



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Expresión de genes asociados a angiogénesis en  
Células Troncales Derivadas de Tejido  
Adiposo (ADSC) en presencia de medio  
condicionado de células tumorales**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**Jessica Karina Pérez Pérez**

Directora de Tesis:

**M. en C. Marcela Angélica De la Fuente Hernández**

Ciudad Universitaria  
Ciudad de México, 2021





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## AGRADECIMIENTOS

---

Agradezco el apoyo, orientación y compañerismo brindados por los investigadores del Laboratorio de Epigenética del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Gracias a la Dra. Vilma A. Maldonado Lagunas por permitirme formar parte del Laboratorio de Epigenética, por su conocimiento, asesoramiento y apoyo brindados durante la elaboración del proyecto.

A mi tutora, la M. en C. Marcela A. De la Fuente Hernández por su constante apoyo, por su enseñanza, orientación y el tiempo brindado en la revisión y corrección del proyecto de tesis.

Agradezco a mis sinodales, la Dra. Floria J. Lizárraga Sánchez, al Dr. Ernesto Soto Reyes Solís, a mi tutora la M. en C. Marcela A. De la Fuente Hernández, la Mtra. A. Alejandra Mendoza Amador y el M. en C. Miguel A. Fernández Rojas por el asesoramiento, interés y tiempo dedicado en la revisión del escrito y examen profesional de licenciatura.

Finalmente agradezco a mis queridos padres, mi linda familia y gran pareja que con amor, comprensión, cariño y motivación me han apoyado a seguir adelante, a valorar mis logros y continuar creciendo de manera profesional y en la vida.

## DEDICATORIA

---

A mi familia que, con mucho amor, comprensión, ánimo y apoyo me impulsaron a lograr mis objetivos sin importar los tropiezos.

*“Mi estimado amigo... la vida es infinitamente más extraña de lo que la mente de un hombre podría inventar. No nos atreveríamos a concebir las cosas que son realmente meros lugares comunes de la existencia.”*

**A. Conan Doyle (1891).**

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIA

## CONTENIDO

---

I.	ABREVIATURAS.....	7
II.	RESUMEN.....	9
III.	INTRODUCCIÓN.....	11
	3.1 Obesidad.....	11
	3.2 Células Troncales de Tejido Adiposo (ADSC).....	15
	3.3 Obesidad y cáncer.....	17
	3.4 Cáncer.....	25
	3.5 Angiogénesis tumoral.....	29
	3.6 Proceso molecular de la angiogénesis tumoral.....	32
	3.7 Genes asociados al proceso angiogénico tumoral.....	38
IV.	ANTECEDENTES.....	42
V.	JUSTIFICACIÓN.....	45
VI.	HIPÓTESIS.....	45
VII.	OBJETIVOS.....	46
VIII.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
IX.	RESULTADOS.....	56
	9.1 Cultivo celular.....	56
	9.2 Cursos temporales.....	58
	9.3 Determinación de temperatura de hibridación (TM).....	62
	9.4 Cuantificación de la expresión de genes angiogénicos.....	62

X.	DISCUSIÓN.....	68
XI.	CONCLUSIONES.....	74
XII.	PERSPECTIVAS.....	76
XIII.	REFERENCIAS.....	78
XIV.	BIBLIOGRAFÍA.....	86

## I. ABREVIATURAS

---

**ADSC:** Células Troncales Derivadas de Tejido Adiposo

**ANG-1:** Angiopoyetina 1

**ANG-2:** Angiotensina 2

**ANOVA:** Análisis de Varianza

**BxPC3:** Células tumorales de adenocarcinoma de páncreas

**cDNA:** Ácido Desoxirribonucleico complementario

**Ct:** (*Cycle Threshold*) ciclos necesarios para alcanzar el umbral de fluorescencia en qRT-PCR.

**CXCL5:** Quimiocina Motivo CXC Ligando 5

**DLL4:** Delta Ligando 4

**DMEM:** Medio de cultivo, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**EEM:** Error Estándar de la Media

**EGF:** Factor de Crecimiento Epidérmico

**eNOS:** Óxido Nítrico Sintasa endotelial

**FGF:** Factor de Crecimiento de Fibroblastos

**HaCaT:** Queratinocitos epidérmicos inmortalizados

**HCT-15:** Células provenientes de adenocarcinoma colorectal

**HeLa:** Células provenientes de adenocarcinoma cervicouterino.

**HIF:** Factor Inducible por Hipoxia

**IMC:** Índice de Masa Corporal

**MC:** Medio Condicionado

**MAPK:** Proteína cinasa activada por mitógenos

**MMP:** Metaloproteinasas de Matriz

**MOPS:** Buffer (3-(N-morpholino) ácido propanesulfónico)

**MSC:** Células Troncales Mesenquimales

**NK:** células *Natural Killer*

**PBS:** Solución Salina Amortiguada por Fosfatos

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**PDGF, PDGFR:** Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas, (ligando y receptor)

**PI3K:** Fosfatidilinositol 3-cinasa

**qRT-PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa en tiempo real

**RPMI-140:** Medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute*

**SFB:** Suero Fetal Bovino

**TAF:** Fibroblastos Asociados a Tumor

**TGF- $\beta$ :** Factor de Crecimiento Transformante Beta

**TIE:** Receptor Transmembrana de Angiotensinas

**TM:** (*Temperature Melting*) temperatura de hibridación del oligonucleótido a la hebra molde en PCR.

**TNF- $\alpha$ :** Factor de Necrosis Tumoral Alfa

**VE-Cadherina:** Cadherina Endotelial Vascular

**VEFG:** Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

**VEGFR-2:** Receptor 2 del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

**vWF:** Factor von Willebrand

**WAT:** Tejido Adiposo Blanco

**$\alpha$ -SMA:** Alfa Actina del Músculo Liso

**786-O:** Células provenientes de adenocarcinoma de riñón

## II. RESUMEN

---

La obesidad es un problema de salud mundial, considerado un factor de riesgo para el desarrollo de otras enfermedades asociadas como el cáncer. En México, 7 de cada 10 adultos presentan problemas de sobrepeso u obesidad. Se ha determinado que el cáncer cervicouterino, de páncreas, riñón y colorrectal, representan algunos de los tipos de cáncer mayormente asociados a la obesidad en mujeres y hombres adultos (Calle, 2003).

El aumento de tejido adiposo blanco en el organismo a causa de la obesidad, conlleva a un aumento de ADSC. Estas células han demostrado tener la capacidad de favorecer el proceso de angiogénesis en un microambiente tumoral, así mismo, se ha determinado que las ADSC promueven la expresión de factores de crecimiento y citocinas angiogénicas, lo cual, favorece el desarrollo de un tumor, sin embargo, la interacción entre la obesidad y el cáncer es poco conocida, por lo que el presente estudio tiene como objetivo determinar si el MC (Medio Condicionado), es decir, el medio con moléculas secretadas por algunos de los tumores mayormente asociados a obesidad, inducen la expresión de 4 genes angiogénicos (VEGF, vWF,  $\alpha$ -SMA y CXCL5) en ADSC. Los resultados muestran que el MC de las células tumorales indujo en las ADSC la expresión genética de VEGF, vWF,  $\alpha$ -SMA y CXCL5 los cuales promueven el proceso angiogénico. Por otro lado, se determinó que todos los MC empleados fueron capaces de inducir la expresión de VEGF en células ADSC. Finalmente, demostramos que el MC de HeLa indujo en

ADSC la sobreexpresión de más genes (VEGF, vWF y  $\alpha$ -SMA) durante los primeros días de cultivo, en comparación con los demás MC.

En conclusión, las ADSC posiblemente promueven el desarrollo tumoral de cánceres asociados a la obesidad mediante la expresión de genes implicados en el proceso angiogénico. Lo cual, podría favorecer el fenotipo tumoral y promover el desarrollo y metástasis de un tumor, lo que resulta importante para su diagnóstico y tratamiento en pacientes obesos.

### III. INTRODUCCIÓN

---

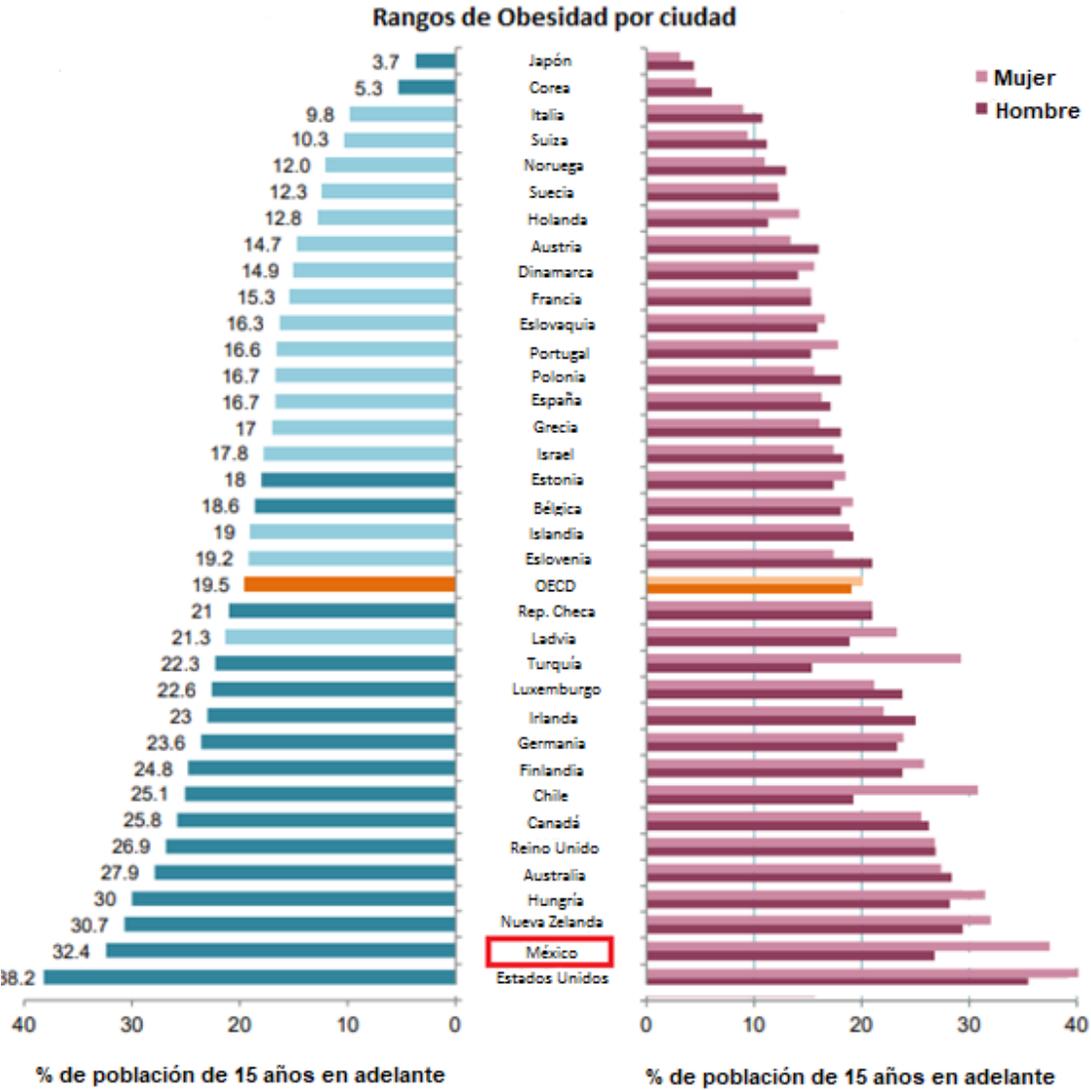
#### 3.1 Obesidad

##### 3.1.1 La obesidad como problema de salud

La obesidad se define como una enfermedad crónica puesto que puede durar años, sin embargo, puede ser controlable. Se asocia con un desequilibrio en las calorías del organismo (Ríos, 2010), lo cual genera un aumento anormal del tejido adiposo que conlleva a un incremento de peso. El aumento de tejido adiposo puede desarrollar alteraciones metabólicas que predisponen al organismo a presentar otros problemas de salud (García, 2004).

Así mismo, la obesidad representa un problema que pone en riesgo la salud de quien la padece, sin embargo, en algunos países incluyendo México el número de casos con obesidad es cada vez mayor (Dávila, 2015). Se estima que desde el año 2000 a la actualidad, México ha ocupado el segundo lugar a nivel mundial con mayor porcentaje de obesidad en mujeres y hombres adultos (Figura 1) (Barrera, 2013; Torres, 2018). Con base en los resultados obtenidos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) realizada en el 2016, en la población de nuestro país, 7 de cada 10 adultos padece problemas de sobrepeso u obesidad. Así mismo, se ha observado que las mujeres presentan mayor incidencia a la obesidad (82.8%) en comparación con los hombres (64.5%) (Barquera, 2013) mientras que, el rango de edad con mayor número de casos es, de los 25 a los 44 años, seguido de los 50

a 59 años, luego de 40 a 49 años y finalmente de los 20 a 24 años (Federación Mexicana de Diabetes (FMD), 2015).



**Figura 1. Rangos de obesidad por país a nivel mundial.** México (cuadro rojo) representa el segundo lugar después de Estados Unidos y antes de Nueva Zelanda, con mayor porcentaje de población con obesidad tanto en mujeres como en hombres adultos. Tomado y modificado de (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD), 2017).

### 3.1.2 Causas y consecuencias de la obesidad

La obesidad es causada por un desequilibrio energético entre las calorías ingeridas y las calorías consumidas por el cuerpo durante el día (Dávila, 2015), lo cual se da como consecuencia de otros factores. Estudios clínicos, epidemiológicos y experimentales, han concluido que la mitad de los casos de obesidad se asocia con factores genéticos y epigenéticos, mientras que la mitad restante se relaciona con factores ambientales y sociales (Rivera, 2012).

Como consecuencia, la obesidad genera un aumento de tejido adiposo principalmente en la zona abdominal, generando alteraciones metabólicas que afectan el buen funcionamiento del organismo, predisponiéndolo a presentar problemas de presión arterial alta, resistencia a la insulina y alteración en los niveles de colesterol y triglicéridos en la sangre, entre otras patologías (Lizarzaburu, 2013). Así mismo, la obesidad contribuye con el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles, como problemas cardiovasculares, diabetes, problemas como osteoartritis y algunos tipos de cáncer (Dávila, 2015). Se estima que el 75% de las muertes ocurridas en México son causadas por enfermedades crónicas no trasmisibles relacionadas con la nutrición (Rivera, 2012).

### 3.1.3 Formas de medir la obesidad

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la obesidad se define como un Índice de Masa Corporal (IMC)  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> (OMS, 2018). El IMC o también llamada Índice de Quetelet, es una relación matemática entre el peso (en kilogramos) y la talla (en metros) elevada al cuadrado (IMC =  $\text{Peso}/\text{Talla}^2$ )

(Ezquerro, 2016), si bien, es una medida frecuentemente empleada, es poco exacta puesto que las medidas obtenidas pueden variar con el sexo, la edad y la masa atribuida al tejido muscular de la persona.

Otra manera de determinar la obesidad es mediante el uso de un plicómetro que mide los pliegues cutáneos de las zonas con mayor tejido graso, o a partir del perímetro abdominal, la cual se considera obesidad si es  $\geq 90\text{cm}$  en hombres y  $\geq 80\text{cm}$  para mujeres (Moreno, 2012). O bien, puede ser cuantificada de manera directa mediante la bioimpedancia, que mide el porcentaje de tejido adiposo del cuerpo, el cual, considera obesidad si el porcentaje es  $\geq 25.1\%$  para hombres y  $\geq 35.1\%$  para mujeres, debido a que en las mujeres existe mayor cantidad de tejido adiposo (Ezquerro, 2016).

### **3.2 Células Troncales de Tejido Adiposo (ADSC)**

#### **3.2.1 Tejido adiposo blanco**

El principal rasgo que define a la obesidad es el aumento del tejido adiposo blanco (*White Adiposse Tissue (WAT)*, por sus siglas en inglés) en el cuerpo, el cual es un tejido de origen mesenquimal cuyas características principales son las de reserva de lípidos, los cuales, sirven como energía para el organismo; y para la síntesis de adipoquinas, que ayudan a regular procesos metabólicos (Ezquerro, 2016). Así mismo, se ha demostrado la capacidad del tejido adiposo blanco para producir algunos tipos de hormonas como leptina, prolactina e insulina, las cuales se asocian con el desarrollo y progresión del cáncer (Herrera, 2015).

El tejido adiposo blanco se compone de una matriz de colágeno, con ramificaciones nerviosas, vasculatura y vasos linfáticos, así como, células de la fracción vascular como: adipocitos, preadipocitos, fibroblastos, monocitos, macrófagos, células progenitoras de células endoteliales, células endoteliales, pericitos, linfocitos y células de troncales (Moreno, 2015) como las ADSC.

### 3.2.2 ADSC

Las células troncales de tejido adiposo o ADSC (*Adiposse Derived Stem Cells*) (Figura 2) se localizan en la zona perivascular del tejido adiposo. Su característica principal es la plasticidad celular, la cual les otorga la capacidad de diferenciarse en un linaje celular osteogénico, adipogénico, miogénico o condrogénico como se demostró en experimentos realizados *in vitro* (Galván, 2016), así mismo, algunos estudios han demostrado su capacidad de diferenciación hacia un fenotipo endotelial en un medio inductor (Deng, 2015).



---

**Figura 2. Morfología celular de ADSC.** Fotografía del cultivo de ADSC que muestra la morfología celular. Tomada con microscopio óptico 10X.

