



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PAPEL DE LAS CÉLULAS TRONCALES
MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO
ADIPOSO SOBRE EL COMPORTAMIENTO
TUMORAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

CARLOS ERNESTO BASTIÁN EUGENIO



**DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. CAROLINA GONZÁLEZ TORRES**

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Bastían
Eugenio
Carlos Ernesto
7848428391
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
407027345

2. Datos del tutor
M. en C.
Carolina
González
Torres

3. Datos del Sinodal 1
Dr.
Jorge Antonio
García
Álvarez

4. Datos del sinodal 2
Dra.
Gisela
Ceballos
Cancino

5. Datos del sinodal 3
Dr.
Emilio Joaquín
Córdova
Alarcón

6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Karla Itzel
Vázquez
Santillán

7. Datos del trabajo escrito
Papel de las células troncales
mesenquimales derivadas de tejido
adiposo sobre el comportamiento tumoral
60 p
2013

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Cáncer.....	7
1.2. Obesidad y cáncer.....	9
1.3. Células troncales.....	11
1.4. Células troncales mesenquimales.....	13
1.5. Células troncales mesenquimales y cáncer.....	15
1.6. Tejido blanco como fuente de células troncales mesenquimales.....	16
1.7. Células troncales derivadas de tejido adiposo y su relación con cáncer.....	16
1.8. Factor nuclear kappa B.....	17
1.9. Importancia del estudio.....	18
2. HIPÓTESIS.....	19
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo general.....	19
3.2. Objetivos particulares.....	19
4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	20
5. RESULTADOS.....	29
6. DISCUSIÓN.....	41
7. CONCLUSIONES.....	49
8. LITERATURA CITADA.....	50
ANEXOS.....	61

ABREVIATURAS

CT: Células troncales

CTH: Células troncales hematopoyética

CTM: Células troncales mesenquimal

CTMO: Células troncales derivadas de médula ósea

CTTA: Células troncales derivadas de tejido adiposo

CO₂: Dióxido de carbono

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Acido desoxirribonucleico

ER: Receptor de estrógenos

FITC: Isotiocianato de flouresceína

IBMX: 3-isobutil-1-metillxantina

IGF-1: Factor de crecimiento similar a la insulina

IL: Interleucina

IP: Ioduro de propidio

Hrs: Horas

Min: Minutos

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

Nf-κB: Factor nuclear kappa B

PBS: Buffer salino de fosfato

PE: Ficoeritrina

RPM: Revoluciones por minuto

SFB: Suero fetal bovino

SDS: Dodecil sulfato sodico

TAB: Tejido adiposo blanco

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

El cáncer y la obesidad son enfermedades con un gran impacto en la salud a nivel mundial. Evidencia epidemiológica sugiere que las personas con obesidad tienen un alto riesgo de varios tipos de cáncer, incluyendo colon, esófago, mama (en mujeres pos-menopáusicas), endometrio, riñón, hígado y páncreas.

Se ha propuesto que la obesidad por medio de su fracción de adipocitos, promueve la progresión del cáncer. Sin embargo se ha explorado poco el papel de la fracción vascular estromal, la cual está constituida por células troncales mesenquimales (CTTA). Mientras que los adipocitos secretan adipocinas, las CTTA producen importantes factores angiogénicos, inmunomodulatorios y de sobrevivencia (citocinas y factores de crecimiento). Las CTTA son similares a las células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea, de las cuales se ha acumulado evidencia de que dan soporte al microambiente tumoral. Existe evidencia de que las CTTA son movilizadas y reclutadas por tumores en modelos murinos y también existe evidencia de movilización de células con el inmunofenotipo de CTTA hacia tumores en pacientes con obesidad. Con base en estas observaciones, se cree que la movilización de CTTA y su reclutamiento por tumores podrían incrementar la estimulación del progreso tumoral por medio de acciones parácrinas sobre los tumores mismos. En este estudio se decidió observar cual era el papel de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo en la progresión del cáncer, estudiando procesos de migración, proliferación e invasión líneas celulares transformadas por medio de ensayos de migración, proliferación y viabilidad.

En este trabajo se observó que el medio condicionado de CTTA provenientes de rata promueven los procesos celulares estudiados en líneas celulares transformadas tanto de humano como de rata. Los resultados de esta tesis permiten sugerir que las CTTA además de su papel en el mantenimiento del nicho tumoral y su papel como inmunoreguladoras, desempeñan un papel directo sobre la progresión del tumor promoviendo procesos como la migración, proliferación y viabilidad posiblemente a través de la vía del factor nuclear kappa B. Por lo que el adecuado control de la obesidad (tanto de la fracción de adipocitos como las CTTA) en pacientes con cáncer podría favorecer la disminución de la progresión tumoral.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

Los seres vivos tienen como unidad funcional a las células, las cuales realizan procesos sumamente complejos para promover su desarrollo. En condiciones normales, el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la muerte celular se llevan a cabo con espectacular control y armonía dentro de cada tejido del cuerpo. Estas actividades son tan importantes para un organismo, que si se manifiestan errores, los puntos de monitoreo distribuidos a lo largo del ciclo celular junto con los mecanismos de reparación del DNA impiden la generación de inestabilidad genómica, y en caso de que la célula tenga un riesgo elevado de generar esta condición, se activan mecanismos que desencadenan su muerte celular. Sin embargo, la perturbación constante de este sistema debida a múltiples factores endógenos y exógenos altera la homeostasis celular, promoviendo su transformación, y por lo tanto, el desarrollo del cáncer [1], [2].

Al hablar de cáncer hacemos referencia a un conjunto de enfermedades con varios mecanismos etiológicos en los que algunas células adquieren, mediante alteraciones genéticas y epigenéticas [3], la capacidad de proliferar de manera exacerbada y de evadir la apoptosis [1–5]. A partir de estas alteraciones, las células adquieren un potencial invasivo, mediante mecanismos cada vez más complejos, como la angiogénesis y la metástasis [6–8].

Se han caracterizado tres grupos principales de genes involucrados en el desarrollo del cáncer: oncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del DNA. Los oncogenes son genes cuya ganancia de función (comúnmente adquirida por mutaciones) promueve el desarrollo del cáncer y están comúnmente ligados a vías de señalización que permiten la proliferación celular. Por el contrario, los genes supresores de tumores ejercen un control negativo sobre la progresión del ciclo celular y su pérdida de función predispone al desarrollo de cáncer, principalmente al promover la evasión de la muerte celular. Por último, los genes de reparación del DNA impiden la inestabilidad genómica mediante múltiples mecanismos, evitando que el daño al DNA se transfiera a la siguiente generación de células y al igual que los genes supresores de tumores, su pérdida de función es un factor de predisposición al desarrollo tumoral (Tabla 1) [1], [2], [9], [10].

Tabla 1. Propiedades de oncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación

Propiedad	Oncogenes	Genes supresores de tumores	Genes de reparación
Número de eventos mutagénicos requeridos para contribuir al cáncer	Uno (dominante)	Dos (recesivo)	Dos (recesivo)
Función del alelo mutante	Ganancia de función	Perdida de función	Perdida de función
Origen de la mutación	Somática	Somática o hereditaria	Somática o hereditaria
Mecanismo de acción (en general)	Parte de una vía de transducción de señales.	Regulación negativa de la división celular	Fidelidad del proceso de replicación.
Ejemplos	Hormonas de crecimiento Receptores Proteínas G Proteínas cinasas	Proteínas que regulan la transcripción y a oncogenes Factores de transcripción.	Enzimas de reparación del DNA

Tomado y modificado de [11].

La idea de que el desarrollo del cáncer es un proceso de múltiples pasos viene desde estudios muy tempranos de tumores inducidos y del descubrimiento de los efectos co-carcinogénicos del aceite de crotón [12]. Rous y colaboradores a través de la inducción de papilomas de piel en ratones mediante virus, concluyeron que las células tumorales pueden existir en estado latente y que el proceso de inducción y consecuente crecimiento del tumor involucra otros mecanismos, los cuales el llamo iniciación, promoción y progresión [13].

La iniciación tiene tres propiedades, solo requiere una pequeña cantidad de tiempo de exposición a un agente iniciador, es irreversible y es heredable, debido a que la célula iniciada transmite las alteraciones genéticas a sus células hijas. La fase de promoción, al contrario, es un proceso gradual y lento, que requiere una exposición prolongada de un agente promotor (muchos de estos son mitógenos). Una característica de los agentes promotores es que la exposición a estos, de manera aislada o antes del agente iniciador, no forman ningún tumor maligno, además son parcialmente reversibles. Esta es una fase de proliferación celular que propaga el daño inicial y lleva a la aparición de células de la clona alterada. La etapa de progresión es una extensión de la promoción del tumor y se genera como resultado de la proliferación celular causada por agentes promotores permitiendo que el daño infligido por la iniciación sea propagado y las células iniciadas

se expandan de manera clonal. Esta propagación de las células dañadas con alteraciones genéticas, lleva a la producción de más alteraciones genéticas, por lo que esta fase es irreversible. La inestabilidad genómica es una de las características de la fase de progresión, este proceso genera translocaciones y aneuploidías que son observadas frecuentemente en células cancerosas. Tales alteraciones en el genoma de las células neoplásicas durante la progresión promueven el aumento de la tasa de crecimiento, angiogénesis, invasión y capacidad metastásica [1], [2], [13], [14].

Ahora bien, existen varios mecanismos para la progresión de cada una de las fases de la carcinogénesis [13], tanto químicos, como físicos y/o biológicos [3].

1.2. Obesidad y cáncer

La obesidad se define como una acumulación excesiva o anormal de grasa que involucra un riesgo para la salud [15], [16]. La causa fundamental de la obesidad es la pérdida del balance energético, es decir, el aumento de la ingesta calórica que excede al gasto energético por un periodo prolongado de tiempo, lo que lleva al incremento de la masa corporal [16]. La obesidad es una enfermedad compleja causada por diferentes factores, como los hereditarios (genéticos), la dieta, el estilo de vida y las condiciones ambientales [17]. La prevalencia de obesidad entre niños, adolescentes y adultos ha aumentado dramáticamente durante las últimas décadas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que actualmente existen más de 1600 millones de adultos con sobrepeso y al menos 400 millones de éstos son obesos. Se predice que para el 2015 existirán 700 millones de personas obesas [16], [18]. De esta manera es como la obesidad adquiere características de una auténtica pandemia y ha sido reconocida como uno de los principales problemas de la salud mundial. Además este problema de salud ha sido relacionado a otras enfermedades que incluyen enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, dislipidemia, enfermedades del hígado y varios tipos de cáncer [19].

La relación entre la desregulación del metabolismo y la carcinogénesis se propuso por primera vez por Otto Warburg en 1956 [20]. En el 2002, expertos de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) evaluaron esta relación y concluyeron que algunos tipos de cáncer podrían ser prevenidos evitando la obesidad

[16]. Muchos estudios observacionales y epidemiológicos han investigado dicha relación, sugiriendo que la obesidad se asocia con un incremento significativo en el riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer, incluyendo colon, esófago, mama (mujeres posmenopáusicas), endometrio, riñón, hígado y páncreas [18], [21–24].

La obesidad está fuertemente asociada con los cambios en la función fisiológica del tejido adiposo, llevando a la resistencia de insulina, inflamación crónica y la secreción alterada de adipocinas [25–27]. El tejido adiposo blanco (TAB) es un órgano complejo y está metabólicamente activo, teniendo un importante papel en la regulación del metabolismo [28], [29]. El TAB es un órgano endocrino importante, sintetiza y secreta hormonas esteroideas y péptidos bioactivos llamados adipocinas, involucrados en la regulación fisiológica del almacenamiento de grasa, el metabolismo de energía, ingesta de alimentos, sensibilidad a la insulina y función inmune entre otros [16]. De hecho, la falla de las funciones del tejido adiposo podría tener un papel importante en las diferentes enfermedades relacionadas a la obesidad incluyendo la inflamación, la resistencia a la insulina y el cáncer [16], [28], [29].

El tejido adiposo puede ser dividido en una fracción de adipocitos, que contiene adipocitos cargados de lípidos y en una fracción vascular estromal, que incluye células troncales mesenquimales, pre-adipocitos, células endoteliales, macrófagos y otras células inmunes. Los tipos celulares de cada fracción pueden cambiar la homeostasis del organismo y su posible contribución a la carcinogénesis, sin embargo el papel de cada una de estas dos fracciones permanece elusiva[15].

El manejo de la obesidad es una oportunidad para la prevención del cáncer, y se ha sugerido que el tejido adiposo puede ser un órgano blanco en el tratamiento del cáncer de mama hormono-dependiente y de otros tipos de cáncer [30].

1.3. Células troncales

Las células madre o células troncales (CT), son un tipo de células definidas funcionalmente por dos características principales, su capacidad para perpetuarse a sí mismas por medio de la auto-renovación, así como la habilidad para generar células maduras de un tejido en particular a partir del proceso de diferenciación (Fig.1) [31–33]. Durante el desarrollo, las células troncales embrionarias y las células progenitoras

resultantes son las responsables de la generación de todos los tejidos y células del organismo. En adultos, las células troncales existen en muchos tejidos y tienen un papel crítico en la regeneración de tejidos y reparación.

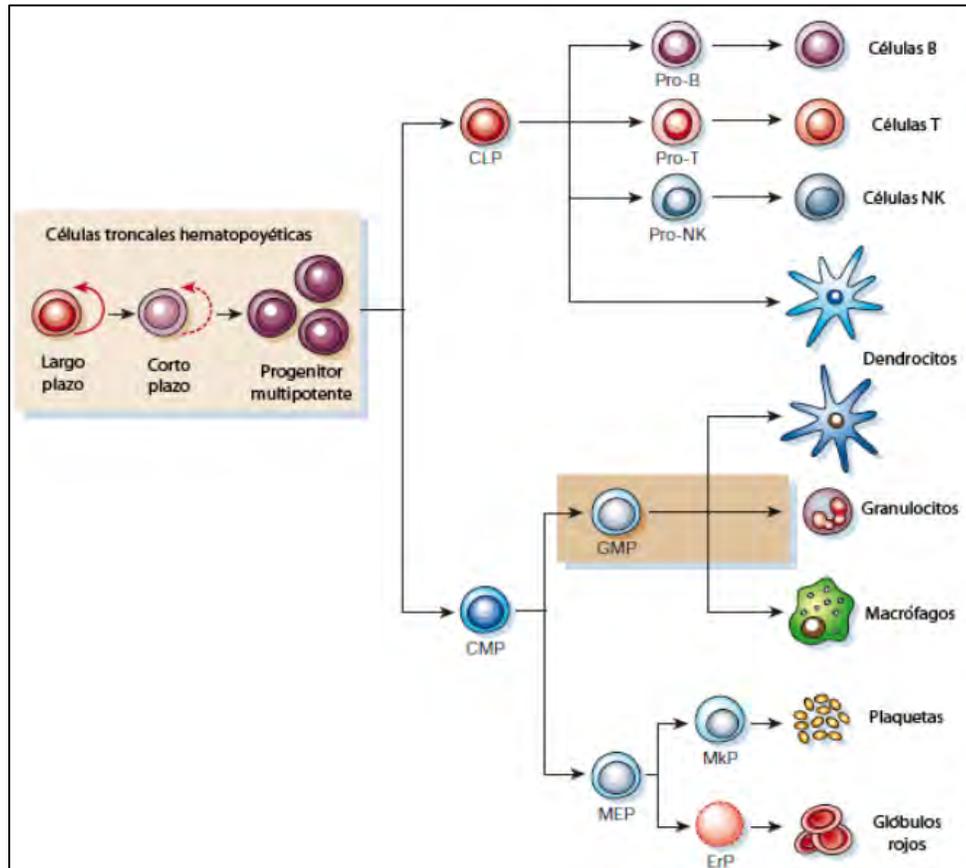


Figura 1. Desarrollo de células troncales hematopoyéticas (CTH). En el recuadro color piel se observa la autorrenovación y con las flechas se observa la diferenciación de las CTH a distintos linajes celulares. Modificado de Reya, 2001. CLP, precursor de células linfoides. CMP, precursor de células mieloides. GMP, precursor de granulocitos y macrófagos. MEP, precursor de eritrocitos y megacariocitos. MkP, precursor de megacariocitos. ErP, precursor de eritrocitos.

La autorrenovación es un proceso que tiene como resultado dos células hijas idénticas a su célula parental por medio de la división celular, es decir, se copia el genoma entero, incluyendo las modificaciones epigenéticas.

La diferenciación está definida por la potencialidad, es decir la capacidad de una célula para dar lugar a otras más especializadas, la diferenciación es un proceso de cambios epigenéticos en la célula. Entonces, la diferenciación es una división celular que produce una o dos células hijas en las cuales el potencial de auto-renovación o alguna parte de su potencialidad se pierden [34], [35].

