumor microenvironment. *Int J Cancer*. doi: 10.1002/ijc.29417
- Penforis, P., Vallabhaneni, K. C., Whitt, J., & Pochampally, R. (2016). Extracellular vesicles as carriers of microRNA, proteins and lipids in tumor microenvironment. *Int J Cancer*, 138(1), 14-21. doi: 10.1002/ijc.29417
- Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., . . . Daidone, M. G. (2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic

- breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, 65(13), 5506-5511. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0626
- Pontiggia, O., Sampayo, R., Raffo, D., Motter, A., Xu, R., Bissell, M. J., . . . Simian, M. (2012). The tumor microenvironment modulates tamoxifen resistance in breast cancer: a role for soluble stromal factors and fibronectin through beta1 integrin. *Breast Cancer Res Treat*, 133(2), 459-471. doi: 10.1007/s10549-011-1766-x
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105-111. doi: 10.1038/35102167
- Roma-Rodrigues, C., Fernandes, A. R., & Baptista, P. V. (2014). Exosome in tumour microenvironment: overview of the crosstalk between normal and cancer cells. *Biomed Res Int*, 2014, 179486. doi: 10.1155/2014/179486
- Sadelain, M., Riviere, I., & Brentjens, R. (2003). Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer*, 3(1), 35-45. doi: 10.1038/nrc971
- Salgado, R., Junius, S., Benoy, I., Van Dam, P., Vermeulen, P., Van Marck, E., . . . Dirix, L. Y. (2003). Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer*, 103(5), 642-646. doi: 10.1002/ijc.10833
- Sanguinetti, A., Santini, D., Bonafe, M., Taffurelli, M., & Avenia, N. (2015). Interleukin-6 and pro inflammatory status in the breast tumor microenvironment. *World J Surg Oncol*, 13, 129. doi: 10.1186/s12957-015-0529-2

- Sansone, P., Storci, G., Tavolari, S., Guarnieri, T., Giovannini, C., Taffurelli, M., . . . Bonafe, M. (2007). IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *J Clin Invest*, *117*(12), 3988-4002. doi: 10.1172/JCI32533
- Schnitt, S. J. (2010). Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol*, *23 Suppl 2*, S60-64. doi: 10.1038/modpathol.2010.33
- Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., & Sharma, K. K. (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. *J Adv Pharm Technol Res*, *1*(2), 109-126.
- Shaw, F. L., Harrison, H., Spence, K., Ablett, M. P., Simoes, B. M., Farnie, G., & Clarke, R. B. (2012). A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, *17*(2), 111-117. doi: 10.1007/s10911-012-9255-3
- Simpson, R. J., Lim, J. W., Moritz, R. L., & Mathivanan, S. (2009). Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics*, *6*(3), 267-283. doi: 10.1586/epr.09.17
- Singh, J. K., Farnie, G., Bundred, N. J., Simoes, B. M., Shergill, A., Landberg, G., . . . Clarke, R. B. (2013). Targeting CXCR1/2 significantly reduces breast cancer stem cell activity and increases the efficacy of inhibiting HER2 via HER2-dependent and -independent mechanisms. *Clin Cancer Res*, *19*(3), 643-656. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1063
- Singh, J. K., Simoes, B. M., Clarke, R. B., & Bundred, N. J. (2013). Targeting IL-8 signalling to inhibit breast cancer stem cell activity. *Expert Opin Ther Targets*, *17*(11), 1235-1241. doi: 10.1517/14728222.2013.835398

- Singh, S., Sadanandam, A., & Singh, R. K. (2007). Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 26(3-4), 453-467. doi: 10.1007/s10555-007-9068-9
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Hide, T., & Dirks, P. B. (2004). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, 23(43), 7267-7273. doi: 10.1038/sj.onc.1207946
- Soysal, S. D., Tzankov, A., & Muenst, S. E. (2015). Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology*, 82(3-4), 142-152. doi: 10.1159/000430499
- They, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 3, Unit 3 22. doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30
- Todorovic-Rakovic, N., & Milovanovic, J. (2013). Interleukin-8 in breast cancer progression. *J Interferon Cytokine Res*, 33(10), 563-570. doi: 10.1089/jir.2013.0023
- Valdivia-Silva, J. E., Franco-Barraza, J., Silva, A. L., Pont, G. D., Soldevila, G., Meza, I., & Garcia-Zepeda, E. A. (2009). Effect of pro-inflammatory cytokine stimulation on human breast cancer: implications of chemokine receptor expression in cancer metastasis. *Cancer Lett*, 283(2), 176-185. doi: 10.1016/j.canlet.2009.03.040
- Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Gutierrez-Vazquez, C., Sanchez-Madrid, F., & Mittelbrunn, M. (2014). Sorting it out: regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol*, 28, 3-13. doi: 10.1016/j.semcancer.2014.04.009

- Wang, R., Lv, Q., Meng, W., Tan, Q., Zhang, S., Mo, X., & Yang, X. (2014). Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors. *J Thorac Dis*, 6(6), 829-837. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.03.38
- Wei, L. H., Kuo, M. L., Chen, C. A., Chou, C. H., Lai, K. B., Lee, C. N., & Hsieh, C. Y. (2003). Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*, 22(10), 1517-1527. doi: 10.1038/sj.onc.1206226
- Xie, G., Yao, Q., Liu, Y., Du, S., Liu, A., Guo, Z., . . . Yuan, Y. (2012). IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures. *Int J Oncol*, 40(4), 1171-1179. doi: 10.3892/ijo.2011.1275
- Yang, X. R., Chang-Claude, J., Goode, E. L., Couch, F. J., Nevanlinna, H., Milne, R. L., . . . Garcia-Closas, M. (2011). Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. *J Natl Cancer Inst*, 103(3), 250-263. doi: 10.1093/jnci/djq526
- Yao, C., Lin, Y., Ye, C. S., Bi, J., Zhu, Y. F., & Wang, S. M. (2007). Role of interleukin-8 in the progression of estrogen receptor-negative breast cancer. *Chin Med J (Engl)*, 120(20), 1766-1772.
- Yu, X., Harris, S. L., & Levine, A. J. (2006). The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res*, 66(9), 4795-4801. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4579