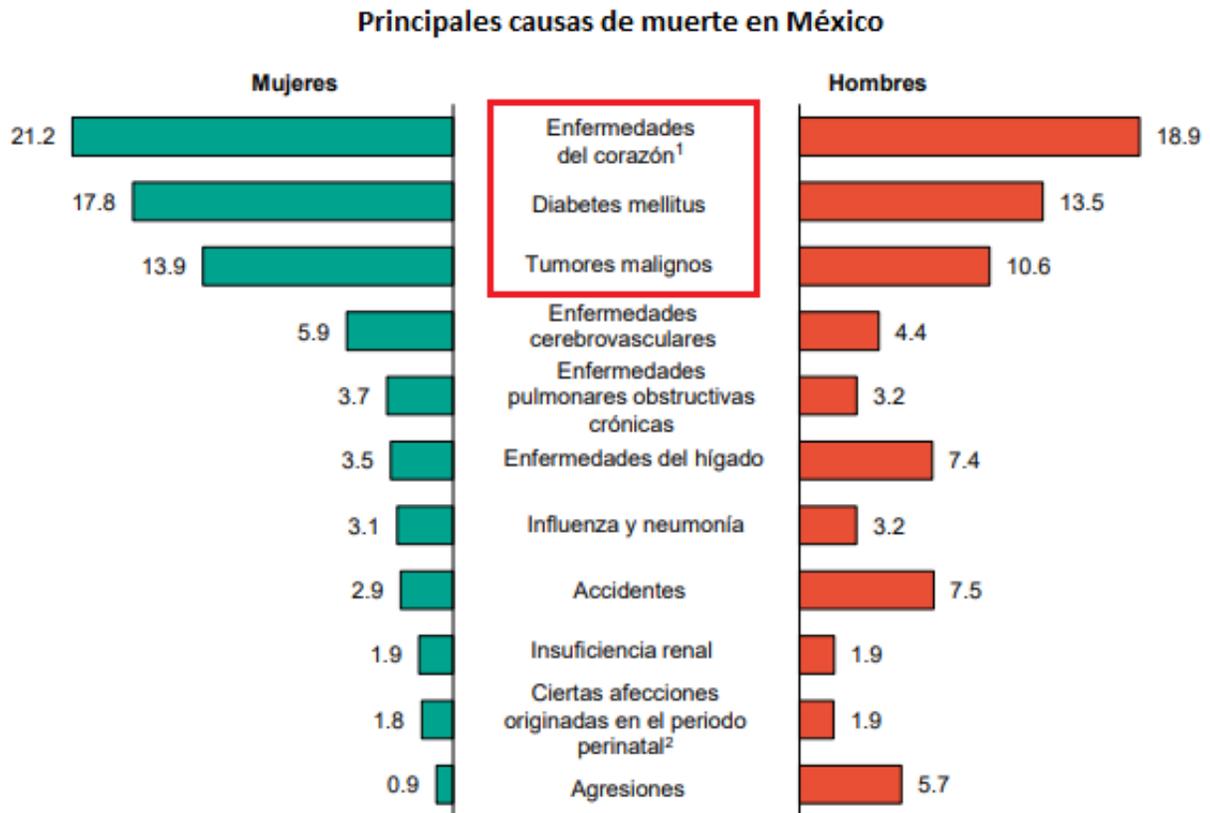
Las ADSC comparten funciones similares a las células troncales mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés), como la capacidad de autorenovación celular, así como, la expresión de factores con propiedades angiogénicas, antiapoptóticas y quimioatrayentes (Moreno, 2015; Zhang, 2009). Además tienen propiedades inmunomoduladoras sobre linfocitos B y T, células NK, monocitos y neutrófilos (Wei, 2015). Las ADSC, son identificadas mediante la ausencia y presencia de los marcadores de superficie CD31-, CD34+/-, CD45- y CD90+ (Wankhade, 2016).

Por su capacidad de diferenciación celular y potencial proliferativo, las ADSC han sido ampliamente empleadas en estudios enfocados en el desarrollo de tratamientos basados en células troncales para la regeneración de extremidades y reconstrucción de tejidos dañados (Bhang, 2014; Wankhade, 2016), demostrando ser aptas para su cultivo y manipulación *in vivo* e *in vitro*. Actualmente su estudio se

ha centrado también en identificar su función en la promoción de tumores, lo cual podría ser útil para desarrollar tratamientos dirigidos a pacientes obesos con cáncer.

### **3.3 Obesidad y cáncer**

La obesidad representa uno de los factores de riesgo para desarrollar cáncer, además de, la edad, el genotipo, la exposición a sustancias tóxicas, la irradiación y el tabaquismo (Herrera, 2015). La asociación entre la obesidad y el cáncer incrementa el riesgo no solo de desarrollar otras enfermedades si no de muerte. En el año 2018, las encuestas realizadas por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (Figura 3), demostraron que las tres principales causas de muerte en México (tanto en hombres como en mujeres) fueron debidas a problemas de salud, como: 1) enfermedades del corazón (20.1%), 2) diabetes mellitus (15.2%) y 3) tumores malignos (12.0%).

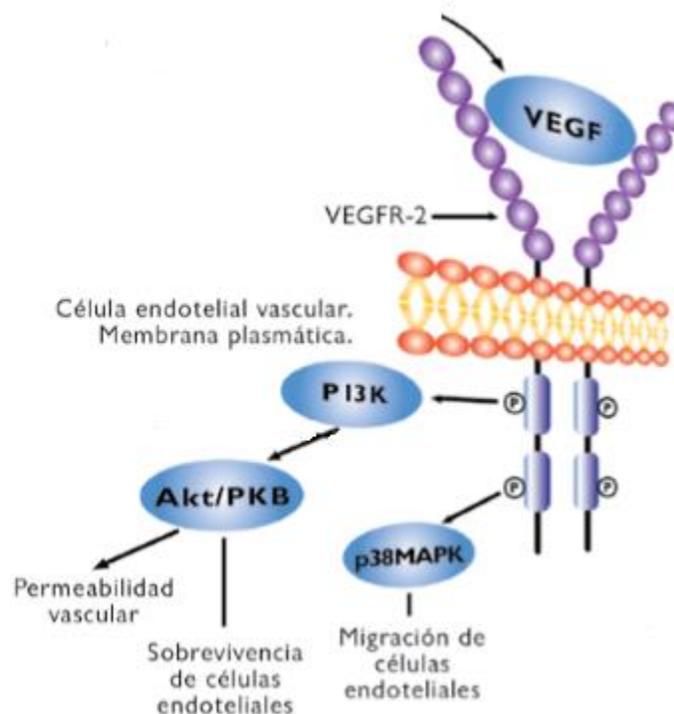


**Figura 3. Principales causas de muerte en México.** Entre las tres primeras causas de muerte en nuestro país se encuentran las enfermedades del corazón, diabetes mellitus y tumores malignos. Tomado y modificado de (Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2018).

### 3.3.1 La obesidad como factor de riesgo para desarrollar cáncer

El aumento de tejido adiposo ocasionado por la obesidad conlleva a una inflamación crónica que favorece el aumento en la expresión de quimiocinas, las cuales tienen efecto quimioatrayente para células del sistema inmune, lo que a su vez, provoca estrés oxidativo que conlleva a la inestabilidad genómica (Herrera, 2015) lo cual podría favorecer la formación de mutaciones que podrían dar lugar al desarrollo de tumores.

Así mismo, las hormonas producidas por el aumento de tejido adiposo como la leptina, prolactina e insulina participan en la cascada de señalización de las vías MAPK (la proteína cinasa activada por mitógenos) y PI3K (la fosfatidilinositol 3-cinasa), las cuales pueden promover procesos implicados en la angiogénesis como el mejoramiento de la permeabilidad vascular, la proliferación, sobrevivencia y migración de células endoteliales, lo cual favorece el crecimiento de un tumor (Herrera, 2015; Martínez, 2006) (Figura 4).



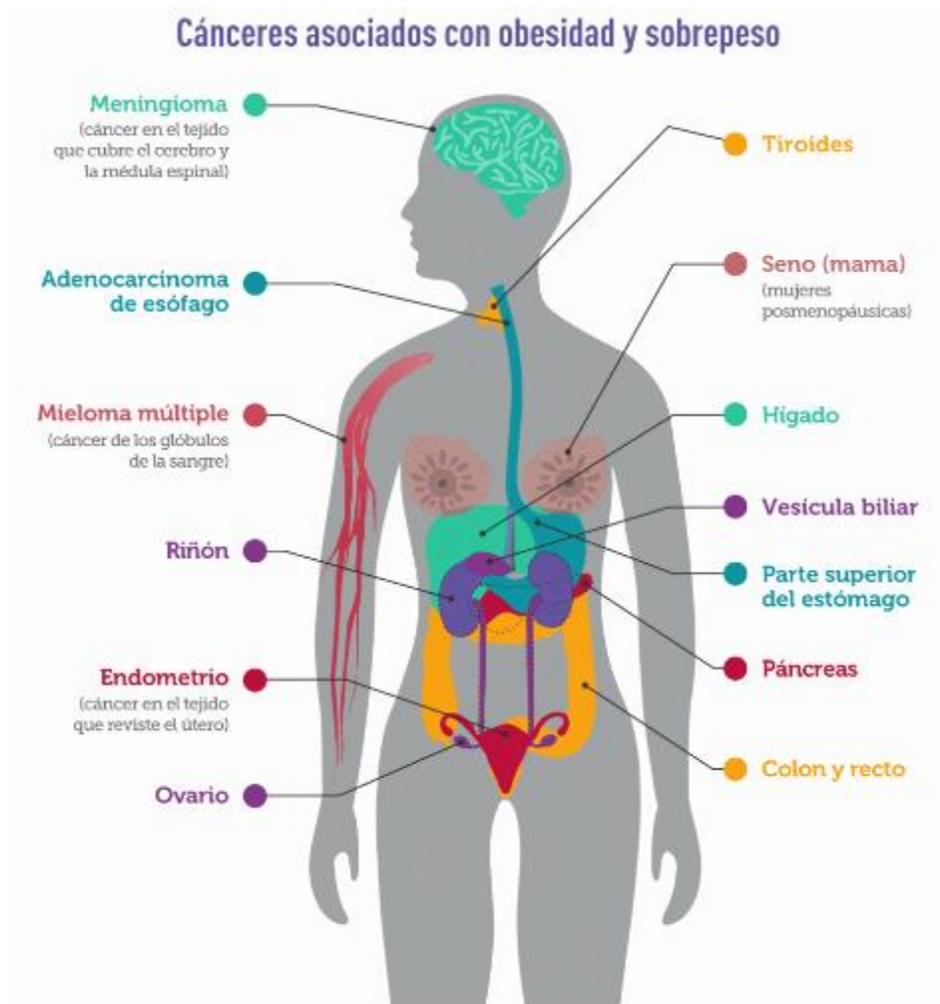
---

**Figura 4. Vías de señalización asociadas a la angiogénesis.** La imagen muestra la activación de las vías PI3K y MAPK por la unión de VEGF a su receptor, las cuales se encuentran implicadas en el proceso angiogénico contribuyendo así al proceso tumoral. Tomado y modificado de (Martínez, 2006).

Las propiedades de las ADSC le permiten promover un estado inflamatorio y el proceso angiogénico (Zhang, 2010), como su capacidad de migración, autorenovación, activación de otras células y diferenciación celular al fenotipo endotelial, así como la expresión de moléculas angiogénicas y quimioatrayentes (Badimon, 2015; Flores, 2006) que contribuyen con el desarrollo del cáncer.

### 3.3.2 Tipos de cáncer asociados a obesidad

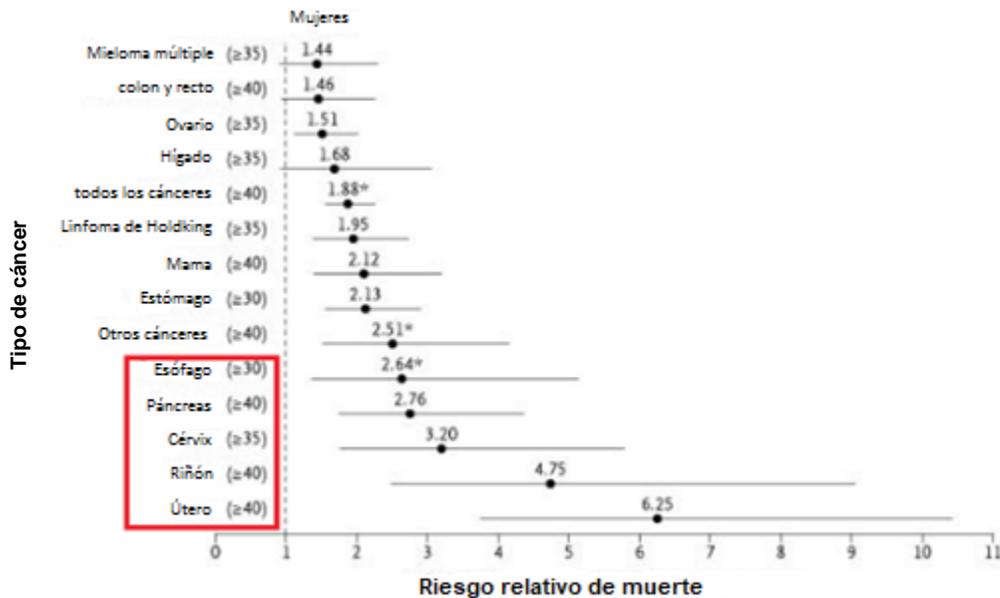
Estudios enfocados en comprobar la relación que existe entre la obesidad y el cáncer han establecido 13 tipos de cáncer mayormente asociados, como el cáncer de útero, hígado, riñón, páncreas, estómago, esófago, ovario, mama, vesícula, tiroides, medula ósea y colorrectal (*Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), 2016) como los tipos de cáncer con mayor incidencia en personas con obesidad (Figura 5).



**Figura 5. Tipos de cáncer asociados a obesidad y sobrepeso.** 13 tipos de cáncer se encuentran mayormente asociados a la obesidad y el sobrepeso. El cáncer de tiroides, mama, hígado, vesícula biliar, estómago, páncreas, ovario, endometrio, riñón, esófago, colon y recto, así como, meningioma y mieloma múltiple. Tomado y modificado de (CDC, 2016).

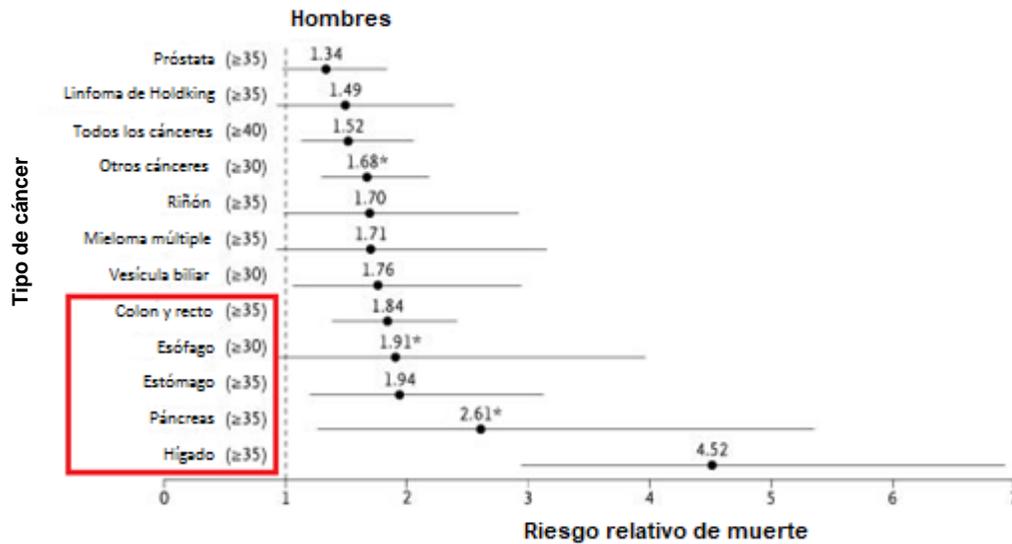
Un estudio de cohorte realizado en la población estadounidense en adultos con obesidad, asoció el  $IMC \geq 30$  con altas tasas de muerte en personas que presentaban cáncer de esófago, colon, hígado, vesícula biliar, páncreas y riñón. Por

otra parte, el estudio permitió evaluar los riesgos relativos de muerte que asocian la obesidad con algunos tipos de cáncer (Calle, 2003). La Figura 6, muestra los tipos de cáncer con mayor riesgo de muerte en mujeres con obesidad como el cáncer de útero, riñón, cérvix, páncreas, esófago y colon.



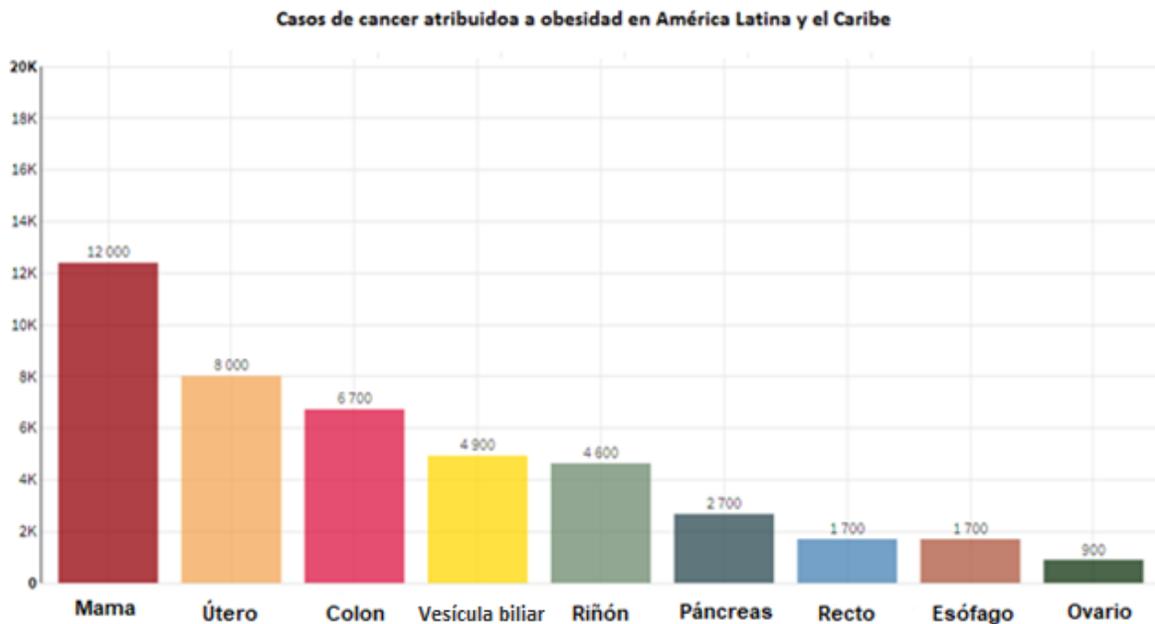
**Figura 6. Riesgo relativo de muerte en mujeres por cáncer asociado a obesidad.** Como se muestra, entre los 5 principales tipos de cáncer (cuadro rojo) con mayor riesgo de muerte en mujeres son por cáncer de útero, de riñón, de cérvix, de páncreas y de esófago. Tomado y modificado de (Calle, 2003).

Mientras que los tipos de cáncer con mayor riesgo de muerte en hombres con obesidad son: el cáncer de hígado, páncreas, estómago, esófago, colon y riñón (Figura 7) (Calle, 2003; Sánchez, 2014).



**Figura 7. Riesgo relativo de muerte en hombres por cáncer asociado a obesidad.** Entre los 5 principales tipos de cáncer (cuadro rojo) con mayor riesgo de muerte en hombres son el cáncer de hígado, de páncreas, de estómago, de esófago y colorrectal. Tomado y modificado de (Calle, 2003).

