



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGIA**



**VALIDACIÓN DE CDH6 COMO MODULADOR DE PROGRAMAS
DE CÁNCER Y QUIMIORRESISTENCIA EN MODELOS
CELULARES DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO**

**Tesis que para obtener el título de
Licenciada en Biotecnología**

PRESENTA:

C. Michelle Martínez Espinosa

DIRECTOR:

Dr. Alejandro Carabarán Lima

CO-DIRECTOR:

Dra. Sandra Lorena Romero Córdoba

MARZO 2023

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" y al Programa Institucional de Cáncer de Mama, IIBO, UNAM, México City, por permitirme realizar mi estancia en sus instalaciones.

Al departamento de Bioquímica por brindarme un lugar de trabajo, compartirme sus conocimientos, sus reactivos y sus equipos.

A la Dra. Sandra L. Romero Córdoba por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por dedicarme tiempo, esfuerzo y paciencia, por no dudar de mis capacidades y compartirme sus conocimientos, dándome la oportunidad de reforzar los míos y adquirir nuevas habilidades.

Al Dr. Alejandro Carabarrín Lima por apoyarme en mis decisiones, brindándome tiempo y paciencia.

A mi familia porque sin su apoyo y aliento esto no habría sido posible, a mi querida amiga Natalia Sulvarán por estar siempre, en las buenas y en las malas, a Miguel Juárez por aparecer en el momento indicado y darme el impulso necesario para no desistir.

A todas las personas que durante este proceso han aportado un granito de arena a mi formación, gracias.

Fuente de financiamiento: Proyecto PAPIIT, UNAM Numero IA206422 "Mecanismo de acción e importancia clínica de los exosomas y ARNs exosomales en la quimiorresistencia del cáncer de mama triple negativo"

INTRODUCCIÓN

Una visión biológica y epidemiológica del cáncer

El cáncer se ha presentado como uno de los desafíos más relevantes en nuestra época, puesto que constituye una de las enfermedades con mayor incidencia en la población humana. “Cáncer” es un término genérico para designar a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier órgano o tejido en el organismo (Sung et al, 2021), esta enfermedad es el resultado de un proceso de múltiples etapas donde las células sufren un daño genético durante un importante periodo de tiempo y que, junto con el conjunto de mutaciones heredadas, conducen a una transformación celular (Dalmay & Edwards, 2006). En condiciones normales, las células humanas se forman y multiplican para formar células nuevas dependiendo de los requerimientos del organismo, cuando estas células se dañan o envejecen, mueren y son reemplazadas por nuevas, sin embargo en algunas ocasiones esto no sucede así por lo que las células dañadas o anormales se comienzan a multiplicar descontroladamente formando tumores (NCI, 2021).

Es importante mencionar que el cáncer se desencadena, establece y progresa a través de la adquisición de características relevantes conocidas como los "sellos del cáncer" dentro de los que se incluyen: la evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad, activación de la invasión y la metástasis, inestabilidad genómica y pasaje mutacional, inflamación, vascularización, desregulación del metabolismo celular, autosuficiencia en las señales de crecimiento, evasión de la destrucción inmune celular, desbloqueo de la plasticidad fenotípica, reprogramación epigenética no mutacional, microbiomas polimórficos y la senescencia celular (Hanahan & Weinberg, 2011; Hanahan, 2022).

El cáncer de mama se caracteriza porque las células mamarias se multiplican sin control en los lóbulos y ductos del tejido mamario. Este tumor representa el tipo de cáncer más común y la segunda causa de muerte por cánceres entre mujeres. Acorde a datos de la Organización Mundial de la Salud este tipo de cáncer fue el de mayor incidencia en 2020 estimando el 11.7% del total de los

casos de cáncer diagnosticados a nivel mundial (GCO, 2020). Existe una variación geográfica importante en su incidencia entre países, sin embargo, los países en vías de desarrollo continúan teniendo las tasas más altas de mortalidad por cáncer de mama, esta alta incidencia refleja la prevalencia de factores de riesgo reproductivos, hormonales y conductuales (Arnold et al., 2022). En México, los nuevos casos de cáncer de mama representan el 28.2 % del total de todos los tipos de cáncer diagnosticados en ese mismo año (GCO, 2021). Desafortunadamente se ha mantenido en los primeros lugares de muerte en mujeres, siendo el grupo etario más afectado el de las mujeres de 60 años o más con la tasa más alta de defunciones por cáncer de mama (INEGI, 2020). Sin embargo, también se hace presente en las mujeres jóvenes, menores de 40 años, donde se diagnostica cada vez más frecuentemente, con características clínico patológicas más agresivas y resultados de supervivencia menos favorables (Villarreal-Garza et al., 2021). Algunos estudios estadísticos reflejan que las mujeres jóvenes con cáncer de mama que viven en México tienen un índice de prevalencia mayor, son diagnosticadas en etapas más avanzadas y tienen peores pronósticos, en comparación con las mujeres que viven en países desarrollados (Villarreal-Garza et al., 2017).

Este tipo de cáncer abarca una serie de entidades biológicas distintas que se asocian con características morfológicas e inmunohistoquímicas específicas y comportamiento clínico diverso (Reis-Filho et al., 2005). Por años se clasificó a los carcinomas de mama invasivos solo acorde al tipo histológico, el grado y la expresión de los receptores hormonales (Simpson et al., 2005). Actualmente, gracias a un conjunto de nuevos estudios de expresión génica y usando tres marcadores moleculares de células tumorales como los receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (PR), los cuales se agrupan como receptores hormonales (RH), y del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), han permitido clasificar a los tumores mamarios en subtipos moleculares de la siguiente manera: luminal A (positivo para RH, negativo para HER2), luminal B (positivo para RH y HER2), HER2 sobre-expresado (negativo para RH y positivo para HER2) y triple negativo (negativo para RH y HER2) (Howlader et al., 2018).

Los carcinomas luminales tienen respuestas variadas al tratamiento sistémico y representan alrededor del 75-80% de todos los tumores de mama a nivel mundial. Este subtipo se traduce en una enfermedad que comprende una alta expresión de genes asociados a las células epiteliales luminales del ducto mamario como la citoqueratina 8 y 18 (Ahn et al., 2015).

Por otra parte, el subtipo HER2 tiene un pronóstico más agresivo si es comparado con las neoplasias luminales, sin embargo, presenta una alta tasa de respuesta a esquemas de quimioterapia y son candidatos para una terapia dirigida antiHER2 como el Trastuzumab en monoterapia o combinado con emtasina (T-DM1), Pertuzumab, y los inhibidores de la tirosina quinasa como Lapatinib y Neratinib (Alcaide-Lucena et al., 2021).

Finalmente, el subtipo molecular triple negativo representa aproximadamente entre el 15 % y el 20 % de todos los cánceres de mama, es más común en mujeres menores de 40 años de edad, en mujeres africanas, americanas o latinas, o en aquellas que son portadoras de una mutación en los genes de reparación del ADN como los genes BRCA, principalmente en el gen *BRCA1* (Calabuig-Fariñas, 2021). Suelen expresar genes que generalmente se encuentran en las células basales/mioepiteliales normales de la mama (Lakhani et al., 2000). Se caracterizan por un alto grado histológico, un alto índice mitótico, la presencia de zonas necróticas centrales e infiltrado linfocítico visible (Reis-Filho et al., 2008).