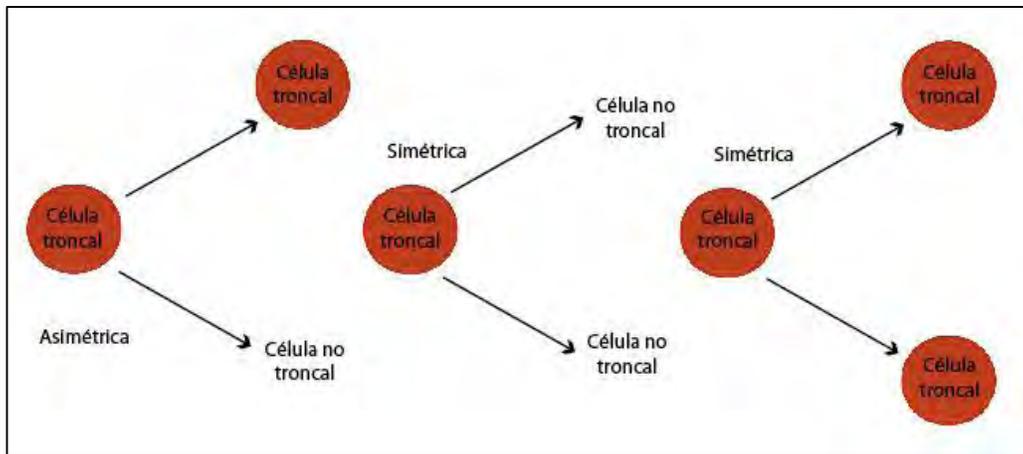


Figura 2. Divisiones simétrica y asimétrica. División de las células troncales. Modificado de Gearharl, 2009.

Las CT pueden dividirse de dos maneras, una simétrica y la otra asimétrica. Cuando una CT se divide simétricamente da lugar a dos células iguales, las dos pueden ser troncales o bien ambas pueden ser células ya diferenciadas. Alternativamente, cuando la CT se divide asimétricamente da lugar a una CT y a una célula no troncal (Fig. 2) [36].

Existen diferencias entre las células troncales en relación a su potencialidad. Dependiendo de esta capacidad, son clasificadas en totipotentes, pluripotentes o multipotentes. Las primeras son aquellas células que pueden dar lugar a cualquier tipo celular, las segundas son aquellas que pueden dar lugar a varios tipos de células pero no a todos y por último las terceras solo pueden diferenciarse en células especializadas de un solo tejido [37].

Se ha determinado que solo las células troncales embrionarias (ESC, por sus siglas en inglés) son totipotentes, debido a que durante el desarrollo temprano tal plasticidad es crítica. En contraste, las células troncales adultas están restringidas en su potencial regenerativo y de diferenciación al tejido en el cual residen, por lo cual suelen ser pluripotentes o multipotentes [31], [34].

Las células troncales adultas específicas residen en ciertos tejidos y constituyen una población muy pequeña, por ejemplo, las células troncales hematopoyéticas (CTH) constituyen solo del 0.01-0.05 % de las células de la médula ósea de un ratón y menos del 1.1% de las células de la médula ósea de humanos [31], [38]. Las células troncales son las principales responsables de la regeneración del daño al tejido y el mantenimiento de la homeostasis, como la reposición fisiológica de las células de la piel y la sangre [39].

Las CTH en adultos son las CT mejor caracterizadas, estas tienen la habilidad para reconstituir todas las células sanguíneas [36], [38], [40], [41]. Otras CT bien caracterizadas son las células troncales mesenquimales (CTM), las cuales tienen una gran capacidad regenerativa de varios tipos de tejidos, además, se han relacionado con la progresión de algunos tipos de cáncer.

1.4. Células troncales mesenquimales (CTM)

En las décadas de los 60's y 70's Friedenstein y colaboradores describieron la presencia de células estromales y células formadoras de huesos dentro de la médula ósea [42]. Este trabajo demostró que una subpoblación de células de la médula ósea tenía potencial osteogénico y fueron caracterizadas por su rápida adherencia, su morfología parecida a los fibroblastos y su capacidad de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos [42–44]. Esta población celular fue denominada células troncales mesenquimales (CTM), y está caracterizada por su habilidad de autorrenovación y diferenciación en tejidos de origen mesodérmico, incluyendo tejido óseo, cartilaginoso, adiposo y conectivo, lo que ha hecho a esta población un blanco muy interesante para la investigación sobre cultivo de tejidos [45]. En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, por sus siglas en inglés) propuso tres criterios para definir a las CTM; (1) la adherencia a superficies plásticas en cultivo, (2) la expresión de marcadores mesenquimales tales como CD73, CD90, CD105 y la ausencia de antígenos hematopoyéticos; (3) la capacidad para diferenciarse *in vitro* hacia linajes de osteoblastos, adipocitos y condroblastos [46].

La ISCT propone a la molécula CD73 (5' ectonucleotidasa) como marcador de linaje para las CTM. CD73 es una glicoproteína cuya función biológica consiste en hidrolizar nucleótidos para generar ATP y GTP como fuente de energía en células diferenciadas. No obstante, el papel que juega CD73 en las CTM se ha observado que está más relacionado con mecanismos de adhesión celular ya que se ha encontrado co-expresada con $\alpha 2$ -integrinas, lo que ha postulado a CD73 como un mediador de adhesión celular en CTM [47], [48].

Las CTM, también expresan CD90 (Thy-1), proteína que pertenece a la súper-familia de las inmunoglobulinas y cuyo principal ligando es CD45. Aunque no se conoce la función

de CD90 en las CTM, se ha observado que si estas células son sometidas a estrés mecánico, se diferencian hacia osteoblastos disminuyendo notablemente la expresión de CD90. Esta disminución podría demostrar que CD90 es un marcador de precursores mesenquimales tempranos que pueden diferenciarse a osteoblastos [49], [50].

Por otra parte, CD105 también conocido como endogлина, es una glicoproteína que pertenece al complejo del receptor del factor de crecimiento transformante- β o α (TGF- β r o α r) y se expresa en monocitos activados, macrófagos activados, precursores eritroides, fibroblastos, células cardíacas, células endoteliales, entre otras. CD105 interviene en la regulación de distintos componentes de la matriz extracelular como fibronectina y colágena razón por la que se ha relacionado con procesos de angiogénesis y reparación vascular [51], [52].

Además de los antígenos propuestos por la ISCT, otros autores proponen a STRO-1, CD44 y CD166 como marcadores moleculares de células mesenquimales [53].

Tabla 2. Células troncales mesenquimales. Características distintivas entre CTMs aisladas de tres tejidos distintos.

Parámetro	Médula ósea	Cordón umbilical	Tejido adiposo
Éxito de aislamiento	100%	30-34 %	100%
Formación de monocapa adherente	4-5 días	2-4 semanas	4-5 días
UFC obtenidas en la monocapa adherente (número)	83	0.002	557
Capacidad de diferenciación osteogénica	71.4%	100%	78.8%
Capacidad de diferenciación adipogénica	100%	0%	94%
Capacidad de diferenciación condrogénica	100%	100%	100%
Expresión de antígenos (%)			
CD44	97.5±5.1	99.7±0.5	99.8±0.2
CD73	90.0±20.0	99.3±1.3	99.6±0.5
CD90	99.1±2.5	97.8±7.1	99.6±5.9
CD105	88.1±7.4	72.4±20.0	90.4±2.8

Tomado y modificado de [44]

Existen varios tejidos que pueden ser fuente de obtención de las CTM. La médula ósea es el principal, aunque se han aislado de tejido adiposo, páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, hueso trabecular, sangre de cordón umbilical, tejido pulmonar, pulpa dental y ligamento periodontal. No obstante, los tejidos más empleados son la médula ósea, la sangre de cordón umbilical y el tejido adiposo (ver tabla 2) [53], [54].

1.5. Células troncales mesenquimales y cáncer

Diversos reportes sugieren que las CTM están involucradas en la invasión tumoral, la angiogénesis y metástasis [45], [46], [55–57]. Las CTM obtenidas de médula ósea tienen un papel relevante en la progresión del cáncer, debido a sus características en el sistema inmune, tienen el potencial de dar soporte a la progresión del tumor [58]. Djouad y colaboradores en el 2003, reportaron un aumento en el crecimiento de células de melanoma en animales alogénicos solo en presencia de CTM, y propusieron que este incremento, se debe a la protección brindada a las células transformadas por las CTM, contra la respuesta inmune del hospedero, ayudando así al establecimiento del tumor [59]. Se ha propuesto que las CTM son reclutadas por las células tumorales, debido a que los tumores secretan factores de hipoxia e inflamación que atraen a este linaje celular. El reclutamiento de CTM por tumores ha sido demostrado en modelos animales cuando estas células se han administrado experimentalmente. Se ha propuesto a las CTM como las progenitoras de las células estromales tumorales, también llamados fibroblastos asociados a carcinomas (CAF, por sus siglas en inglés), los cuales promueven el crecimiento tumoral [60]. El remodelamiento de la matriz extracelular resultante, ejecutado por las CTM reclutadas por el tumor, es un componente integral de la progresión del cáncer [45], [61]. Existen reportes donde se demuestra la promoción de la viabilidad celular, proliferación del tumor y reducción de la apoptosis en múltiples tipos celulares por parte de las CTM [62], [63]. Se ha observado también el papel de las CTM en el aumento del crecimiento tumoral y metástasis de células cancerosas en cáncer de mama, a través de una red de citocinas [55], [64].

1.6. Tejido adiposo blanco como fuente de células troncales mesenquimales

Aisladas de la fracción vascular estromal (FVE) del tejido adiposo, las células troncales derivadas de tejido adiposo (CTTA) comparten una fuerte similitud con las células troncales derivadas de médula ósea (CTMO) como se demuestra por su expresión de marcadores de superficie celular, perfiles génicos y potenciales de diferenciación similares (Tabla 2) [65], [66]. Sin embargo, a diferencia de las CTMO, las CTTA pueden ser obtenidas en grandes cantidades y el procedimiento representa un bajo riesgo para el paciente, lo que las hace una excelente fuente para las futuras aplicaciones clínicas, por ejemplo en el cultivo de tejidos [65–67], [74].

La FVE recién aislada representa una población heterogénea de células entre las que se encuentran las CTTA, pero también contiene una pequeña proporción de células endoteliales, células de musculo liso, pericitos, fibroblastos y algunos tipos de células circulantes tales como leucocitos o CTH [65], [75–78].

De manera interesante, existe evidencia que indica que las CTTA, además de su papel como células troncales, tienen características de pericitos (células murales) y cooperan con el endotelio durante la vascularización. Las CTTA promueven la proliferación de células endoteliales y la formación de vasos sanguíneos al menos en parte a través de efectos tróficos de VEGF (factos de crecimiento vascular endotelial), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) y otras moléculas angiogénicas [73]. Las CTTA también pueden inducir angiogénesis, función que es mediada a través de su capacidad de cooperar con el endotelio para formar redes vasculares [74].

1.7. Células troncales derivadas de tejido adiposo y su relación con cáncer

El hecho de que la obesidad sea la consecuencia de la acumulación de TAB da una pista para encontrar una relación entre obesidad y progresión del cáncer. EL TAB es un potente órgano endocrino, el cual secreta a la circulación varios factores de crecimiento (IGF-1, TGF- β), citocinas (TNF- α e interleucina-6) y hormonas (leptina) [15]. La expresión de estas adipocinas incrementa en la obesidad y afecta el metabolismo de lípidos, la sensibilidad a la insulina, el sistema del complemento alternativo, la homeostasis, la angiogénesis y la regulación del balance energético [75]. Se ha reportado que algunas de estas adipocinas promueven el desarrollo tumoral en varios modelos *in vivo* e *in vitro*, y

podrían potencialmente estar implicados en los efectos del TAB en la progresión de cáncer de mama y colon [76], [77]. También debe ser considerada la posibilidad de efectos parácrinos de las CTTA en la proximidad de los tumores, ya que el TAB al ser un órgano secretor de distintas adipocinas, estas podrían activar vías de señalización, tales como NF- κ B (Factor nuclear kappa B), TFG- β u otras, para evadir la apoptosis o mediar la proliferación [70], [75], [76], [78].

1.8. Factor nuclear kappa B (NF- κ B)

NF- κ B es un factor de transcripción implicado en diversos procesos celulares, es regulador clave de la inducción de numerosos genes [79], [80]. La activación de NF- κ B es controlada por la translocación del citoplasma al núcleo del dímero que conforma este factor de transcripción (p50/p65 o p50/RelB), en respuesta a estimulación celular a través de receptores de membrana. La activación de este factor de transcripción se ha dividido en dos grandes vías; la vía canónica (o clásica), que depende de la participación de un complejo conformado por las cinasas IKK α e IKK β y la subunidad reguladora IKK γ (también conocida como NEMO), que promueve la fosforilación de I κ B α (serina 32 y serina 36), seguido por su rápida degradación dependiente de ubiquitinización a través del proteosoma 26S, con la subsiguiente activación del dímero p50/RelA (p65) y su translocación a núcleo. Por otro lado, se encuentra la vía no canónica (o alternativa), que se inicia con la activación de la proteína NIK y la participación de IKK α , así como, la fosforilación dependiente del procesamiento de p100 (inhibidor I κ B δ complejo multimérico), resultando en la activación del heterodímero p52/RelB [81].

La activación de la vía canónica de NF- κ B es generalmente asociada con exposición inflamatoria, mientras que la activación de la vía no canónica es relacionada con señales durante el desarrollo, estas dos rutas se han considerado señales de transducción independientes con funciones fisiológicas separadas [82]. De manera interesante, varios estudios han provisto evidencia de la existencia de interconexiones entre estas dos vías de señalización [83].

1.9. Importancia del estudio

Se sabe muy poco de los posibles efectos que tienen las CTTA en la progresión del cáncer, no se han realizado estudios para conocer si este tipo de células promueven la proliferación y/o ayudan a sostener la viabilidad y migración celular en modelos *in vitro*. El presente estudio nos permitirá conocer la contribución de las CTTA en el desarrollo del cáncer lo que nos puede proporcionar elementos que soporten la asociación entre la obesidad y la progresión del cáncer.

2. HIPÓTESIS

Las células troncales derivadas de tejido adiposo promueven la viabilidad, proliferación y migración de líneas celulares transformadas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar la contribución de las células troncales derivadas de tejido adiposo sobre la migración celular, proliferación celular y viabilidad celular de dos líneas celulares transformadas.

3.2. Objetivos particulares

- 3.2.1. Aislar células troncales de tejido adiposo retroperitoneal de rata.
- 3.2.2. Caracterizar el porcentaje de las células troncales derivadas de tejido adiposo con la lectura de marcadores específicos expresados por estas células.
- 3.2.3. Examinar el efecto de los medios condicionados de la fracción vascular estromal del tejido adiposo retroperitoneal de rata sobre:
 - 3.2.3.1. La viabilidad celular
 - 3.2.3.2. La proliferación celular
 - 3.2.3.3. La migración celularen dos líneas celulares transformadas.
- 3.2.4. Evaluar el efecto de células troncales derivadas de tejido adiposo sobre la activación de la vía de señalización NF- κ B.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1. Aislamiento y expansión de CTTA de rata

Las CTTA se aislaron de ratas Wistar de sexo masculino, con una edad de 180-210 días y con un peso de 312-386 gr. Estas ratas fueron criadas y donadas por el bioterio del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

El día del experimento los animales fueron sacrificados mediante exanguinación (extracción del corazón) después de ser anestesiados con una dosis de pentobarbital sódico (Anestosal) de 150 mg/kg. Los animales se disectaron bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar, obteniéndose el tejido graso retroperitoneal, que se colocó en un recipiente con buffer fosfato salino (PBS 1X) estéril para su posterior procesamiento.

El aislamiento de las CTTA consiste de dos partes, la primera de ellas se basa en métodos físicos y la segunda en métodos enzimáticos. En la primer parte, el tejido adiposo se lavó 3 veces con PBS. Después de cada lavado el tejido se centrifugó a 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos, recuperándose la parte superior del sobrenadante, esto se repitió 3 veces. El tejido fue cortado en pequeños fragmentos, que se lavaron tres veces con PBS y centrifugados a 1500 rpm durante 5 min.

