



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DE LOS FACTORES SOLUBLES TUMORALES DE CÉLULAS DE CÁNCER DE GLÁNDULA MAMARIA SOBRE LA RESISTENCIA ELÉCTRICA TRANSEPITELIAL DE MONOCAPA DE CÉLULAS ENDOTELIALES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

ALBERTO JOSÉ CABRERA QUINTERO

TUTOR PRINCIPAL

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
[INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. DIANA MARÍA ESCALANTE ALCALDE
[INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR](#)

DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA
[FACULTAD DE MEDICINA](#)

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MARZO DE 2018



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.

Este trabajo se realizó gracias a la dirección del Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

Para la realización de esta tesis fue indispensable el apoyo técnico del M. en C. José Luis Ventura Gallegos, Técnico Académico del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Los experimentos de esta tesis fueron realizados con cordones umbilicales humanos. Que fueron obtenidos con consentimiento informado de voluntarias que dieron a luz en el Hospital General Dr. Manuel Gea González. Para ello se obtuvo la aprobación de los Comités de Ética en Investigación e Investigación de dicho hospital y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, con número de protocolo 11-62-2014 y 1177 respectivamente (Anexo 1 y 2). Lo anterior fue posible gracias al respaldo del Dr. Jorge Román Audifred Salomón, Jefe de la División de Ginecología y Obstetricia y el Dr. Juan Pablo Aragón Hernández, Jefe de la Unidad de Tococirugía del hospital antes mencionado.

El CONACYT me otorgó la beca de maestría No. 384115 para realizar este trabajo.

Agradecimientos

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Facultad de Química de la UNAM por darme una educación de competencia internacional. Especialmente le agradezco a Leticia García, Julio Palacios, Norma Trejo, Roberto Coria y a todos los profesores que me impartieron clase

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

A la Dra. Diana María Escalante Alcalde, y a la Dra. Erika Patricia Rendón Huerta por ser mi comité tutorial. A la Dra. Rendón también le agradezco que me haya abierto las puertas de su laboratorio para poder aprender a hacer inmunofluorescencias.

A los revisores de esta tesis: Dra. Claudia González Espinosa, Dr. Ángel Zarain Herzberg, Dra. Marcela Lizano Soberón, Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara y al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez.

A título personal agradezco a:

A mi familia: Luz, Francisco, Marco, Luz Marina, Emma, Caro, Fernando, Celeste, Peter Jim, Aurelio, Chuncho, Nancy, Mayra, Alex, Olga, Arturo, Julian, Fabiola, Ricardo, Lilia, Luisa.

A Martín Arturo Gallardo Vera por ser mi más cercano colaborador en este proyecto

A Rebeca López Marure, Elizabeth Huerta, Jose Antonio, Erika Gomez que me formaron en el cultivo primario de HUVEC

A Christian Chavarria, Felipe Vadillo, Pablo Matsumura, Javier Esteban Jiménez y Alejandro García por enseñarme a hacer inmunofluorescencias, zimogramas y regalarme reactivos respectivamente

A César Alejandro Guzmán Pérez y Delina Montes Sánchez porque sus tesis sirvió de molde para esta.

A Ambar López Macay, Jonathan García Román, Janini Mejía, César Chirino y Alma Escalona por transmitirme su conocimiento acerca de esta línea de investigación

A Jeff Ireland, Adrian Papas, Fabio Cercegnoli y Kilo Vilayphone, los técnicos del Xcelligence que me resolvieron los problemas que tuve con el equipo

A Ana Lucia Alonso y a todos los que trabajan en Amplibio por prestarme el Xcelligence.

A Irma Mitre Aguilar por hacer que publicara mi primer artículo en una revista arbitrada, aunque fuera una revisión y de coautor, por permitirme ayudarlo a capturar el proyecto a Ciencia Básica de CONACYT que resultó financiado y por los experimentos que hicimos en el Xcelligence.

A Vania Romero y a Alfonso León del Río por los experimentos que hicimos en el Xcelligence y por agradecerme públicamente en seminarios departamentales e institucionales

Al Dr. Mario Zúñiga Ayala, Dr. Daniel Uribe Espinoza, Javier Parra por recolectarme algunos de los cordones umbilicales.

A Javier Hernández por permitirme aprender a capturar un proyecto de largo aliento de CONACYT que resultará financiado

A Andrea Olmos Ortiz, Raquel Toquiantzi Huerta, Jocelyn Fernández, Ernesto Badillo, David Dozal, Andrei Ivan Favela, Abigail Samayoa, Eduardo Torres Cisneros, Daniel Shveid, Anselmo López, Karina Jacome, Victor Edén Montes de Oca, Cecilia Flores, Laura Ventura, Greta, Itzel, Tere Guerra, Ana Ochoa, Linet Torres Manzanares, Fernanda Torres Valdez, Ximena del Toro Ríos, Daén, Saúl, Sergio Contreras, Adriana Vazquez, Alejandro Niño, Luis Robles, Aimé, Mario Bolaños, Beatriz Monroy, Beatriz Couder, Zaira, Mauricio Cárdenas, Elizabeth Camacho, Arturo Saldívar, Omar Vargas, Sandra Flores, Eva Soto Tinoco por ser mis amigos en la Unidad de Bioquímica

A, Carmita Perez, Tere Zavala, Manuel, Manuela Gallegos, Mariana y Genoveva por su apoyo administrativo invaluable.

A Sigifredo Pedraza, Alberto Huberman, Nadia Jacobo Maria de Jesus Ibarra Sánchez y José Esparza por ser los investigadores de la Unidad de Bioquímica.

A los oncólogos César Garay, Pierre, Andrea Castro, Francisco y Eliseo porque nos formamos juntos en la Unidad de Bioquímica

A Mari, Julieta, Lucia Brito, Martha Cariño y todo el personal de la biblioteca de la Nueva Sede de Biomédicas por poner a mi disposición una biblioteca tan espectacular.

A María Teresa Tusie Luna, Paola Vázquez Cárdenas, Alicia Huerta Chagoya, Carlos Aguilar Salinas, a la Fundación Carlos Slim, a Marisa, a José Florez, Suzanne Jacobs, Jason Wright, Zachary Dymek, Laurence Daheron y a todos los que hicieron posible mi estancia en el Instituto Broad y en Harvard Stem Cell Institute

A Federico Martínez y a todos lo que hacen posible la lista de distribución de correos fedetab@bioquimica.unam.mx gracias a ustedes me enteré de seminarios, me regalaron reactivos y fui a cursos que de otra forma no creo que hubiera pasado.

Índice

	Página
Agradecimientos	2
Índice	5
Índice de Figuras	7
1.0 Abreviaturas	8
2.0 Resumen	10
3.0 Abstract	12
4.0 Introducción	14
4.1 Cáncer de Mama	14
4.2 Microambiente Tumoral	15
4.3 Inflamación Asociada a Cáncer	16
4.4 Vasculatura Tumoral	17
4.5 Metástasis	18
4.6 Células Epiteliales	19
4.7 Resistencia Eléctrica Transepitelial (TEER) y su medición	23
5.0 Antecedentes	27
5.1 Nicho Pre-Metastásico	27
5.2 Papel del endotelio en la metástasis	28
5.3 Ensayos de adhesión de endotelio tratado con secretoma de células tumorales	29
5.4 Factores Tumorales Pro-activadores del Endotelio	30
5.5 Factores Tumorales Anti-activadores del Endotelio	31
5.6 Limitantes de la caracterización del secretoma por ELISA-Multiplex	32
5.7 NF- κ B es activada por el secretoma tumoral en el endotelio	34
6.0 Planteamiento del Problema	36
7.0 Hipótesis	37
8.0 Objetivo Principal	37
8.1 Objetivos particulares	37
9.0 Materiales y Métodos	38
9.1 Cultivo primario de células (HUVEC)	38
9.2 Obtención del secretoma de líneas tumorales epiteliales mamarias	39
9.3 Ensayo para evaluar la TEER de una monocapa de HUVEC en tiempo real	41
10.0 Resultados	43
10.1 Efecto del secretoma de MDA-MB-231 sobre la TEER de HUVEC sub-confluentes	43
7.2.1 Determinación del número óptimo de células HUVEC para formar una monocapa con TEER máxima	46

10.2.2 Efecto de adicionar los estímulos afuera de la incubadora y simultáneo al cambio de medio sobre la TEER de HUVEC confluentes	47
10.2.4 Evaluación del efecto del secretoma de MDA-MB-231 sobre la TEER de HUVEC confluentes en condiciones mejoradas	50
10.2.4.1 Efectos 2 horas post-estímulo	52
10.2.4.2 Efectos 2-13 horas post-estímulo	52
10.2.4.3 Efectos 13-20 horas post-estímulo	53
10.3 Efecto del secretoma de ZR-75-30 sobre la TEER de monocapas confluentes de Eahy926 y HMEC-1	54
11.0 Discusión	56
11.1 Efecto del secretoma de MDA-MB-231 sobre la TEER de HUVEC sub-confluentes	57
11.2 Efecto del secretoma de MDA-MB-231 sobre la TEER de una monocapa confluyente de HUVEC	57
11.2.1 Determinación del número óptimo de células HUVEC para formar una monocapa con TEER máxima	57
11.2.2 Efecto de adicionar el estímulo afuera de la incubadora y simultáneo al cambio de medio sobre la TEER de HUVEC confluentes	58
11.2.3 Reproducción del efecto reportado del TNF sobre la TEER de HUVEC	59
11.2.4 Evaluación del efecto del secretoma de MDA-MB-231 sobre la TEER de HUVEC confluentes en condiciones mejoradas	60
11.2.4.1 Efectos 2 horas post-estímulo	60
11.2.4.2 Efectos 2-13 horas post-estímulo	61
11.2.4.3 Efectos 13-20 horas post-estímulo	63
11.3 Efecto del secretoma de ZR-75-30 sobre la TEER de una monocapa confluentes de Eahy926 y HMEC-1	64
12.0 Conclusiones	66
13.0 Perspectivas	67
14.0 Anexos	68
Anexo 1: Oficio de Aprobación del protocolo clínico por los comités de ética e investigación del Hospital Gea González.	68
Anexo 2: Oficio de Aprobación del protocolo por los comités de ética e investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.	69
Anexo 3: Formato de Consentimiento informado	70
Anexo 4: Tabla con las concentraciones en pg/ml de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento presentes en el secretoma de MCF-7, MDA-MB-231 y ZR-75-30	72
Anexo 5: Lista de Archivos del Xcelligence	73
Anexo 6: Colaboraciones en artículos de investigación	74
15.0 Referencias	76

Índice de Figuras

Figura 1: Ejemplos de tejido epitelial.....	20
Figura 2: Organización estructural de las interacciones intercelulares y con su matriz de las células endoteliales.....	21
Figura 3: La resistencia eléctrica trans-epitelial (TEER) se modifica por variables físicas y biológicas.....	24
Figura 4: Características Principales del Sistema de Medición de TEER en Tiempo Real RTCA Xcelligence DP.....	26
Figura 5: Gráficas de círculo que representan los factores proteicos más abundantes en el secretoma de MDA-MB-231 y ZR-75-30 y que son escasos en el secretoma de MCF-7.....	32
Figura 6: Factores proteicos enriquecidos en el secretoma de MCF-7 y que son escasos en el secretoma de MDA-MB-231 y ZR-75-30.....	33
Figura 7: Efecto del VEGF, ECGS y secretoma de MDA-MB-231 no concentrado sobre la TEER medida en tiempo real de células HUVEC sembradas a baja confluencia.....	46
Figura 8: Registro de TEER por 180 horas (7.5 días) de una dilución geométrica de células HUVEC.....	48
Figura 9: Efecto de adicionar los estímulos afuera de la incubadora y simultáneo al cambio de medio sobre la TEER de HUVEC confluentes.....	50
Figura 10: Efecto de cambiar el medio previo al estímulo de TNF sobre la TEER de una monocapa de HUVEC.....	51
Figura 11: Efecto del TNF, secretoma de MDA-MB-231 no concentrado y concentrado 10 veces sobre la TEER de una monocapa de HUVEC.....	52
Figura 12: Registro de TEER de 65,000 Células: HUVEC inmortalizadas, Eahy926 y HMEC1 tratadas con TNF, secretoma de ZR-75-30 o vehículo.....	56

1.0 Abreviaturas

Abreviatura	Definición
BRCA1	Gen 1 de cáncer de mama, que codifica para una enzima de reparación del DNA
BRCA2	Gen 2 de cáncer de mama, que codifica para una enzima de reparación del DNA
BrCa	Cáncer de mama en inglés
CaMa	Cáncer de mama
Ci	Curie, unidad de desintegración atómica usada en radioactividad
CI	Índice Celular, variable sin unidades que describe la impedancia relativa de un cultivo celular en el RTCA DP
CO ₂	Dióxido de Carbono
c/u	cada uno
ECGS	Suplemento de Crecimiento de Células Endoteliales
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
EGM2	Medio de crecimiento de células endoteliales que contiene VEGF
EMT	Transición Epitelial Mesenquimal
ER α	Receptor de Estrógenos alfa
fos	Sub-unidad con actividad de factor de transcripción de AP-1 que normalmente dimeriza con jun.
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
HEPES	Ácido N-2-hidroxi-etilpiperacina-N-2-etanosulfónico
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidermal 2
HUVEC	Célula endotelial de vena de cordón umbilical humano
IL-6	Interleucina seis
IL-8	Interleucina ocho
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
jun	Sub-unidad con actividad de factor de transcripción de AP-1 que normalmente dimeriza con un miembro de la familia FOS.
MAM	Macrofagos asociados a metástasis
MCF-7	Línea 7 de células epiteliales mamarias tumorales no cancerosas de la Fundación de Cáncer de Michigan
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MDA-MB-231	Línea 231 de cáncer de mama metastásico del Centro de Cáncer Monroe Dunaway Anderson de la Universidad de Texas
NaOH	Hidróxido de Sodio

NK	células asesinas naturales
NO	óxido nítrico
PBS	Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos
pH	potencial de hidrógeno, logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrógeno.
	hidrógeno en solución
POE	Personal Ocupacionalmente Expuesto a radiactividad
PR β	Receptor de progesterona
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio del Instituto Roswell Park Memorial
RTCA DP	Equipo de análisis celular en tiempo real de doble propósito
SFB	Suero Fetal Bovino
Src	cinasa, sin función de receptor, cuyo gen es homólogo al gen viral que causa el sarcoma de Rous en pollos.
TAM	Macrófagos asociados a tumor
TASC	Células estromales asociadas al tumor
TEER	Resistencia eléctrica transepitelial
Th1	Linfocitos cooperadores Tipo 1.
Th2	Linfocitos cooperadores Tipo 2
TME	Microambiente tumoral
TNF	Factor de necrosis tumoral
U937	Línea celular humana de linfoma histiocítico mieloide
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VPF	Factor de permeabilidad vascular

2.0 Resumen

La metástasis es el principal factor asociado a la mortalidad en cáncer de mama (CaMa). La mayoría de las pacientes mexicanas con CaMa son diagnosticadas cuando ya tienen metástasis o cuando en corto plazo la desarrollarán. Por tanto en nuestro laboratorio nos hemos enfocado a modelar una de las etapas finales de la metástasis; la extravasación de las células tumorales.

El CaMa induce una activación, aberrante y local, de la angiogénesis y la permeabilidad vascular, que facilita la tumorigénesis y la metástasis. En parte, esto ocurre en respuesta a mediadores que componen el secretoma del tumor primario que induce la proliferación, migración y disfunción, de las células endoteliales asociadas al tumor y de órganos blanco, a donde las células de CaMa, forman tumores secundarios, como el pulmón, cerebro, médula ósea e hígado. Se ha propuesto que los componentes del secretoma son liberados, tanto por las células de CaMa, como por células estromales asociadas al tumor (TASC), por ejemplo leucocitos, fibroblastos y adipocitos, cuyo fenotipo es anormal.

Bevacizumab (Bev), fue la primera alternativa, para interferir con la comunicación entre el endotelio vascular y los otros componentes del microambiente tumoral. Bev es un anticuerpo neutralizante del factor de crecimiento del endotelio vascular/factor de permeabilidad vascular (VEGF/VPF). Sin embargo, Bev en ensayos clínicos, no ha mostrado un efecto terapéutico adicional al estándar. Actualmente una área de investigación activa es la búsqueda de componentes del secretoma tumoral vasoactivos y que su inhibición pueda ser terapéutica.

El objetivo de este trabajo fue montar un ensayo biológico. El cual permitiera estudiar si el secretoma de células de CaMa es capaz de inducir cambios en la permeabilidad vascular *in vitro*. Para ello utilizamos el secretoma de células con alta capacidad metastásica MDA-MB-231(triple negativo). Con dicho secretoma estimulamos células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC). Nuestro resultados muestran que el secretoma induce cambios en la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), de HUVEC sembradas a baja y alta confluencia. La TEER se midió por el sistema libre de marcaje y en tiempo real, RTCA Xcelligence.

Esto sugiere que dentro del microambiente tumoral, las células de CaMa contribuyen en la secreción de factores vasoactivos que pudieran facilitar la metástasis.

A corto plazo, se podría usar este sistema para dilucidar las vías de señalización comunes de los componentes del secretoma vasoactivos. Para ello se podrían ocupar células tumorales o endoteliales tratadas con inhibidores farmacológicos o modificadas genéticamente. Adicionalmente, se podría determinar, si los cambios en la TEER, en la ventana de tiempo descubierta por el Xcelligence, correlacionan con otras mediciones en las células endoteliales. Por ejemplo un aumento en la permeabilidad del endotelio a albúmina marcada (estándar de oro para determinar cambios en permeabilidad vascular) y con cambios en la estructura de las uniones intercelulares.

3.0 Abstract

Metastasis is the main factor associated with breast cancer (BrCa) mortality. The majority of BrCa Mexican patients, are diagnosed in stages when, they already have metastasis or are going to have it on the short run. Therefore in our laboratory we have focused on modeling one of the final stages of metastasis; tumor cell extravasation.

BrCa induces, an abnormal and local activation of angiogenesis and vascular permeability that facilitates tumorigenesis and metastasis. This is partly due to the tumor secretome that induces proliferation, migration and dysfunction of, tumor associated endothelial cells and of target organs, where BrCa cells form secondary tumors, such as the lungs, brain, bone marrow and liver. It has been proposed that, the tumor secretome is made of factors secreted by, both BrCa cells and by tumor associated stromal cells (TASC), for example leukocytes, fibroblasts and adipocytes, of abnormal phenotype.

Bevacizumab (Bev), was the first alternative to interfere with the communication between, vascular endothelium and other components of the tumor microenvironment. Bev is a neutralizing antibody of the vascular endothelial growth factor / vascular permeability factor (VEGF/VPF). However Bev in clinical trials, has not shown a better therapeutic effect, than standard antineoplastic drugs. Currently, an intensive area of research, is the search for vasoactive components of the tumor secretome whose inhibition is therapeutic.

The objective of this project was to set-up a biological assay. Which allowed to study if the components of the secretome of BrCa cells, are capable of inducing changes in vascular permeability *in vitro*. For this we used the secretome of metastatic BrCa cells, MDA-MB-231 (triple negative). With the secretome we stimulated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Our results show that the secretome induces changes in transepithelial electric resistance (TEER), of HUVEC seeded at low and high confluence. The TEER was measured in the real time and label free system RTCA Xcelligence. This suggests that, within the tumor

microenvironment BrCa cells contribute in the secretion of vasoactive factors that could facilitate metastasis.

On the short run, this system, could be used to elucidate signal transduction pathways common to the vasoactive components of the secretome. For such purpose it will be useful tumor or endothelial cells treated with pharmacological inhibitors or genetically modified. Additionally, it could be determined, if the changes in TEER, on the time window discovered by the Xcelligence, correlate with other measurements on endothelial cells. For example an increase on the passage of labeled albumin (gold standard to determine changes in vascular permeability) and with changes in the structure of intercellular junctions.

4.0 Introducción

4.1 Cáncer de Mama

El cáncer de mama (CaMa) es el grupo de enfermedades neoplásicas con mayor índice de mortalidad en mujeres mexicanas (INEGI 2015). La característica más conocida que comparten dichas enfermedades es la proliferación descontrolada de células de los epitelios ductales o lobulillares, que da lugar a tumores o masas en la mama (Jimenez-Salazar 2010). Cada una de las enfermedades que se agrupan dentro del CaMa se caracteriza por mutaciones genéticas o modificaciones epigenéticas particulares, que sobreactivan o silencian factores intrínsecos de las células hiperproliferativas, (oncogenes y genes supresores de tumores respectivamente) (Lee & Muller 2010). Cada una de dichas enfermedades tiene un diagnóstico molecular, pronóstico y terapia diferente (Cárdenas Sánchez et al. 2017).

El 60% de los CaMa sobreexpresan los receptores de hormonas esteroides estrogénicas ($ER\alpha+$) y progesterogénicas ($PR\beta+$). Son los cánceres de mejor pronóstico y responden favorablemente a la terapia blanco como tamoxifeno, (un inhibidor de $ER\alpha$) o Anastrozol (inhibidor de la aromatasa) (Zentella-Dehesa et al. 2007). Los CaMa positivos a receptores hormonales se subdividen en luminal A (buen pronóstico) y Luminal B (pronóstico regular), dependiendo de la sobreexpresión o no de Ki67 y receptor del factor de crecimiento epidermal 2 (HER2), respectivamente (Eroles et al. 2012).

Por otra parte, el 20% de los CaMa no expresan a los receptores hormonales, pero sobreexpresan HER2. El pronóstico es peor que los anteriores, pero existe una terapia blanco con base en inhibidores de HER2, como el trastuzumab. El resto de los CaMa son llamados triple negativos, porque no sobreexpresan ninguno de los genes anteriores, no existe una terapia blanco, y son los CaMa de peor pronóstico (Eroles et al. 2012) (Eroles, 2012). Los triples negativos, también se pueden subdividir en 6 subtipos moleculares, cuyo nombre son: parecidos a basal 1 (BL1), parecidos a basal 2 (BL2), parecidos a células mesenquimales (M), parecidos a células troncales mesenquimales (MSC), luminal y

receptor de andrógenos positivo (LAR) e Inmunomodulador (IM) (Lehmann et al. 2011).

Con respecto a los genes supresores de tumores, como el gen de cáncer de mama 1 y 2 (BRCA1 y BRCA2), en el CaMa se presentan mutaciones con pérdida de función que pueden ocurrir en cualquier de los subtipos mencionados anteriormente, pero que ocurren especialmente en el CaMa hereditario (Narod & Foulkes 2004). Por tanto, la subclasificación del CaMa, con base en marcadores intrínsecos, ha ayudado a aumentar significativamente la esperanza de vida de los pacientes, permitiendo sobrevivir a la etapa crítica del CaMa (Chávarri-Guerra et al. 2012).