Por otra parte, un estudio realizado en América Latina y el Caribe por la *Agency International For Research on Cancer* (por sus iniciales en inglés IARC) en el 2017, indicó el número de casos estimado de los principales tipos de cáncer atribuibles al exceso de masa corporal en mujeres y hombres, la Figura 8 señala al cáncer de mama, de útero, de colon, de vesícula biliar, de riñón, de páncreas, de recto, de esófago y de ovario como los tumores con mayor número de casos.



**Figura 8. Casos de cáncer atribuidos a la obesidad en América Latina y el Caribe.** La gráfica muestra los tipos de cáncer con mayor número de casos en mujeres y hombres con obesidad, entre los que se encuentran el cáncer de mama, de útero, de colon, de vesícula biliar, de riñón, de páncreas, de recto, de esófago y de ovario.

Tomado y modificado de (*Agency International For Research on Cancer (IARC), 2017*).

Los estudios previos han demostrado que el cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte más común en mujeres mexicanas (Mendoza, 2017). Por otra parte, el cáncer de páncreas es un tipo de cáncer poco común y altamente agresivo, el cual presenta una mayor incidencia en la población adulta con obesidad (Franssen, 2011). De manera similar, el cáncer colorrectal es otro tipo de cáncer con alta incidencia en la población mexicana cuyos principales factores de riesgo para su desarrollo son la obesidad y la edad (Tirado, 2008). Mientras que

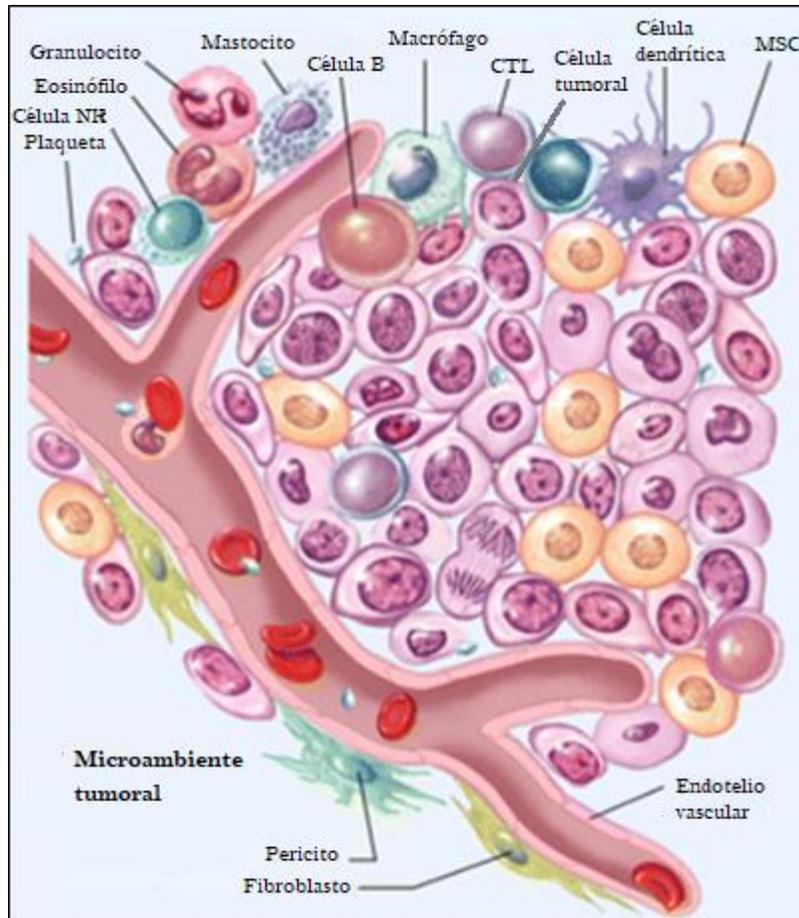
el cáncer renal presenta poca incidencia en la población y el principal factor de riesgo para su desarrollo es la obesidad (Jiménez, 2011).

### **3.3 Cáncer**

#### **3.3.1 Tumor y microambiente tumoral**

El cáncer por su parte, es un conjunto de enfermedades cuya característica principal es el crecimiento descontrolado de las células presentes en un tejido, lo cual, genera una neoplasia maligna o tumor (*American Cancer Society (ASC)*, 2016). Un tumor maligno es un conjunto de células con funciones anormales y genoma alterado que puede presentarse en cualquier parte del cuerpo, el cual se enriquece con la participación de más células circundantes y propias del tejido entre las que se encuentran las células del sistema inmune, células vasculares y células troncales (*National Cancer Institute (NCI)*, 2019).

La interacción del tumor con su microambiente mantiene las condiciones necesarias para la formación, desarrollo y posible metástasis de un tumor maligno. El ambiente en el cual se desarrolla un tumor se conoce como microambiente tumoral, se compone de diferentes tipos de células, de moléculas y estructuras vasculares interaccionan con las células tumorales, como: las células estromales, endoteliales, perivasculares, monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, células epiteliales y troncales mesenquimales (Arango, 2016; *National Cancer Institute (NCI)*, 2018a) (Figura 9).



**Figura 9. Tumor y microambiente tumoral.** Un tumor se compone de diversas células que interactúan entre ellas generando un microambiente apto que le permite formarse y desarrollarse, como células tumorales, estromales, inmunes, endoteliales, perivasculares, epiteliales, inflamatorias y troncales.

Tomado y modificado de (Kerkar, 2012).

Esta compleja red de componentes del tumor y su microambiente, es coordinada por señalización molecular mediante citocinas y quimocinas que establecen una respuesta inflamatoria crónica en el tejido, generando un estado inmunosupresivo en el microambiente que favorece la promoción y progresión de tumores (Arango,

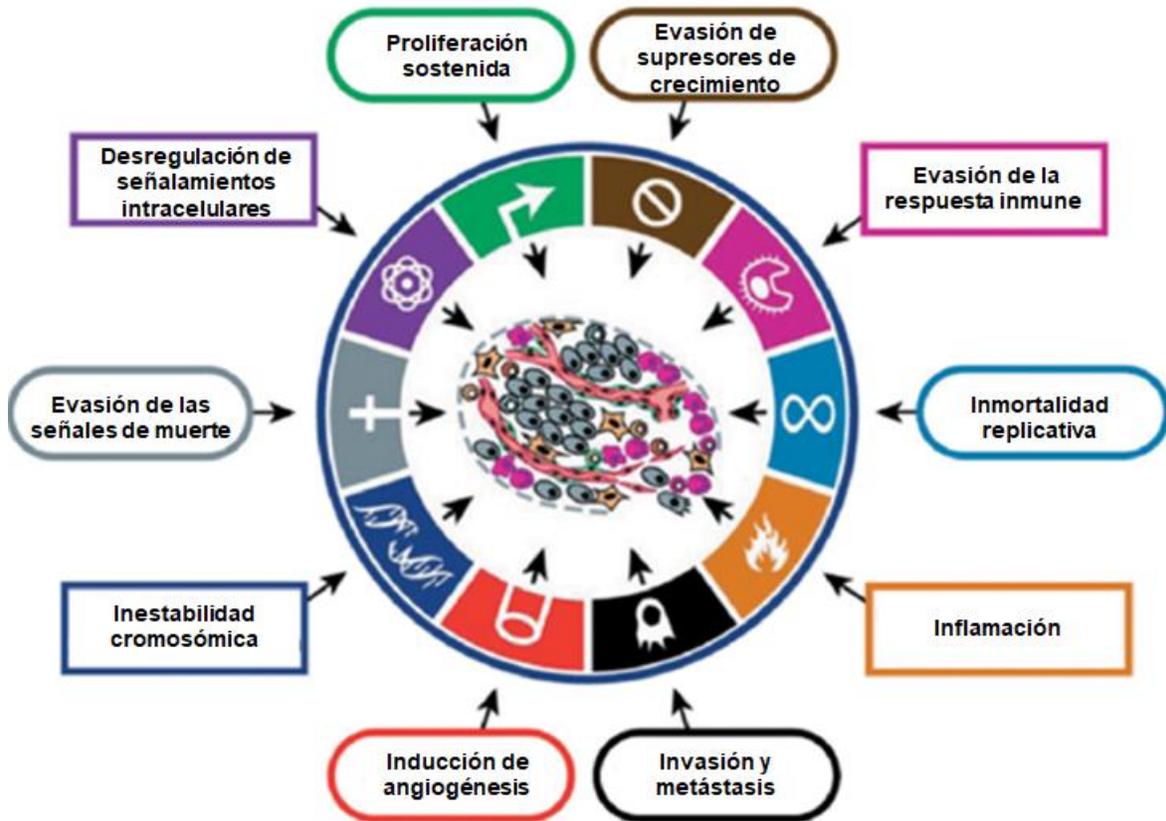
2016). El tumor puede cambiar al microambiente, pero el microambiente puede modificar la forma en la que el tumor crece, expresando o inhibiendo genes presentes en las células que conforman el tumor (*National Cancer Institute (NCI)*, 2019).

### 3.3.2. Características distintivas del cáncer

La variedad de células que componen a un tumor determina el comportamiento del mismo; sin embargo, se han logrado establecer 10 características distintivas que comparten los tumores entre ellos para desarrollar sus funciones anormales (Figura 10):

1) Proliferación sostenida: pueden estimular su propio crecimiento mediante la autosuficiencia en las señales de crecimiento; 2) Evasión de supresores de crecimiento: pueden evadir señales de crecimiento mediante la inhibición de genes supresores de crecimiento; 3) Resistencia a muerte celular: evaden señales de muerte; 4) Inmortalidad replicativa: pueden mantener ciclos repetitivos de división celular sin llegar a la senescencia; 5) Inducen angiogénesis: promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los existentes; 6) Invasión celular y metástasis: pueden modificar su forma y unión celular para migrar a otros tejidos; 7) Desregulación de señalamientos intracelulares: tiene la capacidad de aumentar las interconexiones celulares de vías de señalización y generar más señales (Hanahan & Weinberg, 2011).

Así mismo, también fueron propuestas capacidades favorables y emergentes desarrolladas en distintos momentos del desarrollo de un tumor, como la 8) Inestabilidad y mutación del genoma: que pueden alterar genes o inducir reordenamientos genómicos; la 9) Inflamación generada: en el tejido donde se sitúa el tumor para inducir la expresión de factores de crecimiento que facilitan la angiogénesis y metástasis; Y la 10) Reprogramación del metabolismo energético y evasión de la destrucción inmune: cuando, aún con oxígeno, los tumores pueden reorganizar su metabolismo para mantener la proliferación desregulada, además de evitar ser detectados por células del sistema inmune (Hanahan & Weinberg, 2011).



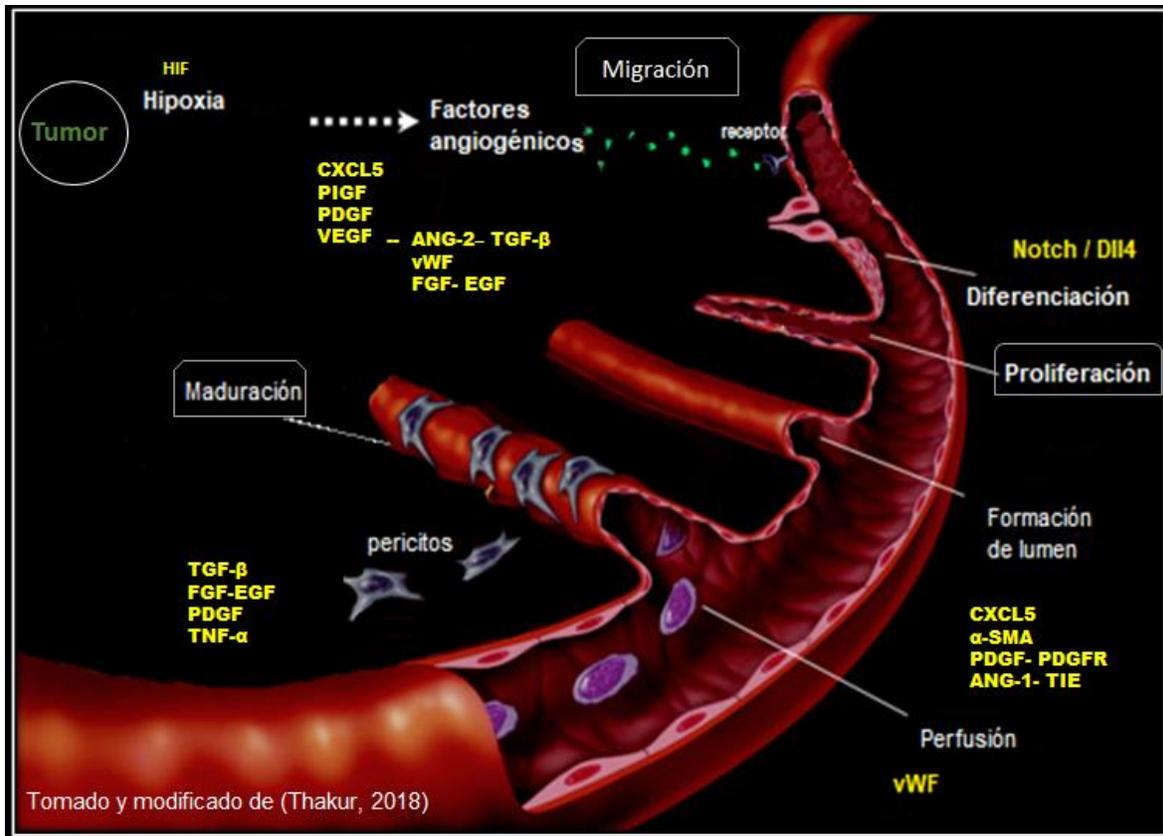
**Figura 10. Características distintivas del cáncer.** Se han establecido 10 capacidades biológicas que adquieren los tumores, 1) sostener una señal proliferativa, 2) evadir supresores de crecimiento, 3) evitar la destrucción inmunológica, 4) permitir la inmortalidad replicativa, 5) generar inflamación, 6) activar invasión y metástasis, 7) inducir angiogénesis, 8) mantener inestabilidad genómica y mutación, 9) resistir a la muerte celular y 10) mantener una desregulación energética celular. Tomado y modificado de (Hanahan y Weinberg, 2011).

### 3.4 Angiogénesis tumoral

La angiogénesis es un proceso biológico que se presenta de forma normal en algunas etapas de vida como la cicatrización de heridas (Tahergorabi, 2012), cuya

función principal es asegurar que los tejidos en desarrollo, reciban un suministro adecuado de nutrientes y oxígeno (Papetti, 2002). Se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes (Martínez, 2006), el cual, se da gracias a un balance en la expresión de factores que promueven e inhiben el proceso general de la angiogénesis, generando solo los vasos sanguíneos necesarios (Nishida, 2006).

El proceso general de la angiogénesis no tumoral, comienza con la vasodilatación y hemostasia del vaso sanguíneo seguido de la migración de células progenitoras de células endoteliales provenientes de la médula ósea, las cuales son atraídas por factores angiogénicos liberados por células endoteliales y metaloproteinasas (MMPs) al sitio del brote, donde se originará el nuevo vaso sanguíneo (*National Cancer Institute* (NCI), 2018b). Al establecerse, las células progenitoras de células endoteliales estimulan su diferenciación y proliferación generando uniones célula-célula para formar los capilares de la nueva vasculatura. Así, los nuevos vasos sanguíneos comienzan a organizar su estructura para formar en el interior un hueco llamado lumen. Posteriormente, los pericitos y células del músculo liso recubren la nueva vasculatura para brindarle rigidez, así como permitir la contracción y dilatación de los nuevos vasos, lo cual, promueve la perfusión de la sangre que nutre y repara el nuevo tejido vascular (Martínez, 2006) (Figura 11).

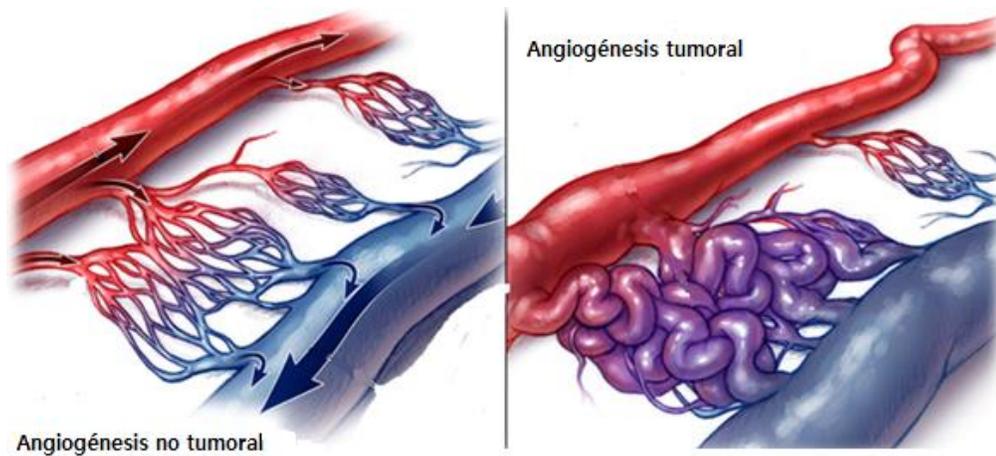


**Figura 11. Proceso general de la angiogénesis.** Etapas del proceso general ocurrido durante la formación de nuevos vasos sanguíneos, así como algunas moléculas implicadas. Tomado y modificado de (Thakur, 2018).

Por otra parte, la angiogénesis desempeña un papel importante en el desarrollo y metástasis de los tumores, los cuales inducen dicho proceso mediante la expresión de factores angiogénicos al igual que las células que los rodean (Papetti, 2002). Diferentes estudios concluyen que la mayoría de los tumores no inducen angiogénesis durante meses o años, hasta que un grupo de células actúan como “interruptor angiogénico” activando el proceso (Badimon, 2015).

### **3.5 Proceso molecular de la angiogénesis tumoral**

La angiogénesis y la angiogénesis tumoral presentan la misma función, nutrir y oxigenar un tejido, así como transportar desechos metabólicos y dióxido de carbono (Hanahan y Weinberg, 2011) provenientes de las células con las que interacciona. Por lo cual, el proceso molecular de ambos tipos de angiogénesis resulta ser similar, con la diferencia de que, en la angiogénesis, los tejidos en desarrollo o reestructuración reciben un suministro adecuado de nutrientes (Papetti, 2002). Sin embargo, en la angiogénesis tumoral, las funciones de las células tumorales y su microambiente son alteradas dando como resultado vasos sanguíneos estructural y funcionalmente anormales, con una organización tisular desordenada, con orificios, vasos tortuosos, anchos y con un endotelio discontinuo que generan un flujo de sangre intermitente y hemorragias (Jimeno, 2016) (Figura 12).