La segunda parte consiste en la digestión enzimática de los fragmentos del tejido, para inducir una lisis diferencial y digerir la matriz extracelular. Este paso se realizó con 0.05 % colagenasa tipo II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en PBS por 1 hora a 37 °C con agitación lenta. Posteriormente se neutralizó la reacción enzimática con DMEM (Gibco, EUA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, EUA) y 1/1000 ml de penicilina/estreptomicina (Gibco, EUA). El tejido se resuspendió con DMEM/5% SFB para conseguir su homogenización y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, recuperándose la pastilla, obteniéndose de esta manera la fracción vascular estromal (SVF), que se resuspendió en DMEM/10% SFB y se centrifugó a 1500 rpm, volviéndose a resuspender en el mismo tipo de medio, el proceso se repitió 2 veces. Finalmente la pastilla se resuspendió en medio DMEM/10% SFB/antibiótico, obteniéndose así una población enriquecida de CTTA, que se sembró en cajas Petri de 100 mm con DMEM/10% SFB/antibiótico, incubándose en condiciones estándar de cultivo celular, el

primer cambio de medio se realizó 24 hrs después del aislamiento para eliminar los eritrocitos residuales [84–87]

La expansión del cultivo se realizó cuando los cultivos alcanzaban 85% de confluencia, resemebrando o criopreservando en SFB conteniendo 5% de DMSO en crioviales de 2ml con 1 a 1.5 millones de células por vial.

4.2. Manejo de cultivo celular

Se utilizaron dos líneas celulares, la C6 derivada de rata y la MCF7 de origen humano. Ambas se obtuvieron del banco celular “American Tissue Culture Collection” (Rockville, MD). Se cultivaron en DMEM/5% SFB/ penicilina-estreptomicina (2%), incubándose en condiciones estándar de cultivo celular, revisándose periódicamente la confluencia para realizar la expansión o la criopresevación de las líneas celulares.

Para el sembrado de un número determinado de células se realizó el conteo mediante la cámara de Neubauer.

4.3. Caracterización de las CTTA

4.3.1. Caracterización del porcentaje de CTTA mediante citometría de flujo

La caracterización de las células CTTA se realizó a través de la determinación de la presencia de marcadores de superficie específicos reportados para células CTTA, como CD44 (Santa Cruz, sc-53069), CD90 (Millipore, CBLI500F) y CD105 (Abcam, ab107595), por medio de citometría de flujo [67], [70–72].

Asimismo se determinó la presencia de células endoteliales y células de linaje hematopoyético a través de los marcadores CD31(BD-Pharmingen, 550300) y CD45 (Millipore. 05-1410), respectivamente para cada tipo celular [66], [88–92].

Las células CTTA empleadas para el ensayo de inmunofenotipificación contaban con máximo 2 pases: las células se despegaron por medio de una solución de acutasa (Millipore, EUA) utilizándose una proporción de 1/1 c/ PBS, se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min, y después se lavó 2 veces con PBS, empleando 2 millones de células.

Las células se incubaron con el anticuerpo primario (CD31, CD44, CD45, CD90 ó CD105) en una solución de PBS con 1% de SFB durante 30 min en hielo.

Posteriormente se lavaron 4 veces con PBS+2mM EDTA+1% SFB y después se incubaron con el anticuerpo secundario. Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a dos tipos de fluoróforos, isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (PE). Se dejó, un grupo de células sin marcar para emplear como control negativo tanto para FITC como para PE. También se marcó un grupo de células con el isotipo para FITC (Miltenyi Biotec, 130-092-213) y se marcó otro con el isotipo para PE (Miltenyi Biotec, 130-092-212).

El cultivo primario cuantificó por medio de un citómetro de flujo (FACSAria, BD Biosciences). La lectura de FITC se realizó con una absorción máxima de 490 y una emisión máxima de 520 nm, mientras que la lectura de PE se realizó con una absorción máxima de 490 y una emisión máxima de 578 nm. Ambos fluoróforos fueron excitados con un láser a 488 nm. Se analizaron 10,000 eventos por ensayo.

4.3.2. Caracterización de las CTTA por medio de su diferenciación.

Para determinar la capacidad de diferenciación de las CTTA, se emplearon células de 1 ó 2 pases con una confluencia celular de 80-90 %. La inducción adipogénica se estimuló reemplazando el medio DMEM/10% SFB por el medio de inducción adipogénico [100 ml de este medio, se realiza con 100 ml de DMEM, al que se le añaden 100 µl de dexametasona 0.1 mM (0.1 µM final), 1 ml de IBMX 45 mM (0.45 mM final), 10 µl de insulina 10 mg/ml (1 µg/ml final) y 250 µl de indometacina 50 mM (0.2 mM final)]. El medio se reemplazó diariamente. Los cultivos se observaron diariamente hasta observar la formación de gotas lipídicas. Una vez observado la formación de estas estructuras, se tiñeron los cultivos con rojo oleoso.

4.4. Obtención de los medios condicionados

Nuestros medios condicionados se obtuvieron de las CTTA de los primeros 2 pases. Una vez obtenidas las CTTA se sembraron en cajas Petri de 100 mm, cuando el cultivo alcanzó el 75-80% de confluencia el medio se sustituyó a DMEM sin suplementar (DMEM s/sup). El medio condicionado se obtuvo colectando el medio s/sup, luego del cultivo de las CTTA durante 24 hrs en el medio sin suplementar. Los medios

condicionados se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos, se colectó el sobrenadante y se congeló en alícuotas a -80 °C.

De manera similar se colectó medio condicionado de adipocitos diferenciados. Durante la extracción de las CTTA, se conservaron los adipocitos, los cuales se cultivaron en DMEM/ 5% SFB por un día. Posteriormente se cambió el medio a DMEM s/sup durante 24 hrs. Después de esto se colectó el medio condicionado. Los medios condicionados se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos, se colectó el sobrenadante y se congeló a -80 °C.

4.5. Ensayo de proliferación

Se evaluó el efecto de los medios condicionados de las células CTTA sobre la proliferación celular en las líneas C6 y MCF7 mediante el ensayo de tinción con ioduro de propidio (IP), leyendo las muestras por citometría de flujo.

Se sembraron 2×10^4 células de las dos líneas celulares en cajas Petri de 10 cm, hasta alcanzar una confluencia del 70% en DMEM/10% de SFB. Llegando a esta confluencia se retiró el medio y se les dejó en DMEM s/sup por 24 hrs. Pasando este tiempo se retiró el medio y se agregaron los medios con las distintas condiciones (Medio condicionado de adipocitos, medio condicionado de CTTA, DMEM/10% SFB y DMEM s/sup) incubando las células durante 24 hrs. Posteriormente, se lavaron las cajas dos veces con PBS 1X, y las células se fijaron (etanol 75% en PBS pH 7.3, a -20°C) durante toda la noche. Se removió el buffer de fijación por centrifugación a 300g durante 10 minutos y las células se lavaron dos veces con PBS 1X. Después, se resuspendieron en buffer de ioduro de propidio (10 µg/ml de ioduro de propidio en buffer de citrato de sodio con 1 mg/ml de RNasa A) para teñir DNA. Se incubaron durante 20 minutos a 37 °C en oscuridad. Después se hicieron 3 lavados para eliminar el buffer de ioduro de propidio. Finalmente, se realizó la lectura en el citómetro de flujo a 488 nm usando el canal 2. El análisis de los resultados de la citometría de flujo para determinar el porcentaje de células en las distintas etapas del ciclo celular se realizó empleando el software Modfit 3.3 (Verity Software House, Topsham, Maine).

4.6. Ensayo de viabilidad celular (MTT)

Para evaluar la viabilidad celular de las líneas tumorales C6 y MCF7 se utilizó el ensayo de MTT [93]. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa que da como resultado un compuesto de color azul (formazan) permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazan producido, por lo que la absorbancia de la solución coloreada de formazan es directamente proporcional al número de células viables [93].

El protocolo que se uso fue el siguiente: Se sembraron 50×10^3 células de la línea C6 y MCF7 por pozo, en una caja de 24 multipozos, con medio DMEM/ 5% SFB/ antibiótico. Al siguiente día el medio de cultivo se sustituyó por el medio a evaluar (DMEM/ 5% SFB/ antibiótico, DMEM s/sup y el medio condicionado de las CTTA). Se incubaron las células durante 48 hrs en una atmosfera regulada a 37 °C con 5% de CO₂.

Después de ese tiempo se añadió a los cultivos el MTT (Sigma, St. Louis, MO) a una concentración de 200 µl/ml, se incubó 4 hrs más. Posteriormente se aspiró el medio y las sales de formazan se solubilizaron en DMSO (Sigma-Aldrich, EUA). Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y en obscuridad. El azul de formazan se cuantificó por medio de espectrofotometría a una absorbancia de 570 nm.

4.7. Ensayo de migración celular

Para comprobar la capacidad de migración de las líneas celulares bajo diferentes condiciones de cultivo, se utilizó el “kit” *QCM 24 well colorimetric Cell Migration Assay* (Millipore, USA), el cual está basado en el principio de la cámara de Boyden, [94].

Se sembraron 150×10^3 células en los “insertos” del kit. Los insertos se colocaron en pozos de una caja de 24 con cada uno de los distintos medios evaluados. Se dejó incubando 24 hrs en condiciones estándar de cultivo celular.

Posteriormente se extrajo el medio de los insertos y se colocó el inserto en un pozo nuevo que contenía 400 µl de la solución de tinción del “kit” incubándose 20 minutos a temperatura ambiente. Pasando este tiempo se lavó con agua varias veces, cuando el

inserto estuvo seco, se limpió la parte interna de este con ayuda de un hisopo para remover las células que no migraron.

Se transfirió el inserto teñido a un pozo limpio con 200 μ l de buffer de extracción durante 15 minutos a temperatura ambiente, después se extrajo el inserto del pozo.

Finalmente se transfirieron 100 μ l de la mezcla teñida a una placa de 96 pozos para su medición colorimétrica en un lector de ELISA (Biorad, EUA) a una densidad óptica de 560 nm.

4.8. Análisis de proteínas del medio condicionado

4.8.1. Extracción de proteínas

Para determinar las proteínas presentes en el medio condicionado, se realizó su extracción a partir de un concentrado de 200 veces de este medio, utilizando columnas de concentración (Sigma-Aldrich). Se agregó un buffer de extracción y precipitación de proteínas compuesto por ácido tricloroacético, se dejó precipitando 15 min a -20 °C y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla en 100 μ l de NaOH 0.1 N. Se colocó en un nuevo tubo eppendorf y se conservó a -20 °C hasta ser utilizado.

Para extraer las proteínas totales de las líneas celulares para los western blots, se utilizó buffer RIPA comercial (Radio Immuno Precipitation Assay) (Biorad, EUA) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (Boheringer, México).

La preparación del lisado de las líneas celulares se llevó a cabo a partir de cajas Petri de 10 cm con una confluencia del 80%, esto para cada una de las condiciones evaluadas. Se colocaron en hielo y se lavaron con PBS frío. Se agregó 1 ml del buffer de lisis (RIPA), se dejó 5 minutos y se procedió a raspar las células adherentes en el plato usando una espátula, se transfirió cuidadosamente la suspensión a un tubo eppendorf. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos. Se removió con cuidado el sobrenadante para descartar la pastilla y se colocó el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf y se guardó a -20 °C hasta ser utilizado.

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford. Para realizar la curva patrón se utilizaron diluciones de albumina con concentraciones conocidas. Se cuantificó en un espectrofotómetro (Applied Biosciences, EUA) a 595

nm. A partir de los valores de absorbancia de la curva patrón se extrapolaron las concentraciones de cada una de las muestras.

4.8.2. Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE)

Para separar las proteínas presentes en los distintos medios utilizados (DMEM/10%, DMEM s/sup y el medio condicionado de CTTA) se realizó una electroforesis de tipo SDS-PAGE, con un gel concentrador de acrilamida al 4% y un gel separador de acrilamida al 12%. Se tomaron 10 µg de proteína de cada una de las alícuotas de proteínas de cada una de las condiciones evaluadas y se diluyeron en un buffer de carga Laemmli 4X que contenía el agente reductor β-mercaptoetanol (Sigma, EUA) al 0.5%. Posteriormente las muestras se colocaron en ebullición en un termoblock a 95 °C durante 3 minutos. Después de esto, se colocaron en hielo y se cargó el gel. Las muestras se corrieron a 70 V durante 30 minutos para que se concentraran antes de entrar al gel separador y después se aumentó el voltaje a 100 V durante 1-2 hrs.

4.8.3. Tinción Deep Purple

Para visualizar el patrón de bandeo proteico de los diferentes medios estudiados, que se separaron con la técnica SDS-PAGE se realizó una tinción de Deep-Purple (General Electric, UK).

La tinción Deep purple se basa en un compuesto fluorescente que se encuentra en la naturaleza, epicocconone [95] que reversiblemente se une a residuos de lisina, arginina e histidina en proteínas y péptidos. Se ha desarrollado como una tinción fluorescente ultrasensible para la detección de proteínas en geles y membranas después de la separación electroforética.

Los geles se fijaron toda la noche en una solución de etanol 10% y ácido acético 7.5%. Posteriormente, se lavó 2 veces con agua desionizada por 15 minutos. Se tiñó el gel durante una hora en la obscuridad con una solución que contiene un volumen del colorante Deep purple y 200 volúmenes de carbonato de sodio (Na₂CO₃) 200 mM. Después se lavó tres veces con 50 ml de ácido acético al 7% por 15 min cada vez. Se procedió a escanear los geles en el Typhoon 9400 (Flourescencia filtro laser verde 532 nm, sensibilidad PMT de 500 -600 V, 50 micrones, tiempo de escaneo de 9:50).

La longitud de onda de excitación utilizada fue de 532 nm, filtro Green Lasser y la emisión del filtro fue de 560 LP O 610 BP. Se escaneo a una resolución de 100 micrones.

4.9. Western-blot

Para el análisis de la función del medio condicionado de las CTTA sobre la vía de señalización de NF- κ B, de las líneas celulares C6 y MCF7, se realizaron western blots (inmunoblots) para detectar las principales proteínas involucradas en esta vía.

La electroforesis de los extractos obtenidos de las líneas celulares C6 y MCF7 sometidas a los distintos tratamientos (medio condicionado CTTA, DMEM/10%, DMEM s/sup, medio condicionado adipocitos) se realizó como se describe anteriormente. Los geles SDS-PAGE (acrilamida 10%) de las líneas celulares se transfirieron a membranas de PVDF (Biorad, EUA) por medio de una cámara de transferencia húmeda (Biorad, EUA) durante 1 hr a 120 V. Para bloquear la membrana se usó leche libre de grasa al 5% disuelta en TBS durante 2 hrs, tras lo cual se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios durante toda la noche. Se empleó GAPDH (Santa Cruz, EUA; SC-25778) como control de carga y se utilizó I κ B α (Santa Cruz, EUA; SC-371) como proteína de referencia para observar la activación de la vía canónica de NF- κ B. Transcurrido ese tiempo se lavaron las membranas con TBS+Tween 10%(TTBS) durante 1.5 horas. Posteriormente, se incubó a la membrana con el anticuerpo secundario, para los dos anticuerpos primarios se utilizó un anticuerpo secundario contra conejo conjugado con HRP (peroxidasa del rábano, por sus siglas en inglés) (Millipore, EUA; 12-348).

Para retirar el exceso de anticuerpo secundario se lavaron las membranas con TTBS. Se sometió a las membranas a una reacción química de la HRP para producir quimioluminiscencia (Inmobilon Western, Millipore, WBKL S01 00), que se detectó mediante una placa fotográfica. El análisis densitométrico de las bandas observadas en la placa fotográfica se realizó con ayuda del software ImageJ (EUA).

4.10. Análisis estadístico

El análisis se realizó mediante el paquete estadístico *Sigmaplot* (Systat Software Inc, Alemania). Los datos son presentados como las medias estadísticas \pm la desviación estándar. Se utilizó la prueba de ANOVA de una vía, seguida por una prueba *post hoc* de Bonferroni para el análisis estadístico. En todos los casos los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Las gráficas se realizaron en *GraphPad prism* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

5. RESULTADOS

5.1. Aislamiento y caracterización de las CTTA

Las CTTA se obtuvieron de la fracción vascular estromal (FVE). Estas células crecieron como una población homogénea con una morfología parecida a los fibroblastos, alargada en forma de huso según lo reportado (Figura 3a)[66], [71]. En la figura 3b se muestra una imagen representativa del cultivo en el pase 1. Este cultivo primario fue capaz de proliferar por varios pases, aproximadamente 3 o 4, y después de estos se observó muerte celular en el cultivo.