4.2 Microambiente Tumoral

Un tumor es un tejido o un órgano aberrante, no sólo una masa de células tumorales. Harold Fisher Dvorak en 1986 dijo que un tumor es una herida que nunca sana (Dvorak 2015). En las etapas tempranas, posteriores a una herida, en un epitelio como la glándula mama, hay infiltración de células del sistema inmune, seguida de remodelación tisular, angiogénesis y proliferación de fibroblastos (producción glicosaminoglicanos) y finalmente proliferación de células epiteliales. En el caso de un tejido tumoral, se activa un programa asociado a cicatrización y remodelación tisular permanente, que incluye una diversidad de células estromales normales no transformadas asociadas al tumor (TASC) (Bussard et al. 2016).

El origen de las TASC es controversial, pero se reconoce que dichas células pudieran originarse de tejido conectivo, adiposo, vascular y de la médula ósea. Por lo tanto, el microambiente tumoral (TME) contiene factores extrínsecos permisivos, o que activamente ayudan al desarrollo de la carcinogénesis (Hanahan & Weinberg 2011). El énfasis de las terapias en CaMa, se ha centrado en, atacar a las células tumorales, sin embargo, un enfoque alternativo propone atacar las interacciones de las células tumorales con su microambiente (Kim et al. 2017).

4.3 Inflamación Asociada a Cáncer

Un tumor de CaMa, para poder desarrollarse, establece una tolerancia inmunológica antígeno específica (Klebanoff et al. 2011). Las células tumorales que no logran formar tumores, expresan neo-antígenos que activan tanto respuestas inmunes innatas como adaptativas. En esta fase el sistema inmune es capaz de eliminar a las células tumorales, lo que explica el buen pronóstico de tumores con infiltraciones de linfocitos T CD8⁺ y células asesinas naturales (NKs) (Place et al. 2011). En cambio, la teoría de la inmuoedición propone que las células de CaMa que sí logran formar tumores, responden y se adaptan a la respuesta inmune, logrando inducir una supresión específica para sus antígenos, mediada por una variedad de células mieloides supresoras y células T-reg. Dicha teoría, tiene sus orígenes desde hace más de un siglo, dado que fue Rudolf Virchow que, propuso que el cáncer se origina en sitios de inflamación crónica (Balkwill & Mantovani 2001).

El tumor recluta células de origen mieloides. Algunos se convierten en macrófagos asociados a tumor (TAM) o asociados a metástasis (MAM). Esto compromete la vigilancia que confiere la inmunidad innata. Dichos TAM tienen un fenotipo M2, inmunosupresor. Los TAM secretan factores angiogénicos. Por ejemplo el factor de crecimiento de células endoteliales (VEGF-A) que induce la neovascularización del tumor, lo que favorece la irrigación y la posibilidad de que haga metástasis; el factor de crecimiento epidermal (EGF), que promueve la proliferación de las células tumorales; metaloproteasas, que facilitan la remodelación de la matriz extracelular y ayudan a que las células de CaMa puedan invadir tejidos vecinos; citocinas que inhiben la actividad y proliferación de linfocitos T cooperadores Tipo 1 (Th1) o CD8⁺ (Carvalho et al. 2016). Además de los TAM los linfocitos cooperadores tipo 2 (Th2), usualmente están presentes en tumores de CaMa. Al igual que los TAM los Th2 secretan citocinas inmunosupresoras, que inhiben las respuesta antitumoral de otros linfocitos.

Existe una terapia cuyo propósito es volver a encender la respuesta inmune antitumoral y en la actualidad tiene avances prometedores. Esta terapia llamada onco-inmunoterapia, se enfoca en despertar a las células T-reactivas citotóxicas

para eliminar al tumor (Li & Kang 2016). Sin embargo, el enfoque de este trabajo, que se discutirá en la siguiente sección, se centra sobre otro componente del microambiente tumoral. Dicho componente se modula por secreciones de células del sistema inmune asociadas a tumor o por las mismas células tumorales.

4.4 Vasculatura Tumoral

Los vasos sanguíneos son importantes para la proliferación y la metástasis de las células tumorales. Algunos tumores de CaMa son capaces de inducir angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos. Esto promueve el crecimiento de estos tumores, mediante el aumento en el volumen de sangre que entra y sale del tumor, lo que promueve el intercambio de nutrientes y desechos (Zentella-Dehesa et al. 2007). Estos tumores, secretan un factor, anteriormente llamado factor de permeabilidad vascular (VPF), pero que hoy se conoce como VEGF-A, para inducir angiogénesis (Folkman 1972). El VEGF-A, es capaz de inducir la proliferación y migración de las células endoteliales, que recubren el interior de los vasos sanguíneos, a través de su unión, principalmente con el receptor 2 de VEGF (VEGFR2/Fik1). Los capilares o vasos de bajo calibre, como los que irrigan directamente al tumor, están compuestos principalmente de células endoteliales y son las primeras que se necesita movilizar para formar un nuevo vaso sanguíneo, posteriormente células como los pericitos se extienden sobre el vaso sanguíneo (Coultas et al. 2005).

Sin embargo, los vasos sanguíneos que se forman dentro de un tumor son diferentes a los que componen el resto del sistema circulatorio. La vasculatura tumoral es sinuosa, frágil, fenestrada, lo que se ha propuesto que facilita la entrada de las células tumorales al sistema circulatorio para hacer metástasis (Reymond et al. 2013). La investigación en este campo ha permitido desarrollar lo que se conoce como la terapia anti-angiogénica, siendo los fármacos que neutralizan al VEGF-A (Bevacizumab) o a su receptor 2 VEGF (Sorafenib) los más probados en estudios clínicos. Desafortunadamente en CaMa no han resultado proveer un efecto benéfico adicional a las terapias estándar, revelando una mayor complejidad y diversidad de los microambientes tumorales (Aalders et al. 2017). Por ejemplo, el VEGF-A que se mencionó anteriormente, es parte de una familia de proteínas homodiméricas al que

también pertenecen el VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y factor de crecimiento placentario (PGF) en humanos. El gen de VEGFA es capaz de formar por lo menos 7 isoformas proteicas mediante splicing alternativo, algunas de ellas incluso son antiangiogénicas. Además existen otros factores con actividad angiogénica como el factor de crecimiento de fibroblastos ácido y básico (FGFA y FGFB respectivamente) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) a pesar de que fueron nombrados originalmente por su actividad mitogénica en otras células. Esto se traduce en que si se neutraliza con Bevacizumab algunas isoformas de VEGFA presente en el microambiente tumoral, la angiogénesis tumoral puede proseguir gracias a los otros factores angiogénicos antes mencionados (Ferrara 2002).

Se ha propuesto que en lugar de buscar neutralizar ligandos, factores solubles presentes en el microambiente tumoral, se podría intentar entender cuáles son las vías de señalización que se encienden en las células endoteliales, por efecto de dichos factores. En particular, determinar si dichas vías de señalización convergen en algún punto dentro de las células endoteliales. En otras palabras si hay proteínas de señalización como factores de transcripción (jun/fos), cinasas itinerantes de la familia de Src o, segundos mensajeros Óxido Nítrico (NO) que se ven moduladas por cualquier estímulo angiogénico. Por tanto la inhibición de estos nodos pudiera tener un efecto antitumoral mayor que el inhibir un ligando a la vez (García-Román & Zentella-Dehesa 2013). El efecto del microambiente tumoral, no se limita a las células endoteliales de la vasculatura intra-tumoral, sino que pudiera actuar sobre células endoteliales distantes, como la de los órganos blanco, donde las células de CaMa hacen metástasis para formar tumores secundarios, está hipótesis de acción a distancia se conoce como la formación de un nicho pre-metastásico y es el enfoque principal de este trabajo.

4.5 Metástasis

El CaMa, es un problema de salud pública ya que se disemina sistémicamente (metástasis). Para ello las células de cáncer necesitan más que su capacidad de proliferación descontrolada. Si bien, a largo plazo, es más razonable generar conocimiento que permita prevenir o diagnosticar tempranamente el cáncer,

el estudio de la metástasis servirá, algún día, para poder tratar a la mayoría de las pacientes que tienen cáncer de mama actualmente (Chávarri-Guerra et al. 2012).

En la metástasis, las células de CaMa, se desplazan desde la neoplasia primaria a un órgano o tejido distante (García-Román & Zentella-Dehesa 2013). Para que este proceso ocurra, una pequeña población de ellas, con las propiedades migratorias necesarias, se desprende del tumor primario y se desplaza a través de la matriz extracelular, fenómeno que se conoce como transición epitelial-mesenquimal (EMT)(García-Román & Zentella-Dehesa 2013). Posteriormente, las células de CaMa invaden el estroma que rodea al tumor primario, entran al torrente linfático o sanguíneo (intravasación), sobreviven en la circulación periférica, se adhieren al endotelio de órganos blanco, salen de los vasos (extravasación) e ingresan al tejido intersticial del órgano blanco y, eventualmente, forman tumores secundarios (García-Román & Zentella-Dehesa 2013).

La metástasis es un proceso muy ineficiente. Solo una de cada millón de células que sale del tumor primario logra formar un tumor secundario (Chambers et al. 2002). Las células de CaMa, que logran hacer todo el proceso de metástasis, no solo sufren cambios fenotípicos ellas mismas, sino que logran, por lo menos temporalmente, generar cambios sistémicos (Fidler 2002). Luego entonces los genes promotores de la metástasis (GPM) y genes supresores de la misma (GSM) no solo participan en prender programas de migración y colonización en la célula tumoral, sino también deben prender programas en otras estirpes celulares que permitan o proactivamente facilitan la diseminación de las células tumorales (Yan et al. 2013). Un subgrupo de estos genes, entonces, debe facilitar la comunicación entre las células tumorales y las TASC. En otras palabras, deben codificar para productos proteicos que se secretan o que inducen la secreción de metabolitos o ácidos nucleicos de las células tumorales y las TASC.

4.6 Células Epiteliales

Este trabajo se enfoca en estudiar la interacción biológica entre 2 estirpes celulares, las células de cáncer de mama en proceso de diseminación y el endotelio vascular de órganos blanco. A continuación se describen las características

distintivas del endotelio vascular y algunas que comparte con otros tejidos epiteliales, dado que ello permite entender el fundamento de los experimentos que se hicieron en este trabajo.

El tejido epitelial sirve para compartimentalizar nuestro cuerpo (Cereijido et al. 2004). Forma barreras (piel), cavidades (glándulas mamarias) y ductos (intestino), que sirven de interfase entre distintos microambientes ya sea líquidos o gaseosos (figura 1) (Alberts et al. 2008). Al microscopio, un tejido epitelial se ve como un camino empedrado, donde cada célula epitelial sería una piedra o un adoquín. El cimiento sobre el cual las células epiteliales están adheridas se le llama lámina basal, que es un tipo de matriz extracelular especializado y se compone entre otras cosas de proteínas filamentosas como la colágena, fibronectina (FN), laminina y vitronectina (figura 2).

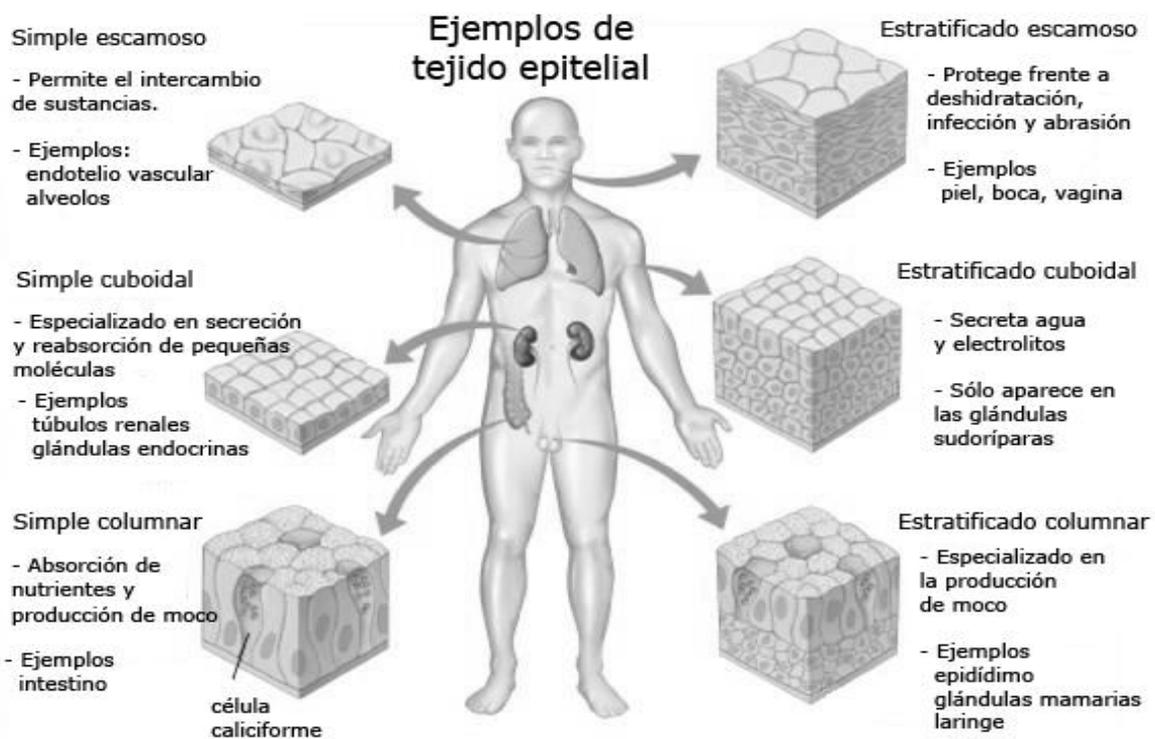


Figura 1: Ejemplos de tejido epitelial (Tomado de Padial, J. 2015)

Las células epiteliales se anclan a estas proteínas filamentosas mediante protusiones proteicas transmembranales como las integrinas o los hemidesmosomas. Estas uniones célula-matriz o focales, están ancladas al citoesqueleto mediante proteínas de andamiaje como vinculina y talina, lo que les

confiere fuerza (figura 2). Incluso la pérdida de dicha interacción matriz-integrina desencadena la muerte de la células epitelial a través de un proceso llamado anoikis (Alberts et al. 2008). Por otra parte, el espacio intercelular es cubierto por uniones intercelulares que hacen las veces del cemento o pegamento, que sella el espacio entre las piedras o los adoquines. Dichas uniones de naturaleza proteica pudieran verse como manos o protusiones que salen de una célula y se unen a otra protrusión idéntica en la célula vecina, como si las células estuvieran agarradas de las manos permanentemente (figura 2).

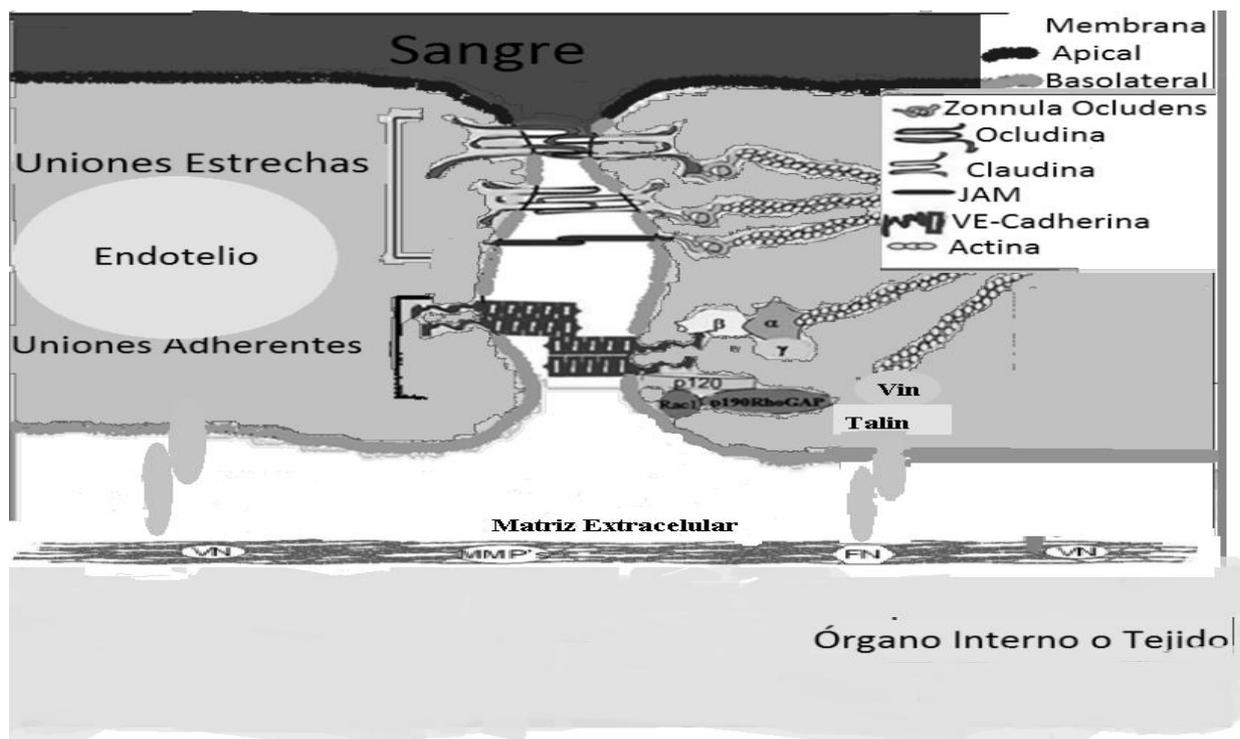


Figura 2: Organización estructural de las interacciones intercelulares y con su matriz de las células endoteliales. (Modificado de (Mehta & Malik 2006)). β , α , " γ " y p120 son beta, alfa, gamma y p120 catenina respectivamente. Vin = vinculina. FN = fibronectina VN = vitronectina

Los epitelios, entonces, son barreras selectivas que regulan el paso entre los dos compartimentos que dividen. Un epitelio modificado, con características particulares, es el que forman las monocapas de células endoteliales, que compartimentaliza la sangre y los tejidos circundantes. En otras palabras, el endotelio envasa la sangre en el interior de todos los vasos sanguíneos (venas, arterias y capilares), pues es la monocapa de células que está en contacto directo con ella (figura 2).

Dado que la función de barrera del endotelio es parte central de este trabajo, vale la pena describirla con más detalle. Las uniones intercelulares, mantienen polarizada a la célula epitelial, pues no permiten que otras proteínas residentes de membrana, como los receptores, pasen de un lado a otro de la unión intercelular, de tal forma que la membrana apical y basolateral difieren en los receptores y otras proteínas residentes de membrana como canales iónicos y transportadores que contiene cada una (Alberts et al. 2008).

Las uniones ocluyentes, se forman en la parte más apical de las células endoteliales, y son la primera barrera que debe atravesar una célula tumoral para extravasarse. Dichas uniones están compuestas de 4 componentes generales: i) una molécula trans-membranal como claudina, ocludina o JAM (moléculas de unión de adhesión) cuya porción extracelular forma uniones homotípicas con una molécula idéntica en la célula vecina; ii) moléculas de andamiaje como zonula occludens 1, 2 y 3, que conectan la parte citoplasmática de la molécula transmembranal con el citoesqueleto de actina; iii) moléculas reguladoras como Src y Ras, y iv) el citoesqueleto de actina (Bauer et al. 2010).

Como se observa en la figura 2, justo debajo de las uniones ocluyentes están las uniones formadas por la proteína intermembranal VE-cadherina o uniones adherentes. Dichas uniones están conectadas al citoesqueleto mediante cateninas (β , α , " γ " y p120). Vale la pena destacar que beta-catenina es un componente importante en la vía de señalización del ligando Wnt, ya que cuando este se une a su receptor frizzled, beta-catenina deja de ser constitutivamente degradado y, viaja al núcleo donde funciona como co-regulador en la transcripción de diferentes genes, como los involucrados en la proliferación de las células epiteliales (Weinberg 2014). Rac1 es una pequeña GTPasa. Rac1 indirectamente induce la fosforilación en la Ser191 y 605 de beta-catenina para que pueda translocarse al núcleo (Duñach et al. 2017). p190RhoGAP es un inhibidor endógeno de Rac1 (induce que Rac1 hidrolize su GTP y se inactive), que ayuda a mantener la integridad de las uniones adherentes (Zebda et al. 2013).

Se ha probado que estímulos como el VEGF o el TNF tienen la capacidad de inducir el desensamblaje de las uniones ocluyentes (McKenzie & Ridley 2007)

(González-Mariscal et al. 2008). ZO-1 actúa como proteína de andamiaje en las uniones ocluyentes, sin embargo, tiene dominios de localización y exportación nuclear (Bauer et al. 2010). El desensamblaje de las uniones ocluyentes ocasiona que las moléculas ZO-1 y ZO-2 se importen al núcleo, donde funcionan como activadores del factor de transcripción ZONAB (Bauer et al. 2010), que parece ser un regulador de la proliferación celular y es capaz de unirse a promotores de genes como HER2 (Jiménez-Salazar et al. 2014).

4.7 Resistencia Eléctrica Transepitelial (TEER) y su medición

Las células epiteliales forman barreras selectivamente impermeables, a otras células, macro-moléculas e iones. Dicha función de barrera se asocia a la integridad, confluencia y morfología de las células epiteliales (Kho et al. 2015). Una manera indirecta, de cuantificar la función de barrera, es mediante la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), que es la que ejercen las células epiteliales sembradas sobre un electrodo, (Figura 3). En dicho sistema, el medio de cultivo, sirve como un medio acuoso rico en iones que cierra el circuito eléctrico (Srinivasan et al. 2015).

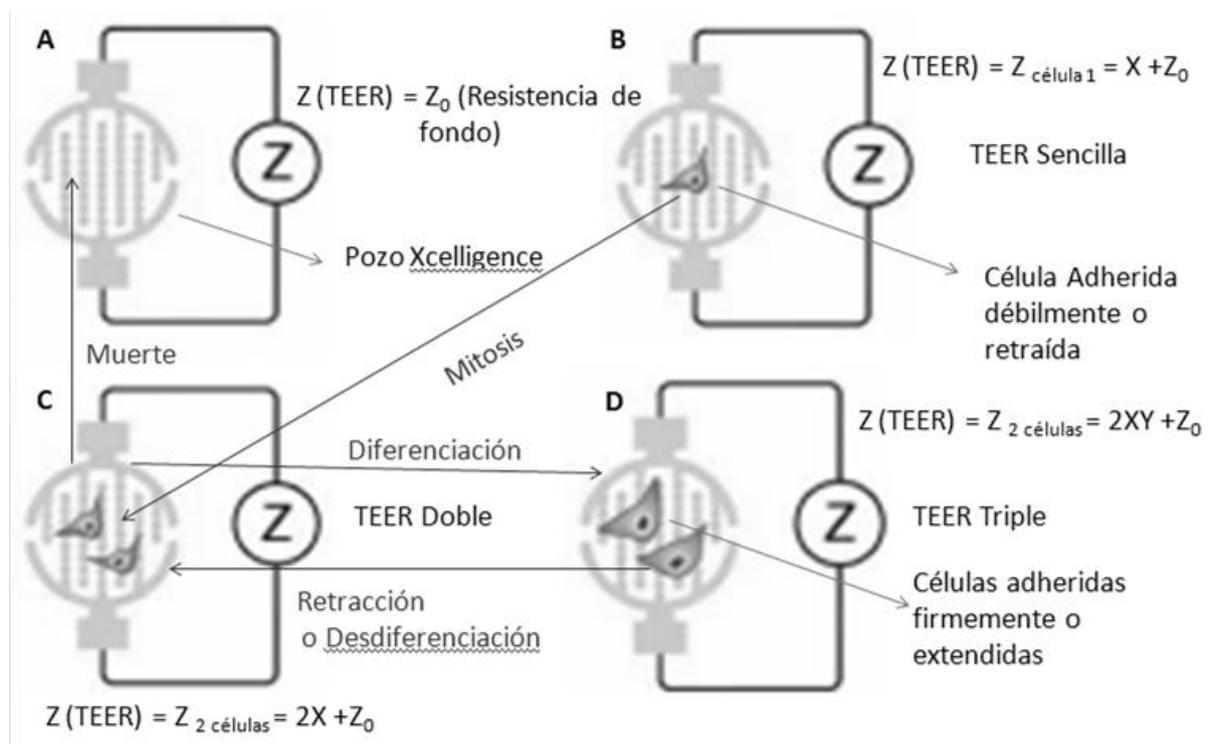


Figura 3: La resistencia eléctrica trans-epitelial (TEER) se modifica por variables físicas y biológicas. Estas variables incluyen la temperatura, composición del medio de cultivo,

número de células presentes y el tamaño de estas. Estas variables son dinámicas en el tiempo debido a fenómenos biológicos tales como mitosis, muerte, diferenciación y des-diferenciación de las células. Modificado de (ACEA Biosciences 2013).

