



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
THE AMERICAN BRITISH COWDRAY MEDICAL CENTER I.A.P.

MICROVESÍCULAS CELULARES: FUENTE DE FIBRINOLÍISIS EN CÁNCER DE MAMA

TESIS DE POSGRADO

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA DE MEDICINA INTERNA

PRESENTA:

DR. BENJAMÍN VALENTE ACOSTA

ASESORES DE TESIS:

DRA AURORA DE LA PEÑA DÍAZ

DRA. RAQUEL GERSON CWILICH

PROFESOR TITULAR:

DR. FRANCISCO MORENO SÁNCHEZ



MÉXICO, DF

FEBRERO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dra. Aurora de la Peña Díaz
Asesor de Tesis
Profesor Titular B, Facultad de Medicina, UNAM
Doctora en Ciencias. Sistema Nacional de Investigadores Nivel II

Dra. Raquel Gerson Cwilich
Asesor de Tesis
Profesor de oncología, Facultad de Medicina, UNAM
Medico Especialista en Oncología Médica, Centro Médico ABC

Dr. Francisco Moreno Sánchez
Profesor Titular de Medicina Interna, Centro Médico ABC
División de Estudios de Posgrado
Facultad de Medicina, UNAM

Dr. José Halabe Cherem
Jefe de la División de Educación e Investigación Médica, Centro Médico ABC
División de Estudios de Posgrado
Facultad de Medicina, UNAM

Agradezco a mis padres y hermanos por todo su amor y comprensión.

A Marái por encontrar en ti un motivo de vida y superación personal.

**A mis profesores el Dr. Moreno, Dr. Halabe, Dr. García, Dr. Tanur y Dr. Lázaro por
forjarme en esta etapa de mi formación.**

ÍNDICE

1. Resumen	5
2. Marco Teórico	6
3. Preguntas de Investigación	17
4. Justificación	17
5. Hipótesis	18
6. Objetivo general	18
7. Material y Métodos	19
8. Análisis estadísticos	27
9. Aspectos éticos	28
10. Resultados	29
11. Discusión	39
12. Conclusiones	43
13. Referencias	44

RESUMEN

Introducción: El sistema fibrinolítico juega un papel importante en la progresión del cáncer de mama, a través de la degradación de matriz extracelular, angiogénesis, inhibición de la apoptosis y proliferación celular. La expresión de activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA) en tejido de cáncer de mama correlaciona con el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, no se puede medir la actividad fibrinolítica en sangre, debido a la generación de inhibidores de u-PA. Recientemente se han descrito microvesículas celulares circulantes en sangre periférica con actividad fibrinolítica. El objetivo de nuestro estudio es demostrar la presencia de microvesículas circulantes con u-PA en pacientes con cáncer de mama y correlacionarlas con el estado de la enfermedad.

Métodos y Resultados: Incluimos 13 pacientes con cáncer de mama y 13 mujeres sanas donadoras del banco de sangre. Dentro de las 13 pacientes con cáncer de mama tuvimos 4 pacientes en remisión del cáncer de mama, 3 pacientes con enfermedad localmente avanzada y 6 pacientes con enfermedad metastásica. Se aislaron las microvesículas en sangre periférica y se determinó su concentración de u-PA. Siendo significativamente mayor en pacientes con enfermedad metastásica comparada con los otros grupos de pacientes ($p < 0.002$).

Conclusiones: Existe un incremento de u-PA en las microvesículas circulantes de pacientes con cáncer de mama metastásico. Las microvesículas circulantes con actividad fibrinolítica están involucradas en el proceso metastásico, probablemente siendo las efectoras directas de dicho proceso en la evolución del cáncer de mama.

MARCO TEÓRICO

CANCER DE MAMA

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres en todo el mundo, anualmente se diagnostican 1.38 millones de mujeres y fallecen más de 500,000 [1]. En México, el cáncer de mama es la causa principal de mortalidad por cáncer en mujeres [2].

El principal factor que contribuye a la mortalidad del cáncer de mama, es su progresión ante la presencia de metástasis, siendo esta la principal causa de muerte que suma 400,000 defunciones anualmente en todo el mundo [3].

Los factores de riesgo para cáncer de mama son el sexo femenino, edad, historia personal o familiar de cáncer de mama, antecedente de exposición a radiación ionizante, factores genéticos heredados, raza, dieta, alcohol y la exposición a estrógenos. La edad y el sexo son los factores de riesgo más asociados, ya que la mayoría del cáncer de mama ocurre en mayores de 61 años y en mujeres [4].

El cáncer de mama generalmente se origina de células epiteliales, por lo que es un carcinoma, existen dos principales tipos histológicos, carcinoma ductal y el carcinoma lobulillar, siendo el ductal más común. Existen diferentes factores histopatológicos que afectan el pronóstico e influyen en la decisión terapéutica, como el grado histológico, el estadio clínico, el estado de los receptores para estrógenos y progesterona y la expresión de Her2/neu [5].

El estadio se refiere a la extensión anatómica del cáncer, se basa en el tamaño del tumor (T), la extensión a ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis a distancia (M). Se puede dividir en estadios del I al IV, pero involucra tres principales grupos, la enfermedad con extensión locoregional que se refiere cuando no hay ganglios positivos, la enfermedad localmente avanzada cuando hay ganglios positivos, y la enfermedad metastásica.

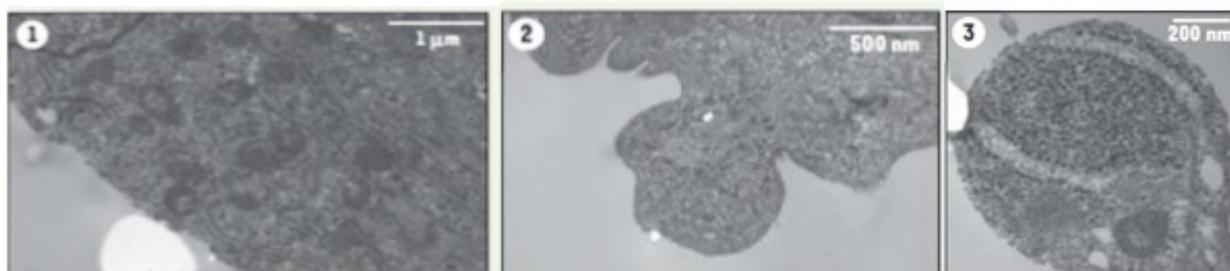
Estadio TNM	Característica	Descripción
I	Tumor <2cm	Locoregional
IIA	Tumor >2cm o ganglios axilares móviles	
IIB	Tumor >5cm	
IIIA	Ganglios mamarios internos o axilares fijos	Localmente avanzado
IIIB	Extensión directa a la pared torácica o la piel	
IIIC	Ganglios infraclaviculares o supraclaviculares	
IV	Metástasis a distancia	Metastásico

MICROVESÍCULAS CELULARES EN CÁNCER

Las microvesículas celulares son un nuevo medio de comunicación inter-celular, todas las células pueden liberar microvesículas constitutivamente y/o por activación celular, estas son liberadas por la membrana plasmática a través de un proceso de vesiculización, tienen un tamaño heterogéneo que va de los 50nm a los 2000nm [6].

Aunque antes se pensaba que cada célula liberaba solo un tipo de microvesículas, por ejemplo las células prostáticas liberan prostatosomas y las células tumorales oncosomas, ahora se conoce que cada tipo de célula puede liberar diferentes tipos de microvesículas con funciones incluso antagónicas, por lo que tienen un fino balance entre salud y enfermedad [7,8].

En cuanto a su constitución, las microvesículas están formadas por una bicapa de lípidos, traen consigo diferentes moléculas con actividad biológica, como proteínas principalmente citocinas y receptores transmembranales, así como ácidos nucleicos como ADN, ARNm, micro-ARN e incluso fragmentos de ARN no codificante, ampliamente implicados en la regulación post-traducciona de las proteínas. Es por ello, que se reconocen como una novedosa vía de comunicación intercelular, interactuando de manera activa para ejercer cambios funcionales y fenotípicos en las células receptoras [9,10].



1. Membrana de una célula, 2. Proceso de vesiculización, 3. Liberación de la microvesícula.

Figura 1. Proceso de vesiculización celular. Tomado y modificado de: Doeuvre L, Angles-Cano E. Des microparticules cellulaires dévoilent leur fonction fibrinolytique et protéolytique. *Medecine/Sciences* 2009;25:37-44.

Las microvesículas se pueden aislar de prácticamente cualquier fluido, por ejemplo: sangre, linfa, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo y trasudados como la ascitis, como fue expuesto previamente, están ampliamente relacionadas tanto en la salud por sus propiedades fisiológicas, como en la enfermedad por sus actividades en la fisiopatología, por lo que también están presentes en pacientes con cáncer, siendo esta una enfermedad protagónica en el estudio de las microvesículas [11].

En el cáncer han sido implicadas en promover el desarrollo de fenotipos celulares altamente agresivos, por ejemplo Yang y colaboradores demostraron que los macrófagos asociados a tumores secretan cierto tipo de microvesículas que contienen micro-ARNs que pueden hacer a las células de cáncer de mama más invasivas a través de la vía Mef2c- β -catenina[12].