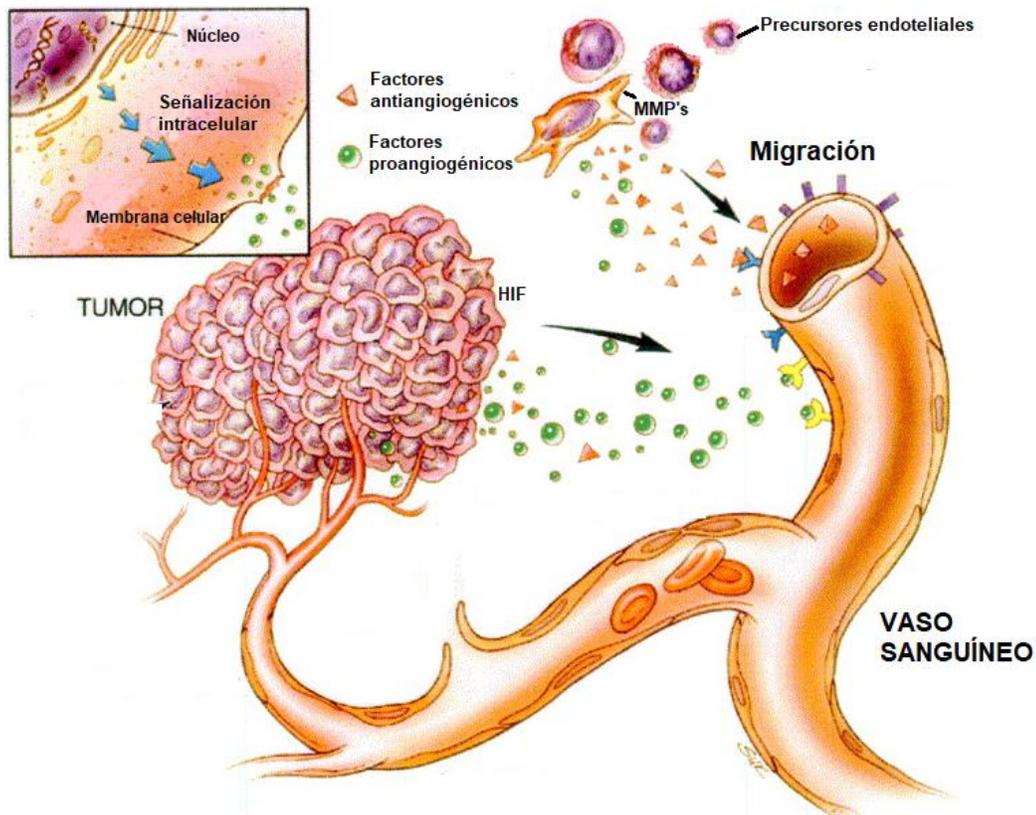


**Figura 12. Vasculatura de la angiogénesis no tumoral y la angiogénesis tumoral.** La angiogénesis tumoral genera vasos sanguíneos irregulares y anchos que dificultan el paso de nutrientes y oxígeno. Tomado y modificado de (MayoClinic, 2019).

El mecanismo que permite la formación de nuevos vasos sanguíneos durante la angiogénesis tumoral consta de tres etapas generales: migración, proliferación y maduración (Tahergorabi, 2012). El proceso ocurre cuando las células del tumor, TAF's (fibroblastos asociados a tumor) detectan una carencia de nutrientes que las estimula a secretar HIF (factor inducible por hipoxia) al microambiente (Ziyad, 2011), lo cual activa la expresión de más factores angiogénicos para continuar el proceso (Papetti, 2002).

1) La primera etapa de *migración* inicia cuando la presencia de HIF en el microambiente tumoral, genera que las células precursoras de células endoteliales comiencen a secretar VEGF (factor de crecimiento endotelial) el cual se une a su receptor VEGFR y favorece la migración de células precursoras de células

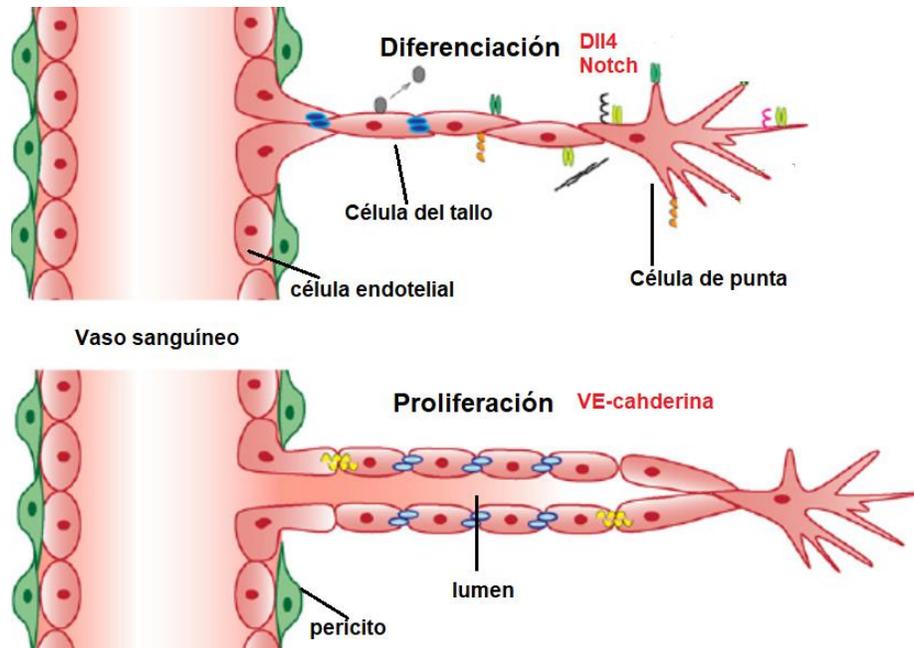
endoteliales. Así mismo, la expresión de factores angiogénicos permite el desprendimiento de los pericitos que rodean el vaso sanguíneo existente (Papetti, 2002). Posteriormente, la unión de la ANG-2 (angiotensina-2) con su ligando TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta) activa a las MMP's (metaloproteinasas de matriz) que degradan localmente la membrana basal de los vasos sanguíneos existentes (Jimeno, 2016). Al mismo tiempo, la expresión de vWF (Factor von Willebrand) genera hemostasia en los vasos sanguíneos para detener el suministro de sangre durante la formación de la nueva vasculatura. Luego las células endoteliales y TAF's migran a la región del daño para promover la formación de nuevos vasos sanguíneos y su proliferación es favorecida por la unión de FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) y EGF (factor de crecimiento epidérmico) (Jimeno, 2016) (Figura 13).



**Figura 13. Etapa de migración de la angiogénesis.** La expresión de HIF por las células del tumor favorece la expresión de factores angiogénicos los cuales, al unirse a su receptor, promueven la migración de las células progenitoras y MMP's a la región donde se formará el nuevo capilar. Tomado y modificado de (Ellis, 2004).

2) Durante la segunda etapa de *proliferación*, las células endoteliales se establecen en el sitio donde comenzará a formarse el nuevo vaso sanguíneo o sitio del brote. Una vez ahí, las células comienzan a proliferar y a diferenciarse por la expresión e inhibición de DLL4 y Notch, con la finalidad de formar células de *tallo* las cuales dan lugar a la estructura del capilar mediante uniones con VE-cadherina, y células de *punta* cuya capacidad les permite formar filipodia, quienes ayudan a

dirigir el crecimiento del nuevo vaso (Potente, 2012). Una vez formado el nuevo capilar, la túnica interna se recubre de glicoproteínas negativas que por repulsión de cargas y mecanismos de apoptosis generan un espacio al centro llamado lumen (Martín, 2008) (Figura 14).

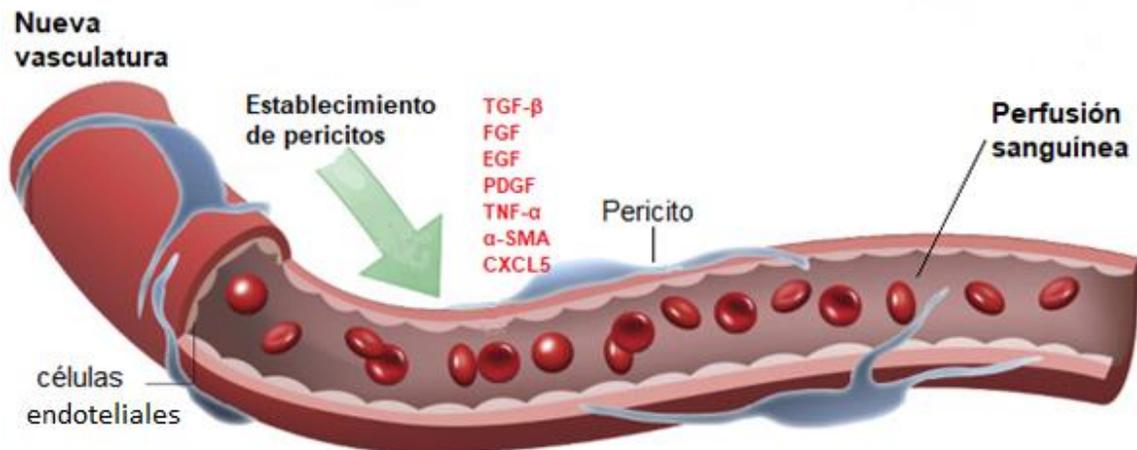


**Figura 14. Etapa de proliferación de la angiogénesis.** La diferenciación de las células progenitoras de células endoteliales a células del tallo y células de punta se da gracias a la unión de DLL4 con su receptor Notch. La proliferación de las células endoteliales favorece la formación del nuevo capilar mediante uniones celulares con VE-cadherina, favoreciendo así la formación del lumen. Tomado y modificado de (Francavilla, 2009).

Posteriormente ocurre el reconocimiento y la fusión del nuevo vaso con otros cercanos mediante el reconocimiento de los filipodia de las células de punta. La unión entre vasos sanguíneos permite la perfusión de la sangre a través de la nueva

vasculatura. Así, el suministro de nutrientes y oxígeno permiten la maduración, estabilización y quiescencia del vaso, (Jimeno, 2016) el cual se refuerza con la migración y proliferación de células mesenquimales, favorecidas por la expresión de factores como  $\alpha$ -SMA (alfa actina del músculo liso), quimiocinas como CXCL5 y por la unión de PDGF $\beta$  (factor de crecimiento derivado de plaquetas) con su receptor PDGFR, así como por la unión de ANG-1 (angiopoyetina 1) con su receptor TIE (Tahergorabi, 2012).

3) La tercera etapa de *maduración* inicia cuando las células mesenquimales que fueron reclutadas se diferencian a pericitos maduros por la expresión de TGF- $\beta$ , los cuales se establecen en la periferia de la nueva vasculatura para mantener la quiescencia del vaso sanguíneo y brindar protección a las células endoteliales. Finalmente, la expresión de TGF- $\beta$ , FGF, EGF, PDGF y TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa) permite la estabilización de la nueva vasculatura con la finalidad de brindar rigidez a los nuevos vasos sanguíneos (Tahergorabi, 2012) (Figura 15).



**Figura 15. Etapa de maduración de la angiogénesis tumoral.** La maduración de la nueva vasculatura se da por el recubrimiento de pericitos, los cuales dan estabilidad al vaso y permiten la perfusión sanguínea. Tomado y modificado de (Thakur, 2018).

### 3.6 Genes asociados al proceso angiogénico tumoral.

En el presente estudio nos interesamos en los genes que codifican a factores de crecimiento como VEGF, vWF y  $\alpha$ -SMA, y quimiocinas como CXCL5 que participan en el proceso de angiogénesis tumoral. A continuación, se describen algunas de sus funciones:

#### 3.6.1 VEGF

El Factor de Crecimiento Endotelial Vascular corresponde a uno de los principales factores pro-angiogénicos que regulan la formación de los vasos sanguíneos durante la angiogénesis. Dentro de la familia, las isoformas VEGF-A y su receptor VEGFR-2 se consideran pro-angiogénicos (Martínez, 2006). El gen VEGF, codifica

para una proteína que se encuentra en el núcleo y se encarga de estimular el crecimiento, diferenciación, proliferación y migración de células endoteliales. De igual manera VEGF tiene la capacidad de aumentar la expresión de moléculas antiapoptóticas para mantener la supervivencia de las células endoteliales durante la proliferación (Jimeno, 2016), así como regular la permeabilidad de la nueva vasculatura durante la angiogénesis (Martínez, 2006).

### 3.6.2 vWF

El factor von Willebrand es una glicoproteína multimérica que está presente en el plasma de la sangre, su estructura primaria es un monómero que al dimerizar y multimerizar forma complejos de diferente peso molecular (Woods, 2016). Este factor, se encuentra implicado en la agregación plaquetaria, hemostasia y regulación de la perfusión de los vasos sanguíneos. Es un eficaz mediador de la adhesión de plaquetas que ayuda a detener el flujo sanguíneo en regiones con daño vascular y favorece el transporte de proteínas por la sangre (Randi, 2016). Así mismo, se encuentra asociado a la metástasis del cáncer, promoviendo la unión de plaquetas y células tumorales que son transportadas por el flujo sanguíneo (Röhsing, 2001).

### 3.6.3 $\alpha$ -SMA

La alfa actina del músculo liso (gen ACTA2) es la isoforma más abundante presente en las células del músculo liso vascular. Su principal función es la activación de miofibroblastos; sin embargo, también se encuentra asociada a la maduración y

estabilización de la nueva vasculatura mediante el reclutamiento de pericitos, así mismo, contribuye con la motilidad y contracción vascular (Tonino, 2011).

#### 3.6.4 CXCL5

El gen para la citocina CXCL5 pertenece a la familia de quimiocinas angiogénicas (motivo CXC) los cuales son considerados fuertes quimioatrayentes que regulan el proceso angiogénico con la finalidad de reparar tejidos conectivos (Belperio, 2000). La unión a su receptor CXCR2 (receptor acoplado a la proteína G), le brinda la capacidad de estimular la quimiotaxis de neutrófilos para promover la angiogénesis (Li, 2011). De igual manera, tienen la capacidad de mediar la proliferación, migración e invasión de tumores (Chen, 2019).

La Tabla 1 resume las características de cada gen: como su locus, el tamaño del gen, el tipo de células que lo expresan y su expresión en ADSC.

**Tabla 1. Características de los genes angiogénicos.**

Gen	Locus	Tamaño del gen	Presente en células	Antecedente	Referencias
<b>VEGF</b>	6p21.1	14kb	Endoteliales, macrófagos, células tumorales, plaquetas, células del estroma, queratinocitos y pericitos.	Algunos estudios han determinado que las ADSC expresan altos niveles de VEGF en cultivos <i>in vitro</i> .	(Selgas, 2001; Chen, 2013; Martínez, 2006; Pérez, 2011).
<b>vWF</b>	12p13.3	178kb	Endoteliales, megacariocitos (precursores de plaquetas) y plaquetas.	Algunos estudios han demostrado la capacidad de las ADSC para expresar vWF bajo estímulos de diferenciación endotelial.	(Deng, 2015; Ning, 2009).
<b>A-SMA</b>	10q23.31	42kb	Del músculo liso vascular, así como por fibroblastos, células endoteliales y células del estroma.	Algunos estudios han demostrado que las ADSC expresan $\alpha$ -SMA como marcador de superficie al ser inducidas a un fenotipo endotelial.	(Badimon, 2015; Vikers, 2004).
<b>CXCL5</b>	4q13.3	3Kb	Monocitos, macrófagos y células tumorales.	<u>Se</u> ha visto expresada en altos niveles por células del estroma como las ADSC.	(GeneCard, 2021; Zhang, 2010).

**Tabla1.** Se resumen las características de los 4 genes angiogénicos empleados para el estudio, como: locus, tamaño del gen, en qué tipo de células es expresado y el antecedente

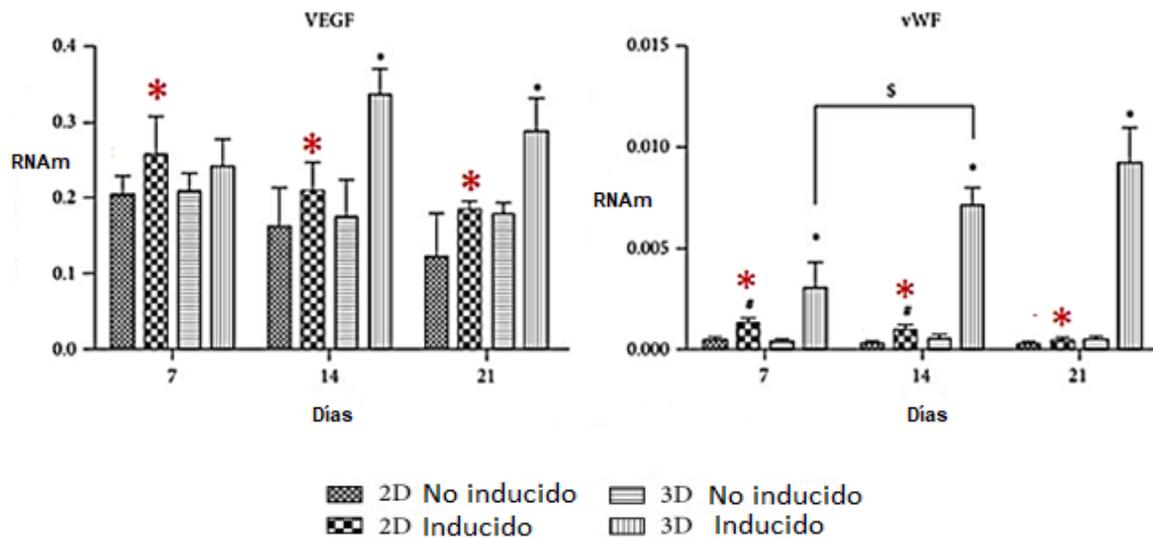
## IV. ANTECEDENTES

---

Una contribución para el entendimiento de cómo la obesidad favorece el desarrollo del cáncer, un estudio *in vivo* realizado con modelos de ratón demostró que las células estromales adiposas provenientes de injertos de tejido adiposo blanco, eran reclutadas por tumores, localizándose en el estroma y vasculatura tumoral, de manera que el estímulo generado fue suficiente para promover el crecimiento tumoral (Zhang, 2009).