Antes de sembrar las células sobre los electrodos, se mide la resistencia eléctrica del medio de cultivo con 10% de SFB (resistencia de fondo Z_0). Para esto se agrega 50 μ l de medio a cada pozo (figura 3A). Las células al adherirse cubren los electrodos (figura 3B), y dificultan la interacción de estos con los iones del medio de cultivo, aumentando así la TEER ($Z_{célula_1} > Z_0$). Lo anterior solo se cumple si las células logran extenderse, puesto que si las células se mantienen retraídas en forma esférica, los cambios en la TEER son imperceptibles. Entre más células hay adheridas (figura 3C), ya sea porque fueron sembradas o porque hicieron mitosis (ejemplificada por la flecha entre 3B y 3C), más alta será la TEER ($Z_{2\text{ células}} > Z_{célula_1}$).

Un estímulo citotóxico disminuye la TEER (ejemplificado por la flecha vertical que conecta el panel 3C y 3A). Esto se debe a que la muerte celular entre otras cosas ocasiona una pérdida del contacto célula-electrodo. Que tanto disminuya la TEER depende qué tantas células se mueren con dicho estímulo.

Por otra parte, un cambio en la TEER, puede deberse también a cambios en la morfología de éstas (ejemplo: las células que pasan del estado del panel 3C al 3D o al revés, como ejemplifican las flechas horizontales que los unen). Un caso típico de esto es, la diferenciación de monocitos a macrófagos, los segundos tienen mayor TEER que los primeros. De forma converso, si las células se retraen, cubriendo menos área, como cuando a unas células endoteliales se les adiciona un agente permeabilizante como la trombina, esto ocasiona una disminución en la TEER (equivalente a ir del estado del panel 3D al 3C).

La TEER máxima, que difiere entre diferentes líneas o tipos celulares, se alcanza cuando las células cubren la totalidad de la superficie del fondo del pozo. Un ejemplo de dicha TEER se puede observar en la figura 4C. En el periodo de proliferación la TEER aumenta a una tasa constante con el paso de tiempo. Después alcanza la TEER máxima, una meseta o línea horizontal cuyos valores se

mantiene constantes con el tiempo. En el caso de la figura 4C se agregó un estímulo citotóxico que indujo una caída drástica en la TEER.

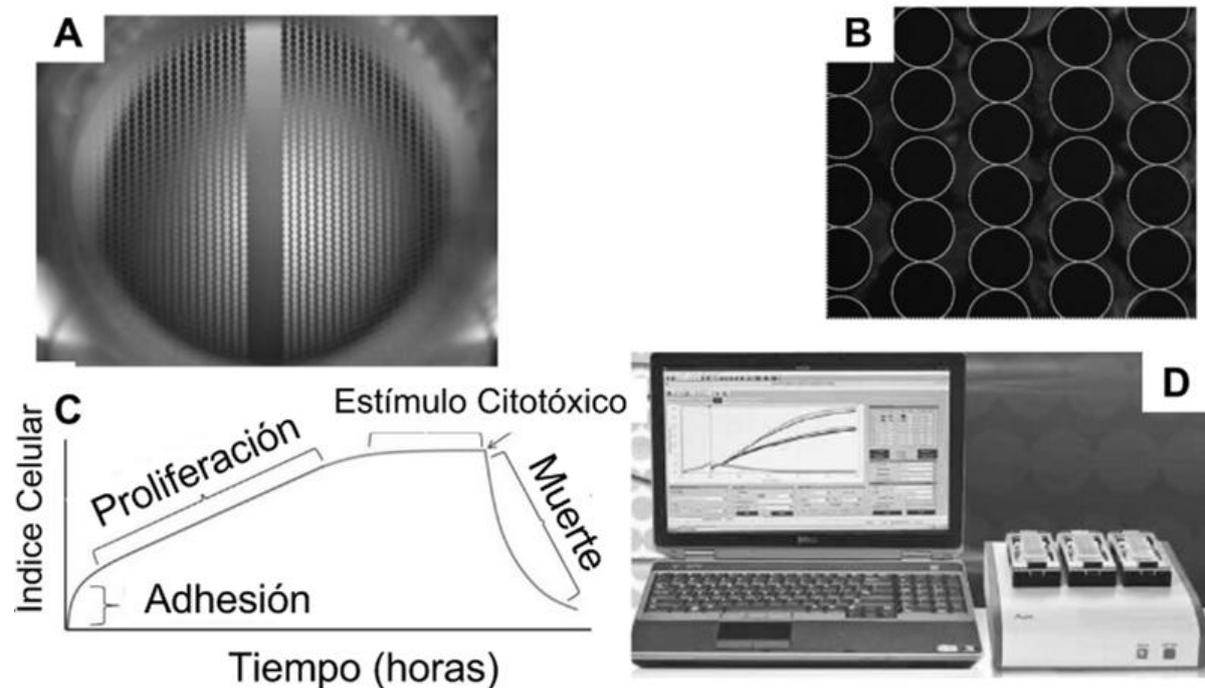


Figura 4: Características Principales del Sistema de Medición de TEER en Tiempo Real RTCA Xcelligence DP. Panel **A**: Vista superior de un pozo del Xcelligence, donde se observan los arreglos de electrodos que cubren la mayor parte el pozo. Panel **B**: Acercamiento para observar los electrodos con más detalle, se denota el contorno de las células en gris por debajo de los electrodos negros. Panel **C**: Se observa un registro prototipo del Xcelligence de tiempo contra índice celular, una medida arbitraria de la TEER de las células, menos la resistencia ofrecida por el medio de cultivo Panel **D**: Componentes físicos del Xcelligence. Tomado de (Kho et al. 2015)

Por lo tanto, para poder distinguir si, cambios en la TEER de una monocapa de células, se debe a cambios en el número y/o morfología de las células individuales, se deben hacer experimentos complementarios, que evalúen la cantidad de células, como ensayos de viabilidad por MTT o cristal violeta. Otra estrategia sería la captura de imágenes o ensayos que evalúen cambios en la morfología de las células como inmunofluorescencias, con marcadores de citoesqueleto o con anticuerpos contra proteína de uniones intercelulares (ACEA Biosciences 2013).

Recientemente, se distribuyó comercialmente una serie de equipos que permiten evaluar la TEER en tiempo real. Esto lo hacen sin necesidad de marcar las células con algún colorante o fluoróforo. Los equipos se llaman RTCA Xcelligence MP, DP y MultiP y son de la marca Acea Biosciences. En esta tesis se utilizó el sistema DP, pero el principio de los otros equipos es el mismo. El sistema DP consta de 2 piezas principales: el aparato analizador y una laptop (Figura 4 D). El analizador se coloca dentro de una incubadora para células de mamífero. Tiene capacidad para tres placas (E-plate) de 16 pozos, 48 pozos en total. Cada pozo tiene una capacidad para 250 μ l de volumen de medio de cultivo. El fondo de cada pozo tiene un área de 0.2 cm^2 de área y está recubierto con hileras de cátodos y ánodos intercalados de oro (ver figura 4 A). Dicho aparato analizador, se conecta mediante usb a la laptop, que va registrando los datos generados por el aparato (ACEA Biosciences 2013).

La laptop, con un software especializado (RTCA 2.0), provisto por ACEA Biosciences, registra la TEER ejercida por las células como una variable arbitraria llamada índice celular (IC). El IC es la resistencia ejercida por la células, menos la resistencia eléctrica ejercida por el medio de cultivo, multiplicada por una constante (ACEA Biosciences 2013). La característica distintiva del sistema Xcelligence es, que puede ser programado para registrar la TEER hasta cada 15 segundos, por un tiempo indeterminado como por ejemplo 96 horas, por lo que se dice que el TEER se mide en tiempo real (ACEA Biosciences 2013). El equipo está diseñado para registrar la TEER de células adherentes, como las células epiteliales, y en nuestra experiencia, no se puede ocupar para medir la TEER de células no adherentes, como las células hematopoyéticas (ej. monocitos)

5.0 Antecedentes

Las células de CaMa no hacen metástasis de manera azarosa, sino que colonizan órganos específicos: pulmón, médula ósea, hígado y cerebro (Weigelt et al. 2005). Pero el mecanismo, que explique dicha especificidad, mejor llamado organotropismo, no ha sido descubierto del todo.

5.1 Nicho Pre-Metastásico

El paradigma que rige hasta cierto punto la investigación al respecto, fue establecido en 1889 por Stephen Paget. Se llama la hipótesis de la semilla y la tierra fértil. La semilla es la célula de cáncer. Ésta prolifera, forma un tumor secundario, en un microambiente favorable, la tierra fértil. En el caso de cáncer de mama, la tierra fértil son los órganos antes mencionados (Ribatti et al. 2006). Tanto las células de cáncer, como el órgano blanco, deben tener características que los hacen compatibles uno con el otro. Evidencia reciente apunta que, el tumor primario crea dicho microambiente favorable, también llamado nicho pre-metastásico, previo a invadir el tejido (Kaplan et al. 2005). En la referencia anterior, ocuparon un modelo murino de cáncer de pulmón. Mostraron que el tumor primario, moviliza células hematopoyéticas progenitoras, hacia los sitios, donde a futuro se va a desarrollar la metástasis. Dichas células eran residentes de la médula ósea y eran positivas para el receptor VEGFR1. La eliminación de estas células hematopoyéticas, inhibe la metástasis.

Más aún se han identificado factores específicos (la citocina midkina), secretados por las células de cáncer, que inducen el nicho pre-metastásico, en un modelo murino de melanoma (Olmeda et al. 2017). Interesantemente en esa publicación se mostró que la midkina, favorece la adhesión de células de melanoma a células endoteliales linfáticas y extravasación *in vitro* de las primeras.

La evidencia en cáncer de mama hasta el momento ha mostrado, en un modelo murino singénico, que el tumor primario, induce hiper-permeabilidad de los vasos sanguíneos pulmonares (Jiang et al. 2016). Esto podría explicar el tropismo

de las células de CaMa de hacer metástasis hacia este órgano. Dicho efecto es revertido parcialmente por bevacizumab, un anticuerpo neutralizante de VEGFA. Por otra parte, se ha mostrado que, el pre-tratamiento subcutáneo a ratones con el secretoma de MDA-MB-231 acelera que el tumor primario xenotransplantado haga metástasis a pulmón (Lee et al. 2014). Adicionalmente se mostró en la referencia anterior que el secretoma induce la proliferación de los vasos sanguíneos linfáticos del ratón (linfangiogénesis).

5.2 Papel del endotelio en la metástasis

El blanco de la mayoría de las terapias antineoplásicas son las células de cáncer. Otro blanco posible es el nicho pre-metastásico. Los vasos sanguíneos y las células endoteliales son parte de este nicho. Además son un blanco asequible considerando que cualquier fármaco intravenoso interactúa primero con el endotelio. El párrafo anterior mostraba que el fenómeno biológico existe, pero tanto los componentes específicos del secretoma de las células de CaMa que lo provocan, como el mecanismo molecular dentro de las células endoteliales no ha sido dilucidado del todo. Esto permitiría determinar que anticuerpos neutralizantes contra los factores tumorales o, moléculas pequeñas inhibitoras serían de utilidad para frenar los efectos en los pacientes con metástasis o a punto de presentarla.

La caracterización del secretoma y su efecto sobre el endotelio ha sido del interés de nuestro laboratorio desde hace 14 años (Estrada-Bernal 2003). Se han realizado experimentos *in vitro* que muestran que el secretoma (conjunto de factores secretados) de las células de cáncer de mama secretan factores que modifican el fenotipo de células endoteliales venosas. La hipótesis de trabajo ha sido que, las células de cáncer, con capacidad metastásica, cuando atraviesan el endotelio, imitan la diapédesis de células del sistema inmune durante una reacción inflamatoria, causado por una infección (Reymond et al. 2013).

En una reacción inflamatoria clásica, en el tejido blanco o infectado por microorganismos, los macrófagos residentes secretan citocinas pro-inflamatorias (TNF, IL-1 β y otras). Estas son ligandos de receptores en la membrana baso-lateral

de las células endoteliales. Por lo tanto las citocinas inducen la activación endotelial; generando vasodilatación, eliminación del glicocalix repelente de la membrana apical, expresión de moléculas de adhesión y un aumento en la permeabilidad vascular, que facilita la extravasación de las células del sistema inmune circulantes hacia el tejido infectado (Guzmán-Pérez 2013). En el caso de las células de cáncer, el estímulo inflamatorio que induciría la activación endotelial, estaría dado por el tumor primario. Dicho estímulo tumoral actuaría a distancia (como una hormona endócrina), generando un nicho en el endotelio del órgano blanco (pulmón, cerebro, médula ósea e hígado) que sea fácil de atravesar por las células tumorales que eventualmente lleguen allí. Vale la pena destacar que el estímulo podría estar siendo producido por las células tumorales, por alguna otra célula no transformada del microambiente tumoral, como las células del sistema inmune infiltradas en el tumor (ej. las TAM) o por ambas.

5.3 Ensayos de adhesión de endotelio tratado con secretoma de células tumorales

Para los trabajos realizados en nuestro laboratorio se han ocupado la líneas de cáncer de mama con alta capacidad metastásica ZR-75-30 (luminal B) y MDA-MB-231 (triple negativo) (Holliday & Speirs 2011). El secretoma derivado de estas líneas, se usó para estimular células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC). Se observó que ambos secretomas, inducen un aumento estadísticamente significativo, en la capacidad de las HUVEC de adherir linfocitos (U-937), con respecto a HUVEC no tratadas. El secretoma de MCF-7, T-47D y MDA-MB-435, líneas no metastásicas, no tienen el mismo efecto sobre las células HUVEC (Montes-Sánchez 2010).

Esto evidencia en condiciones *in vitro*, que el secretoma de células altamente metastásicas, son capaces por sí solos, de inducir uno de los pasos iniciales de la extravasación, la adhesión al endotelio. Podría argumentarse que es una evidencia muy indirecta el usar células U-937 para evidenciar el fenómeno. Esto, a la luz de que el secretoma, con el que se pre-estimulan las HUVEC, son de células de CaMa. Sin embargo cada línea de CaMa puede adherirse en mayor o

menor medida al endotelio no estimulado (Frías González 2007). Las células MCF-7 se adhieren 2 veces más rápido que las ZR-75-30 a las HUVEC no estimuladas. En cambio las U-937 se adhieren a una velocidad similar que las ZR-75-30 sobre HUVEC no estimuladas, pero aumentan exacerbadamente su adhesión sobre endotelios estimulados. Interesantemente las MCF-7 no se adhieren más a endotelios estimulados con el secretoma de ZR-75-30. Por tanto nuestro ensayo de adhesión, permitió disectar el efecto exclusivo del secretoma de ZR-75-30, sobre por ejemplo, las diferencias en la expresión de moléculas de adhesión de las células tumorales.

5.4 Factores Tumorales Pro-activadores del Endotelio

Nuestro grupo y otro han analizado el secretoma de ZR-75-30, MCF-7 y MDA-MB-231 por ELISA Multiplex de 27 citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Montes-Sánchez et al. 2009; Mejía-Rangel et al. 2016; Gómez et al. 2016; López-Marure et al. 2016). Esto con la idea de dilucidar qué factores tumorales, pudieran estar induciendo el fenotipo pro-adhesivo de las HUVEC. Dichos factores deberían estar presentes solo en el secretoma de ZR-75-30 y MDA-MB-231 y no en el secretoma de MCF-7. Tres de los estudios coinciden en que la interleucina seis (IL-6) y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) son factores enriquecidos en el secretoma de ZR-75-30 y no así en MCF-7 (Figura 5A-C). Otros factores que destacaron en por lo menos 2 estudios son el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interleucina ocho (IL-8), VEGF, IL-1 α , e IL-1 β . Motivados por estos resultados, se evaluó el efecto individual de algunas citocinas antes mencionadas sobre el endotelio, los resultados se describen más abajo. Por otra parte se observa que la IL-8 y la IL-1 α también están enriquecidos en el secretoma de MDA-MB-231. Si bien faltaría hacer un análisis de componentes principales (ACP), se puede sugerir que la mayoría de los factores más enriquecidos en ZR-75-30 y MDA-MB-231 son diferentes.

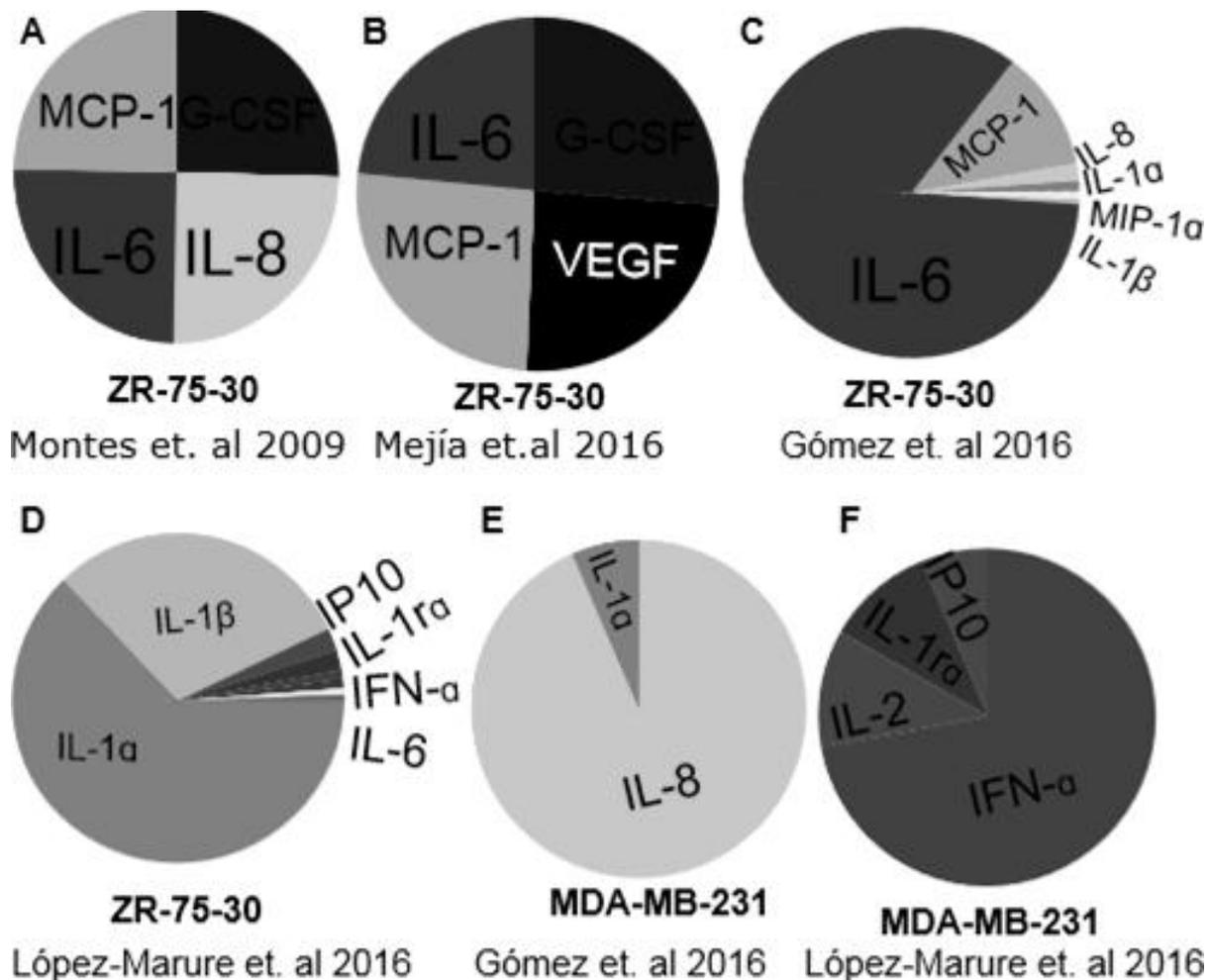


Figura 5: Gráficas de círculo que representan los factores proteicos más abundantes en el secretoma de MDA-MB-231 y ZR-75-30 y que son escasos en el secretoma de MCF-7. Los datos solo representan veces de cambio con respecto a MCF-7 y no la proporción que ocupan en la composición absoluta del secretoma, al no provenir de una caracterización exhaustiva del secretoma. **Panel A-D:** Corresponden a datos de ZR-75-30. **Panel E y F:** Corresponden a datos de MDA-MB-231. Los datos fueron obtenidos de 4 diferentes análisis por ELISA Multiplex de no más de 27 elementos reportados en (Montes-Sánchez et al. 2009; Mejía-Rangel et al. 2016; Gómez et al. 2016; López-Marure et al. 2016)

5.5 Factores Tumoraes Anti-activadores del Endotelio

El análisis recíproco de los datos de ELISA Multiplex nos permite identificar factores que están enriquecidos en el secretoma de MCF-7 pero que son escasos en los secretomas de las líneas celulares más agresivas (Figura 6). El factor que sobresale de estos análisis es la interleucina 2 (IL-2). El análisis sugiere que dicha citocina es pobremente secretada tanto por ZR-75-30 y MDA-MB-231 en uno de los

artículos y por ZR-75-30 en el otro artículo. Esta citocina ha sido catalogada como anti-inflamatoria. Resulta interesante hipotetizar que la IL-2 sobre las células endoteliales tuviera el efecto opuesto a los factores enriquecidos en ZR-75-30 y MDA-MB-23, y/o que la IL-2 inhibiera el efecto de dichos factores. El VEGF también está enriquecido en el secretoma de MCF-7. Sin embargo no resulta ser un buen candidato ya que estudios realizados en nuestro laboratorio, como se observa en la figura 5 sugieren que también es secretado en grandes cantidades por las líneas celulares más agresivas.