Las microvesículas asociadas a tumores pueden inhibir la respuesta inmune contra el cáncer, al promover la apoptosis de los linfocitos T, como lo expone Andreola y colaboradores donde detallan como células de melanoma liberan microvesículas que exponen un ligando Fas promotor de apoptosis linfocítica [13], y también Szajnik y colaboradores que demuestran que las microvesículas derivadas de tumores tienen propiedades inmunoregulatoras, ya que inducen la generación de linfocitos con fenotipo Treg (CD4(+)/CD25(+)/FOXP3(+)), principales implicados en la tolerancia inmune tumoral [14].

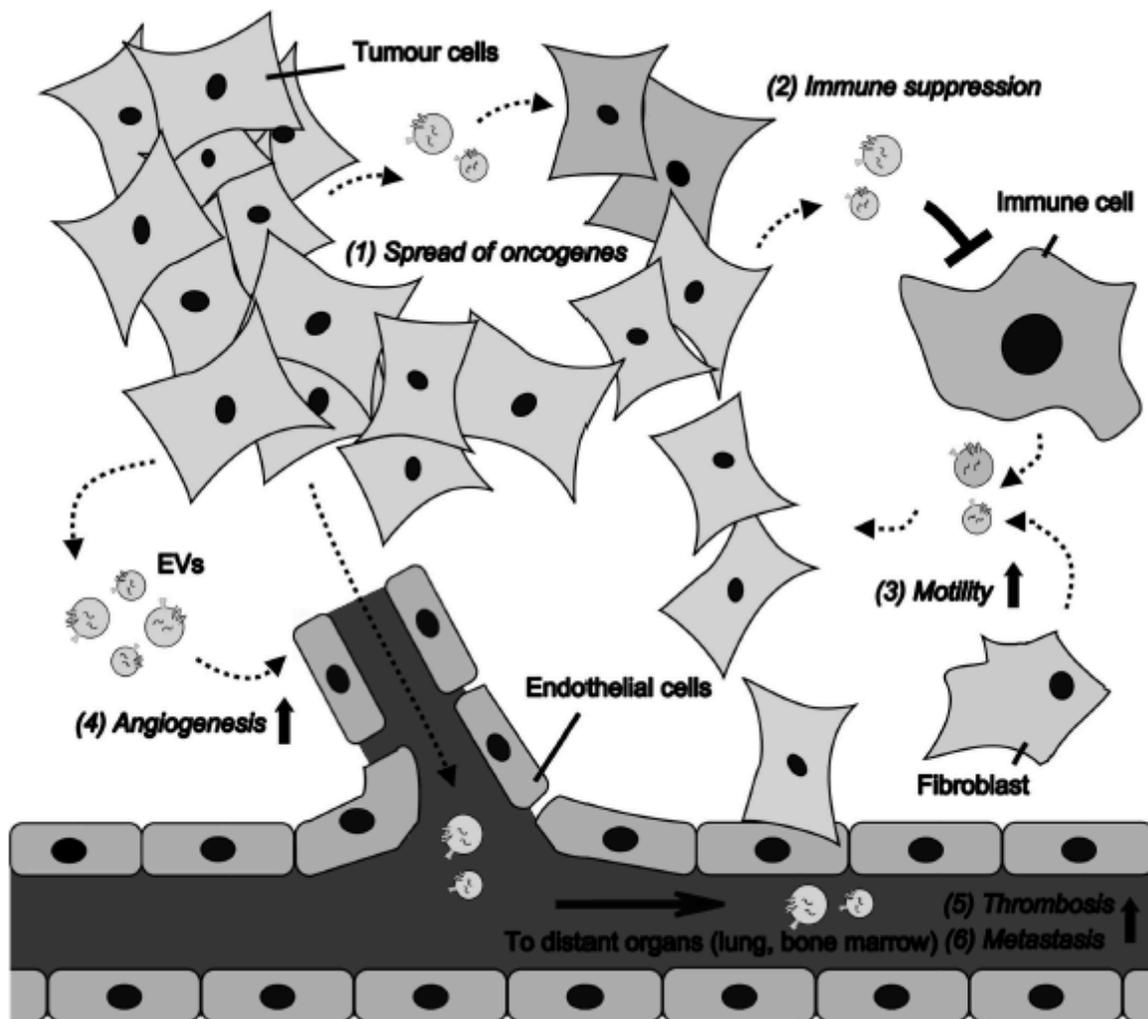
La tumorigénesis involucra un espectro muy amplio de cambios genéticos como la inactivación de genes supresores de tumores y la activación de proto-oncogenes, las

microvesículas también están implicadas en este proceso, ya que las células tumorales pueden transferir de manera horizontal las mutaciones a otras células haciéndolas potencialmente malignas. Un ejemplo claro de esto es el expuesto por Demory y colaboradores, quienes analizan como el KRAS mutado de células de cáncer de colon puede ser transferido y adoptado por otras células [15].

Interesantemente las microvesículas también desempeñan un papel importante en la angiogénesis, definida como la creación de nuevos vasos sanguíneos para permitir el crecimiento tumoral, en un excelente trabajo hecho por Al-Nedawi y colaboradores, se evidencia como las microvesículas de células de carcinoma escamoso, pueden transferir el oncogén EGFR a las células endoteliales, promoviendo la activación de las vías MAPK y AKT e incluso incrementando la expresión endógena del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) [16].

Incluso las microvesículas se han visto implicadas en procesos de resistencia a fármacos antineoplásicos, por ejemplo Shedden y colaboradores demostraron como las células tumorales pueden acumular doxorubicina en microvesículas para su posterior desecho [17], y Zhang y colaboradores demostraron un papel más activo de las microvesículas al transferir glicoproteína-P a células de cáncer de ovario sensibles al paclitaxel, volviéndolas cinco veces más resistentes a la acción del antineoplásico [18].

Finalmente, las microvesículas tumorales no son las únicas involucradas en la enfermedad, sino también las microvesículas asociadas a células del estroma, por ejemplo las microvesículas derivadas de fibroblastos pueden activar vías de señalización celular del tipo WNT en células de cáncer de mama, incrementando su motilidad y potencial metastásico [19], por lo que las células no tumorales también juegan un importante rol en la tumorigénesis, como se expondrá en la siguiente sección con el sistema hemostático y fibrinolítico.



Tomado de Vader P, Breakfield X, Wood M. Extracellular vesicles: Emerging targets for cancer therapy. Trends Mol Med. 2014; 20: 385–393.

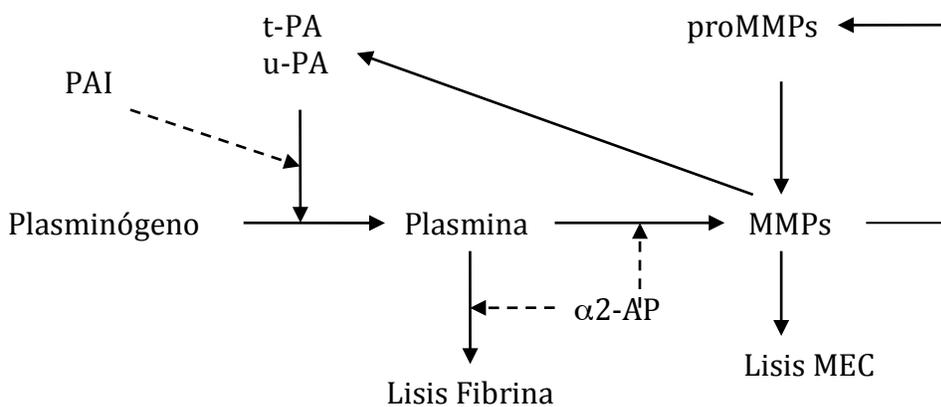
SISTEMA HEMOSTÁTICO Y FIBRINOLÍTICO EN CÁNCER DE MAMA

El sistema hemostático se encuentra dentro de los diferentes factores que intervienen en la progresión del cáncer de mama, ya que la relación entre el tumor y el sistema de hemostasia es reconocido como un regulador de la progresión tumoral [20]. Las plaquetas tiene un efecto directo en la progresión tumoral, ya que fomentan la supervivencia de las células tumorales en la sangre, la adhesión al endotelio, la extravasación al parénquima y finalmente el crecimiento de las células tumorales para formar metástasis [21].

Las células tumorales inducen directamente la agregación plaquetaria con su posterior activación [22]. Las plaquetas activadas liberan microvesículas plaquetarias que tienen el potencial para incrementar y promover la adhesión, proliferación e invasión de células de cáncer de mama a través de diferentes mecanismos, por lo que se propone desempeñan un papel fundamental en la tumorigénesis [23].

Por otro lado, las células tumorales liberan microvesículas que traen consigo factor tisular, principal iniciador de la coagulación al unirse con el Factor VII para generar Factor VIIa y a su vez Factor X. Estas microvesículas con factor tisular son el eslabón entre el cáncer y la trombosis, ya que su presencia aumenta al triple el riesgo de trombosis venosa e incluso cuando los pacientes con cáncer de páncreas se someten a una pancreatectomía se eliminan dichas microvesículas circulantes [24].

Al igual que el sistema hemostático, el sistema fibrinolítico se ha involucrado como participe en la fisiopatogenia de la progresión tumoral, a través de sus componentes: el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA), de su receptor (uPAR) y del inhibidor del activador del plasmigeno-1 (PAI-1). El u-PA es una proteína de 411 aminoácidos que puede catalizar la conversión de plasminógeno a plasmina. Por su parte el uPAR es una glicoproteína que se une al u-PA para regular su activación y así limitar la generación de plasmina, al unirse libera el receptor soluble del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (suPAR), este último se encuentra elevado en pacientes con estados inflamatorios y cáncer [25].