Otra investigación realizada *in vitro* reveló que las ADSC estimularon la expresión de moléculas con efecto parácrino al cocultivarse con células tumorales, potenciando las propiedades malignas y acelerando el crecimiento de las células tumorales, así mismo, indujeron marcadores de células troncales en células cancerosas con lo cual, se determinó que las ADSC pueden mejorar la iniciación y promoción del tumor (Wei, 2015).

En este mismo año, se demostró que las ADSC tienen la capacidad de diferenciarse en otros linajes celulares cuando se cultivan con factores de crecimiento específicos. En aquellas que fueron inducidas con VEGF a un fenotipo endotelial se determinó que el nivel de expresión relativa del RNA mensajero del gen VEGF y de vWF fue mayor al día 7 en monocultivo (2D inducido \*) con referencia a los 14 y 21 días como se observa en la Figura 16. (Deng, 2015).



**Figura 16. Nivel de expresión relativa de VEGF y vWF en ADSC.** Se observa el nivel de expresión de ambos genes en ADSC inducida a un fenotipo endotelial (\*) en monocultivo (cultivos 2D). La expresión genética disminuye después de los 7 días de cultivo para el gen VEGF y vWF. Tomado y modificado de (Deng, 2015).

Otra de las moléculas expresada por las ADSC es CXCL5, estudios realizados *in vitro*, revelaron que la expresión de la quimiocina mejora la formación de tubos endoteliales en modelos hechos con matrigel (Zhang, 2010).

Algunas investigaciones se han enfocado al estudio de las ADSC como una alternativa de terapia regenerativa basada en células troncales para la regeneración de tejidos dañados. Un ejemplo *in vivo* realizado con modelos de ratón, mostró la capacidad que tienen las ADSC para promover la vascularización en extremidades posteriores isquémicas mediante la inyección de un MC de uso clínico que contenía

factores angiogénicos y antiapoptóticos. El MC se obtuvo de un cultivo esferoidal tridimensional de ADSC humanas (Bhang, 2014).

Así mismo, la evidencia muestra que las ADSC tienen la capacidad de expresar moléculas y factores que promueven el proceso angiogénico, así como diferenciarse en otros linajes celulares como el fenotipo endotelial lo cual favorece al crecimiento tumoral (Shweizer, 2015) de cánceres asociados a obesidad.

## **V. JUSTIFICACIÓN**

---

La obesidad representa un riesgo para el desarrollo de enfermedades como el cáncer, entre los que destacan el cáncer de útero, de páncreas, de riñón y de colón. Sin embargo, el proceso molecular que explica la interacción entre la obesidad y el cáncer no es claro, así como el papel que juegan las ADSC para promover el crecimiento de un tumor. Por ello, en este estudio, busco investigar si las ADSC favorecen el microambiente tumoral de cánceres asociados a la obesidad al modular la expresión de genes que promueven el proceso angiogénico. Este, podría ser un mecanismo que explicara la manera en la que las ADSC favorecen el crecimiento de un tumor. Más aún podría ser información relevante que contribuya a una mejoría en el pronóstico y/o tratamiento de los tumores asociados a la obesidad.

## **VI. HIPÓTESIS**

---

Las células ADSC contribuyen al establecimiento del microambiente tumoral de cánceres asociados a la obesidad a través de la expresión de moléculas proangiogénicas.

## **VII. OBJETIVOS**

---

### **7.1. Objetivo General**

Determinar la expresión de 4 genes relacionados al proceso angiogénico en las células ADSC cultivadas con el medio condicionado de células derivadas de cánceres asociados a obesidad.

### **7.2. Objetivos Particulares**

- Obtener el medio condicionado de líneas celulares de cánceres relacionados con obesidad.
- Realizar cursos temporales de cultivos de ADSC en presencia de medio condicionado de células tumorales.
- Determinar la expresión de los genes VEGF, vWF,  $\alpha$ -SMA y CXCL5 en células ADSC posterior al cultivo con medio condicionado de células tumorales.

## VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

---

### ***8.1 Cultivo celular***

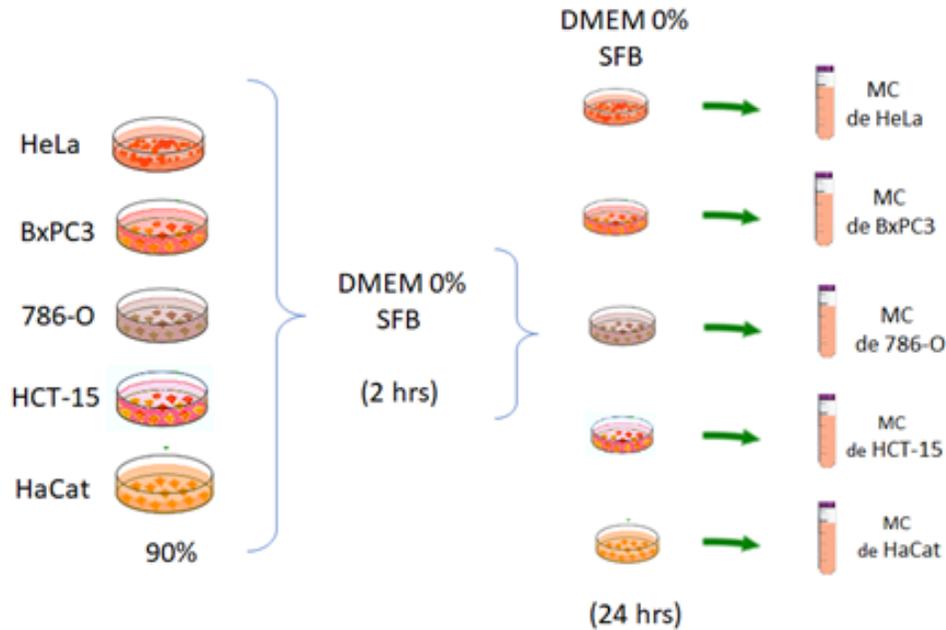
Para el desarrollo del experimento, las siguientes líneas celulares se cultivaron en medio DMEM (Corning 10-017-CV) suplementado con 5% de suero fetal bovino, (SFB por sus siglas en inglés, *Fetal Bovine Serum*) (Gibco™ 10082147):

ADSC (por sus iniciales en inglés, *Adipose Derived Stem Cells*) aislada de tejido adiposo y obtenida de (ATCC® PCS-500-011™), la línea celular HaCaT aislada de queratinocitos epidérmicos inmortalizados y la línea celular HeLa, proveniente de una muestra de adenocarcinoma cérvico-uterino obtenida de (ATCC® CCL-2™).

Por otra parte, cultivamos la línea celular 786-O proveniente de una muestra de adenocarcinoma renal (ATCC® CRL-1932), la línea HCT-15 procedente de una muestra de adenocarcinoma colorrectal (ATCC® CCL-225™) y la línea celular BxPC3 aislada de una muestra de adenocarcinoma pancreático (ATCC® CRL-1687™), en medio RPMI-1640 (Corning 10-040-CV) suplementado con 5% y 10% de SFB. Todos los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

## **8.2 Obtención de los medios condicionados (MC)**

El MC se obtuvo de las líneas celulares HeLa, BxPC3, HCT-15, 786-O y HaCaT como se describe a continuación. Además, se incluyó un medio control con DMEM sin SFB. Los cultivos se mantuvieron hasta tener una confluencia del 90% (Figura 17), posteriormente, se realizó un lavado con buffer PBS 1X y se incubaron en medio DMEM sin SFB por 2 horas. Transcurrido el tiempo, el medio empleado se renovó por más medio sin FBS y se incubó por 24 horas. Al término del tiempo, se recolectó el MC con moléculas secretadas por las células cancerosas y se filtró con un filtro para jeringa con tamaño de poro de  $.20\mu\text{m}$  (Corning #431219) para retirar restos celulares y ser empleado.

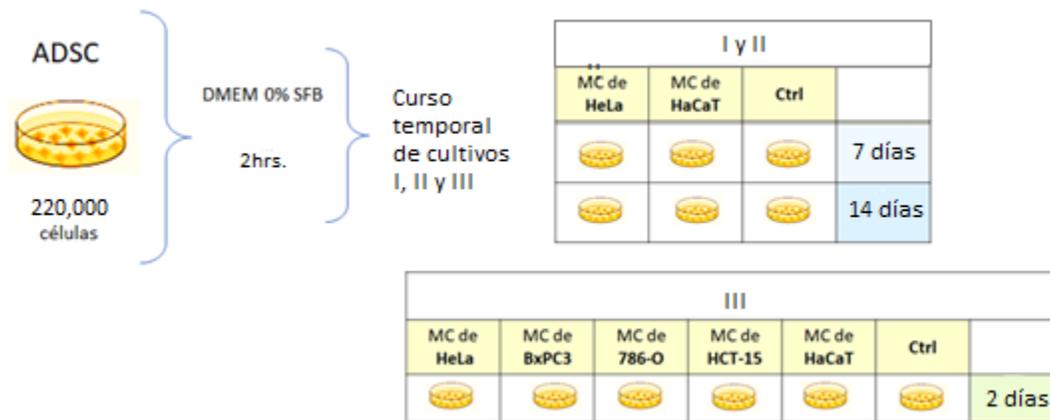


**Figura 17. Obtención del MC.** El MC se obtuvo de 4 líneas celulares de cáncer, HeLa, BxPC3, 786-O y HCT-15, así como la línea no tumoral, HaCaT, las cuales se privaron de SFB por 2 horas y luego por 24 horas. El MC se recolectó y se filtró para su uso.

### 8.3 Cursos temporales

Se realizaron tres cursos temporales cada uno por triplicado biológico, en el primero y segundo se emplearon los MC de HeLa, de HaCaT y el medio control, el cual tuvo una duración de 7 y 14 días respectivamente, mientras que el tercer curso temporal se realizó con una duración de cultivo de 2 días empleando los mismos medios, así como el MC de BxPC3, 786-O y HCT-15, con el objetivo de identificar diferencias significativas en la expresión de los genes proangiogénicos (Figura 18).

Para los cursos temporales sembramos ADSC en monocapa en un formato p100 en medio DMEM con 5% de SFB hasta tener una confluencia del 90%, posteriormente las células fueron recolectadas para realizar una dilución 1:10 con la finalidad de realizar un conteo en la cámara de Neubauer a manera de que cada cultivo mantuviera una proporción similar de células. En cada caja petri se cultivaron aproximadamente 220,000 ADSC bajo las condiciones de crecimiento previamente descritas. Después de 24 horas de crecimiento, las células se privaron de suero por 2 horas, seguidamente se les realizó un lavado con PBS 1X y se le añadió a cada caja petri 12mL de MC recién recolectado de las líneas celulares ya mencionadas. Los cultivos fueron mantenidos en incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por el tiempo programado para cada curso (2, 7 y 14 días) (Figura 18).



**Figura 18. Cursos temporales.** Fueron cultivadas aprox. 220,000 ADSC, las cuales se privaron de suero por 2 horas, posteriormente se les agregó el MC correspondiente. Se muestra el orden de los 3 cursos temporales, el primero con una duración de 7 días, el segundo con una duración de 14 días, en ambos se empleó MC de HeLa, MC de HaCaT y medio control. El tercero tuvo una duración de 2 días en el cual se emplearon los mismos MC además del de BxPC3, 786-O y HCT-15.

#### 8.4 Extracción de RNA y tratamiento con DNAsas

Al término del curso temporal, las células fueron recuperadas para extraer el RNA total mediante el método fenol-cloroformo (TRIzol™ Reagent, Invitrogen™). Posteriormente, el RNA se trató con DNAsas de acuerdo con las indicaciones establecidas por el fabricante del kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega™ # M6101). Finalmente, se midió la concentración y pureza del RNA obtenido mediante espectrofotometría (NanoDrop ND-1000).

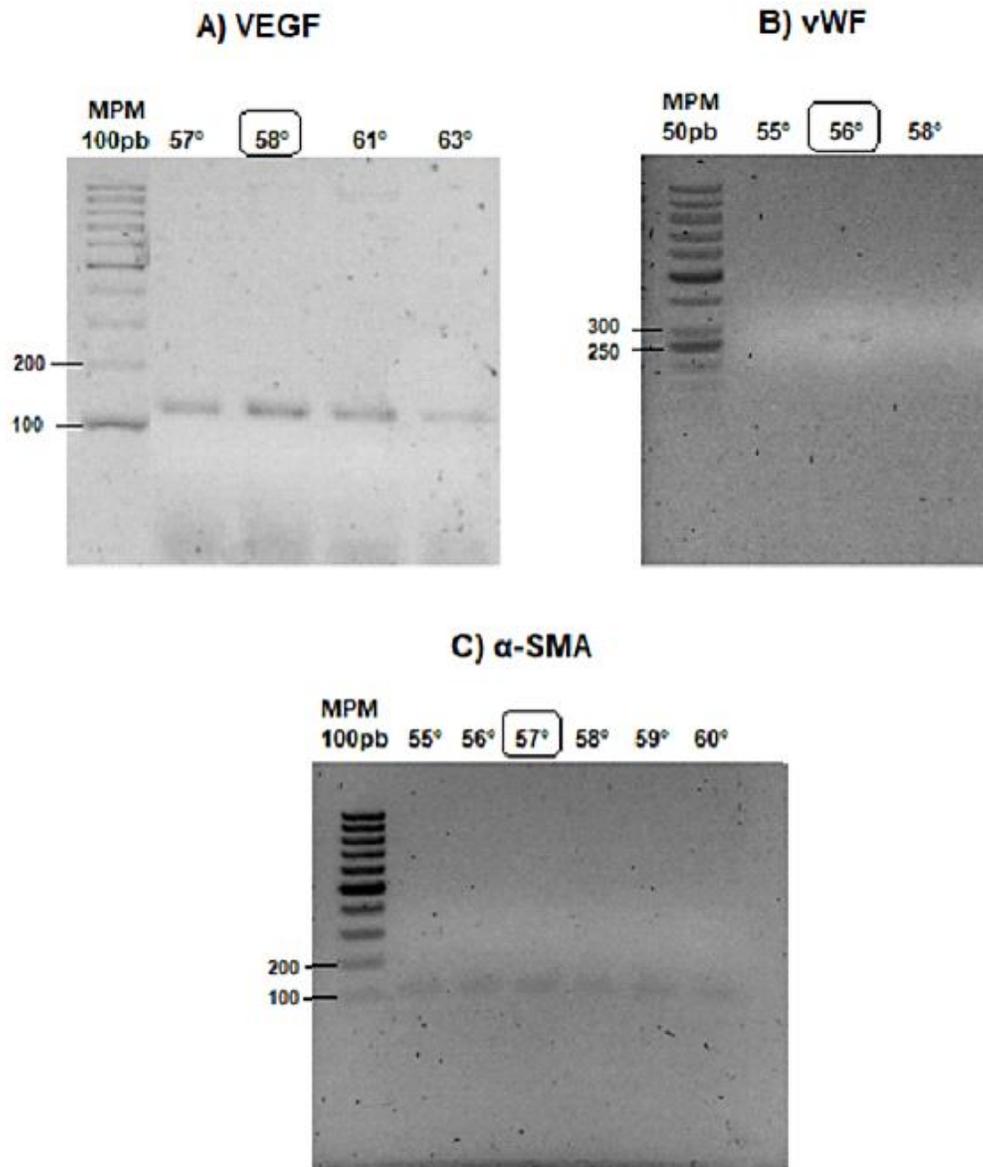
## **8.5 Síntesis de cDNA**

El RNA fue retrotranscrito a DNA complementario (cDNA) para las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Para que las muestras fueran comparables entre ellas, se sintetizó la misma cantidad de RNA por cada muestra siguiendo las indicaciones del fabricante del kit, Maxima First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific™ #K1671) y del kit, High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™ #4329001). El cDNA obtenido se almacenó a -20°C para emplearlo en las reacciones de qRT-PCR.

## **8.6 Determinación de temperatura de hibridación (TM)**

Previo al análisis de expresión de genes mediante qRT-PCR, se determinó la temperatura de hibridación (por sus iniciales en inglés *TM Temperature Melting*) de los oligonucleótidos diseñados específicamente para los genes angiogénicos VEGF, vWF y  $\alpha$ -SMA mediante PCR punto final. El gen CXCL5 fue determinado previamente en nuestro laboratorio.

Para determinar la TM, establecimos un gradiente de temperaturas cercanas a las calculadas con lo cual se realizaron las reacciones de PCR punto final, mediante diferentes termocicladores (GeneAmp™ PCR System 9700, Applied Biosystems). Finalmente se analizaron los productos de PCR separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, mismos que fueron visualizados en un fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS+ System, Bio-Rad) (Figura 19).



**Figura 19. Determinación de TM mediante PCR punto final.** En cada caso, se observa un rango de temperaturas establecidas para la determinación de TM de los oligonucleótidos correspondientes a los genes angiogénicos VEGF, vWF y  $\alpha$ -SMA. A) La TM establecida para los oligonucleótidos del gen VEGF fue a 58°C. B) La TM establecida para vWF fue a 56°C y C) la TM establecida para  $\alpha$ -SMA fue a 57°C.

La caracterización de los oligonucleótidos que fueron empleados, se resume en la Tabla 2. En ella se muestra la secuencia forward y reverse de cada gen, así como, el tamaño del amplicón y la TM determinada. Las secuencias correspondientes a cada gen se tomaron de un estudio realizado in vitro (Deng, 2015).

**Tabla 2. Caracterización de oligonucleótidos.**

Oligonucleótido	Secuencia		Amplicón	TM (°C)
	Forward	Reverse		
<b>VEGF</b>	TTCAAGCCATCCTGTGTGC	ATCTCTCCTATGTGCTGGC	143pb	58°C
<b>vWF</b>	TAGAATCCTTACCAGTGACG	ACTCACACTCATACCCGTTC	251pb	56°C
<b>α-SMA</b>	TCTGTAAGGCCGGCTTTGC	TGTCCCATTCCCACCATCA	100pb	57°C
<b>CXCL5</b>	AAGAAGCTAGAAAACAGGCAAA	TCCAAGGAGAAATGCTAGGG	202pb	58C

**Tabla 2.** La tabla resume las características de los oligonucleótidos correspondientes a los genes VEGF, vWF, α-SMA, y CXCL5, así como el tamaño del amplicón obtenido y la TM determinada mediante PCR punto final.

### 8.7 PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR)

Se determinó la expresión relativa de los genes VEGF, vWF, α-SMA y CXCL5, así como el gen de referencia (control) 18s ribosomal mediante qRT-PCR por triplicado técnico. Las reacciones de qRT-PCR se prepararon empleando un mix de reacción

con SYBR™ Select Master Mix (Applied Biosystems™ #4472908) así como el cDNA obtenido de las ADSC cultivadas con los diferentes MC. La amplificación se realizó en un termociclador QuantStudio 7 Flex (Applied Biosystems™) empleando la TM determinada previamente para cada gen. Los datos del Ct resultantes, se emplearon para el cálculo de los valores  $\Delta Ct$ ,  $\Delta\Delta Ct$  y  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak, 2001) tomando como referencia el gen endógeno 18s.