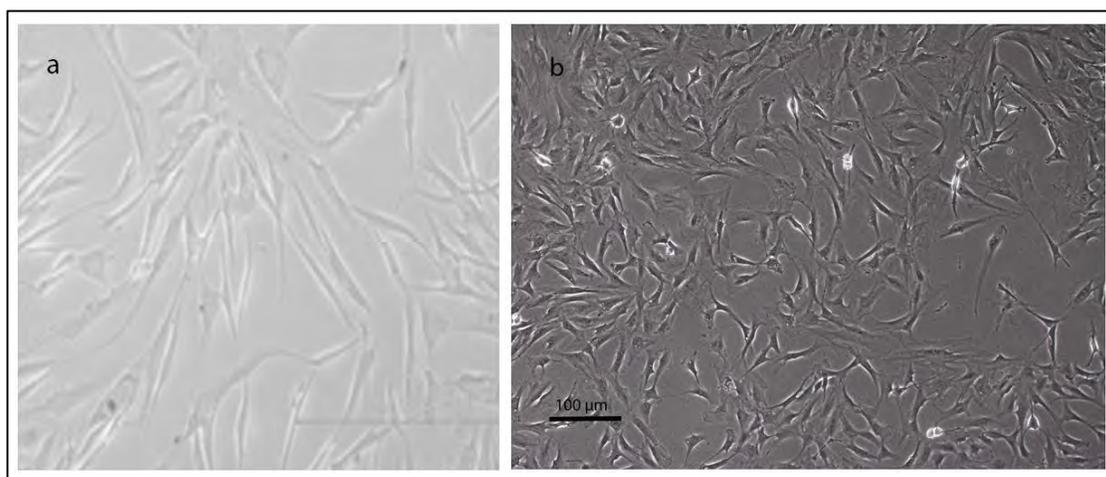


Figura 3. Comparación de células troncales derivadas de tejido adiposo. a) Obtenidas de tejido adiposo de una cirugía de liposucción (Razmkhah, 2010) b) Células obtenidas de tejido adiposo de ratas Wistar durante el pase 1 (aumento 10X).

Para corroborar que los cultivos primarios derivados de la fracción estromal-vascular fueran CTTA, estas células fueron caracterizadas, primero determinando su capacidad de diferenciación adipogénica, ya que este método nos permite identificar el potencial de este linaje celular.

La diferenciación se evaluó a los días 3, 6, 9 y 15 de cultivo. Ningún cambio significativo se observó en los primeros 5 días. A partir del día 6 se comenzaron a detectar cambios (Figura 4a, b y c). Los principales cambios en las CTTA se debieron al paso de una morfología fusiforme (Fig. 4a) a células de una forma más esférica, lo que es aún más evidente a partir del día 9 (Figura 4d). Al día 15 se pueden observar ya células más redondas (con algunas prolongaciones) con muchos lóculos lipídicos dentro de su citoplasma (Fig. 4e, indicados por las flechas), estas células además adquirieron una fuerte tinción con el rojo oleoso (Figura 4f). Todas estas características son buenos

marcadores para sugerir que mediante la diferenciación realizada se obtuvieron pre-adipocitos y adipocitos. Lo que indica que el linaje celular obtenido de la FVE consta de las características de CTTA.

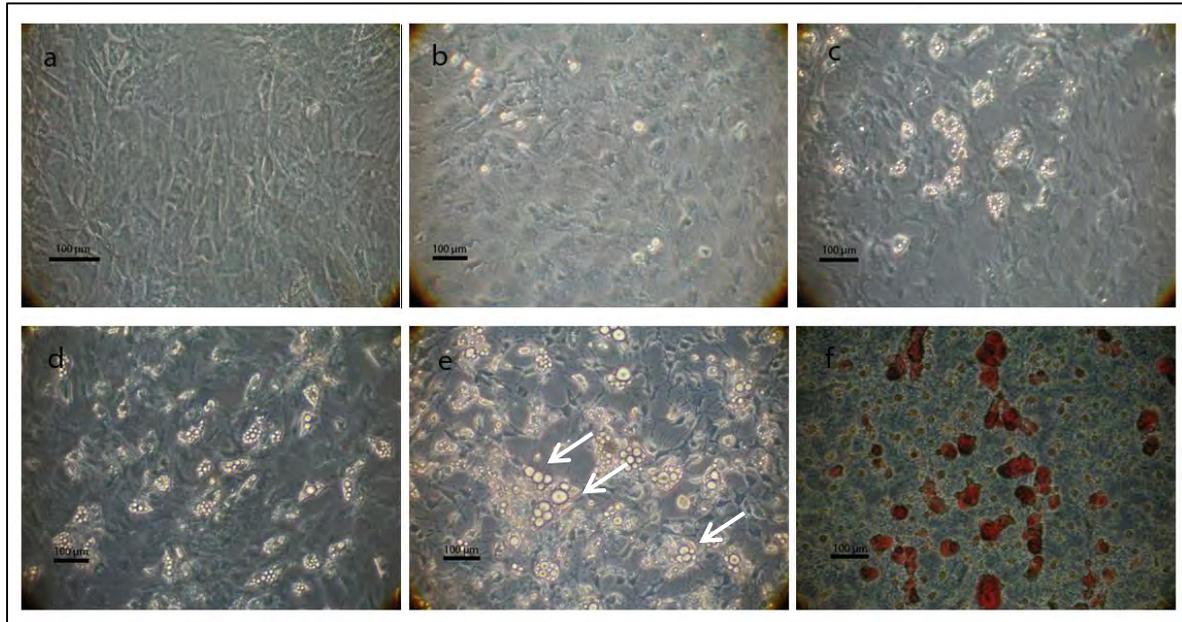


Figura 4. Diferenciación adipogénica de CTTA. a) Pre-tratamiento (0 días). b) 3 días de tratamiento. c) 6 días de tratamiento. d) 9 días de tratamiento. e) 15 días de tratamiento (las flechas indican los lóculos lipídicos). f) Tinción rojo oleoso (15 días). Las fotografías fueron tomadas a un aumento de 20X.

Otro método que se empleó para caracterizar las CTTA, fue la determinación de marcadores de superficie celular previamente reportados por citometría de flujo (inmunofenotipificación) (Figura 5). Además, se utilizaron controles negativos (Figuras 5a y c) y controles de isotipos (Figuras 5b y d), esto para cada uno de los fluoróforos utilizados (FITC y PE).

Mediante los controles negativos se eliminó la lectura de la auto-fluorescencia de las células y por medio de los controles de isotipos se eliminaron posibles inespecificidades de los marcadores fluorescentes utilizados.

CD105, CD90 y CD44, son marcadores de CTM, por lo que se esperaba su expresión en las CTTA. La citometría de flujo reveló que un porcentaje muy alto de la población de las CTTA aisladas expresó CD90 (Figura 5f) y un porcentaje pequeño fueron positivas a los marcadores CD105 y CD31 (Figura 5e y h). La población fue negativa para los marcadores CD44 y CD45 (Figuras 5d y 5c). Los porcentajes pueden ser observados en la tabla 3.

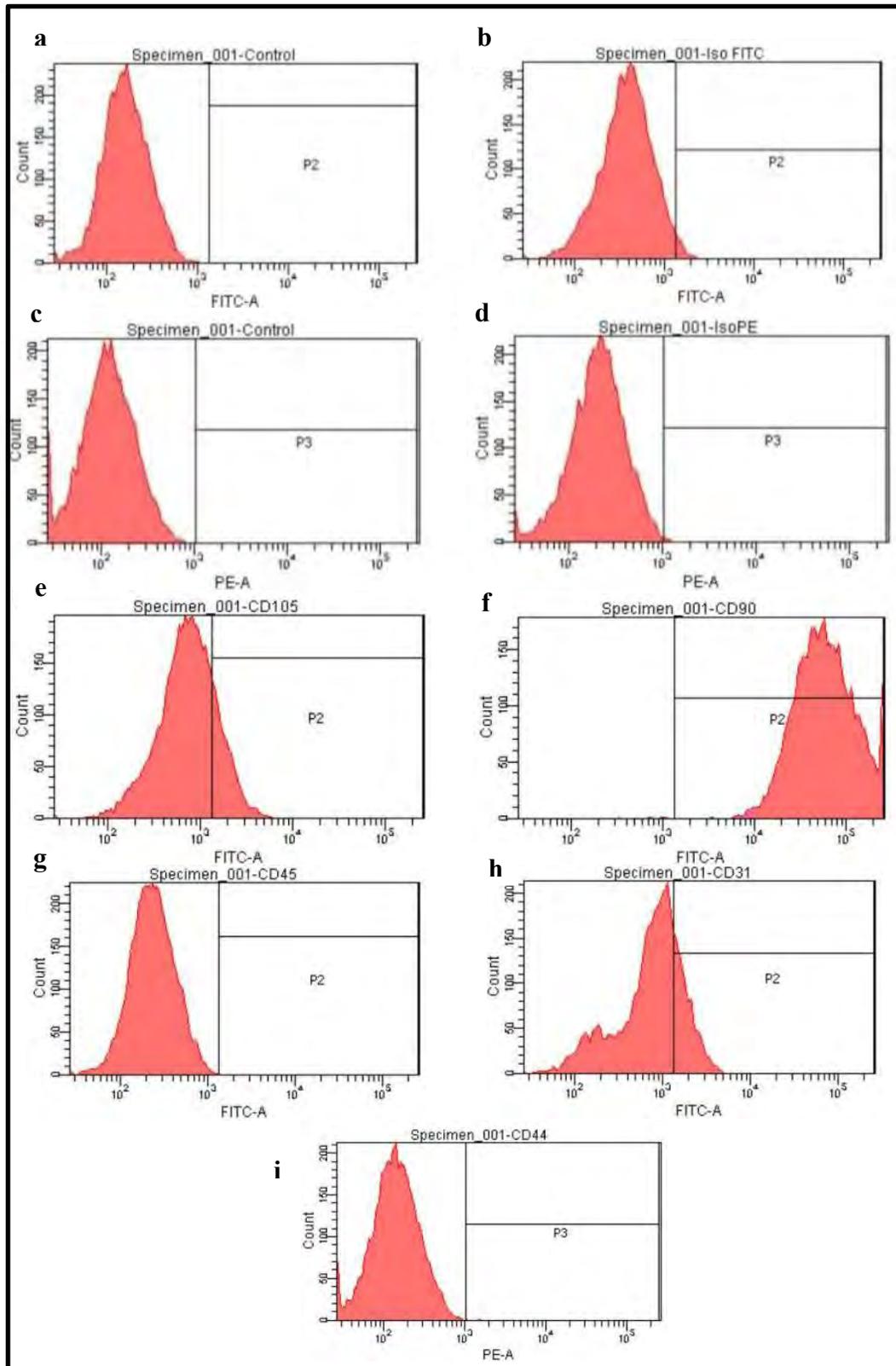


Figura 5. Inmunofenotipo de las CTTA. Histogramas representativos de los controles y anticuerpos utilizados. a) Control negativo FITC, b) Control de isotipo FITC, c) Control negativo PE, d) Control de isotipo PE, e) CD105-FITC, f) CD90-FITC, g) CD45-FITC, h) CD31-FITC, i) CD44-PE. (Imagen representativa de 2 experimentos).

Los resultados del análisis inmunofenotípico de los marcadores de superficie celular utilizados, corresponden con lo previamente reportado [51], [96], [97], exceptuando CD44 (figura 5i), que se reporta como altamente positivo y en este trabajo observamos que la expresión es prácticamente nula. En el caso de CD105 se esperaba una expresión alta, pero existen varios reportes en los cuales se da una expresión medianamente alta o baja [96].

Las proteínas CD31 y CD45, no se encuentran en las células troncales, por lo que su presencia sería un indicio de que las células tienen una contaminación con otros tipos celulares. Se observó que los cultivos tuvieron una ligera contaminación de células endoteliales, lo cual se puede observar por la baja expresión del marcador CD31.

Los cultivos primarios utilizados se encontraban libres de células de linaje hematopoyético, puesto que no hubo expresión del marcador CD45 (Fig. 5g).

Tabla 3. Porcentajes de los marcadores de superficie celular utilizados para la caracterización de las CTTA. (Promedios de 2 experimentos).

Marcador de superficie	Porcentaje (%)
CD90	96.7
CD105	24
CD44	0.2
CD45	0.2
CD31	20

5.2. Efecto del medio condicionado de CTTA en la proliferación celular.

Para evaluar los posibles efectos de la población CTTA sobre procesos celulares de líneas celulares transformadas, se utilizaron medios condicionados, entendiendo como medio condicionado al medio de cultivo que contiene los productos secretados por un cultivo celular en un tiempo dado, ya que como se ha reportado, los medios condicionados son una herramienta útil para el análisis de distintos procesos biológicos, como la proliferación, la viabilidad y la apoptosis [98].

Además, se examinó el efecto del medio condicionado obtenido de las CTTA sobre la viabilidad de las células C6 y MCF7 por la tinción con yoduro de propidio. El protocolo de tinción con yoduro de propidio (IP) nos permite teñir el DNA y es comúnmente

utilizada para observar la progresión del ciclo celular. En este procedimiento las células se fijan y posteriormente se tiñen con IP y después se evalúa la cantidad de fluorescencia. El análisis se realiza caracterizando la cantidad de DNA por célula basado en la cantidad de fluorescencia por célula. Para esto se utiliza un software especializado (Modfit, versión 3.3) que determina el porcentaje de células que están en las distintas etapas del ciclo celular (G₁, S o G₂/M).

En la línea celular MCF7 tratada con el medio condicionado, se puede observar que hubo un aumento en la fase G₂-M, con respecto a las células tratadas con el medio sin SFB, aunque no alcanzó a tener el nivel de aumento observado con las células tratadas con el medio más 10% de SFB (Figura 6, tabla 4). Los porcentajes obtenidos para cada una de las etapas del ciclo celular se pueden observar en la tabla 4 y la figura 6.

Tabla 4. Porcentajes de las distintas fases del ciclo celular obtenidos por medio de la lectura de la tinción de yoduro de propidio en el citómetro de flujo de las líneas celulares C6 y MCF7.

	MCF7			C6		
	10 % SFB	Medio condicionado	Sin SFB	10 % SFB	Medio condicionado	Sin SFB
G₀ - G₁	59.68%	56.76%	59.33%	48.04%	55.89%	49.67%
G₂ - M	33.22%	29.14%	21.31%	16.10%	19.79%	15.00%
S	7.10%	14.09%	19.35%	35.86%	24.32%	35.33%

En la línea celular C6 que se trató con el medio condicionado de las CTTA, también se puede observar un aumento del porcentaje de la población que se encontraba en G₂-M, con respecto a las células tratadas con DMEM s/SFB. El aumento en este caso fue mayor incluso que las células que fueron incubadas con el medio con SFB.

Estos resultados nos sugieren que el medio condicionado obtenido de las CTTA contribuye a la proliferación de las líneas celulares, tanto humanas como de ratas.

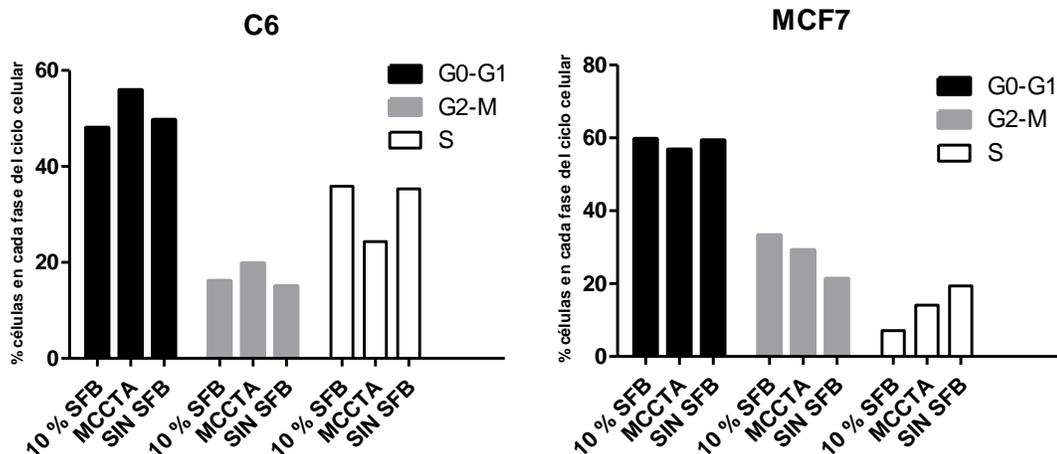


Figura 6. Porcentajes de las fases del ciclo celular de las líneas celulares tratadas. Cada color (blanco <síntesis>, gris <G2-mitosis> y negro <G0-G1>) representa los porcentajes de la población que se encuentran en cada una de las fases del ciclo celular.

5.3. Efecto del medio condicionado de CTTA en la viabilidad celular.

Para determinar la contribución del medio condicionado de las CTTA sobre la viabilidad celular se utilizó el ensayo de MTT.