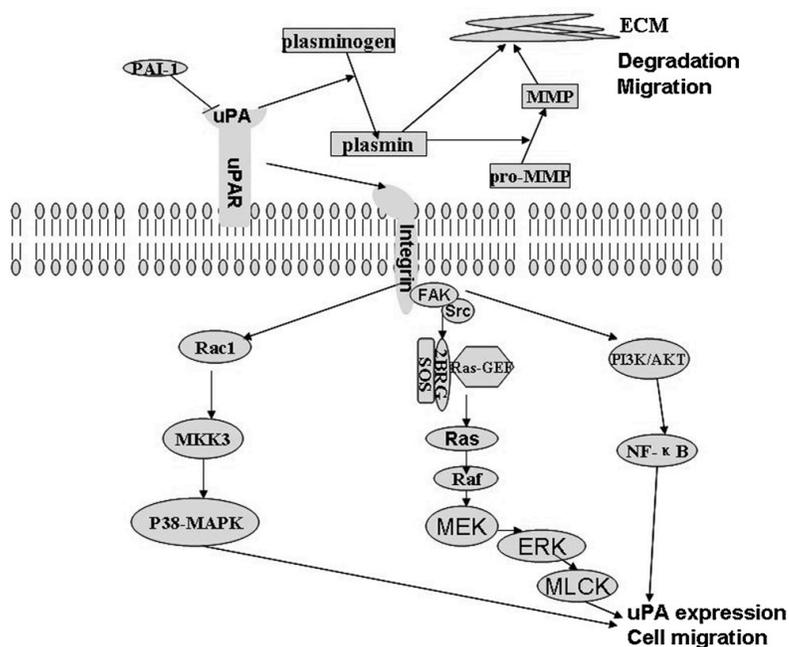


**PAI: Inhibidor del activador del plasminógeno, tPA: Activador del plasminógeno tipo tisular, u-PA: Activador del plasminógeno tipo uroquinasa, MMPs: Metaloproteasas, α2-AP: alfa-2-antiplasmina, MEC: matriz extracelular.

El u-PA a través de la transformación de plasminógeno genera plasmina, la cual puede degradar proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina, vitronectina y fibrina,

así como activar diferentes metaloproteasas [26], por lo que se ha demostrado que el sistema fibrinolítico a través de u-PA desencadena la cascada de proteólisis para facilitar la invasión de células tumorales a los vasos sanguíneos, que pasen al torrente circulatorio y que finalmente aniden y crezcan exitosamente en sitios distantes [27].

Adicionalmente, el u-PA a través de su unión con uPAR tiene efectos en la angiogénesis, supresión de apoptosis, proliferación e invasión celular, ya que el uPAR puede interactuar con integrinas, receptores ligados a proteínas G, tirosin quinazas y serino quinazas, por lo que es activador de cascadas de señalización intracelular como MAPK, Ras, MEK y PI3K/AKT [28,29].



Tomado de: Tang L, Han X. The urokinase plasminogen activator system in breast cancer invasion and metastasis. *Biomed Pharmacother.* 2013 Mar;67(2):179-82.

En cáncer de mama los factores pronósticos tradicionales incluyen la edad, el estado menopáusico, el tamaño, grado e histología tumoral así como la expresión de

receptores de estrógenos y progesterona aunado al Her2/neu así como la presencia de invasión a ganglios linfáticos. Sin embargo, recientemente se reconoce al u-PA y PAI-1 como los nuevos marcadores biológicos del cáncer de mama, ya que en las pacientes que presentan sobre-expresión de estas proteínas en tejido tumoral tienen un riesgo incrementado de recurrencia y una sobrevida reducida [30].

En pacientes con enfermedad limitada, el u-PA y PAI-1 pueden clasificar a las pacientes en enfermedad de bajo y alto riesgo. Aquellas con alto riesgo tienen una supervivencia libre de enfermedad disminuida [31,32], por lo que el incremento en los niveles de estas proteínas se considera indicador de la necesidad de quimioterapia adyuvante, mientras que aquellas pacientes con una baja expresión pueden prescindir de los efectos adversos de la quimioterapia aunado a los beneficios económicos [33].

Sin embargo, el factor pronóstico del sistema fibrinolítico en cáncer de mama solo corresponde a la medición directa de la sobreexpresión en tejido tumoral [34]. La evaluación funcional del sistema de fibrinólisis representa un desafío clínico, ya que a pesar de que la fibrinólisis se encuentra aumentada en el tejido tumoral, el u-PA y la plasmina liberados son inmediatamente neutralizados por sus inhibidores, alfa-2-antiplasmina y PAI-1, por lo que es prácticamente imposible detectar la actividad fibrinolítica en plasma de pacientes (sangre periférica).

Recientemente, se ha descrito la existencia de microvesículas con capacidad fibrinolítica, que transportan en su membrana t-PA o u-PA, con la posibilidad de generar

in-situ plasmina, por lo que las microvesículas con u-PA/uPAR pueden reconocer y activar el plasminógeno en otras superficies [35].

Se ha reconocido que las microvesículas que transportan al sistema u-PA/uPAR promueven la migración celular, angiogénesis, degradación de matriz extracelular y disminución de la adhesividad celular [36], por lo que las microvesículas podrían ser reconocidas como nuevas efectoras de fibrinólisis en pacientes con cáncer de mama, por lo que detectar y medir su actividad fibrinolítica podría generar nuevas formas de entender la fisiopatología de la fibrinólisis en cáncer de mama.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Existen microvesículas con actividad fibrinolítica en pacientes con cáncer de mama?
2. ¿Existe alguna relación entre las microvesículas con actividad fibrinolítica y el estadio clínico del paciente?
3. ¿Existe alguna diferencia entre las microvesículas con actividad fibrinolítica en pacientes sanas y en pacientes con cáncer de mama?

JUSTIFICACIÓN

Las microvesículas extracelulares son parte esencial en la comunicación intercelular en procesos fisiológicos y fisiopatológicos, especialmente en cáncer se reconocen como nuevos efectores de procesos de resistencia a fármacos, angiogénesis y metástasis, por lo que detectar su presencia así como sus diferentes acciones promueven el mejor entendimiento de la enfermedad.

Específicamente en pacientes con cáncer de mama, es importante reconocer y cuantificar la actividad fibrinolítica que promueven las microvesículas extracelulares para entender la fisiopatología de la progresión tumoral y dilucidar nuevas opciones terapéuticas que incidan sobre dichos procesos fisiopatológicos

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS ALTERNA

- Existen microvesículas fibrinolíticas en pacientes con cáncer de mama.
- Existe una mayor actividad fibrinolítica en pacientes con cáncer de mama comparadas con mujeres sanas.
- Existe una diferencia entre la actividad fibrinolíticas de las microvesículas dependiendo del estadio clínico del paciente.

HIPÓTESIS NULA

- No existen microvesículas fibrinolíticas en pacientes con cáncer de mama.
- No existe diferencia entre la actividad fibrinolítica de las microvesículas en pacientes con cáncer de mama y mujeres sanas.
- No existe diferencia en la actividad fibrinolítica de las microvesículas dependiendo el estadio clínico del paciente.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la presencia de microvesículas con actividad fibrinolítica en pacientes con cáncer de mama y relacionar su actividad con el estadio clínico del paciente.
- Comparar la actividad fibrinolítica de las microvesículas entre pacientes con cáncer de mama y mujeres sanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio observacional de corte transversal, comparativo y analítico.

POBLACIÓN

Pacientes con cáncer de mama en remisión, con enfermedad localmente avanzada y enfermedad metastásica admitidos al Centro Medico ABC.

Mujeres sanas donadores del banco de sangre.

Incluimos 13 pacientes con cáncer de mama y 13 mujeres sanas donadoras del banco de sangre.

Dentro de las 13 pacientes con cáncer de mama tuvimos 4 pacientes en remisión del cáncer de mama, 3 pacientes con enfermedad localmente avanzada y 6 pacientes con enfermedad metastásica.

CRITERIOS DE INCLUSION

- Pacientes con cáncer de mama en remisión, con enfermedad localmente avanzada y enfermedad metastásica admitidos al Centro Medico ABC.
- Mujeres sanas donadores del banco de sangre.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Infección grave
- Insuficiencia renal

- Cardiopatía isquémica aguda
- Enfermedad reumatológica
- Otra neoplasia activa sincrónica al cáncer de mama
- Trombosis activa en cualquier territorio
- Tratamiento anticoagulante formal
- Tratamiento antifibrinolítico

VARIABLES

Independiente: Estado actual del cáncer de mama o pacientes sana.

Dependiente: Proteínas de microvesículas, concentración de u-PA en microvesículas.

Cualitativas nominales: Sexo, histología, inmunohistoquímica, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial sistémica, dislipidemia, tabaquismo actual y previo, tipo de quimioterapia.

Cuantitativas continuas: Edad, leucocitos, hemoglobina, plaquetas, glucosa y creatinina.

DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES

Estado actual del cáncer de mama, se divide en:

- Remisión: paciente que tuvo el diagnóstico de cáncer de mama, que recibió tratamiento y actualmente se encuentra sin evidencia de cáncer de mama.

- Enfermedad localmente avanzada: paciente con diagnóstico de cáncer de mama que se encuentra en estadio III de la enfermedad ya sea con ganglios mamaros

internos o axilares fijos, extensión directa a la pared torácica o piel o con ganglios infraclaviculares o supraclaviculares.