El término carcinoma triple negativo (TNBC, por sus siglas en inglés) hace referencia a un grupo de pacientes con cáncer de mama cuyo tumor presenta una positividad menor al 1% de los receptores estrógeno-progesterona y la ausencia de expresión del receptor- HER2 en el examen patológico, por lo que el que el único tratamiento en tumores primarios es la quimioterapia (Brenton et al., 2005, Alcaide-Lucena et al., 2021).

Estudios de perfiles genómicos sugieren que el TNBC es una enfermedad heterogénea, abarcando un amplio espectro de entidades con marcadas diferencias genéticas, transcripcionales, histológicas y clínicas (Pareja et al.,

2016). Los TNBC se caracterizan por tener altos niveles de inestabilidad genómica, con un rango de entre 0.16-5.223 mutaciones/mb, con patrones complejos de alteración en el número de copias (CNA) y reordenamientos estructurales (Ng et al., 2015). Se han identificado cuatro subtipos distintos de TNBC: (i) receptor luminal de andrógenos (LAR), (ii) mesenquimatoso (MES), (iii) inmunosuprimido de tipo basal (BLIS) y (iv) activado por el sistema inmune de tipo basal (BLIA), sin embargo se han hecho otras clasificaciones que resultan una mezcla de estos subtipos lo que sugiere que no todos los subtipos de expresión de TNBC son estables y se identifican de forma reproducible (Burstein et al., 2015, Pareja et al., 2016).

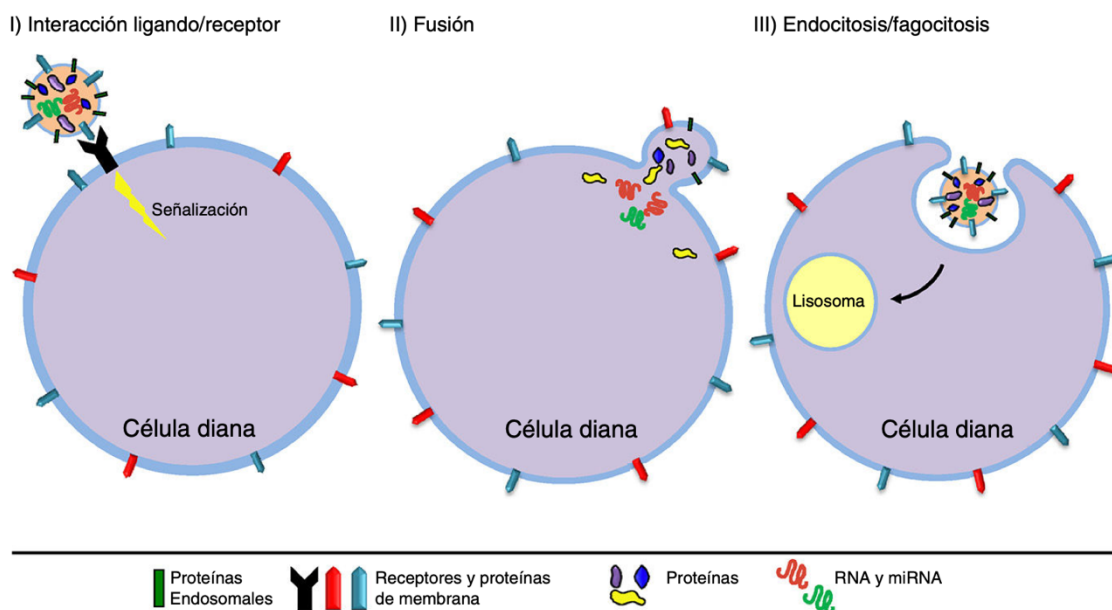
TNBC es un tipo distinto de cáncer de mama caracterizado por un rápido crecimiento, con mayor capacidad metastásica y un alto riesgo de recurrencia que ocurre en los primeros 5 años posteriores al diagnóstico, con una rápida disminución a partir de entonces (Hwang et al., 2019). En comparación con otros subtipos, se comporta de manera más agresiva, con recaídas más tempranas y peores resultados de supervivencia (Hwang et al., 2019, Chan et al., 2022). La tasa de supervivencia relativa a 5 años del TNBC localizado es del 91%, del 65% en estadios localmente avanzados y del 11% en estadios metastásicos (Crown et al., 2012).

Si bien existe la quimioterapia como alternativa para tratar a los TNBC y aun con tasas altas de respuesta a este tratamiento, el curso clínico favorable no se prolonga en el tiempo en un porcentaje importante de pacientes debido al desarrollo temprano de mecanismos de resistencia que repercuten en la eficacia del tratamiento (Bianchini et al., 2016, Calabuig-Fariñas, 2021). Además de que la quimioterapia convencional tiene efectos secundarios dolorosos y mortales (Sing et al., 2018). Se ha propuesto el uso de terapias neoadyuvantes como primera opción, sin embargo los resultados no son completamente satisfactorios y no todos los pacientes presentan respuesta patológica completa (Lee et al., 2020). Como consecuencia de estos resultados se puede decir que el mal pronóstico del TNBC se debe principalmente a que la falta de tratamientos dirigidos y al establecimiento de fenotipos resistentes a los quimiofármacos.

Para poder ofrecer tratamientos dirigidos, ha existido la necesidad de entender mejor cómo funciona el tumor y el microambiente tumoral. Existen numerosos estudios que nos llevan a pensar que la comunicación celular a través de vesículas extracelulares (VE) son un potencial recurso para entender los mecanismo de resistencia a terapia, como medio de transporte de biomarcadores asociado a respuesta a los fármacos y como vehículos del tratamiento en el TNBC, pues es bien sabido que existe un proceso de transferencia de componentes entre células donantes y receptoras (Bona et al., 1973) donde las células liberan biomoléculas o compuestos de diversa naturaleza mediante dos maneras: nanotubos o vesículas extracelulares (Davis 2007).

Vesículas extracelulares (VE)

Las VE son secretadas por las células al espacio extracelular. Se ha reportado que las células normales (fundamentalmente células endoteliales, plaquetas, leucocitos y monocitos) así como células tumorales secretan VE. Están compuestas por bicapas lipídicas con proteínas transmembranales y ácidos nucleicos de la célula huésped, por lo que constituyen un sistema de comunicación célula-célula tanto a nivel local como sistémico (Maravillas-Montero et al., 2017, Garcia et al., 2016). Estas tienen una función dinámica en la interacción celular o la desintoxicación del estrés ambiental y resultan ser de vital importancia (Colombo et al., 2014). Las VE tienen diferentes mecanismos



de acción (Fig1): I) pueden activar una vía de señalización de la célula diana mediante la interacción con los receptores presentes en la superficie celular II) el cargo se entrega a las células receptoras a través de la fusión con la membrana plasmática celular, entregando así los componentes encapsulados, que pueden incluir factores de transcripción, oncogenes, microARN, ARN interferente y ARNm o III) Incorporando el contenido principalmente por endocitosis en las células diana.

Exosomas como transportadores celulares

En particular el transporte de ARNm y microARN permite a una célula inducir un programa transcripcional específico en una célula distante receptora (Février, 2004, Mittelbrunn et al., 2011, Hilton & White, 2021). Existe evidencia de que el entorno extracelular contiene una gran cantidad de vesículas móviles limitadas por la membrana que incluyen: 1) exosomas, partículas de 40-150 nm generadas por procesos de invaginación de membranas endosomales 2) microvesículas, partículas de 100-300nm generadas directamente de la membrana plasmática y 3) cuerpos apoptóticos, partículas de 500-2000 nm (El Andaloussi et al., 2013, Mittelbrunn et al., 2011).

