



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE EXOSOMAS TUMORALES DE CÁNCER DE MAMA EN LA GENERACIÓN, EXPANSIÓN Y FUNCIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS FOXP3⁺, Y EN LA INDUCCIÓN DE ANGIOGÉNESIS *IN VITRO*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Estefanía Scarlett Ortega Chávez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Eduardo Alberto García Zepeda†

Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rosana Pelayo Camacho

Hospital General, IMSS Puebla

Dr. Enrique Ortega Soto

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Ciudad de México. Mayo, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue apoyado por el proyecto FRONTERAS DE LA CIENCIA #187. La alumna Estefanía Scarlett Ortega Chávez fue apoyada con beca CONACYT con el CVU #742105. La investigación contenida en ésta tesis fue realizada en el laboratorio A019, del departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Se agradece a la Q.F.B Gisela DuPont, al M. en C. Oscar Hernández Campos, al Q.F.B. Carlos Castellanos Barba, al Dr. Fernando García Hernández, a la Dra. Janette Furuzawa Carballeda, al Dr. Noé Ayala Alcantar y al LABNALCIT por el apoyo técnico durante esta investigación.

De igual forma, se agradece al M. en C. Arimelek Cortés Hernández, a la Dra. Cynthia Paola López Pacheco, al M. C. Alberto Chinney Herrera, al Biol. Óscar Ovando Márquez y a Fabiola Duarte Ortiz por el apoyo en el diseño de experimentos, discusión de resultados y enseñanza durante la realización de este trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	iv
INTRODUCCIÓN	1
1. Cáncer	1
1.1 Procesos implicados en el desarrollo tumoral	1
2. Cáncer de mama	4
2.1 Anatomía de la glándula mamaria	4
2.2 Incidencia y factores de riesgo	4
2.3 Subtipos de Cáncer de Mama	6
3. Microambiente tumoral	8
4. Exosomas	9
4.1 Biogénesis	10
4.2 Propiedades moleculares	10
4.3 Exosomas y cáncer	11
5. Angiogénesis	12
5.1 Angiogénesis y exosomas tumorales	13
6. Inmunoección del cáncer	15
6.1 Células T reguladoras en cáncer	17
6.2 Células T reguladoras y exosomas tumorales	20
7. Modelo de estudio	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS PARTICULARES	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
DIAGRAMA DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	31
RESULTADOS	32
CONCLUSIONES	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
FIGURAS SUPLEMENTARIAS	74
ANEXO: REACTIVOS	77

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Diagrama de la estrategia experimental.	31
2	Líneas celulares de CaMa en condiciones de cultivo 2D y 3D.	32
3	Los cultivos celulares 3D de la línea MCF-7 muestran un enriquecimiento de la subpoblación con fenotipo CD24 ^{low} /CD44 ⁺ .	34
4	Disminución de la concentración de partículas en SFB y SH tratado con UCF.	35
5	Cuantificación de la concentración por NTA de los exosomas MCF-7 y MDA-MB-468 en condiciones de cultivo 2D y 3D, aislados mediante UCF.	36
6	Microscopía Electrónica de Transmisión de exosomas de CaMa purificados mediante UCF.	37
7	Análisis de la formación de tubos endoteliales en el programa Image J.	38
8	Exosomas de la línea celular MCF-7 y MDA-MB-468 provenientes de cultivos 2D inducen angiogénesis similar al control positivo (FGF).	39
9	La formación de tubos endoteliales por exosomas MDA-MB-468 2D es dosis dependiente.	40
10	Exosomas de CaMa de cultivos 3D inducen mayor angiogénesis que los exosomas de cultivos 2D.	41
11	Exosomas MDA-MB-468 de cultivos 3D inducen mayor angiogénesis que los exosomas de MCF-7.	43
12	Inducción de angiogénesis por exosomas de CaMa.	44
13	Cuantificación por NTA de la concentración de exosomas MCF-7 y MDA-MB-468 en condiciones de cultivo 2D y 3D, purificados mediante SEC.	45
14	Microscopía Electrónica de Transmisión de exosomas de CaMa, purificados por SEC.	46
15	Exosomas de CaMa inducen la expresión de FOXP3, CD25 y CTLA-4 en células Tnaive.	48
16	Exosomas tumorales de CaMa no afectan la proliferación de células Tnaive.	49
17	Los exosomas de CaMa incrementan la expresión de moléculas características de células Treg, relacionadas con su capacidad supresora.	51
18	Exosomas de CaMa no afectan la proliferación de células Treg.	52
19	Exosomas de CaMa incrementan la capacidad supresora de células Treg.	53
20	Efectos de los exosomas de CaMa en la modulación de células Treg y en la inducción de angiogénesis.	65

ABREVIATURAS

APC	Antigen presenting cell (Célula presentadora de antígeno).
CaMa	Cáncer de mama.
CD	Cluster of differentiation (Grupo de diferenciación).
CD25	Cadena α del receptor para interleucina 2.
CD45RA	Proteína tirosina fosfatasa presente en células naive.
CD127	Cadena α del receptor para interleucina 7.
CMN	Células Mononucleares.
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (Antígeno 4 del linfocito T citotóxico).
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement (Suplemento de crecimiento para células endoteliales).
EGF	Epidermal Growth Factor (Factor de crecimiento epidermal).
FACS	Fluorescence activated cell sorter (Separación celular activada por fluorescencia).
FOXP3	Factor de transcripción forkhead box 3.
FGF	Fibroblasts Growth Factor (Factor de Crecimiento de Fibroblastos).
IDO	Indoleamine 2,3-Dioxygenase (Indolamina 2,3-dioxigenasa).
IL	Interleucina.
IMFr	Intensidad Media de Fluorescencia relativa.
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad.
MMP	Metaloproteinasas.
PBS	Phosphate buffered saline (Amortiguador de fosfato salino).
SFB	Suero Fetal Bovino.
SH	Suero Humano AB.
TA	Temperatura ambiente.
Tconv	Célula T convencional.
TCR	T cell receptor (Receptor de células T).
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta (Factor de crecimiento transformante beta).
Treg	Célula T reguladora.
TNF	Factor de Necrosis Tumoral.
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de crecimiento endotelial vascular).

RESUMEN

Durante el desarrollo tumoral, el tumor induce angiogénesis y la supresión de la vigilancia inmunológica antitumoral; diversos mecanismos están involucrados como la secreción de diversas moléculas. Por otra parte, existe un aumento en la frecuencia de células T reguladoras (Treg) dentro del microambiente tumoral así como en la periferia en el CaMa; tal incremento se correlaciona con una menor supervivencia y un mal pronóstico para los pacientes y, se ha descrito que las células Treg limitan las respuestas inmunes antitumorales al promover la tolerancia periférica, favoreciendo la progresión tumoral. Recientemente, se ha evidenciado la relevancia de los exosomas (microvesículas membranales de 30-100 nm) tumorales en la progresión de la enfermedad y metástasis. Sin embargo, aún no se ha estudiado a detalle su papel en la inducción de angiogénesis y en la generación de células Treg.

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de exosomas provenientes de células de CaMa cultivadas en 2D y 3D en la inducción de angiogénesis y en la generación y expansión de células Treg, así como en la modulación de su función supresora. Se cultivaron líneas celulares de CaMa con diferente subtipo molecular, células MCF-7 (luminal) y MDA-MB-468 (triple negativo); se purificaron a los exosomas provenientes de dichos cultivos, y se analizó la inducción de angiogénesis *in vitro* por la formación de tubos endoteliales, cuantificando los nodos, redes y segmentos. Para conocer el efecto de exosomas de CaMa en la generación y expansión de Treg, se purificaron células Tnaive ($CD4^+CD25^+CD45RA^+$) y Treg ($CD4^+CD25^{HI}CD127^-$) de individuos sanos y se expusieron a la presencia o ausencia de exosomas, donde se evaluó la expresión de moléculas clásicas en células Treg. Además, se evaluó la función supresora de las células Treg expandidas al ponerlas en cultivo con células T autólogas Tconv ($CD4^+$ y $CD8^+$). Los resultados muestran que los exosomas inducen angiogénesis dependiente de la dosis, de igual forma las condiciones de cultivo y el origen celular influyen directamente en éste resultado, ya que los exosomas provenientes de cultivos 3D de la línea MDA-MB-468 indujeron mayor formación de tubos endoteliales que los cultivos 2D y que la línea MCF-7. Los resultados sobre la modulación de Treg, demuestran que los exosomas de CaMa inducen un incremento en la expresión de moléculas FOXP3, CD25 y CTLA-4 en células Tnaive $CD4^+CD25^+CD45RA^+$; mientras que en las células Treg se promueve la expresión de moléculas relacionadas con su capacidad supresora como FOXP3, CD25 y CTLA-4. Por su parte, las Treg incrementaron su capacidad supresora al inhibir la proliferación de células Tconv.

En conclusión, nuestros resultados evidencian un nuevo mecanismo fisiopatogénico en el cual los exosomas de CaMa favorecen el crecimiento y progresión de la enfermedad, al inducir angiogénesis y evadir la respuesta inmune antitumoral, generando y expandiendo células T $CD4^+CD25^+FOXP3^+$, así como incrementando su capacidad supresora.

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

El cáncer comprende un grupo de patologías originadas por alteraciones del material genético que regulan directa o indirectamente el ciclo celular, derivando en un crecimiento anormal y descontrolado de células en el organismo, formando tejidos tumorales que interfieren con la función adecuada de tejidos y órganos sanos. Dependiendo de la capacidad de invadir el tejido periférico, existen “tumores malignos” (por ejemplo: carcinomas, en el caso de células epiteliales transformadas) o en caso de autolimitar su crecimiento se denominan “tumores benignos” (por ejemplo: quistes y adenomas) [1].

El cáncer se refiere a un grupo de enfermedades que originan tumores en prácticamente cualquier órgano. Estos tumores contienen diferentes poblaciones de células transformadas con diferentes mutaciones y esta cualidad se denomina, heterogeneidad clonal. Dichas células transformadas logran establecer relación con las células del estroma, modifican la matriz extracelular y desarrollan capacidades diferentes como la migración e invasión; con esta organización celular logran cierta adaptación, que culmina con la invasión de células tumorales a uno o a varios órganos específicos distantes del tumor primario, proceso denominado metástasis, la cual es la principal causa de muerte en los pacientes [1].

1.1 Procesos implicados en el desarrollo tumoral

El desarrollo de cáncer consta de múltiples pasos en los que las células tumorales adquieren nuevas capacidades, que incluyen: el aumento en la proliferación celular, la evasión de la supresión de crecimiento y la resistencia a la muerte celular, lo que produce inmortalidad replicativa, también incluye la inducción de la angiogénesis y finalmente, la invasión y metástasis. Sin embargo, la principal característica adquirida es la inestabilidad del genoma y además, este en este proceso se inflamación; que genera diversidad genética (mutaciones) [2].

La adquisición de los rasgos característicos en las células tumorales depende en gran parte de la alteración del genoma, que confiere una ventaja selectiva sobre otras células, permitiendo su crecimiento y dominio en el entorno local [3]. Los mecanismos de mantenimiento del genoma,

para detectar y resolver daños en el ADN, aseguran que la tasa de mutación espontánea sea baja; en las células tumorales dicha tasa aumenta, como resultado de defectos en: I. La detección de daño en el ADN, II. En la reparación del ADN dañado, y III. En la inactivación de moléculas mutagénicas, antes de que hayan dañado el ADN [4, 5].

Las células tumorales tienen la capacidad de mantener una proliferación crónica. Los tejidos normales regulan cuidadosamente la producción y liberación de señales que promueven el crecimiento, lo que garantiza la homeostasis en el número de células y, por lo tanto, el mantenimiento de la arquitectura tisular normal y su función. En las células tumorales, estas señales se encuentran desreguladas, esto permite la producción de factores de crecimiento que incrementan la proliferación por un estímulo autócrino. De igual forma, hay una mayor expresión de receptores de factores de crecimiento, lo que provoca células hiperreactivas a bajas concentraciones de ligando. Además, las células tumorales envían señales para estimular a células no tumorales dentro del microambiente, que sirven de soporte, al secretar factores de crecimiento que las células tumorales reciben [6, 7].

Las células tumorales evaden los procesos que regulan negativamente la proliferación celular, estos programas celulares dependen de la expresión y activación de genes supresores de tumores (tales como RB1, TP53, NF1, BRCA1 y BRCA2, entre otros), que en condiciones normales limitan el crecimiento y la proliferación, activando la senescencia y la apoptosis. La inestabilidad del genoma induce mutaciones en dichos genes, permitiendo la proliferación no controlada de las células tumorales. El desequilibrio en la señalización proliferativa y daño del ADN, induce atenuación de la apoptosis, al aumentar la expresión de reguladores antiapoptóticos (por ejemplo: Bcl-2) o mediante la regulación negativa de factores pro-apoptóticos (tales como Bax, Bim y Puma) [7].

En contraste con la apoptosis, la muerte celular necrótica libera señales pro-inflamatorias en el tejido circundante. Como consecuencia, se reclutan células inflamatorias del sistema inmune, cuya función es reparar el daño tisular y eliminar los daños asociados a la necrosis. En el contexto neoplásico, las células inmunes inflamatorias promueven la progresión tumoral al fomentar la angiogénesis, la proliferación de células tumorales y la invasividad. En consecuencia, las neoplasias incipientes y potencialmente invasivas, pueden obtener ventajas al tolerar cierto grado de muerte por necrosis, para reclutar células inmunes que promoverán el desarrollo tumoral [8-10].

Siguiendo este contexto, las células tumorales adquieren la capacidad de evadir la vigilancia inmunológica antitumoral y cabe destacar el papel dual que tiene el sistema inmune durante la fisiopatología del cáncer. La vigilancia inmune monitorea constantemente a las células y tejidos de los organismos para mantener la homeostasis y vigilar el crecimiento normal de las células. Esta vigilancia es responsable de reconocer y eliminar a las células tumorales incipientes y por lo tanto, tumores nacientes [11]. De acuerdo con esta lógica, los tumores consolidados han escapado de la detección del sistema inmune, evitando su erradicación. Las células tumorales pueden evadir la respuesta antitumoral mediante la regulación de algunos componentes del sistema inmune al minimizar la infiltración de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y células NK, al secretar TGF-β y citocinas inmunosupresoras [11, 12]. Por otro lado, operan mecanismos que favorecen el reclutamiento de células inmunes con capacidad inmunosupresora, incluidas las células Treg y células mieloides supresoras (MDSCs) [12, 13].

La inflamación asociada al tumor, contribuye al suministro de factores de crecimiento que mantienen la señalización proliferativa tales como: factores de supervivencia (como ligandos de EGFR y TGF-β), factores pro-angiogénicos (por ejemplo: VEGF, Angiopoyetina 2 e IL-8), citocinas (como IL-6, IL-17 e IL-23), especies reactivas de oxígeno (que son altamente mutagénicas para células cercanas) y enzimas que modifican la matriz extracelular favoreciendo la angiogénesis, invasión y metástasis (por ejemplo: metaloproteinasas (MMPs)) [10, 14].

Para su desarrollo, los tumores requieren intercambio metabólico para la obtención de nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de eliminar desechos y dióxido de carbono. Durante la embriogénesis, el desarrollo de la vasculatura implica la generación de nuevas células endoteliales y su ensamblaje en tubos (vasculogénesis) además del alargamiento de los vasos existentes (angiogénesis); en el adulto la angiogénesis puede activarse, pero sólo de forma transitoria. Por el contrario, durante la progresión del tumor ocurre un “switch” angiogénico, que causa el surgimiento de nuevos vasos sanguíneos para beneficiar el crecimiento neoplásico [15]. En homeostasis existen mecanismos regulatorios que inducen o suprimen la angiogénesis, los inductores e inhibidores mejor descritos son el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) y trombospondina-1 (TSP-1), respectivamente [15].

Es importante destacar que el mecanismo de inducción de la angiogénesis en cáncer puede variar. En algunos tumores los oncogenes (gen que ha mutado y facilita el desarrollo de cáncer) como Ras y Myc, regulan positivamente la expresión de factores angiogénicos; mientras que en otros, tales señales inductivas son producidas indirectamente por células inflamatorias del sistema inmune [16]. Actualmente, se conoce un amplio repertorio de células que desempeñan papeles cruciales en la angiogénesis patológica que incluye células del sistema inmune innato como macrófagos, neutrófilos y mastocitos [16-18].

El proceso angiogénico proporciona nutrientes, elimina desechos del microambiente y contribuye a su progresión al facilitar la invasión local y a distancia (metástasis). El proceso de metástasis es la principal causa de muerte en los pacientes e involucra varios pasos. Comienza con la invasión local de células transformadas, le sigue la intravasación y tránsito de células tumorales al sistema sanguíneo y linfático, seguido por la extravasación de dichas células a tejidos distantes y la formación de pequeños nódulos de células transformadas (micrometástasis); finalmente, culmina con el crecimiento de lesiones micrometastásicas en tumores macroscópicos [19].

2. Cáncer de mama

2.1 Anatomía de la glándula mamaria

La glándula mamaria humana es una glándula sudorípara modificada, que se compone de 15-20 lóbulos separados por una cantidad variable de tejido adiposo; cada lóbulo está formado por lobulillos más pequeños (alveolos) que contienen glándulas secretoras de leche [20]. El epitelio mamario presenta dos linajes celulares: las células luminales (que se diferencian en células alveolares y ductales) y las células mioepiteliales (situadas entre las células luminales y la membrana basal). Un pequeño número de células ductales indiferenciadas representan a las células troncales mamarias que se diferencian en células luminales y mioepiteliales, las cuáles proporcionan la capacidad de expansión celular asociada al embarazo y la lactancia [20].

2.2 Incidencia y factores de riesgo

En 2017 la OMS (Organización Mundial de la Salud) reportó que el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, ocasionando 8.8 millones de defunciones por año [1].

El CaMa es la principal causa de muerte por neoplasias en mujeres, ya que es el más frecuente (25.1%), tiene el mayor índice de mortalidad (14.7%) y además, es el cáncer con la mayor prevalencia (36.3%) [21]. De las defunciones reportadas por cáncer en mujeres durante el 2015, la Secretaria de Salud en México reportó que el CaMa registró el 15.4% de las muertes, seguido del cáncer cervico-uterino con el 9.9% y el cáncer de ovario con el 5.9% [22, 23].

En el CaMa existen diversos factores de riesgo que incluyen:

I. Sexo: Ser mujer es el principal riesgo de padecer CaMa, aunque los hombres también pueden padecerlo (0.5%). Sin embargo, las hormonas femeninas como estrógeno y progesterona, pueden promover el crecimiento de células tumorales [24].

II. Envejecimiento: El riesgo de padecer CaMa se incrementa conforme aumenta la edad, aunque existe un porcentaje de mujeres menores a 40 años que lo desarrollan. Aproximadamente uno de ocho casos de CaMa se detecta en mujeres menores de 45 años de edad, mientras que dos de tres casos de CaMa se encuentran en mujeres de 55 años o más [24].

III. Factores genéticos: Del 5 al 10% de los casos de CaMa se originan directamente por mutaciones heredadas de algún progenitor. La causa más común es la mutación en los genes BRCA1 (Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein) y BRCA2 (Breast Cancer Type 2 susceptibility protein), que son proteínas supresoras de tumor que se encargan de la reparación del ADN. Por otro lado, el gen P53 y PTEN ayudan a regular el crecimiento celular, las personas con mutaciones en estos genes tienen un riesgo aumentado de padecer CaMa, cáncer gástrico, cáncer en la tiroides, útero y ovario. También se han identificado errores en el oncogen HER2 donde se desarrollan tumores agresivos [24].

IV. Antecedentes familiares: El riesgo de padecer CaMa aumenta entre los pacientes cuyos familiares cercanos desarrollaron esta enfermedad. Si un familiar de primer grado (madre, hermana o hija) padeció CaMa, el riesgo se duplica, sólo alrededor del 15% de las mujeres con CaMa tiene un familiar con esta enfermedad [24].

V. Origen étnico: Las mujeres de raza blanca tienen una probabilidad ligeramente mayor de padecer CaMa que mujeres de raza negra; sin embargo, en mujeres menores de 45 años de edad el CaMa es más común en las mujeres de raza negra. Las mujeres asiáticas, hispanas e indioamericanas tienen un menor riesgo de padecer y morir de CaMa [24].

VI. Terapias de reemplazo hormonal: El uso prolongado de anticonceptivos incrementa el riesgo de padecer CaMa, el riesgo se normaliza una vez que se interrumpe su consumo. Por su parte, la terapia de reconstitución hormonal (compuesta de estrógeno combinada con progesterona) es usada para atenuar los síntomas de la menopausia, también aumenta el riesgo de padecer CaMa [24].

VII. Historial ginecológico: Pacientes con menarca precoz o menopausia tardía tienen un riesgo mayor de padecer CaMa, este aumento podría deberse a una exposición prolongada a estrógeno y progesterona. De igual forma el número de embarazos tiene relevancia, pacientes nulíparas o que tuvieron su primer hijo después de los 30 años tienen un riesgo mayor; los embarazos múltiples y embarazos en pacientes jóvenes reducen el riesgo. Por su parte, la lactancia podría disminuir ligeramente el riesgo de CaMa especialmente si se prolonga de 1 a 2 años [24].

VII. Sobrepeso u obesidad: En estado de obesidad y sobrepeso los niveles de estrógeno se incrementan, debido a que el tejido adiposo tiende a producirlo en mayor cantidad; por lo que el riesgo de padecer CaMa aumenta. Además, las mujeres con sobrepeso presentan niveles de insulina en sangre más elevados que se asocia con CaMa; la correlación entre el peso y el riesgo de CaMa es aún compleja [24].

2.3 Subtipos de Cáncer de Mama

Existen diversas clasificaciones en CaMa, una de ellas es debido al origen celular que da inicio a la enfermedad y otra, es por la expresión de patrones moleculares que presenta, lo que nos ayuda a entender la patología. Además, son necesarias para la elección del tratamiento. Según el origen celular, se identifican en:

- El carcinoma ductal comienza en un conducto lácteo de la glándula. El carcinoma ductal *in situ* (DCIS), limita su crecimiento al conducto sin invadir más allá de la membrana basal y el carcinoma ductal invasivo (IDC) penetra a través de la pared del conducto, crece en el tejido adiposo y puede propagarse; es el tipo más común de CaMa [20].
- El carcinoma lobular comienza en las glándulas productoras de leche (lobulillos). El carcinoma lobular *in situ*, es una lesión poco frecuente, no hay evidencia de que progrese a una forma invasiva; por otra parte, el carcinoma lobular invasivo (ILC) puede propagarse a otros tejidos [20].

De acuerdo con la expresión genética, existe la clasificación del CaMa basada en características moleculares, dividiéndose en los siguientes subtipos:

- Luminal A y luminal B: Los tipos luminales son positivos para receptores hormonales (estrógeno y progesterona). El cáncer luminal A es negativo para HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), es de bajo grado, suele crecer con lentitud y tiene buen pronóstico. El cáncer luminal B es positivo para HER2, generalmente crece con mayor rapidez que los luminal A y el pronóstico es menos favorable [20].
- Tipo HER2: Este tipo de cáncer tiene copias adicionales del gen HER2 y algunas veces de otros genes relacionados con HER2 (como GRB7 y PGAP3). Crece rápidamente y tiene mal pronóstico, aunque el tratamiento con anticuerpos dirigidos a HER2 es altamente exitoso; sin embargo, el porcentaje de recaída es mayor en este subtipo de cáncer que en los de tipo luminal A [20].
- ❖ Tipo basal: Es un cáncer triple negativo (negativo para receptor de estrógeno, progesterona y HER2). Es el menos frecuente, sin embargo, es más común en mujeres con mutaciones en el gen BRCA1 y en mujeres jóvenes de raza negra. Es un cáncer de alto riesgo, crece rápidamente, tiene mal pronóstico y poca afectividad de los tratamientos [24].

Estas clasificaciones han permitido una administración de tratamientos más adecuada y personalizada para cada paciente; sin embargo, se necesitan más investigaciones sobre los mecanismos que involucran el desarrollo de esta patología [24].

3. Microambiente tumoral

Durante la última década, la complejidad de los tumores ha sido reconocida. Desde esta perspectiva, la biología de un tumor sólo puede ser entendida al considerar la interacción entre las células que conforman e infiltran al tumor y la comunicación dentro del microambiente [25].

Dentro del tumor existe una variedad de clonas generadas por mutaciones. Estas clonas muestran diferente potencial proliferativo, de diferenciación, vascularización, inflamación e invasividad [26]. Entre esta diversidad celular, podemos encontrar a una pequeña población de células troncales tumorales (CSC, cancer stem cell). Esta subpoblación se define por la capacidad de iniciar nuevos tumores de manera eficiente [27, 28] y por la expresión de los marcadores CD133⁺, CD44⁺, CD24^{-/low} [29-31]. Las CSC tienen características distintivas, como un potencial ilimitado de proliferación, mientras que las células hijas se dividen rápidamente perdiendo el potencial proliferativo y sufren una diferenciación para formar poblaciones heterogéneas en los tumores; además las CSC tienen capacidad de auto-renovación y confieren resistencia selectiva a quimioterapia [32]. En este sentido, se ha propuesto que la resistencia a los tratamientos contra el cáncer, la metástasis y la reincidencia, es promovida por esta subpoblación tumoral; posiblemente debido a que tienen la capacidad de crear nichos favorables para su desarrollo. Sin embargo, la importancia de las CSC en el desarrollo de cáncer sigue siendo un tema de debate [32, 33].

Durante el desarrollo tumoral aumenta la demanda de nutrientes y oxígeno, las células endoteliales son activadas y proliferan por la acción de ligandos como VEGF y FGF (liberados por el tumor) que en conjunto promueven la angiogénesis [34, 35]. En tejidos normales, los pericitos proporcionan soporte al endotelio y brindan soporte a la membrana basal para ayudar a soportar la presión del flujo sanguíneo; sin embargo, durante su reclutamiento en procesos tumorales, se ha asociado a una vasculatura errante, que permite la intravasación de células tumorales al torrente sanguíneo, permitiendo su diseminación [36].

Los fibroblastos y macrófagos asociados al tumor (CAFs y TAMs, respectivamente) forman parte del estroma del microambiente. Se ha reportado que los CAFs inducen proliferación tumoral al producir factores de crecimiento, inducen la angiogénesis e incrementan la invasión y metástasis [37].

Por su parte los TAMs, tienen un fenotipo similar a macrófagos M2, es decir, producen citocinas tipo II, tienen funciones anti-inflamatorias y tienden a acumularse en regiones hipóxicas atraídos por VEGF (secretado por el tumor). La acumulación de TAMs en estas regiones se correlaciona con la inducción de angiogénesis y la posterior adquisición de un fenotipo invasivo por las células tumorales, ya que son una fuente importante de proteasas y catepsinas [38, 39].

El microambiente tumoral es similar a un sitio de inflamación crónica, debido a la liberación constante de factores de crecimiento, moléculas inductoras de la angiogénesis y citocinas que reclutan a células del sistema inmune como macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y B. Estas células son manipuladas por el tumor para favorecer su crecimiento al liberar diversas moléculas como EGF, VEGF, FGF, quimiocinas y citocinas que amplifican el estado inflamatorio [40]. Las células inmunes infiltrantes ayudan a la inducción de angiogénesis, estimulan la proliferación de células tumorales y facilitan la invasión y diseminación del tumor [14, 16, 18].

El microambiente tumoral es una estructura dinámica, que se rige principalmente por las señales que envían las células tumorales al resto de células que conforman dicho microambiente, esta comunicación (célula a célula) propicia el progreso de la enfermedad. Sin embargo, recientemente se ha documentado un nuevo mecanismo de larga distancia que propicia la progresión tumoral, a través de la comunicación mediada por exosomas tumorales (microvesículas membranales) que remodelan el nicho y dirigen la diseminación metastásica [41, 42].