- Enfermedad metastásica: paciente con diagnóstico de cáncer de mama que debuto con estadio IV o progreso con involucro de metástasis a distancia viscerales u óseas.

Pacientes sanas: pacientes sanas sin co-morbilidades que acudan al banco de sangre.

CALCULO DE TAMAÑO DE MUESTRA

Ya que nuestro estudio es pionero en este campo, la concentración de microvesículas en la población mexicana tanto en individuos sanos como en enfermos se desconoce.

No existe un estudio previo para calcular el tamaño de la muestra necesario para determinar diferencias entre los grupos, sin embargo se incluyeron por lo menos 3 pacientes en cada grupo.

MEDICIONES DE LABORATORIO

Se analizaran muestras biológicas (sangre) de pacientes de género femenino con cáncer de mama localmente avanzado y metastásico admitidos al Centro Medico ABC, asi como donadoras sanas del banco de sangre, recabando la información clínica a traves del expediente clínico.

PROCEDIMIENTO DE MUESTRAS

El manejo de las microvesículas, se ha dividido en cuatro apartados para poder facilitar el proceso:

-Pre-analítico

- 1) Obtención y procesamiento inicial del sustrato (sangre)

-Analítico

- 2) Extracción de Microvesículas
- 3) Cuantificación de las mismas
- 4) Identificar su potencial fibrinolítico

1) OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO INICIAL DEL SUSTRATO (SANGRE)

1. Invitar a participar en el proyecto, al paciente que sea candidato a entrar al protocolo.
2. Solicitar la firma del consentimiento informado.
3. Identificar y transcribir las variables clínicas relevantes del expediente clínico del paciente, en la hoja de recolección de datos.
4. En caso de paciente externo: dar una orden de laboratorio que incluya la toma de muestra para entrar a protocolo, la cual presentará en laboratorio.
5. En caso de paciente interno: solicitar la toma de muestra de laboratorio con sus laboratorios de rutina incluyendo una muestra extra para protocolo.
6. El flebotomista tomará la muestra de sangre venosa periférica, depositándola en 1 tubo de Citrato de Sodio al 3.2% (TAPA AZUL).

7. Homogenizar la muestra.
8. Centrifugar la muestra en el equipo ALLEGRA X-22R a 3750RPM x 15 minutos.
9. Extraer el plasma y distribuirlo en tubos de 5ml.
10. Centrifugar de nuevo el tubo de plasma en el equipo ALLEGRA X-22R a 3750RPM por 5 minutos.
11. Separar el plasma obtenido con pipeta de 500 microlitros, dejando el anillo divisor de glóbulos rojos (aproximadamente 100 microlitros del fondo), en un solo tubo de plástico mayor y mezclar.
12. Etiquetar muestras y colocar en congelador.
13. Después congelar a -76°C en máximo 24 horas siguientes.

2) EXTRACCIÓN DE MICROVESÍCULAS

El proceso de extracción de microvesículas en el Laboratorio de Trombosis y Fibrinólisis.

1. Descongelar las muestras. Las muestras se encuentran a una temperatura de -76°C , por lo que, deben pasar a una temperatura mayor gradualmente. Este proceso dura aproximadamente 1:30hr.
2. Rotular tubos de policarbonato para ultracentrifuga. Marcar 2 veces.
3. Una vez que se encuentran las muestras a temperatura ambiente, tomar y dispensar 500 microlitros (10 veces) para homogenizar la muestra.
4. Dispensar en los tubos de policarbonato previamente rotulados.
5. Pesar muestras en balanza analítica 62ADAPW124 (máximo 120g d=0.0001) utilizando trozo de gradilla. Se debe formar pares (peso y contrapeso) para

- colocar en el rotor de la ultracentrífuga. Para ajustar pares es posible retirar y desechar muestra con pipetas de transferencia.
6. Colocar tubos con rotor azul.
 7. Iniciar el primer ciclo de la ultracentrífuga.
 - Los ciclos de ultracentrífuga se programan de la siguiente manera:
 - Velocidad 30,000 RPM
 - Tiempo 90 minutos
 - Temperatura 4°C
 8. Rotular 4 tubos de 0.6 ml para cada muestra. Cada tubo contendrá una alícuota de 25 mililitros.
 9. Retirar tubos de ultracentrífuga
 10. Retirar 450 microlitros con pipeta de 100 microlitros
 11. Devolver los 450 microlitros de plasma al tubo inicial de 1.5 ml
 12. Agregar 450 microlitros de solución buffer con pipeta de 1000 microlitros.
 13. Pesar muestra y formar pares en balanza analítica
 14. Iniciar segundo ciclo de ultracentrífuga con mismos parámetros
 15. Retirar tubos de la ultracentrífuga
 16. Retirar 450 microlitros de solución buffer y desechar.
 17. Agregar 450 microlitros de solución buffer
 18. Pesar muestras y formar pares en balanza analítica.
 19. Iniciar tercer ciclo de ultracentrífuga con parámetros establecidos al inicio.
 20. Retirar tubos de la ultracentrífuga
 21. Retirar 475 microlitros de solución buffer y desechar
 22. Mezclar el volumen restante y medirlo. Aproximadamente serán 25 microlitros

23. Dispensar el volumen medido en tubo de 0.6 ml, previamente rotulado. (tubo marcado con *)
24. Agregar 80 microlitros de solución buffer para lavar paredes del tubo de policarbonato
25. Tomar 75 microlitros de la solución biffer con la que se lavaron las paredes y dispensar en tubo marcado con el *. Se completa una muestra de 100 microlitros.
26. Mezclar la muestra y dispensar 25 microlitros en cada tubo de 0.6 ml (4 alícuotas de 25 microlitros cada una).

3) CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS

1. Separar las muestras marcados con *
2. Encender aparato “Baño María”, agregar agua hasta la primera línea y programar a 37°C
3. Agregar Nitrógeno líquido a contenedor cilíndrico y depositarlo en recipiente cuadrado de UniceL.
4. Colocar las muestras en una gradilla de UniceL tener presente el orden (se pueden borrar los números debido a la sumersión en Nitrógeno Líquido)
5. Iniciar 5 ciclo de cambio de Temperatura simultánea. Introducir muestras en “Baño María” a 37°C durante 1 minuto y posteriormente en Nitrógeno Líquido durante 1 minuto (Repetir 5 veces)
6. Acudir al Laboratorio del Dr. Fragoso, solicitar permiso para usar Programa NanoDrop

7. Abrir Programa NanoDrop, seleccionar icono "Protein A280"
8. Dispensar con pipeta 2 microlitros de solución inyectable para limpiar equipo
9. Dispensar 2 microlitros de solución inyectable y seleccionar "Blank"
10. Seleccionar icono "Record" para que las determinaciones siguientes queden registradas.
11. Dispensar 2 microlitros de albumina y seleccionar "Blank" (Concentraciones de albumina 100mg/dl)
12. Dispensar 2 microlitros de buffer y seleccionar "Blank"
13. Iniciar la cuantificación de muestras, no olvidar colocar cada muestra previamente en "Vortex" para mezclar adecuadamente el sustrato.
14. Escribir en el programa el numero de muestra a determinar
15. Dispensar 2 microlitros de la muestra a determinar y seleccionar F1 para iniciar determinación. Posterior a cada determinación limpiar aparato. Repetir le mismo procedimiento con cada muestra.
16. Seleccionar la opción de mostrar resultados, guardar en un archivo Microsoft Excel, eliminar columnas de fecha, hora y otras agregadas por el programa sin utilidad, e imprimir datos obtenidos.

4) MEDICIÓN DE ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA

Se determinó la presencia de los activador del plaminogeno u-PA (tipo urocinasa) por tecnica de zimografia, posteriormente se comprobara la generacion de plasmina.

En una placa de 96 pozos se deposita por duplicado para cada muestra en 50 μ l, 2×10^5 microvesículas en suspensión en PBS suplementado con albúmina bovina al 0.8%, 1

mM de plasminógeno, 0.75mM del sustrato cromogénico selectivo para la plasmina (metil-malonil)-hidroxipropil arginina, p-nitroanilina (CBS S0065, Stago, Francia).

Como blanco se emplea 50 μ l del amortiguador del último lavado en la obtención de las microvesículas. El resultado se obtiene extrapolando el resultado que se obtiene en una curva patrón que se construye con los resultados de concentraciones crecientes de plasminógeno (0 a 5 mM) y una cantidad fija de microvesículas (2×10^5). La cinética se sigue durante 9 h en un equipo EON a 37°C, midiendo el cambio de absorbancia a 405 nM por la producción de p-nitroanilina que genera el cromógeno al liberarse del péptido por acción de la plasmina.

ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó estadística descriptiva usando promedio \pm desviación estándar para variables cuantitativas, y frecuencias y porcentaje para variables cualitativas.

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para valorar la distribución de las variables cuantitativas.

Se calcula el Coeficiente de correlación de Pearson para medir la asociación entre variables cuantitativas.

Se usó la prueba de T de Student para valorar diferencia entre variables cuantitativas dentro de dos grupos.

Se utilizó el análisis de ANOVA de un factor para determinar diferencias entre cantidad de microvesículas y capacidad fibrinolítica (u-PA de microvesículas) dependiendo del estado del cáncer de mama en las pacientes.