En la clasificación actual las diferencias entre los exosomas y las microvesículas se centra en el tamaño, lo que podría implicar que las microvesículas puedan contener mayor carga (un aumento del radio 5 veces mayor implica una superficie 25 veces mayor y un volumen 125 veces mayor). Además, se originan a través de diversos mecanismos de biogénesis, pues mientras las microvesículas se generan por brotación de la membrana, los exosomas son generados por endocitosis celular (Hilton & White, 2021).

Como se menciona anteriormente, los exosomas son VE pequeñas capaces de regular funciones biológicas y celulares. El cargo exosomal consiste en proteínas de la superficie celular, proteínas, como las tetraspaninas, anexinas, integrinas, chaperonas, ácidos nucleicos, incluyendo ADN, ARN mensajero, ARN no codificante, aminoácidos y metabolitos (Gajdosova et al., 2020, Théry & Amigorena, 2002). Sin embargo, el mecanismo por el cual se selecciona o preferencia el cargo que será vesiculado en el exosoma es complejo y aún se

sigue estudiando. Casi todos los tipos de células pueden secretar exosomas y como consecuencia se pueden encontrar presentes en fluidos biológicos, además están ampliamente involucrados en procesos fisiológicos y patológicos, especialmente en la tumorigénesis (Xie et al., 2019).

Biogénesis exosomal

De forma general la biogénesis exosomal inicia con la formación de endosomas tempranos y estos endosomas a su vez forman gradualmente cuerpos multivesiculares (MVB), cuya formación está regulada principalmente por el complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT), que consiste en ESCRT-0, ESCRT-1, ESCRT-II, ESCRT-III, proteínas auxiliares como Alix, VSP4 y tetraspaninas (Spellicy & Stice, 2021). Este complejo puede reconocer a las proteínas ubiquitinadas promoviendo su degradación, seleccionando así el cargo que llevarán estas vesículas. La membrana del endosoma se reorganiza de manera que se enriquece en tetraspaninas lo que impulsa finalmente que se liberen al exterior después de la fusión con la membrana plasmática. La manera en la que las células receptoras los absorben es variada y puede ser a través de la endocitosis, pinocitosis, la fagocitosis o la fusión con la membrana celular (Zhao et al., 2020) (Fig.2)

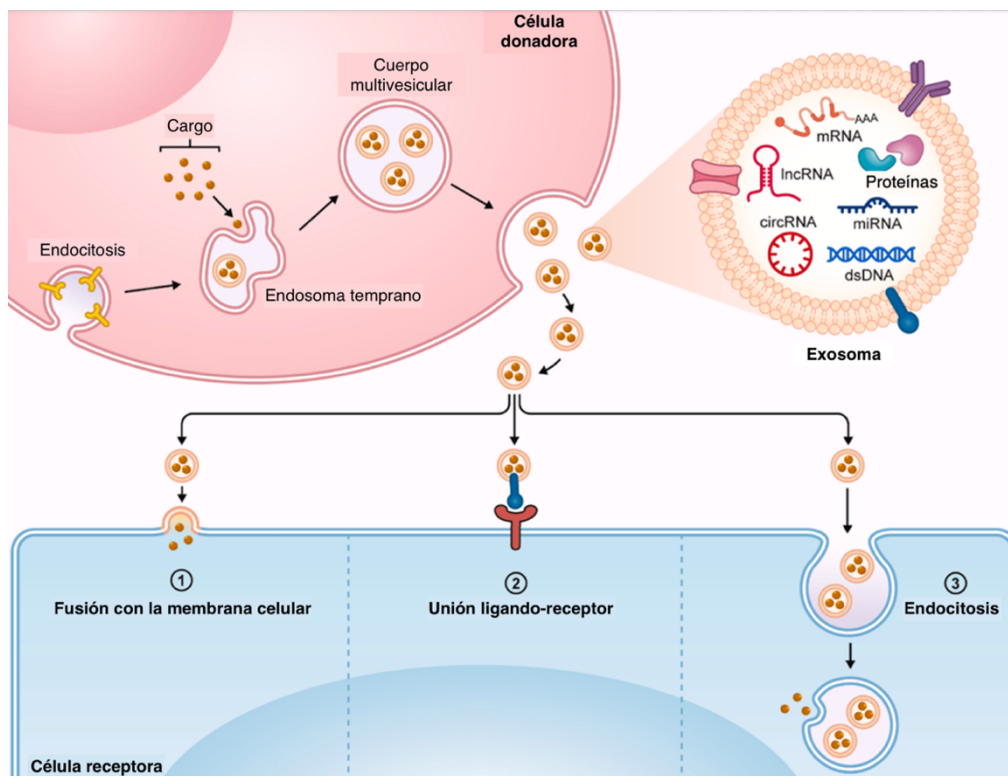


Figura 2. Biogénesis, contenido, captura y secreción exosomal. (Modificado de W. Tang) et al., 2022)

También se ha descrito la biogénesis independiente de ESCRT donde los exosomas se originan por la vía de la ceramida (Xu et al., 2016) y se organizan en microdominios lipídicos, favoreciendo la gemación de la vesícula intraluminal. Esta ruta está controlada por la familia de proteínas RAB, por ejemplo RAB31 que media la formación de vesículas intraluminales a través de la proteína flotillina e inhibe la degradación lisosomal de MVB, promoviendo la liberación de exosomas (Wei et al., 2021).

Como resultado de la génesis la composición de su membrana lipídica en su mayor parte procede de la membrana plasmática de la célula progenitora presentando, al mismo tiempo, características distintivas como la presencia o ausencia de proteínas determinadas, ligandos y moléculas de adhesión que inducen a pensar en vías propias de selección de los exosomas responsables de estas variaciones (Bell et al., 2016). Con base en la evidencia reportada en la literatura se ha propuesto que tienen numerosas ventajas en la administración de tratamientos debido a que la composición de su membrana lipídica le otorga características como baja inmunogenicidad y buena biocompatibilidad, y posiblemente especificidad (Perocheau et al., 2021).

Importancia de los exosomas en el cáncer

Los exosomas en condiciones fisiológicas normales participan en la presentación de antígenos, la maduración y diferenciación de varias células inmunes, afectando así la activación inmunitaria y la supresión en el proceso de inmunomodulación en el contexto tumoral (Maravillas-Montero & Martínez-Cortés, 2017). También se sabe que la composición y el contenido del cargo transportado por estos, es diferente en cada contexto celular y patológico, lo que provoca que tengan funciones específicas en diferentes ambientes (Shey et al., 2015). En entornos como los que se desarrollan en las enfermedades como el cáncer, los exosomas, funcionan como un mecanismo para escapar de la vigilancia del sistema inmunitario durante el desarrollo tumoral, apoyando la interacción entre diversas poblaciones de células tumorales heterogéneas e inmunitarias (Mao et al., 2021). En diversos estudios se ha observado que proteínas altamente expresadas en exosomas derivados del tumor, promueven la proliferación y la metástasis de las células tumorales receptoras (Li et al.,

2019). También se ha identificado que los exosomas contribuyen a la formación de nichos ya que pueden ser incorporados por células alejadas del tumor primario, lo que eventualmente resultará en la preparación del nicho metastásico (Hoshino et al., 2015).