Se observó una tendencia en el aumento de la proliferación celular en los cultivos de las líneas celulares C6 y MCF7 en que se utilizó el medio condicionado en comparación con el medio sin SFB (Figuras 7 y 8).

El análisis estadístico realizado con los datos de la línea celular C6 únicamente mostró diferencias significativas ($p < 0.01$) entre los grupos de las células tratadas con DMEM/10% y las células tratadas con medio s/ SFB, no existió diferencia significativa entre ninguno de los otros grupos (Figura 7).

El análisis estadístico de los datos obtenidos con la línea celular MCF7 mostro diferencia entre dos pares de grupos de datos; entre los grupos tratados con DMEM/ 10 % y s/ SFB, y los grupos tratados con DMEM/ 10 % y el medio condicionado (Figura 8). A pesar de que no hubo diferencias entre los tratamientos con el medio condicionado y con DMEM sin SFB, se puede observar una ligera tendencia mayor en la viabilidad de las células tratadas con medio condicionado.

A partir de estos resultados sugerimos que las dos líneas celulares cultivadas con el medio condicionado tienen un ligero aumento en su viabilidad celular, tendencia observada en cada uno de los experimentos a pesar de la falta de significancia estadística.

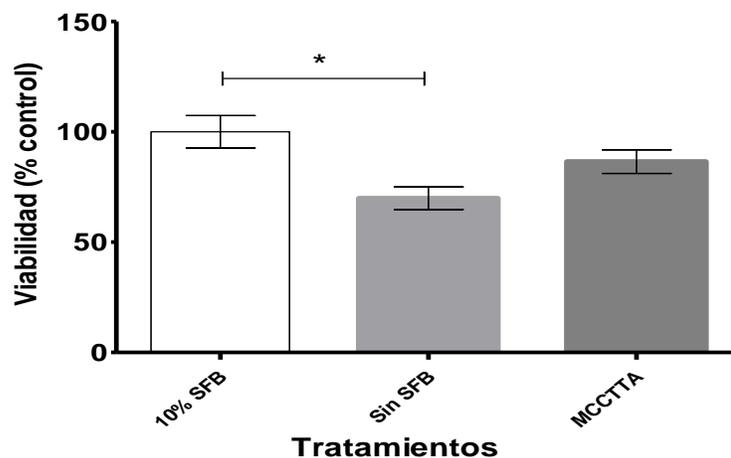


Figura 7. Efecto del medio condicionado en la viabilidad de las C6. Las células fueron cultivadas en placas de 24 en seis replicas en los respectivos medios, se realizaron tres replicas biológicas. La viabilidad esta expresada en porcentaje obtenido por las unidades de absorbancia a 570 nm con respecto a las células crecidas en DMEM/ 10% SFB. Las barras de error están construidas a partir del error estándar de todos los experimentos de cada tratamiento (*, Bonferroni, $p < 0.05$). MCCTTA, Medio condicionado de CTTA.

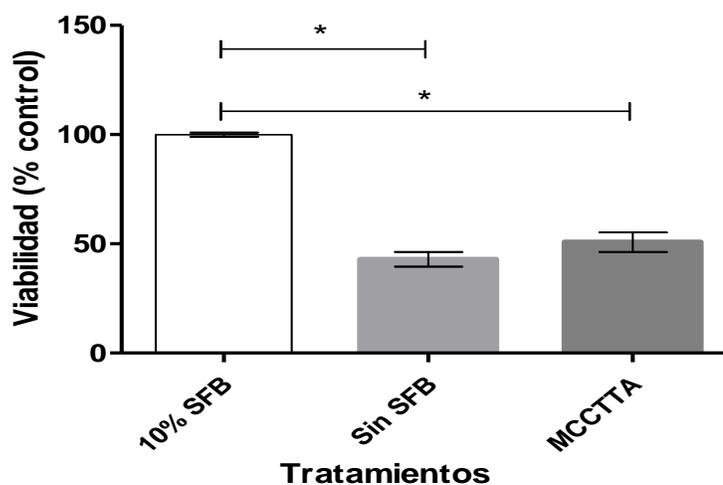


Figura 8.- Efecto del medio condicionado en la viabilidad de las MCF7. Las células fueron cultivadas en placas de 24 en seis replicas en los respectivos medios, se realizaron tres replicas biológicas. La viabilidad esta expresada en porcentaje obtenido por las unidades de absorbancia a 570 nm con respecto a las células crecidas en DMEM/ 10% SFB. Las barras de error están construidas a partir del error estándar de todos los experimentos de cada tratamiento (*, Bonferroni, $p < 0.05$). MCCTTA, Medio condicionado de CTTA.

5.4. Efecto del medio condicionado de CTTA en la migración celular

Con la finalidad de evaluar la migración celular de las líneas celulares MCF7 y C6 inducida por el medio condicionado de las CTTA. Se realizó un ensayo de migración basado en el principio de la cámara de Boyden.

En la figura 9 observamos un aumento en el porcentaje de migración de las células MCF7 tratadas con el medio condicionado de las CTTA respecto a las que fueron tratadas sin suero (control negativo), el porcentaje se duplicó, pasando de un 44% a un 82%.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos utilizados, cabe destacar que hubo diferencias significativas ($p < 0.01$) entre el tratamiento con el medio condicionado con el control positivo (DMEM/ 10%) como con el control negativo (DMEM s/ SFB).

También se observó un aumento en el porcentaje de migración de las células C6 tratadas con el medio condicionado de las CTTA, el aumento del porcentaje fue menor que en las células MCF7, pero en este caso el análisis estadístico, también indicó diferencias significativas entre los dos tratamientos (figura 10).

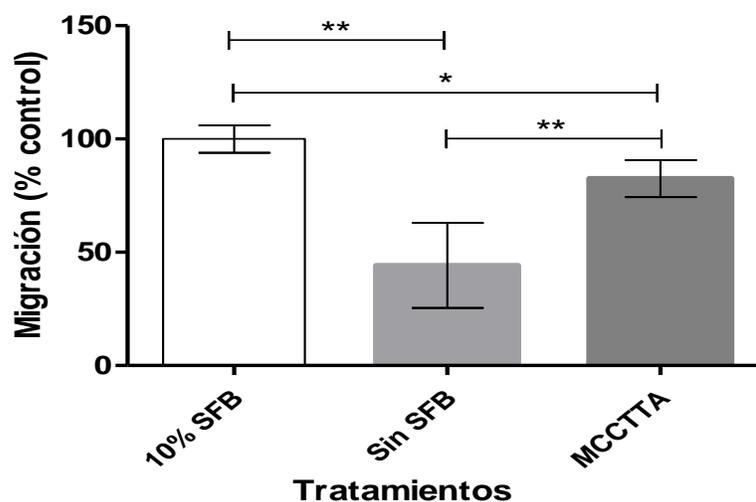


Figura 9. Efecto del MCS en la migración de las MCF7. Las células se cultivaron en placas de 24 en triplicados en los respectivos medios, (con tres replicas biológicas). La viabilidad esta expresada en porcentaje obtenido por las unidades de absorbancia a 570 nm con respecto a las células tratadas con DMEM/ 10% SFB (control). Las barras de error están construidas a partir de la desviación estándar de todos los experimentos de cada tratamiento. (*, Bonferroni, $p < 0.05$; **, Bonferroni, $p < 0.01$) MCCTTA, Medio condicionado de CTTA.

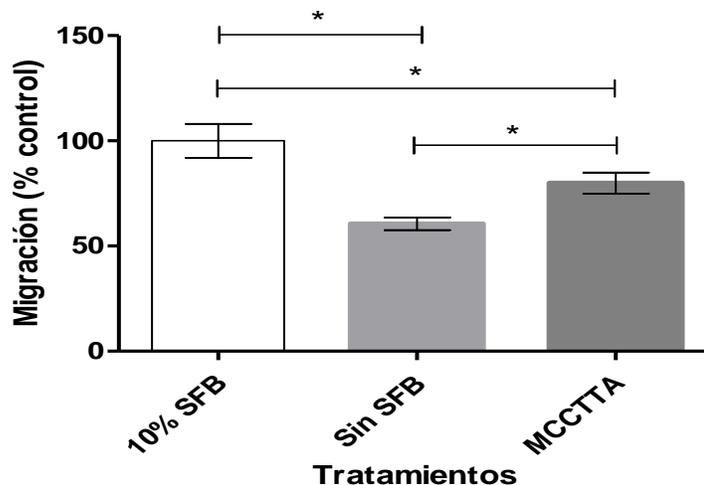


Figura 10.- Efecto del MCS en la migración de las C6. Las células se cultivaron en placas de 24 en triplicados en los respectivos medios (con tres replicas biológicas). La viabilidad esta expresada en porcentaje obtenido por las unidades de absorbancia a 570 nm con respecto a las células tratadas con DMEM/ 10% SFB (control). Las barras de error están construidas a partir de la desviación estándar de todos los experimentos de cada tratamiento (*, Bonferroni, $p < 0.01$). MCCTA, Medio condicionado de CTTA.

5.5. Visualización del perfil de proteínas en geles de acrilamida

Después de haber observado un aumento en la migración y una tendencia a aumentar en la proliferación y viabilidad en nuestros modelos celulares, por medio de los ensayos antes descritos, se decidió determinar el perfil proteico de cada uno de los medios utilizados. Para esto se realizaron geles de poliacrilamida de una dimensión. En la figura 11 se muestran imágenes correspondientes al perfil de proteínas de los medios utilizados de la región de peso molecular de 20 a 250 kDa. A partir de estos geles logramos visualizar diferentes bandas que representan distintas proteínas en cada una de las condiciones. Como se esperaba, en el caso del medio sin SFB no se observó ninguna banda, ya que el DMEM por si solo carece de proteínas.

Las flechas negras indican proteínas que aumentan en nuestro medio condicionado de CTTA con respecto al medio con 10% SFB. Las flechas blancas muestran proteínas que disminuyeron o desaparecieron en nuestro medio condicionado de CTTA con respecto al medio con 10% SFB. La flecha azul indica una proteína en la que prácticamente no hubo cambio de intensidad en las dos condiciones. Como se observa en la figura 11, los cambios son variados, existen tanto disminuciones como aumentos de proteínas entre el

medio condicionado de las CTTA con respecto al DMEM+SFB, aunque parece existir un mayor número de proteínas aumentadas en las CTTA respecto al DMEM+SFB. A partir de estos resultados sugerimos que cada uno de los medios utilizados tenían su propio perfil proteico y que las diferencias entre los perfiles de proteínas de las CTTA con respecto al DMEM+SFB, son probablemente las responsables de los distintos resultados en las pruebas de los procesos celulares aquí evaluados.

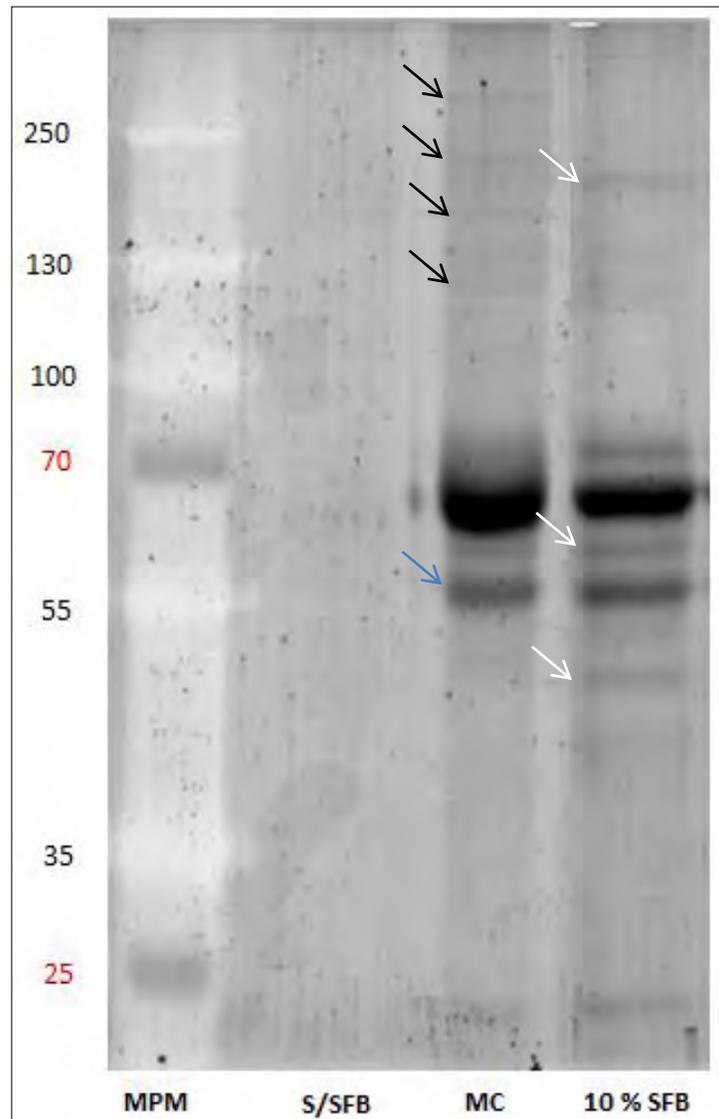


Figura 11. Perfil de proteínas de los medios utilizados. MPM, marcador de peso molecular (kDa); s/SFB, Medio DMEM sin suero fetal bovino; MC, medio condicionado; 10% SFB, medio DMEM con 10% de suero fetal bovino. Las flechas blancas muestran proteínas que disminuyeron en el MC, las negras las proteínas que aumentaron y las azules las proteínas que permanecieron igual.

5.6. Efecto del medio condicionado de las CTTA en la vía de NF- κ B

Finalmente decidimos determinar el posible efecto del medio condicionado de las CTTA sobre una de las principales vías de señalización celular, como lo es el factor nuclear kappa B (NF- κ B). Éste es un factor de transcripción muy importante para la expresión inducible de una amplia variedad de genes, desempeñando un papel crítico en la respuesta para una gran variedad de estímulos y procesos celulares, como la inflamación, supervivencia celular, apoptosis y proliferación[81], [83], [99].

Para analizar esta vía, elegimos determinar los niveles de expresión proteica de I κ B α , una de las proteínas reguladoras más importantes del factor de transcripción NF- κ B (dímero p50-p65). Se decidió probar el efecto sobre la vía de señalización de NF- κ B tanto del medio condicionado de las CTTA, como el efecto del medio condicionado obtenido de los adipocitos, esto con la finalidad de conocer si el tejido diferenciado tenía o no el mismo efecto.

En la figura 12 se muestra que la expresión de I κ B α cambia en las distintas condiciones experimentales. Como se esperaba, en las células tratadas con el medio s/SFB (s/s) la expresión de esta proteína fue muy baja.

En el caso del medio con 10% SFB claramente se puede observar un aumento en la expresión de I κ B α en las dos líneas celulares, de igual manera se observó un aumento de la proteína en el caso de las células cultivadas con medio condicionado obtenido de los adipocitos, que fue superior al del medio con 10% SFB.

En cambio, los resultados con el medio condicionado de las CTTA fueron ambiguos, ya que en las células C6 (de rata) la expresión de I κ B α fue baja, incluso menor que la del medio sin SFB (Figura 12, abajo derecha). En cambio en la línea celular MCF7 (de origen humano), se observó un aumento de la expresión de esta proteína, que incluso fue mayor que en las células cultivadas con medio 10% SFB (Figura 12, abajo izquierda).

Sin embargo, también debemos considerar los cambios de fosforilación observados en las distintas condiciones. En el caso de las condiciones sin SFB en las dos líneas celulares, no se observó fosforilación. En cambio en todas las demás condiciones se observaron dos bandas de I κ B α , lo cual probablemente señala la fosforilación en alguno de sus residuos (Figura 12, superior) y por lo tanto de su posible degradación, lo que lleva a la activación de la vía.