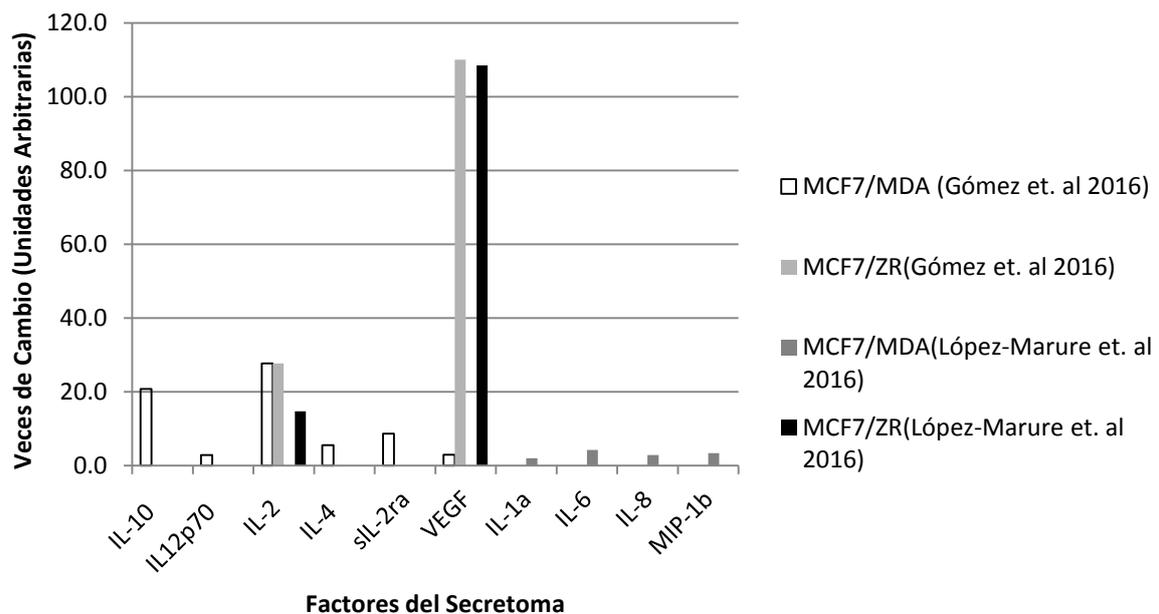


Figura 6: Factores proteicos enriquecidos en el secretoma de MCF-7 y que son escasos en el secretoma de MDA-MB-231 y ZR-75-30. Los datos fueron obtenidos del análisis de 27 elementos de ELISA Multiplex de 2 publicaciones (Gómez et al. 2016; López-Marure et al. 2016)

5.6 Limitantes de la caracterización del secretoma por ELISA-Multiplex

Los análisis de ELISA-Multiplex, antes mencionados, solo evalúan un subconjunto de los factores proteicos, presentes en el secretoma de las líneas celulares estudiadas. Por ejemplo no se evaluaron la concentración de adipocinas (Leptina, Adiponectina) que se ha reportado previamente que están presentes en el

secretoma de MCF-7 (Bougaret et al. 2017). Como se observa en el apéndice 4, los ELISA multiplex publicados no reportan las concentración de los mismo factores proteicos. IL-6, IL-8 y VEGF es el único factor que es reportado por tres de los estudios. Un caso hipotético es que no se reportó la concentración de un determinado factor porque no hubo diferencias entre las diferentes líneas celulares. Esto afectaría la confiabilidad y/o reproducibilidad de los resultados de cualquiera de los estudios mencionados anteriormente, pues al parecer muchos de los factores salen diferencialmente expresados entre las diferentes líneas en un estudio y en otro no.

Cabe destacar que ninguno de los estudios hizo réplicas de la caracterización del secretoma, solo hizo un experimento independiente. Por lo que variabilidad en las concentraciones del secretoma podría tener un origen biológico o un error técnico. Fenómenos biológicos que pudieran afectar la composición del secretoma son la antigüedad del secretoma, las condiciones del cultivo para obtenerlo o la inestabilidad genética de las líneas, que genera clonas y variabilidad inter-laboratorio.

Aunque no resulta evidente del apéndice 4, para muchos factores no se observó diferencias entre las líneas celulares, porque sus concentraciones estaban en el límite de detección del sistema de detección, particularmente cuando el factor está en muy bajas concentraciones. Esto se podría mejorar concentrando el secretoma, centrifugándolo con una columna Amicón como se describe en la sección de material y métodos de esta tesis.

También dichos análisis solo caracterizaron proteínas solubles. En la actualidad se reconoce que exosomas y otras vesículas extracelulares que empaquetan proteínas son importantes para la comunicación intercelular (Hoshino et al. 2015). También se reconoce que moléculas no proteicas derivadas del ácido araquidónico (Wculek & Malanchi 2015), miRNA, también podrían ser importantes componentes del secretoma tumoral que afectan al endotelio (Zhou et al. 2014) .

Finalmente los factores diferencialmente expresados entre las diferentes líneas no necesariamente van a tener un efecto sobre el endotelio, pues podrían

estarse expresando para otros fines, como por ejemplo en la comunicación con el sistema inmune, o como factores autócrinos (Resmini et al. 2017).

5.7 El factor de transcripción NF- κ B es activado por el secretoma tumoral en el endotelio

En el trabajo más reciente publicado por nuestro laboratorio, se hizo un microarreglo de mRNA. Esto con el afán de determinar los genes, que se regulan en células HUVEC, en respuesta a los factores secretados por ZR-75-30 (Mejía-Rangel et al. 2016). Las células HUVEC fueron estimuladas por 3 horas con el secretoma de la línea tumoral. Fue el mismo lapso de tiempo que se ocupó para tratar las HUVEC en los ensayos de adhesión mencionados anteriormente. Se observó que el estímulo, induce la transcripción principalmente de genes que participan en la vía de NF- κ B. Dicha vía normalmente se enciende en respuesta a citocinas pro-inflamatorias. El pre-tratamiento a células HUVEC con el inhibidor selectivo de la vía, BAY-117085, abate totalmente el efecto pro-adhesivo del secretoma de ZR-75-30 sobre células HUVEC. En comparación con lo que hace el estímulo con TNF, el secretoma de ZR-75-30 induce la expresión específica de 4 genes: TGFB3, SORBS1, PKD1L1 E IGAA1199. Más aún, en dicho artículo se demuestra que aunque factores como IL-6 y VEGF (apéndice 4) presentes en el secretoma de ZR-75-30 activan sus respectivos receptores en las HUVEC, esto no se refleja en el transcriptoma en la ventana de tiempo que se hizo el microarreglo.

5.8 Evidencias in-vivo del efecto del secretoma tumoral

El efecto del secretoma de ZR-75-30 no se limita a un inducir un fenotipo pro-adhesivo en HUVEC. In-vivo se ha demostrado, en un modelo murino, que la inyección intradérmica del secretoma de ZR-75-30, induce un aumento en la permeabilidad vascular, medida por la extravasación de azul de evans (Guzmán-Pérez 2013). En dicho trabajo no se analizó el efecto del secretoma de MCF-7. Un aumento en la permeabilidad vascular se asocia con el debilitamiento en la función

de barrera de endotelio, lo que facilitaría la transmigración o extravasación de las células de cáncer de mama para que invada su órgano blanco.

El efecto del secretoma de ZR-75-30 fue similar al producido por 25 ng de VEGF recombinante humano. 25 ng de VEGF no inducen el incremento máximo de permeabilidad vascular, pues a 150 ng de VEGF se observa un incremento aún mayor. La cantidad aproximada de VEGF que contenía el secretoma de ZR-75-30 era mucho menor a 25 ng de VEGF. En dicho trabajo se describe que se inyectaron 630 ng de proteína total de secretoma, que tenía una concentración de 15.77 ng/ml, lo que equivale a 40 μ L de volumen. Si bien no se hizo una cuantificación de la cantidad de VEGF en el secretoma de ZR-75-30, se podría extrapolar de los datos de (Mejía-Rangel et al. 2016) (apéndice 4) que se colocaron 1.58 ng de VEGF (39.592 ng /ml). Por lo que estos datos sugieren que hay algo además del VEGFA en el secretoma de ZR-75-30 que está incrementando la permeabilidad vascular. Además queda por determinar si el efecto del secretoma de ZR-75-30 sobre la permeabilidad es directo o indirecto sobre el endotelio. Pues el secretoma de ZR-75-30 pudiera estar actuando sobre leucocitos y estos a su vez secretar otras citocinas que activaran al endotelio. Para responder las 2 interrogantes anteriores, resulta útil hacer experimentos *in vitro*, pues es más fácil evaluar la participación de agentes individuales (factores del secretoma, estirpes celulares, receptores... etc) De aquí que el propósito de la presente tesis de maestría, sea descartar o apoyar que el efecto del secretoma de las células tumorales metastásicas es directo sobre el endotelio.

6.0 Planteamiento del Problema

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte en mujeres mexicanas. La mayoría de los casos son detectados en etapas avanzadas. El principal factor asociado a la muerte de las pacientes es la metástasis. Gran parte de la investigación y terapia en cáncer está dirigida contra componentes internos de la célula tumoral (receptores, citoesqueleto, material genético). Sin embargo el estudio y las terapias contra el microambiente tumoral, por ejemplo la inmunoterapia que re-activa a la células T citotóxicas anti-tumorales, son un blanco prometedor en cáncer de mama.

El proceso de metástasis involucra la intravasación y extravasación de las células tumorales de los vasos sanguíneos y, por tanto, la interacción con el endotelio. Experimentos en modelos animales asocian un aumento en la permeabilidad vascular con la eficiencia de metástasis en cáncer de mama. El secretoma de líneas de cáncer de mama es capaz de inducir un aumento en la permeabilidad vascular *in vivo*. Factores específicos como la Midkina secretados por células de melanoma se ha demostrado que promueven la metástasis en modelos animales.

Hasta el momento falta identificar factores específicos del secretoma de células de cáncer de mama, que induzcan permeabilidad vascular y favorezcan la metástasis. Tampoco se ha demostrado que vías de señalización específicas se activan en el endotelio para favorecer los procesos antes mencionados.

Un ensayo biológico *in vitro* que permita identificar factores tumorales inductores de permeabilidad vascular y las vías de señalización activadas en el endotelio en respuesta a dichos factores, sería de utilidad para identificar genes susceptibles de ser evaluados *in vivo* como biomarcadores o como blancos terapéuticos.

7.0 Hipótesis

El secretoma de MDA-MB-231 es capaz de inducir la disminución de la TEER de una monocapa de HUVEC

8.0 Objetivo Principal

Evaluar si el secretoma de MDA-MB-231 es capaz de inducir cambios en la TEER de una monocapa de HUVEC.

8.1 Objetivos particulares

1. Estandarizar la técnica de medición de TEER de una monocapa de HUVEC expuesta a TNF
2. Evaluar si el secretoma de MDA-MB-231 afecta la TEER de una monocapa de HUVEC

9.0 Materiales y Métodos

9.1 Cultivo primario de células (HUVEC)

Las células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC), se obtuvieron siguiendo la metodología previamente estandarizada en el laboratorio (Alfonzo Méndez 2010, p.38), con base en lo reportado previamente en la literatura (Jaffe et al. 1973), con algunas modificaciones.

Los cordones umbilicales se recolectaron de partos eutócicos o cesáreos del servicio de Tococirugía del Hospital General Dr. Manuel Gea González. Se obtuvo el consentimiento informado firmado por cada participante y la aprobación No.11-62-2014 del comité de ética de dicho hospital y 1177 del INCMNSZ (ver anexo 1, 2 y 3).

Los cordones fueron almacenados en solución fría (con geles refrigerantes) de PBS (NaCl 1.37 M, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 100 mM, KH₂PO₄ 18 mM) hasta que fueron procesados. Se procesaron dentro de las primeras 24 horas después de su recolección.

El cordón se desinfectó por afuera con alcohol al 70% y una gasa. En la vena del cordón (el vaso sanguíneo de mayor calibre, con respecto a las 2 arterias que contiene el cordón) se introdujo una cánula, y esta se sujetó con ayuda de una pinza Kelly. Se perfundió solución de PBS con una jeringa de 10 ml, para eliminar la mayor cantidad de restos de sangre y verificar que la vena no estuviera perforada. En caso de que la vena estuviera perforada, el cordón se cortó a la altura de la perforación y fue procesado como 2 fragmentos independientes. Ambos extremos del cordón umbilical se ocluyeron con cinchos de plástico de electricista. La vena de los cordones se llenó con colagenasa tipo II (Gibco, # Cat. 17101015) al 0.01% en solución de HEPES (NaCl 142 mM, KCl 4.4 mM, HEPES 10.9 mM y Glucosa 12.2 mM) tibia.

Los cordones se sumergieron en un vaso de precipitados con solución salina fisiológica (NaCl 0.9%) tibia y se incubaron por 20 minutos a 37°C en un baño

recirculador de agua. Los cordones se masajearon suavemente para desprender las HUVEC de la lámina basal. Se recolectó el eluido con colagenasa de cada cordón en un tubo para centrifuga (Corning, #Cat. SCT-50ML-25-S) con 5 ml de medio de cultivo M199 (Sigma-Aldrich, # Cat. M5017) a pH 7.2, suplementado con SFB al 10% (By Products, # Cat 90020), glutamina al 1% (Sigma-Aldrich, # Cat. G5792), 20 µg/ml de ECGS (Sigma-Aldrich, # Cat. E9640), 1 UI/ml de heparina (Pisa, # Cat 4000397) y 100 UI/ml de antibiótico/antimicótico (Gibco, # Cat. 15240062).

Se llenó el cordón con PBS, se masajeo y el eluido con PBS también se recolectó en el tubo para centrifuga. El paso anterior se repitió una vez. Los tubos se centrifugaron 10 minutos a 1200 rpm a temperatura ambiente. Se descartaron los sobrenadantes, y se resuspendieron los botones celulares en medio M199 suplementado. Las HUVEC se sembraron a razón de 3 cordones por placas Petri de 100 mm de diámetro (Corning, # Cat. 430167) o 1 cordón por placa petri de 60 mm de diámetro (Corning, # Cat. 430166) previamente cubiertas con gelatina de piel de bovino al 0.2% (Sigma-Aldrich, # Cat. G9391) y se incubaron a 37°C con una atmósfera de 5% CO₂ y 100% de humedad.

Los cordones se depositaron en una bolsa amarilla de desechos biológicos y se incineraron. 12 horas después las placas Petri se lavaron con medio de cultivo sin suero para lavar la sangre residual y posteriormente se les adiciono M-199 suplementado. El medio de cultivo fue cambiado cada tercer día y las células se despegaron con tripsina (Sigma-Aldrich, # Cat. T4799) al 0.05% en solución de verseno (PBS + EDTA 10 mM) cuando llegaron a confluencia. Los experimentos se realizarán con las HUVEC desde pasaje cero hasta pasaje 3. La viabilidad de los cultivos fue cercana al 100% en todos los cultivos empleados para el desarrollo de esta tesis.

9.2 Obtención del secretoma de líneas tumorales epiteliales mamarias

Se emplearon los secretomas de diferentes tipos de células humanas de cáncer de mama, MCF-7 con fenotipo luminal A (ATCC, # Cat. HTB-22), ZR-75-30

con fenotipo luminal B (ATCC, #Cat. CRL-1504) y MDA-MB-231 con fenotipo triple negativo (ATCC, # Cat. HTB-26) (Holliday & Speirs 2011). El secretoma se obtuvo de acuerdo a la metodología montada anteriormente en el laboratorio (Estrada Bernal 2003, p. 48) a excepción del paso de concentración, como se describe más adelante.

1×10^6 d células de las diferentes líneas celulares cancerosas se sembraron en una placa petri de 100 mm de diámetro (Corning, # Cat. 430167), con 8 ml de medio RPMI-1640 (Gibco, # Cat. 31800022) a pH=7.2 con rojo de fenol, 10% de SFB (By Products, # Cat 90020) y 100 UI/ml de antibiótico/antimicótico (Gibco, # Cat. 15240062) y se incubaron a 37°C (5% CO₂ y 100% de humedad). Cuando las células alcanzaron 70% de confluencia (aproximadamente 48 horas después) se despegaron las células con tripsina al 0.05% (Sigma-Aldrich, # Cat. T4799) y se sembraron en botellas de cultivo de 175 cm² (Corning, # Cat. 431080) con 30 ml de medio RPMI con rojo de fenol al 10% de SFB y 100 UI/ml de antibiótico/antimicótico.

Una vez que las células volvieron a alcanzar confluencia en aproximadamente 48 horas, se retiró el medio de cultivo y se realizaron 10 lavados de 10 ml cada uno, con una dilución 1:1 de medio RPMI sin rojo fenol y sin suero (Sigma-Aldrich, # Cat. R8755) y PBS a pH = 7.4. Posteriormente las células se incubaron 48 horas con 25 ml de medio RPMI sin rojo de fenol y sin suero, El medio de cultivo (secretoma) se recolecto en un tubo para centrifuga y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se guardó a 4°C (por tiempo indefinido) y el pellet que contenía detritus celular se desechó. El secretoma se ocupó concentrado 10 y 100 veces.

Para concentrarlo 10 veces, el secretoma se centrifugó una vez a 14000 rpm, 40 minutos a 4°C, en columnas Amicon de 500 µl de volumen con 3000 kDa de peso molecular de corte (Millipore, #Cat. UFC500308). Para concentrarlo 100 veces se tomó el secretoma 10 veces concentrado y se volvió a centrifugar. Las columnas Amicon fueron reutilizadas para concentrar los diferentes secretoma, entre cada uso, se dejaron enjuagando toda la noche con agua bidestilada y se esterilizaron con óxido de etileno en gas. Durante todo el procedimiento el secretoma se mantuvo en hielo o a 4°C.

9.3 Ensayo para evaluar la TEER de una monocapa de HUVEC en tiempo real

La TEER de una monocapa de HUVEC, tratadas con diferentes secretomas se evaluó con el equipo de análisis celular en tiempo real RTCA DP Xcelligence (ACEA Biosciences, #Cat. 00380601050). Se siguió el protocolo reportado previamente por otro grupo de investigación (Kustermann, S. et al., 2014) con algunas modificaciones.

Se adicionó gelatina al 0.2% en pozos de placas E-plate 16 (Acea Biosciences, # Cat. 05469830001) y éstas se incubaron durante 10 minutos a 37°C. El exceso de gelatina se descartó por decantación, para no tocar el fondo de los pozos y despegar los electrodos. Se agregaron 50 µl de M199 suplementado a cada pozo y se midió la resistencia basal en el Xcelligence. Se sembraron 60,000 células HUVEC/pozo (300% de confluencia), y se dejó la placa 30 minutos a temperatura ambiente para que las células se asentaran uniformemente. La E-plate se metió a la incubadora a 37°C y se conectó al Xcelligence. El equipo se programó para que registrara la TEER cada 15 minutos por 24 horas.

Al día siguiente se verificó que las HUVEC formaron una monocapa viéndolas al microscopio y que su TEER, tuviera un valor mínimo de 4, constante con respecto al tiempo, durante las 12 horas anteriores. Los estímulos se agregaron a los pozos sin quitar el medio en el que se sembraron las HUVEC. Se destapó temporalmente la E-plate, manteniéndola conectada al equipo dentro de la incubadora, y los secretomas se adicionaron 10 y 100 veces concentrados en 3 pozos independientes (triplicado) en un volumen no mayor a 20 µl (1 /10 parte del volumen total del pozo que le caben 200 µL de volumen) de tal forma que quedarán 1X y 10X respectivamente.

El TNF (R & D Systems, P01375) se agregó de la misma forma que los secretomas, para que quedara a una concentración de 10 ng/ml en los pozos. Lo anterior se hizo para disminuir modificaciones en la resistencia eléctrica no relevantes, por el cambio de temperatura y por el cambio de medio.

El destapar las placas afuera de la campana de flujo laminar para poner el estímulo, pudo comprometer la esterilidad del cultivo de HUVEC. Sin embargo, en ninguno de los pozos utilizados en este estudio se observó crecimiento de microorganismos, tal vez por el tiempo relativamente corto que se mantuvo el cultivo de HUVEC posteriormente (24 horas). Después de poner los estímulos se programó el Xcelligence para que registrará la TEER de todos los pozos cada 10 minutos durante las siguientes 24 horas. Una vez terminado el experimento, se desechó el medio por decantación, se tripsinizaron las HUVEC, se lavó la placa con PBS hasta que no quedó ninguna célula adherida, se esterilizó la placa por UV y se re-utilizó.

10.0 Resultados

10.1 Efecto del secretoma de MDA-MB-231 sobre la TEER de HUVEC sub-confluentes

Se realizó un análisis de la TEER en tiempo real de un cultivo sub-confluyente de HUVEC (20,000 células/cm²) en presencia del secretoma de MDA-MB-231 (figura 7). El archivo con los datos crudos se llama 1506121523D14000 y se describe en el apéndice 5. Las células se sembraron en la E-plate 16 del RTCA DP Xcelligence (ver sección de material y métodos). Esto sirvió para determinar si dicho secretoma era tóxico para las células HUVEC. También este experimento permite evaluar la ventana de tiempo máxima de exposición que se podían dejar las HUVEC en presencia dicho secretoma.

Las células fueron sembradas en medio que contenía todos los suplementos descritos en la sección de material y métodos de esta tesis. El secretoma de MDA-MB-231 fue diluido 1:1 en medio de células HUVEC con 10% de SFB, sin los otros suplementos en los que normalmente se mantienen las HUVEC. El control positivo de proliferación fue VEGF (8 ng/ml). A otra condición experimental se le adicionó 20 ng de suplemento de crecimiento de células endoteliales (ECGS), que es el factor mitogénico común para células HUVEC. La condición experimental sin estímulo fue donde no se adiciono ningún suplemento, pues se sabía que no era tóxica para las células. Los estímulos fueron colocados en células HUVEC 66 horas posteriores a la siembra, cuando se encontraban en fase de crecimiento (log) y a sub-confluencia.

Se observó que el secretoma de MDA-MB-231 no concentrado, induce un aumento constante en la TEER de HUVEC por 72 horas (Figura 7A), con respecto a la condición basal. El efecto del secretoma de MDA-MB-231 es similar al que induce el ECGS y el VEGF. Posterior a las 72 horas (datos no mostrados) las HUVEC de todas las condiciones disminuyen gradualmente su TEER hasta alcanzar cero.

Como se observa en la figura 7^a había diferencias en la TEER de los diferentes pozos antes de poner el estímulo. En particular se puede observar que los pozos que fueron posteriormente estimulados con VEGF y sin estímulo tenían una TEER menor que los otros estímulos. Por lo tanto para poder discernir mejor las diferencias en TEER causadas por los estímulos, se procedió hacer una doble normalización de los datos (figura 7B). Primero se normalizó con respecto al tiempo en que se aplicó el estímulo, de tal forma que al momento del estímulo la TEER tuviera un valor 1, para todos los pozos, independientemente del estímulo (se dividió todos los datos de un pozo entre el valor de TEER del tiempo en que se puso el estímulo a ese pozo).