Cada vez existe más evidencia que demuestra cómo es la interacción entre los componentes exosomales y el microambiente tumoral, por ejemplo; los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) son células estromales primarias del microambiente tumoral y están estrechamente asociadas al desarrollo de la enfermedad. Se ha encontrado información de que miR-500^a-5p se expresa altamente en los exosomas de CAF y se ha visto su transferencia a líneas celulares del subtipo triple negativo y luminal A (MDAMB231 y MCF7 respectivamente) promoviendo mucho más la proliferación y la metástasis al unirse a la peptidasa (Chen & Song, 2019).

De manera más específica los exosomas en TNBC interactúan en el entorno local y remoto, afectando así la tumorigénesis y por lo tanto el desarrollo de este subtipo tumoral (Fig. 3). Es decir, pueden actuar como mediadores entre el microambiente tumoral y las células tumorales transportando diversas cargas.

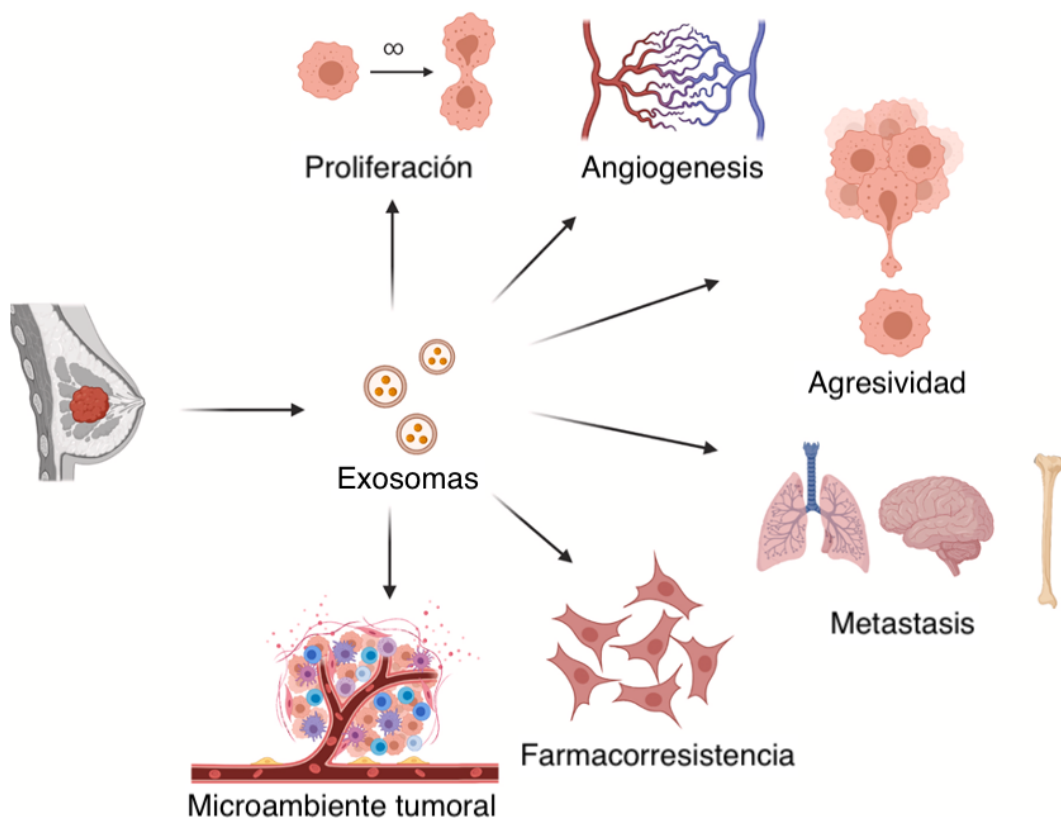


Figura 3. Papel de los exosomas en el cáncer de mama triple negativo. (Modificado de W. Tang et al., 2022)

¿Los exosomas están implicados en la resistencia a fármacos quimioterapéuticos?

Como se mencionó anteriormente debido a que existe una comunicación entre el tumor y el microambiente tumoral que es principalmente mediada por exosomas, estos podrían explicarnos porque existe o se desarrolla la resistencia a los tratamientos actuales contra el cáncer. Esta resistencia puede ser inherente de las células tumorales o surgir después de una respuesta inicial del tumor al tratamiento, esta última se conoce como resistencia adquirida y existen diversos mecanismos por los cuales se puede desarrollar, algunos de ellos involucran la transmisión de VE. Los exosomas en particular pueden inducir la resistencia a la quimioterapia y la radioterapia a través de la interacción directa con los medicamentos, la influencia en la reparación del ADN y la apoptosis, y la alteración del transcriptoma (Milman et al., 2019).

Se sabe que este tipo de VE puede contener diversas especies de ácidos nucleicos, tal característica ha reflejado un papel crucial en el desarrollo de la resistencia a medicamentos. El desarrollo de la resistencia adquirida es un proceso gradual y que se puede atribuir a diferentes moléculas bioactivas exosómicas, en la mayoría de estudios se describe que una célula resistente a los medicamentos en el microambiente tumoral o espacio tumoral transmite a una célula cancerosa sensible al medicamento una carga de ácido nucleico que da como resultado la regulación génica y que a su vez provoca que la célula sea resistente a la terapia contra el cáncer (Milman et al., 2019). Un ejemplo de ello es en el cáncer de ovario donde se ha visto que miR21, que es un miRNA exosómico, ha incrementado la resistencia a paclitaxel al reducir la expresión de APAF1, que es un gen asociado a la apoptosis (Au et al., 2016). Este mecanismo se ha visto también en el cáncer de mama subtipo HER2 positivo, donde la transferencia exosomal de lncRNA-SNHG14 induce la resistencia al trastuzumab (Dong et al., 2018).

Otro de los mecanismos que inducen a la resistencia a los medicamentos se debe a la carga de proteínas exosomales, como por ejemplo la secreción de sustratos de medicamentos citotóxicos fuera de las células por el transportador multidrogas dependiente de ATP, P-glicoproteína (P-gp)(Genovese et al., 2017).

Existen reportes de que la línea celular de cáncer de mama MCF-7/ADM expresa altos niveles de P-gp. En el tratamiento con doxorubicina, la droga no fue acumulada en el núcleo MCF-7/ADM como se esperaba, pero fue secretada fuera de las células mediante una vía exosomal. Los altos niveles de P-gp en los exosomas sugiere la transferencia directa de la proteína P-gp a través de los exosomas. Además, la internalización de los exosomas con P-gp dio lugar a la transferencia de los rasgos de resistencia a los medicamentos a las células sensibles a los mismos (Lv et al., 2014). La transmisión de protooncogenes y la regulación ascendente de las tirosinas quinasas receptoras (RTK) a través de exosomas son un mecanismo molecular adicional de la resistencia adquirida a los medicamentos en el cáncer (Zeng et al., 2017, Vella et al., 2017) .

Se ha reportado también que los exosomas derivados del tumor (TDE) pueden actuar como portadores de medicamentos para la terapia del cáncer, debido a que estos expresan diferentes tipos de receptores en su superficie que se pueden utilizar para atacar el tumor *in situ*, evitando así la modificación de la superficie exosomal para la administración de medicamentos. Debido a que la actividad de los exosomas y su carga es ubicua se ha reportado también que los exosomas podrían funcionar como protumorgénicos y antitumorgénicos basados de la fuente de la que originan. Por ejemplo, los exosomas de las células troncales mesenquimales menstruales (MenSc) mostraron propiedad antiangiogénicas *in vitro* e *in vivo*, mientras que los exosomas de las células troncales derivadas de la médula ósea, promovieron el crecimiento tumoral *in vivo* (Rosenberger et al., 2019). En otros estudios se ha visto que los exosomas de las células de cáncer de ovario hipóxico inducen la polarización de los macrófagos al fenotipo M2 (Chen et al., 2016). Los exosomas derivados del cáncer pancreático transfieren miR-203 a las células detriticas vecinas y dan como resultado la maduración de las mismas a través de la reducción de TNF- α e IL-2 (Zhou et al., 2014). Si bien los exosomas representan un potencial importante en el tratamiento contra diversos tipos de cáncer, tomar en cuenta estas limitantes y heterogeneidad podría ser de gran utilidad.