Posteriormente, se realizó una curva ROC (característica operativa del receptor) para realizar una representación gráfica de la razón de verdaderos positivos frente a la razón de falsos positivos para determinar un umbral de discriminación, que nos ayudo a decidir a partir de que concentración de u-PA en microvesículas extracelulares una pacientes tiene mayor probabilidad de tener enfermedad metastásica. Buscando la mayor sensibilidad y especificidad.

Todos los datos de probabilidad fueron pruebas de dos colas, los valores menores de 0.05 fueron considerados como estadísticamente significativos. Todos los análisis se realizaron con SPSS 15.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL, USA).

ASPECTOS ÉTICOS

El proyecto fue aprobado por el Comité Científico del Centro Médico ABC así como el Comité de Bioética del Centro Médico ABC. El proyecto cumple con la Ley General de Salud, la Declaración de Helsinki, la Declaración Universal de Derechos Humanos, el Reglamento de la Ley General en Salud en materia de la Investigación para la Salud.

RESULTADOS

Incluimos 13 pacientes con cáncer de mama y 13 mujeres sanas donadoras del banco de sangre.

Dentro de las 13 pacientes con cáncer de mama tuvimos 4 pacientes en remisión del cáncer de mama, 3 pacientes con enfermedad localmente avanzada y 6 pacientes con enfermedad metastásica.

Las variables cuantitativas se comportaron conforme a la curva de normalidad, por lo que fueron evaluadas por pruebas paramétricas.

No existió diferencia significativa entre la edad de controles sanas y pacientes con cáncer de mama, siendo la media de edad 55.4 ± 4.05 y 53 ± 9.33 años respectivamente.

El promedio de edad presento diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de pacientes y controles sanos ($p=0.001$), siendo mas añosas las pacientes en remisión de la enfermedad, seguidas por los controles sanos, las pacientes con enfermedad metastásica y finalmente las pacientes con enfermedad localmente avanzada.

****Ver gráfico 1.**

En la tabla 2 se muestran las características clínicas y de laboratorio obtenidas de las pacientes y controles sanos.

****Ver tabla 1.**

Dentro de las pacientes incluidas en el grupo con cáncer de mama, la histología más frecuente fue carcinoma ductal infiltrante en 11 pacientes y solo en 2 tipo lobulillar, de las cuales una estaba en remisión y otra presentaba enfermedad metastásica.

****Ver gráfico 2.**

Las pacientes no presentaron diferencias significativa entre el estado de la enfermedad y los marcadores de inmunohistoquímica (estrógeno y/o progesterona, HER2/neu o triple negativo).

****Ver tabla 2**

Todas las pacientes que tenían enfermedad activa, ya sea enfermedad localmente avanzada o metastásica, se encontraban recibiendo quimioterapia. En la tabla 2 se expone el tipo de quimioterapia según el tipo de paciente.

****Ver tabla 3.**

De las 6 pacientes con enfermedad metastásica, 2 presentaban metástasis en huesos, 2 metástasis viscerales y 2 tanto en huesos como en vísceras (pulmón e hígado).

RESULTADOS DE MICROVESÍCULAS CELULARES

El promedio de proteínas de microvesículas en pacientes incluidas dentro del grupo de cáncer de mama fue de 0.1682 ± 0.12 comparado con 0.3305 ± 0.30 del grupo control, aunque las mujeres sanas presentaron mayor cantidad de proteína de microvesículas, la diferencia no fue significativa.

El promedio de concentración de u-PA de microvesículas fue de 0.0162 ± 0.011 UI/ml en controles y 0.033 ± 0.028 UI/ml en pacientes en el grupo de cáncer de mama, dicha diferencia tampoco fue significativa.

Al dividir las pacientes con cáncer de mama en subgrupos dependiendo del estado de la enfermedad, no se encontró diferencia entre la cantidad de proteínas de microvesículas, pero si una diferencia significativa de la concentración de u-PA de microvesículas entre los diferentes grupos ($p=0.002$). Siendo mayor en pacientes con enfermedad metastásica 0.53 ± 0.304 UI/ml comparada con pacientes con enfermedad localmente avanzada 0.023 ± 0.005 UI/ml, pacientes en remisión del cáncer de mama 0.0102 ± 0.01414 UI/ml y mujeres sanas 0.0162 ± 0.01182 UI/ml.

****Ver tabla 4.**

****Ver gráfico 3.**

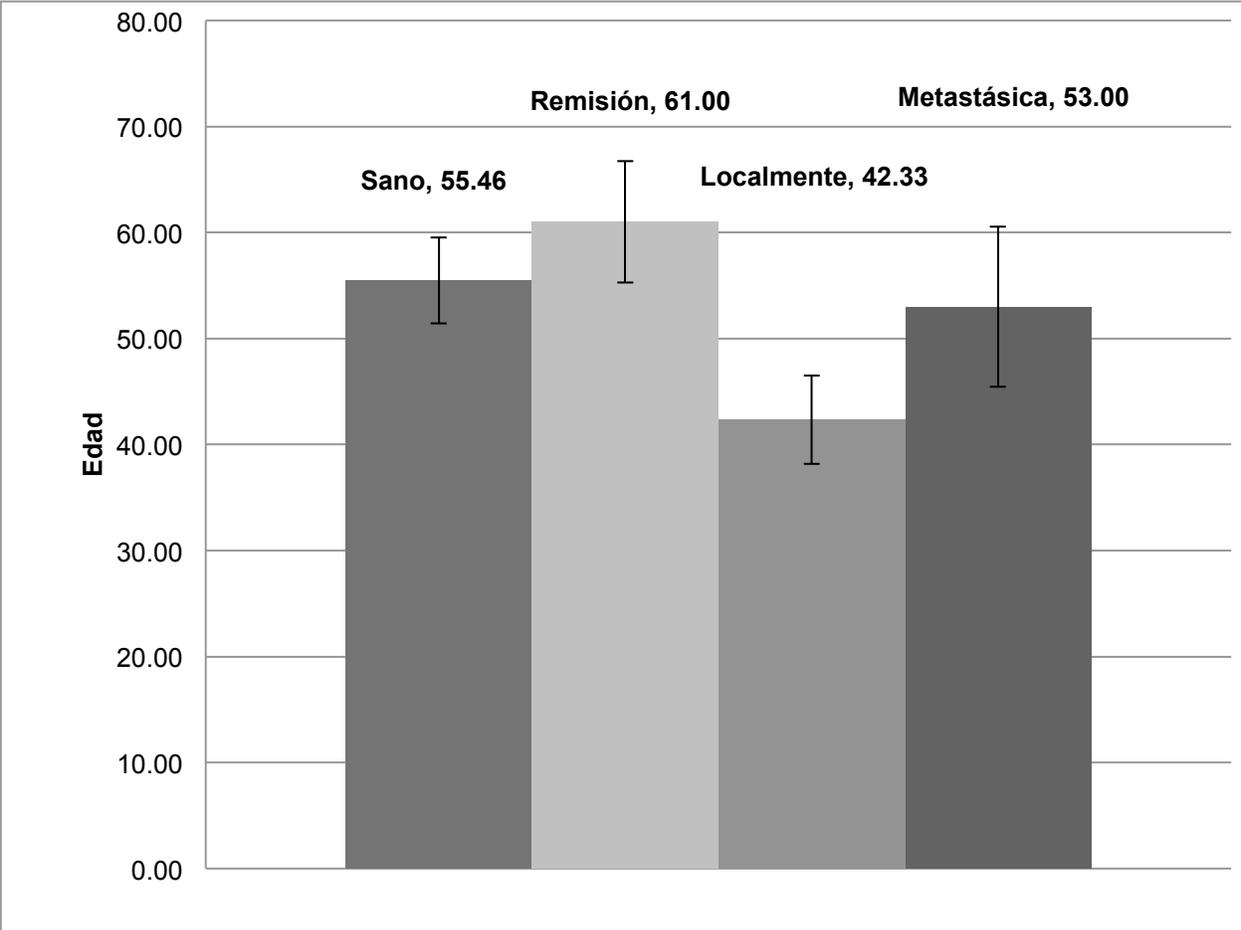
Encontramos una correlación negativa entre la cuenta plaquetaria en sangre periférica y la concentración de u-PA de microvesículas extracelulares ($r= -0.457$, $p=0.025$).

****Ver gráfico 4.**

No encontramos diferencias significativas entre la cantidad de proteínas de microvesículas y la concentración de u-PA de microvesículas dependiendo de las variables de diabetes mellitus, hipertensión, dislipidemia y tabaquismo previo o actual.

A través de una curva COR para determinar un umbral de corte de u-PA en microvesículas como discriminador de enfermedad metastásica en nuestra población, se selecciono un umbral de u-PA de 0.0267 UI/ml, con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 75% para determinar enfermedad metastásica. Se obtuvo un área bajo la curva de 0.958.

Gráfico 1. Edad dependiendo del tipo de paciente.



*Se expone la media de la edad con desviación estándar.