Adicionalmente el control negativo, la condición sin estímulo se grafico como una línea basal, de forma tal que todos los estímulos se graficaron con respecto al control negativo como si este fuera cero (Figura 7B). Gracias a esta doble normalización se observa que el efecto del secretoma de MDA-MB-231 no concentrado alcanza su máximo a las 24.4 horas post-estímulo. La normalización ayuda particularmente para mostrar que el efecto del control positivo VEGF (8ng/ml) es mayor que él de los otros estímulos.

En términos cuantitativos el secretoma de MDA-MB-231 induce a las 24.4 horas un efecto 52% mayor que la condición sin estímulo sobre la TEER de las HUVEC (Figura 7C). El VEGF induce a las 38.1 horas su efecto máximo de 117% con respecto a la condición sin estímulo. El ECGF induce a las 47.1 horas su efecto máximo de 43% sobre la TEER.

Todos los estímulos generan una pendiente positiva en las primeras 2 horas post-estímulo (figura 7D). Después todos los estímulos generan una pendiente muy cercana a cero, para después desencadenar un aumento en la pendiente de menor magnitud al producido en las primeras 2 horas post-estimulo. También se observa que la pendiente de las HUVEC tratadas con VEGF se mantiene como las más grande y positiva de todos los estímulos.

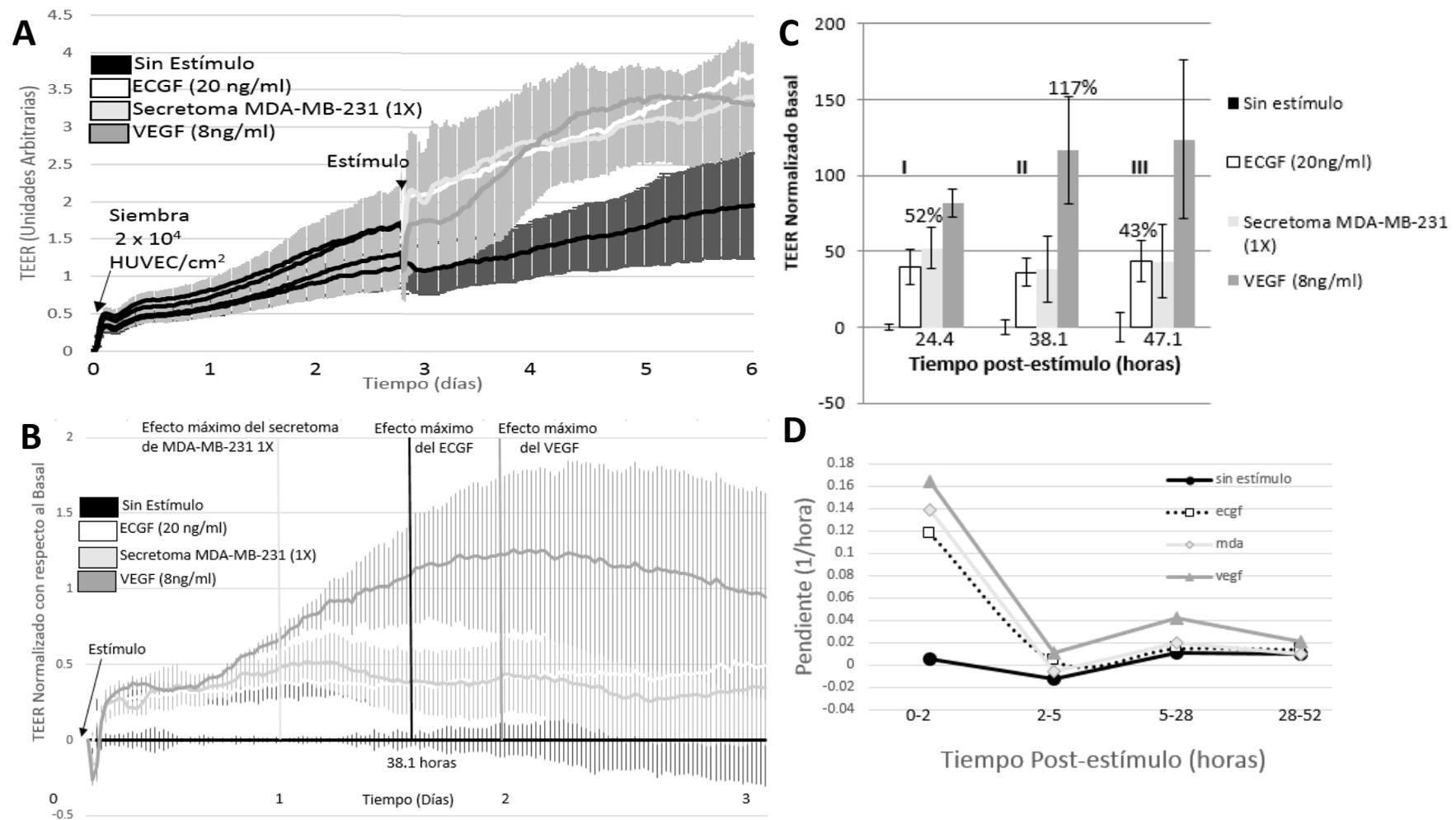


Figura 7: Efecto del VEGF, ECGS y secretoma de MDA-MB-231 no concentrado sobre la TEER medida en tiempo real de células HUVEC sembradas a baja confluencia ($16,000$ células/cm²). Los datos crudos se encuentran en el archivo: 1506121523D14000.plt. Cada condición se sembró por triplicado. Se muestra el promedio de los datos con su desviación estándar de un solo experimento independiente. **Panel A:** Se muestran los datos sin normalizar y el tiempo 0 corresponde al momento de sembrar las células. **Panel B:** Los datos fueron normalizados con respecto a la condición sin estímulo (basal) y el tiempo 0 corresponde al momento del estímulo. Las rayas verticales indican los tiempos en que se ven las TEER máximas inducidas por los diferentes estímulos. **Panel C:** Porcentaje de aumento de la TEER con respecto al control inducido por los diferentes estímulos a i) 24.4 ii) 38.1 y iii) 47.1 horas post-estímulo. **Panel D:** Valores de la pendiente de la TEER para los diferentes estímulos, en diferentes lapsos de tiempo, que cubren en total todo el experimento.

10.2 Efecto del secretoma de MDA-MB-231 sobre la TEER de una monocapa confluyente de HUVEC

10.2.1 Determinación del número óptimo de células HUVEC para formar una monocapa con TEER máxima

En medio suplementado (ver sección de material y métodos) se sembraron diferentes número de células HUVEC en pozos del Xcelligence y se registró la TEER durante 180 horas (figura 8). El archivo con los datos crudos se llama 1506021737D3huvecdensidades y se describe en el apéndice 5. La TEER al tiempo 0 corresponde al medio de cultivo sin células, que el equipo automáticamente toma como 0 (unidades arbitrarias).

Durante el experimento se realizaron tres cambios de medios (indicados por cuadros negros en la figura 8). El número mayor (160,000 células/cm²) de células HUVEC sembradas alcanzó su TEER máxima, a las 48 horas de haberse sembrado. Los pozos donde se sembró un número menor de células alcanzaron una TEER máxima a las 140 horas (6 días después) de haberse sembrado. La condición donde se sembró el menor número de células (10,000 células/cm²) al final de las 180 horas no había alcanzado la TEER máxima o similar a las otras condiciones experimentales. Inesperadamente se observó que los cambios de medio, cuando las células HUVEC ya habían alcanzado su TEER máxima inducen una disminución neta de la TEER, que no se recupera en cuestión de horas.

Se consideró entonces que 160,000 células/cm² o un número mayor, que se evaluó en posteriores experimentos, podría ser lo óptimo para formar una monocapa en el menor tiempo posible.

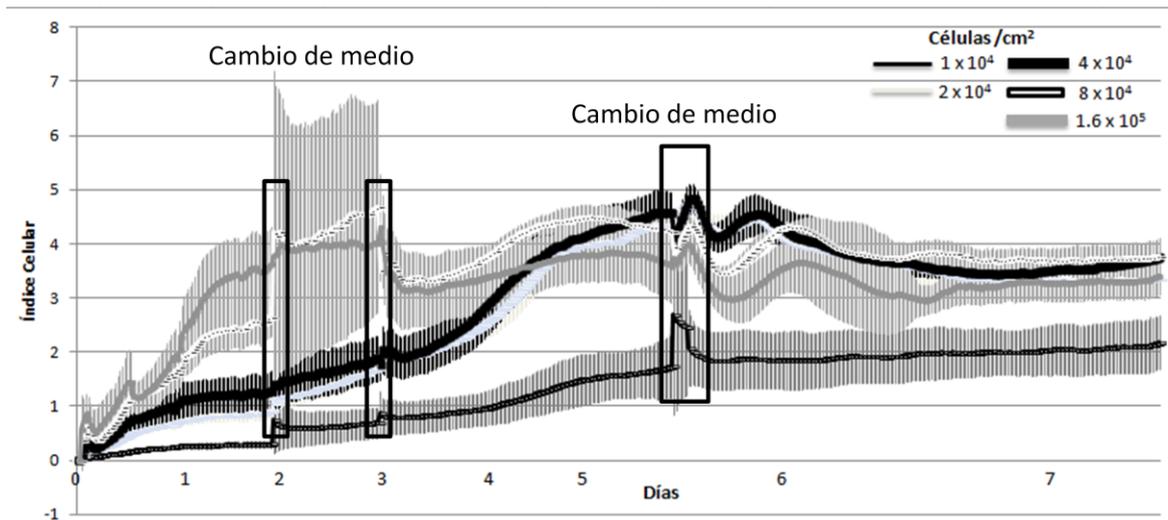


Figura 8: Registro de TEER por 180 horas (7.5 días) de una dilución geométrica de células HUVEC, cuyo factor de dilución es igual a 2, la concentración menor es 10,000 células/cm² y la concentración mayor es 160,000 células/cm². Los datos crudos se encuentran en el archivo: 1506021737D3huvecdensidades.plt. Cada condición se evaluó por triplicado y se muestra el promedio de los datos con su desviación estándar. Los rectángulos negros muestran los cambios de medio, y la perturbación en la TEER derivada de ello.

10.2.2 Efecto de adicionar los estímulos afuera de la incubadora y simultáneo al cambio de medio sobre la TEER de HUVEC confluentes

Se realizó un análisis en tiempo real de la TEER de 300,000 células HUVEC/cm² sembradas en medio suplementado como normalmente se mantiene las HUVEC (Figura 9). El archivo con los datos crudos se llama 1510191134D3intento3.plt y se describe en el apéndice 5.

Dos horas después de haberse sembrado, las HUVEC aumentaron su TEER súbitamente a un valor de 2, esto sugiere que el asentamiento de las HUVEC en el fondo del pozo, es suficiente para generar una interferencia en la corriente eléctrica, que pasa a través de los electrodos del pozo. Las oscilaciones (aumento y disminución) en la TEER, que ocurren entre las 2 horas y las 36 horas post-siembra, pueden deberse a fenómenos celulares como: la adhesión, retracción, migración, formación de uniones intercelulares y proliferación de las células HUVEC, que permiten que se forme una monocapa que cubre el pozo en su totalidad. La caracterización precisa de dichos fenómenos celulares, sobrepasa el interés principal de esta tesis y no se describirán en más detalle.

La densidad celular sembrada alcanzo una TEER máxima en la mitad del tiempo (20 horas) que las 160,000 células/cm² del experimento descrito en la sección anterior.

A las 22 horas post-siembra se estimularon las HUVEC. Para ello se sacaron las HUVEC de la incubadora y se les retiró el medio del día anterior (tal y como se habían hecho los experimentos con las HUVEC sub-confluentes). Se colocaron los estímulos disueltos 1:1 en medio de cultivo para HUVEC y se continuó con el registro de la TEER. Se observó una caída súbita en la TEER en todas las condiciones experimentales, seguida de un aumento súbito y después el registro se estabilizo, mostrando diferencias entre los diferentes estímulos.

Llamó la atención que la TEER de las células HUVEC estimuladas con TNF (10ng/ml) se mantuviera por encima de la condición sin estímulo y con vehículo. Está documentado que el TNF induce un disminución en la TEER en 10 horas, que correlaciona con un aumento en la permeabilidad vascular (Kustermann et al. 2014). Por otra parte se observó que los secretomas de ambas líneas celulares de cáncer de mama inducían 3 horas post-estímulo una disminución mayor de la TEER que los otros estímulos. La TEER de las HUVEC tratadas con los secretomas tumorales se mantuvo por debajo del control sin estímulo y el vehículo. El secretoma de MDA-MB-231 a largo plazo indujo el TEER más bajo. La condición de sin estímulo y vehículo a largo plazo no regresaron a valores de TEER similares a antes de poner los estímulos.

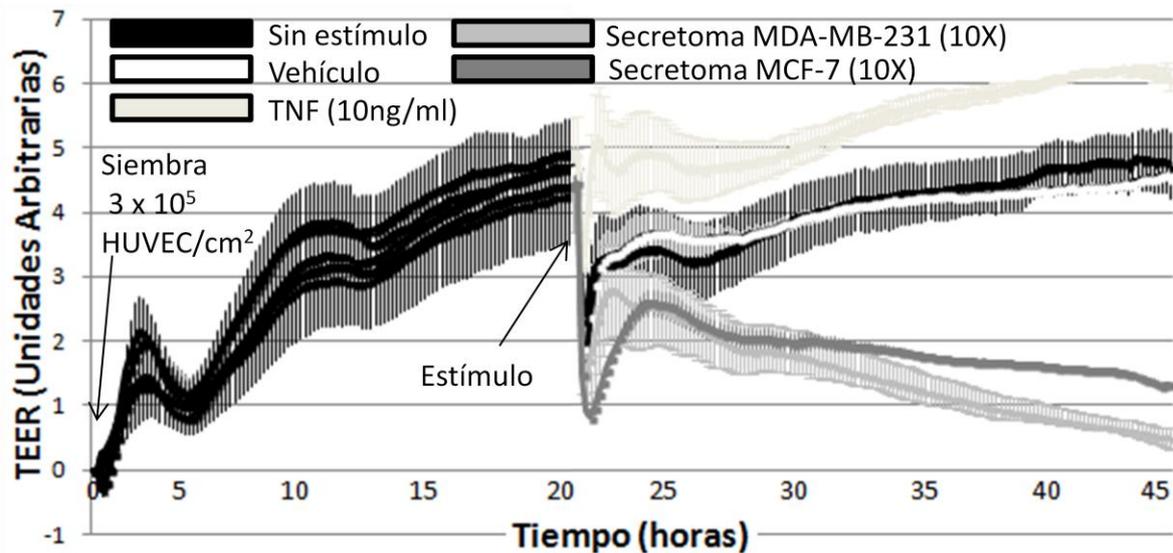


Figura 9: Efecto de adicionar los estímulos afuera de la incubadora y simultáneo al cambio de medio sobre la TEER de HUVEC confluente. Los datos crudos se encuentran en el archivo: 1510191134D3intento3.plt. Los estímulos que se colocaron se detallan en la esquina superior izquierda. La TEER se midió cada 30 minutos durante 47 horas, los estímulos se pusieron 22 horas después de haberse sembrado las HUVEC. Cada condición se evaluó por duplicado y se muestra el promedio de los datos con su desviación estándar de un solo experimento independiente.

10.2.3 Reproducción del efecto reportado del TNF sobre la TEER de HUVEC

Se repitió el experimento anterior, con solo 2 condiciones experimentales y modificando la forma de poner el estímulo (Figura 10). El archivo con los datos crudos se llama 1511010118D0.plt y se describe en el apéndice 5. Esta vez se realizó un cambio de medio 7 horas previo al estímulo. Posteriormente, al momento de poner el estímulo solo se retiró la mitad del medio del pozo. Se colocó el TNF disuelto 1:1 en medio de cultivo. En la condición de sin estímulo solo se adicionó más medio de cultivo. Inmediatamente después de poner el estímulo se observó una caída súbita en la TEER de ambas condiciones experimentales, seguida de un aumento de la TEER y finalmente una estabilidad de la TEER con valores diferentes para los 2 estímulos. Las HUVEC tratadas con TNF a largo plazo tuvieron una TEER por debajo de la condición sin estímulo, que coincide con lo reportado en la literatura (Kustermann et al. 2014).

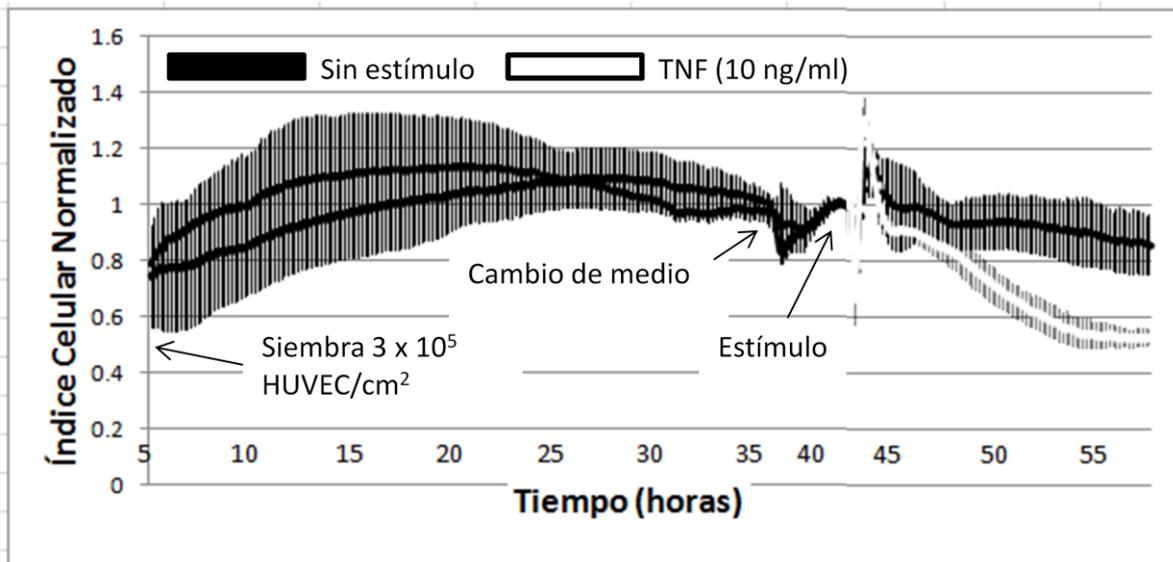


Figura 10: Efecto de cambiar el medio previo al estímulo de TNF (10 ng/ml) sobre la TEER de una monocapa de HUVEC. Los datos crudos se encuentran en el archivo: 1511010118D0.plt. El estímulo se colocó, quitando solo la mitad del medio de cultivo donde se sembraron las células HUVEC del día anterior. La TEER se midió cada 30 minutos durante 58 horas, el estímulo se pusieron 36 horas después de haberse sembrado las HUVEC. Cada condición se evaluó por triplicado y se muestra el promedio de los datos con su desviación estándar de un solo experimento independiente.

10.2.4 Evaluación del efecto del secretoma de MDA-MB-231 sobre la TEER de HUVEC confluentes en condiciones mejoradas

Como se observa en la figura 11A, para este experimento se sembraron 3.25×10^5 HUVEC/cm². Las HUVEC tendieron a un valor de 5.5 tras 24 horas de haberse sembrado. Dicho valor lo mantuvieron aproximadamente durante 12 horas y después se puso el estímulo (36 horas post-siembra). El valor de 5.5 de TEER ha sido alcanzado y mantenido por las HUVEC en todos los experimentos anteriores (figuras 8 a 10).

La forma de adicionar los estímulos, fue diferente con respecto a los experimentos anteriores. Las HUVEC se mantuvieron en la incubadora durante la adición del estímulo. Se abrió la puerta de la incubadora, se sacó el Xcelligence con todo y la mitad de la charola que tiene abajo. Se mantuvo la E-plate conectada al equipo para adicionar al estímulo. No se retiró el medio en que fueron sembradas las HUVEC y se adicionó 20 μ L de estímulo, 10 veces concentrado, para que en el pozo, que contenía aproximadamente 200 μ l de medio de cultivo, quedara a la concentración deseada.

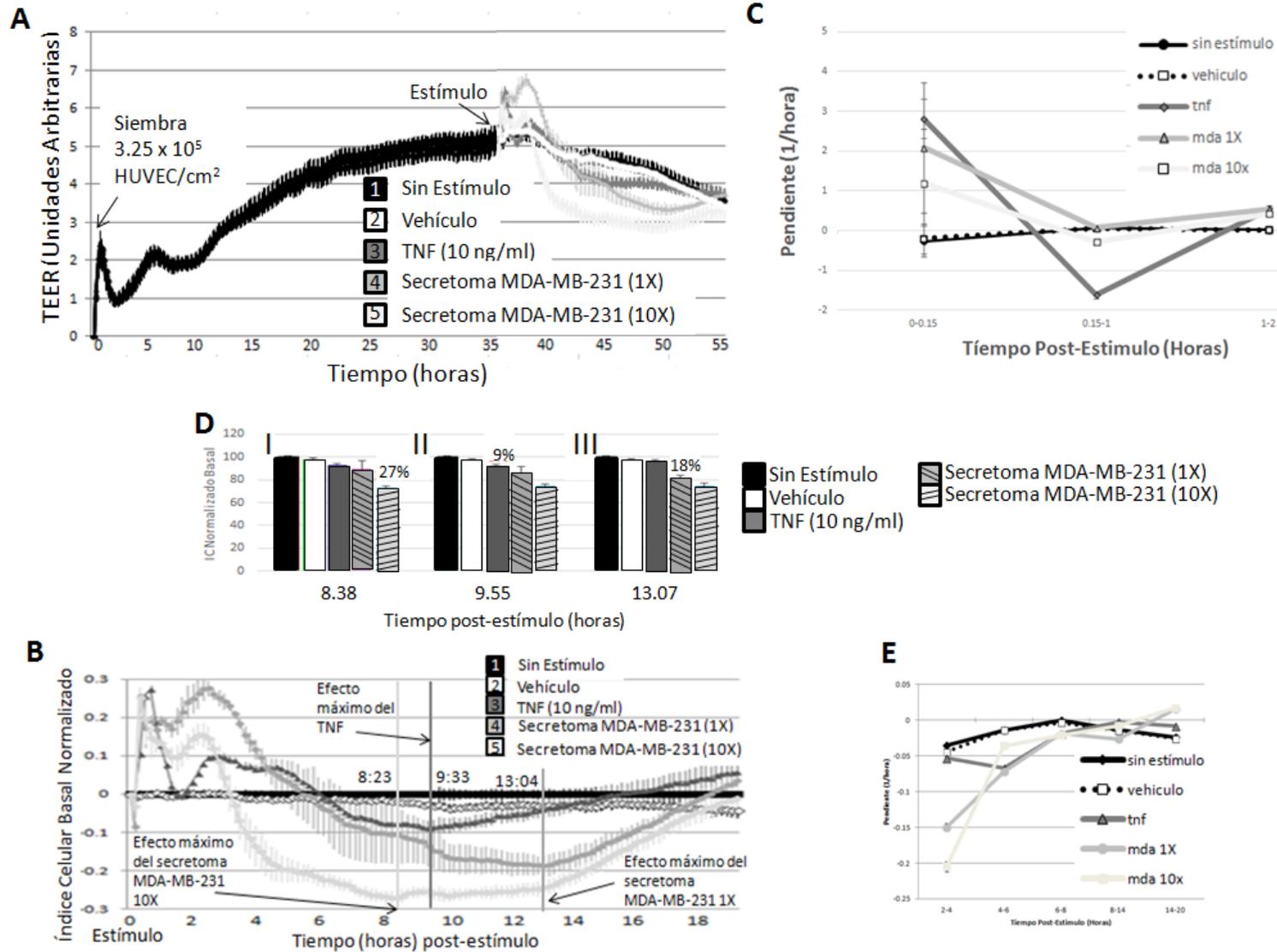


Figura 11: Efecto del TNF (10 ng/ml), secretoma de MDA-MB-231 no concentrado y concentrado 10 veces sobre la TEER de una monocapa de HUVEC. **Panel A:** La TEER se midió cada 30 minutos durante 55 horas, los estímulos se pusieron 36 horas después de haberse sembrado las HUVEC. Los números dentro los recuadros de los diferentes estímulos corresponden al orden en que se pusieron los estímulos. Cada condición se evaluó por triplicado y se muestra el promedio de los datos con su desviación estándar de un solo experimento independiente. **Panel B:** Los datos fueron normalizados con respecto a la condición sin estímulo (basal) y el tiempo 0 corresponde al momento del estímulo. Las rayas verticales grises indican los tiempos en que se ven las TEER máximas inducidas por los diferentes estímulos. **Panel C:** Valores de la pendiente de la TEER para los diferentes estímulos, en diferentes lapsos de tiempo, que cubren las primeras 2 horas post-estimulo. **Panel D:** Porcentaje de disminución de la TEER con respecto al control inducido por los diferentes estímulos a i) 8.38 ii) 9.55 y iii) 13.07 horas post-estimulo. **Panel E:** Valores de la pendiente de la TEER para los diferentes estímulos, en diferentes lapsos de tiempo, que cubren en total todo el experimento después del estímulo, excepto las primeras 2 horas post-estimulo que se cubrieron en el panel C.