4. Exosomas

Los exosomas son microvesículas membranales con un rango de tamaño de 40-100 nm y su biogénesis engloba un origen endosomal. Son liberados como consecuencia de la fusión de cuerpos multivesiculares (MVB) con la membrana plasmática. Poseen una doble membrana lipídica y su contenido es rico en proteínas y ácidos nucleicos; promueven la comunicación intercelular y sirven como un mecanismo de entrega. Además, están implicados en diversos procesos fisiológicos y patológicos al funcionar como mecanismo de entrega a nivel local (microambiente) y sistémico [43].

4.1 Biogénesis

La biogénesis de los exosomas incluye un proceso común en las células que involucra la vía endocítica, un mecanismo altamente dinámico [44]. Los endosomas tempranos maduran a endosomas tardíos, durante este proceso acumulan vesículas intraluminales (ILV). En la formación de los MVB se engloban proteínas, ácidos nucleicos y lípidos del citoplasma; existe evidencia de que la composición de los exosomas influye en la ruta de tránsito, aquellos ricos en colesterol son liberados a diferencia de los carentes, que son enviados a la fusión con los lisosomas [45]. El mecanismo para la formación de los MVB e ILV es impulsado por el complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT), que se compone de aproximadamente 30 proteínas que se ensamblan en 4 complejos (ESCRT 0, I, II y III) con proteínas asociadas (por ejemplo: VTA1 y ALIX); estos procesos requieren del citoesqueleto (actina y microtúbulos), proteínas motoras (cinesinas y miosinas) y maquinaria de fusión (SNAREs y factores de anclaje), aunque la maquinaria implicada en la liberación de los MVB aún está en una etapa temprana de comprensión [46]. La participación de proteínas Rab GTPasas en la secreción de exosomas es importante, se ha reportado que Rab 11 (ubiquitin ligasa) se requiere para su secreción; así como Rab27 y Rab35 están involucradas en el transporte y liberación de exosomas [47]. Por su otra parte, el aumento en la secreción de exosomas por células tumorales es inducido por la sobreexpresión de Rab3D [48]. Por su parte, el microambiente ácido de los tumores estimula la liberación de exosomas y mejora su capacidad de fusión con la célula blanco; la captación se logra a través de endocitosis, mediante la interacción receptor-ligando o por fusión directa [49, 50].

4.2 Propiedades moleculares

Los exosomas contienen proteínas que reflejan su origen celular, función y el mecanismo de secreción. En general, los exosomas contienen proteínas del citoesqueleto, citoplasma, de choque térmico, de membrana, así como proteínas involucradas en el tráfico de vesículas; mientras que proteínas del núcleo, mitocondria, retículo endoplasmático o aparato de Golgi están ausentes [51]. Como consecuencia de su origen y biogénesis, los exosomas contienen proteínas como Rab, Anexina, flotilina, Alix y TSG101. Poseen tetraspaninas como CD9, CD63 y CD81 (marcadores para exosomas) [52]. Se han identificado la presencia de citocinas y mediadores como IL-1 β , IL-8, VEGF, EGF, CCL2, CCL18, CCL20 y CCL22 [53-56].

Por otra parte, los lípidos contenidos en exosomas son importantes durante su formación y función, generalmente están enriquecidos en esfingomielina, colesterol y glicoesfingolípidos, en comparación con sus células parentales. La composición lipídica probablemente contribuye a la estabilidad de la membrana en entornos extracelulares, ya que les brinda rigidez estructural y resistencia a los cambios [57, 58].

La presencia de ARN funcional en exosomas se describió por primera vez en 2006. Se tiene registro de ARNm intactos, fragmentos de ARNm, ARN largos no codificantes, ARNr, fragmentos de ARNt y micro ARN, estos últimos son el principal componente de ARN en exosomas [51]. Los micro ARN transportados en exosomas tumorales se transfieren a diferentes tipos de células o al nicho pre-metastásico. En contraste con el ARN, la presencia de ADN en exosomas y su importancia biológica está mucho menos explorada, ha podido detectarse ADN mitocondrial, ADN monocatenario, ADN bicatenario y amplificaciones de oncogenes (como c-Myc) en exosomas [59, 60].

La composición de los exosomas es totalmente distinta entre ellos, se ha demostrado que su contenido determina su funcionalidad y depende de la célula de origen. De igual forma, la biodistribución de los exosomas muy probablemente depende de la célula de origen, de los receptores expuestos en su superficie, los ligandos y las moléculas de adhesión que expresen, así como de la disponibilidad de las diferentes células diana para internalizar a los exosomas circulantes [61, 62].

4.3 Exosomas y cáncer

Las funciones atribuidas a los exosomas tumorales han crecido exponencialmente desde su descripción inicial. Se les ha atribuido relación directa con el progreso de la enfermedad. Los exosomas tumorales influyen en diversos aspectos del cáncer, como en la adquisición del fenotipo tumoral por la transferencia de oncogenes y señales parácrinas, en la modulación del microambiente, en la evasión de la vigilancia antitumoral al interactuar con células inmunes y alterar sus funciones, en la metástasis al facilitar proteasas que degradan la matriz extracelular, en la resistencia a las terapias y en la inducción de angiogénesis al transferir moléculas pro-angiogénicas como VEGF y miRNAs que impactan en las células endoteliales [63].

5. Angiogénesis

La angiogénesis se define como el surgimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes, es vital en diversos procesos que incluyen el crecimiento de órganos, el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas [64, 65]. Los vasos sanguíneos recién desarrollados, suministran oxígeno y nutrientes a los tejidos, promueven la vigilancia inmunológica de las células hematopoyéticas y eliminan los productos de desecho [64, 66]. Sin embargo, este proceso permanece inactivo en el adulto, excepto en momentos de cicatrización de heridas, crecimiento del esqueleto, embarazo o durante el ciclo menstrual [64, 65].

La angiogénesis es un evento estrechamente regulado, que incluye la participación de integrinas, quimiocinas, angiopoyetinas y agentes de detección de oxígeno [67]. Una vez que las señales pro-angiogénicas como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) activan los receptores de células endoteliales, las células endoteliales liberan proteasas para degradar la membrana basal, luego proliferan y migran formando nuevas ramificaciones a una velocidad de varios milímetros por día [68]. Las células endoteliales depositan una nueva membrana basal y secretan factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) que atraen a las células de soporte como los pericitos, lo que garantiza la estabilidad del nuevo vaso [69]. Este es un proceso complejo que involucra la acción concertada de varios otros factores, como las angiopoyetinas y las efrinas, que actúan sobre receptores específicos para regular la estabilidad de los vasos [70].

En condiciones fisiológicas, la angiogénesis ocurre de manera gradual involucrando la desestabilización de vasos, la migración de células endoteliales y proliferación, el brote y estabilización de los nuevos vasos, así como la resolución y término de este mecanismo. En cambio, la angiogénesis tumoral difiere en que la resolución falla y los vasos están altamente desordenados. Sin embargo, el desarrollo de vasos sanguíneos es crítico para el crecimiento tumoral, ya que proporciona nutrientes esenciales, oxígeno y factores de crecimiento, además de proporcionar un conducto para eliminar los desechos [69, 71]. La angiogénesis ha sido considerada durante mucho tiempo como un sello distintivo del cáncer [2, 7, 15].

El desencadenante más importante de la angiogénesis tumoral es la hipoxia. Las células endoteliales poseen varios mecanismos de detección de oxígeno, principalmente a través de la familia de proteínas del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF), que regula la expresión de diversos genes no sólo implicados en la angiogénesis, sino también en la supervivencia celular, el metabolismo y la inflamación. Respondiendo a la hipoxia, HIF inicia una respuesta transcripcional adaptativa e induce la secreción de VEGF [72, 73]. VEGF es un potente inductor de la angiogénesis e incrementa la permeabilidad vascular [69, 70]. Se encuentra sobreexpresado en múltiples tumores y su señalización conduce a la proliferación, supervivencia, migración y diferenciación de las células endoteliales [74, 75].

La vasculatura tumoral difiere de la fisiológica, los vasos dilatados y sinuosos de células endoteliales no forman estratos regulares y tienen una membrana basal de grosor variable; los pericitos forman asociaciones anormales con las células endoteliales, todas ellas conducen a un incremento de la permeabilidad vascular. Estas condiciones de estrés celular potencian la angiogénesis, disminuyen la eficacia terapéutica y permiten la expansión de clonas tumorales resistentes [76, 77].

La angiogénesis se asocia con diversas afecciones patológicas que incluyen cáncer, psoriasis, retinopatía diabética, artritis, asma, trastornos autoinmunes, enfermedades infecciosas y aterosclerosis [78, 79]. Debido a la importancia de la angiogénesis en diversas enfermedades, la comprensión de los genes y las vías que regulan este proceso es fundamental para el diseño de mejores terapias [80].

5.1 Angiogénesis y exosomas tumorales

Inicialmente en el año 2002 demostraron que los lípidos presentes en las microvesículas afectan la migración de células endoteliales y potencian la angiogénesis. Como mecanismo propusieron y demostraron que la esfingomiélin, un componente principal identificado en microvesículas secretadas por la línea celular de fibrosarcoma HT1080, junto con VEGF, confieren propiedades inductoras de angiogénesis en las células endoteliales [81].

Para el año 2008, se reportó que los exosomas de pacientes con glioblastoma estimulan la angiogénesis, similar a VEGF, EGF, FGF y FBS. Ya que modifican el perfil de traducción de las células endoteliales de cerebro humano (HBMVEC) al transferir exosomas que contienen moléculas pro-angiogénicas como FGF, IL-6, IL-8, TIMP-1, VEGF y TIMP-2 [82].

Además, se ha destacado la importancia de la hipoxia sobre los exosomas. En glioblastoma, la hipoxia tiene potenciado el efecto pro-angiogénico de los exosomas y modificó su contenido. Curiosamente, los exosomas secretados en condiciones hipóxicas potenciaron la angiogénesis al incrementar la longitud de vasos formados en comparación con exosomas normóxicos, además incrementaron la proliferación de las células endoteliales. Los exosomas hipóxicos mostraron una actividad autócrina, al estimular la activación y proliferación de las células tumorales. Como posible mecanismo de acción, se propuso la participación de proteínas encontradas en los exosomas como MMP8, MMP9, IL-8, PDGF y caveolina 1 [83]. En mieloma múltiple, la hipoxia incrementa la liberación de los exosomas y a su vez, estos aceleraron la formación de nuevos tubos en células endoteliales; se propuso como mecanismo a miR-135b, ya que aceleró la actividad transcripcional de HIF-1 a través de la inhibición de FIH-1 (factor inhibitorio de HIF-1) [84].

La etapa clínica en la que se encuentre el paciente es fundamental para la inducción de angiogénesis en el cáncer de ovario. Se demostró que el contenido de los exosomas derivados del cáncer de ovario de alto grado (displasia moderada a severa) tiene un profundo impacto en la angiogénesis, en comparación con el cáncer de ovario de bajo grado (displasia leve). Señalando que ATF2 y MTA1 desempeñan un papel clave en la angiogénesis [85].

Los exosomas de CaMa contienen en gran proporción Anexina 2. Ensayos *in vitro* e *in vivo* demuestran que estos exosomas inducen angiogénesis mediada por la interacción de Anexina 2 y t-PA (Activador tisular del plasminógeno), ya que incrementó la formación de redes y ramas en las células HUVEC (células de endotelio), así como la concentración de hemoglobina. Estos hallazgos a su vez, facilitaron la metástasis al preparar el nicho pre-metastásico en órganos específicos [86].

6. Inmunoedición del cáncer

En las décadas anteriores aún se discutía sobre el papel del sistema inmune en el cáncer. En un inicio surgió la teoría de la "vigilancia inmune del cáncer" que fue apoyada por datos experimentales, donde se mostró un reconocimiento y posterior eliminación de tumores trasplantados en ratones inmunocompetentes, y no así, con tumores implantados en ratones inmunodeficientes. De igual forma, en humanos se ha reportado que el sistema inmune detecta y elimina células tumorales y que, las inmunodeficiencias (primarias o inducidas) se asocian con una mayor susceptibilidad a la tumorigénesis [87]. Diversas investigaciones señalan que la vigilancia inmune funciona en las primeras etapas del desarrollo tumoral, sin embargo ahora sabemos que esto sólo es una parte de la historia, ya que nuevos estudios revelan que el sistema inmune además, remodela al tumor seleccionando las clonas poco inmunogénicas, favoreciendo la progresión [77]. Debido a esto, se propuso el término "Inmunoedición del cáncer", que describe el papel que tiene el sistema inmune en el desarrollo tumoral. La Inmunoedición del cáncer, es el resultado de tres procesos: la eliminación, el equilibrio y el escape [77].

El proceso de eliminación dentro de la inmunoedición, engloba el concepto inicial de vigilancia inmune, es decir, el sistema inmune tanto innato como adaptativo, reconoce y elimina el surgimiento de células tumorales [88]. Inicialmente las células sanas del tejido se transforman en células tumorales por carcinógenos, junto con el fracaso de los mecanismos supresores de tumores intrínsecos. Estas células tumorales expresan moléculas en su superficie inducidas por el estrés como calreticulina y antígenos, que son reconocidos por moléculas MHC de clase I y NKG2D por células efectoras CD8⁺ y células NK, respectivamente. Las células dendríticas también pueden capturar y presentar estos antígenos tumorales a células T, incluidas las células NKT. Estas células efectoras activadas secretan interferón tipo I (INF- α/β) y II (INF- γ); el INF tipo I se requiere al inicio, actúa en células dendríticas CD103⁺ para mejorar la presentación cruzada de antígenos tumorales a células T CD8⁺, mientras que el INF tipo II tiene efectos antitumorales, al inhibir la proliferación de células tumorales y la angiogénesis [89].

Las células T CD8⁺ pueden inducir apoptosis de células tumorales al interactuar con los receptores Fas y TRAIL, o al secretar perforina y granzimas. Las células T efectoras expresan moléculas coestimuladoras tales como CD28, CD137, GITR y OX-40 que mejoran su proliferación y supervivencia; mientras que las células T $\gamma\delta$ también pueden reconocer y eliminar tumores que expresan ligandos para NKG2D. Las células del sistema inmune innato como los macrófagos (M1) y los granulocitos también contribuyen a la inmunidad antitumoral mediante la secreción de TNF- α , IL-1, IL-12 y ROS [89-91]. Sin embargo, esto también induce la liberación de las quimiocinas CXCL10 (proteína 10 inducible por interferón), CXCL9 (inducible por INF- γ) y CXCL11 (quimioatrayente α de células T inducible por interferón) por parte de células tumorales; estas quimiocinas (a diferencia de otras quimiocinas de esta familia como CXCL1, CXCL2 o CXCL8 que tienen actividad pro-angiogénica) tienen la capacidad de bloquear la formación de nuevos vasos sanguíneos, lo que conduce a la muerte de más células tumorales [88].

Más adelante, las células del sistema inmune y cualquier variante de célula tumoral que haya sobrevivido al proceso de eliminación, entran en un equilibrio dinámico. En este proceso el INF- γ y los linfocitos T, ejercen una potente presión de selección sobre las células tumorales que es suficiente para contener, pero no para extinguir completamente a la población tumoral que muta rápidamente; esto implica la continua remodelación del tejido y la selección de aquellas clonas con inmunogenicidad reducida, lo que promueve la producción de variantes resistentes que comienzan a inducir inmunosupresión [77]. Esta fase, es un equilibrio entre la respuesta antitumoral (IL-12 e INF- γ) y citocinas promotoras de tumores (IL-10 e IL-23); además de ser la etapa más larga de las tres, ya que las células tumorales pueden entrar en estado de reposo y permanecer latentes durante períodos prolongados, donde surgen nuevas variantes que albergan diferentes mutaciones que aumentan la resistencia a la presión inmune. Sin embargo, queda por determinar qué cambia el equilibrio y favorece el escape inmune, pero dado a que la edición ocurre en esta fase, es probable que un nuevo mecanismo en las nuevas variantes de células tumorales sea la clave [89].

A pesar de que las células tumorales atraviesan por una constante presión de selección inmune, algunas clonas tumorales emergen y "escapan" de la vigilancia inmune, que es la etapa final en la inmunosedición del cáncer. Durante esta fase, las variantes tumorales sobrevivientes han adquirido insensibilidad a la detección y/o eliminación inmunológica a través de cambios genéticos o

epigenéticos y evaden el reconocimiento inmune (por mecanismos como pérdida de antígenos tumorales, la disminución en la expresión de moléculas coestimuladoras en células efectoras o mediante la disminución de la expresión de MHC en APC); expresan moléculas de supervivencia (molécula anti-apoptóticas como Bcl2) e inmunosupresoras (como IDO, PD-L1, galectina-1/3/9, CD39, CD73 y receptores de adenosina), secretan citocinas que potencian la angiogénesis (como VEGF, TGF- β , IL-6 y M-CSF) y comienzan a expandirse de manera descontrolada [92]. Además, las células dendríticas y macrófagos M2 expresan moléculas que favorecen el establecimiento del tumor, como arginasa (enzima involucrada en el metabolismo de la urea y que tiene capacidad inmunoreguladora), iNOS e IDO (indolamina 2,3-dioxigenasa) y secretan citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- β , que pueden inhibir la proliferación de linfocitos T CD8⁺ o inducir apoptosis en estas células citotóxicas [90].

Por su parte, IDO cataboliza la conversión de triptófano a un metabolito tóxico para linfocitos T efectores e induce la generación de células Treg. De igual forma, las células Treg son reclutadas al microambiente tumoral por la acción de quimiocinas como CCL5, CCL20, CCL22, CCL28 y CXCL12 que son secretadas por el tumor; además, las células Treg expresan receptores inhibidores como PD-1, CTLA-4, Tim-3 y LAG3 que suprimen la respuesta inmune antitumoral y favorecen el desarrollo tumoral [90, 93, 94]. Aunque la modulación del sistema inmune en los tumores, se reconoce como un elemento clave que favorece la progresión del cáncer, actualmente es un campo prometedor para la manipulación terapéutica [77].

6.1 Células T reguladoras en cáncer

Las células Treg desempeñan un papel central para el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria y la auto-tolerancia [95, 96]. Estas células pueden suprimir la activación, proliferación y funciones efectoras de una amplia gama de células del sistema inmune incluyendo, linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, NK, NKT, linfocitos B y células presentadoras de antígeno. Son esenciales para: prevenir enfermedades autoinmunes, regular la respuesta inmune contra infecciones y para mantener la tolerancia intestinal e inducir tolerancia materno-fetal y hacia el alo-injerto [97].

Originalmente, las células Treg CD4⁺ se identificaron por la expresión constitutiva de la cadena α del receptor IL-2 (CD25); sin embargo, la expresión de CD25 es inducible en células T efectoras y

por ello, limita la utilización de este marcador como molécula específica de células Treg [98]. Hasta ahora, la expresión del factor de transcripción FOXP3 (forkhead box P3) representa el marcador más utilizado para Treg [97] y es fundamental para la expresión de diversos genes que les confieren su fenotipo supresor único. Además de las moléculas mencionadas, se han descrito otras más para identificarlas como CTLA-4, PD-1, LAG-3 y GITR [99].

Las células Treg FOXP3⁺ pueden generarse de diversa maneras. Pueden originarse durante el desarrollo de células T en el timo; estas células son Treg de origen tímico (nTreg) y muestran características estables [100]. Por otro lado, células T CD4⁺ naive que se encuentran en tejidos periféricos, pueden diferenciarse en células Treg FOXP3⁺ (pTreg); estas células Treg generadas en la periferia tienen un papel importante en la tolerancia contra antígenos no propios tales como la microbiota comensal [101]. Finalmente, las células Treg FOXP3⁺ también pueden inducirse *in vitro* activando células T CD4⁺ naive en presencia de TGF-β, a este tipo se les denominan Treg inducidas (iTreg), sin embargo, carecen de un fenotipo estable [100]. De manera interesante, la inestabilidad de la expresión de FOXP3 observada en iTreg frente al fenotipo estable en nTreg o pTreg, se puede atribuir a la desmetilación de elementos reguladores en la región promotora de FOXP3. En iTreg por ejemplo, la desmetilación de los motivos CpG dentro de los elementos potenciadores del locus FOXP3 (región desmetilada, TSDR) no es completa [102].

A las células Treg recientemente se les ha atribuido también la capacidad de suprimir la respuesta antitumoral [97]. En este sentido, Woo fue el primero en describir un aumento en la cantidad de Treg en pacientes con cáncer; en este trabajo, demostraron que células Treg CD4⁺CD25⁺ se incrementaron en pacientes con cáncer pulmonar y de ovario, y que éstas células secretan grandes cantidades de TGF-β, el cual inhibió las funciones de las células T CD8⁺ efectoras *in vitro* [103]. Se ha demostrado que existe un incremento en la frecuencia de Treg en diversos tipos de cáncer, incluyendo melanoma [104], cáncer de ovario [105], CaMa [106], gástrico [107] y pancreático [108]. El grado de infiltración de células Treg se ha correlacionado con el pronóstico del paciente [105, 109] y dicha condición, se asocia frecuentemente con un mal pronóstico [110-112]. Posiblemente debido a que las células Treg son capaces de suprimir la respuesta específica tumoral como se reportó en cáncer de ovario [105].

Recientemente se han reportado asociaciones más detalladas entre el reclutamiento y activación de Treg, con la progresión del cáncer. En melanoma el aumento de células Treg se correlacionó con el incremento en el nivel sérico de H-ferritina [113]; la liberación de H-ferritina por células tumorales condujo a la inducción de células Treg productoras de IL-10, este mecanismo mostró el potencial de inducción de células Treg en pacientes con cáncer [114, 115]. De igual forma, factores inmunosupresores son secretados por las células tumorales como TGF- β e IL-10, que promueven tanto la expansión de nTreg como la generación de iTreg [116-118]. En cáncer de ovario [105] y en linfoma de Hodgkin [119] se evidenció la liberación de grandes cantidades de la quimiocina CCL22, que es secretada tanto por células tumorales como por TAMs; CCL22 puede reclutar células Treg CCR4⁺. Diversos reportes han demostrado que CCL22 media el tráfico de células Treg CCR4⁺ en distintos tumores [105, 120-122]. Por otro lado, hipoxia tumoral tiene un papel directo en el reclutamiento de células Treg; la hipoxia regula positivamente a CCL28 en las células tumorales, que fue responsable del reclutamiento de células Treg FOXP3⁺ a través del receptor CCR10 [123]. Además, la expresión deIDO en APC infiltrantes de tumor estimula la conversión de células Tconv a Treg [124]. En conjunto, estos hallazgos evidencian la estrecha correlación entre el crecimiento del tumor y el incremento en las frecuencias de células Treg [115].

Es importante destacar que las frecuencias elevadas de Treg no solo benefician al tumor al evadir la vigilancia inmune, sino también representa un gran obstáculo en la inmunoterapia exitosa. Las células T efectoras al igual que las células Treg, reconocen antígenos específicos del tumor (como LAGE-1) que estimulan a ambos linajes celulares [125, 126]; como consecuencia, las vacunas inmunoterapéuticas pueden dar lugar a la expansión de Treg y así, obstaculizar la terapia [109, 127, 128]. En general, el trabajo previo ha establecido claramente que el incremento en la frecuencia de células Treg durante el desarrollo tumoral, depende de la etapa en la que se encuentre el cáncer, sin embargo, dicho incremento se correlaciona con la supervivencia general del paciente [109]. Por lo que es necesario tener más evidencias de este mecanismo, así como de la acumulación o la inducción preferencial de células Treg específicas de tumores y su papel durante la progresión tumoral.

6.2 Células T reguladoras y exosomas tumorales

Como se mencionó previamente, los exosomas representan un mecanismo de comunicación intercelular que por su alto contenido en proteínas y miRNAs, son potentes reguladores de la progresión tumoral. En este sentido, hay evidencia de que los exosomas tumorales tienen como blanco a las células Treg. Se ha demostrado que exosomas de tumores de cabeza y cuello contienen FasL y MHC I, esto se relacionó con la capacidad por parte de los exosomas de inhibir la proliferación e inducir apoptosis de células T CD8⁺ pero no de CD4⁺. Además, los exosomas incrementaron la proliferación de células Treg a diferencia de los exosomas derivados de células dendríticas. Estos datos sugieren que los exosomas tumorales inducen la supresión inmune promoviendo la expansión de Treg y eliminan a las células T efectoras antitumorales CD8⁺, contribuyendo así al escape tumoral [129].

Los exosomas de cáncer de ovario indujeron la generación de células CD4⁺CD25^{HI}FOXP3⁺ a partir de células T CD4⁺CD25⁻, así como la expansión de células Treg y aumento la actividad supresora de las células Treg, posiblemente debido a que incrementó la expresión de moléculas como FasL, IL-10, TGF-β, CTLA-4, granzima B y perforina. Este estudio sugiere que los exosomas de cáncer de ovario tienen propiedades inmunoregulatoras al generar células Treg, promover su expansión y regular positivamente la función supresora; así como mejorar su resistencia a la apoptosis [130].

Los exosomas de cáncer nasofaríngeo contienen grandes concentraciones de la quimiocina CCL20, que fue la responsable del reclutamiento de células Tnaive CCR6⁺ y Treg CCR6⁺ (CCL20 es ligando de CCR6). Por otro lado, los exosomas tienen la capacidad de convertir células T CD4⁺CD25⁻ en CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, mejoran la expansión de células Treg e incrementan su capacidad supresora, al inhibir la proliferación de células Tconv, mediante la secreción de citocinas inmunoregulatoras como IL-10 y TGF-β [131].

7. Modelo de estudio

La comprensión actual de diversos procesos biológicos se basa en estudios de poblaciones homogéneas de células cultivadas en sustratos bidimensionales (2D) y esto ha permitido

comprender mecanismos celulares individuales, pero no el comportamiento fisiológico de las células *in vivo*. Las células *in vivo* se encuentran en un entorno complejo, que contiene componentes de la matriz extracelular, poblaciones celulares que interactúan y una mezcla de factores secretados por las células [132].

Una de las diferencias notables observadas cuando se comparan células en cultivos 2D y 3D, es la disimilitud en la morfología. Las células en monocapa son planas, como consecuencia, las células tienen una polaridad apical-basal forzada; cambios que pueden afectar directamente su función. Por ejemplo, el aplanamiento de las células puede alterar la relación de membrana-citoplasma que afecta la proliferación, apoptosis y la diferenciación [133-135]. Por otro lado, la matriz extracelular además de servir como soporte adhesivo y mecánico para las células, también tiene un rol en la regulación de la distribución espacial de nutrientes, gases (como oxígeno) y moléculas efectoras (factores de crecimiento, hormonas y citocinas). En cultivos 2D, la distribución de la matriz extracelular se modifica y afecta dichos gradientes que son esenciales para la regulación de procesos celulares como la migración celular [136], la angiogénesis [137, 138] y la remodelación de tejidos durante el desarrollo [139]. Sin embargo, se ha demostrado que algunos tipos celulares en condiciones 2D, puede recuperar su forma y función cuando se integran a entornos de cultivo tridimensional (3D) [140, 141]. Como se ha mencionado, los cultivos celulares 2D apenas reflejan el comportamiento de las células y en este caso particular, el comportamiento de los tumores sólidos. La heterogeneidad del microambiente y la organización espacial de las células, son características que influyen directamente en la malignidad del tumor. Los cultivos 3D mimetizan algunas de las condiciones fisiológicas, al simular un microambiente que incluye la generación de un gradiente de nutrientes y oxígeno, que en cáncer, juega un papel esencial en la angiogénesis y la metástasis [142]; así como una proliferación. En cultivos 3D, las células de la superficie tienen niveles más altos de proliferación, mientras que el interior se encuentra un mayor número de células inactivas o necróticas; similar a un tumor [143].