Tabla 1. Características clínicas y bioquímicas de los pacientes

Variable	Sanas (13)	Remisión (3)	Localmente avanzada (4)	Metastásica (6)
Edad (DE)	55.4 (4)	61 (5.7)	42.3 (4.16)	53 (7.5)
Diabetes, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)
Hipertensión, n (%)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	1 (16.7)
Dislipidemia, n (%)	1 (7.7)	1 (25)	1 (33.3)	1 (16.7)
Tabaquismo Previo, n (%)	2 (15.1)	0 (0)	2 (66.7)	1 (16.7)
Tabaquismo actual, n (%)	3 (23)	0 (0)	0 (0)	2 (33.3)
Leucocitos (DE)	6.32 (3.3)	7.36 (2.9)	6.06 (1.32)	6.42 (2.13)
Hemoglobina (DE)	14.5 (1.06)	14.6 (0.45)	12.96 (1.4)	13.74 (1.26)
Plaquetas (DE)	264,769 (55,050)	232,666 (43,143)	305,333 (88,296)	212,400 (63,766)
Creatinina (DE)	0.72 (0.23)	0.87 (0.16)	0.66 (0.04)	0.68 (0.17)
Glucosa (DE)	94.9 (9.3)	103.3 (4.72)	89.5 (12.02)	101.7 (22.42)

n: número, DE: desviación estándar.

Gráfico 2. Histología dependiendo del tipo de paciente.

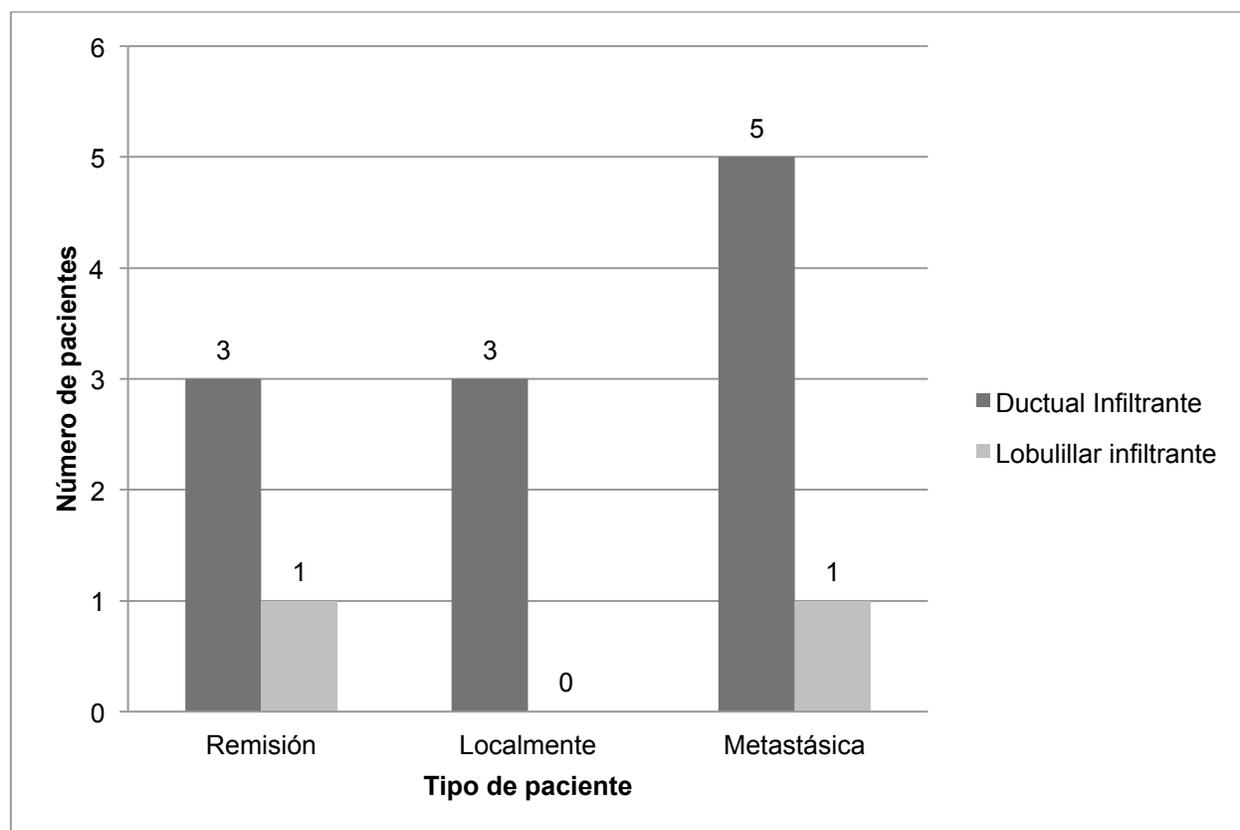


Tabla 2. Marcadores de inmunohistoquímica

		Marcadores			Total
		E/P +	HER2/neu +	Triple negativo	
Tipo de paciente	Remisión	3	1	0	4
	Localmente	1	2	0	3
	Metastásica	3	1	2	6
Total		7	4	2	13

**E/P: Estrógeno y/o progesterona, triple negativo: no expone ningún marcador por inmunohistoquímica.

Tabla 3. Esquema de quimioterapia dependiendo el tipo de paciente.

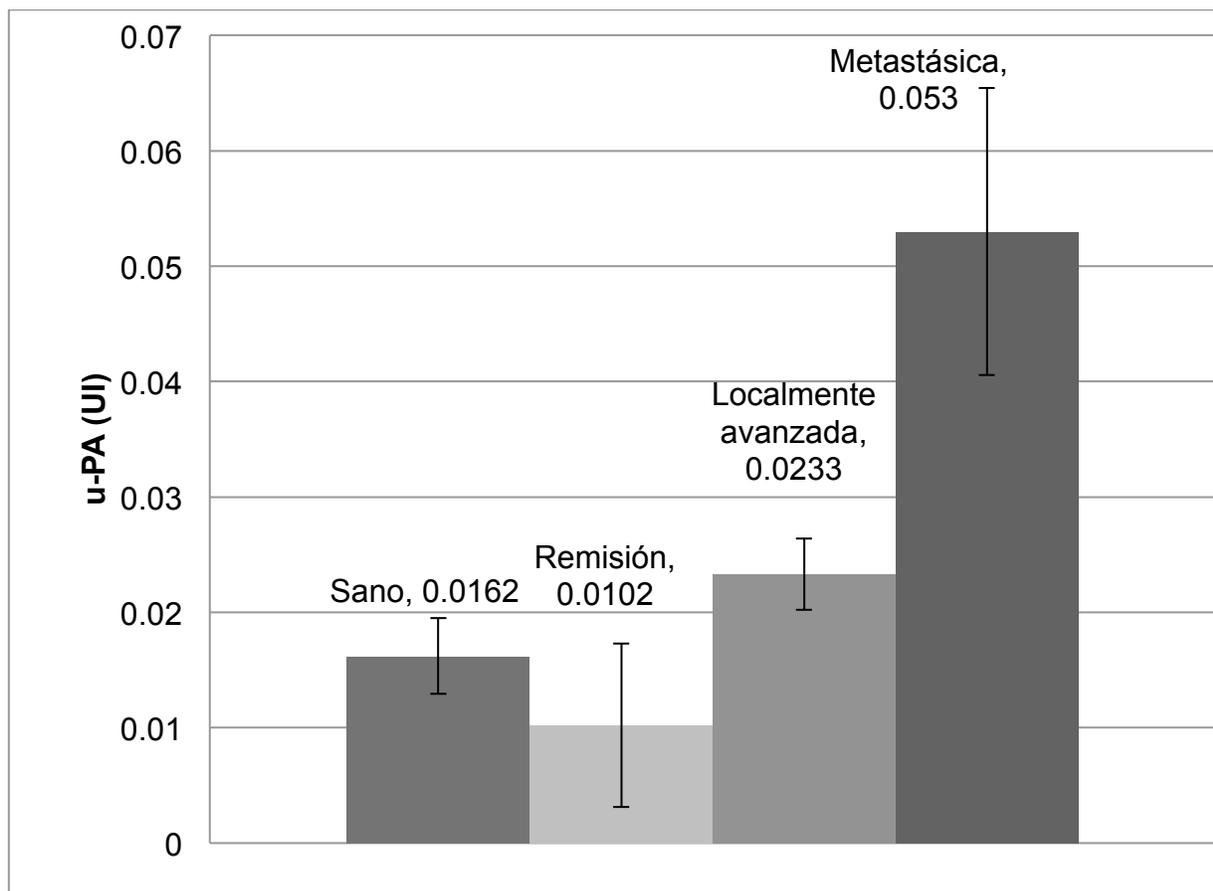
Número	Tipo de paciente	Quimioterapia
1	Localmente	Ciclofosfamida + Docetaxel
2	Localmente	Ciclofosfamida + Doxorubicina
3	Localmente	Docetaxel + Trastuzumab
1	Metastásica	Docetaxel + Capecitabina
2	Metastásica	Capecitabina
3	Metastásica	Gemcitabina + Paclitaxel
4	Metastásica	Docetaxel
5	Metastásica	Gemcitabina + Carboplatino
6	Metastásica	Docetaxel

Tabla 4. Promedio de proteínas de microvesículas y concentración de u-PA de microvesículas dependiendo el tipo de paciente.