10.2.4.1 Efectos 2 horas post-estímulo

A diferencia de los experimentos anteriores, la adición del estímulo no produjo una caída súbita de la TEER. Sin embargo, tanto el TNF como el secretoma de MDA-MB-231 a las 2 concentraciones probadas, volvió a inducir un aumento inmediato, oscilatorio y transitorio de la TEER (figura 11A y B). Dicho aumento en la TEER, esta vez, no se observó en las condiciones de sin estímulo ni de vehículo (figura 11A y B). En el caso del TNF, el aumento de la TEER es seguido de una disminución drástica del TEER. Como se observa en la figura 11C, el valor de la pendiente del minuto 15 al 60 (después del estímulo del TNF) es de -2, dicho valor es el más negativo que se midió en todo el experimento. Posteriormente la TEER aumenta otra vez hasta alcanzar valores similares a las HUVEC sin estímulo (figura 11A y B).

Las HUVEC tratadas con secretoma 10 veces concentrado de MDA-MB-231, después del aumento inmediato post-estímulo de la TEER, también sufren un ligera disminución de su TEER, que se mantiene en valores de pendiente similares a las HUVEC sin estímulo durante las primeras 2 horas post-estímulo (figura 11C). El secretoma sin concentrar de MDA-MB-231 generó el mayor aumento en la TEER en las primeras 2 horas post-estímulo (figura 11A). Sin embargo también presentó oscilaciones, como se observa en sus valores de pendiente (figura 11C).

10.2.4.2 Efectos 2-13 horas post-estímulo

Como se observa en la figura 11B, 3.5 horas después de haber puesto el estímulo, el secretoma de MDA-MB-231 concentrado 10 veces, genera una disminución significativa de la TEER con respecto a la condición sin estímulo. En este punto (entre las 2 y las 4 horas post-estímulo) se observa la pendiente más negativa (figura 11E) generada por dicho estímulo. El efecto máximo (-27%) del secretoma de MDA-MB-231 ocurre a las 8.38 horas post-estímulo (figura 11B y D (I)). La pendiente negativa se mantiene hasta las 13 horas post-estímulo (figura 11E).

El secretoma no concentrado de MDA-MB-231 tiene una cinética diferente. Hasta las 8.38 horas post-estímulo (figura 11B) induce una disminución de la TEER

que es significativamente menor a la condición sin estímulo (-11%). A las 13 horas post-estímulo alcanza a inducir su efecto máximo de -19% (figura 11B y 11D (II)).

El efecto del TNF es similar al del secretoma no concentrado a las 8.38 horas (8%), ejerce su efecto máximo a las 9.55 horas (-9%) y a las 13.5 horas disminuye su magnitud a -8% (figura 11B y D). En cuanto al análisis de la pendiente de la gráfica de TNF, en este intervalo de tiempo ya no alcanza valores tan negativos como las gráficas del secretoma de MDA-MB-231 (figura 11E). También se observa que el TNF al igual que el secretoma no concentrado de MDA-MB-231 tarda más en disminuir la TEER por debajo de la condición sin estímulo que el secretoma concentrado 10 veces (figura 11B).

10.2.4.3 Efectos 13-20 horas post-estímulo

Tanto las células no tratadas, como las tratadas con el vehículo, disminuyen su TEER después del tiempo en que se pusieron los estímulos en los otros pozos. A las 8.5 horas post-estímulo ambas controles negativos sufren una disminución de 12% y después de 20 horas del estímulo las células alcanzan los mismos valores de TEER que las que fueron expuestas a los otros estímulos (figura 11A). Esto se hace más evidentemente si se analiza la pendiente de las gráficas de dichos estímulos (figura 11E), pues se observa que es siempre es negativa.

Por otra parte llama la atención que las HUVEC tratadas con el secretoma no concentrado y concentrado 10 veces de MDA-MB-231 desde la hora 14 hasta la 20 (donde se suspendió la medición) sufren un aumento en su TEER (figura 11B). Este aumento no alcanza a superar los valores de TEER de las HUVEC sin estímulo. Este fenómeno es más evidente si, se observa en la figura 11E, que en el lapso antes mencionado, para las HUVEC tratados con los secretomas la pendiente es positiva (0.02/hora), mientras que es negativa para la condición sin estímulo, vehículo (-0,02/hora) y TNF (-0.01/ hora).

10.3 Efecto del secretoma de ZR-75-30 sobre la TEER de monocapas confluentes de Eahy926 y HMEC-1

Se analizó la sensibilidad de 2 líneas celulares endoteliales Eahy926 (Figura 12^a) y HMEC-1 (figura 12B) al estímulo de TNF (10 ng/ml) y secretoma no concentrado de ZR-75-30. Los valores de TEER de las Eahy926 en las primeras 3 horas es 6.5 unidades arbitrarias (figura 12A), muy superior al 2.0 alcanzado por el mismo número de células HUVEC primarias sembradas anteriormente (figura 11A). Las 65,000 HMEC-1 alcanzan un valor de TEER de 9.0 en este mismo periodo de tiempo (figura 12B).

En el periodo comprendido de las 3-23 horas, justo antes del estímulo, las Eahy926 y las HMEC-1 (figura 12 A y B) reproducen parcialmente la forma de la curva de TEER mostrado por las HUVEC primaria (figura 11A). Ambas líneas celulares muestran una caída inicial de su TEER (25%) en las primeras 6 horas de este periodo, en comparación con la caída del 60% de TEER de las HUVEC. Acto seguido la TEER en ambas líneas celulares aumenta con una pendiente mucho menor al cultivo primario, hasta que alcanza una pendiente neutra (meseta). Las líneas celulares parecieran sufrir cambios con menor magnitud desde que se adhieren hasta que alcanzan una TEER estable en comparación con las HUVEC. Resulta interesante notar que la TEER (5.5 de unidades arbitrarias) en la que se estabiliza las EAhy926 es muy similar al de las HUVEC primarias. Las HMEC-1 se estabilizan en un valor de TEER de 7.5.

Se observó que el TNF en las células Eahy926 induce una disminución más exacerbada que lo que indujo en las HUVEC de cultivo primario (figura 11A y 12A). Pero en células HMEC-1 el TNF no induce una disminución de la TEER, sino al contrario a largo plazo tiende a aumentarlo. Por otra parte el secretoma de ZR-75-30 no induce una disminución de la TEER, de ninguna de las 2 líneas celulares endoteliales evaluadas. También se observa que las células sin estímulo o incubadas con el vehículo aumentan su TEER. Cabe destacar que los estímulos se pusieron de la misma forma que en el experimento anterior con HUVEC. En otras palabras no se retiró el medio previo al estímulo, ni se sacó la placa con células de la incubadora.

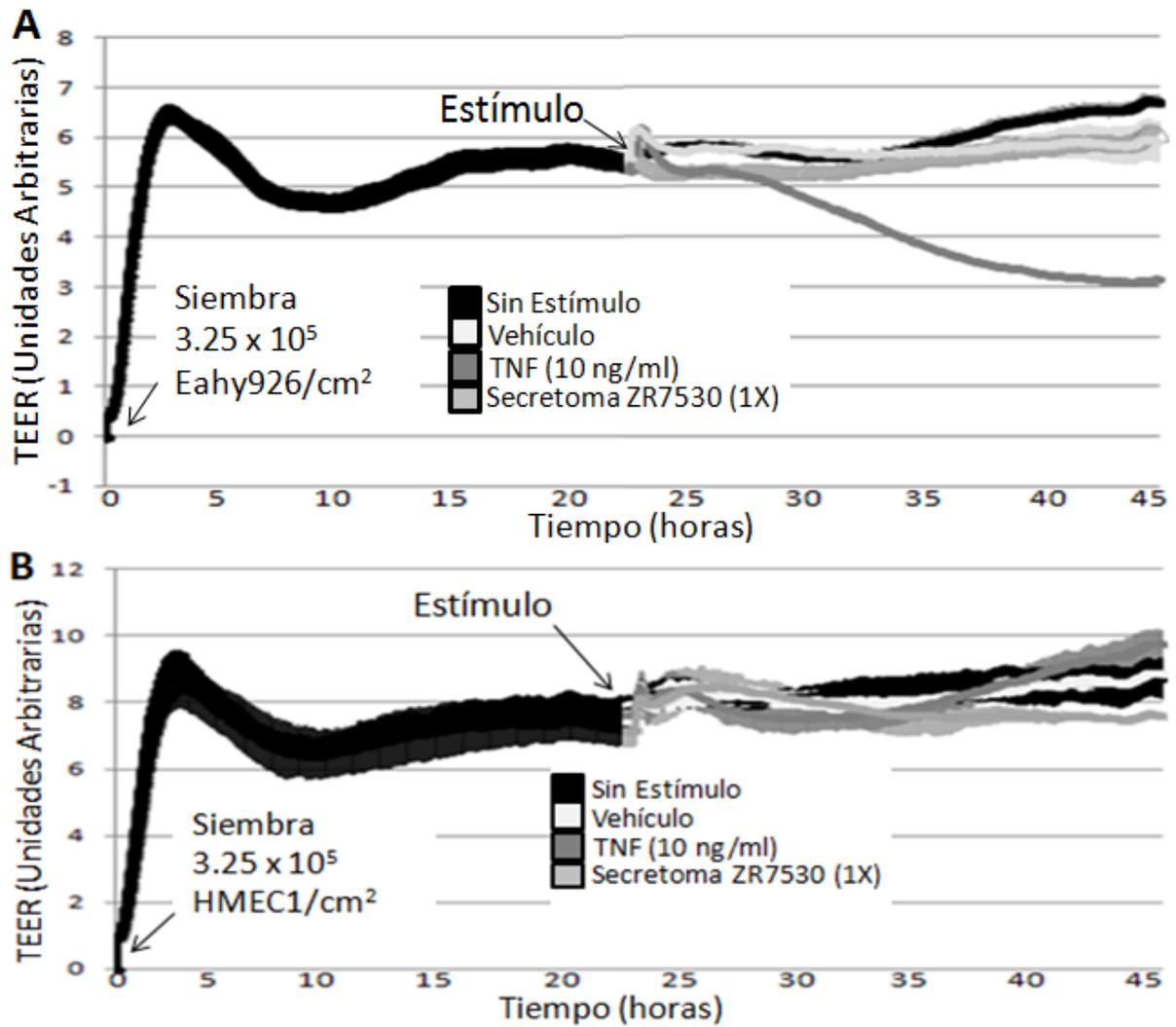


Figura 12: Registro de TEER de 3.25×10^5 células/cm²: HUVEC inmortalizadas (Eahy926) (**Panel A**), HMEC1 (**Panel B**) tratadas con TNF (10 ng/ml), secretoma de ZR-75-30 (1X) o vehículo. Cada condición se evaluó por duplicado y se muestra el promedio de los datos con su desviación estándar de un solo experimento independiente.

11.0 Discusión

El efecto negativo que tiene el secretoma de MDA-MB-231 sobre la permeabilidad vascular de HUVEC ya ha sido reportado en un congreso (Gallardo Vera & Zentella Dehesa 2017). En el ensayo descrito, el efecto de dicho secretoma es 30% mayor al ejercido por el TNF a 10 horas de estímulo. La concentración del secretoma fue de 10 µg/ml. La permeabilidad vascular fue medida por la cuantificación de FITC-dextrán que atravesó la monocapa de HUVEC. Interesantemente también se mostró que el pre-tratamiento de HUVEC con el secretoma de MDA-MB-231 exagera 1.5 veces la transmigración endotelial de las células MDA-MB-231 con respecto a HUVEC no tratadas. En otro congreso previo se reportó que el secretoma de ZR-75-30 aumenta la permeabilidad vascular de HUVEC en un 50%, con respecto a lo que puede inducir el TNF (Gallardo Vera et al. 2014). La concentración del secretoma de ZR-75-30 también fue de 10 µg/ml. Dicho efecto requirió incubar las células HUVEC durante 12 horas con el secretoma.

Los resultados de esta tesis coinciden con lo reportado previamente por Gallardo Vera y colaboradores. En particular se coincide en el orden de magnitud que tarda el secretoma de MDA-MB-231 en inducir un efecto sobre la permeabilidad vascular. Gallardo-Vera y colaboradores reportan que ocurre a las 10 horas. Nuestros resultados sugieren que la TEER alcanza su máxima disminución desde las 8 horas. La diferencia se puede deber a que Gallardo-Vera y colaboradores miden una molécula más grande, el paso de FITC-dextrán y en esta tesis se mide una partícula mucho más pequeña que pasaría más rápidamente, en principio electrones.

Gallardo-Vera y colaboradores también han hecho experimentos de TEER en el sistema Xcelligence (comunicación personal). Sus resultados son muy similares a los que se reportan en esta tesis. Sin embargo en su trabajo, no queda claro si las fluctuaciones iniciales (0-2 horas post-estimulo) son dependientes del estímulo o no. En esta tesis se sugiere que la disminución inicial en la TEER no depende del

estímulo per se. Más bien resulta muy importante la forma en que se pone el estímulo, como se discute a continuación.

11.1 Efecto del secretoma de MDA-MB-231 sobre la TEER de HUVEC sub-confluentes

Un reporte previo, mostraba que el secretoma de MDA-MB-231 inducía un aumento del 50% en la proliferación de las HUVEC (Li et al. 2003). Se reprodujo dicho experimento en el sistema Xcelligence para corroborar que el secretoma de MDA-MB-231 no fuera tóxico sobre las HUVEC (figura 7).

La TEER de un cultivo celular se ha mostrado que correlaciona con su viabilidad, proliferación y muerte (Limame et al. 2012)(Roshan Moniri et al. 2015). En nuestro experimento observamos que, después de 24 horas, el secretoma de MDA-MB-231 indujo un aumento en la TEER de 52% con respecto a las células HUVEC no estimuladas.

11.2 Efecto del secretoma de MDA-MB-231 sobre la TEER de una monocapa confluyente de HUVEC

11.2.1 Determinación del número óptimo de células HUVEC para formar una monocapa con TEER máxima

Específicamente para el sistema Xcelligence, los reportes anteriores eran contradictorios en cuantas células HUVEC se necesitaban sembrar inicialmente y en cuanto tiempo se formaba una monocapa (Kustermann et al. 2014; Rahim & Üren 2011; Gallardo Vera & Zentella Dehesa 2017) . Por lo que se decidió sembrar una progresión geométrica de número de células HUVEC en medio M199 suplementado (Figura 8).

Con 32,000 células la TEER máxima, se alcanza en aproximadamente 48 horas, el resto de las condiciones experimentales requiere de aproximadamente 120 horas (5 días). Los experimentos subsecuentes de esta tesis se hicieron con aproximadamente 3.25×10^5 HUVEC/cm² (figura 9, 10, 11 y 12). Dicha densidad es la que ya había establecido previamente Gallardo-Vera M (tesis en preparación). Sembrar un número menor de células, solo retrasa el tiempo en que se forma la monocapa en nuestras condiciones experimentales.

Una observación inesperada de este experimento es que el cambio de medio modifica la TEER (rectángulos negros figura 8). Esta modificación es particularmente notable cuando las HUVEC han formado una monocapa íntegra. A tiempos muy cortos el cambio de medio provoca una serie de decrementos e incrementos súbitos en la TEER. Después se genera una disminución neta en la TEER, que tarda por lo menos 24 horas, en volver a valores semejantes a los que tenía antes del cambio de medio. Una explicación a este fenómeno se da en la siguiente sección de la discusión.

11.2.2 Efecto de adicionar el estímulo afuera de la incubadora y simultáneo al cambio de medio sobre la TEER de HUVEC confluentes

La mayoría de los protocolos reportados, para evaluar el efecto de algún estímulo, sobre un cultivo confluyente de HUVEC en el sistema Xcelligence, no mencionaban que tomáramos alguna precaución especial a la hora de agregar los estímulos (Rahim et.al 2011) (Kusterman et al., 2014). Por lo tanto realizamos el experimento cuyos resultados se muestran en la figura 9, como si estuviéramos haciendo un experimento con cualquier otra técnica de biología celular.

En todas las condiciones experimentales se observó una caída en la TEER y una recuperación total o parcial de la TEER dependiendo del estímulo. La disminución inicial de la TEER podría deberse a la hipotermia que sufren las HUVEC al sacar la E-plate de la incubadora para poner el estímulo. La recuperación de la TEER a su vez podría deberse a que las células se regresaron a la incubadora después de poner el estímulo, y la hipotermia desapareció. En el caso de las HUVEC tratadas con el secretoma de las células tumorales, la recuperación de la TEER por meter la placa a la incubadora, se ve comprometida por el efecto del estímulo. La incubadora está a 37°C y nuestro cuarto de cultivo tiene una

temperatura promedio de 19°C, gracias a que cuenta con aire acondicionado, para dificultar el crecimiento de microorganismos.

El efecto negativo que tiene la hipotermia sobre la TEER ha sido documentado previamente en células endoteliales de la barrera hematoencefálica murinas (Inamura et al. 2013). En dicho trabajo observaron que el meter a las células a una incubadora con 5% CO₂ a 15°C durante 1 hora disminuye la TEER en un 50%. Por otra parte después de haber dejado las células durante 24 horas a 15°C, si las células se pasan a una incubadora a 37°C en 1 hora recuperan su TEER. Interesantemente también muestran que la disminución en TEER por la hipotermia está asociada a una movilización de la Claudina-5 (proteína de las uniones estrechas), de membrana a citoplasma mediante inmunofluorescencia y western blot de la fracción citoplásmica y membranal. Por lo que se puede concluir que la hipotermia causa un efecto biológico sobre las células endoteliales, y no se trata entonces de algún artefacto en la medición de la TEER.

El efecto de la hipotermia también ha sido documentado en HUVEC, más no por medición de su TEER (Brinkkoetter et al. 2006). En dicho trabajo sometieron a la HUVEC a una temperatura de 4°C por 24 horas. Posteriormente las HUVEC se atemperaron a 37°C durante otras 24 horas. Observaron un aumento de 8 veces en la permeabilidad vascular de las HUVEC que fueron sometidas a la hipotermia, con respecto a células que no fueron sometidas a hipotermia. El aumento de la permeabilidad vascular se acompañó de una disminución en la tinción membranal de ZO-1 y VE-Cadherina, proteínas que participan en la formación de uniones intercelulares.

Otra posible explicación, es que el cambio de medio per se afecta la TEER de las HUVEC. El quitar el medio induce la retracción inmediata de la HUVEC y la adición del nuevo medio gradualmente induce el estiramiento de las HUVEC. A favor de esta explicación esta nuestra experiencia con las HUVEC. Hemos visto que son células susceptibles a retraerse y desprenderse ante insultos leves como el cambio de medio o lavados con PBS.

11.2.3 Reproducción del efecto reportado del TNF sobre la TEER de HUVEC

Reproducir un efecto antes reportado, permite validar que la metodología empleada está bien aplicada. En nuestro caso que el TNF no indujera una disminución sobre la TEER de las HUVEC, ponía en duda que nuestro stock de dicho citocina tuviera actividad biológica o que nuestro cultivo de HUVEC tenía alguna alteración patológica (por provenir de un donador cuya historia clínica no conocíamos) que la hacía refractaria al efecto del TNF.

En el siguiente experimento (figura 10) hicimos el cambio de medio previo al estímulo, dejamos reposar las células dentro de la incubadora 6 horas antes de poner el estímulo, y solo retiramos la mitad del medio a la hora de poner el estímulo. Estos cambios no evito la caída y posterior recuperación de la TEER durante las primeras 7 horas post-estimulo. Esto refuerza la idea de que la hipotermia que sufren nuestras HUVEC al sacarlas de la incubadora afecta negativamente su TEER. Sin embargo se observó que en tiempos posteriores la TEER de las HUVEC estimuladas con TNF era menor al de las HUVEC sin estímulo, como estaba reportado en la literatura.

11.2.4 Evaluación del efecto del secretoma de MDA-MB-231 sobre la TEER de HUVEC confluentes en condiciones mejoradas

Para evitar la disminución basal en la TEER, por el cambio de medio al adicionar los secretomas, se optó por no hacer dicho cambio de medio. Además se adicionó un volumen muy pequeño (20 μ l), con respecto al volumen de medio (200 μ l) del pozo, como sugirió el fabricante del equipo Xcelligence. Sin embargo, esta estrategia trajo consigo el cuestionamiento de cuánto tiempo iban a permanecer vivas tantas células. Normalmente se les cambia el medio a las HUVEC cada 48 horas. Sin embargo en nuestro experimento las HUVEC no tratadas apenas empiezan a disminuir su TEER a las 36 horas post-siembra (cuando se adiciono el estímulo), lo que permitió demostrar el efecto del secretoma sobre la TEER (figura 11).

11.2.4.1 Efectos 2 horas post-estímulo

A pesar de las diversas modificaciones empleadas en la forma de añadir el estímulo a la monocapa de HUVEC, el aumento súbito de la TEER post-estímulo no desapareció. Una explicación es que dicho aumento podría ser un fenómeno biológico causado por el estímulo y no físico.