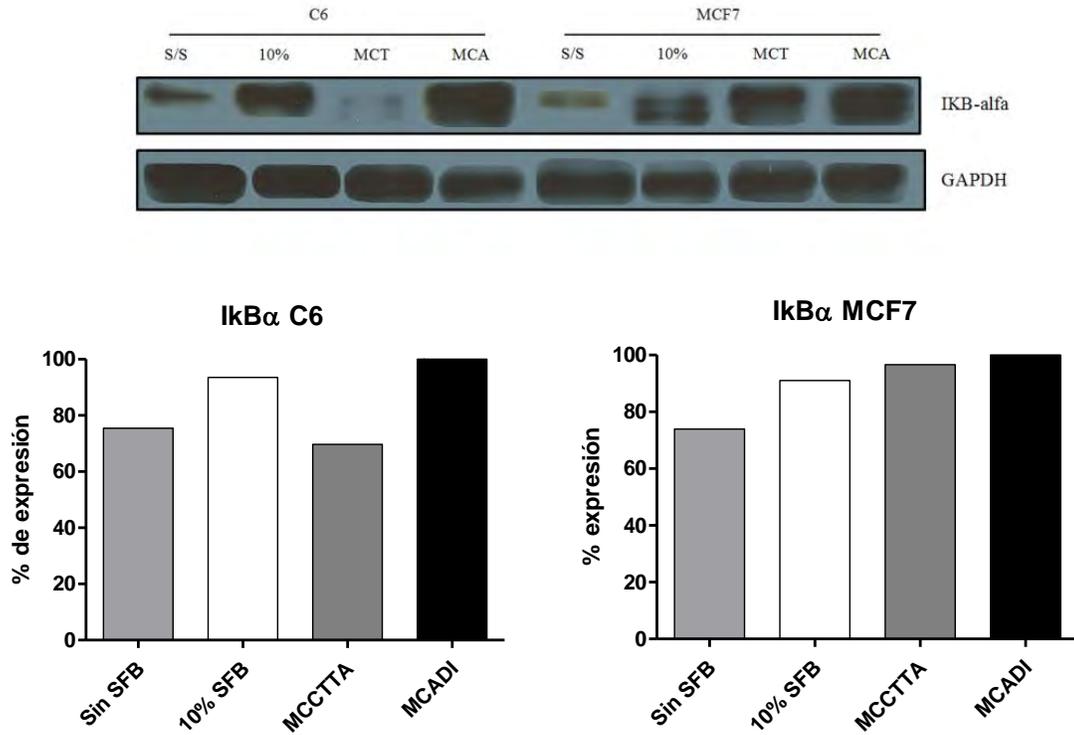


Figura 12. Expresión proteica de IκBα bajo el tratamiento con el medio condicionado derivado de las CTTA. Se utilizó como control de carga a GAPDH (Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa). s/s, DMEM sin SFB; 10%, DMEM con 10% SFB; MCCTTA, medio condicionado de CTTA; MCADI, medio condicionado de adipocitos. Las gráficas están realizadas a partir de un análisis de densitometría realizado en ImageJ, se normalizó con el porcentaje de expresión de GAPDH.

6. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha reconocido que el ambiente tumoral desempeña un papel fundamental para el desarrollo del cáncer. Visto desde esta perspectiva, la biología del tumor solo se puede entender por el estudio de las células tumorales dentro de lo que se denomina “microambiente tumoral”, el cual es construido durante el curso de la tumorigénesis en sus múltiples pasos. Esto contrasta con la antigua idea, desde un punto de vista reduccionista, de un tumor como solo una colección de células cancerígenas homogéneas, cuya biología entera podía ser entendida elucidando las propiedades de estas células. El microambiente de tumores sólidos, en muchos casos está compuesto de varios tipos de células mesenquimales y otros componentes extracelulares, e incluye células endoteliales, fibroblastos, miofibroblastos, adipocitos, células del sistema inmune y células troncales mesenquimales [100]. Estos tipos celulares contribuyen de manera importante a la biología de muchos tumores. Entre estos linajes celulares destaca el papel de las células troncales mesenquimales por su contribución al establecimiento del nicho tumoral [5].

Los diferentes tipos de células estromales que constituyen el microambiente tumoral son reclutadas desde los tejidos normales adyacentes, sin embargo, también se ha documentado la migración de células estromales de tejidos lejanos. En los últimos años, se ha determinado a la médula ósea como fuente importante de las células estromales asociadas a tumores [101]. El origen de las células estromales de médula ósea ha sido demostrado empleando como modelo a ratones, en los cuales las células de médula ósea y su progenie han sido etiquetadas con la proteína verde fluorescente y se ha observado su diseminación hacia el tejido tumoral [102], además de que se ha acumulado evidencia que las células troncales de médula ósea (CTMO) administradas en tumores en modelos animales resultan en una progresión acelerada del cáncer [12], [14], [15].

Sin embargo, las células troncales mesenquimales no solo derivan de la médula ósea, como ya se describió anteriormente, también pueden derivar del tejido adiposo. La capacidad de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CTTA) para dar soporte a células normales y tumorales aún es debatida, por lo que sigue siendo poco claro el papel de las CTTA [103]. Pero al igual que las CTMO, las CTTA también han sido relacionadas con la progresión del cáncer, por su posible papel en la creación

del microambiente tumoral. Existen estudios que han reportado que células derivadas del tejido adiposo blanco se infiltran en diferentes compartimentos tumorales [19], [104]; también existen estudios donde se ha demostrado que este linaje celular es capaz de secretar citocinas tales como CXCL5 o CCL5 [105], [106]. Esto nos habla de la posible capacidad de estas células para reclutar otros linajes celulares y también de su capacidad para promover el establecimiento de células tumorales circulantes por medio de la secreción de estos quimioatrayentes.

En este trabajo se exploró el papel del medio condicionado obtenido de las células CTTA en el comportamiento de dos líneas celulares transformadas; de manera singénica (usando una línea tumoral neural de rata) y de manera alogénica (usando una línea tumoral de origen mamario humano). Con este fin se decidió determinar si los medios condicionados afectan procesos fundamentales en la progresión del cáncer, como lo son la proliferación, la viabilidad y la migración celular.

Corroboramos que nuestro medio condicionado se obtuvo de una población de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo. La comprobación de la identidad de las CTTA la realizamos por medio de dos métodos. El primero de ellos fue por medio de la diferenciación adipogénica de las CTTA, que como se muestra en la figura 4, la mayor parte de nuestro cultivo celular se diferenció hacia pre-adipocitos, lo cual nos sugiere que las células utilizadas eran CTTA. El segundo método involucró determinar el porcentaje de las CTTA por medio de la inmunofenotipificación de los marcadores celulares reportados para estas células. Nuestra población tuvo un alto porcentaje de CD90, el cual es ampliamente aceptado como marcador de células troncales mesenquimales [78], [107], [108]. En el caso de CD105 y CD44 se esperaba encontrar también una alta expresión en nuestros cultivos celulares, pero encontramos una expresión baja para estas dos proteínas. Una posible explicación de nuestros resultados para CD105, es que de acuerdo con varios reportes, estas células pueden llegar a tener una baja expresión de CD105 durante los primeros pases después de su aislamiento, incrementándose su expresión conforme aumenta el número de pases [96]. Nosotros realizamos la caracterización de estas células en los primeros 2 pases lo que podría explicar porque la expresión de CD105 es aún muy baja. Probablemente si hubiésemos realizado los experimentos con pases mayores hubiésemos visto una expresión más alta

de este marcador. En el caso de CD44, el anticuerpo utilizado no fue específico para rata, sino estaba hecho para humano, se esperaba el reconocimiento por parte del anticuerpo ya que la homología entre ambas proteínas es alta (65% de acuerdo al Blast entre proteínas), pero posiblemente no hubo tal identificación y esta quizás fue la razón de que se encontrara una expresión tan baja.

Como se observa en la tabla 3, solo tuvimos una ligera contaminación con células endoteliales que corresponden a una población marcada con CD31 y nula contaminación de células hematopoyéticas que corresponden a la población marcada con CD45. Todos estos resultados nos indican que los cultivos que utilizamos estaban enriquecidos con CTTA. Para dar mayor peso a estos resultados, se podría realizar también otro tipo de diferenciaciones, por ejemplo osteogénica y condrogénica, lo que reforzaría la presencia de plasticidad de nuestro cultivo y por la tanto la multipotencialidad de las CTTA. Sin embargo, consideramos que nuestros resultados son suficientes para probar el linaje de los cultivos utilizados.

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos celulares de proliferación, viabilidad y migración celulares, tanto para el modelo singénico como el alogénico fueron parecidos (Figuras 6-10). En los tres casos se observó la promoción de estos procesos en las líneas celulares transformadas cultivadas con el medio condicionado obtenido de las CTTA, en comparación con las cultivadas en medio sin suero fetal bovino.

La proliferación de las líneas celulares cultivadas en el medio condicionado fue mayor (en ~5%) comparadas a las cultivadas en nuestro control negativo (medio sin suero). En el caso de la línea celular C6, este aumento inclusive fue mayor en comparación a nuestro control. El aumento observado en la tasa de proliferación en este trabajo, concuerda con reportes previos donde se ha observado que células troncales mesenquimales de médula ósea promueven también el crecimiento de tumores en condiciones *in vivo* [109]. Por otro lado, también se ha observado un aumento en la proliferación en cáncer gástrico atribuido a las CTTA [110].

También se observó que el medio condicionado de las CTTA promovió un aumento en la viabilidad de las líneas celulares utilizadas en comparación con el medio que carecía de SFB, a pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estas dos condiciones (Figs. 7 y 8). El aumento en la viabilidad mediada por células

troncales mesenquimales se ha reportado en distintos tipos de líneas celulares y modelos en condiciones *in vivo* [111–113]. Todos estos trabajos atribuyen dicho aumento en la viabilidad a la disminución de la apoptosis y solo algunos reportes le dan importancia al aumento de la tasa de proliferación [109], [114], proceso que en el presente trabajo parece tener relevancia, debido a que en esta tesis observamos un aumento en la tasa proliferativa de las líneas celulares cultivadas con el medio condicionado de las CTTA. Para conocer la contribución que tiene la disminución de la apoptosis en el aumento de la viabilidad observada en este trabajo, sugerimos que se podrían realizar otros ensayos como emplear la tinción con anexina V por medio de citometría de flujo, esto para la detección de células apoptóticas.

Se observó también un aumento estadísticamente significativo en la migración celular de las líneas celulares cultivadas con medio condicionado de las CTTA en comparación de las cultivadas en medio SFB (Figs. 9 y 10). Estos resultados concuerdan con el aumento de la migración observado en cocultivos de CTTA y una línea celular transformada de origen murino (B16-lacZ) [115], o también en reportes donde CTMO promueven la migración en líneas celulares (PyMT-Luc, 17L3C-Luc) o en tumores (colon) [45], [114]. Debido a que la migración celular es un proceso necesario para eventos tales como la angiogénesis o la metástasis, esto explica de cierta forma, el reclutamiento de las CTTA por parte de los tumores [19], [103], [116]. Esta tesis concuerda con que el aumento dado por las CTTA en la migración celular de las líneas celulares transformadas es un factor importante para explicar el reclutamiento de las CTTA observado en tumores.

En conjunto nuestros resultados en los ensayos de proliferación, viabilidad y migración celulares sugieren que las CTTA además de su función como remodeladoras del nicho tumoral y de su papel como inmunoreguladoras [59], también forman parte y ayudan al mantenimiento y regulación del ambiente tumoral, promoviendo la progresión del cáncer por medio de la promoción de la migración, proliferación y viabilidad de las células transformadas, como observamos en este trabajo.

Después de demostrar que las CTTA son capaces de aumentar *in vitro* la migración de líneas celulares de cáncer, y después de observar que son capaces de provocar un aumento en la tendencia de la tasa de proliferación y viabilidad de los tumores, decidimos estudiar los probables mecanismos responsables de este incremento. Para esto, se determinó si

existían diferencias entre los contenidos proteicos de cada medio de cultivo utilizado, mediante de la tinción de geles de poliacrilamida de una dimensión. Nuestros datos muestran que existen diferencias evidentes en el contenido proteico del medio condicionado de las CTTA respecto a los controles, como se ve en el cambio del bandeo mostrado por las flechas en la fig. 11.

Algunas de las proteínas diferencialmente expresadas en el medio condicionado de las CTTA, podría desempeñar un papel importante para el incremento de las funciones celulares que estudiamos aquí. Sin embargo, de los grupos de proteínas existentes, las que con mayor probabilidad podrían tener tal rol, son las citocinas y los factores de crecimiento. Estos son un diverso grupo de proteínas solubles y péptidos que están involucrados en la señalización, comunicación y regulación de diversos procesos biológicos como la proliferación, migración, muerte celular, diferenciación celular, entre otros. La resolución de los geles realizados no nos permitió discernir el aumento o disminución de éstas, ya que estas son proteínas de bajo peso molecular (5kDa-11kDa), además de que estas se encuentran normalmente a concentraciones extremadamente bajas, lo que hace muy complicado observarlas en geles de poliacrilamida, incluso aunque fuesen geles de dos dimensiones. Un método para determinar las citocinas que podrían encontrarse aumentadas en el medio condicionado de las CTTA es mediante un microarreglo de citocinas, de esta forma podríamos conocer cuales se encuentran diferencialmente expresadas.

Respecto a esto se ha reportado que las CTTA secretan diversas citocinas como las mencionadas anteriormente (CXCL5, CCL5), pero también otras como IL-4, IL-8, IL-10, TGF- β 1 [78], [84], [105], [106]. Por otra parte, se ha demostrado la implicación de muchas de estas citocinas como quimioatrayentes secretados tanto por las células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea, como por las CTTA. Por ejemplo, se ha propuesto un papel promotor de la metástasis por parte de CCL5 secretado por CTTA [56], efectos similares tiene LL-37 producida por CTMO en la promoción de la progresión de cáncer de ovario [117]. Se ha reportado también que niveles elevados de IL-8 incrementan la invasividad de las células de cáncer de mama y aumentan la angiogénesis en el sitio del tumor [84]. Otros reportes indican que tejidos tumorales donde las CTTA son reclutadas, estas son una importante fuente de factores tales como

SDF-1, CXCL5 y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1, por sus siglas en inglés) [84], [103], [105]. Las citocinas también ejercen roles directamente sobre las células transformadas, por ejemplo, IL-8, es un potente factor pro-angiogénico [84] o LL-37 que promueve la migración [117]. Las citocinas además median el reclutamiento de células pro-inflamatorias en tumores, por ejemplo, CCL5 recluta macrófagos en cáncer de mama [118]. En resumen, se ha demostrado que muchas de estas citocinas sobre-expresadas por CTTA o CTMO ejercen sus efectos sobre los tumores (modificando el nicho tumoral o sobre los tumores mismos), por lo que nosotros creemos que la manera como actuaron las CTTA para aumentar los procesos celulares aquí estudiados fue por medio de citocinas secretadas por este linaje celular.

Las citocinas actúan a nivel celular por medio de diversas cascadas de señalización, entre ellas, una de las más importantes, por la amplia gama de respuestas que desempeña, es el factor de transcripción NF- κ B, por lo que decidimos explorar esta vía de señalización debido a que existen varios reportes en los cuales se ha visto que varias de las citocinas sobre-expresadas, anteriormente mencionadas, tenían como una de sus rutas en común a NF- κ B [119–123]. Los resultados obtenidos (Figura 12), solo nos permiten indagar un poco esta vía. En el inmunoblot observamos que mientras en la línea C6, I κ B α se encontraba expresado en menor medida que nuestro control positivo (SFB), en la línea MCF7 observamos lo contrario, una expresión superior en comparación al control positivo. De manera consistente observamos una alta expresión de I κ B α en las células cultivadas en el medio obtenido de la fracción de adipocitos del TAB.

También es importante destacar que se pueden observar estados de fosforilación en casi todas las condiciones (Figura 12), excepto en donde se utiliza medio sin suplementar. Esto nos indica que los medios suplementados y condicionados, son capaces de activar la vía de Nf- κ B, promoviendo la fosforilación de I κ B α , lo que lleva a su degradación y que permite la liberación del dímero p50-p65 y su posterior translocación al núcleo [124], [125]. En particular es importante destacar que en los medios condicionados de los adipocitos podemos observar una banda de I κ B α intensa, tanto de su forma fosforilada, como la forma defosforilada, lo que nos sugiere que la proteína se está degradando, pero también se está traduciendo.

Una posible explicación a estos resultados, podría darse en base al origen de cada una de las líneas celulares utilizadas (una deriva de tejido nervioso <C6> y otra de tejido mamario<MCF7>), debido a que estos tipos celulares expresan diferencialmente distintos receptores. Específicamente el tejido mamario expresa muchos más receptores para responder a gran variedad de estímulos, tales como hormonas y por supuesto citocinas. Por ejemplo el receptor de estrógenos, que se vincula con un 75% de los casos de cáncer de mama y que también se ha visto relacionado con NF- κ B [126], [127]. Sin embargo, este receptor no se encuentra presente en células de origen nervioso, esto podría dar una posible explicación a las diferencias observadas en western blot entre las líneas C6 (origen nervioso) y MCF7 (origen mamario). Otra posible explicación radica en que una misma citocina no ejerce el mismo efecto sobre una célula aún a pesar de tener el receptor para dicha citocina, por ejemplo, CXCR1 (receptor de IL-8), se encuentra expresado en tumores de origen glial y de origen mamario, pero se ha observado que la adición de IL-8 puede reducir la expresión de NF- κ B en glioblastomas [128] o activar la misma vía en cáncer de mamá [129].