Papel de las cadherinas en la tumorigénesis y resistencia a fármacos

Es bien sabido que la unión entre las células y la matriz extracelular son fundamentales para mantener la organización estructural y funcional de los tejidos (Sánchez et al., 2005). Este proceso se logra, en gran parte, gracias a las moléculas de adhesión celular (CAM), que son receptores celulares funcionales, cuya principal característica es la de transducir señales al interactuar con sus ligandos, desencadenando diferentes eventos, como la expresión génica, cambios fenotípicos de inducción y sobreexpresión de determinadas moléculas en la membrana celular (Macias, 2006).

Las CAM incluyen cadherinas, integrinas y moléculas de superfamilia de inmunoglobulinas (Cavallaro & Christofori, 2004). Entre sus características más importantes podemos destacar que su expresión fluctúa entre alta y baja afinidad por sus ligandos, permitiendo su adecuada función en la respuesta inmune e inflamatoria (Macias, 2006).

En la célula hay diferentes puntos de anclaje donde estas moléculas se ven implicadas en la adhesión de diferentes maneras; existen uniones estrechas, uniones adherentes, uniones gap y desmosomas (Campbell et al., 2017). Las

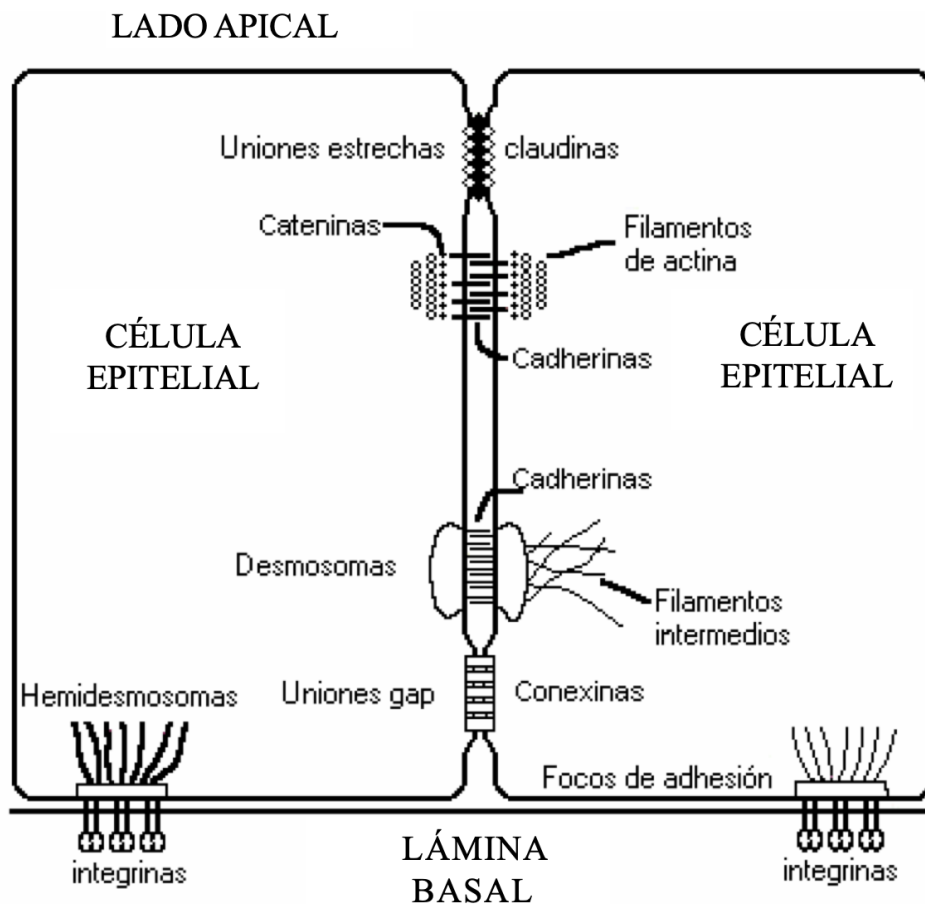


Figura 4. Representación esquemática de las uniones celulares. Tomado de Sánchez et al., 2005

integrinas por ejemplo están involucradas en los hemidesmosomas mediando la adhesión célula-matriz extracelular, mientras que en las uniones estrechas se dan principalmente por las adherencias a base de cadherinas y nectina mediando la adhesión célula-célula (Fig. 4) (Campbell et al., 2017, Sánchez et al., 2005).

Las cadherinas (CDH) son una familia multigénica de glicoproteínas que participan principalmente en la adhesión de células dependientes de calcio, pero están implicadas en otros procesos como sensores del microambiente circundante. Están constituidas por polipéptidos con alto grado de homología y se regulan a través de las cateninas formando complejos cadherina-catenina (San Miguel et al., 2007). De igual manera, se ha descubierto que las CDH pueden participar promoviendo la tumorigénesis, el crecimiento tumoral y la progresión maligna. Esta superfamilia consta de 115 genes y de varias subfamilias: cadherinas tipo I o clásicas, cadherinas tipo II o atípicas, desmocolinas, desmogleínas, cadherinas de 7 dominios y las aisladas CDH13 y CDH26 (Hulpiau & Van Roy, 2009). Actualmente algunas cadherinas se han identificado con motivos RGD de unión a la integrina (Casal & Bartolomé, 2018), que al expresarlos se asocian con formas agresivas del cáncer en las últimas etapas de la metástasis, debido a que funcionan como ligandos de integrinas $\alpha 2\beta 1$ activando así la vía de señalización de las integrinas, promoviendo y facilitando los diferentes pasos que también intervienen en la progresión metastásica (Streuli, 2009). Las CDH en condiciones normales desempeñan funciones fundamentales en la morfogénesis al mediar la adhesión intercelular específica y organización del citoesqueleto (Pouliot, 1992).

Para mediar esta adhesión, las cadherinas primero forman cis-dímeros con cadherinas en las mismas células (Wu et al., 2010). El contacto con una célula adyacente se inicia entonces por la formación de trans-dímeros con cadherinas en las células vecinas (Pertz et al., 1999). Con respecto a la biología del cáncer, la adhesión celular sufre diversas alteraciones en su señalización, se pierde la inhibición por contacto, migración celular e interacciones estromales durante la metástasis, proceso donde las cadherinas tienen un papel muy importante (Berx & Van Roy, 2009).

La cadherina-6 (CDH6) es una CDH de clase II, involucrada principalmente en la morfogénesis del sistema nervioso central y el riñón (Cho et al, 1998). Tiene cinco dominios extracelulares y un dominio citoplasmático, que utiliza para interactuar con moléculas de catenina (Zuo et al. 2017). Además tiene secuencias flanqueantes de RGD, estos motivos se han implicados principalmente en las interacciones de las integrinas celulares con las proteínas de la matriz extracelular, las proteínas involucradas en el control hemostático y el motivo His-Ala-Val (HAV) para la estabilización y agrupación de monómeros adyacentes en sus cinco dominios extracelulares (Casal & Bartolomé, 2019). Las células cancerosas utilizan las integrinas en sus mecanismos evasivos para la resistencia a medicamentos. Hay algunos estudios donde se ha demostrado la capacidad de la integrina $\alpha 2\beta 1$ para funcionar como receptor de RGD en células metastásicas, de la misma manera se ha reportado que ha estado involucrada en la sobreexpresión de HER2 como motor de resistencia a Lapatinib y Trastuzumab (Huang et al., 2011).