### **8.8 Análisis estadístico.**

La expresión relativa de los genes angiogénicos fue calculada a partir de los valores  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  obtenidos de las qRT-PCR. Los valores fueron analizados con el software GraphPad Prism 6 mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías con lo cual se pudo obtener una representación gráfica de los niveles de expresión de cada gen. Se tomaron como significantes los valores de \*\*\*\* $p > 0.0001$ , \*\*\* $p > 0.001$ , \*\* $p > 0.01$ , \* $p > 0.05$ .

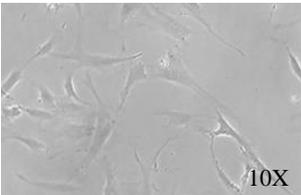
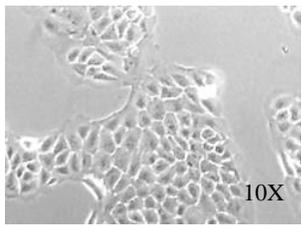
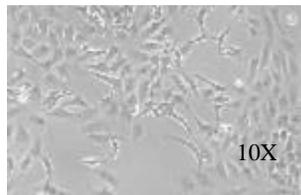
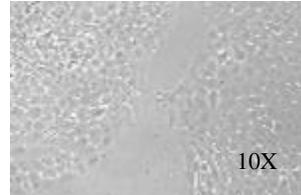
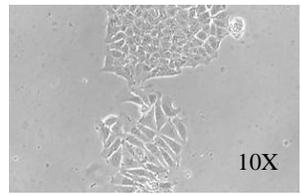
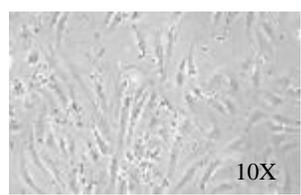
## **IX. RESULTADOS**

---

### **9.1 Cultivo celular.**

Para el primer objetivo comenzamos cultivando células troncales derivadas de tejido adiposo (ADSC) que fueron empleadas en pases tempranos con la finalidad de mantener íntegro su fenotipo celular troncal. Las condiciones de crecimiento determinadas para cada cultivo celular permitieron una adecuada manipulación de cada cultivo celular, así mismo, permitieron sincronizar los cultivos de células tumorales y no tumorales con el de las ADSC. La Tabla 3 resume el tejido de origen, el tiempo de proliferación y la morfología celular de cada línea celular empleada, así como la imagen representativa de cada cultivo en condiciones de crecimiento.

**Tabla 3. Condiciones de crecimiento de las líneas celulares.**

Línea celular	Tipo de Tejido	Proliferación	Morfología	Foto
ADSC <i>Células troncales de tejido adiposo</i>	Tejido adiposo blanco	8-11 días en medio DMEM 5% SFB	Fusiforme, adherente	 10X
HaCaT <i>Queratinocitos epidérmicos inmortalizados</i>	Epidermis	4-5 días en medio DMEM 5% SFB	Epitelial, adherente	 10X
HeLa <i>Células de cáncer de útero</i>	Adenocarcinoma cervicouterino	3-4 días en medio DMEM 5% SFB	Epitelial, adherente	 10X
BxPC3 <i>Células de cáncer de páncreas</i>	Adenocarcinoma pancreático	4-5 días en medio RPMI-140 10% SFB	Epitelial, adherente	 10X
HCT-15 <i>Células de cáncer de colon</i>	Adenocarcinoma colorrectal	1-2 días en medio RPMI-140 5% SFB	Epitelial, adherente	 10X
786-O <i>Células de cáncer de riñón</i>	Adenocarcinoma renal	3-4 días en medio RPMI-140 5% SFB	Epitelial, adherente	 10X

**Tabla 3.** Se muestran las condiciones de crecimiento de cada cultivo celular como el tejido de origen y tiempo de proliferación, así como, las características de crecimiento y su morfología celular. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio óptico (objetivo 10X).

Las características de crecimiento de cada línea celular proveniente de tejido tumoral así como la línea no tumoral HaCaT (de las cuales se obtuvo el MC), permitió conocer el tiempo de proliferación de cada cultivo para programarlo con el crecimiento de las ADSC. Con la finalidad de mantener el MC íntegro y evitar su degradación, decidimos emplearlo en ausencia de suero durante los cursos temporales.

## **9.2 Cursos temporales**

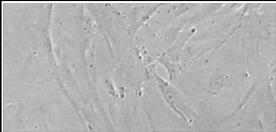
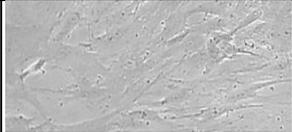
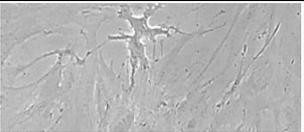
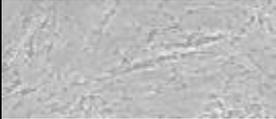
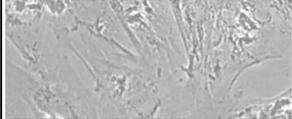
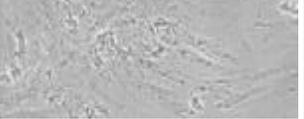
Para el segundo objetivo, realizamos tres cursos temporales, cada uno por triplicado biológico. El primer y segundo curso temporal se realizó con una duración de 7 y 14 días respectivamente, durante los cuales empleamos DMEM sin SFB como control (sin moléculas secretadas por células), MC de HeLa (con moléculas secretadas por células tumorales) y MC de HaCaT (con moléculas secretadas por células no tumorales) con el objetivo de identificar diferencias significativas en la expresión de los genes.

Las imágenes representativas al primer y segundo curso temporal muestran que las ADSC cultivadas al día 7 y día 14 adquirieron cambios morfológicos con respecto al día 0 (Tabla 4) como respuesta a los estímulos recibidos por el MC: como contracción de la membrana celular, discontinuidad en la membrana y citoplasma vacuolado (con aspecto apolillado), así mismo, aumentó la presencia de detrito

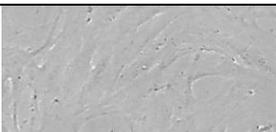
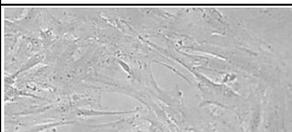
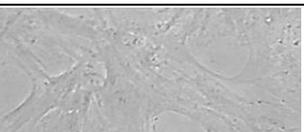
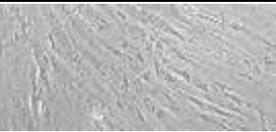
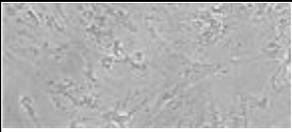
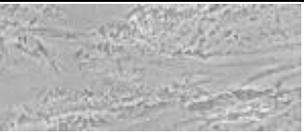
celular en el medio, como ocurre en un proceso apoptótico (Vázquez, 2018), lo cual, puede impedir la expresión de los genes proangiogénicos.

**Tabla 4. Primer y segundo curso temporal.**

**A)**

ADSC en medio Control	ADSC en MC HaCaT	ADSC en MC HeLa	I
			Día 0
			Día 7

**B)**

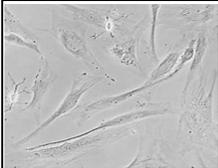
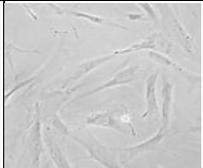
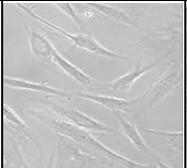
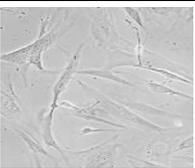
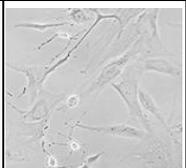
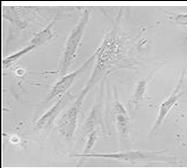
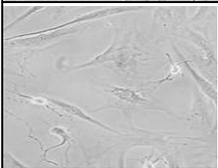
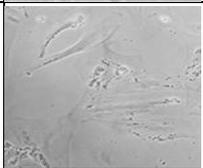
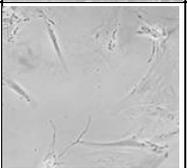
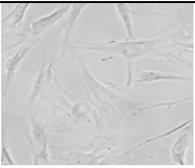
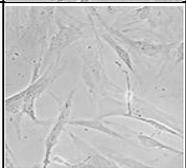
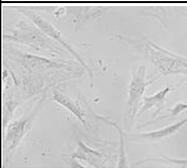
ADSC en medio Control	ADSC en MC HaCaT	ADSC en MC HeLa	II
			Día 0
			Día 14

**Tabla 4.** Imágenes representativas de la morfología celular de las ADSC durante el primer y segundo curso temporal. **A)** El primer curso, corresponde a ADSC cultivadas con medio control, MC de HaCaT y MC de HeLa al día 0 y día 7. **B)** El segundo curso temporal corresponde a ADSC cultivadas con medio control, MC de HaCaT y MC de HeLa al día 0 y día 14 de cultivo. Las fotografías fueron tomadas con microscopio óptico (objetivo 10X).

Con base en los resultados obtenidos del primer y segundo curso temporal, decidimos realizar un tercer curso temporal con una duración de 2 días. Se emplearon los mismos medios, así como el MC de BxPC3, el MC de HCT-15 y el MC de 786-O. La Tabla 5 muestra, que la morfología celular de las ADSC al día 2 de cultivo no indujo cambios morfológicos con respecto al día 0, como ocurrió al día 7 y 14 de cultivo. Estos datos sugieren que, posiblemente la ausencia de suero en el MC indujo en las ADSC los cambios morfológicos en cultivos con mayor duración.

**Tabla 5. Tercer curso temporal.**

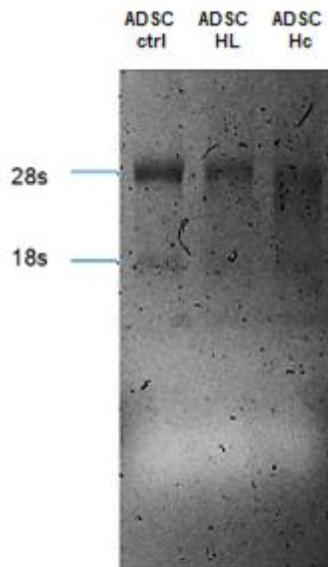
C)

MC Control	MC HaCaT	MC HeLa	MC BxPC3	MC HCT-15	MC 786-0	III
						Día 0
						Día 2

**Tabla 5.** Se muestra la morfología celular de ADSC durante el tercer curso temporal al día 0 y día 2. Las fotografías fueron tomadas con microscopio óptico (objetivo 10X).

Posterior a los cursos temporales, el material genético (RNA) de las ADSC se extrajo y retrotranscribió a cDNA para emplearlo en las reacciones de qRT-PCR, para ello, evaluamos la integridad y calidad de las muestras de RNA mediante un

gel de integridad. La Figura 20 muestra el gel de integridad preparado con RNA de ADSC cultivadas con medio control, MC de HeLa y MC de HaCaT empleadas en el primer curso temporal, en la cual se observan dos bandas: 28s y 18s ribosomal, las cuales, representan la integridad del RNA obtenido. El gel de integridad muestra que el RNA se encuentra íntegro y puede ser empleado, ya que las bandas no se encuentran fragmentadas.



---

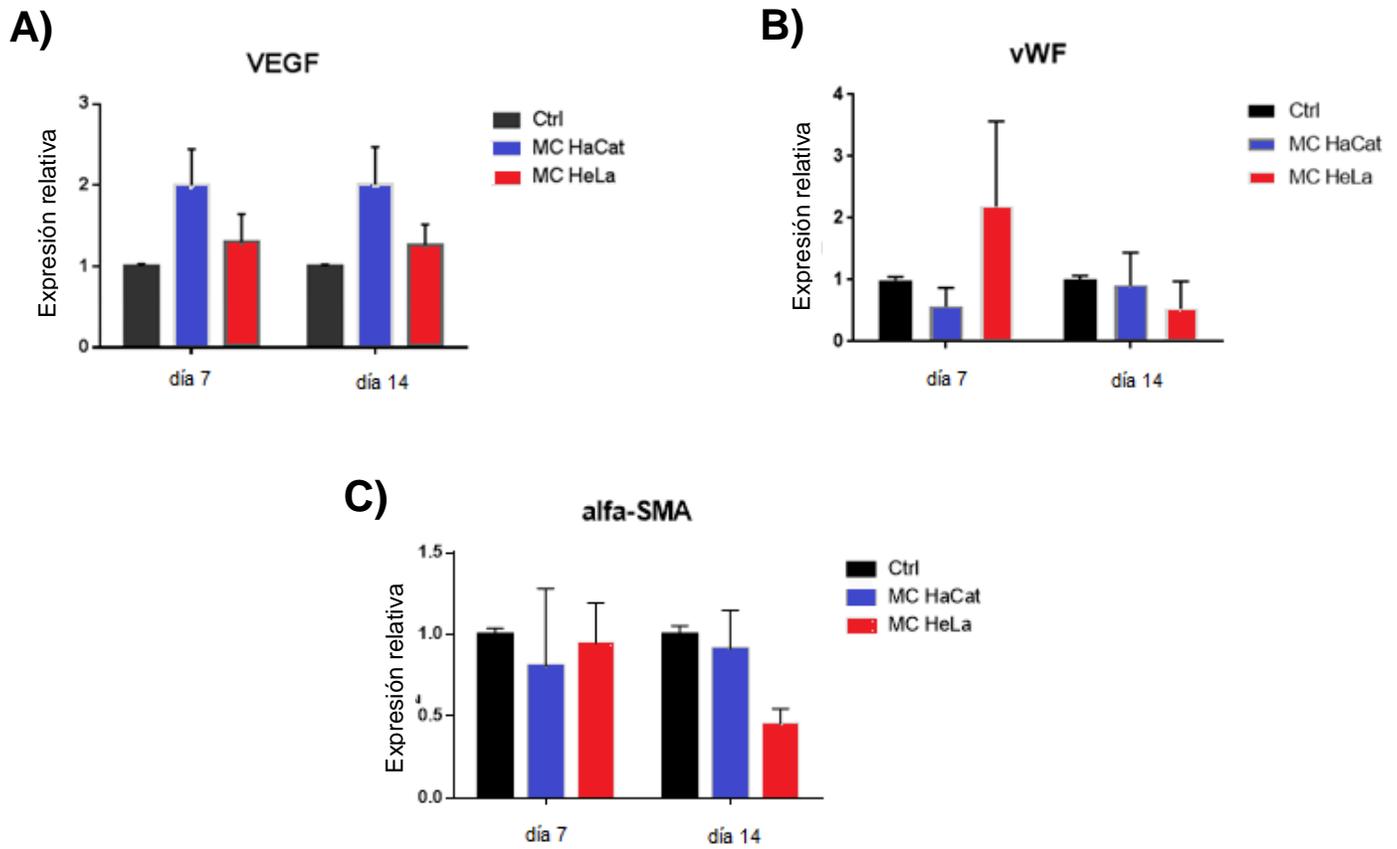
**Figura 20. Gel de integridad de ADSC posterior al curso temporal.** Se muestra la banda 18s y 28s ribosomal de los productos obtenidos de la electroforesis del gel de integridad al 1.5% de agarosa. Se empleó el RNA de ADSC cultivadas en medio control, MC de HeLa y MC de HaCaT, posterior al primer curso temporal.

### **9.3 Determinación de temperatura de hibridación (TM)**

Para el tercer objetivo (cuantificar la expresión genética), se determinó la TM de los oligonucleótidos correspondientes a los genes angiogénicos VEGF, vWF y  $\alpha$ -SMA mediante la técnica de PCR punto final. La TM determinada para el gen VEGF se estableció a los 58°C, para el gen vWF se estableció a los 56°C y para el gen  $\alpha$ -SMA se estableció a los 57°C. La TM correspondiente a CXCL5 había sido determinada previamente por nuestro laboratorio a 58°C.

### **9.4 Cuantificación de la expresión de genes angiogénicos**

Con respecto a la cuantificación de la expresión relativa de los genes proangiogénicos, en el primer y segundo curso temporal (Figura 21) se decidió emplear el MC de células tumorales, el MC de células no tumorales y el medio de crecimiento sin suero como control, para identificar diferencias en la expresión de los genes proangiogénicos, sin embargo, no encontramos diferencia significativa con respecto al medio empleado. Por otra parte, decidimos realizar el primer y segundo curso temporal con una duración de 7 y 14 días para identificar cambios en la expresión de los factores VEGF, vWF y  $\alpha$ -SMA, pero tampoco encontramos diferencias significativas con respecto a la duración de los cultivos.



**Figura 21. Nivel de expresión relativa de los genes angiogénicos correspondientes al primer y segundo curso temporal.** Se muestra la expresión relativa de los genes angiogénicos VEGF, vWF y  $\alpha$ -SMA en ADSC cultivadas con medio control (negro), en MC de HaCaT (azul) y en MC de HeLa (rojo) al día 7 y día 14 de cultivo. A) Muestra el nivel de expresión relativa para el gen VEGF, B) muestra el nivel de expresión relativa para el gen vWF, C) se presenta el nivel de expresión relativa para el gen  $\alpha$ -SMA. En ningún caso se encontraron diferencias significativas. Las barras representan el error estándar de la media. ( $\pm$ EEM), (\*\* $p \leq 0.05$ ) según el ANOVA.

Debido a que no se hallaron diferencias significativas en la expresión de los genes durante el primer y segundo curso temporal, se decidió realizar un tercer curso temporal con una duración de 2 días

La cuantificación de la expresión relativa de los genes VEGF, vWF,  $\alpha$ -SMA y CXCL5 del tercer curso temporal (Figura 22) muestran que al día 2 de cultivo todos los genes angiogénicos empleados en este estudio fueron sobreexpresados por diferente MC de células tumorales y no tumorales, en comparación con el día 7 y día 14 de cultivo.