Tipo	Proteínas de microvesículas	p	u-PA de microvesículas	p
Sanas	0.33 (0.304)		0.0162 (0.01182)	
Pacientes en remisión	0.11 (0.017)		0.0102 (0.01414)	
Pacientes con enfermedad localmente avanzada	0.29 (0.211)	NS	0.0233 (0.00533)	0.002
Pacientes con enfermedad metastásica.	0.14 (0.034)		0.53 (0.03046)	

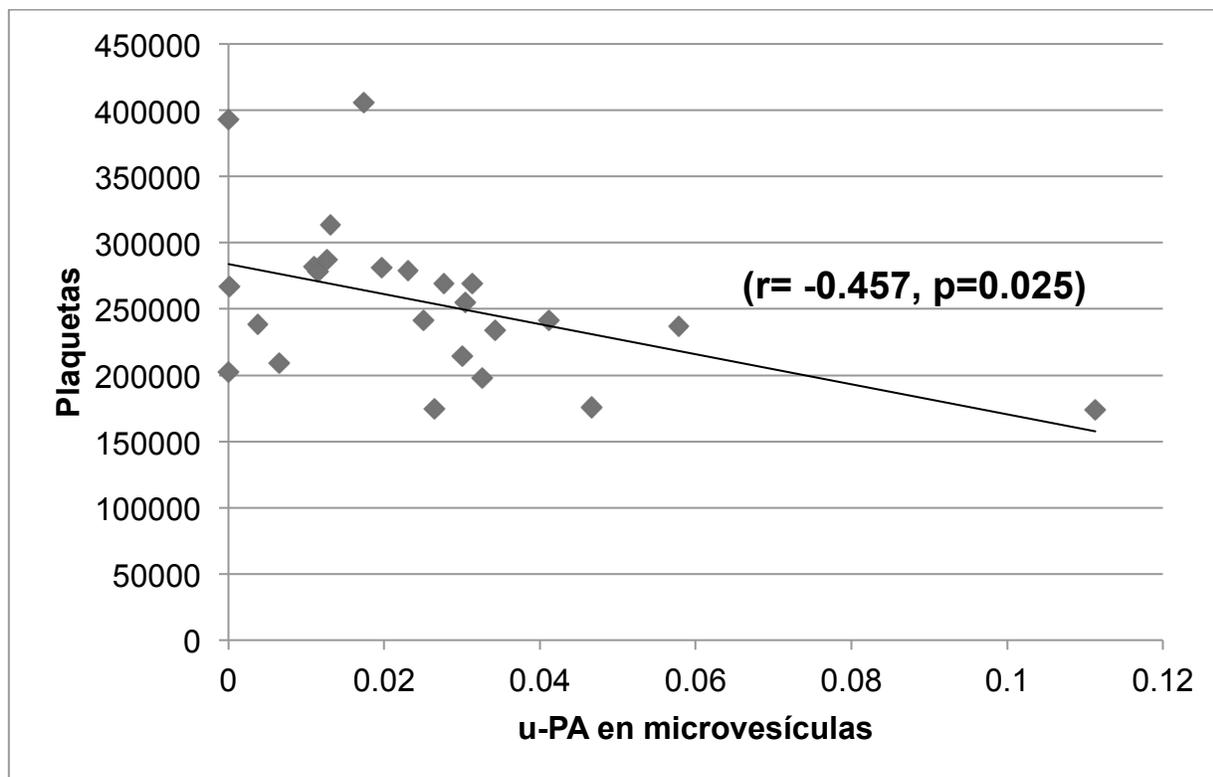
**Los valores se muestran en promedio y desviación estándar. Los valores de u-PA se expresan en UI/ml. La p corresponde a la significancia estadística obtenida por la prueba de ANOVA.

Gráfico 3. Concentración de u-PA (UI/ml) presente en microvesículas de pacientes dependiendo del estado de la enfermedad.



Los resultados se expresan en promedio \pm desviación estándar.

Gráfico 4. Correlación entre la concentración de u-PA (UI/ml) en microvesículas y la cuenta plaquetaria en sangre periférica.



Se incluyen todas las pacientes del estudio.

DISCUSIÓN

Nuestro estudio no encontró una diferencia entre la cantidad de microvesículas dependiendo del estadio de cáncer de mama e incluso haciendo la comparación con pacientes sanas. La concentración de proteínas de microvesículas refleja la cantidad de microvesículas presentes en el plasma sanguíneo, independientemente del origen de estas.

Nuestro hallazgo es contrario a lo descrito por Galindo-Hernández y colaboradores [37], donde encuentran un aumento de la concentración de microvesículas en pacientes con cáncer de mama comparándolas con pacientes sanas, siendo más del doble la concentración en pacientes con cáncer de mama. Sin embargo, este estudio fue hecho en pacientes con cáncer de mama sin recibir tratamiento, mientras que nuestras pacientes estaban bajo tratamiento quimioterapéutico, factor que podría alterar la concentración de microvesículas [38, 39].

Nuestro estudio fue capaz de encontrar un incremento en la concentración de u-PA en las microvesículas de pacientes con cáncer de mama, este incremento depende del estado de la enfermedad, siendo mucho mayor en pacientes con cáncer de mama metastásico comparadas con pacientes con cáncer de mama localmente avanzado y pacientes en remisión.

La fibrinolisis tiene un papel importante en la progresión del cáncer de mama, a partir de evidencia previa, los dímeros D conocidos como un marcador final de la fibrinolisis,

pueden estar aumentados en etapas avanzadas del cáncer de mama, aunque este es un marcador muy inespecífico, se puede relacionar al volumen tumoral, a la tasa de progresión y la supervivencia de pacientes con cáncer de mama metastásico [40].

La correlación negativa entre la cuenta plaquetaria y la cantidad de u-PA en microvesículas circulantes podría ser reflejo del avance de la enfermedad, ya que en pacientes con cáncer de mama metastásica la cuenta plaquetaria tiende a bajar con respecto a etapas iniciales de la enfermedad [41] y el u-PA se relaciona con mayor progresión e invasión tumoral.

La fibrinolisis toma un papel clave en la progresión tumoral ya que las células de cáncer de mama pueden expresar u-PA, propiciando una mayor generación de plasmina, es por ello que las pacientes con cáncer de mama que tienen una expresión incrementada de u-PA directamente en el tejido tumoral, tienden a tener un peor pronóstico [31]. La expresión incrementada de u-PA y su receptor esta propiciada por factores de crecimiento, citocinas y oncogenes como v-Src y v-Ras [42]. El sistema fibrinolítico a través de u-PA promueve la metástasis tumoral por diferentes mecanismos incluidos la degradación de matriz extracelular y la activación de metaloproteasas [43]. Sin embargo, también promueve la activación de vías de señalización intracelular como Ras-Raf-MEK-ERK, promoviendo el aumento de la capacidad invasiva de las células tumorales [44,45].

Aunque el valor pronóstico de u-PA es atribuible a su medición *in-situ*, existen algunos reportes que demuestran un incremento sérico del receptor soluble de u-PA en

pacientes con cáncer de mama, e incluso ven una correlación positiva dependiendo del estadio de la enfermedad, por lo que podría utilizarse como un biomarcador diagnóstico [46,47].

Recientemente se ha dilucidado que las microvesículas circulantes en el plasma sanguíneo, juegan un papel importante en la fibrinólisis, ya que su membrana acarrean activadores del plasminógeno y al interactuar con otra membrana que tenga plasminógeno, fibrina o matriz extracelular, se produce un proceso de fibrinólisis, por lo que ahora se reconocen como nuevos efectores de la fibrinólisis [48].

Esto último toma relevancia en el estudio de Angelucci y colaboradores que fueron capaces de demostrar como una línea celular de cáncer de próstata agresivo puede liberar microvesículas con u-PA, y que estas microvesículas pueden acondicionar otras células con menor agresividad, haciéndolas altamente adhesivas e invasivas [49], situación que podría extrapolarse a nuestros resultados, ya que nuestras pacientes con metástasis tenían una concentración mayor de u-PA en microvesículas circulantes, por lo que abre la posibilidad a detectar dicha actividad fibrinolítica directamente con el potencial de ser diagnóstico y tener un valor pronóstico en la evolución metastásica [50].

Se debe hacer énfasis que nuestros resultados cobran relevancia debido a que a pesar de la amplia evidencia existente del papel de las microvesículas en cáncer, la mayoría de datos proviene de experimentos *in-vitro*, que no siempre correlacionan con la cuestión fisiopatológica, ya que la concentración de microvesículas en estos experimentos es mucho mayor que la encontrada *in-vivo* [11], por lo que nuestro estudio

es el primero en demostrar que las pacientes con cáncer de mama metastásico tienen un incremento de la concentración de u-PA en microvesículas circulantes, abriendo nuevas posibilidades para blancos terapéuticos.

Es importante señalar que la fibrinólisis producto de las microvesículas celulares se puede inhibir con amiloride o anticuerpos monoclonales dirigidos contra u-PA [36]. El amiloride a parte de su mecanismo ahorrador de potasio también es un inhibidor directo y selectivo de u-PA, por lo que Ding y colaboradores demostraron que en cultivos celulares de cáncer gástrico, el bloqueo farmacológico de u-PA por amiloride, significativamente inhibe la adhesión, migración e invasión de las células tumorales, e incluso en modelos murinos comprueban que puede inhibir el crecimiento tumoral y prologar la supervivencia de ratones con cáncer [51].

CONCLUSIONES

En conclusión, nuestro estudio demuestra que existe un incremento de u-PA en las microvesículas circulantes de pacientes con cáncer de mama metastásico. El incremento es significativo comparado con mujeres sanas así como pacientes con cáncer de mama localmente avanzado o inclusive en remisión de la enfermedad.

Nuestros resultados podrían indicar que las microvesículas circulantes con actividad fibrinolítica están involucradas en el proceso de proteólisis y formación de metástasis, siendo las efectoras directas de dicho proceso en la evolución del cáncer de mama.