Los resultados aquí mostrados parecen indicar que en la línea celular MCF7 la vía de NF- κ B tiene un papel importante en el aumento de la migración, viabilidad y proliferación celulares. En el caso de la línea celular C6, esta vía no parece tener tal importancia. Esto nos hace pensar que probablemente otras vías se encuentran involucradas y que estas también están contribuyendo al incremento de los procesos evaluados en este trabajo.

Estos resultados sugieren una posible contribución de NF- κ B en el aumento en la migración, viabilidad y proliferación celular de las líneas celulares que se observó en este trabajo. Sin embargo, para probar de manera concluyente el papel de esta vía sobre lo aquí visto, se debe de explorar no solo la vía canónica, sino también la no canónica, por ejemplo viendo la expresión a nivel de proteína de Nik, que es la principal cinasa activadora de la vía no canónica[81]. También medir los niveles de expresión de los receptores de las citocinas sobre-expresadas por las CTTA para cada una de las líneas celulares utilizadas, esto para indagar si la expresión diferencial de los receptores es o no el motivo de las diferencias en la activación de NF- κ B observadas en esta tesis.

Nuestros resultados sugieren que las CTTA promueven la progresión del cáncer de manera directa, promoviendo de manera clara la migración; y proliferación y viabilidad

de los tumores. Proponemos que esta función promotora de las CTTA contribuye a la inducción de la progresión de los tumores observada en la obesidad, ya que como se mencionó anteriormente la obesidad lleva a un aumento en el tejido adiposo blanco, tanto de su fracción adipocitos como de su fracción estromal. El aumento de esta última fracción, lleva al incremento de las CTTA, las cuales como proponemos en este trabajo, favorecen procesos celulares que promueven la progresión del cáncer, como lo son la proliferación celular, la viabilidad celular y la migración celular, por lo que las CTTA contribuirían de manera importante en el microambiente tumoral de las personas con obesidad. Finalmente proponemos que el adecuado control de la obesidad podría ayudar a la disminución del progreso tumoral.

7. CONCLUSIONES

- Aislamos y caracterizamos poblaciones celulares de cultivos primarios enriquecidos con células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CTTA).
- Observamos que las CTTA favorecen la migración celular, también se observó una tendencia a aumentar tanto la proliferación como viabilidad de células transformadas, lo cual sugiere que las CTTA contribuyen a la tumorigénesis, promoviendo los procesos celulares previamente mencionados.
- Se observó que una de las posibles vías por las que podrían actuar las CTTA es por medio de la vía de señalización de NF- κ B.
- La promoción ejercida por las CTTA sobre los procesos de las células tumorales, nos hace sugerir que estas podrían contribuir a la progresión del cáncer observada en la obesidad.
- Concluimos que el adecuado manejo de la obesidad podría ayudar a disminuir el progreso tumoral.

8. LITERATURA CITADA

- [1] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, Fifth. Garland Sciences, 2008, p. 1725.
- [2] F. Bunz, *Principles of cancer genetics*, First. Baltimore, Maryland: , 2008, p. 325.
- [3] B. a Ponder, “Cancer genetics.,” *Nature*, vol. 411, no. 6835, pp. 336–41, May 2001.
- [4] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “The Hallmarks of Cancer,” *Cell*, vol. 100, pp. 57–70, 2000.
- [5] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of Cancer: The Next Generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011.
- [6] T. Tonini, F. Rossi, and P. P. Claudio, “Molecular basis of angiogenesis and cancer.,” *Oncogene*, vol. 22, no. 42, pp. 6549–56, Sep. 2003.
- [7] J. Yokota, “Tumor progression and metastasis.,” *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 3, pp. 497–503, Mar. 2000.
- [8] P. Mehlen and A. Puisieux, “Metastasis: a question of life or death.,” *Nature reviews. Cancer*, vol. 6, no. 6, pp. 449–58, Jun. 2006.
- [9] C. Osborne, P. Wilson, and D. Trpathy, “Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications,” *The oncologist*, vol. 9, pp. 361–377, 2004.
- [10] R. a Beckman and L. a Loeb, “Genetic instability in cancer: theory and experiment.,” *Seminars in cancer biology*, vol. 15, no. 6, pp. 423–35, Dec. 2005.
- [11] A. Levine, “The tumor suppressor genes.,” *Annual review of biochemistry*, vol. 62, no. 1, pp. 623–51, Jan. 1993.
- [12] T. J. Slaga, “Overview of tumor promotion in animals.,” *Environmental health perspectives*, vol. 50, no. 47, pp. 3–14, Apr. 1983.
- [13] R. W. Ruddon, *Cancer Biology*, 2nd ed. US: Oxford University Press, 2007, p. 507.
- [14] G. I. Evan and K. H. Vousden, “Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer.,” *Nature*, vol. 411, no. 6835, pp. 342–8, May 2001.
- [15] M. J. Khandekar, P. Cohen, and B. M. Spiegelman, “Molecular mechanisms of cancer development in obesity.,” *Nature reviews. Cancer*, vol. 11, no. 12, pp. 886–95, Dec. 2011.

- [16] P. L. Prieto-Hontoria, P. Pérez-Matute, M. Fernández-Galilea, M. Bustos, J. A. Martínez, and M. J. Moreno-Aliaga, "Role of obesity-associated dysfunctional adipose tissue in cancer: a molecular nutrition approach.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1807, no. 6, pp. 664–78, Jun. 2011.
- [17] J. A. M. M.J. Moreno-Aliaga, J.L. Santos, A. Marti, "Does weight loss prognosis depend on genetic make-up?," *Obes.Rev.*, vol. 6, pp. 157–168, 2005.
- [18] B. Teucher, S. Rohrmann, and R. Kaaks, "Obesity: focus on all-cause mortality and cancer.," *Maturitas*, vol. 65, no. 2, pp. 112–6, Feb. 2010.
- [19] H. B. T. Pischon, U.Nothlings, "Obesity and cancer," *Proc.Nutr.Soc.*, vol. 67, pp. 128–145, 2008.
- [20] Otto Warburg, "On the Origin of Cancer Cells," *Science*, vol. 123, no. 3191, pp. 309–314, 1956.
- [21] S. D. Hursting, N. P. Nunez, L. Varticovski, and C. Vinson, "The obesity-cancer link: lessons learned from a fatless mouse.," *Cancer research*, vol. 67, no. 6, pp. 2391–3, Mar. 2007.
- [22] C. La Vecchia, S. H. Giordano, G. N. Hortobagyi, and B. Chabner, "Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle.," *The oncologist*, vol. 16, no. 6, pp. 726–9, Jan. 2011.
- [23] I. Romieu and M. Lajous, "The role of obesity, physical activity and dietary factors on the risk for breast cancer: Mexican experience.," *Salud pública de México*, vol. 51 Suppl 2, no. 655, pp. s172–80, Jan. 2009.
- [24] E. E. Calle, C. Rodriguez, K. Walker-thurmond, and M. J. Thun, "Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of US adult," *New England Journal*, pp. 1625–1638, 2003.
- [25] L. Vona-Davis and D. P. Rose, "Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression.," *Endocrine-related cancer*, vol. 14, no. 2, pp. 189–206, Jun. 2007.
- [26] K. Karastergiou and V. Mohamed-Ali, "The autocrine and paracrine roles of adipokines.," *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 318, no. 1–2, pp. 69–78, Apr. 2010.
- [27] R. C. M. van Kruijsdijk, E. van der Wall, and F. L. J. Visseren, "Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue.," *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, vol. 18, no. 10, pp. 2569–78, Oct. 2009.

- [28] P. Trayhurn, "Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat.," *Acta physiologica Scandinavica*, vol. 184, no. 4, pp. 285–93, Aug. 2005.
- [29] P. Trayhurn and I. S. Wood, "Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity.," *Biochemical Society transactions*, vol. 33, no. Pt 5, pp. 1078–81, Nov. 2005.
- [30] A.S.Anderson and S.Caswell, "Obesity management an opportunity for cancer prevention," *Surgeon*, vol. 7, pp. 282–285, 2009.
- [31] T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, and I. L. Weissman, "Stem cells, cancer, and cancer stem cells.," *Nature*, vol. 414, no. 6859, pp. 105–11, Nov. 2001.
- [32] R. M. Seaberg and D. van der Kooy, "Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions," *Trends in Neurosciences*, vol. 26, no. 3, pp. 125–131, Mar. 2003.
- [33] I. L. Weissman, D. J. Anderson, and F. Gage, "Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations.," *Annual review of cell and developmental biology*, vol. 17, pp. 387–403, Jan. 2001.
- [34] H. M. Blau, T. R. Brazelton, and J. M. Weimann, "The Evolving Concept of a Stem Cell : Entity or Function ?," *Cell*, vol. 105, pp. 829–841, 2001.
- [35] I. L. Weissman, "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution.," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 157–68, Jan. 2000.
- [36] J. Gearharl, H. Bridgid, D. Melton, R. Pedersen, and E. D. Thomas, *Essentials of Stem Cell Biology*, Second. Academic Press, 2009, p. 630.
- [37] D. U. Silverthorn, *Fisiologia Humana. Un enfoque integrado*, 4th Editio. EUA, 2007: Pearson Education, 2007, p. 655.
- [38] M. Kondo, *Hematopoietic Stem Cell Biology*. EUA: Springer, 2009, p. 251.
- [39] D. J. Laird, U. H. von Andrian, and A. J. Wagers, "Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease.," *Cell*, vol. 132, no. 4, pp. 612–30, Feb. 2008.
- [40] A. Sengupta and J. a Cancelas, "Cancer stem cells: a stride towards cancer cure?," *Journal of cellular physiology*, vol. 225, no. 1, pp. 7–14, Oct. 2010.
- [41] C. Blanpain, M. Mohrin, P. a. Sotiropoulou, and E. Passegué, "DNA-Damage Response in Tissue-Specific and Cancer Stem Cells," *Cell Stem Cell*, vol. 8, no. 1, pp. 16–29, Jan. 2011.

- [42] A. J. Friedenstein, J. F. Gorskaja, and N. N. Kulagina, "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs .," *Exp.Hematol.*, vol. 4, pp. 267–274, 1976.
- [43] K. English, A. French, and K. J. Wood, "Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation?," *Cell stem cell*, vol. 7, no. 4, pp. 431–42, Oct. 2010.
- [44] J. Andrea, A. Romero, D. Marcela, P. Guerrero, V. Marcela, and R. Pardo, "Células madre mesenquimales : características biológicas y aplicaciones clínicas .," pp. 177–184.
- [45] K. Shinagawa, Y. Kitadai, M. Tanaka, T. Sumida, M. Kodama, Y. Higashi, S. Tanaka, W. Yasui, and K. Chayama, "Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer.," *International journal of cancer. Journal international du cancer*, May 2010.
- [46] S. Ciavarella, M. Dominici, F. Dammacco, and F. Silvestris, "Mesenchymal stem cells: a new promise in anticancer therapy.," *Stem cells and development*, vol. 20, no. 1, pp. 1–10, Jan. 2011.
- [47] S. P. Colgan, H. K. Eltzschig, T. Eckle, and L. F. Thompson, "Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73).," *Purinergic signalling*, vol. 2, no. 2, pp. 351–60, Jul. 2006.
- [48] L. Airas, J. Niemelä, M. Salmi, T. Puurunen, D. J. Smith, and S. Jalkanen, "Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells.," *The Journal of cell biology*, vol. 136, no. 2, pp. 421–31, Jan. 1997.
- [49] a Augello, T. B. Kurth, and C. De Bari, "Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches.," *European cells & materials*, vol. 20, pp. 121–33, Jan. 2010.
- [50] A. Wiesmann, H.-J. Bühring, C. Mentrup, and H.-P. Wiesmann, "Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation.," *Head & face medicine*, vol. 2, p. 8, Jan. 2006.
- [51] S. Gronthos, D. M. Franklin, H. a Leddy, P. G. Robey, R. W. Storms, and J. M. Gimble, "Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells.," *Journal of cellular physiology*, vol. 189, no. 1, pp. 54–63, Oct. 2001.
- [52] N. a Dallas, S. Samuel, L. Xia, F. Fan, M. J. Gray, S. J. Lim, and L. M. Ellis, "Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy.," *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 14, no. 7, pp. 1931–7, Apr. 2008.

- [53] F. Mosna, L. Sensebé, and M. Krampera, "Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide.," *Stem cells and development*, vol. 19, no. 10, pp. 1449–70, Oct. 2010.
- [54] J. J. Minguell, A. Erices, and P. Conget, "Mesenchymal Stem Cells," *Exp Biol Med*, vol. 226, no. 6, pp. 507–520, 2001.
- [55] S. Liu, C. Ginestier, S. J. Ou, S. G. Clouthier, S. H. Patel, F. Monville, H. Korkaya, A. Heath, J. Dutcher, C. G. Kleer, Y. Jung, G. Dontu, R. Taichman, and M. S. Wicha, "Breast Cancer Stem Cells Are Regulated by Mesenchymal Stem Cells through Cytokine Networks.," *Cancer research*, pp. 614–624, Jan. 2011.
- [56] A. E. Karnoub, A. B. Dash, A. P. Vo, A. Sullivan, M. W. Brooks, G. W. Bell, A. L. Richardson, K. Polyak, R. Tubo, and R. a Weinberg, "Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis.," *Nature*, vol. 449, no. 7162, pp. 557–63, Oct. 2007.
- [57] K. Mclean, Y. Gong, Y. Choi, N. Deng, K. Yang, S. Bai, L. Cabrera, E. Keller, L. Mccauley, K. R. Cho, and R. J. Buckanovich, "Human ovarian carcinoma – associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production," vol. 121, no. 8, 2011.
- [58] R. M. Dwyer, S. Khan, F. P. Barry, T. O'Brien, and M. J. Kerin, "Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer.," *Stem cell research & therapy*, vol. 1, no. 3, p. 25, Jan. 2010.
- [59] F. Djouad, P. Ponce, C. Bony, P. Tropel, F. Apparailly, J. Sany, D. Noël, and C. Jorgensen, "Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals.," *Blood*, vol. 102, no. 10, pp. 3837–44, Nov. 2003.
- [60] M. Hu and K. Polyak, "Microenvironmental regulation of cancer development," *Curr Opin Genet Dev*, vol. 18, pp. 27–34, 2008.
- [61] N. Z. Kuhn and R. S. Tuan, "Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis.," *Journal of cellular physiology*, vol. 222, no. 2, pp. 268–77, Feb. 2010.
- [62] I. Rasmusson, "Immune modulation by mesenchymal stem cells.," *Experimental cell research*, vol. 312, no. 12, pp. 2169–79, Jul. 2006.
- [63] L. Li, H. Tian, W. Yue, F. Zhu, S. Li, and W. Li, "Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth," *Journal of Cellular Physiology*, no. July, pp. 1–27, 2010.

- [64] C. P. El-haibi and A. E. Karnoub, "Mesenchymal Stem Cells in the Pathogenesis and Therapy of Breast Cancer," *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, pp. 399–409, 2010.
- [65] J. M. Gimble, A. J. Katz, and B. a Bunnell, "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine.," *Circulation research*, vol. 100, no. 9, pp. 1249–60, May 2007.
- [66] G. Lin, M. Garcia, H. Ning, L. Banie, Y.-L. Guo, T. F. Lue, and C.-S. Lin, "Defining stem and progenitor cells within adipose tissue.," *Stem cells and development*, vol. 17, no. 6, pp. 1053–63, Dec. 2008.
- [67] M. Locke, V. Feisst, and P. R. Dunbar, "Human Adipose-Derived Stem Cells (ASC): Separating Promise from Clinical Need.," *Stem cells (Dayton, Ohio)*, Jan. 2011.
- [68] M. E. Danoviz, V. Bassaneze, J. S. Nakamuta, G. R. dos Santos-Junior, D. Saint-Clair, M. C. Bajgelman, K. C. Faé, J. Kalil, A. A. Miyakawa, and J. E. Krieger, "Adipose tissue-derived stem cells from humans and mice differ in proliferative capacity and genome stability in long-term cultures.," *Stem cells and development*, vol. 20, no. 4, pp. 661–70, Apr. 2011.
- [69] J. B. Mitchell, K. McIntosh, S. Zvonic, S. Garrett, Z. E. Floyd, A. Kloster, Y. Di Halvorsen, R. W. Storms, B. Goh, G. Kilroy, X. Wu, and J. M. Gimble, "Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers.," *Stem cells (Dayton, Ohio)*, vol. 24, no. 2, pp. 376–85, Feb. 2006.
- [70] M. Razmkhah, M. Jaberipour, and A. Ghaderi, "Bcl-2 and Fas Expressions Correlate with Proliferative Specificity of Adipose-derived Stem Cells (ASCs) in Breast Cancer.," *Immunological investigations*, pp. 1–9, Jan. 2011.
- [71] L. Zimmerlin, V. S. Donnenberg, M. E. Pfeifer, E. M. Meyer, B. Péault, J. P. Rubin, and A. D. Donnenberg, "Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue.," *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, vol. 77, no. 1, pp. 22–30, Jan. 2010.
- [72] L. T. Lin CS, Xin ZC, Deng CH, Ning H, Lin G, "Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture.," *Histology and histopathology*, vol. 25, no. 06, pp. 807–15, 2010.
- [73] M. Rodeheffer, K. Birsoy, and Friedman. JM, "Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo," *Cell*, vol. 135, pp. 240–249, 2008.
- [74] Y. Zhang, C. F. Bellows, and M. G. Kolonin, "Adipose tissue-derived progenitor cells and cancer.," *World journal of stem cells*, vol. 2, no. 5, pp. 103–13, Oct. 2010.