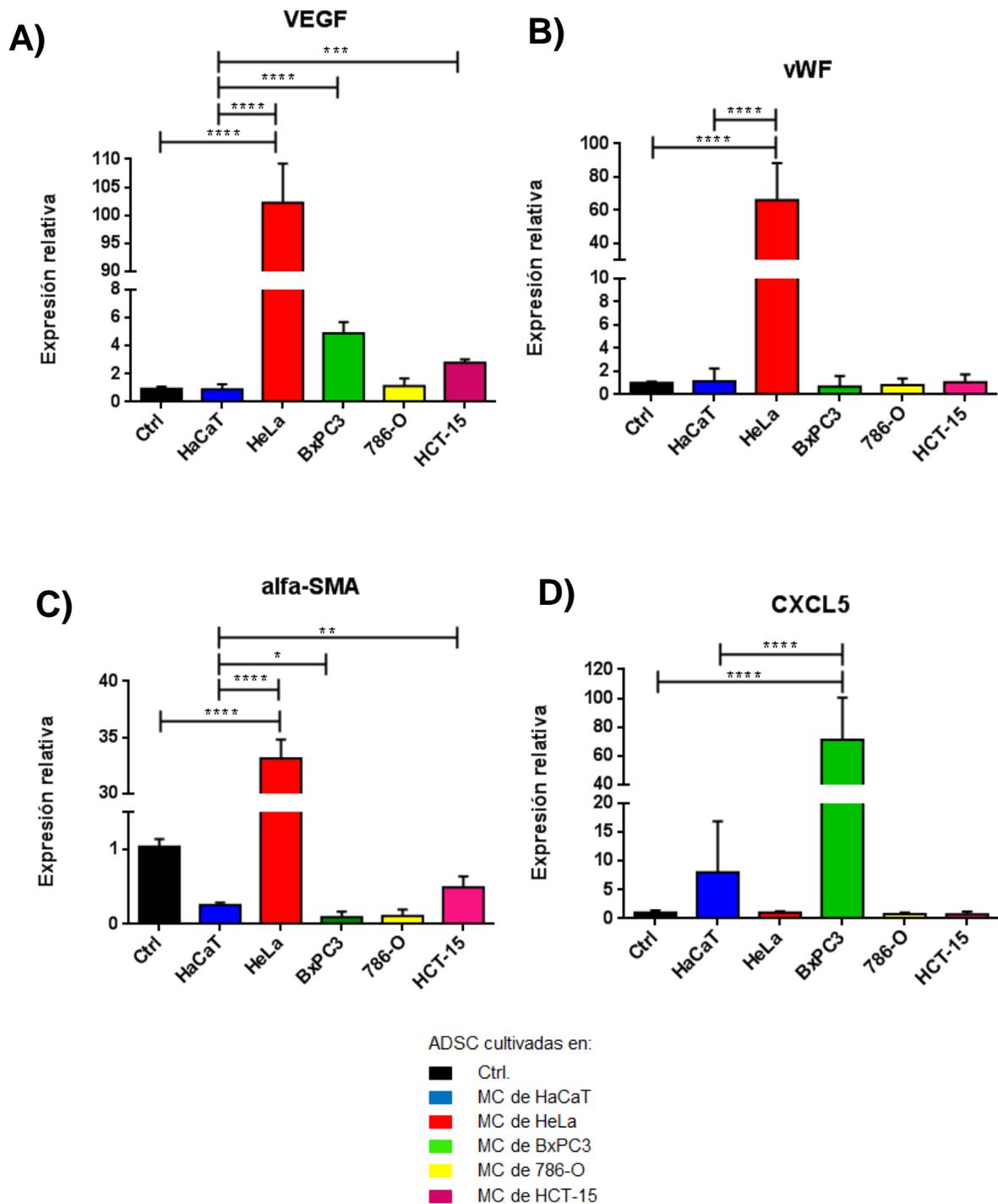
Por otra parte, observamos que el MC de las células tumorales HeLa, BxPC3 y HCT-15, mostraron tener mayor capacidad de expresión de factores proangiogénicos como VEGF (Figura 22A) en comparación con la línea no tumoral HaCaT (\*\*\*\* $p > 0.0001$ , \*\*\* $p > 0.001$ ). Nuestro análisis mostró diferencias significativas en ADSC cultivadas en MC de HeLa con respecto al medio control y con respecto al MC de HaCaT, así como, en ADSC cultivadas con MC de BxPC3 y de HCT-15 con respecto al MC de HaCaT.

De igual manera encontramos que el MC de la línea tumoral HeLa indujo al día 2 la sobreexpresión de más genes (VEGF, vWF y  $\alpha$ -SMA) (Figura 22A, 22B y 22C) en comparación con los demás MC de células tumorales y no tumorales (\*\*\*\* $p > 0.0001$ ).

Con respecto a la expresión de  $\alpha$ -SMA (Figura 22C), se observa que el MC de la línea no tumoral HCT-15 mostró mayor capacidad de expresión del gen en comparación con el MC de HaCaT y BxPC3 (\*\* $p > 0.01$ , \* $p > 0.05$ ), sin embargo, ninguno de estos tres MC tuvieron la capacidad de sobreexpresar el gen en comparación con el medio de crecimiento sin suero (control).

La gráfica correspondiente al CXCL5 (Figura 22D) muestra que solo el MC de BxPC3 indujo la sobreexpresión del gen en comparación el MC de HaCaT y el medio de crecimiento sin suero (control) (\*\*\*\* $p > 0.0001$ ) a diferencia de los demás MC.

Finalmente, las gráficas de VEGF correspondientes al primer, segundo y tercer curso temporal (Figura 21A y 22A) muestran que todos los medios empleados en el trabajo indujeron la sobreexpresión del factor, el cual, es considerado como el principal regulador del proceso angiogénico.



**Figura 22. Niveles de expresión relativa de los genes angiogénicos correspondientes al tercer curso temporal.** Las gráficas muestran la expresión relativa de los genes angiogénicos VEGF, vWF,  $\alpha$ -SMA y CXCL5 en ADSC cultivadas en medio control (negro), MC de HaCaT (azul), MC de HeLa (rojo), MC de BxPC3 (verde), MC de 786-O (amarillo) y MC de HCT-15 (rosa) al día 2 de cultivo. **A)** para VEGF se hallaron diferencias significativas

en ADSC cultivadas en MC de HeLa con respecto al medio control y con respecto al MC de HaCaT, así como, en ADSC cultivadas con MC de BxPC3 y de HCT-15 con respecto al MC de HaCaT. **B)** para el gen vWF se encontraron diferencias significativas en ADSC cultivadas en MC de HeLa con respecto al medio control y con respecto al MC de HaCaT. **C)** El gen  $\alpha$ -SMA mostró diferencias significativas en ADSC cultivadas con MC de HeLa con respecto al medio control y MC de HaCaT, así como en ADSC cultivadas con MC de BxPC3 y HCT-15 con respecto al MC de HaCaT. Finalmente, **D)** para el gen CXCL5 se encontraron diferencias significativas en ADSC cultivadas con MC de BxPC3 en comparación con el medio control y MC de HaCaT. Las barras representan el error estándar de la media ( $\pm$ EEM). Las marcas de significancia estadística indican \*\*\*\* $p > 0.0001$ , \*\*\* $p > 0.001$ , \*\* $p > 0.01$  y \* $p > 0.05$  según el ANOVA.

## X. DISCUSIÓN

---

En el presente estudio fue evaluado el nivel de expresión relativa de algunos genes angiogénicos en ADSC cultivadas con MC de células tumorales. Decidimos emplear ADSC debido a que son células troncales obtenidas del tejido adiposo, las cuales, poseen la capacidad de diferenciación hacia otros linajes celulares (Galván, 2016), así como la capacidad de expresión de moléculas con propiedades angiogénicas y quimioatrayentes (Moreno, 2015; Zhang, 2009). Son células aptas para su cultivo *in vitro* ya que mantienen una tasa de duplicación poblacional relativamente rápida, adherentes y de fácil manipulación en cultivos celulares (Badimon, 2015). Así mismo, se han visto asociadas a la promoción del proceso angiogénico y el crecimiento tumoral (Deng, 2015; Zhang, 2009).

Así mismo elegimos HeLa, BxPC3, HCT-15 y 786-O por ser líneas celulares de cánceres asociados con un mayor riesgo relativo de muerte en mujeres y hombres adultos con obesidad (Calle, 2003).

El MC fue empleado como simulación de un microambiente tumoral, ya que, contiene moléculas y factores de crecimiento secretadas al medio por las células tumorales durante su cultivo (Sánchez, 2011), como: HIF, VEGF, FGF, TGF- $\beta$  o EGF (Deng, 2015; Jimeno, 2016) los cuales pueden inducir la expresión de diferentes factores angiogénicos en las ADSC (Deng, 2015; Chen, 2016; Tarcisia, 2017).

Durante los cursos temporales se tomaron fotografías representativas de la morfología de ADSC. En el primer y segundo curso temporal (7 y 14 días respectivamente), pudimos observar que las ADSC adquirieron cambios morfológicos posiblemente por la ausencia de SFB, induciendo un estrés metabólico en las ADSC que favoreció los cambios morfológicos. Con base en investigaciones realizadas in vitro, se sabe que ADSC cultivadas en un medio sin suero presentan una menor viabilidad celular y mayor apoptosis celular a los 5 días de cultivo (Díaz, 2016).

Durante el primer y segundo curso temporal decidimos emplear el MC de HeLa y el MC de HaCaT, este último como un control de factores secretados por células no tumorales, así como el medio de crecimiento sin SFB, con el objetivo de identificar diferencias en la expresión de los genes angiogénicos. Posterior a los cursos temporales se determinó la expresión relativa en ADSC de los genes angiogénicos (VEGF, vWF y  $\alpha$ -SMA). En estudio previos, se demostró una mayor expresión de VEGF y vWF al día 7 en comparación con el día 14 y 21 (Deng, 2015). En nuestros resultados, no encontramos diferencias significativas en la expresión relativa de ninguno de los genes evaluados entre los dos tiempos de duración de los cultivos, sin embargo, el MC de HeLa mostró una tendencia a una mayor actividad angiogénica en ADSC con respecto a los demás medios al sobreexpresar los genes VEGF y vWF (Figura 21A y 21B), mientras que el MC de HaCaT solo indujo la sobreexpresión de VEGF. Con respecto a lo anterior, estudios previos han demostrado que las células tumorales como HeLa y los queratinocitos epidérmicos como HaCaT inducen la expresión de VEGF en tejidos con carencia de nutrientes,

con la finalidad de promover la angiogénesis y favorecer la supervivencia de los queratinocitos y de las células tumorales. (Carrero, 2006; Eming, 2006; Zhu, 2013). Altos niveles de VEGF en el MC inducen en ADSC la expresión de VEGF y vWF (Carrero, 2006; Deng, 2015), por lo cual, solo el MC de HeLa pudo inducir mayor expresión de vWF al día 7 (Figura 21B). Contrario a lo anterior, se observa en la Figura 21C, que  $\alpha$ -SMA no fue sobreexpresado por las ADSC cultivadas al día 7 y 14 posiblemente como consecuencia de la falta de moléculas necesarias para inducir en ADSC la expresión del gen.

A partir de nuestras observaciones a nuestros resultados anteriores, se decidió realizar un tercer curso temporal con un menor tiempo de cultivo. El tercer curso temporal mostró que en el día 2 de cultivo se sobreexpresaron un mayor número de genes (Figura 22) con respecto al día 7 y día 14 (Figura 21), al emplear MC de diferentes líneas celulares tumorales, lo cual, propone que, durante los primeros días de cultivo, en el MC existe mayor concentración de moléculas inductoras de la expresión de los genes angiogénicos en ADSC. Aunado a lo anterior, las células tumorales HeLa, BxPC3 y HCT-15 mostraron mayor capacidad para promover el proceso angiogénico, ya que, indujeron la sobreexpresión del gen VEGF en el día 2 de cultivo (Figura 22A) con diferencias significativas al compararlas contra el medio de crecimiento sin suero y el MC de células no tumorales (HaCaT). Estos resultados sugieren que las células tumorales tienen mayor capacidad de promover la expresión de factores angiogénicos con la finalidad de favorecer el crecimiento tumoral a diferencia de las células no tumorales como HaCaT (Hanahan y Weinberg, 2011; Jimeno, 2016; Ziyad, 2011). Por otro lado, el MC de HeLa favoreció la

sobreexpresión de un mayor número de genes (VEGF, vWF y  $\alpha$ -SMA) en ADSC con diferencias significativas con respecto a los demás MC de células tumorales y no tumoral (Figura 22A, 22B y 22C). Con relación a este, estudios han establecido que el cáncer cervicouterino se caracteriza por su proliferación vascular (Carrero, 2006), lo cual, promueve la expresión de VEGF y su secreción al medio (Rajesh, 2005). Proponemos que esto favorece en las ADSC una cascada de señalización que en parte podría explicar la sobreexpresión de vWF y  $\alpha$ -SMA que induce el MC de HeLa al compararlo contra los demás MC (Figura 22B).

Los resultados observados con respecto a la expresión relativa de  $\alpha$ -SMA (Figura 22C) nos muestra que el MC de HCT-15 tuvo una expresión significativamente mayor con respecto al MC de HaCaT, el cual, a su vez mostró mayor expresión del gen  $\alpha$ -SMA con respecto al MC de BxPC3. Con base en investigaciones realizadas *in vitro*, se sabe que el cáncer colorrectal promueve la expresión de  $\alpha$ -SMA promueve la diferenciación de miofibroblastos y mejora el fenotipo tumoral (Yokoyama, 2015). De igual manera, se sabe que la expresión de  $\alpha$ -SMA es menor en cáncer colorrectal y de páncreas con respecto al cáncer cervical (The Human Protein Atlas, 2020).

Por otra parte, se incluyó el análisis de expresión de CXCL5 para determinar si el MC favorecía la expresión de esta citosina reguladora del proceso angiogénico en las ADSC (Belperio, 2000; Li, 2011). Nuestros resultados mostraron (Figura 22 D) que el MC de BxPC3 promovió en ADSC la sobreexpresión del gen con diferencias significativas al compararlo con respecto al medio de crecimiento sin suero y al MC

de células no tumorales (HaCaT). Estudios demuestran que la presencia de VEGF en el medio por la ausencia de nutrientes (Eming, 2006; Zhu, 2013), puede inducir en las ADSC la expresión de CXCL5, con la finalidad de promover la angiogénesis a causa de la posible activación de las vías de señalización PI3K y MAPK (Li, 2011). Estudios han establecido que CXCL5 es sobreexpresado por el cáncer de páncreas al detectar la ausencia de nutrientes (Li, 2011), así mismo, el medio inducido por CXCL5 promueve la expresión de VEGF para promover la formación de nuevos vasos sanguíneos (Chen, 2019).

Con respecto a la expresión del factor VEGF obtenida de los tres cursos temporales (Figura 21 y Figura 22) encontramos que todos los MC empleados en este estudio favorecieron la sobreexpresión del gen, este resultado podría explicarse en parte a la ausencia de SFB en el medio, ya que se ha observado que la privación de nutrientes favorece la expresión de VEGF en células tumorales y queratinocitos, por lo que su secreción al medio favorece que las ADSC aumenten la expresión de esta molécula por un loop de retroalimentación (Deng, 2015). VEGF activa y promueve la angiogénesis (Carrero, 2006), de manera que, al unirse a su receptor (VEGFR-2) activa las vías de señalización implicadas en el proceso angiogénico (Figura 8), como la vía PI3K que se relaciona con la supervivencia de células endoteliales, la cual, a su vez activa la vía AKT favoreciendo la permeabilidad vascular. Y las vías de señalización MAPK la cual promueve la migración de células endoteliales y la vía Ras implicada en la proliferación de células endoteliales (Martínez, 2006).

Estos resultados en conjunto, demuestran que el MC de HeLa, BxPC3, 786-O, HCT-15 y HaCaT fueron capaces de inducir en las ADSC la expresión los 4 genes angiogénicos (VEGF, vWF,  $\alpha$ -SMA y CXCL5), como fue observado por estudios previos (Bhang, 2014). Los cuales favorecen el fenotipo tumoral y promueven el crecimiento de un tumor (Schweizer, 2015; Zhang, 2009).

## **XI. CONCLUSIONES**

---

Con el objetivo de conocer el papel de las ADSC en el microambiente tumoral que sostiene y propicia el crecimiento de un tumor, se analizó la expresión relativa de los genes angiogénicos VEGF, vWF,  $\alpha$ -SMA y CXCL5 mediante cursos temporales realizados en ausencia de suero por 2, 7 y 14 días. Se demostró que las ADSC expresaron los cuatro genes angiogénicos al ser cultivadas con un MC proveniente de células tumorales de cánceres asociados a la obesidad. Así mismo, se determinó que en el día 2 de cultivo, las ADSC sobreexpresaron mayor cantidad de genes angiogénicos en comparación con 7 y 14 días de cultivo. Por otra parte, establecimos que el MC de la línea celular tumoral (HeLa) mostró tener mayor actividad angiogénica en comparación la línea celular no tumoral HaCaT al sobreexpresar mayor cantidad de genes angiogénicos. Finalmente determinamos que el gen VEGF fue sobreexpresado con todos los MC empleados en el trabajo, sin embargo, solo el MC del cáncer cervicouterino (HeLa) indujo en ADSC la sobreexpresión de un mayor número de genes (VEGF, vWF y  $\alpha$ -SMA).

Con base en lo observado en nuestros resultados concluimos que durante el cultivo de ADSC en presencia de MC de células tumorales existe una señalización a través de factores secretados al medio, mismos que estimulan a las ADSC a favorecer el microambiente tumoral de cánceres asociados a obesidad a partir de la expresión de factores de crecimiento como VEGF, vWF,  $\alpha$ -SMA y CXCL5 durante los primeros

días de cultivo, los cuales, tendrán implicación en la promoción del proceso angiogénico y el crecimiento de un tumor.

## **XII. PERSPECTIVAS**

---

Con el propósito de enriquecer el presente trabajo, se sugiere ampliar la investigación con un análisis proteómico del MC, antes y después de los cursos temporales, con el objetivo de observar algún cambio en la expresión de las proteínas secretadas al MC por las células tumorales.

Así mismo, se propone realizar co-cultivos de ADSC / células tumorales asociados a obesidad para favorecer la comunicación intercelular continua en un flujo de señales - respuesta, con el objetivo de evaluar la expresión diferencial de genes angiogénicos tanto en ADSC como en las líneas celulares tumorales.

Por otro lado, la idea de que las ADSC pudieran adquirir una diferenciación celular a un fenotipo endotelial para favorecer la angiogénesis tumoral, no se rechaza. Con base en diferentes estudios, se ha observado que las ADSC pueden diferenciarse a un fenotipo endotelial al cultivarse en medios inducidos, con lo cual, se podrían analizar en las ADSC a los genes asociados a la formación del endotelio vascular como el factor Óxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS)

De igual manera, se propone analizar si las ADSC cultivadas con MC de células tumorales presentan marcadores de superficie correspondientes a células troncales o adquirieron una diferenciación celular a un fenotipo endotelial.