Estudios previos han informado que CDH6 podría regularse anormalmente y promover la transición epitelio mesénquima (EMT) y la metástasis del cáncer al atenuar la autofagia (Gugnoni et al., 2017), además se propone que controla la arquitectura celular, dictando la interacción celular y promoviendo la fusión dependiente de DRP1. Actualmente se ha informado de un aumento de la expresión de CDH6 en neoplasias malignas y se asocia con metástasis en los ganglios linfáticos y un mal pronóstico (Zu et al. 2017, Karthikeyan et al. 2016, Ma C. et al., 2018). En estudios con respecto al osteosarcoma se ha visto que CDH6 está estrechamente relacionada con la supervivencia y el pronóstico de los pacientes. Adicionalmente, CDH6 se identificó como un modulador directo y funcional de miR-223-3p, el cual está regulado a la baja en pacientes con osteosarcoma y se asocia negativamente con la expresión de CDH6, la inhibición de esta cadherina suprimió la capacidad migratoria de las células del osteosarcoma (Ji et al., 2018). En el cáncer gástrico se ha encontrado que el nivel de expresión de CDH6 esta significativamente asociado a la infiltración de células B en los tejidos tumorales (Luo et al., 2021). Así mismo se han hecho evaluaciones de actividad transcripcional basal de diferentes líneas celulares de

cáncer de ovario epitelial y se ha reportado que CDH6 contribuye a la resistencia a terapia (Hyter et al., 2017).

En el caso particular de TNBC se ha reportado una sobreexpresión de CDH6 que en conjunto con otras cadherinas, influye en las células troncales cancerosas alterando a los factores de transcripción, manteniendo así la renovación de las células cancerosas mamarias. Se reporta que los genes asociados a CDH6 están involucrados principalmente en el ciclo celular y la replicación/reparación de ADN, siendo así que CDH6 podría desempeñar un papel clave en el mantenimiento y la promoción de células cancerosas, contribuyendo así en la quimioresistencia (Yang et al., 2017). Los mecanismos de resistencia a la terapia en el cáncer se pueden categorizar como intrínsecos y adquiridos. Los mecanismos intrínsecos son factores preexistentes del cáncer que están presentes antes de cualquier tratamiento, lo que hace que ciertos tratamientos no sean útiles. La farmacorresistencia adquirida se desarrolla durante el tratamiento. La evidencia acumulada ha demostrado que la expresión de marcadores relacionados con la troncalidad es crucial para el mantenimiento del tumor y que estas moléculas también median la resistencia (Zhou et al., 2021). Se ha propuesto que CDH6 puede actuar como un gen de linaje, manteniendo su expresión en algunos tumores (Sotomayor et al., 2014). Otros estudios reportan que CDH6 podría hacer que las células tumorales pierdan la polaridad, lo que destaca su potencial como objetivo para el desarrollo de terapias dirigidas (Royer & Lu, 2011).

ANTECEDENTES DIRECTOS:

Exploración transcriptómica que identificó ARN's exosomales asociados a la quimiorresistencia.

Existe evidencia importante de que los exosomas y su carga, como los ARN, funcionan como mediadores oncogénicos (Webber et al., 2015). En el caso específico del TNBC, actualmente aún no se han dilucidado completamente los mecanismos moleculares que establecen la resistencia a la quimioterapia, ni el grado en el que este cargo exosomal influye sobre la sensibilidad a los fármacos.

El laboratorio donde realice mi tesis ha generado resultados preliminares que respaldan el papel de los exosomas y el ARN-exosomal en la quimiorresistencia. Por un lado, se utilizó un abordaje preclínico en modelos celulares y se observó que el condicionamiento *in-vitro* con exosomas provenientes de células resistente a antraciclinas y taxanos median la respuesta a estos fármacos en células sensibles. Adicional a esto, se hizo un análisis integrativo tomando en cuenta datos transcriptómicos de los experimentos *in-vitro* y de análisis *in-silico* en bases de datos donde se evalúan muestras tumorales de pacientes con TNBC que fueron tratadas con quimioterapia neoadyuvante obteniendo respuesta patológica completa o enfermedad residual. Gracias a este análisis se identificó una firma génica asociada a la respuesta al tratamiento que es mediada por ARN's exosomales a través de la vesiculación de transcritos como CDH6, TMPRSS4, miR-574-5p y miR-7977 (Datos no publicados).

En los experimentos realizados por el laboratorio estos transcritos se han identificado como enriquecidos en VE y sobreexpresados en las células tras su condicionamiento con respecto a los cultivos control, lo que nos indica que su transporte a células circundantes a través de vesículas podría resultar en una expresión a la alza en las células receptoras. Añadido a esto los datos públicos en pacientes con respuesta parcial a la quimioterapia también revelan una alteración de estos transcritos, lo que nos llevaría a pensar en que participan en el establecimiento de mecanismos de resistencia a la terapia.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) tiene pronósticos de supervivencia muy bajos y tasas de recurrencia alta, por lo que resulta de suma importancia seguir en constante investigación para encontrar mejores tratamientos que garanticen la calidad de vida de los pacientes. El laboratorio receptor ha encontrado que CDH6 es un gen enriquecido en los exosomas de modelos celulares resistentes a taxanos y antraciclinas. En el caso específico del TNBC se encontró involucrado en el condicionamiento de células sensibles a quimioterapia al reducir la actividad de los fármacos, por lo cual, el estudio de este gen permitirá nuevos conocimientos para el desarrollo de nuevas tecnologías de tratamiento, ya que los actualmente existentes son invasivos e inespecíficos.

HIPÓTESIS

El silenciamiento génico de CDH6 repercutirá en la resistencia a quimiofármacos y la respuesta a quimioterapia neoadyuvante en el cáncer de mama triple negativo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de CDH6 en la resistencia a quimiofármacos en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Adquirir conocimientos y habilidades de técnicas de cultivo celular y biología molecular.
- Determinar la curva IC50 para las líneas celulares MDAMB231, MDAMB 468 y BT549.
- Evaluar la expresión genética total de CDH6 en las líneas celulares MDA MB231, MDAMB468 y BT549.
- Realizar el silenciamiento de CDH6 en las líneas celulares MDAM231, MDAMB468 Y BT549 mediante el uso de un siRNA.
- Determinar el nivel de silenciamiento de CDH6 en las líneas celulares MDAMB231, MDAMB468 y BT549.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este proyecto se utilizaron tres líneas celulares: MDAMB231, que es una línea celular de cáncer de mama humano altamente agresivo e invasivo. Su morfología es de tipo endotelial y se distingue por su fenotipo invasivo con proyecciones estrelladas que se unen en múltiples colonias celulares. MDAMB468, que es una línea de cáncer de mama de tipo epitelial, aislada de una mujer afroamericana con adenocarcinoma mamario metastásico y BT549, línea celular de cáncer de mama que fue aislada de un tumor ductal invasivo que había hecho metástasis, las células derivaron de una paciente con cáncer de mama.