En conclusión, existe una clara diferencia referente a las condiciones de cultivo y funcionamiento celular, así como en los efectos y respuestas celulares que se obtienen a partir de cada uno (2D vs 3D). Por lo que, es vital continuar evidenciando que la forma de cultivo tiene impacto en los resultados obtenidos en distintas investigaciones y enfatizar el uso de modelos de estudio adecuados, que asemejen de una mejor manera las condiciones fisiológicas de las células para contribuir con conocimiento preciso [132].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En CaMa la angiogénesis y el aumento en la frecuencia de células Treg se correlaciona con un pronóstico desfavorable para el paciente, así como una menor sobrevida. Recientemente, se ha investigado sobre el papel de los exosomas tumorales en la inducción de angiogénesis, así como en la modulación de la respuesta de células Treg, mecanismos que en conjunto, favorecen la progresión tumoral y metástasis. Reportes previos han demostrado que los exosomas tumorales son potentes inductores de angiogénesis, que inducen cambios fenotípicos y funcionales en las células endoteliales; también se ha informado que exosomas tumorales tienen la capacidad de generar y expandir células Treg, así como de incrementar su capacidad supresora. Sin embargo, se sabe poco sobre estos mecanismos en CaMa. Por lo que en este estudio, se evaluó el efecto *in vitro* de los exosomas de líneas celulares de CaMa con distinto subtipo tumoral (dependientes de hormonas y no dependientes) cultivados en monocapa y en un modelo 3D, en la inducción de nuevos vasos sanguíneos. También se analizó el papel funcional de los exosomas en células Treg, evaluando la generación y expansión de linfocitos Treg FOXP3⁺, y se determinó si los exosomas incrementan su capacidad supresora.

HIPÓTESIS

Los exosomas derivados de líneas celulares de CaMa tendrán un efecto promotor de la angiogénesis y tendrán la capacidad de modular la respuesta de células Treg FOXP3⁺, incrementando su generación y expansión, así como su actividad supresora.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto funcional *in vitro* de exosomas de CaMa provenientes de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-468 en condiciones 2D y 3D, en la inducción de angiogénesis y su capacidad de generar y expandir células Treg FOXP3⁺; así como el efecto en su capacidad supresora.

OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Establecer cultivos 2D y 3D, a partir de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-468.
- II. Aislar y caracterizar los exosomas de líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-468 provenientes de cultivos 2D y 3D.
- III. Evaluar la inducción de angiogénesis por efecto de exosomas de cultivos 2D y 3D de CaMa en células endoteliales.
- IV. Analizar la generación *ex vivo* de células Treg FOXP3⁺ a partir de células Tnaive CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺ en presencia exosomas 3D de CaMa.
- V. Evaluar la expansión de células Treg FOXP3⁺ *ex vivo* en presencia de exosomas 3D de CaMa.
- VI. Analizar la capacidad supresora *in vitro* de células Treg FOXP3⁺ expandidas en presencia de exosomas 3D de CaMa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares adherentes de CaMa (2D)

Las condiciones de cultivo se describen a continuación:

- Línea MCF-7 de CaMa humano (ATCC HTB-22) fenotipo epitelial luminal, receptor de estrógeno positivo; se cultivó en medio DMEM (Dulbecco's modified eagle médium) glucosa 4.5 g/L, SFB 10% disminuido en exosomas (v/v) y antibióticos (Penicilina 10,000 U y Estreptomina 10 ng/mL) a 37°C con 5% de CO₂.
- Línea MDA-MB-468 de CaMa humano (ATCC HTB-132) fenotipo basal A metastásica, triple negativo (receptor de estrógeno, progesterona y HER2 negativo); se cultivó en medio L-15 (Leibovitz 15), glucosa 4.5 g/L, SFB 10% disminuido en exosomas (v/v) y antibióticos (Penicilina 10,000 U y Estreptomina 10 ng/mL) a 37°C.

SFB y SH disminuido en exosomas

Las líneas celulares de CaMa en condiciones adherentes, las células endoteliales Huvec (ver apartado Ensayo de Inducción de Angiogénesis) y células T (ver apartado Ensayo de Supresión) se cultivaron en condiciones estándares. Sin embargo, el SFB (Gibco, USA) y el SH (Gibco, USA) que se utilizaron como suplemento de los medios de cultivo fueron depletados de exosomas, con el fin de minimizar la influencia de éstos durante la caracterización de los exosomas de CaMa y en los ensayos funcionales. Los sueros tanto el SFB como el SH, se filtraron con un poro de 0.2 µm, se centrifugaron a 9,900 rpm (10,000 g) durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se ultracentrifugó a 35,000 rpm durante 3 hrs a 4°C. Finalmente se recuperó cuidadosamente el sobrenadante (SFB y SH), evitando resuspender de nuevo el botón (exosomas).

Generación de cultivos en suspensión de CaMa (3D)

Los cultivos tridimensionales se generaron a partir de cultivos adherentes. Se colocaron 350,000 células para cada condición (línea celular de CaMa) en 8 mL de medio DMEM/F12 1:1 (sin SFB), suplementado con EGF 20 ng/mL y B27 (Gibco, USA) al 2%, en placas no adherentes de 100mm*20mm, en una atmósfera de CO₂ al 5% y a 37°C. Se mantuvo en cultivo sin movimiento durante 6 días.

Caracterización del fenotipo Stem-like de cultivos de CaMa 2D y 3D

Al sexto día, los cultivos 3D se centrifugaron a 600 rpm durante 5 min a 4°C. Se recolectó cuidadosamente el sobrenadante y se almacenó a 4°C para la posterior purificación de exosomas de CaMa (ver apartado Purificación de exosomas de CaMa). Al botón celular se le agregó 100 µl de tripsina (Merck), se incubó 5 min a 37°C y se disgregó gentilmente.

Las células de los cultivos adherentes se cosecharon de manera estándar, con 100 µl de TrypLE Express Enzyme 1X (Thermo Fisher Scientific) por placa, se incubó 5 min a 37°C y se despegó cuidadosamente. Se determinó la viabilidad por exclusión con azul de tripano en cultivos 2D y 3D, utilizando células con 90% de viabilidad. Las células se tiñeron con anti-CD24 APC (Santa Cruz Biotechnology) y anti-CD44 FITC (Santa Cruz Biotechnology), junto con el marcador de viabilidad AZ (Biolegend) durante 30 min a TA. Posteriormente se fijaron en paraformaldehído al 2% y se analizaron en el citómetro Attune NXT (Thermo Fisher Scientific).

Purificación de exosomas de CaMa: UCF y SEC

Se recolectó el sobrenadante de cultivos adherentes con 80% de confluencia, mientras que para los cultivos en suspensión, se recolectó al sexto día de cultivo. Los sobrenadantes fueron centrifugados a 10,000 g durante 30 min a 4°C (para la eliminación de restos celulares) y se recolectó la fase líquida.

Para los ensayos funcionales de inducción de angiogénesis, los exosomas fueron purificados mediante centrifugación diferencial (UCF). Se realizaron 2 ciclos de ultracentrifugación a 100 000 g durante 1:30 hrs sin freno a 4°C; se recuperaron los exosomas (botón) y se almacenaron a 4°C, siendo estables por 1 semana. Mientras que para los ensayos de células T, los exosomas fueron purificados mediante una columna de exclusión por tamaño (SEC, *size exclusion chromatography*), para ello, el sobrenadante se concentró utilizando tubos Amicon (Merck) de 15 mL con un poro de 30 kDa que se centrifugó a 3 100 g durante 1 hora a 4°C; el concentrado de 1.5 mL fue vertido en una columna de sefarosa para la separación (Sigma-Aldrich) y se obtuvieron 25 fracciones de 500 µl. Cada fracción fue analizada por NTA para determinar las fracciones con mayor cantidad de vesículas; para la línea celular MCF-7 en 2D y 3D las fracciones de la 8-11 y de la 6-9 para la línea

celular MDA-MB-468 en 2D y 3D fueron las fracciones de interés. Finalmente para concentrar a los exosomas, las fracciones de interés de cada línea celular fueron centrifugadas a 3,100 g durante 30 min a 4°C en tubos Amicon (Merck) de 2mL con un poro de 30 kDa. Para recuperar la suspensión de exosomas, se invirtió el tubo y se centrifugó a 3,100 g durante 2 min a 4°C y los exosomas se almacenaron a 4°C.

Caracterización de exosomas de CaMa

Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

La suspensión con exosomas recientemente aislados, se colocó sobre una rejilla cubierta con una película de carbón durante 5 min, se lavó el exceso con agua MiliQ por 10 seg y finalmente los exosomas se tiñeron con acetato de uranilo al 2% durante 5 min. Los exosomas tumorales se visualizaron en un microscopio JEOL JEM 12000 EII, con una aceleración de 80 kV.

Cuantificación de exosomas tumorales por NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*)

La distribución y concentración de exosomas fue analizada por NTA, todas las muestras fueron analizadas con las siguientes condiciones: una dilución de 1:200 de la suspensión de exosomas, temperatura menor a 25°C. La medición se estandarizó con 3 lecturas de 30 seg y un error <0.05. Los exosomas se analizaron con el Nanosight NS300 (Marvern). Las mediciones se realizaron con un nivel de cámara de 10 y un límite de detección de 3.

ENSAYOS FUNCIONALES

Inducción de angiogénesis por exosomas de CaMa

Cultivo de células endoteliales Huvec

Se cultivó la línea celular endotelial humana Huvec (ATCC CRL-1730) en medio F-12K, SFB 10% disminuido en exosomas (ver apartado SFB disminuido en exosomas) suplementado con heparina (Sigma, Aldrich) (0.1 mg/ml), ECGS (0.05 mg/ml) y antibióticos (Penicilina 10,000 U y Estreptomina 10 ng/mL) a 37°C con 5% de CO₂ hasta alcanzar un 80% de confluencia.

Ensayo de formación de tubos endoteliales

Para los ensayos de inducción de angiogénesis se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano, se adicionaron 40 µl de matrigel (BD Biociences) con 120 µl de PBS 1X, a cada condición. Se dejó solidificar durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se retiró el PBS 1X y se adicionaron 30 000 células Huvec a cada pozo, en presencia o ausencia de exosomas tumorales de CaMa (en condiciones 2D y 3D) y con la concentración de 12 000 y 20 000 exosomas por célula Huvec respectivamente, sin SFB. Se usó como control negativo 10 mM de sulforafano (Sigma-Aldrich) y como control positivo 10 ng/uL FGF (Gibco). Los co-cultivos se mantuvieron por 6 horas a 37°C y 5% CO₂. Finalmente, el área de formación de tubos endoteliales se cuantificó como la densidad media de los pixeles obtenidos a partir del análisis de 5 campos aleatorios de imágenes de microscopio de campo claro a 10X, usando el programa Image J 1.50i (National Institutes of Health) donde se cuantificó por separado la formación de segmentos (vasos individuales), nodos (intersección de 2 o más segmentos) y redes (circuito conformado por segmentos y nodos).

Generación y expansión de Treg con exosomas de CaMa

Individuos sanos

Todos los procedimientos que involucraron muestras humanas siguieron los lineamientos de bioseguridad para el trabajo con muestras humanas establecidos por la comisión de Bioética y Seguridad del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Se utilizaron concentrados leucocitarios de 6 individuos sanos, recolectados en el Banco de Sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”.

Separación de CMN

La sangre se diluyó en PBS 1X con relación 1:2. Se realizó un gradiente de estratificación de densidad en 2 mL Lymphoprep (Axis Shield, Norway) por cada 8 mL de sangre diluida. Se centrifugó a 2 000 rpm durante 30 min a 18°C, sin freno. Las CMN se recolectaron en la interfase, se lavaron en 3 ocasiones (a 1 500 rpm, 1 200 rpm y 900 rpm durante 5 min) con medio RPMI 1640 (Gibco, USA) y SFB depletado de exosomas al 10%. Se determinó la viabilidad celular por exclusión de azul tripano, utilizando células con 90% de viabilidad. Para los ensayos de supresión, se criopreservaron alícuotas de CMN autólogas, en solución 90% SFB (Gibco, USA) y DMSO 10% (Sigma-Aldrich) a -70°C por 24 hrs, posteriormente se transfirieron a nitrógeno líquido.

Purificación células T CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺ (Tnaive) y células CD4⁺CD25^{HI}CD127⁻ (Treg)

Las CMN se incubaron con anticuerpos con fluorocromos anti-CD4 PE (Tonbo Biosciences), anti-CD25 PECy5 (BD Bioscience), anti-CD45RA PECy7 (Tonbo Biosciences) y anti-CD127 FITC (BD Bioscience) durante 30 min a 4°C en oscuridad, posteriormente se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron a 1 200 rpm durante 5 min. Se purificaron células T CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺ y CD4⁺CD25^{HI}CD127⁻ por FACS en un citómetro de flujo FACSAria™ I (BD Bioscience).

Generación *ex vivo* de células Treg y efecto de los exosomas de CaMa 3D

Las células T CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺ se estimularon con perlas magnéticas acopladas a anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Life Technologies), en una proporción 1:10 (perla:célula). Se cultivaron 20,000 células en placas de 96 pozos fondo U con medio OpTmizer T-Cell Expansion (Gibco, USA) suplementado con IL-2 (50 U/mL) (R&D Systems, UK) y TGF-β (0.5 ng/mL) en concentraciones subóptimas (condiciones limitadas en nutrientes y de activación, para evidenciar efecto real de los exosomas de CaMa), en presencia o ausencia de exosomas tumorales (50, 500, 5 000, 10 000 y 20 000 exosomas por célula Tnaive); las células se mantuvieron en una atmósfera de 37°C y 5% CO₂. En el día 4, se analizó su fenotipo por citometría de flujo (ver apartado Fenotipo de Treg).

Expansión *ex vivo* de células Treg por exosomas de CaMa

Las células T CD4⁺CD25^{HI}CD127⁻ se estimularon con perlas magnéticas acopladas a anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en una proporción 1:2 (perla:célula). Se cultivaron 15 000 células en placas de 96 pozos fondo U en medio OpTmizer™ CTSTM T-Cell Expansion (Gibco,USA) suplementado con IL-2 (300 ug/ml) (R&D Systems) en condiciones subóptimas, en presencia o ausencia de exosomas tumorales (50, 500, 5 000, 10 000 y 20 000 exosomas por célula Treg); las células se mantuvieron en una atmósfera de 37°C y 5% CO₂. En el día 3 se adicionó medio con IL-2 (50 U/mL), al día 5 se retiraron las perlas magnéticas anti-CD3/CD28 y se adicionó IL-2 (50 U/mL), mientras que en el día 7, las células fueron contadas (viabilidad 90%) para los ensayos de supresión y se analizó su fenotipo por citometría de flujo (ver apartado Fenotipo de Treg y supresión).

Fenotipo de células Treg

Después de 4 días a las células T CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺ (Tnaive) y 7 días para las células CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻ (Treg), cultivadas en presencia o ausencia de exosomas, se evaluó su fenotipo por citometría de flujo. Se incubaron con anticuerpos anti-CD25 PEcy5 (BD Bioscience), anti-CTLA4 PEcy7 (Biolegend) y AZ (Biolegend) durante 30 min a 4°C en oscuridad, el exceso se lavó con PBS 1X. Para la tinción de FOXP3, se utilizó FOXP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Tonbo), se adicionaron 100 ul de la solución Fijation/Permeabilitation (1 parte del concentrado con 3 partes del diluyente), se incubó 1 hora a TA en oscuridad. Se lavó con 100 ul de Permeabilitation Buffer 1X (Tonbo) y se incubó con anti-FOXP3 APC durante 30 min a 4°C en oscuridad. Las células se lavaron 2 veces más y se analizaron en el citómetro de flujo Attune NXT (Life Technologies, USA). Los resultados (porcentaje, números e intensidad media de fluorescencia) se analizaron con programa FlowJo Vx0.7 (Tree Star Ashland, USA).

Ensayo de Supresión

Las células T CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻ expandidas *in vitro* con exosomas tumorales fueron cocultivadas con células T autólogas (aisladas con kit PanT cell, Miltenyi Biotec) descongeladas (previamente marcadas con 2 μM CFSE) en distintas proporciones (0:1, 1:2, 1:8 y 1:32 Treg:Tconv) en placa de 96 pozos fondo U, en medio RPMI suplementado con SH al 10% (ver apartado SH disminuido en exosomas). Las células fueron estimuladas con perlas anti-CD3/CD28 en una proporción de 1:15 (perla:célula) y se mantuvieron en cultivo a 37°C con 5 % CO₂. Al día 5, se realizó tinción superficial con anti-CD4 APC (Tonbo Biosciences) y anti-CD8 PEcy7 (Tonbo Biosciences) durante 30 min a 4°C, se lavó con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 2%. Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo Attune NXT (Life Technologies, USA) y se determinó la proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺ por dilución de CFSE. Para determinar el porcentaje de supresión se usó la siguiente formula:

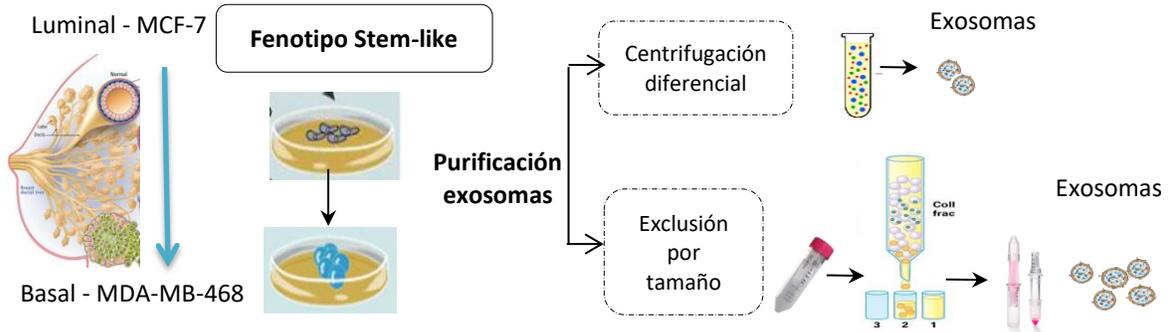
$$\% \text{ Supresión} = \frac{\% \text{ de Proliferación de Tresp sin Treg} - \% \text{ de Proliferación de Tresp con Treg}}{\% \text{ de Proliferación de Tresp sin Treg}} \times 100$$

Análisis estadístico

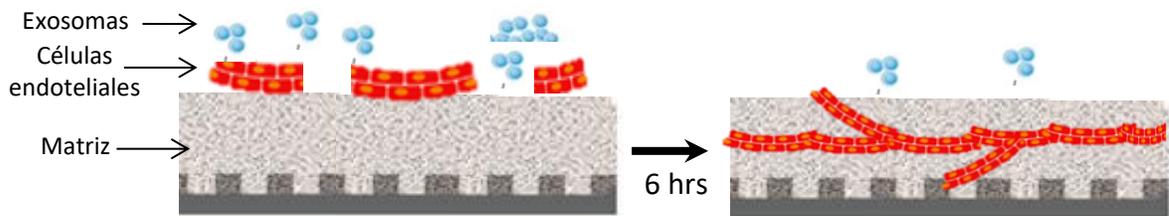
El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism 6.01 (USA). Para analizar la distribución de los datos se utilizó la prueba de normalidad Shapiro Wilk. Para la comparación entre los grupos se usó la prueba de Kruskal-Wallis (Generación y expansión de células Treg y supresión) y Tukey's (angiogénesis), los resultados se describieron como media y desviación estándar. Se consideró un valor significativo $p < 0.05$.

DIAGRAMA DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

I. Purificación de exosomas de CaMa



II. Inducción de Angiogénesis por exosomas de CaMa



III. Inducción y expansión de células Treg por exosomas y, capacidad supresora de Treg

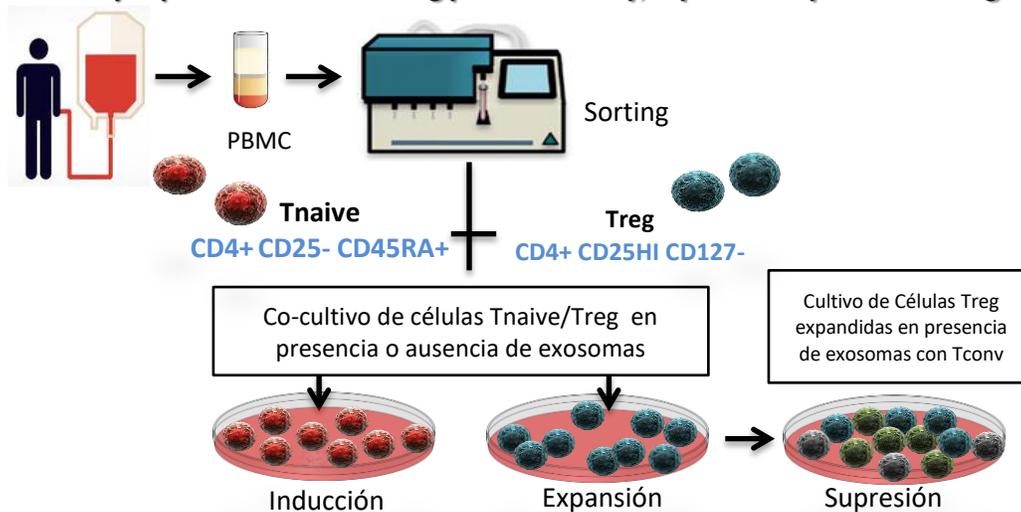


Figura 1. Diagrama de la estrategia experimental. I) Se establecieron cultivos 2D y 3D de las líneas celulares de CaMa MCF-7 y MDA-MB-468, del sobrenadante se aislaron los exosomas por centrifugación diferencial (UCF) y mediante una columna de exclusión por tamaño; para los ensayos de inducción de angiogénesis y en células Treg, respectivamente. II) Para el ensayo de inducción de angiogénesis se pusieron en cultivo células endoteliales (Huvec) en presencia o ausencia de exosomas (12 000 y 20 000), se incubó durante 6 horas y se analizó la formación de tubos endoteliales. III) De individuos sanos se purificaron CMN y se sortearon células Tnaive (CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺) y Treg (CD4⁺CD25^{HI}CD127⁻) y se cultivaron en ausencia o presencia de exosomas (50, 500, 5 000, 10 000 y 20000) y se analizó la expresión de moléculas relacionadas con fenotipo y función de Treg y se evaluó su capacidad supresora.

RESULTADOS

Establecimiento de cultivos celulares 2D y generación de cultivos 3D

La localización espacial de las células tumorales y las condiciones de oxígeno, afectan sus características fenotípicas y en algunos casos, favorecen la adquisición de un fenotipo tipo troncal e incrementan su agresividad [132, 138, 144]; por lo que se evaluó, si las condiciones de cultivo 2D y 3D modifican a los exosomas producidos y por lo tanto su contenido, visto desde su función en la inducción de angiogénesis.

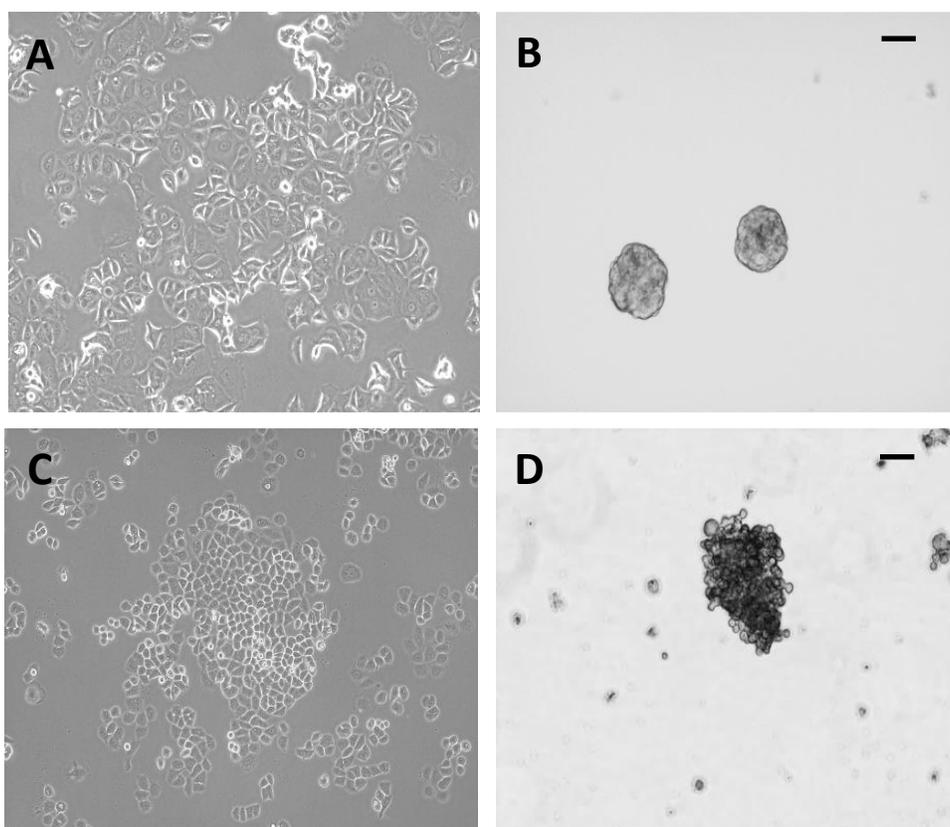


Figura 2. Las líneas celulares de CaMa en condiciones de cultivo 2D y 3D. Fotografías representativas del crecimiento de la línea celular (A) MCF-7 (Luminal A) y (C) MDA-MB-468 (triple negativo) en condiciones adherentes con medio suplementado y SFB disminuido en exosomas. Fotografías representativas del crecimiento en condiciones 3D de (B) MCF-7 y (D) MDA-MB-468 con medio libre de exosomas. Microscopía de contraste de fases 10X, escala de la barra 100 μm .

Para ello se establecieron cultivos celulares de las líneas tumorales MCF-7 (Figura 2-A) con fenotipo luminal y MDA-MB-468 (Figura 2-C) con fenotipo triple negativo, en condiciones adherentes. De igual forma se establecieron cultivos tridimensionales para cada línea celular. El tipo celular (MCF-7 o MDA-MB-468) determinó la forma en que cada cultivo se generó. Los cultivos 3D de MCF-7 establecieron esferas completamente homogéneas, en cuanto a su estructura y tamaño de 100-130 μm (Figura 2-B), mientras que la línea celular MDA-MB-468 generó agregados celulares en forma de “racimo” con tamaños heterogéneos entre 200-400 μm (Figura 2-D).

Fenotipo *Stem-like* en cultivos 2D y 3D

Los cultivos adherentes han sido extensamente usados en diversas investigaciones incluido el cáncer, sin embargo se ha demostrado que los cultivos tridimensionales son un mejor modelo de estudio, ya que asemeja a un tumor sólido en la organización espacial de las células, en la disposición de nutrientes y oxígeno; así como en el enriquecimiento de células con fenotipo stem-like; estas células son responsables de mantener el crecimiento tumoral y agresividad [132, 143-146]. La modificación en la expresión de CD24 y CD44 es utilizada como marcador de la adquisición de un fenotipo tipo troncal [29-31, 147] y por lo tanto, fue caracterizado en ambas líneas celulares cultivadas en condiciones 2D y 3D, mediante los marcadores CD24^{low}/CD44⁺. CD24 es una molécula de adhesión; su expresión se correlaciona con la tumorigénesis y la progresión tumoral [148-150]. Por otro lado, CD44 es un glicoproteína de membrana, se sobreexpresa en cáncer y su interacción con sus ligandos promueve los procesos de migración e invasión, involucrados en las metástasis [151].