Finalmente, se sugiere evaluar si la inhibición en ADSC de la expresión de los genes angiogénicos en un modelo in vitro y posteriormente en un modelo in vivo puede disminuir la viabilidad de células tumorales o formación de tumores (respectivamente) al no proveer de estas moléculas al microambiente tumoral.

### XIII. REFERENCIAS

---

Arango, M. y Rodríguez, C. (2016). *Role of the immune system in the microenvironment of malignant tumor of breast*. Rev. Cubana de Hematología, Inmunología y hemoteria. 32 (2):190-202.

American Cancer Society (ACS) (2016). *¿Qué es el cáncer?*  
<https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>

Badimon, L., Oñate, B. y Vilahur, G. (2015). *Adipose-derived mesenchymal Stem Cells and their reparative potential in ischemic heart disease*. Revista Española de Cardiología. 8(7): 599-611.

Barquera, S., Nonato, I., Barrera, L., Pedroza, A. y Dommarco, J. (2013). *Prevalence of obesity in Mexican adults 2000-2012*. Instituto Nacional de Salud Pública. 55(2): 151-160.

Barrera, A., González, A. y Molina, M. (2013). *Escenario actual de la obesidad en México*. Re. Med. Inst. Mex. Seguro Soc. 51 (3): 292-99.

Bhang, S., Lee, S., Shin, J., Lee, T., Jang, H. y Kim, B. (2014). *Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose Derived Stem Cells for Therapeutic Angiogenesis*. The American Society of Gene and Cell Therapy. 22(4), 862-872.

Belperio, J., Keane, M., Arenberg, D., Addison, C., Ehlert, J., Burdick, M y Strieter, R. (2000). *CXC Chemokines in angiogenesis*. Journal of leukocyte Biology. 68, 1-5.

Calle, E., Rodríguez, C., Walker, K. y Thun, M. (2003). *Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults*. The new England Journal Medicine. 348(17): 1625-1638.

Carrero, Y., Alaña, F., Callejas, D. y Mindida, R. (2006). *Angiogenesis en cáncer cervical. Expresión del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), metabolism oxidative e infiltración leucocitaria*. Sociedad Científica de Estudiantes de Medicina Venezuela. 4(2): 88-104.

Chen, C., Xu, Z., Zong, Y., Ou, B., Shen, X., Feng, H., Zheng, M., Zhao, J. y Lu, A. (2019). *CXCL5 induces tumor angiogenesis via enhancing the expression of FOXD1 mediated by the AKT/NF- $\kappa$ B pathway in colorectal cancer*. *Cell Death and Disease*. 10(178): 10-178.

Chen, G., Shi, X., Sun, C., Li, M., Zhou, Q., Huang, J., Qiu, Y., Wen, X., Zhang, Y., Zhang, Y., Yang, S., Lu, L., Zhang, J., Yuan, Q., Lu, J., Xu, G., Xue, Y., Jin, Z., Jiang, C., Ying, M. y Lui, X. (2013). *VEGF-mediated proliferation of human adipose tissue derived stem cells*. *Plos One*. 3(10): e73673.

Chen, J., Gu, Z., Wu, M., Yang, Y., Zhang, J., Ou, J., Zuo, Z., Wang, J. y Chen, Y. (2016). *C-reactive protein can upregulate VEGF expression to promote ADSC-induced angiogenesis by activating HIF-1 $\alpha$  via CD64/PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling pathways*. *Stem Cell Res. Ther.* 7(1):114.

Cob, E., Rosenstock, S. y Sánchez, A. (2018). *Obesity and cancer*. *Medicina Legal de Costa Rica*. 35(2): 45-53.

Dávila, J., González, J., Barrera, A. (2015). *Panorama de la obesidad en México*. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* 53(2): 240-249.

Deng, M., Gu, Y., Liu, Z., Qi, Y., Ma, G. y Kang, N. (2015). *Endothelial differentiation of human adipose Derived Stem Cells on polyglycolic acid/ polylactic Acid Mesh*. *Stem Cells International*. (15): 1-11.

Díaz, C. (2016). *Efecto de los productos de secreción de Células Troncales Derivadas de Tejido Adiposo sobre la viabilidad proliferación y mirnaoma en una línea tumoral humana*. Tesis de Maestría en Biología Experimental. Universidad Nacional Autónoma de México.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2016). *El cáncer y la obesidad: El sobrepeso y la obesidad se asocian con el cáncer*. <https://www.cdc.gov/spanish/signosvitaales/obesidad-cancer/infographic.html#infographic-a>

Ellis, L. (2004). *Angiogenesis and its role in colorectal tumor and metástasis formation*. *Elsevier*. 31(17): 3-9.

Eming, S. y Krieg, T. (2006). *Molecular Mechanisms of VEGF-A action during tissue repair*. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 11(1): 79-86.

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2016 (ENSANUT). (2016). *Informe Final de Resultados*. [transparencia.insp.mx/2017/auditorias-insp/12701\\_Resultados\\_Encuesta\\_ENSANUT\\_MC2016.pdf](http://transparencia.insp.mx/2017/auditorias-insp/12701_Resultados_Encuesta_ENSANUT_MC2016.pdf)

Ezquerro, S., Frühbeck, G. y Rodríguez, A. (2016). *El tejido adiposo, protagonista en las alteraciones metabólicas de la obesidad*. SEBBM. 190, 28.

Federación Mexicana de Diabetes. (2015). *La obesidad y el sobrepeso en México*. [fmdiabetes.org/la-obesidad-y-el-sobrepeso-en-mexico/](http://fmdiabetes.org/la-obesidad-y-el-sobrepeso-en-mexico/)

Flores, E., Montesinos, J. y Mayani, H. (2006). *Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica*. Revista de Investigación Clínica. 58(5): 498-511.

Francavilla, C., Maddaluno, L. y Cavallaro, U. (2009). *The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis*. Elsevier. 19: 298-309.

Franssen, B. y Chan, C. (2011). *Cáncer de páncreas, el punto de vista del cirujano*. Revista de Gastroenterología de México. 76(4): 353-361.

Galván, C., Miranda, R., de León, D., Macías, A., Baganet, C., Rondon, C., González, I., Socarras, F., Bencomo, H., Rivero, J. y Hernández, R. (2016). *Isolation and characterization of mesenchymal cells from adipose tissue*. Revista Cubana de hematología y Hemoterapia. 32 (3): 1-15.

García, E. (2004). *¿Qué es la obesidad?* Revista de Endocrinología y Nutrición. 12(4): 588-590.

García, D., Castellanos, G., Cedeño, M., Benet, R. y Ramirez, A. (2017). *Adipose tissue as an endocrine gland pathophysiological implications*. ISSN. 1(2):20.

GeneCards. (2021). CXCL5 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CXCL5>

Hanahan, D. y Weinberg, R. (2011). *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell. 144(5): 646-674.

Herrera, D., Coria, G., Fernández, C., Aranda, G., Denes, J. y Hernández, M. (2015). *Obesity as a risk factor in the development of cancer*. Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública. 32(4): 766-76.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2018). *Mujeres y Hombres en México, 2018*. [cedoc.inmujeres.gob.mx/documentos\\_downland/MHM\\_2018.pdf](http://cedoc.inmujeres.gob.mx/documentos_downland/MHM_2018.pdf)

International Agency for Research on Cancer (IARC). (2017). *Cancer attributable to obesity*. [Gco.iarc.fr/causes/obesity/tolos-bars](http://Gco.iarc.fr/causes/obesity/tolos-bars)

Jiménez, M., Scavuzzo, A. y Santana, Z. (2011). *Cáncer renal*. En Herrera, A., Ñamendys, S. y Meneses, A. (6 ed.) *Manual de Oncología*. México: Instituto Nacional de Cancerología.

Jimeno, E. (2016). *Bases moleculares de la angiogénesis tumoral: papel del VEGF*. Trabajo de grado. Universidad Complutense de Madrid.

Kerkar, S. y Restifo, N. (2012). *Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment*. *Cancer Res.* 72 (13): 3125-3130.

Li, A., King, J. y Moro A. (2011). *Overexpression of CXCL5 is associated with poor survival in patients with pancreatic cancer*. *Am. J. Pathol.* 178(3): 1340-1349.

Livak, K., y Schmittgen, T. (2001). *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C (T)</sup> method*. *Applied Biosystems.* 402-408.

Lizarzaburu, J. (2013). *Metabolic Syndrome: concept and practical application*. *An Fac. Med.* 74(4):315-20.

Martín, F., Yu, W., Rodríguez, A., Ewald, A., Werb, Z., Alonso, M. y Mostov, K. (2008). *Cell Polarity Dynamics Controls the Mechanism of lumen formation in epithelial morphogenesis*. *Elsevier.* 18(7):507-513.

Martínez, J. y Herrera, L. (2006). *Angiogénesis: VEGF/ VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer*. Instituto Nacional de Cancerología. 83-96.

MayoClinic. (2019). *Malformación arteriovenosa cerebral*. <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/brain-avm/symptoms-causes/syc-20350260>

Mendoza, Z. (2017). *Programa de detección del cáncer cervicouterino: políticas públicas y experiencias de los actores que implementan el programa en el estado de Veracruz, México*. *Salud Colectiva.* 13(3): 521-535

Moreno, G., Kopchick, J. y Argente, J. (2015). *Adipokines in healthy and obese children*. National Institutes of Health. 78 (3):1-30.

Moreno, M. (2012). *Definición y clasificación de la obesidad*. Rev. Med. Clin. Condes. 23(2): 124-128.

National Cancer Institute (NIH). (2018a). *Estadísticas del cáncer*. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas>

National Cancer Institute (NIH). (2018b). *Inhibidores de la angiogénesis*. [cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/hoja-informativa-inhibidores-angiogenesis](https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/hoja-informativa-inhibidores-angiogenesis)

National Cancer Institute (NIH). (2019). *Microambiente tumoral*. [cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/microambiente-tumoral](https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/microambiente-tumoral)

Ning, H., Liu, G., Lin, G., Yang, R., Lue, T. y Lin, C. (2009). *Fibroblast Growth Factor 2 Promotes Endothelial Differentiation of adipose tissue Derived Stem Cells*. National Institutes of Health. (4):97-979.

Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. y Kojiro, M. (2006). *Angiogenesis in cancer*. Vascular Health and risk management. 2(3): 213-219.

Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). (2017). *Obesity Update 2017*. [oecd.org/els/health-systems/Obesity-Update-2017.pdf](http://www.oecd.org/els/health-systems/Obesity-Update-2017.pdf)

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). *Obesidad y sobrepeso*. World Health Organization. <http://www.who.int/topics/obesity/es/>

Papetti, M. y Herman, I. (2002). *Mechanisms of Journal and tumor derived angiogenesis*. S. Am. J. Physiol. 282. 947-971.

Pérez, L. (2011). *VEGF-A y COX-2 en la angiogénesis del carcinoma de mama*. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. [riuma.uma.es/xmlui/bitstream/handle/10630/4719/TDR\\_PEREZ\\_VILLA.pdf?sequence=6&isAllowed=y](http://riuma.uma.es/xmlui/bitstream/handle/10630/4719/TDR_PEREZ_VILLA.pdf?sequence=6&isAllowed=y)

Potente, M., Gerhardt, H. y Carmeliet, P. (2012). *Aspectos básicos y terapéuticos de la angiogénesis*. Rev. Cell. 3(5): 11-17.

Rajesh, M. y Subbi, M. (2005). *Vascular endothelial growth factor (VEGF) up regulates epidermal growth factor receptor (EGF-R) in cervical cancer in vitro: this action mediated through HPV-E6 in HPV positive cancers*. Gynecol. Oncol. 97(1): 206-13.

Randi, A. y Laffan, M. (2016). *Von Willebrand factor and angiogenesis: basic and applied tissues*. Journal of thrombosis and hemostasis. 15 (1): 13-20.

Röhsing, L., Damin, D., Stefani, S., Castro, C., Roisenberg, I. y Schwartzmann, G. (2001). *von Willebrand factor antigen levels in plasma of patients with malignant breast disease*. Brazilian, Journal of Medical and Biological Research. 34(9): 1125-2229.

Ríos, D. (2010). *Obesidad en México*. Dirección general de Epidemiología. 43(27): 28.

Rivera, J., Hernández, M., Aguilar, C., Vadillo, F. y Maruyama, C. (2012). *Obesidad en México. Recomendaciones para una política de estado*. México.

Sánchez, C., Ibáñez, C. y Klassenn, J. (2014). *The link between obesity and cáncer*. Rev. Med. Chile. 142: 211-221.

Sánchez, R.E. (2011). *Comparación del efecto de medios condicionados de cultivos de 2 tipos de células madre mesenquimales sobre la cicatrización de heridas en ratones*. Tesis de Maestría en Fisiología. Universidad Nacional de Colombia.

Selgas, R., Del Reso, G., Bajo, M., Cirugeda, A., Sánchez, J. y Álvarez, V. (2001). *El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Su papel en la fisiopatología peritoneal*. Nefrología. 5:423-425.

Schweizer, R., Tsuji, W., Gorantla, V., Marra, K., Rubin, J. y Plock, J. (2015). *The role of Adipose –Derived Stem Cells in Breast Cáncer progresión and metástasis*. Stem Cells International. (15) 1-17.

Scuderi, N., Ceccarelli, S., Onesti, M., Fioramonti, P., Guidi, C., Romano, F., Frati, L., Angeloni, A. y Marchese, C. (2012). *Human adipose derived stromal cells for cell based therapies in the treatment of systemic sclerosis*. Cell Transplantation. 22(5): 779-795.

Tahergorabi, Z. y Khazaei, M. (2012). *A review on angiogenesis assays and its assays*. Iranian Journal of basic medical science. 15(6): 1110-26.

Tarsicia, T., Damayanti, L., Antarianto, R., Moenadjat, Y. y Pawitan, J. (2017). *Adipose derived stem cell conditioned medium effect on proliferation phase of wound healing in Sprague Dawley rat*. Medical Journal of Indonesia. 26: 239-45.

The Human Protein Atlas. (2020). ACTA2. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000107796-ACTA2/pathology>

Thakur, C. (2018). *Nanotechnology based targeted drug delivery systems for brain tumors*. Elsevier. 2:27-47.

Tirado, L. y Mohar, A. (2008). *Epidemiología de cáncer de colon y recto*. Instituto Nacional de Cancerología. 7(2): 3-11.

Tonino, P. y Abreu, C. (2011). *Microvessel density is associated with VEGF and  $\alpha$ -SMA expression in different regions of human gastrointestinal carcinomas*. Cancers. 3, 3405-3418.

Torres, F. y Rojas, A. (2018). *Obesidad y Salud Pública en México: transformación del patron hegemónico de oferta demanda de alimentos*. Scielo. 193(49):145-169.

Vázquez, F. (2018). *Evaluación de apoptosis y necrosis mediante microespectroscopía Raman y AFM*. Tesis Profesional de Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Sonora.

Vikers, S., Johnson, L., Zou, L., Yannas, I., Gibson, L. y Spector, M. (2004). *Expression of alpha smooth muscle actina and contraction of cells derived from synovium*. Tissue Eng. 10(7): 1214-1223.

Wankade, U., Shen, M., Kolhe, R. y Fulzele, S. (2016). *Advances in Adiposse derived stem cells Isolation, Characterization, and application in regenerative tissue engineering*. Stem Cells International. 2016, 1-9.

Wei, H., Zeng, R., Lu, J., Lai, W., Chen, W., Liu, H., Chang, Y. y Deng, W. (2015). *Adipose-derived stem cells promote tumor initiation and accelerate tumor growth by interleukin-6 production*. Oncotarget. 6(10):7713-7724.

Woods, A., Kempfer, A., Paiva, T., Sánchez, A. y Lazzari, M. (2016). *Biología molecular en la enfermedad de Von Willebrand. Estado actual y perspectivas*. Hematología. 20:164-173.

Yokoyama, S., Leda, J., Yamamoto, M., Yamaguchi, S., Mitani, Y., Takeuchi, A., Takifuji, K., Hotta, T., Matsuda, K., Watanabe, T., Shively, J. y Yamaue H. (2015). *P4H9-detected molecule expression on spindle-shaped fibroblasts indicates malignant phenotype of colorectal cancer*. British Journal of Cancer. 113. 1454-1459.

Zhang, Y., Daquinag, A., Traktuev, D., Amaya, F., Simmons, P., March, K., Pasqualini, R., Arap, W. y Kolonin, M. (2009). *White adipose tissue cells are recruited by experimental tumors and promote cancer progression in mouse models*. Cancer Res. 69(12): 5259-66.

Zhang, H., Ning, H., Banie, L., Wang, G., Lin, G., Lue, T. y Lin, C. (2010). *Adipose tissue derived Stem cells secrete CXCL5 cytokine whit chemoattractant and angiogenic properties*. Biochemical and Biophysical research communications: USA. 402, 56-564.

Zhu, J., Wu, X., Lu, Z., Luo, D., Cai, S. y Zheng, M. (2013). *Role of VEGF receptors in normal and psoriatic human keratinocytes: Evidence from irradiation with different uv sources*. PLoS One. 8(1): e55463

Ziyad, S. y Iruela, M. (2011). *Molecular mechanisms of tumor angiogenesis*. Genes Cancer. 2(12):1085-1096.

## XIV. BIBLIOGRAFÍA

---

Bolivar, A., Rojas, A. y Lugo, P. (2014). *PCR y PCR multiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización*. Avances en Biomedicina. 3(1): 25-33.

Cetina, L. y Ochóa, F. (2014). *Cáncer cervicouterino, aún el reto por vencer. Cervical cancer, the challenge to beat*. Gaceta Mexicana de Oncología. 13(4): 1-3.

Chianeh, Y. y Rao, P. (2013). *Role of Copper and vascular endothelial growth factor (VEGF) on endometrial angiogenesis*. Journal of Krishna of Medical Sciences University. 2 (2): 6-17.

Mitchel, N., Catenacci, V., Wyatt, H. y Hill, J. (2011) *Obesity: overview of an epidemic*. Psychiatr. Clin. North Am. 34(4):717-732.

Moreno, A. (2016). *Terapia celular con células troncales derivadas de tejido adiposo para mejorar el proceso de reparación de defectos óseos en un modelo animal*. México: UAM.

Rao, X., Huang, X., Zhou, Z. y Lin, X. (2013). *An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis*. Biostat Bioinforma Biomath. 3(3): 71-85.

Spiegel, M., Scchiller, R. y Srinivasan, A. (2007). *Análisis de varianza. Probabilidad y estadística*. (2da versión). México: McGraw-Hill.

Yadav, L., Puri, N., Rastogi, V., Satpute, P. y Sharma, V. (2015). *Tumor angiogenesis and angiogenic inhibitors: A review*. Journal Cilinc Diagnostic R. 9(6): 1-5.