Estas líneas celulares se eligieron porque recapitulan parcialmente la heterogeneidad presente en los tumores de cáncer de mama triple negativo, que

serán analizadas en los ensayos *in vitro*. Las líneas celulares fueron donadas por el departamento de Bioquímica del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Acondicionamiento de líneas celulares

Las líneas celulares se descongelaron añadiendo 5 ml de medio Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) para MDAMB468 y BT549, y Roswell Park Memorial Institute (RPMI) para MDAMB231 suplementado con suero fetal bovino al 10%. Posteriormente se centrifugó a 1500 rpm por 4 minutos. El pellet resultante fue lavado en PBS dos veces, para retirar cualquier restante de DMSO y se resuspendió en una caja Petri a 37° C con 5% de CO₂ para su expansión.

Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC50)

Las células se desprendieron de las cajas Petri con ayuda de 700 µl de tripsina, posteriormente se inhibió a esta con el medio de cultivo respectivo para cada línea celular.

En el caso de las líneas celulares MDAMB231 Y MDAMB468 por su tiempo de duplicación estaban listas para ser utilizadas cuando llegaban a una confluencia aproximada del 80-90%. Particularmente para BT549, nos encontramos con una problemática puesto que al llegar a esa confluencia se desprendían de la placa, por lo que se utilizó un mayor número de placas Petri con una confluencia aproximada del 50%. Para todas las líneas celulares se consideró que estuvieran en el mismo pase, tomando en cuenta que las células no alcanzaran el pasaje número 25.

Para tener un control del número de células que se recuperaron de este paso y el número a resembrar se realizó un conteo utilizando la cámara de Neubauer. Tomando en cuenta este conteo y el factor de dilución que se utilizó, se calculó el número total aproximado de células que teníamos y el número aproximado de células a utilizar por pozo en cada tratamiento (Tabla 1), considerando también el tiempo de duplicación de cada línea celular, el tiempo de incubación, y que por pozo se requerían 100 µl de medio con células.

<i>Línea celular</i>	<i>Conteo en cámara de Neubauer</i>	<i>Factor de dilución</i>	<i>No. de células por pozo</i>
<i>MDA MB 231</i>	51, 44, 48, 40	3	35,000
<i>MDA MB 468</i>	34, 33, 32, 37	3	18,000
<i>BT 549</i>	123, 103, 73, 81	2	20,000

Tabla 1. Número aproximado de células a sembrar por pozo en experimentos de IC50.

Para determinar la IC50 se emplearon fármacos quimioterapéuticos constantemente utilizados en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo: doxorrubicina, docetaxel y paclitaxel. Se utilizaron como controles experimentales el tiempo inicial y final en condiciones que no fueron tratadas con ninguno de estos fármacos.

Debido a la naturaleza de los fármacos y su mecanismo de acción las células fueron sometidas al tratamiento por 24 hrs para doxorrubicina y 48 hrs para paclitaxel y docetaxel. Posteriormente se retiró el medio con tratamiento de cada pozo y se fijaron las células con una solución fijadora compuesta de 1% de glutaraldehído, 2% de suero fetal bovino (FBS) y el resto de volumen con medio de cultivo RPMI. Para asegurar una fijación celular adecuada, las células permanecieron en solución fijadora durante 10 minutos, posteriormente se retiró, se lavó con PBS y se dejó secar para hacer una tinción con cristal violeta.

Tinción con cristal violeta

Se realizó la tinción con 50 μ l de cristal violeta al 0.1 % incubando durante 15 minutos en oscuridad. A continuación, se retiró el cristal violeta y se enjuagó la placa con agua. Una vez perfectamente seca la placa, se agregaron 70 μ l de ácido acético y se mantuvo en agitación por 20 minutos a velocidad máxima .

Finalmente se midió con la absorbancia emitida por la tinción en un espectrómetro MultiSkan Go y se analizó mediante el software de este equipo, a una longitud de onda de 570 nm.

Transfección celular

Para el silenciamiento de CDH6 se realizó una transfección de tipo transitoria. Las líneas celulares MDAMB231, MDAMB468 y BT549 se sembraron en placas de 12 pozos, con un número de células, por pozo, aproximada de 100,000 y en placas de 6 pozos, con un número de células cultivadas de 200,000 aproximadamente. El protocolo para la transfección se realizó de acuerdo al fabricante con el reactivo Lipofectamine 2000 RNAiMAX de Invitrogen y con las siguientes consideraciones: se diluyó 3.1 μl de Lipofectamine2000 en 48 μl de medio Optimem por cada muestra. De la misma manera se diluyó 3.1 μl de siRNA en 50 μl de medio Optimem por muestra. El siRNA utilizado en este procedimiento fue Ambion (Cat: 43922420), que es un siRNA prediseñado para nuestro gen objetivo y que se obtuvo de manera comercial, Posteriormente ambas diluciones se mezclaron en partes iguales formando el complejo lípido-siRNA y se dejó incubar por 15 minutos. Las líneas celulares que anteriormente habían sido sembradas en las placas de 12 pozos, se lavaron 2 veces con PBS para asegurarnos de quitar cualquier rastro de medio de cultivo suplementado y posteriormente se les agregó el complejo lípido-siRNA por muestra, en el caso de las placas de 12 pozos se agregaron 100 μl y se llevó a un volumen de 1000 μl con medio Optimem. Para las placas de 6 pozos, se agregaron 200 μl del complejo lípido-siRNA y se llevó a un volumen final de 2000 μl con medio Optimem. En ambas condiciones de cultivo se empleó una concentración final de siRNA de 50 μM . Finalmente se incubaron las células a 37° grados con 5% de CO₂ por 18 horas.

Extracción de ARN

Para este procedimiento se utilizó el reactivo TRIzol de Invitrogen y el procedimiento a seguir fue el siguiente: se utilizaron 350 μl de TRIzol para lisar dos pozos de células tratadas, se separaron mecánicamente y con ayuda de una micropipeta se despegaron las células para posteriormente depositarle en tubos de microcentrifuga.

Las células con TRIzol se incubaron por 10 minutos en hielo, y posteriormente se agregó 80 μl de cloroformo. Las fases se incorporaron mediante agitación con

vortex hasta que las fases entre el TRIzol y el cloroformo se perdieron, esta mezcla se mantuvo en incubación por 15 minutos. El siguiente paso fue centrifugar por 15 minutos a 12,000g a 4° C. De las fases que se formaron se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo, mientras que la fase rojo fenol se desechó.

Posteriormente, a la fase acuosa se le agregaron 200 µl de isopropanol y se incubó durante toda la noche a 4°C para una precipitación más lenta y específica, finalmente se centrifugó por 10 minutos a 12,000g a 4°C y se descartó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta para secar el precipitado (pastilla). A continuación se le agregó 400 µl de etanol al 70%, posteriormente se agitó en vórtex y se centrifugó por 5 minutos a 7500g a 4°C. El sobrenadante se descartó con ayuda de una micropipeta y el precipitado se dejó secar completamente. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 20 µl de agua tratada con DEPC. La cuantificación de ARN se realizó con el equipo Thermo Scientific Multiskan Go y nanodrop. Para verificar pureza y la no contaminación de nuestras muestras se evaluaron los rangos de las absorbancias a A230 y A280 para calcular los índices A260/A230, que indica la contaminación por sustancias químicas, y A260/280, que refleja una estimación aproximada de la contaminación proteica que pudiera estar presente en la muestra.

Cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real

La retrotranscripción de RNA a DNA se realizó con el kit High Capacity RNA to cDNA de Applied Biosystems utilizando la siguiente metodología:

Todos los componentes se mantuvieron en hielo, utilizando los volúmenes siguientes por reacción partiendo de entre 500ng a 2mg de RNA total.