El efecto de los estímulos sobre la TEER de HUVEC en las primeras 2 horas no estaba previsto por nuestro grupo de trabajo. Nuestro objetivo es estudiar cómo las células de CaMa atraviesan la monocapa de células endoteliales y consideramos que para ello se requeriría debilitar la integridad del endotelio, que se traduciría en una disminución en la TEER. Sin embargo el aumento de la TEER por nuestros estímulos podría deberse a que se inducen cambios en las concentraciones iónicas extra-celulares, (posiblemente debido a efectos sobre canales iónicos) o a un aumento en las uniones intercelulares. El estudio más detallado de este fenómeno podría describir moléculas que inhibieran el paso de células de CaMa a través del endotelio, lo cual pudiera tener una aplicación terapéutica. Dichas moléculas pudieran ser secretadas por las células de cáncer o encontrarse dentro de las células endoteliales.

Alternativamente la adición del estímulo podría mejorarse aún más, incorporando ciertas maniobras que hemos encontrado recientemente en la literatura (Ludwig et al. 2011). Un ejemplo de ello sería desfasar la adición de los diferentes estímulos. Se sugiere que las mediciones son muy susceptibles al cambio de temperatura. Aunque no sacamos la e-plate de la incubadora, tal vez nos estamos tardando mucho en adicionar todos los estímulos. A favor de esta hipótesis, habría que considerar el orden en que se pusieron los estímulos para este experimento. El penúltimo estímulo que se colocó, el secretoma no concentrado de MDA-MB-231, induce el mayor aumento aparente de TEER justo después del estímulo (figura 11A).

11.2.4.2 Efectos 2-13 horas post-estímulo

Como se mencionó al principio de la sección de discusión ya se ha reportado el efecto directo del secretoma de MDA-MB-231 y de ZR-75-30 sobre la

permeabilidad vascular de HUVEC (Gallardo Vera & Zentella Dehesa 2017) y está por reportarse su efecto sobre la TEER (Gallardo-Vera (en preparación)).

Por otra parte el secretoma de la MDA-MB-231 es capaz de aumentar la eficiencia de metástasis en modelos murinos (Lee et al. 2014). El secretoma de ZR-75-30 es capaz de inducir un aumento en la permeabilidad vascular *in vivo* de un modelo murino no inmunocomprometido (Guzmán-Pérez 2013). Sin embargo el efecto *in vivo* pudiera estar siendo modificado por la interacción con otros componentes del microambiente tumoral. El secretoma de las ZR-75-30 podría actuar sobre otras células residentes de los vasos sanguíneos, por ejemplo algún subgrupo de leucocitos, y que estos a su vez secreten un factor vasoactivo que potenció el efecto del secretoma de las células de cáncer.

La disminución en la TEER de la monocapa de HUVEC, inducida por el secretoma de MDA-MB-231 podría deberse a un aumento en la permeabilidad vascular de dichas células. Ya se ha reportado que la TEER y la permeabilidad vascular correlacionan inversamente (Kustermann et al. 2014). Sin embargo valdría la pena evaluar si es el caso del fenómeno biológico que estamos estudiando, pues una disminución en la TEER también se ha visto asociada con un aumento en la muerte celular. Esto último sugerimos que no es el caso, considerando los experimentos que realizamos en cultivos sub-confluentes de HUVEC en la primera sección de resultados de esta tesis (figura 7).

Resulta interesante recalcar que el sistema en tiempo real, en un solo experimento, nos permitió evidenciar que el fenómeno biológico sobre las células endoteliales, ocurre en un tiempo mínimo de 8 horas, puesto que los experimentos de permeabilidad vascular *in vitro* sugerían que podía ocurrir en un rango de 8-24 horas (McKenzie & Ridley 2007). Siguiendo técnicas de punto final hubiéramos tenido que hacer más experimentos, lo cual hubiera requerido de más tiempo y más recursos como células HUVEC y secretoma.

El efecto del secretoma 10 veces concentrado de MDA-MB-231 sobre la TEER de las HUVEC es muy superior al del control positivo (TNF) (figura 11). Incluso el secretoma de MDA-MB-231 no concentrado también es capaz de inducir

una disminución de la TEER de HUVEC mayor que el TNF. Esto contrasta con trabajos previos del laboratorio evaluando otros fenotipos de las HUVEC (Montes-Sánchez 2010). En dichos trabajos el TNF induce en células HUVEC, más adhesión de células U-937 en comparación con el secretoma de MDA-MB-231.

11.2.4.3 Efectos 13-20 horas post-estímulo

Inesperadamente, al final del experimento el secretoma de MDA-MB-231 indujo un aumento de la TEER (durante 8 horas) hasta coincidir con los valores de TEER de las células sin estímulo. Incluso los valores de pendientes positivos para el lapso de tiempo 13-20 horas (figura 11E), recalcan el contraste con los fenómenos anteriores, que tenían una pendiente negativa.

Este aumento en la TEER podría deberse a que los factores del secretoma, que habían causado los efectos que disminuyeron la TEER en un inicio, se habían consumido. Esto podría provocar que las HUVEC regresarán a su estado basal o que otros estímulos de mayor vida media presentes en el secretoma actúen. Cualquiera de las 2 hipótesis sería congruente con que los fenómenos biológicos pueden ser cíclicos. En particular, las vías de señalización que los provocan, se mantienen encendidas mientras haya un ligando que active a su receptor y que los segundos mensajeros rio abajo se mantengan en una conformación activa. Sin embargo existen mecanismos de retro-alimentación negativa. Los ligandos tienen una vida media, los receptores pueden ser endocitados, los segundos mensajeros inactivados, por acción de proteínas reguladoras tales como fosfatasas y proteínas activadoras de proteínas G. Incluso los factores de transcripción, que son activados por dichas vías de señalización, tienen dentro de sus genes blancos a aquellos que codifican para proteínas, que inactivan a dichos factores de transcripción.

Existen diversos fenómenos celulares que explicarían el aumento en la TEER de las HUVEC estimuladas con el secretoma de MDA-MB-231. Las HUVEC se pueden volver a extender sobre el fondo del pozo, pueden formar más o de nuevo su uniones intercelulares o proliferar. Estos fenómenos que aumentan la TEER podrían explicarse por la presencia de factores de crecimiento en el secretoma de MDA-MB-231 (figura 5 y anexo 4). Dichos factores también pueden ser producidos

por las HUVEC, en respuesta al secretoma de MDA-MB-231, como parte de un sistema de retroalimentación negativa, característica de los sistemas biológicos.

Por otra parte, en la parte final del experimento, se observó una caída en la TEER de las HUVEC sin estímulo y tratadas con el vehículo. Esta caída pudiera deberse a que las células se empezarán a retraer o a morir por falta de nutrientes, después de 55 horas sin cambio de medio de cultivo. Por lo tanto el experimento se pudiera repetir poniendo el estímulo antes, por ejemplo a las 24 horas después de haberse sembrado, donde ya se alcanzado el máximo nivel de TEER. También previo al estímulo se pudiera cambiar el medio de cultivo, para regenerar los nutrientes que mantienen a las HUVEC vivas. Esta segunda opción tiene la desventaja que también se estarían regenerando los factores de crecimiento del SFB y el ECGS que pudieran enmascarar el efecto del secretoma de MDA-MB-231. Por lo que si este cambio de medio previo al estímulo se hiciera, dicho medio tendría que ser por lo menos carente de ECGS, como cuando se hizo el experimento en HUVEC sub-confluentes. Alternativamente hubiera sido deseable dejar correr el experimento más tiempo para verificar que la TEER realmente siguiera decayendo, tal vez hasta alcanzar cero, para cerciorarnos que las células efectivamente se empezaban a morir y no sufrían alguna oscilación en su TEER momentánea.

11.3 Efecto del secretoma de ZR-75-30 sobre la TEER de una monocapa confluentes de Eahy926 y HMEC-1

Existen modelos de células endoteliales humanas que puede resultar más asequible para cultivar, que las HUVEC de cultivo primario. Por ejemplo la línea celular de HUVEC inmortalizadas mediante fusión con A549, llamada Eahy926 (ATCC 2016a) y la línea HMEC1 derivada de micro-vasculatura de prepucio humano (ATCC 2016b) . Estas células tienen la ventaja de que se les puede dar un número indeterminado de pases, sin cambios en la morfología y que el fondo genético sería homogéneo y constante en todos los experimentos. Sin embargo reportes previos indican que dichas células responden menos al TNF (Lidington et al. 1999).

Como se observa en la figura 12A, el TNF induce una disminución significativa de la TEER de células Eahy926. Sin embargo el secretoma de ZR-75-30 no concentrado es incapaz de inducir un efecto sobre la TEER. En el caso de las células HMEC1 (figura 12B) el secretoma de ZR-75-30 tarda casi 20 horas en generar una disminución de la TEER con respecto a las células no tratadas, el TNF por su parte no genera ningún efecto sobre la TEER. Una limitación de los experimentos mostrados en la figura 12, es que el secretoma que se utilizó, no se verificó si tenía actividad biológica por un ensayo independiente, como el ensayo de adhesión que está estandarizado en el laboratorio. Pudiera ser que las líneas celulares endoteliales si fueran responsivas, pero el secretoma que se utilizó no tuviera actividad biológica.

Al final del experimento se observó un aumento en la TEER de las HMEC-1 y las Eahy926. Esto podría indicar que se presentó un evento de proliferación, gracias a que había huecos en la monocapa de células. Alternativamente las células se pudieron empaquetar más permitiendo el aumento en el número de células en el pozo.

12.0 Conclusiones

1. Se estandarizó la evaluación en tiempo real del efecto del secretoma de células de CaMa, sobre la TEER de una monocapa de células HUVEC. El método estandarizado funciona debido a que:
 - a. Se reprodujo la disminución en la TEER inducida por TNF reportada previamente en la literatura
 - b. Se reprodujo un efecto posiblemente mitogénico del secretoma de MDA-MB-231 reportado previamente en la literatura
2. Se encontró que la hipótesis fue verdadera, ya que, el secretoma de MDA-MB-231 concentrado 10 veces, induce en 8.5 h una disminución máxima de la TEER de células HUVEC, con respecto al vehículo y al control sin estímulo.

13.0 Perspectivas

En esta tesis se estandarizó un sistema de medición de TEER en tiempo real, de una monocapa de células HUVEC, sensible al efecto del secretoma de células de CaMa. Este sistema podría ser útil para dilucidar las vías de señalización, que desencadenan los cambios en la TEER de HUVEC, por efecto de los secretomas de CaMa. Para ello se podrían pre-tratar las HUVEC con inhibidores farmacológicos específicos. Alternativamente a las HUVEC se les podría hacer ingeniería genética para mutar o sobreexpresar genes como la subunidad p50 de NF- κ B, para demostrar que dicha vía es causal del efecto del secretoma sobre las HUVEC.

Adicionalmente, se podría validar, si los cambios en la TEER, en la ventana de tiempo descubierta por el Xcelligence, correlacionan con otras variables en el endotelio vascular. Por ejemplo con el paso a través del endotelio de albúmina marcada (estándar de oro) o, con cambios en la estructura de las uniones intercelulares.

14.0 Anexos

Anexo 1: Oficio de Aprobación del protocolo clínico por los comités de ética e investigación del Hospital Gea González.
Dicho protocolo sirvió para poder obtener las muestras biológicas para esta tesis



Hospital General Dr. Manuel Gea González
Comités de Investigación y de Ética en Investigación
"2014, Año de Octavio Paz"

Julio 18 de 2014,
Oficio No. CI y CEI/195/14.

DR. JORGE ROMÁN AUDIFRED SALOMÓN
INVESTIGADOR PRINCIPAL INTERNO
DR. ALBERTO JOSÉ CABRERA QUINTERO
INVESTIGADOR PRINCIPAL EXTERNO
PRESENTE.

Comunicamos a ustedes que el protocolo "Participación de la vía de señalización NF-kB en la activación endotelial mediada por los factores solubles tumorales derivados de líneas celulares de cáncer de mama con diferente potencial metastásico", fue presentado en la *Primera Sesión Extraordinaria del Comité de Investigación y del Comité de Ética en Investigación*, llevada a cabo el día 25 de junio del presente año, y los integrantes de los mismos consideran que los documentos entregados el día 18 de julio de 2014 con los cambios solicitados, cumplen con lo requerido y le otorgan el dictamen de

Aprobado

El registro de este proyecto es el **11-82-2014**. Les informamos que este fallo tiene vigencia hasta 31 de diciembre de 2016. Si se requiriera ampliar el período, soliciten la renovación anual con 45 días de anticipación a su fecha de vencimiento, por medio de una carta donde se expongan los motivos correspondientes.

Así mismo se les notifica que por indicación de la Coordinación de Institutos en Investigación la designación de "investigador responsable" se modifica por "investigador principal"

Al realizar este proyecto adquieren el compromiso ineludible de informar cada tres meses el avance del estudio a la División de Investigación Clínica por medio del formato establecido, disponible en la página electrónica del Hospital, anexando el listado de los sujetos de estudio incluidos (nombre y número de expediente), de igual forma se debe agregar la información de las presentaciones a congresos o las publicaciones que se han generado. Les recordamos que cualquier cambio o actualización en los integrantes o procedimientos de este estudio deberá ser notificado por escrito a estos Comités.

Apegándonos al cumplimiento de las Normas, nuevamente les solicitamos un original del consentimiento informado para que sean sellados en la División de Investigación Clínica y devueltos a usted. A partir de éstos se deben generar las copias que se aplicaran a los sujetos de estudio

Se anexa hoja de seguimiento de su proyecto para que tengan presente la entrega de su reporte en tiempo y forma.

Sin otro particular por el momento, nos es grato enviarles un cordial saludo.

ATENTAMENTE


Dra. María Elisa Vega Memije
Presidente
Comité de Investigación

MLER*locm




Dr. Jorge Andrés Peña Ortega
Presidente
Comité de Ética en Investigación

Anexo 2: Oficio de Aprobación del protocolo por los comités de ética e investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

"2014, Año de Octavio Paz"

MÉXICO, D.F., A 03 DE NOVIEMBRE DE 2014.

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INVESTIGADOR PRINCIPAL
DEPTO. DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN, "SALVADOR ZUBIRÁN".
VASCO DE QUIROGA No. 15
COL. SECCIÓN XVI, DEL TLALPAN
MÉXICO, D.F., C.P. 14000
PRESENTE

Por este medio, me permito informarle que el **Comité de Investigación**, así como el **Comité de Ética en Investigación** del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, **ha revisado y aprobado** el Protocolo de Investigación Clínica, titulado:

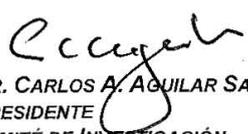
"Participación de la vía de señalización NF-kB en la activación endotelial mediada por los factores solubles tumorales derivados de líneas celulares de cáncer de mama con diferente potencial metastásico"
REF. 1177

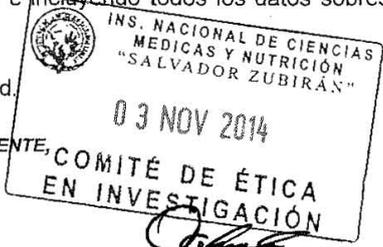
Así mismo se revisó y **aprobó** la siguiente documentación:

- Consentimiento Informado versión 25 de agosto de 2014.

La vigencia de la aprobación termina el día 03 de noviembre de 2015. Si la duración del estudio es mayor tendrá que solicitar la re-aprobación anual del mismo, informando sobre los avances y resultados parciales de su investigación e incluyendo todos los datos sobresalientes y conclusiones.

Sin más por el momento quedamos de Usted.


DR. CARLOS A. AGUILAR SALINAS
PRESIDENTE
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

ATENTAMENTE,

DR. ARTURO GALINDO FRAGA
PRESIDENTE
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación.
Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Sección XVI, C.A.S.V.
Delegación Tlalpan
México, D. F. 14000
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

Anexo 3: Formato de Consentimiento informado



SECRETARÍA DE SALUD. HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

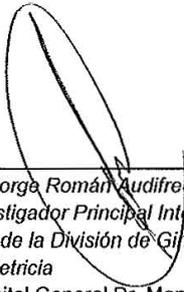
De acuerdo con las disposiciones contenidas en la Ley General de Salud, Título Quinto "Investigación para la Salud", Capítulo Único, Título Segundo "De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos" Capítulo I, Disposiciones Comunes, artículo 13 que señala que en toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar, artículos 14 fracción V, 20, 21 y 22 de dicho Reglamento; y de conformidad con los principios éticos contenidos en la Declaración de Helsinki, se me ha explicado que:

- I. Por ser una mujer sana y por tener un parto o una cesaría sin complicaciones, se me propone participar en un proyecto de investigación donando un fragmento de cordón umbilical. El objetivo de la investigación es estudiar cómo interactúan las células de cáncer de mama con los vasos sanguíneos sanos del cordón umbilical que yo done. Se me aclaró que soy una mujer sana, que ni yo ni mi bebé padecemos cáncer, pero que donar un pedazo del cordón umbilical ayudará en la investigación contra el cáncer.
- II. Sólo se tomará un fragmento de cordón umbilical de alrededor de 15 cm de largo. Se me explicó que el cordón umbilical permite el paso de nutrientes y sustancias de desecho entre el bebé y la madre durante la gestación; pero que al momento del nacimiento ya no es necesario y que en condiciones normales, el cordón umbilical es cortado y desechado junto con la placenta.
- III. Estoy enterada de que el fragmento de donde será tratado para obtener células de la vena de cordón umbilical y serán cultivadas un máximo de tres semanas, y que el destino final y único es estudiar la respuesta de estas células a las sustancias que liberen las células de cáncer de mama; se me explico que esto no presenta un riesgo ni para mi bebe ni para mí.
- IV. Estoy enterada que las células que se extraigan de la vena del cordón umbilical solo serán utilizadas para cumplir los objetivos de este protocolo y por ningún motivo serán inmortalizadas ni usadas para propósitos no descritos en este protocolo.
- V. Estoy enterada de que después de que se extraigan las células de la vena del cordón umbilical, el cordón será incinerado. Y después de los experimentos, las células usadas y las sobrantes serán eliminadas tratándolas con cloro o sosa cáustica.
- VI. Ni mi bebe ni yo tendremos alguna complicación o efecto secundario por la toma del fragmento de cordón umbilical
- VII. Sé, que los resultados de este estudio no van a proporcionar información adicional sobre mi recuperación posparto, ni sobre la salud de mi bebé.
- VIII. Se me explicó que el tratamiento que se le dé al cordón umbilical no va a proporcionar ninguna ventaja para mi recuperación posparto, ni para la salud de mi bebé.
- IX. Se me ha asegurado que puedo preguntar hasta mi complacencia todo lo relacionado con el estudio y mi participación!
- X. Se me aclaró que puedo abandonar el estudio en cuanto yo lo decida, sin que ello afecte mi atención de parte del médico o del hospital.
- XI. Autorizo la publicación de los resultados del estudio del cordón umbilical a condición de que, en todo momento, se mantendrá el secreto profesional y que no se publicará mi nombre o revelará mi identidad, ni la de mi bebé.
- XII. Mi participación en la investigación consiste sólo en donar el fragmento de cordón umbilical, ni mi bebé ni yo recibiremos ningún medicamento ni algún tratamiento especial. Por lo que, no me generará ningún malestar o efecto negativo en mi salud o en la de mi bebé, pero se me informa que podré salir del estudio en el momento que yo lo deseé.
- XIII. El estudio del fragmento de cordón umbilical no causará ninguna afectación en mi salud o en la de mi bebé. De presentarse alguna complicación medica en mi tratamiento o en el de mi bebé sería por otra causa y no por el proyecto de investigación; por lo cual, no se me dará ninguna compensación económica.
- XIV. Los estudios realizados al cordón umbilical no tendrán ningún costo para mí. De igual forma, no estoy recibiendo algún apoyo económico por donar un fragmento de cordón umbilical.

Con fecha _____, habiendo comprendido lo anterior y una vez que se aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi participación en el proyecto, yo

_____ con número de expediente
_____ acepto participar en el estudio titulado: "**Participación de la vía de señalización de NF-kB en la activación endotelial mediada por los FST derivados de líneas de cáncer de mama con diferente potencial metastásico**".

nombre y firma paciente o
responsable legal



Dr. Jorge Román Audifred Salomón,
Investigador Principal Interno
Jefe de la División de Ginecología y
Obstetricia
Hospital General Dr. Manuel Gea González
correo electrónico: jorgeaudifred @ prodigy.net.mx
teléfono fijo directo: 40003073

nombre y firma del testigo 2

dirección _____

relación que guarda con el paciente

nombre y firma del testigo 1

dirección _____

relación que guarda con el paciente

quien aplica el consentimiento informado:
Dr. Juan Pablo Aragón Hernández
Investigador Adjunto Interno
Jefe de la Unidad Tocoquirúrgica (UT),
Hospital General Dr. Manuel Gea González
Correo electrónico: nogaraip@ hotmail.com
Teléfono (conmutador) 4000 3000 ext. 3480



Este documento se extiende por triplicado, quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o de su representante legal y el otro en poder del Investigador, así mismo es obligatorio integrar al expediente clínico una copia del mismo, anexando una nota donde se especifique que el sujeto de estudio está participando en el protocolo **Participación de la vía de señalización de NF-kB en la activación endotelial mediada por los FST derivados de líneas de cáncer de mama con diferente potencial metastásico**, con número de registro **11-62-2014**, a cargo del Dr. Jorge Román Audifred Salomón. Queda entendido que la Dirección de Investigación, o los Comités podrán requerir este documento en cuanto lo consideren necesario. Este documento deberá ser conservado por el Investigador Responsable durante un mínimo de 5 años.

Para preguntas o comentarios comunicarse con la Dra. María Elisa Vega Memije (01 55) 4000 3217 Presidente del Comité de Investigación o con el Dr. Jorge Andrés Peña Ortega, Presidente del Comité de Ética en Investigación al (01 55) 4000 3279.