REFERENCIAS

- 1 Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2011; 378: 1461–84.
- 1 Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2011; 378: 1461–84.
- 2 Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. Breast cancer in Mexico: a pressing priority. *Reprod Health Matters* 2008; 16: 113–23.
- 3 Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006; 24: 2137-50.
- 4 McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 2000; 321: 624–28.
- 5 Tavassoli FA, Devilee P, eds. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital tract. IARC Press: Lyon, 2003
- 6 El Andaloussi S, et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2013; 12:347–357.
- 7 van der Pol E, et al. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*. 2012; 64:676–705

-
- 8 Goubran HA, Burnouf T, Stakiw J, Seghatchian J. Platelet microparticle: a sensitive physiological "fine tuning" balancing factor in health and disease. *Transfus Apher Sci.* 2015 Feb;52(1):12-8
- 9 Kosaka N, et al. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem.* 2010; 285:17442–17452
- 10 Freyssinet JM, Dignat-George F. More on: Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2005;3:613 14.
- 11 Vader P, Breakfield X, Wood M. Extracellular vesicles: Emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol Med.* 2014 July ; 20(7): 385–393
- 12 Yang M1, Chen J, Su F, Yu B, Su F, Lin L, Liu Y, Huang JD, Song E. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol Cancer.* 2011 Sep 22;10:117.
- 13 Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, Squarcina P, Accornero P, Lozupone F, Lugini L, Stringaro A, Molinari A, Arancia G, Gentile M, Parmiani G, Fais S. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med.* 2002 May 20;195(10):1303-16
- 14 Szajnik M1, Czystowska M, Szczepanski MJ, Mandapathil M, Whiteside TL. Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PLoS One.* 2010 Jul 22;5(7):e11469
- 15 Demory Beckler M. Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Mol Cell Proteomics* 2013; 12:343-355.

-
- 16 Al-Nedawi K. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:3794-3799.
- 17 Shedden K, Xie XT, Chandaroy P, Chang YT, Rosania GR. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res.* 2003 Aug 1;63(15):4331-7.
- 18 Zhang FF, Zhu YF, Zhao QN, Yang DT, Dong YP, Jiang L, Xing WX, Li XY, Xing H, Shi M, Chen Y, Bruce IC, Jin J, Ma X. Microvesicles mediate transfer of P-glycoprotein to paclitaxel-sensitive A2780 human ovarian cancer cells, conferring paclitaxel-resistance. *Eur J Pharmacol.* 2014 Sep 5;738:83-90.
- 19 Luga V, Zhang L, Vitoria-Petit AM, Ogunjimi AA, Inanlou MR, Chiu E, Buchanan M, Hosein AN, Basik M, Wrana JL. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell.* 2012 Dec 21;151(7):1542-56.
- 20 Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-674.
- 21 Bambace NM, Holmes CE: The platelet contribution to cancer progression. *J Thromb Haemost* 2011, 9:237-249.
- 22 Alonso-Escolano D, Stron gin AY, Chung AW, Deryugina EI, Radomski MW: Membrane type-1 matrix metalloproteinase stimulates tumour cell-induced platelet aggregation: role of receptor glycoproteins. *Br J Pharmacol* 2004, 141:241-252.
- 23 Janowska-Wieczorek A, Ma rquez-Curtis LA, Wysoczynski M, Ratajczak MZ: Enhancing effect of platelet-derived microvesicles on the invasive potential of breast cancer cells. *Transfusion* 2006, 46:1199-1209.

-
- 24 Zwicker JI1, Liebman HA, Neuberg D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, Furie B. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res*. 2009 Nov 15;15(22):6830-40.
- 25 Brünner N, Nielsen HJ, Hamers M, Christensen IJ, Thorlacius-Ussing O, Stephens RW. The urokinase plasminogen activator receptor in blood from healthy individuals and patients with cancer. *APMIS*. 1999 Jan;107(1):160-7.
- 26 Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 1997;72:1–22.
- 27 Fisher JL, Mackie PS, Howard ML, Zhou H, Choong PF. The expression of the urokinase plasminogen activator system in metastatic murine osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1654–60.
- 28 Blasi F, Sidenius N. The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. *FEBS Lett* 2010;584:1923–30.
- 29 Han B, Nakamura M, Mori I, Nakamura Y, Kakudo K: Urokinase-type plasminogen activator system and breast cancer (Review). *Oncol Rep* 2005, 14:105-112.
- 30 Janicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Hofler H, et al. Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 1993; 24:195-208.
- 31 Janicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, et al. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:913–20.

32 Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, et al. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb Haemost* 2004;91:450–6.

33 Duffy MJ. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clinical chemistry*. 2002; 48: 1194-7.

34 Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Fernö M, Eppenberger-Castori S, Sweep CG, Ulm K, Peyrat JP, Martin PM, Magdelenat H, Brünner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl PO, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-van Gelder ME, Manders P, Fiets WE, Blankenstein MA, Broët P, Romain S, Daxenbichler G, Windbichler G, et al.: Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2002, 94:116-128.

35 Dejouvencel T, Doeuvre L, Lacroix R, Plawinski L, Dignat-George F, Lijnen HR, et al. Fibrinolytic cross-talk: a new mechanism for plasmin formation. *Blood*. 2010;115(10):2048-56.

36 Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, Basire A, Pannell R, Borghi H, et al. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 2007;110(7):2432-9.

37 Galindo-Hernandez O, Villegas-Comonfort S, Candanedo F, González-Vázquez MC, Chavez-Ocaña S, Jimenez-Villanueva X, Sierra-Martinez M, Salazar EP. Elevated

concentration of microvesicles isolated from peripheral blood in breast cancer patients.

Arch Med Res. 2013 Apr;44(3):208-14

38 Kim HK, Song KS, Park YS, Kim CM, Lee KR. Method comparison of flow cytometric assay of platelet microparticles and changes of platelet microparticles during cancer chemotherapy. *Thromb Haemost.* 2002 Mar;87(3):547-8.

39 Lechner D, Kollars M, Gleiss A, Kyrle PA, Weltermann A. Chemotherapy-induced thrombin generation via procoagulant endothelial microparticles is independent of tissue factor activity. *J Thromb Haemost.* 2007 Dec;5(12):2445-52.

40 Dirix LY, Salgado R, Weytjens R, Colpaert C, Benoy I, Huget P, van Dam P, Prové A, Lemmens J, Vermeulen P. Plasma fibrin D-dimer levels correlate with tumour volume, progression rate and survival in patients with metastatic breast cancer. *Br J Cancer.* 2002 Feb 1;86(3):389-95.

41 Chaari M, Ayadi I, Rousseau A, Lefkou E, Van Dreden P, Sidibe F, Ketatni H, Galea V, Khaterchi A, Bouzguenda R, Frikha M, Ghorbal L, Daoud J, Kallel C, Quinn M, Gligorov J, Lotz JP, Hatmi M, Elalamy I, Gerotziafas GT. Impact of breast cancer stage, time from diagnosis and chemotherapy on plasma and cellular biomarkers of hypercoagulability. *BMC Cancer.* 2014 Dec 22;14:991.

42 Huang S, New L, Pan Z, Han J, Nemerow GR. Urokinase plasminogen activator/urokinase-specific surface receptor expression and matrix invasion by breast cancer cells requires constitutive p38alpha mitogen-activated protein kinase activity. *J Biol Chem* 2000;275:12266–72.

43 Tang L, Han X. The urokinase plasminogen activator system in breast cancer invasion and metastasis. *Biomed Pharmacother.* 2013 Mar;67(2):179-82.

-
- 44 Luo J, Sun X, Gao F, Zhao X, Zhong B, Wang H, et al. Effects of ulinastatin and docetaxel on breast cancer invasion and expression of uPA, uPAR and ERK. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;29:30–71.
- 45 Jo M, Thomas KS, Somlyo AV, Somlyo AP, Gonias SL. Cooperativity between the Ras-ERK and Rho-Rho kinase pathways in urokinase-type plasminogen activator-stimulated cell migration. *J Biol Chem* 2002;277:12479–85.
- 46 Soydinc HO, Duranyildiz D, Guney N, Derin D, Yasasever V. Utility of serum and urine uPAR levels for diagnosis of breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(6):2887-9.
- 47 Thielemann A, Baszczuk A, Kopczyński P, Kopczyński Z. High concentration of urokinase-type plasminogen activator receptor in the serum of women with primary breast cancer. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2013;17(5):440-5.
- 48 Angles-Cano E, Plawinski L. Fibrinolysis, new concepts and new mechanisms: fibrinolytic microvesicles and fibrinolytic crosstalk. *AMEH. Comunicacion Celular y Homeostasis Vascular*, Apr 2013, Mazatlan, Mexico. Nieto Editores, 14 (Supl 1), pp.S55-S64, 2013
- 49 Angelucci A, D'Ascenzo S, Festuccia C, Gravina GL, Bologna M, Dolo V, Pavan A. Vesicle-associated urokinase plasminogen activator promotes invasion in prostate cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis*. 2000;18(2):163-70.
- 50 Lacroix R, Plawinski L, Robert S, Doeuve L, Sabatier F, Martinez de Lizarrondo S, Mezzapesa A, Anfosso F, Leroyer AS, Poullin P, Jourde N, Njock MS, Boulanger CM, Anglés-Cano E, Dignat-George F. Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis. *Haematologica*. 2012 Dec;97(12):1864-72.

51 Ding Y, Zhang H, Zhou Z, Zhong M, Chen Q, Wang X, Zhu Z. u-PA inhibitor amiloride suppresses peritoneal metastasis in gastric cancer. *World J Surg Oncol*. 2012 Dec 12;10:270.