Los resultados respecto a la línea celular MCF-7 mostraron un fenotipo CD24⁺ (92.87%) y CD44 (9.1%), cuando fue cultivada en condiciones adherentes (Figura 3-A panel superior izquierdo). Por otro lado, cuando fue cultivada en suspensión modificó su fenotipo, esto lo vemos representado por una pérdida de CD24 (de 92.87% a 65.83%) y una ganancia de CD44 (de 9.1% a 88.4%) (Figura 3-A panel inferior izquierdo). Estos resultados evidencian que en los cultivos 3D de MCF-7, hay un enriquecimiento de la subpoblación con fenotipo CD24^{low}/CD44⁺ comparado con el cultivo 2D (Figura 3-B), el cual las relaciona con el fenotipo troncal reportado en la literatura para este tipo de cultivos.

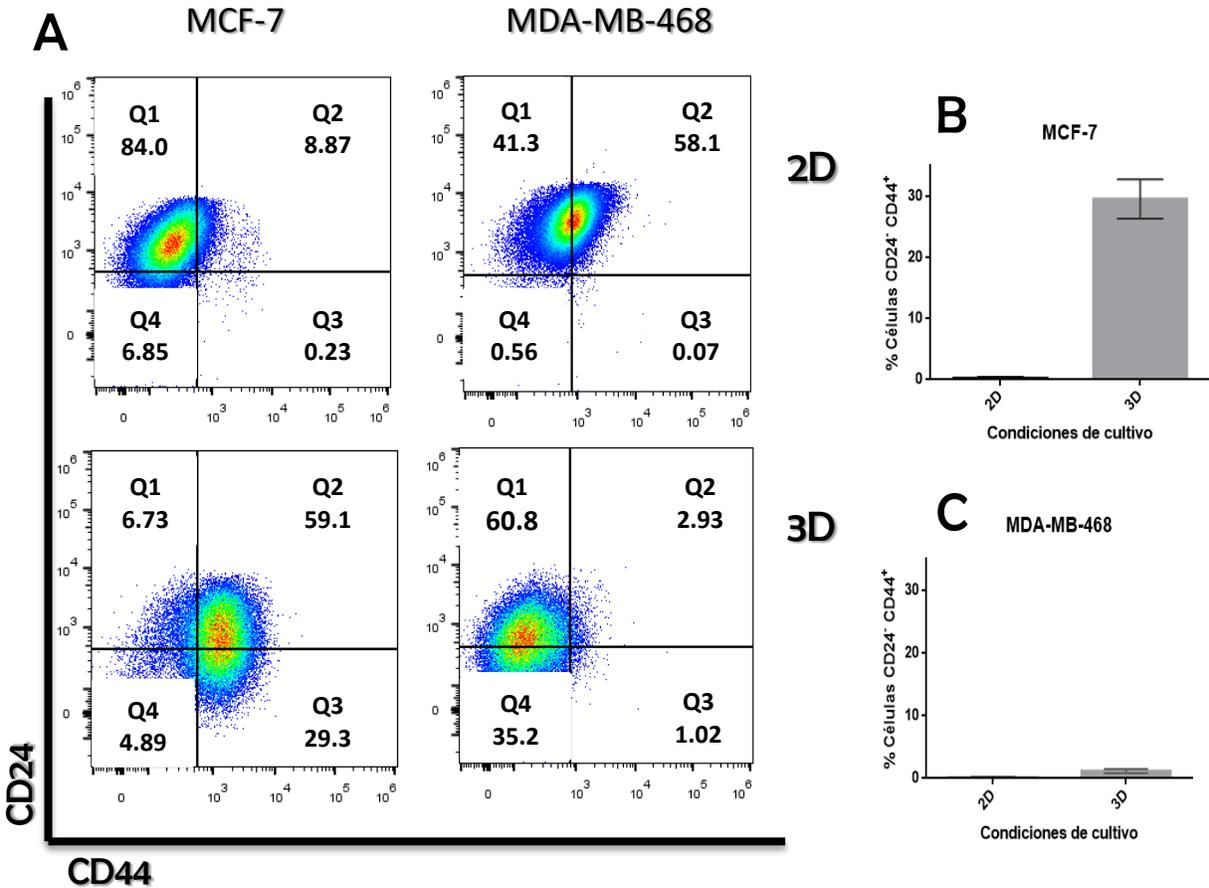


Figura 3. Los cultivos celulares 3D de la línea MCF-7 muestran un enriquecimiento de la subpoblación con fenotipo CD24^{low}/CD44⁺. A) Diagramas de puntos de las células cultivadas en condiciones 2D y 3D analizadas por citometría de flujo. B) Los cultivos 3D, pero no 2D de MCF-7 mostraron un enriquecimiento de células troncales; sin embargo, C) los cultivos 3D de células MDA-MB-468 no mostraron este enriquecimiento. El fenotipo stem-like se evaluó mediante los marcadores CD24^{low}/CD44⁺. Paneles representativos de 3 experimentos independientes.

Interesantemente en células de la línea MDA-MB-468 no ocurrió un proceso similar comparado con la línea MCF-7. Las células en condiciones 2D mostraron un fenotipo mayormente CD24⁺ (99.4%) y CD44⁺ (58.17%) (Figura 3-A panel superior derecho). Sin embargo, al analizar la condición 3D, no hubo un enriquecimiento de células con fenotipo troncal como se esperaba, únicamente se evidenció la pérdida del marcador CD24 (de 99.4% a 63.73%) y contrastantemente, se observó una pérdida de CD44 (de 58.17% a 3.95%) (Figura 3-A panel inferior derecho). Estos resultados evidencian que en los cultivos 3D de MDA-MB-468, no hay un enriquecimiento de la subpoblación con fenotipo CD24^{low}/CD44⁺ comparado con el cultivo 2D (Figura 3-C).

Disminución de partículas en el SFB y SH

Recientemente se ha descrito la presencia de exosomas en el SFB y SH, que podrían influenciar en la caracterización de exosomas tumorales de CaMa, así como en ensayos funcionales [152]. Por lo que, dichos sueros se trataron por ultracentrifugación (UCF) con la finalidad de disminuir la presencia de exosomas. Posteriormente se analizó la presencia de partículas por NTA. El SFB sin tratar, mostró una concentración de 5.3×10^9 part/ml, mientras que al ser tratado por UCF disminuyó a 3.1×10^6 part/ml (Figura 4 A-B). Los resultados para el SH sin tratar indicaron 4.2×10^8 part/ml, mientras que al ser tratado disminuyeron a 1.6×10^7 part/ml (Figura 4 C-D). Esto indica que el tratamiento con UCF es eficiente, al disminuir la cantidad de partículas presentes en el suero en un 99.95% y un 96.2% en el SFB y SH, respectivamente.

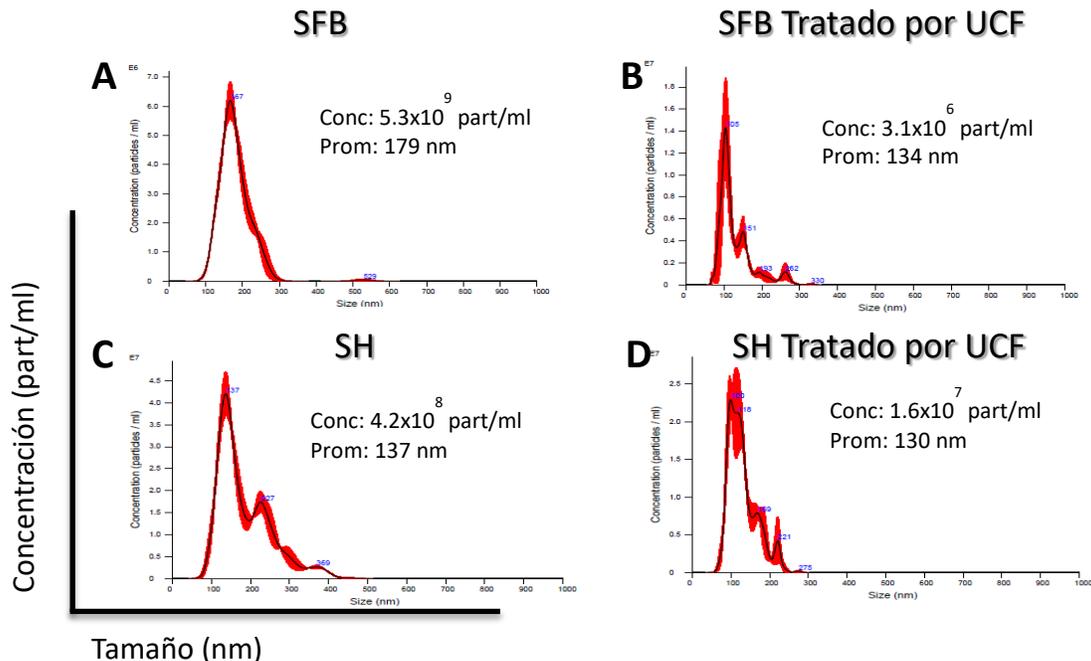


Figura 4. Disminución de la concentración de partículas en SFB y SH tratado con UCF. Se encontró una clara disminución de partículas en el SFB (B) así como en el SH (D) tratado, comparado con el suero inicial (A y C). Análisis NTA, dilución 1:200. Imagen representativa de 3 ensayos independientes.

La disminución en la concentración de exosomas del SFB, disminuye la posible contaminación de exosomas exógenos en los cultivos de células de CaMa; es decir, los exosomas purificados de células de CaMa están enriquecidos en sí mismos. De igual forma, la disminución de partículas en el SH disminuye la contaminación exógena en los cultivos de células Tnaive y Treg.

Cuantificación de exosomas de CaMa obtenidos por UCF

En los ensayos de inducción de angiogénesis, una vez establecidos los cultivos 2D y 3D, los exosomas de CaMa se purificaron mediante UCF (ver Purificación de exosomas de CaMa) y se cuantificaron por NTA. Para cada condición de cultivo, se comenzó el aislamiento de exosomas a partir de 75 mL, equivalente a aproximadamente 6×10^6 células de cultivos 2D y 3.75×10^6 células de cultivos 3D.

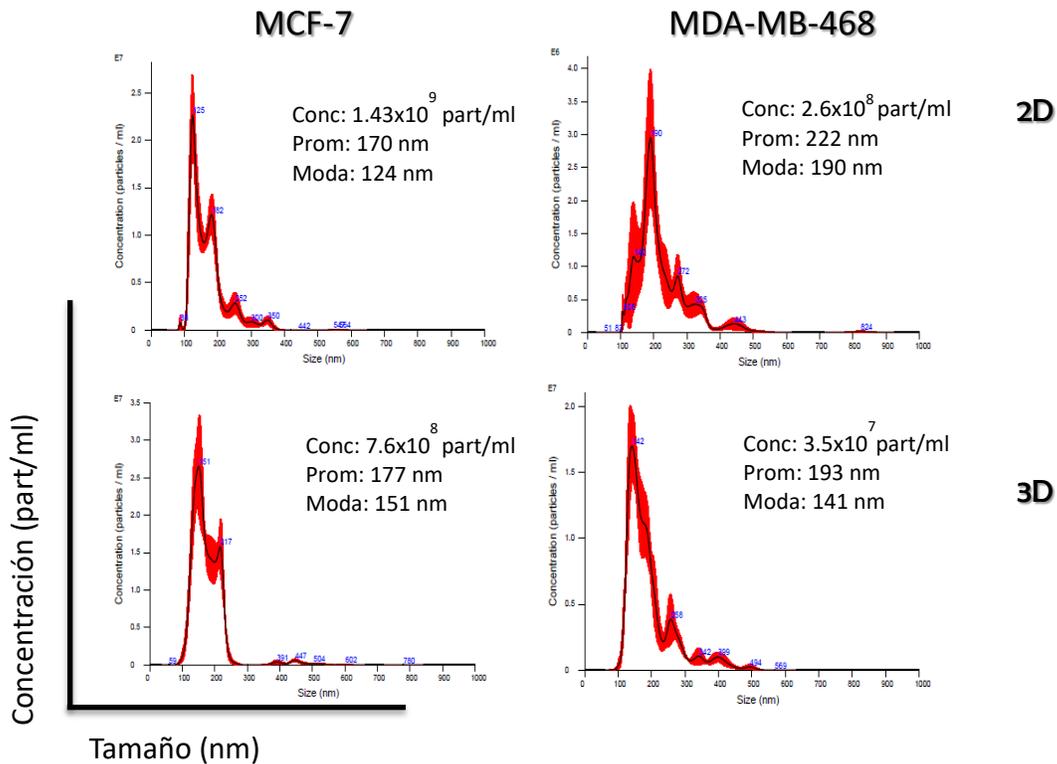


Figura 5. Cuantificación de la concentración por NTA de los exosomas MCF-7 (panel izquierdo) y MDA-MB-468 (panel derecho) en condiciones de cultivo 2D y 3D, aislados mediante UCF. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Dilución 1:200

Los resultados indican que los exosomas provenientes de la línea celular MCF-7 en condiciones de cultivo 2D tuvieron una concentración de 1.4×10^9 part/ml y aquellos cultivados en 3D 7.6×10^8 part/ml (Figura 5 panel izquierdo). La concentración de exosomas de la línea MDA-MB-468 de cultivos 2D mostraron concentraciones de 2.6×10^8 part/ml, mientras que exosomas de cultivos 3D tuvieron 3.5×10^7 part/ml (Figura 5 panel derecho). En cuanto al tamaño de los exosomas MCF-7 tuvieron un promedio de 124 nm y 151 nm en condiciones 2D y 3D, respectivamente; mientras que exosomas de MDA-MB-468 tuvieron un promedio de 190 nm y 141 nm, respectivamente.

Caracterización de exosomas de CaMa purificador por UCF: MET

Los exosomas de cultivos 2D y 3D de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-468 purificados mediante UCF, fueron caracterizados por MET. Se tiñeron con Acetato de Uranilo al 2% para su análisis y se observó una estructura heterogénea, tanto en forma como en tamaño en los exosomas de CaMa. Los resultados mostraron que los exosomas de MCF-7 en condiciones de cultivo 2D tienen un tamaño promedio de 83 ± 16 nm (Figura 6-A) y los provenientes de cultivos 3D tuvieron un tamaño de 95 ± 15 nm (Figura 6-B). Mientras que los exosomas de la línea MDA-MB-468 de cultivos 2D y 3D muestran un tamaño promedio de 116 ± 25 nm (Figura 9-C) y 143 ± 47 nm (Figura 6-D) respectivamente.

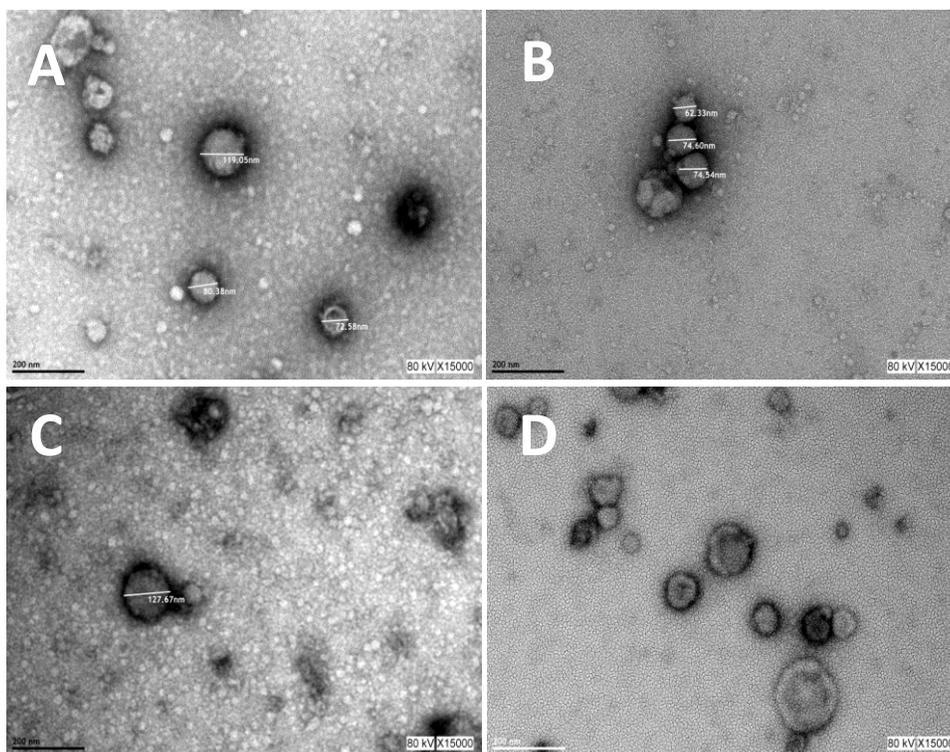


Figura 6. Microscopía Electrónica de Transmisión de exosomas de CaMa purificados mediante UCF. A) Exosomas de la línea MCF7 en condiciones de cultivo 2D (A) y 3D (B), así como exosomas de la línea celular MDA-MB-468 de cultivos 2D (C) y 3D (D). Teñidos con acetato de uranilo 2%, aumento 15 000X, escala de la barra 200 nm.

❖ ENSAYO FUNCIONAL

Inducción de Angiogénesis por exosomas de CaMa

Debido a que el contenido de los exosomas es rico en proteínas pro-angiogénicas [63, 81] y algunos miRNAs [84], se evaluó si la formación de tubos endoteliales por efecto de exosomas de CaMa dependía de la dosis, del origen celular y así como de la condición de cultivo. Para ello, al término de las 6 horas del ensayo de inducción de angiogénesis, se tomaron fotografías que evidenciaban la formación de tubos endoteliales, mostrado en la figura 7-A. La formación de nodos denota la intersección de más de 2 células endoteliales y los segmentos indican la longitud de los capilares formados. En conjunto, dentro del proceso de angiogénesis las redes muestran la complejidad de los vasos, basados en la altura y longitud del mismo, así como el número de células que lo componen, información proporcionada principalmente por nodos y segmentos [153, 154]. Para analizar cuantitativamente el proceso de angiogénesis, se examinaron 5 campos diferentes mediante el programa IMAGE J; en la figura 7-B, se muestra el análisis de segmentos, nodos y redes en color verde, rojo y azul, respectivamente.

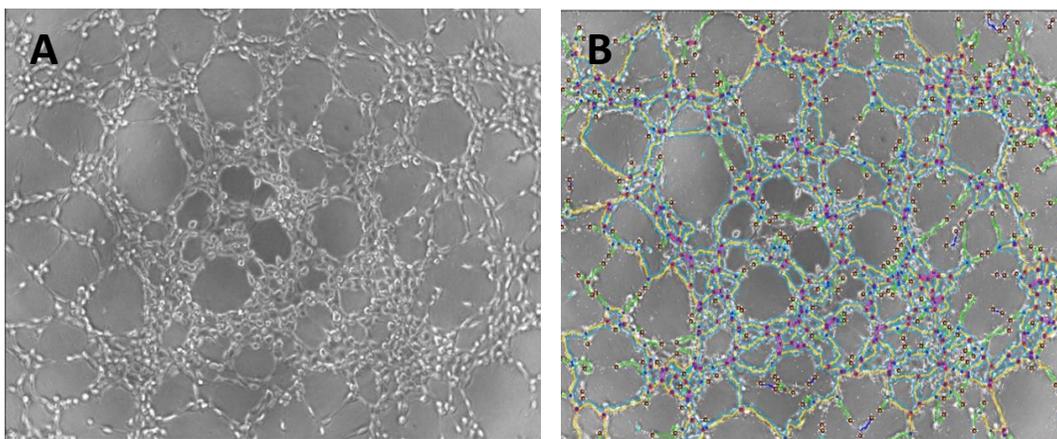


Figura 7. Análisis de la formación de tubos endoteliales en el programa Image J. Las fotografías capturadas (A) fueron analizadas por el programa Image J, que cuantificó la formación de vasos (B) mediante el análisis de nodos (rojo), segmentos (verde) y redes (azul). Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Aumento 10X.

Nota: Todas las condiciones tratadas de la gráfica 8 a la 11, fueron comparadas con la condición NS (sin estímulo) y todas ellas mostraron significancia de $p < 0.0001$ (Datos no mostrados). Por lo que, a partir de este punto, los datos significativos (indicados por asteriscos (*)) muestran únicamente la comparación con el control positivo (Figura 8-11).

La primera pregunta planteada fue investigar si los exosomas de MCF-7 y MDA-MB-468 tienen efecto en la inducción de angiogénesis en condiciones de cultivo 2D; para ello, se co-cultivaron células endoteliales con una dosis de 12,000 exosomas por célula. Los resultados indican claramente que los exosomas de cultivos 2D (MCF-7 y MDA-MB-468) son capaces de inducir angiogénesis (Figura 8), de manera similar al control positivo (FGF). Esto sugiere que los exosomas de CaMa en condiciones 2D tienen efectos similares al inducir la formación de vasos.

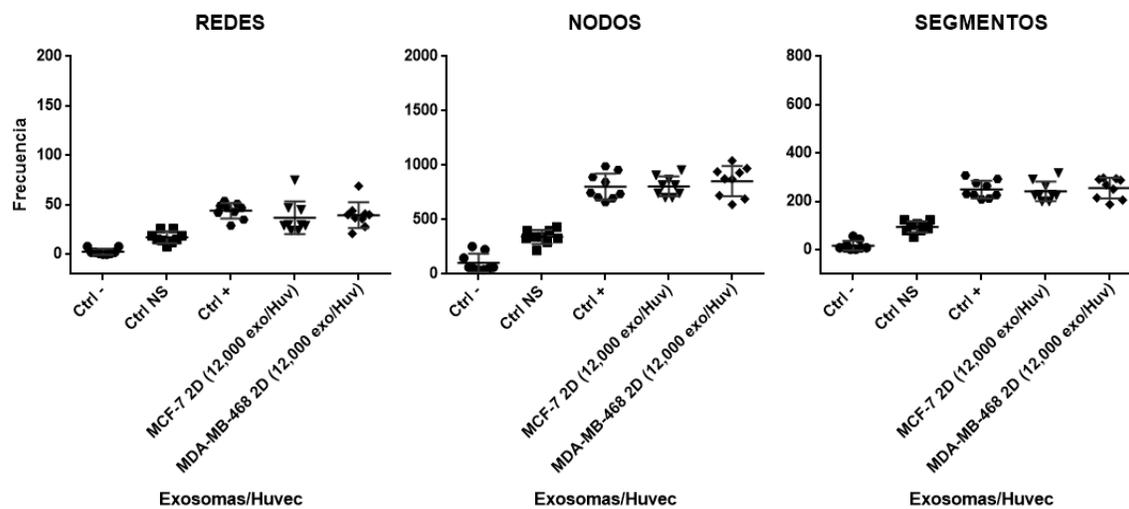
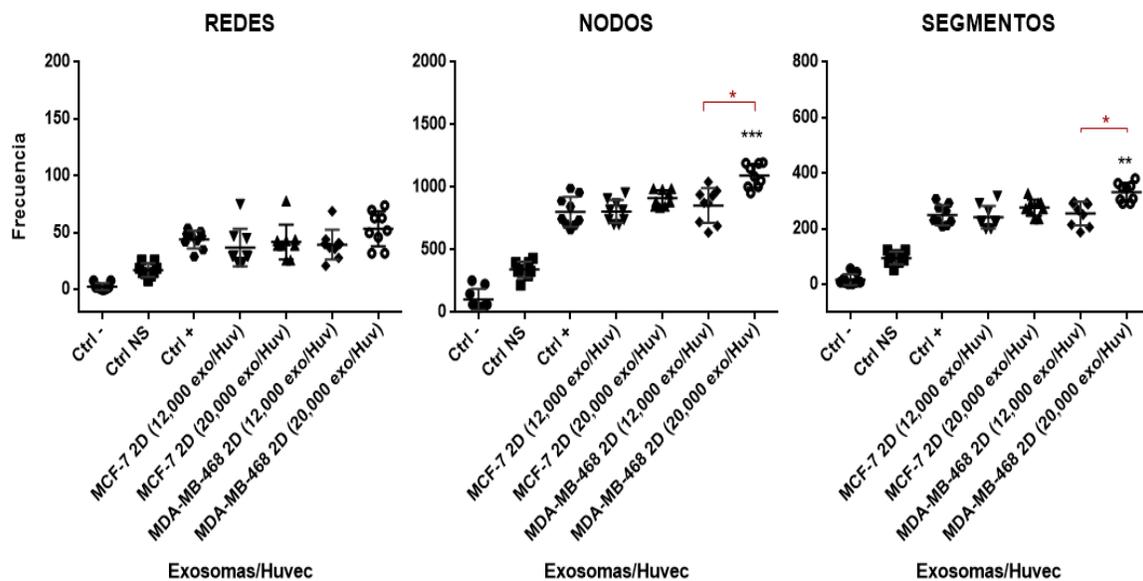


Figura 8. Exosomas de la línea celular MCF-7 y MDA-MB-468 provenientes de cultivos 2D inducen angiogénesis similar al control positivo (FGF). Los exosomas de ambas líneas celulares mostraron efecto inductor en la angiogénesis en la formación de redes, nodos y segmentos. Gráficas de 3 experimentos independientes.

Observamos que los exosomas de CaMa en condiciones de cultivo 2D son capaces de inducir angiogénesis (Figura 8); por lo que se evaluó una dosis mayor (20,000 exosomas por célula endotelial) de exosomas de cultivos 2D, con el objetivo de saber si este efecto es dependiente de la dosis. Los resultados indican un notable aumento en la inducción de vasos cuando la dosis de exosomas tumorales aumenta, incluso es mayor que el control positivo (Figura 9) en nodos y segmentos, no así en la formación de redes. Lo cual sugiere que la angiogénesis inducida por exosomas es una serie de eventos regulados a distintos niveles; sin embargo, la formación de nodos con los exosomas de MDA-MB-648 (20,000 exosomas) son incluso mayores que el control positivo (** $p < 0.001$); y se observa un incremento significativo al incrementar de 12,000 exosomas a 20,000 (* $p < 0.05$, indicado con una barra). Para el caso de exosomas MCF-7 se ve una formación similar al control positivo sin ser significativo, incluso cuando la dosis es aumentada.

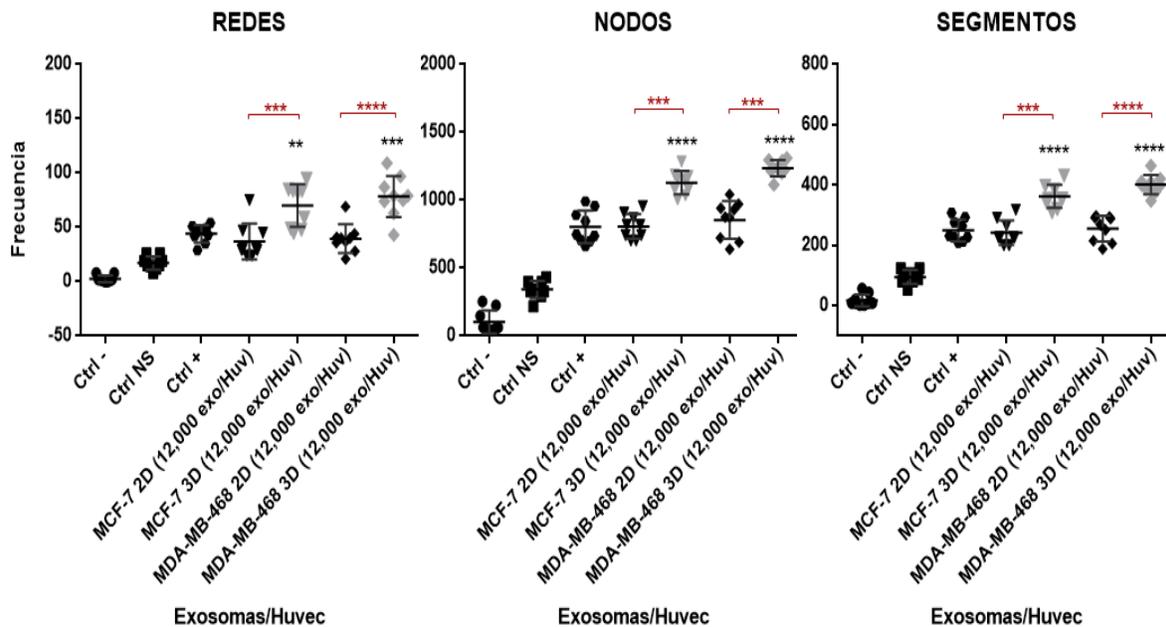
Para el caso de los segmentos mostrado en la figura 9, es evidente que los exosomas de MDA-MB-468 (20,000 exosomas) indujeron una mayor formación de segmentos que el control positivo (** $p < 0.01$), y se observa un incremento significativo al aumentar de 12,000 a 20,000 exosomas MDA-MB-468 (* $p < 0.05$, indicado con una barra). Mientras que los exosomas MCF-7 indujeron un incremento similar al control positivo, sin ser significativo, incluso al incrementarse la dosis. Por lo que estos resultados indican que, al incrementarse la cantidad de exosomas MDA-MB-468 (20 000 exosomas) hay mayor formación de tubos que el control positivo y que exosomas de MCF-7; es decir, el efecto es dependiente de la dosis para los exosomas de MDA-MB-468.