Anexo 4: Tabla con las concentraciones en pg/ml de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento presentes en el secretoma de MCF-7, MDA-MB-231 y ZR-75-30

Los datos fueron obtenidos de acuerdo a 4 publicaciones (Montes-Sánchez, 2009, Mejía-Rangel, 2016, Gómez, 2016 y López-Marure, 2016)

	Gómez 2016			López 2016			Montes 2009		Mejía et.al 2016	
	MCF7	MDA	ZR	MCF7	MDA	ZR	ZR	MCF7	ZR	MCF7
Eotaxin	X	X	X	2.8	3.6	4.4	1.7	1.5	X	X
FGFb	X	X	X	X	X	X	1,8	1.1	X	X
G-CSF	X	X	X	X	X	X	28728	1.7	28,728	9,594
GM-CSF	X	X	X	X	X	X	70,8	21,9	X	X
IFN-a	X	X	X	0.1	3	0.3	X	X	X	X
IFNγ	X	X	X	X	X	X	22,5	2.5	2068	1315
IL-10	2.08	0.10	2.63	0.6	0.4	0.4	1.9	1.9	X	X
IL-12	X	X	X	X	X	X	2.5	2.5	X	X
IL12p40	0.4	0.4	3.18	0.6	0.6	0.6	X	X	X	X
IL12p70	1.72	0.6	2.62	0.9	1.6	1.2	X	X	X	X
IL-13	X	X	X	X	X	X	5,9	2.9	X	X
IL-15	X	X	X	X	X	X	2,6	1.6	X	X
IL-17	X	X	X	0.07	0.07	0.07	2,6	1.6	X	X
IL-1a	1.5	4.2	199	6	3	1211	X	X	X	X
IL-1α	X	X	X	2.2	9.5	13.5	26,1	2.6	X	X
IL-1β	0.8	0.8	44	0.6	0.43	58	9,9	2.3	X	X
IL-2	27.74	1	1	1.47	6.8	0.1	1.3	1.3	X	X
IL-4	2.78	0.5	2.78	0.5	0.5	0.5	0.2	0.2	X	X
IL-5	X	X	X	X	X	X	2.4	2.4	X	X
IL-6	0.9	0.9	10000	22.7	5.3	57	33053	2.0	2891	1081
IL-7	X	X	X	X	X	X	2.7	2.7	X	X
IL-8	3.94	157.4	883	8.5	2.9	7.5	24800	1.5	24800	8429
IL-9	X	X	X	X	X	X	1.6	2.0	X	X
IP-10	X	X	X	3.2	8.6	22.4	4.3	4.3	X	X
MCP-1	1.9	1.9	2936	2.3	1.6	2.9	27978	1.7	X	X
MIP-1α	0.9	0.9	98	0.9	0.7	1.8	1.1	1.1	X	X
MIP-1β	2	2	6.39	2.7	0.8	2.1	3,1	2.2	X	X
PDGFBB	X	X	X	X	X	X	2,9	1.9	X	X
RANTES	X	X	X	X	X	X	1.5	1.5	X	X
sIL-2ra	1.74	0.2	4.4	2.1	1.1	3	X	X	X	X
TNF	X	X	X	0.1	0	0.2	X	X	X	X
VEGF	116140	39278	273	10000	7378	92.2	2318	122,6	39592	14231

Anexo 5: Lista de Archivos del Xcelligence

Nombre del Archivo	Figura de la tesis en la que se utilizo	Tamaño del archivo (MB)	Fecha del experimento	Casilla del equipo utilizada
1506121523D14000.plt	7	1.90	12 de Junio 2015	1
1506021737D3huvecdensidades.plt	8	2.47	2 de Junio 2015	3
1510191134D3intento3.plt	9	1.36	19 Octubre 2015	3
1511010118D0.plt	10	1.45	1 Noviembre 2015	1,2,3
1605232321D3.plt	11	1.44	23 Mayo 2016	3
1606072052D2.plt	12A	2.79	7 Junio 2016	2
1606071944D1.plt	12B	2.80	7 Junio 2016	1

Anexo 6: Colaboraciones en artículos de investigación

Int J Clin Exp Pathol 2018;11(2):685-694
www.ijcep.com /ISSN:1936-2625/UCEP0067792

Original Article

Effect of soluble factors derived from ZR 75.30 breast cancer cells on endothelial activation

Alma R Escalona-Guzman^{1,2,3}, Ricardo Hernández-García⁶, Felipe Vadillo-Ortega⁴, Rebeca Lopez-Marure⁵, Janini Mejia-Rangel⁷, Irma B Mitre-Aguilar⁴, Alberto J Cabrera-Quintero⁴, Alejandro Zentella-Dehesa^{1,2}

¹Biochemistry Unit, Guillermo Soberon Acevedo, Department of Genomic Medicine and Environmental Toxicology, Biomedical Research Institute (IIBO), National Autonomous University of Mexico (UNAM) Institute of Medical Sciences, Nutrition Salvador Zubiran (INCMNSZ), Mexico City, Mexico; ²Program of Breast Cancer, IIBO, UNAM, Mexico City, Mexico; ³PhD Program in Biomedical Sciences, UNAM, Mexico City, Mexico; ⁴Liaison Unit of The Faculty of Medicine of UNAM in The National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN), Mexico City, Mexico; ⁵Cell Biology Laboratory, Department of Physiology, National Institute of Cardiology Ignacio Chavez (INCICh), Mexico City, Mexico; ⁶Department of Pharmacology, ⁷Genetics and Molecular Biology, Centre of Research and Advanced Studies, National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico

Received October 23, 2017; Accepted November 10, 2017; Epub February 1, 2018; Published February 15, 2018

Abstract: In this study, we analyzed soluble factors secreted by two Estrogen Receptor Positive (ER- α) human breast cancer cell lines, ZR 75.30 (luminal B) and MCF7 (luminal A), and evaluated their effect on endothelial activation. The composition of tumoral soluble factors (TSFs) was analyzed by ELISA (Bio-Plex). TSFs from ZR 75.30 cells expressed higher levels of TNF, IFN- γ , IL-6, and IL-8 compared to TSFs from MCF-7 cells. TSFs from ZR 75.30 cells induced a pro-adhesive phenotype in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), as characterized by increased monocyte cell adhesion, adhesion molecule expression and NF- κ B activation and decreased I κ B- α expression. Conversely, TSFs from MCF-7 cells exerted none of these effects on HUVECs. We then added TNF, IFN- γ , IL-6 or IL-8 alone or in combination with TSFs from MCF-7 cells to HUVECs. Only the combinations that included TNF induced endothelial activation. A neutralizing antibody against IL-1 β (this cytokine was not measured in the ELISA) had a modest blocking effect on cellular adhesion or the expression of adhesion molecules induced by TSFs from ZR 75.30 cells in HUVECs. However neutralizing antibodies against TNF, IFN- γ , IL-6 or IL-8 had no effect. Our results suggest that although TNF is an inducer of endothelial cell activation, it is not the only molecule that is responsible for this effect in TSFs from ZR 75.30 cells.

Keywords: Tumoral soluble factors, TNF, endothelial activation, breast cancer, endothelial cell adhesion molecules

Introduction

Breast cancer is the most commonly occurring malignancy in women and is responsible for approximately 522,000 deaths annually worldwide [<http://goo.iarc.fr/today>], and most of these deaths are associated with metastasis to the lung, bone, brain or liver. Metastasis is a complex process involving multiple steps, including i) invasion across the basement membrane, ii) intravasation into the vascular or lymphatic system, iii) survival in the bloodstream, iv) binding to the wall of blood vessels, v) extravasation, vi) aggressive colonization and vii) growth in the target organ [1]. Tumor cells

secrete a complex mixture enriched in cytokines, chemokines, growth factors, and enzyme modulators that contribute to the tumor micro-environment. Consequently, the intrinsic properties of tumor cell secretion products are determinants of the risk and organ specificity of metastases [2]. Recent studies have suggested that the recruitment of normal cells from target organs contributes to intravasation and colonization during metastasis. Indeed, endothelial cells from the target organ are the first normal cellular components that appear to collaborate with metastatic cells during extravasation [3].

Review Article

Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer

Irma B Mitre-Aguilar^{1,2}, Alberto J Cabrera-Quintero^{1,2}, Alejandro Zentella-Dehesa^{1,2,3}

¹Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), México D. F., México; ²Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México D. F., México; ³Programa de Investigación de Cáncer de Mama, IIB, UNAM, México D.F. 04510, México

Received November 12, 2014; Accepted December 24, 2014; Epub January 1, 2015; Published January 15, 2015

Abstract: Glucocorticoids (GC) are essential steroid hormones for human life. They regulate a series of important processes by binding with three glucocorticoid receptors (GR) and activating genomic and non-genomic pathways. Activated cytoplasmic GR can directly bind DNA and transactivate or transrepress specific genes. Additionally, it can interact with other transcription factors to affect gene expression indirectly. The two membrane GR can interact with mitogen-activated protein (MAP) kinases or activate cAMP and Ca²⁺-dependent pathways, respectively. Glucocorticoids have been widely used as co-treatment of patients with breast cancer (BC) due to reduction of chemotherapy-induced side effects such as nausea, lack of appetite, and inflammation. However, GC may exert a direct effect on tumor response to chemotherapy. *In vitro*, GC inhibits chemotherapy, radiation and cytokine-induced apoptosis by upregulating antiapoptotic genes and detoxifying proteins. They also upregulate the proto-oncogene c-fms, tumor suppressor gene Nm23, several members of the epidermal growth factor (EGF) signaling pathway and the estrogen sulfotransferase signaling pathway, thus indirectly inhibiting estrogen receptor activation. They inhibit the proangiogenic gene (vascular endothelial growth factor (VEGF); therefore, they could play a role in reducing angiogenesis. Interestingly, the phosphorylation status of ser-211 in the GR is dependent on the expression of the BRCA1 gene, a tumor suppressor gene that is mutated in the majority of patients with triple negative BC. Some clinical randomized trials have also attempted to address the effect of GC on patients with BC. Thus, in this review we summarize GC mechanisms of action and their participation in several facets of BC.

Keywords: Glucocorticoids, breast cancer, genomic, non-genomic, glucocorticoid membrane receptor

Introduction

The main physiological functions of glucocorticoids (GC) include downregulating the immunological function (immunosuppression), increasing the production of glucose [1], changing carbohydrate, protein, and lipid metabolism, regulating vascular tone, regulating bone mineralization, and affecting the central nervous system (CNS) [2, 3]. GC is released in response to stress conditions. Under such conditions, the hypothalamus secretes a corticotrophin-releasing hormone that stimulates the hypophysis gland. In turn, this gland produces the corticotrophin hormone that acts on the cortex of the suprarenal gland. It is here that GC are produced and secreted into the bloodstream, where they bind with globulins and are transported throughout the body [4]. This sys-

tem is known as the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA axis).

GC have genomic and non-genomic effects

Three main mechanisms of action for GC have been described. The first is the genomic mechanism, which involves a classic cytosolic GC receptor (GR), while the remaining two mechanisms are non-genomic. One uses the classic GR but bound to the plasma membrane, and the other is dependent on a non-classic membrane GR.

GR belongs to the family of steroid receptors

GR belong to the superfamily of nuclear receptors of transcription factors [5]. It relates to other steroid receptors, such as those for min-

15.0 Referencias

- Aalders, K.C. et al., 2017. Anti-angiogenic treatment in breast cancer: Facts, successes, failures and future perspectives. *Cancer Treatment Reviews*, 53, pp.98–110. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28088074> [Accessed November 2, 2017].
- ACEA Biosciences, I., 2013. *RTCA DP Instrument Operator's Manual*, San Diego California USA.
- Alberts, B. et al., 2008. *Molecular Biology of the Cell: Reference edition, Volume 1*, Garland Science. Available at: http://books.google.com.mx/books/about/Molecular_Biology_of_the_Cell.html?id=iepqmRfP3ZoC&pgis=1 [Accessed October 6, 2014].
- Alfonzo Méndez, M.A., 2010. Desarrollo de baculovirus como vectores de expresión para el estudio de la activación de células endoteliales humanas primarias. , p.77.
- ATCC, 2016a. EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™). Available at: <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-2922.aspx#characteristics>.
- ATCC, 2016b. HMEC-1 (ATCC® CRL-3243™). Available at: https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/By_Tissue/Other_Tissues/Foreskin/CRL-3243.aspx#generalinformation.
- Balkwill, F. & Mantovani, A., 2001. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet*, 357(9255), pp.539–545.
- Bauer, H. et al., 2010. The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.
- Bougaret, L. et al., 2017. Supernatants of Adipocytes From Obese Versus Normal Weight Women and Breast Cancer Cells: In Vitro Impact on Angiogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 232(7), pp.1808–1816.
- Brinkkoetter, P.T. et al., 2006. Hypothermia-induced loss of endothelial barrier function is restored after dopamine pre-treatment: role of p42/p44 activation. *Transplantation*, 82(4), pp.534–542.
- Bussard, K.M. et al., 2016. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast cancer research : BCR*, 18(1), p.84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27515302%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4982339>.
- Cárdenas Sánchez, J. et al., 2017. Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Séptima revisión. , pp.1–147. Available at: http://www.consensocancermamario.com/documentos/FOLLETO_CONSENSO_DE_CANCER_DE_MAMA_7aRev2017c.PDF.
- Carvalho, M.I. et al., 2016. A Comparative Approach of Tumor-Associated Inflammation in Mammary Cancer between Humans and Dogs. *BioMed Research International*, 2016, pp.1–12. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/4917387/>.
- Cereijido, M., Contreras, R.G. & Shoshani, L., 2004. Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans. *Physiological reviews*, 84(4), pp.1229–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15383651> [Accessed May 25, 2014].
- Chambers, A.F., Groom, A.C. & MacDonald, I.C., 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature reviews. Cancer*, 2(8), pp.563–72.

- Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154349>.
- Chávarri-Guerra, Y. et al., 2012. Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system. *The Lancet. Oncology*, 13(8), pp.e335-43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22846838> [Accessed September 10, 2014].
- Coultas, L., Chawengsaksophak, K. & Rossant, J., 2005. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature*, 438(7070), pp.937–945.
- Duñach, M., Del Valle-Pérez, B. & García de Herreros, A., 2017. p120-catenin in canonical Wnt signaling. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 52(3), pp.327–339. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28276699> [Accessed May 22, 2017].
- Dvorak, H.F., 2015. Tumors: wounds that do not heal-redux. *Cancer immunology research*, 3(1), pp.1–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25568067>.
- Eroles, P. et al., 2012. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 38(6), pp.698–707. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005>.
- Estrada-Bernal, A., 2003. Activación dependiente de NF-kB de células endoteliales humanas tratadas con productos solubles derivados de linfomas humanos. , p.143.
- Ferrara, N., 2002. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature reviews. Cancer*, 2(10), pp.795–803.
- Fidler, I.J., 2002. The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation*, 70(9–10), pp.498–505.
- Folkman, J., 1972. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Annals of surgery*, 175(3), pp.409–416.
- Frías González, S.E., 2007. Caracterización de la adhesión de células metastásicas humanas a cultivos endoteliales humanos activados por factores solubles derivados de células tumorales. , p.113.
- Gallardo Vera, M.A., Ventura Gallegos, J.L. & Zentella Dehesa, A., 2014. 144: Breast cancer tumor secreted factors induce both endothelial activation and increment of vascular permeability in vitro. *European Journal of Cancer*, 50, p.S32. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804914501220> [Accessed November 18, 2017].
- Gallardo Vera, M.A. & Zentella Dehesa, A., 2017. 19PAn endothelial premetastatic-like niche is promoted by tumor-secreted factors derived from highly metastatic breast cancer cells in vitro. *Annals of Oncology*, 28(suppl_5), p.1. Available at: <http://academic.oup.com/annonc/article/doi/10.1093/annonc/mdx361.017/4108258/19PAn-endothelial-premetastaticlike-niche-is>.
- García-Román, J. & Zentella-Dehesa, A., 2013. Vascular permeability changes involved in tumor metastasis. *Cancer Letters*, 335(2), pp.259–269. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23499893> [Accessed November 3, 2017].
- Gómez, E.O. et al., 2016. Secretome derived from breast tumor cell lines alters the morphology of human umbilical vein endothelial cells. *Molecular membrane biology*, 7688(January 2017), pp.1–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27690154>.
- González-Mariscal, L., Tapia, R. & Chamorro, D., 2008. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et biophysica acta*, 1778(3), pp.729–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17950242>

- [Accessed August 30, 2013].
- Guzmán-Pérez, C.A., 2013. Estandarización de un ensayo de permeabilidad vascular in vivo sensible a factores solubles secretados por la línea celular de cáncer de mama ZR-75-30. , p.80.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674.
- Holliday, D.L. & Speirs, V., 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast cancer research : BCR*, 13(4), p.215. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21884641>.
- Hoshino, A. et al., 2015. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527(7578), pp.329–335. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature15756>.
- Inamura, A. et al., 2013. Cooling treatment transiently increases the permeability of brain capillary endothelial cells through translocation of claudin-5. *Neurochemical Research*, 38(8), pp.1641–1647.
- INEGI, 2015. Datos de Mortalidad. Available at: <http://www.beta.inegi.org.mx/temas/mortalidad/> [Accessed May 20, 2017].
- Jaffe, E.A. et al., 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *Journal of Clinical Investigation*, 52, pp.2745–2756.
- Jiang, M., Qin, C. & Han, M., 2016. Primary breast cancer induces pulmonary vascular hyperpermeability and promotes metastasis via the VEGF-PKC pathway. *Molecular Carcinogenesis*, 55(6), pp.1087–1095.
- Jimenez-Salazar, J.E., 2010. Efecto sobre la expresión de los genes ZO-1, ZONAB, OCLUDINA, HER-2 y cambios en la localización de las proteínas ZO-1 y ZONAB inducidos por estradiol en células de carcinoma mamario humano MCF-7. , p.77.
- Jiménez-Salazar, J.E. et al., 2014. Membrane-initiated estradiol signaling of epithelial-mesenchymal transition-associated mechanisms through regulation of tight junctions in human breast cancer cells. *Hormones & cancer*, 5(3), pp.161–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24771004> [Accessed July 3, 2014].
- Kaplan, R.N. et al., 2005. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438(7069), pp.820–827.
- Kho, D. et al., 2015. Application of xCELLigence RTCA biosensor technology for revealing the profile and window of drug responsiveness in real time. *Biosensors*, 5(2), pp.199–222.
- Kim, K.-W. et al., 2017. How Can We Treat Cancer Disease Not Cancer Cells? *Cancer Research and Treatment*, 49(1), pp.1–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28052653> [Accessed November 3, 2017].
- Klebanoff, C.A. et al., 2011. Therapeutic cancer vaccines: are we there yet? *Immunological reviews*, 239(1), pp.27–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21198663> [Accessed May 20, 2017].
- Kustermann, S. et al., 2014. A Real-time Impedance-Based Screening Assay for Drug-Induced Vascular Leakage. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24385420> [Accessed March 2, 2014].
- Lee, E., Pandey, N.B. & Popel, A.S., 2014. Pre-treatment of mice with tumor-conditioned media accelerates metastasis to lymph nodes and lungs: A new spontaneous breast cancer metastasis model. *Clinical and Experimental*

Metastasis.

- Lee, E.Y.H.P. & Muller, W.J., 2010. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(10), pp.a003236–a003236. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20719876> [Accessed November 3, 2017].
- Lehmann, B.D.B. et al., 2011. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*, 121(7), pp.2750–2767. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21633166><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3127435&tool=pmcentrez&rendertype=abstract><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc3127435/>.
- Li, A. et al., 2003. The mitogenic and anti-apoptotic activity of tumor conditioned medium on endothelium. , 29, pp.375–382.
- Li, Z. & Kang, Y., 2016. Emerging therapeutic targets in metastatic progression: A focus on breast cancer. *Pharmacology and Therapeutics*, 161, pp.79–96.
- Lidington, E. a et al., 1999. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transplant immunology*, 7(4), pp.239–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10638837>.
- Limame, R. et al., 2012. Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. A. Ahmad, ed. *PloS one*, 7(10), p.e46536. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0046536> [Accessed October 31, 2017].
- LONZA, 2017. Endothelial Cell Growth Medium. Available at: <https://www.lonza.com/products-services/bio-research/primary-cells/human-cells-and-media/endothelial-cells-and-media/endothelial-cell-growth-media-kits.aspx>.
- López-Marure, R. et al., 2016. Dehydroepiandrosterone inhibits events related with the metastatic process in breast tumor cell lines. *Cancer biology & therapy*, 17(9), pp.915–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5036408>.
- Ludwig, A., Sommer, A. & Uhlig, S., 2011. Assessment of endothelial permeability and leukocyte transmigration in human endothelial cell monolayers. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 763, pp.319–32. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-191-8_22 [Accessed October 31, 2017].
- McKenzie, J.A.G. & Ridley, A.J., 2007. Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF- α -induced changes in endothelial morphology and permeability. *Journal of cellular physiology*, 213(1), pp.221–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17476691> [Accessed December 4, 2014].
- Mehta, D. & Malik, A.B., 2006. Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Physiology Reviews*, 86(1), pp.279–367. Available at: <http://physrev.physiology.org/content/86/1/279.full-text.pdf+html><http://physrev.physiology.org/content/86/1/279>.
- Mejía-Rangel, J. et al., 2016. Pro-adhesive phenotype of normal endothelial cells responding to metastatic breast cancer cell conditioned medium is linked to NF κ B-mediated transcriptomic regulation. *International Journal of Oncology*, 49(5), pp.2173–2185.
- Montes-Sánchez, D. et al., 2009. Glycosylated VCAM-1 isoforms revealed in 2D western blots of HUVECs treated with tumoral soluble factors of breast cancer cells. *BMC chemical biology*, 9, p.7. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2787495&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 17, 2014].
- Montes-Sánchez, D.G., 2010. Analisis de marcadores de superficie en células endoteliales tratados con factores solubles derivados de células tumorales. , p.120.
- Narod, S.A. & Foulkes, W.D., 2004. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Reviews | CANCER*, 4(9), pp.665–676. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1431>.
- Olmeda, D. et al., 2017. Whole-body imaging of lymphovascular niches identifies pre-metastatic roles of midkine. *Nature*, 546(7660), pp.676–680. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature22977> [Accessed July 4, 2017].
- Place, A.E., Jin Huh, S. & Polyak, K., 2011. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast cancer research*, 13(6), p.227. Available at: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2912>.
- Rahim, S. & Üren, A., 2011. A real-time electrical impedance based technique to measure invasion of endothelial cell monolayer by cancer cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (50), pp.10–13.
- Resmini, G. et al., 2017. HMGA1 regulates the Plasminogen activation system in the secretome of breast cancer cells. *Scientific Reports*, 7(1), p.11768. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-11409-4>.
- Reymond, N., D'Água, B.B. & Ridley, A.J., 2013. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature reviews. Cancer*, 13(12), pp.858–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24263189> [Accessed January 21, 2014].
- Ribatti, D., Mangialardi, G. & Vacca, A., 2006. Stephen Paget and the “seed and soil” theory of metastatic dissemination. *Clinical and experimental medicine*, 6(4), pp.145–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17191105>.
- Roshan Moniri, M. et al., 2015. Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA). *Cytotechnology*, 67(2), pp.379–86. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10616-014-9692-5> [Accessed October 31, 2017].
- Srinivasan, B. et al., 2015. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. *Journal of laboratory automation*, 20(2), pp.107–126. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25586998>.
- Wculek, S.K. & Malanchi, I., 2015. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature*, 528(7582), pp.413–417. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature16140>.
- Weigelt, B., Peterse, J.L. & van 't Veer, L.J., 2005. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature reviews. Cancer*, 5(August), pp.591–602.
- Weinberg, R.A., 2014. *The Biology of Cancer* Second. E. Zayatz, ed., New York: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Yan, J., Yang, Q. & Huang, Q., 2013. Metastasis suppressor genes. *Histology and Histopathology*, 28(3), pp.285–292.
- Zebda, N. et al., 2013. Interaction of p190RhoGAP with C-terminal Domain of p120-catenin Modulates Endothelial Cytoskeleton and Permeability. *Journal of Biological Chemistry*, 288(25), pp.18290–18299. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23653363> [Accessed May 22, 2017].
- Zentella-Dehesa, A. et al., 2007. Cáncer de glándula mamaria y metástasis: un creciente problema de salud pública en México. *Mensaje Bioquímico*, XXXI, pp.172–195. Available at:

http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje_Bioq07v31p172_195_Zentella.pdf [Accessed November 18, 2014].

Zhou, W. et al., 2014. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer cell*, 25(4), pp.501–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24735924> [Accessed July 9, 2014].