- [75] Y. Zhang, A. Daquinag, D. O. Traktuev, F. Amaya-Manzanares, P. J. Simmons, K. L. March, R. Pasqualini, W. Arap, and M. G. Kolonin, "White adipose tissue cells are recruited by experimental tumors and promote cancer progression in mouse models.," *Cancer research*, vol. 69, no. 12, pp. 5259–66, Jun. 2009.
- [76] T. Jardé, S. Perrier, M.-P. Vasson, and F. Caldefie-Chézet, "Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer.," *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, vol. 47, no. 1, pp. 33–43, Jan. 2011.
- [77] J. M. Birmingham, J. V Busik, F. M. Hansen-Smith, and J. I. Fenton, "Novel mechanism for obesity-induced colon cancer progression.," *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 4, pp. 690–7, Apr. 2009.
- [78] M. Razmkhah, M. Jaberipour, N. Erfani, M. Habibagahi, A.-R. Talei, and A. Ghaderi, "Adipose derived stem cells (ASCs) isolated from breast cancer tissue express IL-4, IL-10 and TGF- β 1 and upregulate expression of regulatory molecules on T cells: Do they protect breast cancer cells from the immune response?," *Cellular immunology*, vol. 266, no. 2, pp. 116–122, Sep. 2010.
- [79] M. Karin and Y. Ben-neriah, "Phosphorylation meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity," *Annual review of immunology*, vol. 18, pp. 621–663, 2000.
- [80] S. Ghosh, M. Karin, and N. Haven, "Missing Pieces in the NF- κ B Puzzle," vol. 109, pp. 81–96, 2002.
- [81] A. Oeckinghaus and S. Ghosh, "The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation.," *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 1, no. 4, p. a000034, Oct. 2009.
- [82] J. L. Pomerantz and D. Baltimore, "Two Pathways to NF- κ B," *Molecular Cell*, vol. 10, no. 4, pp. 693–695, Oct. 2002.
- [83] V. F.-S. Shih, J. Davis-Turak, M. Macal, J. Q. Huang, J. Ponomarenko, J. D. Kearns, T. Yu, R. Fagerlund, M. Asagiri, E. I. Zuniga, and A. Hoffmann, "Control of RelB during dendritic cell activation integrates canonical and noncanonical NF- κ B pathways.," *Nature immunology*, vol. 13, no. 12, pp. 1162–70, Dec. 2012.
- [84] M. Razmkhah, M. Jaberipour, A. Hosseini, A. Safaei, B. Khalatbari, and A. Ghaderi, "Expression profile of IL-8 and growth factors in breast cancer cells and adipose-derived stem cells (ASCs) isolated from breast carcinoma.," *Cellular immunology*, vol. 265, no. 1, pp. 80–5, Jan. 2010.
- [85] P. A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim, and M. H. Hedrick, "Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells □," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 13, no. December, pp. 4279 – 4295, 2002.

- [86] B. a Bunnell, M. Flaata, C. Gagliardi, B. Patel, and C. Ripoll, "Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation.," *Methods (San Diego, Calif.)*, vol. 45, no. 2, pp. 115–20, Jun. 2008.
- [87] C. Pineda and C. Londoño, "Obtención de células madre del tejido adiposo y su potencial de diferenciación osteogénico," *Revista Ingeniería Biomédica*, vol. 3, no. 5, pp. 58–65, 2009.
- [88] L. J. Justement LB, Brown VK, "Regulation of B-cell activation by CD45: a question of mechanism," *Immunology today*, vol. 15, no. 9, pp. 399–406, 1994.
- [89] D. Male, J. Rahman, a Linke, W. Zhao, and W. Hickey, "An interferon-inducible molecule on brain endothelium which controls lymphocyte adhesion mediated by integrins.," *Immunology*, vol. 84, no. 3, pp. 453–60, Mar. 1995.
- [90] D. L. Livant, R. K. Brabec, K. J. Pienta, D. L. Allen, K. Kurachi, and S. Markwart, "Anti-invasive , Antitumorigenic , and Antimetastatic Activities of the PHSCN Sequence in Prostate Carcinoma Sequence in Prostate Carcinoma 1," *Cancer Research*, pp. 309–320, 2000.
- [91] J. H. Kim, S.-H. Park, S. G. Park, J.-S. Choi, Y. Xia, and J.-H. Sung, "The Pivotal Role of Reactive Oxygen Species Generation in the Hypoxia-Induced Stimulation of Adipose-Derived Stem Cells.," *Stem cells and development*, pp. 1–31, Mar. 2011.
- [92] R. Izadpanah, C. Trygg, B. Patel, C. Kriedt, J. Dufour, J. M. Gimble, and B. a Bunnell, "Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue.," *Journal of cellular biochemistry*, vol. 99, no. 5, pp. 1285–97, Dec. 2006.
- [93] T. Mossman, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay," *Journal of immunological methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63, 1983.
- [94] J. a Sherratt, E. H. Sage, and J. D. Murray, "Chemical control of eukaryotic cell movement: a new model.," *Journal of theoretical biology*, vol. 162, no. 1. pp. 23–40, 07-May-1993.
- [95] J. a Mackintosh, H.-Y. Choi, S.-H. Bae, D. a Veal, P. J. Bell, B. C. Ferrari, D. D. Van Dyk, N. M. Verrills, Y.-K. Paik, and P. Karuso, "A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis.," *Proteomics*, vol. 3, no. 12, pp. 2273–88, Dec. 2003.
- [96] R. Surgery, D. Force, and H. Yokosuka, "Concise Review : Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for," pp. 804–810, 2012.

- [97] S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, and K. Bieback, “Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.,” *Stem cells (Dayton, Ohio)*, vol. 24, no. 5, pp. 1294–301, May 2006.
- [98] B. Y. Khoo, N. Miswan, P. Balaram, K. Nadarajan, and E. Elstner, “Modification of MCF-10A Cells with Pioglitazone and Serum-Rich Growth Medium Increases Soluble Factors in the Conditioned Medium, Likely Reducing BT-474 Cell Growth.,” *International journal of molecular sciences*, vol. 13, no. 5, pp. 5607–27, Jan. 2012.
- [99] Y. M. Thu, Y. Su, J. Yang, R. Splittgerber, S. Na, a Boyd, C. Mosse, C. Simons, and a Richmond, “NF- κ B inducing kinase (NIK) modulates melanoma tumorigenesis by regulating expression of pro-survival factors through the β -catenin pathway.,” *Oncogene*, no. May, pp. 1–13, Oct. 2011.
- [100] Z. Castaño, C. M. Fillmore, C. F. Kim, and S. S. McAllister, “The bed and the bugs: interactions between the tumor microenvironment and cancer stem cells.,” *Seminars in cancer biology*, vol. 22, no. 5–6, pp. 462–70, Oct. 2012.
- [101] A. Patenaude, J. Parker, and A. Karsan, “Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization.,” *Microvascular research*, vol. 79, no. 3, pp. 217–23, May 2010.
- [102] D. Luo, D. Liu, X. Zhou, S. Yang, C. Tang, and G. Liu, “Bone marrow-derived cells contribute to NDEA-induced lung squamous cell carcinoma.,” *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, Oct. 2012.
- [103] B. Cousin, E. Ravet, S. Poglio, F. De Toni, J. Grolleau, J. Pe, H. Lulka, I. Touil, M. Andre, L. Casteilla, L. Buscail, P. Cordelier, P. Bourin, and L. Pe, “Adult Stromal Cells Derived from Human Adipose Tissue Provoke Pancreatic Cancer Cell Death both In Vitro and In Vivo.,” vol. 4, no. 7, pp. 31–34, 2009.
- [104] S. Kidd, E. Spaeth, K. Watson, J. Burks, H. Lu, A. Klopp, M. Andreeff, and F. C. Marini, “Origins of the Tumor Microenvironment : Quantitative Assessment of Adipose-Derived and Bone Marrow – Derived Stroma,” vol. 7, no. 2, 2012.
- [105] H. Zhang, H. Ning, L. Banie, G. Wang, G. Lin, T. F. Lue, and C.-S. Lin, “Adipose tissue-derived stem cells secrete CXCL5 cytokine with chemoattractant and angiogenic properties.,” *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 402, no. 3, pp. 560–4, Nov. 2010.
- [106] S. Pinilla, E. Alt, F. J. Abdul Khalek, C. Jotzu, F. Muehlberg, C. Beckmann, and Y.-H. Song, “Tissue resident stem cells produce CCL5 under the influence of cancer cells and thereby promote breast cancer cell invasion.,” *Cancer letters*, vol. 284, no. 1, pp. 80–5, Oct. 2009.

- [107] Y. Zhang, Y. Fan, Z. Wang, Y. Wan, Z. Zhou, B. Zhong, L. Wang, and F. Wang, "Isolation, characterization, and gene modification of dairy goat mesenchymal stem cells from bone marrow.," *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, vol. 48, no. 7, pp. 418–25, Aug. 2012.
- [108] M. S. Choudhery, M. Badowski, A. Muise, and D. T. Harris, "Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose and cord tissue.," *Cytotherapy*, vol. 15, no. 3, pp. 330–343, Jan. 2013.
- [109] W. Zhu, W. Xu, R. Jiang, H. Qian, M. Chen, J. Hu, W. Cao, C. Han, and Y. Chen, "Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo.," *Experimental and molecular pathology*, vol. 80, no. 3, pp. 267–74, Jun. 2006.
- [110] W. Z. Zhao BC, Zhao B, Han JG, Ma HC, "Adipose-derived stem cells promote gastric cancer cell growth, migration and invasion through SDF-1/CXCR4 axis.," *Hepatogastroenterology*, vol. 57, no. 104, pp. 1382–9, 2010.
- [111] S. Xu, E. Menu, A. DE Becker, B. VAN Camp, K. Vanderdeken, and I. VAN Riet, "Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Are Attracted by Preparation of Conditioned Medium," *Stem Cells*, vol. 30, pp. 266–279, 2012.
- [112] J. I. M. I. N. Yu, E. U. N. S. Jun, Y. C. Bae, and J. I. N. S. U. P. Jung, "Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissues Favor Tumor Cell Growth In Vivo," *Stem Cells and Development*, vol. 473, pp. 463–473, 2008.
- [113] K. Shinagawa, Y. Kitadai, M. Tanaka, T. Sumida, M. Kodama, Y. Higashi, S. Tanaka, W. Yasui, and K. Chayama, "Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer.," *International Journal of Cancer*, vol. 127, no. 10, pp. 2323–33, Dec. 2010.
- [114] K. Suzuki, R. Sun, M. Origuchi, M. Kanehira, T. Takahata, J. Itoh, A. Umezawa, H. Kijima, S. Fukuda, and Y. Saijo, "Mesenchymal Stromal Cells Promote Tumor Growth through the Enhancement of Neovascularization," *Molecular Medicine*, vol. 7, no. 14, 2011.
- [115] J. L. Halpern, A. Kilbarger, and C. C. Lynch, "Mesenchymal stem cells promote mammary cancer cell migration in vitro via the CXCR2 receptor.," *Cancer letters*, vol. 308, no. 1, pp. 91–9, Sep. 2011.
- [116] I. Martin-Padura, G. Gregato, P. Marighetti, P. Mancuso, A. Calleri, C. Corsini, G. Pruneri, M. Manzotti, V. Lohsiriwat, M. Rietjens, J.-Y. Petit, and F. Bertolini, "The white adipose tissue used in lipotransfer procedures is a rich reservoir of CD34+ progenitors able to promote cancer progression.," *Cancer research*, vol. 72, no. 1, pp. 325–34, Jan. 2012.

- [117] S. B. Coffelt, F. C. Marini, K. Watson, K. J. Zvezdaryk, J. L. Dembinski, H. L. LaMarca, S. L. Tomchuck, K. Honer zu Bentrup, E. S. Danka, S. L. Henkle, and A. B. Scandurro, “The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 10, pp. 3806–11, Mar. 2009.
- [118] M. Keophiphath, C. Rouault, A. Divoux, K. Clément, and D. Lacasa, “CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue.,” *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 30, no. 1, pp. 39–45, Jan-2010.
- [119] L. Song, L. Liu, Z. Wu, Y. Li, Z. Ying, C. Lin, J. Wu, B. Hu, S. Cheng, M. Li, and J. Li, “TGF- β induces miR-182 to sustain NF- κ B activation in glioma subsets,” vol. 122, no. 10, 2012.
- [120] S.-W. Wang, H.-H. Wu, S.-C. Liu, P.-C. Wang, W.-C. Ou, W.-Y. Chou, Y.-S. Shen, and C.-H. Tang, “CCL5 and CCR5 interaction promotes cell motility in human osteosarcoma.,” *PloS one*, vol. 7, no. 4, p. e35101, Jan. 2012.
- [121] M. Yu, X. Qi, J. L. Moreno, D. L. Farber, and A. D. Keegan, “NF- κ B signaling participates in both RANKL- and IL-4-induced macrophage fusion: receptor cross-talk leads to alterations in NF- κ B pathways.,” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 187, no. 4, pp. 1797–806, Aug. 2011.
- [122] H. Long, R. Xie, T. Xiang, Z. Zhao, S. Lin, Z. Liang, Z. Chen, and B. Zhu, “Autocrine CCL5 signaling promotes invasion and migration of CD133+ ovarian cancer stem-like cells via NF- κ B-mediated MMP-9 upregulation.,” *Stem cells (Dayton, Ohio)*, vol. 30, no. 10, pp. 2309–19, Oct. 2012.
- [123] X. Zhu, L. Wang, B. Zhang, J. Li, X. Dou, and R. C. Zhao, “TGF-beta1-induced PI3K/Akt/NF-kappaB/MMP9 signalling pathway is activated in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukaemia hemangioblasts.,” *Journal of biochemistry*, vol. 149, no. 4, pp. 405–14, Apr. 2011.
- [124] A. Oeckinghaus and S. Ghosh, “The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation.,” *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 1, no. 4, p. a000034, Oct. 2009.
- [125] G. Blancas-Flores, F. J. Alarcón-Aguilar, R. García-Macedo, J. C. Almanza-Pérez, J. L. Flores-Sáenz, R. Román-Ramos, J. L. Ventura-Gallegos, J. Kumate, A. Zentella-Dehesa, and M. Cruz, “Glycine suppresses TNF- α -induced activation of NF- κ B in differentiated 3T3-L1 adipocytes.,” *European journal of pharmacology*, vol. 689, no. 1–3, pp. 270–7, Aug. 2012.

- [126] S. C. Baumgarten and J. Frasor, “Minireview: Inflammation: an instigator of more aggressive estrogen receptor (ER) positive breast cancers.,” *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, vol. 26, no. 3, pp. 360–71, Mar. 2012.
- [127] D. Xing, S. Oparil, H. Yu, K. Gong, W. Feng, J. Black, Y.-F. Chen, and S. Nozell, “Estrogen modulates NF κ B signaling by enhancing I κ B α levels and blocking p65 binding at the promoters of inflammatory genes via estrogen receptor- β .,” *PloS one*, vol. 7, no. 6, p. e36890, Jan. 2012.
- [128] B. Raychaudhuri and M. a Vogelbaum, “IL-8 is a mediator of NF- κ B induced invasion by gliomas.,” *Journal of neuro-oncology*, vol. 101, no. 2, pp. 227–35, Jan. 2011.
- [129] F. Végran, R. Boidot, C. Michiels, P. Sonveaux, and O. Feron, “Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF- κ B/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis.,” *Cancer research*, vol. 71, no. 7, pp. 2550–60, Apr. 2011.

9. ANEXOS:

Unidades empleadas

ml: Mililitro

μ l: Microlitro

mg/ml: Miligramos por mililitro

μ M: Micromolar

μ g/ μ l: Microgramos sobre microlitros

mM: Milimolar