*Figura 9. La formación de tubos endoteliales por exosomas MDA-MB-468 2D es dosis dependiente. Análisis de la formación de nodos, segmentos y redes en presencia de diferentes cantidades de exosomas (12 000 y 20 000 exosomas por célula endotelial) de células MCF-7 y MDA-MB-468 de cultivos en monocapa. El efecto inductor de nodos y segmentos es dependiente de la cantidad de exosomas MDA-MB-468. Gráficas de 3 experimentos independientes. Los asteriscos negros muestran la significancia contra el control positivo, mientras que la barra roja muestra la significancia entre las 2 concentraciones de exosomas de MDA-MB-468 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.*

El cultivo en monocapa es ampliamente utilizado como modelo de estudio de las células tumorales; sin embargo, no asemeja la complejidad de un tumor como lo hacen los cultivos 3D [132, 144, 145, 155]. Por lo tanto, se analizó la angiogénesis inducida por exosomas de CaMa a baja concentración (12 000 exosomas por célula endotelial) derivados de cultivos tridimensionales y el efecto se comparó con exosomas de cultivos en monocapa.

Los resultados en la figura 10 evidencian claramente que los exosomas de cultivos 3D (MCF-7 y MDA-MB-468) inducen mayor angiogénesis que los exosomas de cultivos 2D (*sets de asteriscos rojos*) y que el control positivo (*sets de asteriscos negros*), de acuerdo a la cuantificación de redes, nodos y segmentos. Los exosomas 3D de MCF-7 mostraron un incremento en redes (** $p < 0.01$), nodos (**** $p < 0.0001$) y segmentos (**** $p < 0.0001$) comparados con el control positivo (*sets de asteriscos negros*), mientras que los exosomas 2D no incrementaron significativamente la formación de tubos. De una forma similar, únicamente los exosomas de cultivos 3D de MDA-MB-468 mostraron un incremento significativo en la formación de redes (*** $p < 0.001$), nodos (**** $p < 0.0001$) y segmentos (**** $p < 0.0001$) comparados con el control positivo (*sets de asteriscos negros*) y no así, los exosomas de los cultivos 2D (Figura 10).



*Figura 10. Exosomas de CaMa de cultivos 3D inducen mayor angiogénesis que los exosomas de cultivos 2D. Se evaluó la concentración de 12,000 exosomas por cada célula endotelial provenientes de cultivos 2D y 3D; se observa mayor efecto en la formación de redes, nodos y segmentos por acción de exosomas provenientes de cultivos 3D respecto a exosomas provenientes de cultivos 2D para MCF-7, como MDA-MB-468 (sets de asteriscos y barra roja). Gráficas de 3 experimentos independientes. Los asteriscos negros muestran la significancia contra el control positivo. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.*

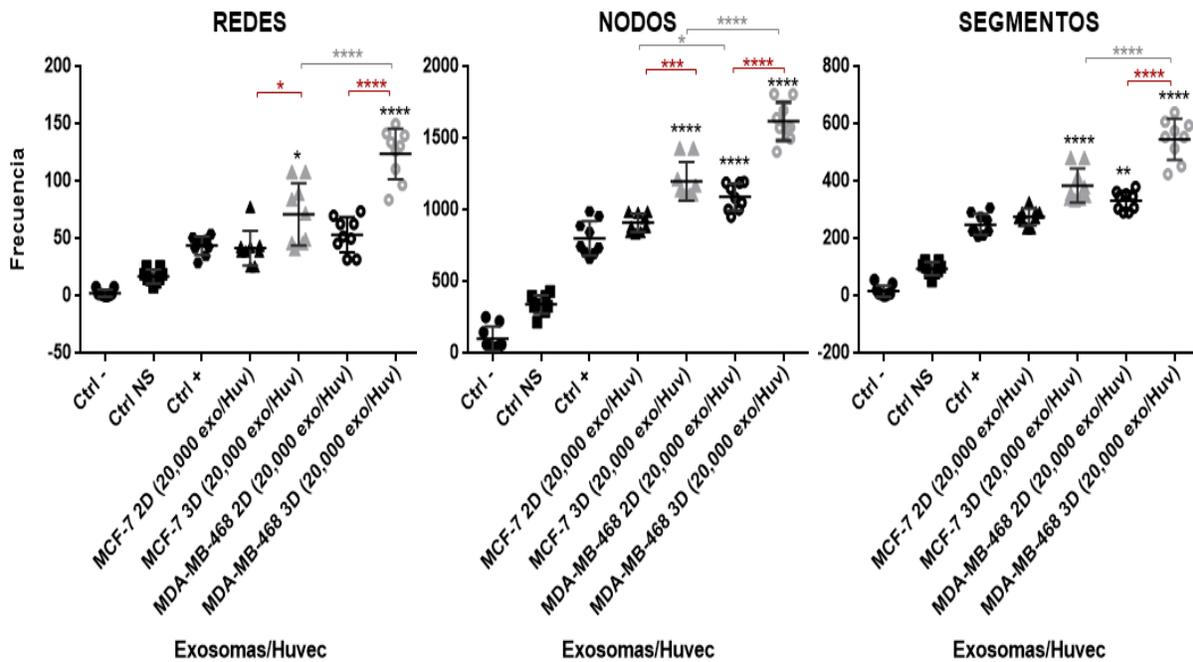
Interesantemente, al comparar el efecto de los exosomas de CaMa derivados de cultivos 2D vs 3D, observamos claramente que los exosomas 3D inducen mayor angiogénesis que los exosomas 2D, tanto para la línea MCF-7 como para la MDA-MB-468 ($***p<0.001$ y $****p<0.0001$, *sets de asteriscos rojos*). Estos datos sugieren que el contenido de los exosomas cambia como consecuencia de las condiciones de cultivo, las células cultivada en condiciones 3D liberan exosomas que tienen un mayor efecto pro-angiogénico, comparado con los exosomas de cultivos 2D.

Finalmente, se evaluó la concentración de 20,000 exosomas por célula endotelial comparando las condiciones de cultivo 2D vs 3D, como se muestra en la figura 11. Los resultados para MCF-7 indican que los exosomas derivados de cultivos 3D inducen mayor formación de redes ($*p<0.05$), nodos ($****p<0.0001$) y segmentos ($****p<0.0001$) comparados con el control positivo (*sets de asteriscos negros*) y no así, los exosomas derivados de cultivos 2D. Para MDA-MB-468, la formación de nodos ($****p<0.0001$) y segmentos ($**p<0.01$) con exosomas 2D fue estadísticamente mayor que el control positivo (*sets de asteriscos negros*); interesantemente, al evaluar los exosomas de cultivos 3D observamos un incremento en al evaluar redes ($****p<0.0001$), nodos ($****p<0.0001$) y segmentos ($****p<0.0001$) comparados con el control positivo (*sets de asteriscos negros*).

Al comparar el efecto de inducción de angiogénesis entre los exosomas de la misma línea celular variando las condiciones de cultivo (*sets de asteriscos y barras rojas*), observamos que la formación de nodos, redes y segmentos fue mayor con los exosomas 3D, para las 2 líneas celulares de CaMa (Figura 11). En el caso de exosomas MCF-7, la formación de redes ($*p<0.05$) y nodos ($***p<0.001$) fue mayor con los exosomas de cultivos 3D; mientras que para MDA-MB-468 la inducción de redes ($****p<0.0001$), nodos ($****p<0.0001$) y segmentos ($****p<0.0001$) fue mayor, comparado con exosomas de cultivos 2D.

Por otro lado, se comparó el efecto de exosomas de la misma condición de cultivo (ya sea 2D o 3D) contra el origen celular (*sets de asteriscos y barras grises*); es decir, el efecto de exosomas 2D de MCF-7 contra MDA-MB-468, y exosomas 3D de MCF-7 contra MDA-MB-468. Los resultados muestran que los exosomas de MDA-MB-468 en condiciones de cultivo 2D, indujo un incremento únicamente en la formación de nodos ($*p<0.05$), comparado con exosomas MCF-7 bajo la misma

condición de cultivo (Figura 11). Mientras que los exosomas de MDA-MB-468 en condiciones de cultivo 3D, indujeron un incremento en la formación de redes ($****p<0.0001$), nodos ($****p<0.0001$) y segmentos ($****p<0.0001$), comparado con exosomas MCF-7 bajo la misma condición de cultivo (Figura 11). Estos datos sugieren que, los exosomas provenientes de cultivos 3D pueden modificar su contenido al incrementar la angiogénesis respecto a exosomas 2D y que, los exosomas de MDA-MB-468 son más eficientes al inducir este efecto angiogénico comparados con los exosomas de MCF-7.



*Figura 11. Exosomas MDA-MB-468 de cultivos 3D inducen mayor angiogénesis que los exosomas de MCF-7. Exosomas tanto de MCF-7 como de MDA-MB-468 inducen angiogénesis por la formación de nodos, redes y segmentos mayor que el control positivo (sets de asteriscos negros). De igual forma, los exosomas de cultivos 3D inducen mayor formación de redes, nodos y segmentos en comparación de exosomas 2D (sets de asteriscos y barras rojas). Sin embargo, exosomas de MDA-MB-68 tienen un mayor efecto en la inducción de angiogénesis de cultivos 3D, que exosomas MCF-7 (sets de asteriscos y barras grises) bajo las mismas condiciones de cultivo. Gráficas de 3 experimentos independientes. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.*

En la figura 12 se muestran imágenes representativas de los resultados reportados anteriormente, evidenciando el efecto de exosomas de CaMa en condiciones de cultivo 2D y 3D en la inducción de angiogénesis. Se muestran fotografías de células endoteliales (Huvec) sin estímulo (NS), el control negativo (Sulforafano) y el control positivo (FGF), y las diferentes condiciones de estudio.

En el efecto de exosomas en la inducción de angiogénesis por exosomas de CaMa, podemos observar que dicha formación es dosis dependiente para ambas líneas celulares. Estos datos sugieren que, los exosomas derivados de cultivos 3D parecen modificar su contenido al potenciarse su efecto en la formación de tubos endoteliales y que, los exosomas de la línea celular MDA-MB-468 muestra un mayor efecto pro-angiogénico vs exosomas de MCF-7.

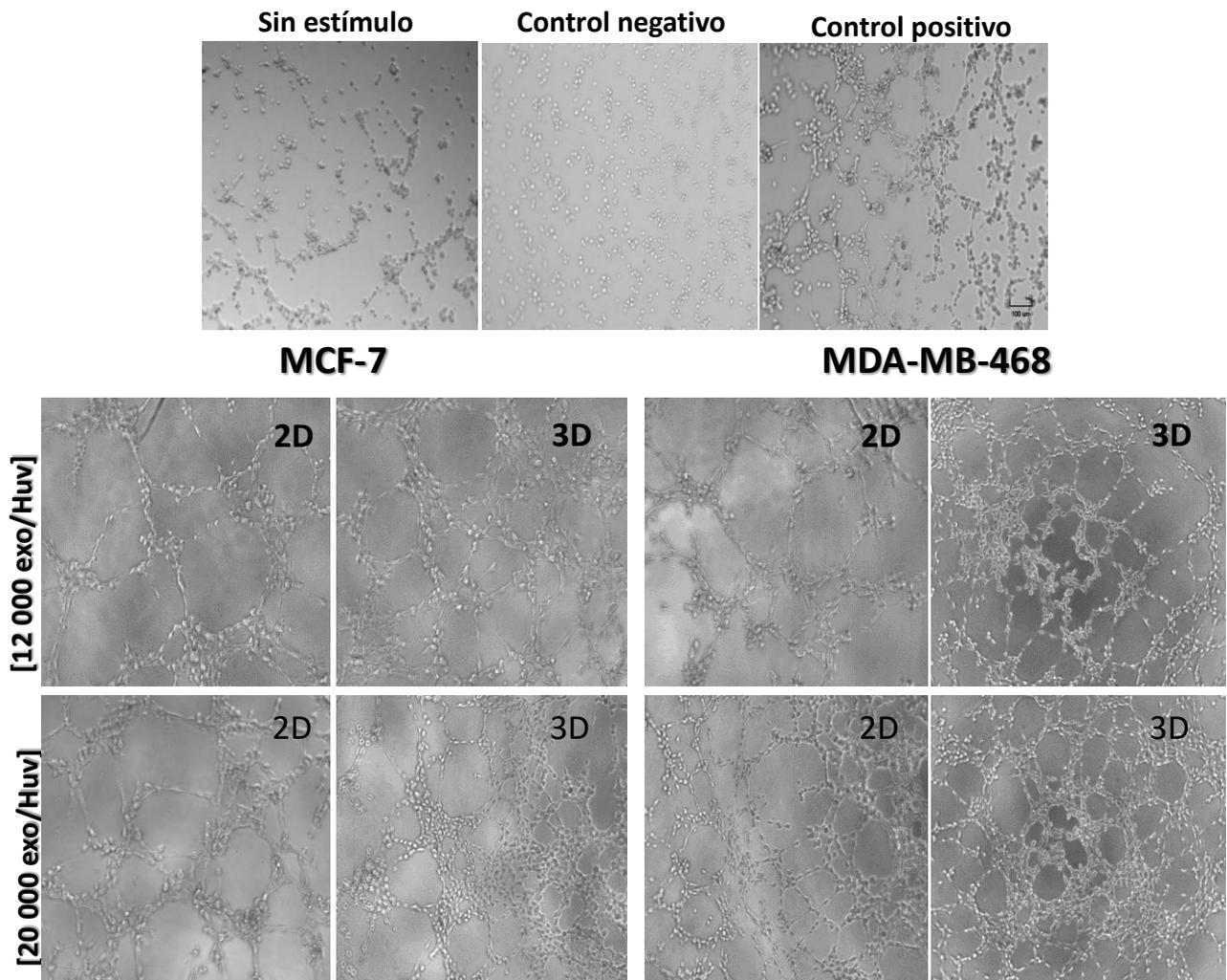


Figura 12. Inducción de angiogénesis por exosomas de CaMa. Formación de tubos en células endoteliales en diversas condiciones: Sin estímulo (NS) únicamente medio F12-K sin SFB, control negativo Sulforafano y control Positivo FGF. Efecto de exosomas de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-468 en condiciones de cultivo 2D y 3D, con 12 000 y 20 000 exosomas por célula endotelial. Fotografías representativas, posterior a las 6hrs de cultivo en presencia o ausencia de exosomas, magnificación 10x. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes.

Cuantificación de exosomas de CaMa obtenidos por columna de exclusión por tamaño

En los ensayos sobre generación y expansión de células Treg, los exosomas de CaMa fueron aislados y purificados mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), debido a la baja concentración y heterogeneidad en los exosomas obtenidos mediante UCF (Figura 5 y 6).

Durante el procedimiento de purificación por cromatografía, se recolectaron 25 fracciones y fueron analizadas por NTA para determinar las fracciones con mayor concentración de exosomas. Para la línea MCF-7 las fracciones 8 a la 11 mostraron mayor número de partículas (Figura 1 complementaria), mientras que para la línea MDA-MB-468 fueron las fracciones 6 a la 9 (Figura 2 complementaria). Una vez seleccionadas las fracciones con mayor concentración de partículas se concentraron y finalmente, se cuantificó la concentración de partículas.

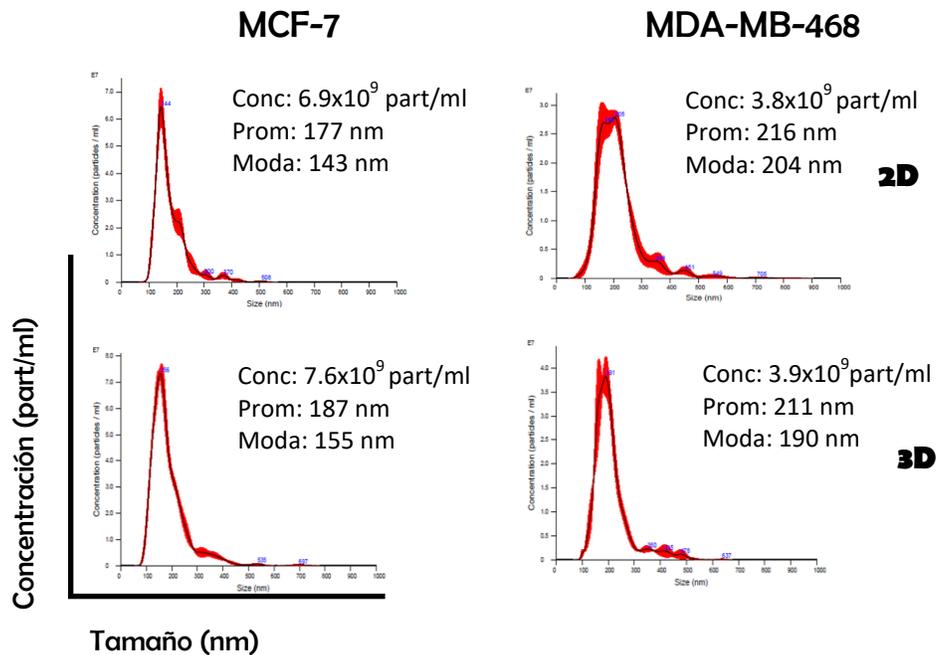


Figura 13. Cuantificación por NTA de la concentración de los exosomas MCF-7 (panel izquierdo) y MDA-MB-468 (panel derecho) en condiciones de cultivo 2D y 3D, purificados mediante SEC. Imágenes representativas de 6 experimentos independientes Dilución 1:200

Para cada condición de cultivo, se comenzó el aislamiento de exosomas a partir de 50 mL, equivalente a aproximadamente 4×10^6 células de cultivos 2D y 2.5×10^6 células de cultivos 3D.

Particularmente, los exosomas provenientes de la línea celular MCF-7 de cultivos adherentes tuvieron una concentración de 6.9×10^9 part/ml y aquellos de cultivos en suspensión 7.6×10^9 part/ml (Figura 13 panel izquierdo). La concentración de exosomas de la línea MDA-MB-468 de cultivos 2D mostraron concentraciones de 3.8×10^9 part/ml, mientras que exosomas de cultivos 3D tuvieron 3.9×10^9 part/ml (Figura 13 panel derecho). En cuanto al tamaño de los exosomas MCF-7 mostraron un tamaño promedio de 177 nm y 187 nm en condiciones 2D y 3D, respectivamente; mientras que exosomas de MDA-MB-468 tuvieron un promedio de 216 nm y 211 nm, respectivamente.

Caracterización de exosomas de CaMa purificados por SEC: MET

Los exosomas de cultivos 2D y 3D de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-468 fueron caracterizados por MET. Se tiñeron con Acetato de Uranilo al 2% para su análisis y se observó una estructura homogénea, tanto en forma como en tamaño en los exosomas de CaMa.

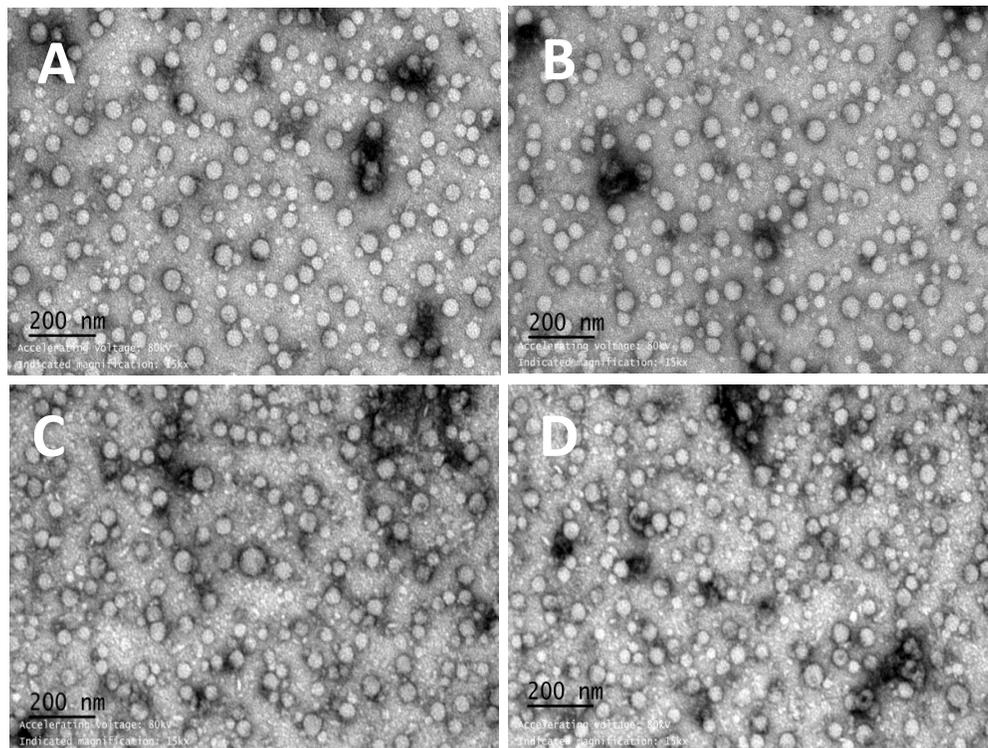


Figura 14. Microscopía Electrónica de Transmisión de exosomas de CaMa, purificados por SEC. A) Exosomas de línea MCF7 en condiciones de cultivo 2D (A) y 3D (B), así como exosomas de la línea celular MDA-MB-468 de cultivos 2D (C) y 3D (D). Teñidos con acetato de uranilo 2%, aumento 15 000X, escala de la barra 200 nm.

Los resultados mostraron que los exosomas de MCF-7 en condiciones de cultivo 2D tienen un tamaño promedio de 62 ± 7 nm (Figura 14-A) y los provenientes de cultivos 3D tuvieron un tamaño de 59 ± 6 nm (Figura 14-B). Mientras que los exosomas de la línea MDA-MB-468 de cultivos 2D y 3D muestran un tamaño promedio de 61 ± 10 nm (Figura 14-C) y 61 ± 14 nm (Figura 14-D) respectivamente. Estos resultados no indican variación en la morfología de los exosomas, en cuanto tamaño y forma debido a las condiciones de cultivo (2D vs 3D), ni tampoco existe una variación aparente conforme al origen celular (MCF-7 vs MDA-MB-468). Estos datos corresponden a la morfología y tamaño (40-100 nm) reportados anteriormente para exosomas tumorales [43].

ENSAYO FUNCIONAL

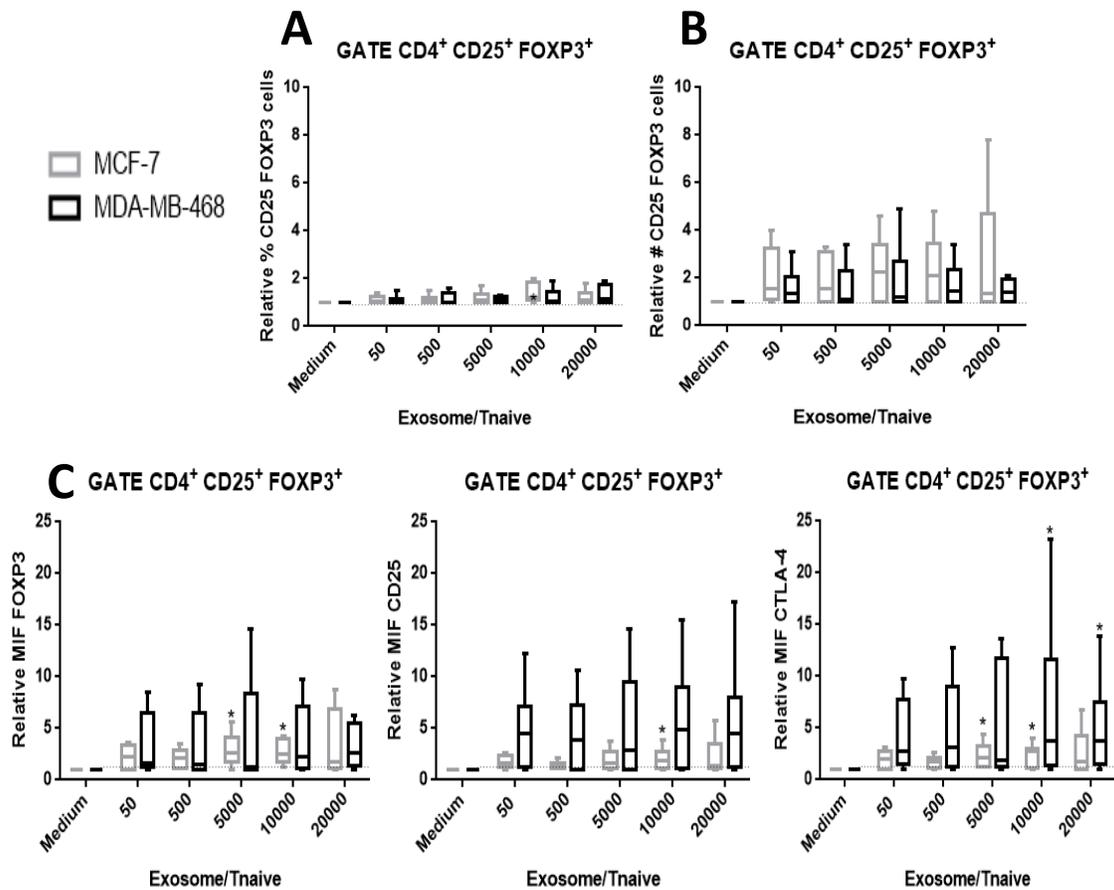
❖ Generación de células Treg por exosomas de CaMa

Otro aspecto funcional necesario de analizar, es el efecto de los exosomas de CaMa en la generación y expansión de células Treg. Se evaluó únicamente el efecto de exosomas 3D, debido a las ventajas de estudio que brinda este modelo, al simular algunas de las condiciones fisiológicas celulares [132, 144, 145, 155] y además, de los resultados obtenidos en este trabajo en donde los exosomas provenientes de cultivos 3D tienen mayor efecto angiogénico en comparación con los exosomas de cultivos 2D. Para dichos ensayos, se utilizaron paquetes leucocitarios de individuos sanos y se sortearon células Tnaive con fenotipo $CD4^+ CD25^- CD45RA^+$ y células Treg con fenotipo $CD4^+ CD25^{HI} CD127^-$ (la estrategia de sorting se muestra en la figura 3 complementaria).

Los resultados sobre la generación y expansión de células Treg por efecto de exosomas de CaMa, así como la evaluación de su capacidad supresora fueron normalizados, para ello los resultados obtenidos se ajustaron respecto a una escala común (Incremento Relativo); dichos valores normalizados permitieron la comparación de resultados por individuo y con ello se procuró disminuir las variaciones de resultados entre los individuos evaluados, debido a factores técnicos.

Se evaluó el efecto de exosomas de CaMa en la generación de células Treg a partir de células Tnaive ($CD4^+ CD25^- CD45RA^+$). Para ello, se pusieron en cultivo 20 000 células Tnaive en presencia o ausencia de exosomas tumorales (50, 500, 5 000, 10 000 y 20 000 exosomas por Tnaive) y se evaluó su fenotipo al día 4. Los resultados respecto al incremento relativo del porcentaje de CD25

y FOXP3 (Figura 15-A), no muestran un cambio significativo en la expresión cuando se administran exosomas de MCF-7 y MDA-MB-468 con concentraciones menores; sin embargo, con las dosis mayores se observa un ligero incremento para ambas líneas celulares. Por otro lado, al analizar la expresión de CD25 y FOXP3 por números totales de células (Figura 15-B), se observa un incremento notorio aunque no significativo cuando se adicionan exosomas tumorales respecto al grupo sin exosomas (medio) para MCF-7 como para MDA-MB-468 en todas las dosis analizadas, sin alguna tendencia.



*Figura 15. Exosomas de CaMa inducen la expresión de FOXP3, CD25 y CTLA-4 en células Tnaive. Se evaluó la expresión de los marcadores CD25 y FOXP3 en porcentaje (A) y por números totales (B) sin encontrar un incremento significativo. Al evaluar la IMF de FOXP3, CD25 y CTLA-4 (C) se observó incrementos significativos respecto al control sin exosomas; sin embargo, no se encontró diferencias entre exosomas de MCF-7 y MDA-MB-468. Gráficas de 6 experimentos independientes. *p<0.05.*

Interesantemente al analizar la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de FOXP3, CD25 y CTLA-4 (Figura 15-C), se observa un incremento cuando se adicionan exosomas de CaMa. La IMF de FOXP3

muestra un incremento visible con todas las dosis de exosomas agregadas, sin embargo, las dosis de 5 000 y 10 000 exosomas de MCF-7 muestran un incremento significativo ($*p<0.05$) respecto al control sin exosomas; mientras que con los exosomas de MDA-MB-468 se observa un incremento (no significativo). La IMF de CD25 se incrementa cuando se adicionan exosomas tumorales (MCF-7 y MDA-MB-468) con las diferentes dosis, únicamente la concentración de 10 000 exosomas de MCF-7 muestran un incremento significativo ($*p<0.05$) respecto al control sin exosomas; con los exosomas de MDA-MB-468 se observa un incremento, sin embargo, no es significativo. Por último, la IMF de CTLA-4 incrementa cuando se adicionan exosomas tanto de MCF-7 como MDA-MB-468, la concentración de 5 000 y 10 000 exosomas de MCF-7 y las dosis de 10 000 y 20 000 exosomas de MDA-MB-468 muestran un incremento significativo ($*p<0.05$) respecto al control sin exosomas.

Estos datos indican que los exosomas de líneas celulares de CaMa incrementan la expresión de marcadores característicos de células Treg; sin embargo, este incremento solo es significativo con la concentración de 5 000 y 10 000 exosomas de MCF-7, y únicamente las dosis mayores de exosomas MDA-MB-468 (10 000 y 20 000) tuvieron impacto en la expresión de CTLA-4.

Posteriormente se analizó el efecto de los exosomas de CaMa en la proliferación de las células Tnaive. Los exosomas de MCF-7 (Figura 16-A) y MDA-MB-468 (Figura 16-B) muestran una ligera disminución en la proliferación comparados con el control sin exosomas, aunque esta diferencia no es significativa.

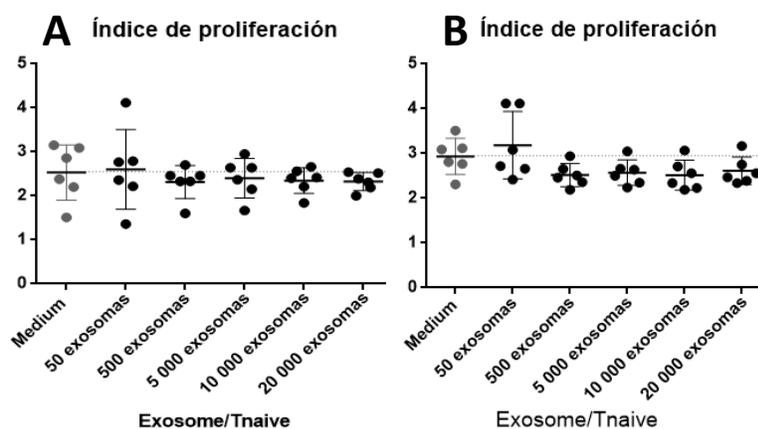


Figura 16. Exosomas tumorales de CaMa no afectan la proliferación de células Tnaive. Exosomas de MCF-7 (A) y MDA-MB-468 (B) no afectan la proliferación respecto al control sin exosomas; sin embargo, se observa una tendencia (no significativa) a disminuir la tasa de proliferación conforme la concentración de exosomas es mayor. Gráficas de 6 experimentos independientes.

❖ Expansión de células Treg por exosomas de CaMa

Para evaluar la capacidad de los exosomas tumorales en la expansión de células Treg, se cultivaron 15 000 células Treg con fenotipo CD4⁺CD25^{HI}CD127⁻, en presencia o ausencia de exosomas tumorales (50, 500, 5 000, 10 000 y 20 000 exosomas por Treg) y se evaluó el fenotipo al día 7. Los resultados del incremento relativo del porcentaje de CD25 y FOXP3 (Figura 17-A) no muestran un cambio en la expresión cuando se administran exosomas de MCF-7 y de MDA-MB-468. Al analizar la expresión de CD25 y FOXP3 por números totales (Figura 17-B) se observa un incremento significativo en las concentraciones de 5 000 ($*p<0.05$), 10 000 ($**p<0.01$) y 20 000 exosomas ($**p<0.01$) para MCF-7 y la concentración de 10 000 ($*p<0.05$) y 20 000 exosomas ($*p<0.05$) de MDA-MB-468, respecto al control sin exosomas.

Interesantemente al analizar la IMF de FOXP3, CD25 y CTLA-4 (Figura 17-C), se observa una tendencia dosis dependiente al incrementar la concentración de exosomas (no significativa). La IMF de FOXP3 se incrementa significativamente con las concentraciones de exosomas 5 000 ($*p<0.05$), 10 000 ($**p<0.01$) y 20 000 ($***p<0.001$) exosomas de MCF-7 y 10 000 ($*p<0.05$) y 20 000 ($**p<0.01$) exosomas de MDA-MB-468. La IMF para CD25 se incrementó con las concentraciones de 5 000 ($**p<0.01$), 10 000 ($**p<0.01$) y 20 000 exosomas MCF-7 ($***p<0.0001$), mientras que para MDA-MB-468 se incrementó significativamente con las concentraciones de 10 000 ($*p<0.01$) y 20 000 ($**p<0.01$); interesantemente, solo la concentración de 5 000 exosomas mostró una diferencia ($*p<0.05$), mostrando un incremento mayor con exosomas MCF-7 comparado con MDA-MB-468. Finalmente la IMF de CTLA-4, muestra resultados similares al incrementarse con las concentraciones mayores 5 000 ($**p<0.01$), 10 000 ($***p<0.001$) y 20 000 ($***p<0.0001$) de exosomas MCF-7 como las concentraciones de 10 000 ($*p<0.05$) y 20 000 ($**p<0.01$) exosomas MDA-MB-468.

Estos resultados muestran que los exosomas de MCF-7 y MDA-MB-468 tienen la capacidad de incrementar y mantener la expresión de las moléculas CD25, FOXP3 y CTLA-4, moléculas características de células Treg y que se relacionan con su capacidad supresora. Este efecto parece ser dependiente de la dosis, ya que se incrementa la expresión con las concentraciones mayores, sin embargo, no hay una diferencia en cuanto a los exosomas de MCF-7 vs MDA-MB-468 (Figura 17).

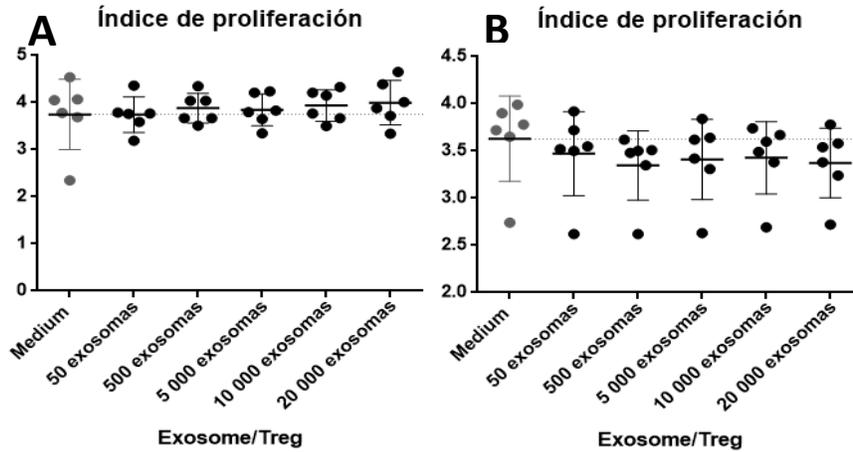


Figura 18. Exosomas de CaMa no afectan la proliferación de células Treg. Los exosomas de MCF-7 (A) no afectan la proliferación de células Treg; sin embargo, los exosomas de MDA-MB-468 (B) tienen tendencia a disminuir la proliferación de células Treg (no significativa). Gráficas de 6 experimentos independientes.

❖ **Inhibición de la proliferación de células Tconv por Treg expandidas con exosomas de CaMa**

Hasta ahora se evidenció que los exosomas de CaMa tienen la capacidad de incrementar marcadores característicos de Treg como CD25 y FOXP3, así como moléculas relacionadas con su función supresora como CTLA-4; por lo que se investigó si los exosomas incrementan la capacidad en las células Treg de inhibir la proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺ autólogas (Tconv). Para ello, las células Treg que fueron expandidas en presencia o ausencia de exosomas de MCF-7 y MDA-MB-468 (Figura 17), se cultivaron con células Tconv en distintas proporciones (1:2, 1:8 y 1:32 (Treg:Tconv)). Al quinto día se evaluó la proliferación de las células Tconv, así como la capacidad supresora de las células Treg en presencia o ausencia de exosomas tumorales.

Los resultados en general, muestran que los exosomas de CaMa (en todas las condiciones) aumentan la capacidad supresora de células Treg al disminuir la proliferación de células Tconv, respecto a la supresión basal (Treg cultivadas en ausencia de exosomas) (Figura 19). Particularmente, las células Treg que estuvieron en presencia de exosomas de la línea celular MCF-7 muestran un incremento en la capacidad supresora en células T CD4⁺ (Figura 19-A, color gris), en la relación de 1:2 (Treg:Tconv) se observa una diferencia significativa en todas las

concentraciones de exosomas (excepto la de 500 exosomas) respecto a las Treg que no tuvieron contacto ($*p<0.05$); por otro lado, en las relaciones de 1:8 y 1:32 solo se observa diferencia significativa con la concentración de 50 exosomas ($*p<0.05$ y $**p<0.01$, respectivamente). Interesantemente, la supresión a hacia las células T CD8⁺ por células Treg cultivadas con exosomas MCF-7 (Figura 19-B, color gris), muestra un incremento en la supresión con las concentraciones de 5 000 ($*p<0.05$), 10 000 ($**p<0.01$) y 20 000 ($**p<0.01$) en la relación de 1:2, curiosamente, la supresión se mantiene con las concentraciones más altas de 500 ($*p<0.05$), 10 000 ($*p<0.05$) y 20 000 ($*p<0.05$) exosomas en las relaciones de 1:8 y 1:32.

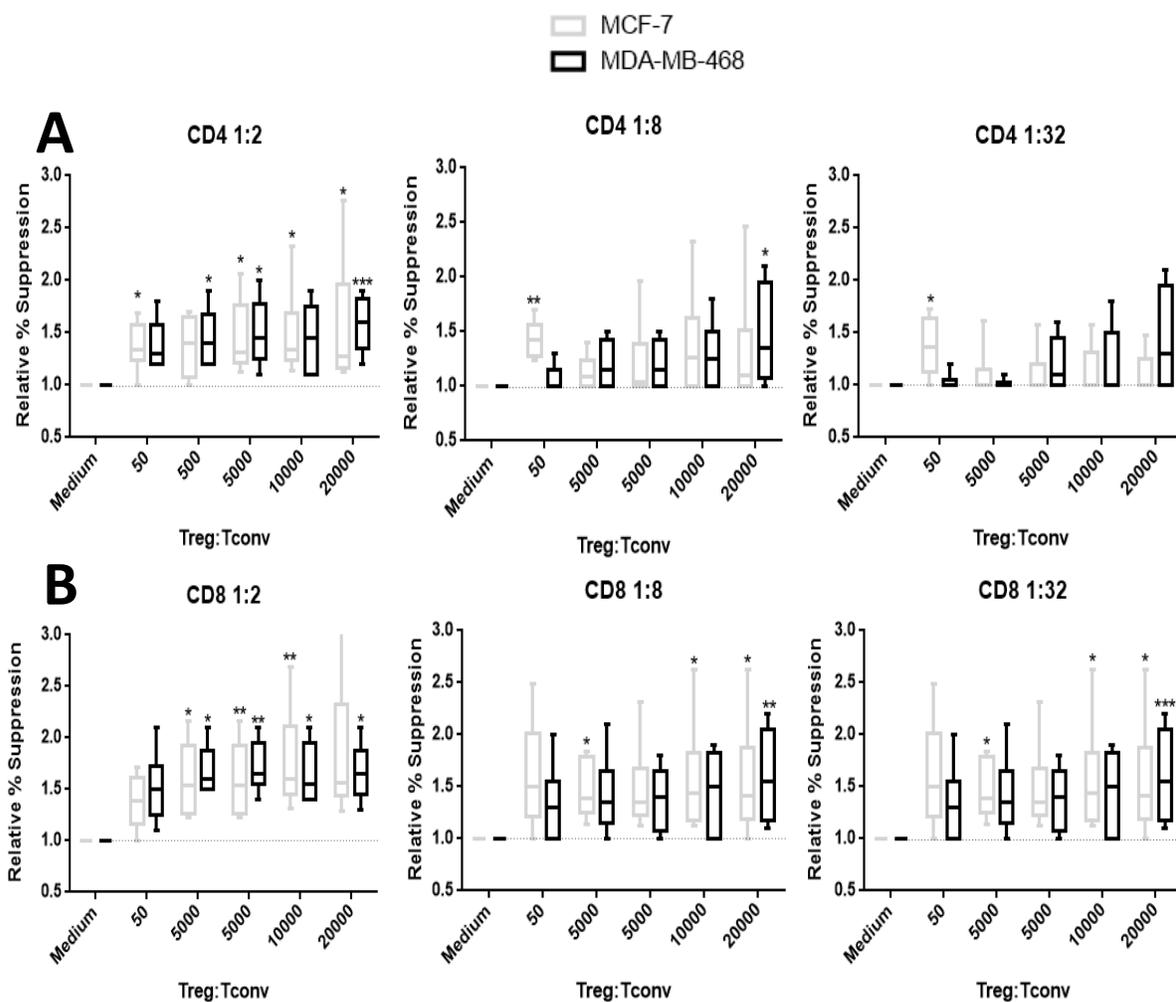


Figura 19. Exosomas de CaMa incrementan la capacidad supresora de células Treg. Las células Treg expandidas en presencia de exosomas de la línea celular MCF-7 y MDA-MB-468 aumentan su capacidad de supresión en células T CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B), al inhibir su proliferación. Graficas de 6 experimentos independientes. $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$.

Los resultados para los exosomas de la línea celular MDA-MB-468, muestran un aumento en la capacidad supresora de las células Treg comparada con la supresión basal (células Treg en ausencia de exosomas). La supresión en células T CD4⁺ (Figura 19-A, color negro) en la relación de 1:2 es significativa con las concentraciones de 500 (* $p < 0.05$), 5 000 (* $p < 0.05$) y 20 000 (** $p < 0.001$) exosomas; esta diferencia se mantiene sólo con la concentración mayor de exosomas en la relación de 1:8 (* $p < 0.05$); mientras que en la relación de 1:32 se pierde, aunque se mantiene una tendencia conforme aumenta la concentración de exosomas (no significativa). Curiosamente, la supresión en células T CD8⁺ (Figura 19-B, color negro) por células Treg se ve incrementada en la relación de 1:2, el incremento es significativo con todas las concentraciones (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$) excepto la menor de 50 exosomas. En las relaciones de 1:8 y 1:32 dicho incremento se mantiene únicamente con la dosis mayor de 20 000 exosomas (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$, respectivamente).

Estos resultados permiten concluir que los exosomas de CaMa tienen efecto en las células Treg al incrementar su capacidad supresora; sugiriendo que ésta capacidad, parecer ser dependiente del contacto ya que en la relación de 1:2, la supresión es mayor en comparación con relaciones mayores (1:8 y 1:32). Sin embargo, no se encontró diferencia significativa sobre el incremento de la capacidad supresora en células Treg por efecto de exosomas MCF-7 o MDA-MB-468.

DISCUSIÓN

Los cultivos celulares adherentes 2D han sido extensamente usados como una herramienta y un modelo de estudio en diversas investigaciones incluyendo aquellas relacionadas con cáncer, proporcionando basta información sobre mecanismos celulares y moleculares [132, 144, 156]. Desafortunadamente, los cultivos celulares en monocapa apenas reflejan el comportamiento de los tumores sólidos, respecto a la heterogeneidad del microambiente y la organización espacial de las células, características que influyen directamente en la malignidad del tumor. En este sentido, los cultivos tridimensionales asemejan algunas de las condiciones fisiológicas relevantes al simular el microambiente, que incluye la generación de un gradiente de nutrientes y oxígeno disponible para las células, que en cáncer juegan un papel esencial en la angiogénesis y la metástasis. Dichos constructos celulares conducen a respuestas individuales, proporcionando mayor agresividad al aumentar la resistencia, migración e invasividad [142, 157].

Los modelos 3D en CaMa se caracterizan por el enriquecimiento de una subpoblación con fenotipo $CD24^{-/low}/CD44^{+}$ que les confiere mayor agresividad y malignidad al tumor [158]. En cuanto a esto, nuestros resultados indican que únicamente la línea celular MCF-7 tuvo la capacidad de mostrar un enriquecimiento celular con fenotipo troncal y no así MDA-MB-468 (Figura 3); además, la línea celular MCF-7 formó esferoides estructurados en comparación con los agregados celulares en forma de racimo de MDA-MB-468 (Figura 2) como se ha reportado anteriormente [147, 159]; a pesar de esto, los esferoides formados por MDA-MB-468 requirieron de tratamiento enzimático para disgregarse, lo cual indica que las células se asociaron íntimamente. Estos datos indican que los marcadores de uso común para CSC no se expresan universalmente en células de CaMa; datos que son respaldados por otros estudios, en los cuales no hay un fenotipo franco $CD24^{-/low}/CD44^{+}$ en los esferoides de esta línea celular [159-164]. Esta discrepancia puede explicarse debido a diferencias técnicas y la manipulación celular, que incluyen la disgregación, la densidad celular a la que se siembran, el día de cosecha y la generación de esferoides (número de pasajes); por lo que, es imperativo entender el enfoque metodológico que varía de un grupo a otro al interpretar los datos publicados. Sin embargo, a este fenotipo se le ha correlacionado con la capacidad de iniciar tumores y con la formación de esferoides (*in vitro*), aunque la determinación de marcadores específicos para CSC aún es controversial [159, 160].

Por otro lado, la heterogeneidad de las CSC en CaMa probablemente refleje la diversidad de eventos oncogénicos, el origen celular y la influencia del microambiente; y por lo tanto, debe ser más relevante centrarse en sus propiedades biológicas [165-167]. Lo que es evidente, es que el cambio en la forma de cultivo (2D y 3D) tiene un impacto en la expresión de distintas moléculas y posiblemente en la expresión diferencial de genes, que resultará en la modificación de las funciones y con esto, en su potencial metastásico e invasivo.

Los exosomas representan un blanco de estudio muy importante en la investigación del cáncer, debido a la capacidad que tienen de inducir diversas respuestas celulares (locales y a distancia) y al papel que desempeñan en la tumorigénesis, mediante la regulación de la angiogénesis, la inmunidad y la metástasis [168]. Es por esto que, el interés principal de este trabajo fue evaluar el efecto de los exosomas de CaMa en procesos fundamentales del cáncer que impulsan su desarrollo y metástasis, como es la inducción de angiogénesis y por otro lado, analizar su papel en la modulación de las células Treg, que potencian la evasión de la respuesta antitumoral. Para lograr este objetivo, inicialmente se eliminó la presencia de exosomas provenientes del SFB y SH, que como se ha descrito anteriormente, podrían cambiar el fenotipo de las células e influir en los resultados experimentales [152, 169, 170]. Nuestros resultados muestran que la UCF elimina la mayor parte de partículas presentes tanto en el SFB como en el SH (Figura 4); sin embargo, no logró eliminarlos completamente, por lo que, se sugiere el uso de suplementos para cultivos celulares desprovistos de microvesículas (como los usados en este estudio para los cultivos 3D) en investigaciones relacionadas con exosomas.

Inicialmente, el aislamiento de exosomas de CaMa se realizó mediante UCF diferencial, que consiste en una serie de ciclos de centrifugación con diferente fuerza centrífuga, en función a la densidad y tamaño de los exosomas [171]. Los resultados obtenidos muestran un aislamiento exitoso al obtener una cantidad de exosomas considerable (Figura 5), esto fue corroborado por MET (Figura 6). Sin embargo, aunque la UCF es considerada como el estándar de oro en el aislamiento de exosomas (debido a que se pueden procesar grandes volúmenes de muestra, tiene bajo costo y no requiere capacitación especializada) tiene desventajas: los exosomas a menudo contienen contaminantes de proteínas y otras microvesículas, tiene menor rendimiento de purificación y debido a la fuerza centrífuga aplicada, los exosomas se dañan y se fusionan entre sí; lo que reduce su vida útil, pudiendo interferir con su análisis [172].

Debido a esta problemática, se han desarrollado alternativas en la purificación de exosomas como la filtración seguida de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La filtración y la SEC permiten el aislamiento de exosomas íntegros como resultado de la baja fuerza de manipulación [171]; en este estudio, se mostró que los exosomas purificados mediante esta técnica se enriquecieron como lo muestra la figura 13 en comparación con la UCF y además, los exosomas mantuvieron intacta su estructura según lo examinado por MET (Figura 14). Por lo que, se sugiere a la filtración seguida de SEC como un método exitoso en el aislamiento de exosomas. Sin embargo, aunque se han logrado grandes avances en el desarrollo de técnicas de aislamiento y cuantificación de exosomas, aún es evidente el desafío que implica su purificación.

Siguiendo con el análisis de exosomas por MET no se encontraron cambios aparentes en su morfología y tamaño, debido a las distintas condiciones de cultivo (2D y 3D) o a su origen celular (MCF-7 y MD-MB-468); sin embargo, algo que podría indicar diferencias en la naturaleza de estas vesículas debido a su origen, son las fracciones en las cuales fueron eluidas durante el aislamiento por SEC (Figuras 1 y 2 complementarias), en el que podría sugerirse que quizás el contenido de ambas vesículas es distinto. No obstante, los datos en cuanto al tamaño y morfología de exosomas por MET concuerdan con lo reportado anteriormente por diversos grupos de investigación [173-178].

La cuantificación de los exosomas se realizó mediante NTA, la cual es una técnica de caracterización que combina las propiedades de la microscopía en la dispersión de la luz y el movimiento browniano para obtener la distribución de tamaño de las partículas (PSD) en una suspensión líquida [179]. Los resultados referentes a la PSD según la técnica de aislamiento (UCF y SEC) no reflejan una diferencia significativa; sin embargo, existe una diferencia en relación a la concentración de exosomas. El método de aislamiento por UCF (Figura 5) mostró una menor cantidad de partículas que la SEC (Figura 13), a pesar de que el volumen inicial de sobrenadante para la UCF fue mayor. Estos datos muestran que la SEC obtiene mayor concentración de exosomas.

Curiosamente se encontró una variación en la PSD al analizarlos mediante MET y NTA; los datos indican una mayor PSD cuando son analizados por NTA y menor con MET. Algunos grupos de investigación han reportado esta discrepancia [180-182]; mencionan que las diferencias

detectadas en la PSD, se deben principalmente al límite mínimo de detección de las diferentes técnicas, es decir, al índice de refracción y al procesamiento de la muestra [183-185]. En el caso específico de NTA el mínimo detectable es de 70 nm, lo que sugiere que la detección de partículas pequeñas podría obstaculizarse por vesículas más grandes (que atribuyen al coeficiente de difusión del medio) dando valores sobreestimados; mientras que el rango mínimo de detección para MET es de 1 nm pudiendo detectar vesículas más pequeñas. Por otro lado, el NTA se “calibra” con perlas de sílice con índices de refracción establecidos (que proporcionan su tamaño), sin embargo, las partículas tienen diversos índices que pudieran llevar a una mala interpretación de datos, al subestimar partículas pequeñas y sobreestimar a las mayores. Por último, también se ha mencionado que la fijación de los exosomas para el análisis en MET, reduce su tamaño al deshidratarlos (cerca del 12%) [181]. En consecuencia, de estas posibles causas se podría explicar la discrepancia en la PSD encontrada en este estudio al analizarse mediante MET y NTA. Sin embargo, un protocolo estandarizado en el aislamiento, identificación y cuantificación de exosomas, podría minimizar la variabilidad e imprecisión asociadas con la técnica.

Actualmente se utilizan distintos métodos para cuantificar exosomas, lo que resulta problemático al realizar comparaciones entre estudios, por lo que existe una creciente necesidad de estandarizar la cuantificación de exosomas y por consiguiente, su dosificación en ensayos funcionales. Un método ampliamente utilizado para dosificar exosomas se realiza mediante la concentración de proteínas (μg); sin embargo, este método tiene limitaciones al proporcionar mediciones inapropiadas (incluye proteínas no exosómicas) [186-188]. Por lo que, en este estudio se dosificó mediante el número de exosomas al cuantificarlo por NTA, debido a que es un método más preciso e incrementa la reproducibilidad de datos.

La angiogénesis está relacionada con la falta de éxito en los tratamientos contra el cáncer, ya que permite el crecimiento tumoral y la invasión a otros órganos [7, 64, 68, 77, 80, 137]. Por ello, en este trabajo de investigación, fue importante analizar el papel de estas vesículas en este proceso tan determinante durante el desarrollo tumoral. Nuestros datos indican que los exosomas de CaMa son capaces de inducir angiogénesis (Figura 8) con un efecto dependiente de la cantidad (Figura 9), sugiriendo que el contenido de los exosomas regula directa o indirectamente la secreción de varios factores pro-angiogénicos que facilitan la migración de células endoteliales para promover la angiogénesis y permitir el crecimiento tumoral.

Uno de los mecanismos que podríamos hipotetizar como responsable de este proceso, es a través del contenido de los exosomas. Reportes previos han demostrado que los exosomas tumorales de células de tejido conectivo, mamario y de ovario, células gliales y plasmáticas, contienen proteínas pro-angiogénicas como VEGF, FGF, EGF, IL-6 e IL-8 [81-83, 85, 86] y proteínas que facilitan la reorganización y degradación de la matriz extracelular como MMP2, 8 y 9 [83, 86]. Por otra parte, la capacidad angiogénica de los exosomas tumorales también puede atribuirse a algunas quimiocinas y sus receptores, se ha reportado que los exosomas tumorales acarrean CXCR4, CXCL8, CCL2, CXCL12 y CXCR7 que participan en procesos como proliferación celular, invasión, migración y supervivencia [189-191]. Estudios han establecido que además de proteínas, algunos micro ARN contenidos en exosomas dirigen la angiogénesis como let7, miR-27b, miR-100, miR-128, miR-130a, miR-132, miR-135b, miR-210, miR-296 y miR-378 [84, 85, 192]; por lo que, es esencial conocer el perfil de expresión génica para explorar la patogénesis del CaMa. El microambiente tumoral podría favorecer la liberación de exosomas en las células tumorales facilitando así, procesos que contribuyen a la invasión y metástasis, como la angiogénesis.

Bajo condiciones de hipoxia, las células tumorales secretan sustancias que modulan el microambiente para promover la angiogénesis y obtener los nutrientes y oxígeno necesarios para su crecimiento [42, 193, 194]. Probablemente debido a la hipoxia que se genera en los cultivos 3D a diferencia de la normoxia que existe en los cultivos 2D, los resultados indicaron que los exosomas derivados de cultivos 3D indujeron significativamente una mayor angiogénesis que los exosomas de cultivos 2D (Figura 10); esto al comparar la influencia que ejercen las condiciones de cultivo (2D vs 3D), sobre la calidad y cantidad de exosomas derivados de células de CaMa. Un posible mecanismo fue descrito por Umezu *et al.*, [84]; en este trabajo sugirieron que los exosomas de mieloma múltiple promueven la actividad angiogénica a través del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α), un factor de transcripción clave que se activa durante la hipoxia y que conduce a la sobreproducción de moléculas angiogénicas tales como VEGF, angiopoyetina-1 y osteopontina, las cuales podrían ser acarreadas también por los exosomas. Hasta ahora, se han descrito algunos micro ARNs en exosomas implicados en la regulación de la señalización de HIF-1 α , como el miR-199a, miR-17-92, miR-20b, miR-23, miR-24, miR-26, miR-107, miR-210 y miR-373 [195-198]. De igual forma, la hipoxia incrementa la expresión de MMP2 y MMP9 en CaMa, que ayuda a degradar la matriz extracelular y promover la metástasis [199]. Por lo que, la molécula HIF-1 α se sitúa como un blanco importante para estudiar en exosomas de CaMa.

Con relación a la hipoxia, King *et al.*, [158] demostraron claramente que esta condición promueve la liberación de exosomas en CaMa, pues al incubar células bajo hipoxia severa (0.1% O₂) por 24 horas o hipoxia moderada (1% de O₂) durante más de 48 h, la cantidad de exosomas aumentó. Nuestros resultados muestran un mecanismo similar, ya que los exosomas provenientes de cultivos 3D influenciados por la hipoxia, liberaron una mayor cantidad exosomas que los provenientes de cultivos 2D (Figura 13); a pesar de tener menor densidad celular. Por lo tanto, es importante tener en consideración que las condiciones de cultivo modifican la liberación de exosomas, así como posiblemente su contenido [200].

Las células tumorales utilizan mecanismos que les permiten sobrevivir en condiciones hipóxicas, lo que conduce a un fenotipo más agresivo que estimula la angiogénesis [156, 201, 202]. El origen celular y las fluctuaciones en los gradientes de los cultivos 3D promueven la heterogeneidad y agresividad del tumor. Nuestros resultados evidencian claramente que el origen celular tiene efecto directo en la inducción de angiogénesis, ya que los exosomas derivados de la línea celular MDA-MB-468 (subtipo molecular triple negativo: RE-, RP- y Her2-), manifestaron un comportamiento más agresivo que el de los exosomas de MCF-7 (luminal A), lo cual podría estar relacionado con su agresividad (Figura 12). Estos resultados concuerdan con los reportados por Yi *et al.*, en donde exosomas derivados de OvCa de alto grado (displasia moderada a severa), tienen un profundo impacto en la angiogénesis en comparación con los exosomas derivados de células de ovario de bajo grado (displasia leve) [85]. Esto sugiere que, además de las condiciones del microambiente, el grado de malignidad de las células parentales influencia directamente sobre la inducción de angiogénesis.

Se sabe que la angiogénesis tumoral está regulada por diversas moléculas, incluidas citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento derivados del microambiente; este mecanismo apoya la progresión del CaMa y la resistencia a la quimioterapia [84]. Los exosomas son mediadores de un mecanismo recientemente descrito en el cual, las células tumorales inducen la angiogénesis [82, 83, 203], al transferir exosomas que reprograman a las células endoteliales favoreciendo el crecimiento tumoral y la metástasis [82, 204, 205]. Por lo tanto, se requieren estudios detallados para comprender cómo los factores contenidos en los exosomas afectan el microambiente y la angiogénesis en CaMa; además de incluir estudios *in vivo* para obtener evidencia sobre el papel de los exosomas en la inducción de angiogénesis.

Otro aspecto necesario a considerar dentro del contexto tumoral, es la inmunovigilancia. Normalmente, el sistema inmune se encarga de mantener bajo control el crecimiento de células “anormales”; sin embargo, en el cáncer esta inmunovigilancia se encuentra alterada o evadida por las células tumorales. Las células Treg normalmente suprimen la activación descontrolada de células efectoras tras una infección y regulan la inflamación para mantener un estado de homeostasis; estas capacidades son utilizadas por las células tumorales. Estudios recientes han identificado algunos mecanismos involucrados en el escape tumoral, en donde los tumores evaden la vigilancia inmune generando un microambiente inmunosupresor que implica la liberación de citocinas como IL-10, TGF- β o VEGF. Por otro lado, el incremento en la frecuencia de células Treg dentro del tumor y en la periferia, está asociado con pronóstico pobre y una menor supervivencia en pacientes con cáncer [105, 111]; sin embargo, los mecanismos involucrados no están bien definidos. Varias publicaciones han revelado que los exosomas tumorales pueden ejercer efectos perjudiciales sobre el sistema inmune, que van desde la apoptosis de células T citotóxicas y el deterioro de la maduración de células dendríticas, hasta conversión *in situ* de células Treg a partir de linfocitos T naive [206].

Los hallazgos reportados en este trabajo con exosomas de CaMa, muestran el incremento en la expresión de las moléculas FOXP3, CD25 y CTLA-4 (IMF) en células Tnaive CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺ (Figura 15-C), particularmente la cantidad de 5 000 y 10 000 exosomas de la línea celular MCF-7. Por su parte, los exosomas de MDA-MB-468 sólo incrementaron la expresión de CTLA-4 en la concentración de 10 000 y 20 000 exosomas. El mecanismo que favorece el incremento de dichas moléculas en células Tnaive aún no es claro. Estudios previos han reportado resultados similares, en donde se incrementó la expresión de CD25 en células T CD4⁺CD25⁻ debido a la presencia de exosomas tumorales. Las moléculas TGF- β 1 e IL-10 mediaron la generación de células T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ ya que al neutralizarlas se inhibió la generación de células Treg, sin embargo, TGF- β 1 parece ser más crítico en este proceso [130, 207, 208]. Este hallazgo es respaldado por reportes que indican que, la generación de iTreg requiere de un microambiente enriquecido en TGF- β [209] y por su parte, la estimulación de linfocitos Tnaive CD4⁺CD25⁻ a través de su TCR en presencia de TGF- β genera una población fenotípicamente similar a nTreg, en cuanto a la expresión de FOXP3, CD25 y CTLA-4 [101]. Además, TGF- β a través de su receptor activa a SMAD3 el cual puede unirse al gen de FOXP3 y en conjunto con otros factores, induce su expresión [210].

Por lo que, un mecanismo similar es aparentemente utilizado por los exosomas para inducir la expresión de FOXP3 y por ende de CD25 y CTLA-4 en células Tnaive. Estos datos sugieren que los exosomas pueden estar relacionados con la modulación en la frecuencia y funciones de Treg [131].

Estudios previos muestran que los exosomas son capaces de estimular a células del sistema inmune, ya que portan moléculas de MHC clase I y II que podrían desempeñar un papel importante en la inducción y expansión de células Treg $CD4^+CD25^{HI}FOXP3^+$. En este sentido, los resultados de este trabajo indican que los exosomas de CaMa tienen la capacidad de incrementar la expresión y frecuencia de moléculas en las células Treg relacionadas con su función supresora como FOXP3, CD25 y CTLA-4, como ha sido reportado anteriormente [130, 131]. El incremento en la expresión de CD25 que se evidencia en la figura 17-C, puede ser consecuencia del incremento previo de FOXP3, que en cooperación con NFAT (activado río debajo de la activación por TCR) regula la expresión de CD25 [211]. La alta expresión de CD25 en células Treg $FOXP3^+$, es esencial para el desarrollo, función y mantenimiento de este linaje celular, ya que regula directamente la estabilidad de la expresión de FOXP3 y la proliferación de éstas células, mediante la vía de STAT5 [212]. De igual forma, en nuestros resultados observamos un incremento en la expresión de CTLA-4 mediado por los exosomas tumorales; este incremento puede ser consecuencia del incremento previo de FOXP3 (Figura 17-C), el cual al interactuar con NFAT incrementa la expresión de CTLA-4 [211, 213]. Cabe mencionar que CTLA-4 es importante para llevar a cabo la función supresora en células Treg, ya que además de regular directamente las funciones en las células Tconv, puede modular las funciones en APC especialmente en células dendríticas, al unirse a sus ligandos CD80/86 que induce la secreción deIDO, enzima que favorece el catabolismo del triptófano a un metabolito tóxico para las Tconv [214].

En este estudio, se usó un modelo para mostrar la capacidad supresora de células Treg expandidas en presencia de exosomas de CaMa sobre linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ (autólogos), donde se evidenció una susceptibilidad a la proliferación (Figura 19). El incremento de la expresión de FOXP3, así como de CD25 y CTLA-4 en células Treg se correlaciona con una mayor capacidad supresora. En este sentido, este estudio mostró que los exosomas de CaMa aumentan la expresión de CD25 en células Treg, lo que podría explicar la inhibición de la proliferación de las células Tconv por privación de IL-2, puesto que las células Treg son muy eficientes al captar la IL-2 del microambiente al expresan altos niveles de CD25 ya que no son capaces de producirla [215].

Por otra parte, el incremento en la capacidad supresora de las células Treg podría deberse al incremento de citocinas supresoras como IL-10 y TGF- β 1. Estudios han reportado que exosomas de OvCa cultivados con células Treg, incrementaron su capacidad supresora al incrementar la secreción de estas citocinas, este mecanismo contribuye a atenuar la respuesta inmune antitumoral en pacientes con cáncer [130], pues se ha demostrado que IL-10 y TGF- β 1 son mediadores clave al limitar la proliferación y producción de citocinas inflamatorias (IFN- γ y TNF- α) en células inmunes críticas para controlar la progresión tumoral; además, de polarizar a células dendríticas hacia fenotipos tolerogénicos [216]. De igual forma, se ha documentado que los exosomas tumorales estimulan la capacidad supresora de las células Treg mediante la citólisis, ya que los exosomas incrementaron la secreción de granzima B y perforina en células Treg responsables de la muerte de células NK y linfocitos T CD8⁺ [131]. Los exosomas podrían estar potenciando la capacidad supresora de las células Treg de varias formas: al incrementar la secreción de citocinas inhibitorias como IL-10 y TGF- β , mediante citólisis al expresar moléculas como perforina y granzima B o mediante disrupción metabólica, al sobreexpresar CD25; sin embargo aún falta estudiar a profundidad los mecanismos específicos que están involucrados en el incremento de la capacidad supresora en células Treg por efecto de exosomas de CaMa.

Los resultados demuestran que la cantidad de exosomas es importante para evidenciar su efecto. Las concentraciones mayores mostraron un mejor resultado en la modulación de células T, que incluyen la generación y expansión de células Treg, así como el incremento en su capacidad supresora. Esto sugiere que al incrementar la cantidad de exosomas probablemente también se incrementa la “carga bioactiva” responsable de dichos efectos observados; por lo que, las propiedades de los exosomas incluido su contenido, reflejan el estímulo que desencadena su formación [200].

En conjunto, nuestros resultados indican que los exosomas de CaMa tienen la capacidad de generar y expandir células Treg, así como potenciar su capacidad supresora. Este mecanismo, representa un importante hallazgo que contribuye a la evasión inmune en el cáncer; ya que las interacciones de exosomas tumorales con células Treg representan un mecanismo de escape inmunológico recientemente definido.

CONCLUSIONES

- ❖ Los exosomas de CaMa tienen un efecto positivo en la inducción de angiogénesis *in vitro* y este efecto es dependiente de la dosis. Asimismo, los exosomas provenientes de cultivos 3D como los de la línea celular MDA-MB-468, tuvieron mayor efecto en la formación de tubos endoteliales.
- ❖ La presencia de exosomas de CaMa (10 000 y 20 000 part/célula endotelial) favorece la expresión de las moléculas FOXP3, CD25 y CTLA-4, en células Tnaive CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺.
- ❖ Las células Treg expandidas en presencia de exosomas de CaMa, incrementan la expresión de moléculas relacionadas con su función supresora (FOXP3, CD25 y CTLA-4); efecto dependiente de la dosis.
- ❖ Los exosomas de CaMa incrementan la capacidad supresora de las células Treg, al inhibir la proliferación de células Tconv.

Nuestros resultados muestran un nuevo mecanismo que apoya la progresión del CaMa, en el que las células tumorales tienen la capacidad de inducir angiogénesis al transferir exosomas que reprograman a las células endoteliales asistiendo el crecimiento tumoral y la metástasis. De igual forma, se evidenció que los exosomas favorecen la expresión de moléculas características de células Treg en células Tnaive; además, tienen la capacidad de expandir células Treg y potencian su capacidad supresora (Figura 20). En conjunto, estos mecanismos representan un importante hallazgo que contribuyen a la evasión inmune y favorecen el crecimiento tumoral, que juntos, conllevan al escape tumoral y finalmente, a la metástasis.

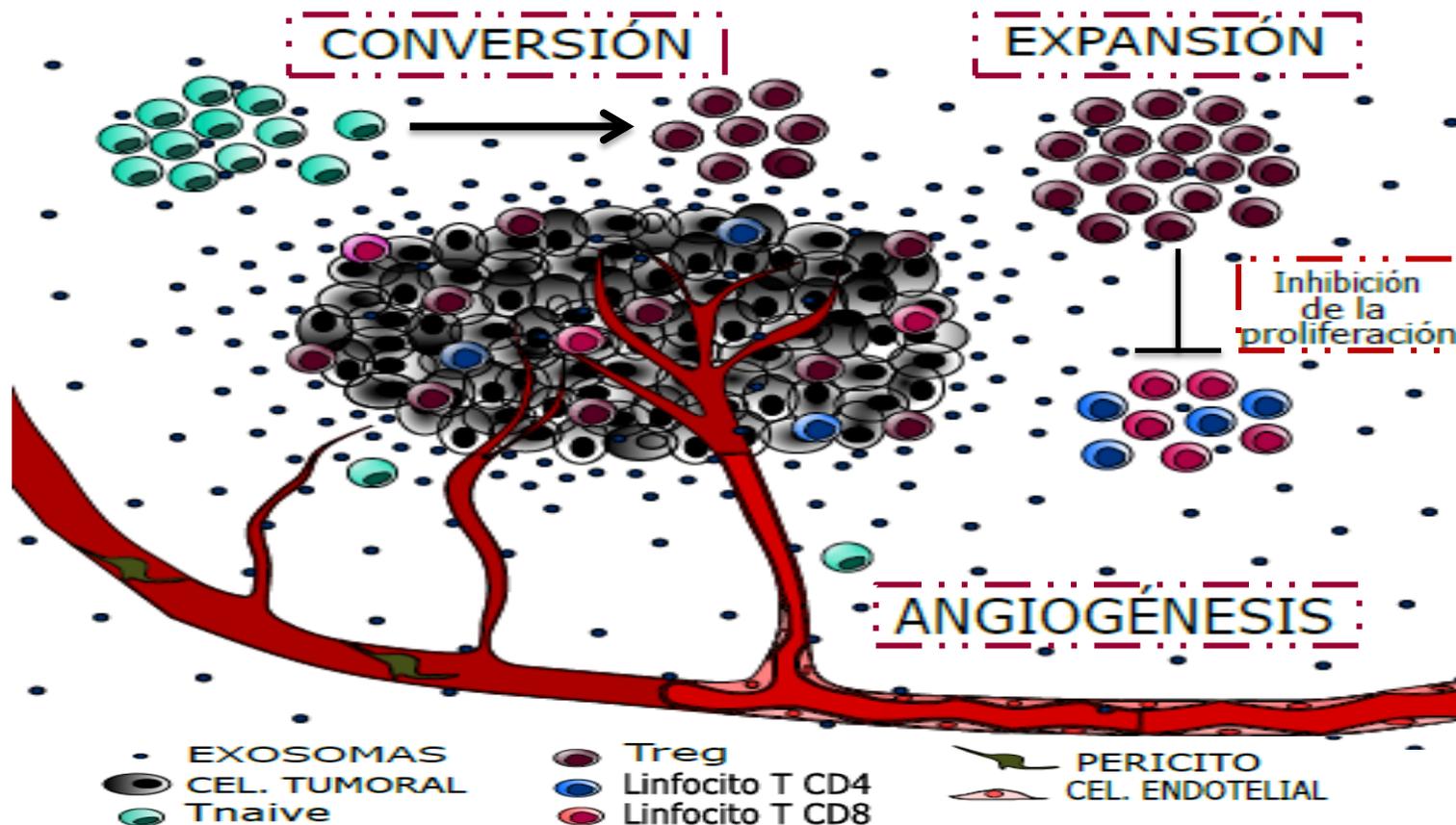


Figura 20. Efectos de exosomas de CaMa en la modulación de células Treg y en la inducción de angiogénesis. Los exosomas de CaMa tienen la capacidad de inducir la expresión de moléculas características de células Treg en linfocitos Tnaive (Conversión); además, expanden a las células Treg e incrementan su capacidad supresora, al inhibir la proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺. De igual forma, potencian la angiogénesis tumoral al reprogramar a las células endoteliales e inducir la formación de tubos. En conjunto, dichos mecanismos favorecen la progresión del cáncer y la metástasis.

PERSPECTIVAS

- ❖ Determinar el contenido molecular de exosomas de CaMa, mediante un perfil genético y proteico.
- ❖ Determinar la presencia o ausencia de moléculas relacionadas con la inducción de angiogénesis (como VEGF, FGF, HIF-1 α); así como en la generación y expansión de células Treg (como TGF- β , miR-15b, miR-16, miR21, miR24, miR-31, miR39, miR-155 y miR-214) en los exosomas de CaMa.
- ❖ Realizar ensayos bloqueando VEGF y HIF-1 α , para proponer mecanismos de inducción de angiogénesis por los exosomas de CaMa; así como de TGF- β y algunos microARN como miR-21y miR-155 para la modulación de células Treg.
- ❖ Analizar la expresión de moléculas relacionadas con la función supresora de células Treg, tales como PD-1, HELIOS, LAG-3, GITR, CD39 y CD73.
- ❖ Realizar ensayos con exosomas de líneas celulares de tejido mamario y determinar su efecto en la modulación de células Treg (generación, expansión y capacidad supresora), así como en la inducción de angiogénesis y compararlos con el efecto de los exosomas de CaMa.
- ❖ Determinar si los exosomas favorecen uno o varios mecanismos de supresión ejercido por las células Treg mediante el análisis de citocinas anti-inflamatorias como IL-10, IL-35 y TGF- β ; así como la producción de moléculas pro-apoptóticas como granzima B y perforina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. (OMS), O.M.d.I.S., *Cáncer de mama: prevención y control*. 2015. **Versión actual 2017**.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
3. Salk, J.J., E.J. Fox, and L.A. Loeb, *Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 51-75.
4. Ciccía, A. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: making it safe to play with knives*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 179-204.
5. Negrini, S., V.G. Gorgoulis, and T.D. Halazonetis, *Genomic instability--an evolving hallmark of cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(3): p. 220-8.
6. Cheng, N., et al., *Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(10): p. 1521-33.
7. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
8. White, E., et al., *Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(2): p. 212-7.
9. Galluzzi, L. and G. Kroemer, *Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis*. Cell, 2008. **135**(7): p. 1161-3.
10. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. **140**(6): p. 883-99.
11. Shields, J.D., et al., *Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21*. Science, 2010. **328**(5979): p. 749-52.
12. Mougiakakos, D., et al., *Regulatory T cells in cancer*. Adv Cancer Res, 2010. **107**: p. 57-117.
13. Ostrand-Rosenberg, S. and P. Sinha, *Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer*. J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4499-506.
14. DeNardo, D.G., P. Andreu, and L.M. Coussens, *Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity*. Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(2): p. 309-16.
15. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
16. Qian, B.Z. and J.W. Pollard, *Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis*. Cell, 2010. **141**(1): p. 39-51.
17. Zumsteg, A. and G. Christofori, *Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumor angiogenesis*. Curr Opin Oncol, 2009. **21**(1): p. 60-70.
18. Murdoch, C., et al., *The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(8): p. 618-31.
19. Talmadge, J.E. and I.J. Fidler, *AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective*. Cancer Res, 2010. **70**(14): p. 5649-69.
20. Kaminska, M., et al., *Breast cancer risk factors*. Prz Menopauzalny, 2015. **14**(3): p. 196-202.
21. Globocan, 2012.
22. Salud, S.d., *Programa Cáncer de la Mujer*. 2015.
23. INEGI, I.N.d.E.y.G., *"ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER"*. 2018.
24. Society, A.C., 2018.
25. Hu, M. and K. Polyak, *Molecular characterisation of the tumour microenvironment in breast cancer*. Eur J Cancer, 2008. **44**(18): p. 2760-5.
26. Visvader, J.E., *Cells of origin in cancer*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 314-22.
27. Cho, R.W. and M.F. Clarke, *Recent advances in cancer stem cells*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(1): p. 48-53.
28. Lobo, N.A., et al., *The biology of cancer stem cells*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 675-99.
29. Dontu, G., et al., *In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells*. Genes Dev, 2003. **17**(10): p. 1253-70.
30. Liu, S., S.G. Clouthier, and M.S. Wicha, *Role of microRNAs in the regulation of breast cancer stem cells*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2012. **17**(1): p. 15-21.
31. Rappa, G. and A. Lorico, *Phenotypic characterization of mammosphere-forming cells from the human MA-11 breast carcinoma cell line*. Exp Cell Res, 2010. **316**(9): p. 1576-86.
32. Lawson, J.C., G.L. Blatch, and A.L. Edkins, *Cancer stem cells in breast cancer and metastasis*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **118**(2): p. 241-54.

33. Rosen, J.M. and C.T. Jordan, *The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm*. *Science*, 2009. **324**(5935): p. 1670-3.
34. Pasquale, E.B., *Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond*. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(3): p. 165-80.
35. Ahmed, Z. and R. Bicknell, *Angiogenic signalling pathways*. *Methods Mol Biol*, 2009. **467**: p. 3-24.
36. Raza, A., M.J. Franklin, and A.Z. Dudek, *Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis*. *Am J Hematol*, 2010. **85**(8): p. 593-8.
37. Rasanen, K. and A. Vaheri, *Activation of fibroblasts in cancer stroma*. *Exp Cell Res*, 2010. **316**(17): p. 2713-22.
38. Lewis, C. and C. Murdoch, *Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies*. *Am J Pathol*, 2005. **167**(3): p. 627-35.
39. Joyce, J.A., et al., *Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis*. *Cancer Cell*, 2004. **5**(5): p. 443-53.
40. Schafer, M. and S. Werner, *Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(8): p. 628-38.
41. Barcellos-Hoff, M.H., D. Lyden, and T.C. Wang, *The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(7): p. 511-8.
42. Quail, D.F. and J.A. Joyce, *Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis*. *Nat Med*, 2013. **19**(11): p. 1423-37.
43. Colombo, M., et al., *Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles*. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 24): p. 5553-65.
44. Klumperman, J. and G. Raposo, *The complex ultrastructure of the endolysosomal system*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014. **6**(10): p. a016857.
45. Mobius, W., et al., *Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O*. *J Histochem Cytochem*, 2002. **50**(1): p. 43-55.
46. Hanson, P.I. and A. Cashikar, *Multivesicular body morphogenesis*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2012. **28**: p. 337-62.
47. Raposo, G. and W. Stoorvogel, *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. *J Cell Biol*, 2013. **200**(4): p. 373-83.
48. Yang, J., et al., *High expression of small GTPase Rab3D promotes cancer progression and metastasis*. *Oncotarget*, 2015. **6**(13): p. 11125-38.
49. Parolini, I., et al., *Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(49): p. 34211-22.
50. Zhang, X., et al., *Exosomes in cancer: small particle, big player*. *J Hematol Oncol*, 2015. **8**: p. 83.
51. Yanez-Mo, M., et al., *Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions*. *J Extracell Vesicles*, 2015. **4**: p. 27066.
52. van Niel, G., et al., *The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis*. *Dev Cell*, 2011. **21**(4): p. 708-21.
53. Hasegawa, H., et al., *Native IL-32 is released from intestinal epithelial cells via a non-classical secretory pathway as a membrane-associated protein*. *Cytokine*, 2011. **53**(1): p. 74-83.
54. Kim, H.K., et al., *Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro*. *Br J Haematol*, 2004. **124**(3): p. 376-84.
55. Chen, T., et al., *Chemokine-containing exosomes are released from heat-stressed tumor cells via lipid raft-dependent pathway and act as efficient tumor vaccine*. *J Immunol*, 2011. **186**(4): p. 2219-28.
56. Gulinelli, S., et al., *IL-18 associates to microvesicles shed from human macrophages by a LPS/TLR-4 independent mechanism in response to P2X receptor stimulation*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(12): p. 3334-45.
57. Llorente, A., B. van Deurs, and K. Sandvig, *Cholesterol regulates prostasome release from secretory lysosomes in PC-3 human prostate cancer cells*. *Eur J Cell Biol*, 2007. **86**(7): p. 405-15.
58. Pilzer, D., et al., *Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer*. *Springer Semin Immunopathol*, 2005. **27**(3): p. 375-87.
59. Thakur, B.K., et al., *Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection*. *Cell Res*, 2014. **24**(6): p. 766-9.
60. Waldenstrom, A., et al., *Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e34653.
61. Katzmann, D.J., G. Odorizzi, and S.D. Emr, *Receptor downregulation and multivesicular-body sorting*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(12): p. 893-905.
62. Keller, S., et al., *Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function*. *Immunol Lett*, 2006. **107**(2): p. 102-8.
63. Steinbichler, T.B., et al., *The role of exosomes in cancer metastasis*. *Semin Cancer Biol*, 2017. **44**: p. 170-181.
64. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. *Nature*, 2011. **473**(7347): p. 298-307.

65. Potente, M., H. Gerhardt, and P. Carmeliet, *Basic and therapeutic aspects of angiogenesis*. Cell, 2011. **146**(6): p. 873-87.
66. Coultas, L., K. Chawengsaksophak, and J. Rossant, *Endothelial cells and VEGF in vascular development*. Nature, 2005. **438**(7070): p. 937-45.
67. Bouis, D., et al., *A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention*. Pharmacol Res, 2006. **53**(2): p. 89-103.
68. Chung, A.S., J. Lee, and N. Ferrara, *Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(7): p. 505-14.
69. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-95.
70. Yancopoulos, G.D., et al., *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 242-8.
71. Ribatti, D., B. Nico, and E. Crivellato, *The development of the vascular system: a historical overview*. Methods Mol Biol, 2015. **1214**: p. 1-14.
72. Yang, Y., et al., *HIFs, angiogenesis, and cancer*. J Cell Biochem, 2013. **114**(5): p. 967-74.
73. Fraisl, P., et al., *Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism*. Dev Cell, 2009. **16**(2): p. 167-79.
74. Kieran, M.W., R. Kalluri, and Y.J. Cho, *The VEGF pathway in cancer and disease: responses, resistance, and the path forward*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(12): p. a006593.
75. Hicklin, D.J. and L.M. Ellis, *Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis*. J Clin Oncol, 2005. **23**(5): p. 1011-27.
76. Hida, K., et al., *Tumor angiogenesis--characteristics of tumor endothelial cells*. Int J Clin Oncol, 2016. **21**(2): p. 206-212.
77. Fouad, Y.A. and C. Aanei, *Revisiting the hallmarks of cancer*. Am J Cancer Res, 2017. **7**(5): p. 1016-1036.
78. Folkman, J., *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis*. Semin Oncol, 2002. **29**(6 Suppl 16): p. 15-8.
79. Chung, A.S. and N. Ferrara, *Developmental and pathological angiogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2011. **27**: p. 563-84.
80. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
81. Kim, C.W., et al., *Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin*. Cancer Res, 2002. **62**(21): p. 6312-7.
82. Skog, J., et al., *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(12): p. 1470-6.
83. Kucharczyk, P., et al., *Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(18): p. 7312-7.
84. Umezu, T., et al., *Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1*. Blood, 2014. **124**(25): p. 3748-57.
85. Yi, H., et al., *High-grade ovarian cancer secreting effective exosomes in tumor angiogenesis*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(5): p. 5062-70.
86. Maji, S., et al., *Exosomal Annexin II Promotes Angiogenesis and Breast Cancer Metastasis*. Mol Cancer Res, 2017. **15**(1): p. 93-105.
87. Burnet, M., *Cancer; a biological approach. I. The processes of control*. Br Med J, 1957. **1**(5022): p. 779-86.
88. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
89. Mittal, D., et al., *New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape*. Curr Opin Immunol, 2014. **27**: p. 16-25.
90. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 137-48.
91. Girardi, M., et al., *Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells*. Science, 2001. **294**(5542): p. 605-9.
92. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. Science, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
93. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 329-60.
94. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 235-71.
95. Kim, J.M., J.P. Rasmussen, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice*. Nat Immunol, 2007. **8**(2): p. 191-7.
96. Lahl, K., et al., *Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 57-63.
97. Sakaguchi, S., et al., *FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(7): p. 490-500.

98. Campbell, D.J. and M.A. Koch, *Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(2): p. 119-30.
99. Samstein, R.M., et al., *Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification*. Cell, 2012. **151**(1): p. 153-66.
100. Huehn, J., J.K. Polansky, and A. Hamann, *Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage?* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(2): p. 83-9.
101. Bilate, A.M. and J.J. Lafaille, *Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 733-58.
102. Wieczorek, G., et al., *Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue*. Cancer Res, 2009. **69**(2): p. 599-608.
103. Woo, E.Y., et al., *Regulatory CD4(+)/CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4766-72.
104. Sato, E., et al., *Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18538-43.
105. Curiel, T.J., et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. Nat Med, 2004. **10**(9): p. 942-9.
106. Bates, G.J., et al., *Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse*. J Clin Oncol, 2006. **24**(34): p. 5373-80.
107. Sasada, T., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression*. Cancer, 2003. **98**(5): p. 1089-99.
108. Zou, W., *Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 295-307.
109. Jacobs, J.F., et al., *Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy?* Lancet Oncol, 2012. **13**(1): p. e32-42.
110. Ormandy, L.A., et al., *Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma*. Cancer Res, 2005. **65**(6): p. 2457-64.
111. Wolf, A.M., et al., *Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(2): p. 606-12.
112. Wolf, D., et al., *Treg(s) in Cancer: Friends or Foe?* J Cell Physiol, 2015. **230**(11): p. 2598-605.
113. Gray, C.P., P. Arosio, and P. Hersey, *Association of increased levels of heavy-chain ferritin with increased CD4+CD25+ regulatory T-cell levels in patients with melanoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(7): p. 2551-9.
114. Beyer, M., et al., *Comparative approach to define increased regulatory T cells in different cancer subtypes by combined assessment of CD127 and FOXP3*. Clin Dev Immunol, 2011. **2011**: p. 734036.
115. Beyer, M. and J.L. Schultze, *Regulatory T cells in cancer*. Blood, 2006. **108**(3): p. 804-11.
116. Nizar, S., et al., *T regulatory cells, the evolution of targeted immunotherapy*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1806**(1): p. 7-17.
117. Liu, V.C., et al., *Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2883-92.
118. Valzasina, B., et al., *Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation independent*. Cancer Res, 2006. **66**(8): p. 4488-95.
119. Ishida, T., et al., *Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege*. Cancer Res, 2006. **66**(11): p. 5716-22.
120. Wei, S., I. Kryczek, and W. Zou, *Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking*. Blood, 2006. **108**(2): p. 426-31.
121. Ghiringhelli, F., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner*. J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1075-85.
122. Ghiringhelli, F., et al., *Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation*. J Exp Med, 2005. **202**(7): p. 919-29.
123. Facciabene, A., et al., *Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells*. Nature, 2011. **475**(7355): p. 226-30.
124. Munn, D.H. and A.L. Mellor, *Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1147-54.
125. Fourcade, J., et al., *Human tumor antigen-specific helper and regulatory T cells share common epitope specificity but exhibit distinct T cell repertoire*. J Immunol, 2010. **184**(12): p. 6709-18.
126. Wang, H.Y., et al., *Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy*. Immunity, 2004. **20**(1): p. 107-18.
127. Francois, V., et al., *The CD4(+) T-cell response of melanoma patients to a MAGE-A3 peptide vaccine involves potential regulatory T cells*. Cancer Res, 2009. **69**(10): p. 4335-45.

128. Fehervari, Z. and S. Sakaguchi, *CD4+ regulatory cells as a potential immunotherapy*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005. **360**(1461): p. 1647-61.
129. Wieckowski, E.U., et al., *Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8+ T lymphocytes*. J Immunol, 2009. **183**(6): p. 3720-30.
130. Szajnik, M., et al., *Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg)*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11469.
131. Mrizak, D., et al., *Effect of nasopharyngeal carcinoma-derived exosomes on human regulatory T cells*. J Natl Cancer Inst, 2015. **107**(1): p. 363.
132. Baker, B.M. and C.S. Chen, *Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 13): p. 3015-24.
133. McBeath, R., et al., *Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment*. Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 483-95.
134. Thomas, C.H., et al., *Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 1972-7.
135. Weaver, V.M., et al., *beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium*. Cancer Cell, 2002. **2**(3): p. 205-16.
136. Kay, R.R., et al., *Changing directions in the study of chemotaxis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(6): p. 455-63.
137. Otrick, Z.K., et al., *Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms*. Blood Cells Mol Dis, 2007. **39**(2): p. 212-20.
138. Adams, R.H. and K. Alitalo, *Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(6): p. 464-78.
139. Bollenbach, T., et al., *Precision of the Dpp gradient*. Development, 2008. **135**(6): p. 1137-46.
140. Petersen, O.W., et al., *Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(19): p. 9064-8.
141. Emerman, J.T. and D.R. Pitelka, *Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes*. In Vitro, 1977. **13**(5): p. 316-28.
142. Folkman, J. and C. Haudenschild, *Angiogenesis in vitro*. Nature, 1980. **288**(5791): p. 551-6.
143. Edmondson, R., et al., *Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors*. Assay Drug Dev Technol, 2014. **12**(4): p. 207-18.
144. Duval, K., et al., *Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture*. Physiology (Bethesda), 2017. **32**(4): p. 266-277.
145. Ponti, D., et al., *Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties*. Cancer Res, 2005. **65**(13): p. 5506-11.
146. Lee, G.Y., et al., *Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells*. Nat Methods, 2007. **4**(4): p. 359-65.
147. Rappa, G., et al., *Growth of cancer cell lines under stem cell-like conditions has the potential to unveil therapeutic targets*. Exp Cell Res, 2008. **314**(10): p. 2110-22.
148. Baumann, P., et al., *CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis*. Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 10783-93.
149. Aigner, S., et al., *CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin*. FASEB J, 1998. **12**(12): p. 1241-51.
150. Senner, V., et al., *CD24 promotes invasion of glioma cells in vivo*. J Neuropathol Exp Neurol, 1999. **58**(8): p. 795-802.
151. Senbanjo, L.T. and M.A. Chellaiah, *CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells*. Front Cell Dev Biol, 2017. **5**: p. 18.
152. Shelke, G.V., et al., *Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**.
153. DeCicco-Skinner, K.L., et al., *Endothelial cell tube formation assay for the in vitro study of angiogenesis*. J Vis Exp, 2014(91): p. e51312.
154. Guidolin, D., et al., *Investigating in vitro angiogenesis by computer-assisted image analysis and computational simulation*. Methods Mol Biol, 2015. **1214**: p. 197-214.
155. Hirschhaeuser, F., et al., *Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again*. J Biotechnol, 2010. **148**(1): p. 3-15.
156. Wan, L., et al., *Mimicking Embedded Vasculature Structure for 3D Cancer on a Chip Approaches through Micromilling*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 16724.
157. Eccles, S.A., *Targeting key steps in metastatic tumour progression*. Curr Opin Genet Dev, 2005. **15**(1): p. 77-86.

158. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
159. Liu, Y., et al., *Lack of correlation of stem cell markers in breast cancer stem cells*. Br J Cancer, 2014. **110**(8): p. 2063-71.
160. Grimshaw, M.J., et al., *Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(3): p. R52.
161. Sheridan, C., et al., *CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(5): p. R59.
162. Wright, M.H., et al., *Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(1): p. R10.
163. Hwang-Verslues, W.W., et al., *Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8377.
164. Park, S.Y., et al., *Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(3): p. 876-87.
165. He, K., T. Xu, and A. Goldkorn, *Cancer cells cyclically lose and regain drug-resistant highly tumorigenic features characteristic of a cancer stem-like phenotype*. Mol Cancer Ther, 2011. **10**(6): p. 938-48.
166. Scheel, C., et al., *Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast*. Cell, 2011. **145**(6): p. 926-40.
167. Chaffer, C.L., et al., *Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity*. Cell, 2013. **154**(1): p. 61-74.
168. Milane, L., et al., *Exosome mediated communication within the tumor microenvironment*. J Control Release, 2015. **219**: p. 278-294.
169. Ochieng, J., et al., *Anchorage-independent growth of breast carcinoma cells is mediated by serum exosomes*. Exp Cell Res, 2009. **315**(11): p. 1875-88.
170. Lehrich, B.M., et al., *Fetal Bovine Serum-Derived Extracellular Vesicles Persist within Vesicle-Depleted Culture Media*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(11).
171. Li, P., et al., *Progress in Exosome Isolation Techniques*. Theranostics, 2017. **7**(3): p. 789-804.
172. Jeppesen, D.K., et al., *Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**: p. 25011.
173. Brase, J.C., et al., *Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 306.
174. Brownlee, Z., et al., *A novel "salting-out" procedure for the isolation of tumor-derived exosomes*. J Immunol Methods, 2014. **407**: p. 120-6.
175. Cocucci, E. and J. Meldolesi, *Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(6): p. 364-72.
176. Kumar, D., et al., *Biomolecular characterization of exosomes released from cancer stem cells: Possible implications for biomarker and treatment of cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(5): p. 3280-91.
177. Kruger, S., et al., *Molecular characterization of exosome-like vesicles from breast cancer cells*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 44.
178. Melo, S.A., et al., *Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis*. Cancer Cell, 2014. **26**(5): p. 707-21.
179. Filipe, V., A. Hawe, and W. Jiskoot, *Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates*. Pharm Res, 2010. **27**(5): p. 796-810.
180. Mehdiani, A., et al., *An innovative method for exosome quantification and size measurement*. J Vis Exp, 2015(95): p. 50974.
181. van der Pol, E., et al., *Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing*. J Thromb Haemost, 2014. **12**(7): p. 1182-92.
182. Vestad, B., et al., *Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis: a variation study*. J Extracell Vesicles, 2017. **6**(1): p. 1344087.
183. Gardiner, C., et al., *Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis*. J Extracell Vesicles, 2013. **2**.
184. van der Pol, E., et al., *Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(12): p. 2596-607.
185. van der Pol, E., et al., *Innovation in detection of microparticles and exosomes*. J Thromb Haemost, 2013. **11 Suppl 1**: p. 36-45.
186. Akers, J.C., et al., *Comparative Analysis of Technologies for Quantifying Extracellular Vesicles (EVs) in Clinical Cerebrospinal Fluids (CSF)*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0149866.
187. Koritzinsky, E.H., et al., *Quantification of Exosomes*. J Cell Physiol, 2017. **232**(7): p. 1587-1590.

188. Rupert, D.L.M., et al., *Methods for the physical characterization and quantification of extracellular vesicles in biological samples*. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2017. **1861**(1 Pt A): p. 3164-3179.
189. Nagarsheth, N., M.S. Wicha, and W. Zou, *Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(9): p. 559-572.
190. Gonzalez, E., et al., *Human mammospheres secrete hormone-regulated active extracellular vesicles*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e83955.
191. Taverna, S., et al., *Role of exosomes released by chronic myelogenous leukemia cells in angiogenesis*. Int J Cancer, 2012. **130**(9): p. 2033-43.
192. Yin, R., et al., *The Pleiotropic Effects of miRNAs on Tumor Angiogenesis*. J Cell Biochem, 2015. **116**(9): p. 1807-15.
193. Mizukami, Y., Y. Kohgo, and D.C. Chung, *Hypoxia inducible factor-1 independent pathways in tumor angiogenesis*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(19): p. 5670-4.
194. Tonini, T., F. Rossi, and P.P. Claudio, *Molecular basis of angiogenesis and cancer*. Oncogene, 2003. **22**(42): p. 6549-56.
195. Kulshreshtha, R., et al., *A microRNA signature of hypoxia*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(5): p. 1859-67.
196. Huang, X., Q.T. Le, and A.J. Giaccia, *MIR-210--micromanager of the hypoxia pathway*. Trends Mol Med, 2010. **16**(5): p. 230-7.
197. Hua, Z., et al., *MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia*. PLoS One, 2006. **1**: p. e116.
198. Tadokoro, H., et al., *Exosomes derived from hypoxic leukemia cells enhance tube formation in endothelial cells*. J Biol Chem, 2013. **288**(48): p. 34343-51.
199. Park, J.E., et al., *Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(6): p. 1085-99.
200. de Jong, O.G., et al., *Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes*. J Extracell Vesicles, 2012. **1**.
201. Goel, H.L. and A.M. Mercurio, *VEGF targets the tumour cell*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(12): p. 871-82.
202. Krock, B.L., N. Skuli, and M.C. Simon, *Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil*. Genes Cancer, 2011. **2**(12): p. 1117-33.
203. Chan, Y.K., et al., *Proteomic analysis of exosomes from nasopharyngeal carcinoma cell identifies intercellular transfer of angiogenic proteins*. Int J Cancer, 2015. **137**(8): p. 1830-41.
204. Ludwig, N., et al., *Exosomes from HNSCC Promote Angiogenesis through Reprogramming of Endothelial Cells*. Mol Cancer Res, 2018.
205. Ohyashiki, J.H., T. Umezumi, and K. Ohyashiki, *Exosomes promote bone marrow angiogenesis in hematologic neoplasia: the role of hypoxia*. Curr Opin Hematol, 2016. **23**(3): p. 268-73.
206. Chaput, N. and C. Thery, *Exosomes: immune properties and potential clinical implementations*. Semin Immunopathol, 2011. **33**(5): p. 419-40.
207. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
208. Peng, Y., et al., *TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(13): p. 4572-7.
209. Wang, G.J., et al., *Thymus exosomes-like particles induce regulatory T cells*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5242-8.
210. Huehn, J. and M. Beyer, *Epigenetic and transcriptional control of Foxp3+ regulatory T cells*. Semin Immunol, 2015. **27**(1): p. 10-8.
211. Wu, Y., et al., *FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT*. Cell, 2006. **126**(2): p. 375-87.
212. Mahmud, S.A., L.S. Manlove, and M.A. Farrar, *Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function*. JAKSTAT, 2013. **2**(1): p. e23154.
213. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
214. Grohmann, U., et al., *CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 1097-101.
215. Pandiyan, P., et al., *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1353-62.
216. Facciabene, A., G.T. Motz, and G. Coukos, *T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis*. Cancer Res, 2012. **72**(9): p. 2162-71.

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

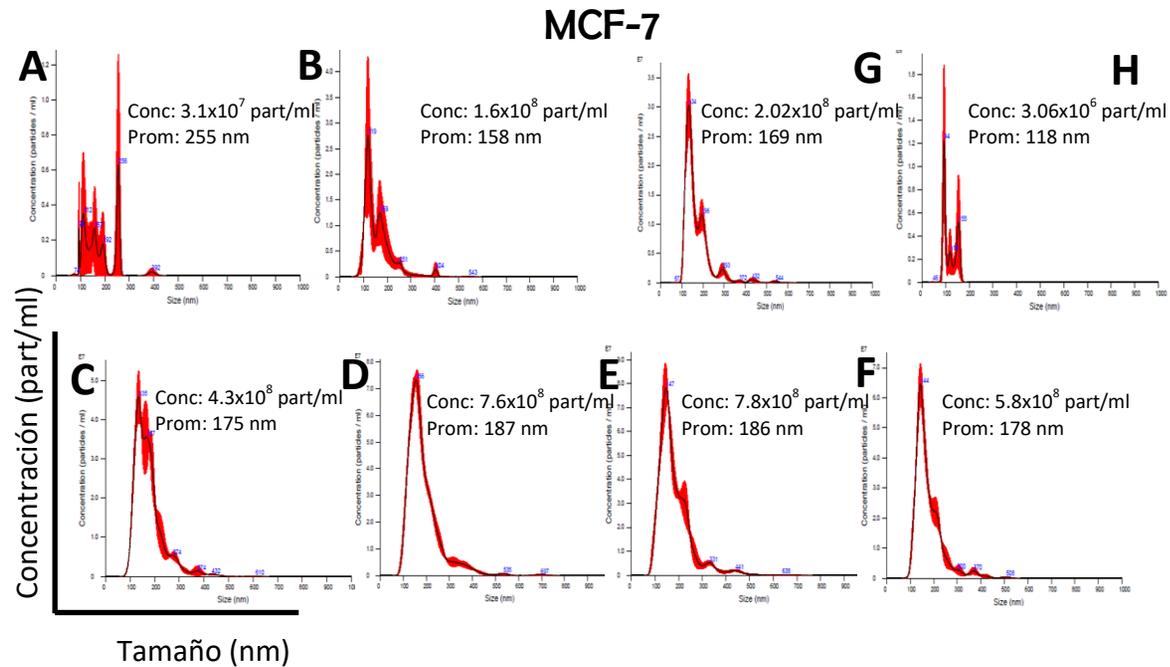


Figura 1. Las fracciones 8-11 tienen la mayor cantidad de exosomas para la línea celular MCF-7. Análisis por NTA de las fracciones obtenidas durante la purificación de exosomas mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Se recolectaron 25 fracciones con un volumen de 500 μ l de la columna de sefarsa; las fracciones con mayor concentración de partículas y mayor homogeneidad de tamaño fueron de la 8-11 (C-F), las cuales fueron usadas para la concentración y cuantificación final de exosomas. En las fracciones restantes, de 1 (A) a la 7 (B) y de la 12 (G) a la 25 (H) se encontró gran dispersión y baja concentración de partículas, las cuales fueron desechadas. Dilución 1:200. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

MDA-MB-468

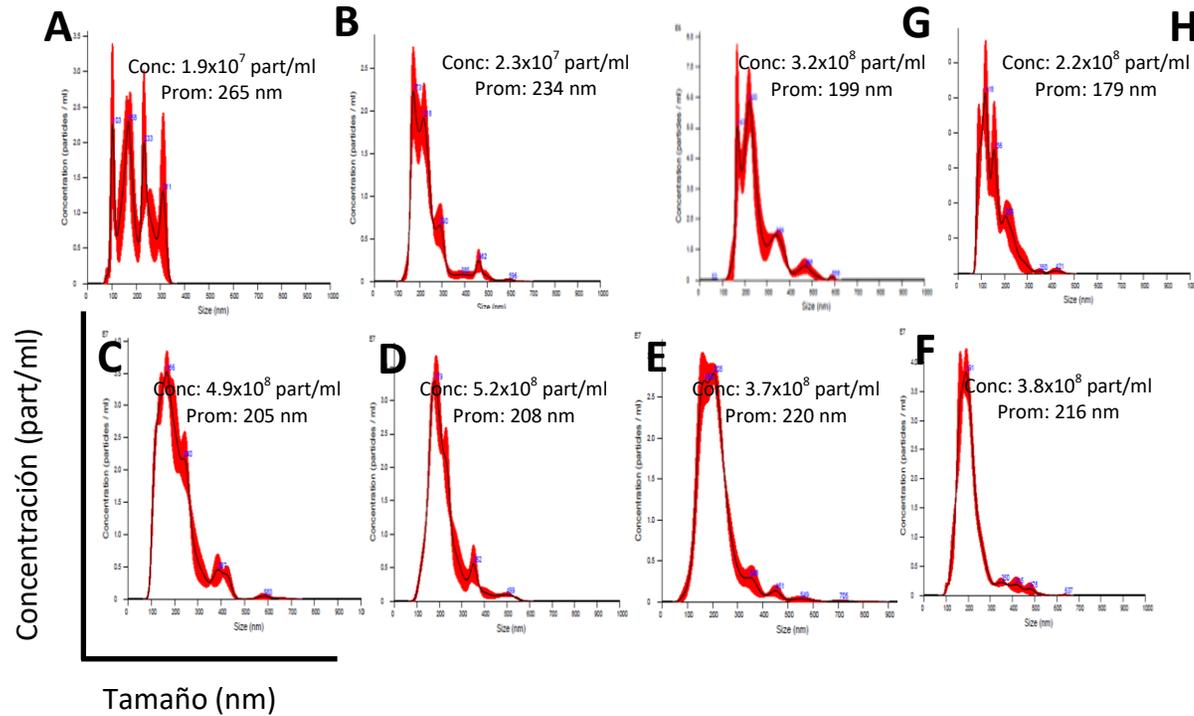


Figura 2. Las fracciones 6-9 tienen la mayor concentración de exomas para la línea celular MDA-MB-468. Análisis por NTA de las fracciones obtenidas durante la purificación de exomas mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Se recolectaron 25 fracciones con un volumen de 500 ul de la columna de sefarosa; las fracciones con mayor concentración de partículas y mayor homogeneidad de tamaño fueron de la 6-9 (C-F), las cuales fueron usadas para la concentración y cuantificación final de exomas. En las fracciones restantes, de 1 (A) a la 5 (B) y de la 10 (G) a la 25 (H) se encontró gran dispersión y baja concentración de partículas, las cuales fueron desechadas. Dilución 1:200. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

FACSDiva Version 6.1.3

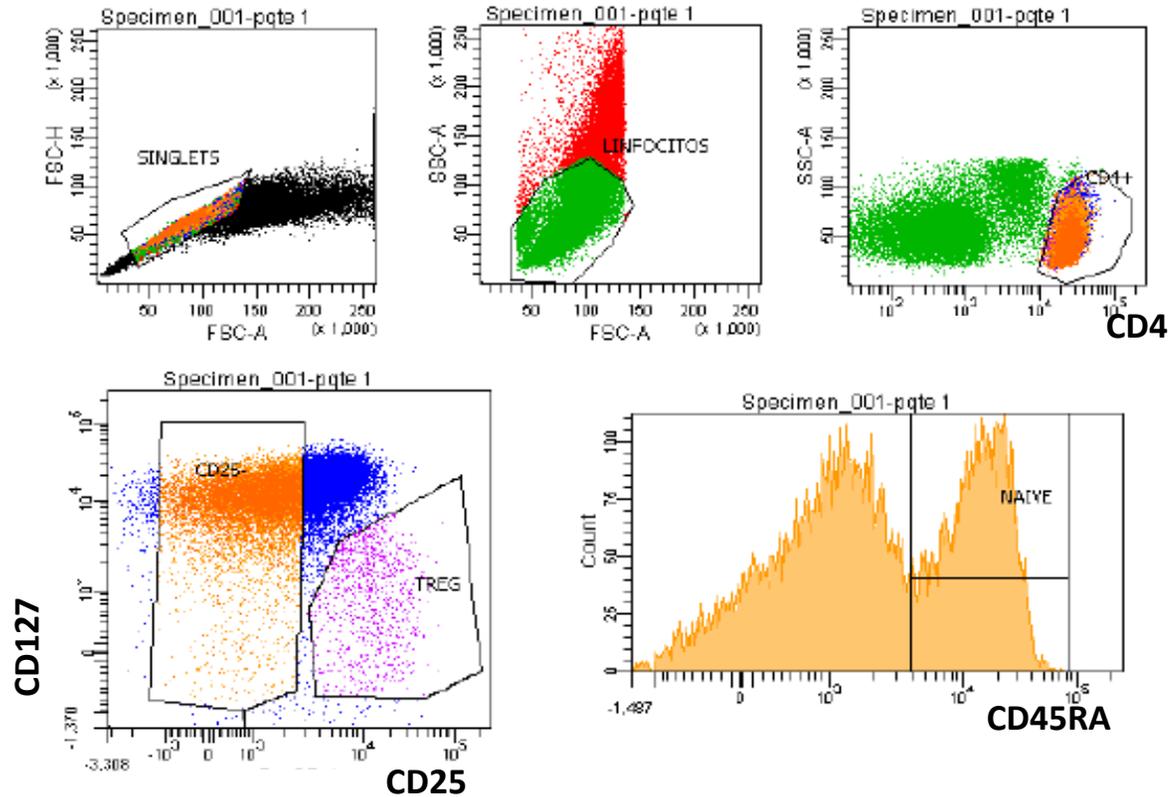


Figura 3. Diagrama de la estrategia de purificación de células Tnaive ($CD4^+CD25^-CD45RA^+$) y Treg ($CD4^+CD25^{HI}$, $CD127^-$). De la región de células individuales (singlets) se tomó la región de linfocitos ($SSC-A$ vs $FSC-A$) y posteriormente la región de células $CD4^+$ ($SSC-A$ vs $CD4$); las células Treg fueron tomadas en la región $CD25^{HI}/CD127^-$, mientras que las células Tnaive fueron tomadas de la región $CD25^-$ y positiva para $CD45RA$. Citómetro FACS Aria II.

ANEXO: REACTIVOS

❖ Medio OpTmizer T-Cell Expansion Suplementado 100 mL

Glutamato 0.2 M (Gibco)	1 mL
Piruvato de sodio 100 mM (Gibco)	1 mL
Antibióticos 100 x (Gibco)	
-Penicilina 10 000 U	1 mL
- Estreptomina 10 ng/mL	1 mL
OpTmizer T-Cell Expansion Supplement	1.04 mL
OpTmizer T-Cell Expansion Basal Medium	94.96 mL

❖ PBS 10X

NaCl	40 g
K ₂ HPO ₄	12.2 g
KH ₂ PO ₄	1.2 g
Agua destilada	500 mL

❖ PBS PARAFORMALDEHIDO

Paraformaldehído	2 g
PBS 1X	aforar a 100 ml

Calentar el PBS a 56°C y adicionar el paraformaldehído. Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 100 mL.

❖ MACS

PBS 1X	47.3 ml
BSA 10%	2.5 mL
EDTA 0.5 M	200 µL

❖ Buffer FACS

SFB	2 mL
EDTA 0.5 M	1.6 mL
Azida de sodio 2.5%	1.6 mL
PBS 1X	394.8 mL