<i>Componente</i>	<i>Volumen por reacción</i>
<i>2XRT Buffer Mix</i>	5µl
<i>20X RT Enzima</i>	0.5 µl
<i>Muestra de RNA</i>	Hasta 4.5 µl
<i>H₂O</i>	c.b.p 10 µl

Tabla 2. Componentes para la retrotranscripción.

Estos componentes se alicuotaron en tubos de microcentrífuga, se sellaron apropiadamente y se centrifugaron brevemente para asegurarnos de que todo estuviera mezclado.

La reacción de retrotranscripción se realizó en un termociclador MJ Research PTC-100 donde se siguió el siguiente programa: 37°C por 60 minutos, 95°C por 5 minutos y finalmente mantener a 4°C.

Para realizar la PCR en tiempo real se utilizó el kit Taq Man Master Mix Universal II de Applied Biosystems. Se realizaron los cálculos para la reacción de PCR de cada uno de los reactivos quedando de la siguiente manera:

<i>Componente</i>	<i>Volumen por reacción</i>
<i>TaqMan Universal Master Mix II</i>	5 μ l
<i>TaqMan Assay 20X</i>	0.5 μ l
<i>cDNA o DNA templado + agua libre de RNAsa</i>	4.5 μ l + 2 μ l
<i>Volumen total</i>	12 μ l

Tabla 3. Componentes para la PCR en tiempo real.

Posteriormente se agregaron todos los componentes a cada pozo de una placa de 96 pozos, se cubrió la placa con un revestimiento óptico y se centrifugó brevemente.

La placa se cargó con 10 μ l del master mix y se cargó al equipo Step ONE de Applied Biosystems utilizando las siguientes temperaturas:

- Activación de la polimerasa: 95° C durante 10 minutos
- Desnaturalización: 95°C durante 0.15 segundos por 40 ciclos
- Alineamiento/extensión: 60°C durante 1 minuto por 40 ciclos

Los resultados fueron analizados por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como normalizador se incluyó el gen GAPDH. Los valores normalizados fueron analizados con una prueba de t para definir diferencias significativas.

Ensayo de viabilidad celular (MTS)

Se realizó el ensayo de viabilidad celular a través del compuesto MTS. Para este procedimiento se sembraron células de las líneas celulares MDA MB 231 Y MDA MB 468 en placa de cultivo de 96 pozos, después de dejarlas adherirse, se hizo la transfección anteriormente mencionada, se les dio tratamiento con las concentraciones determinadas de IC50, finalmente se agregaron 10 μ l de MTT a cada pozo y se dejó incubando a 37° C con 5% de CO₂ por tres horas.

Esta placa se leyó en el equipo MultiSkan Go.

RESULTADOS

Aprendizaje y estandarización de técnicas de cultivo y de biología molecular

A lo largo de la realización de este proyecto uno de los retos iniciales fue aprender la manera correcta de ejecutar técnicas propias de la biología molecular y cultivo celular, utilizando los instrumentos y las instalaciones adecuadas para ello. Para lograr este objetivo se implementó un plan estratégico asegurando así que estos procesos se realizaran de manera autónoma y correcta, y entonces poder obtener resultados confiables y reproducibles. En este primer objetivo se abarcaron técnicas desde lo más básico como lo es el pipeteo óptimo, hasta técnicas más avanzadas como el mantenimiento celular. Este periodo de entrenamiento se concluyó con técnicas propias de la biología molecular como son la PCR en tiempo real.

El plan estratégico se dividió en dos fases donde primero se mostró la técnica correcta para realizar el proceso y posteriormente una fase de aprendizaje donde se alcanzó la ejecución correcta de las técnicas e instrumentos. El resultado final de esta etapa fue la adquisición de conocimientos relevantes para el desarrollo de técnicas específicas que permitieron comenzar con las estandarizaciones planteadas en este proyecto asegurando que los resultados nos presentarían algún sesgo técnico debido a una mala operación del evaluador. Además esto permitió fortalecer varios de los conocimientos adquiridos durante el tiempo de

estudio y reforzó las debilidades en diversas áreas que no pudieron ser atendidas como se debían por la contingencia sanitaria que se presentó durante las materias de mi plan de estudios.

Determinación de concentración inhibitoria 50 (IC50) en las líneas celulares

Para la determinación de la concentración inhibitoria 50 se realizó una serie de experimentos sometiendo a las tres líneas celulares a los fármacos antes mencionados.

Los resultados obtenidos de la estandarización para cada línea celular fueron los siguientes:

<i>Línea Celular</i>	<i>Fármaco</i>	<i>Concentración inhibitoria (IC50)</i>
<i>MDA MB 231</i>	Paclitaxel	11.53 μM
	Docetaxel	26.72 μM
	Doxorrubicina	3.96 μM
<i>MDA MB 468</i>	Paclitaxel	1.8 μM
	Docetaxel	3.8 μM
	Doxorrubicina	1.34 μM
<i>BT 549</i>	Paclitaxel	9.8 μM
	Docetaxel	18.96 μM
	Doxorrubicina	14.87 μM

Tabla 4. Resultados de IC50 final de cada línea celular a los fármacos probados.

Silenciamiento exógeno de CDH6 mediante sistema de siRNA

Como parte de la caracterización de la expresión genética de CDH6 evaluamos su expresión total en las tres líneas celulares antes mencionadas, observando, como se esperaba, una diversidad en los patrones de expresión, siendo la línea BT549 la que más lo expresó y por lo tanto representa nuestro principal modelo de estudio de silenciamiento de dicho gen (Fig 4). Cabe señalar que no detectamos expresión de este transcrito en la línea celular MDAMB 468.

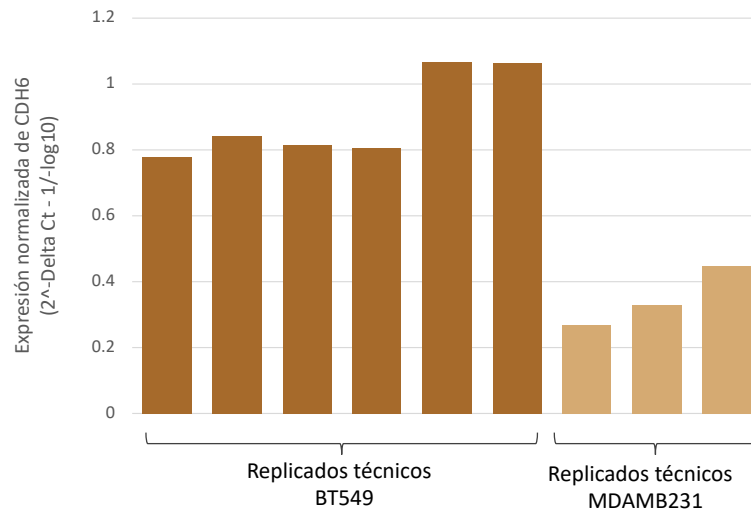


Fig 4. Expresión genética de CDH6 en las líneas celulares BT549 y MDAMB 231

Tras realizar la transfección de una secuencia siRNA para el silenciamiento del gen CDH6 en la línea celular BT549 a una concentración de 60 μ M de siRNA y 24 h de transfección definimos que hay cambios significativos con respecto a la condición control (Fig 5). Es decir, con esta concentración se ha silenciado exitosamente entre el 30 al 50% de la expresión total del gen.

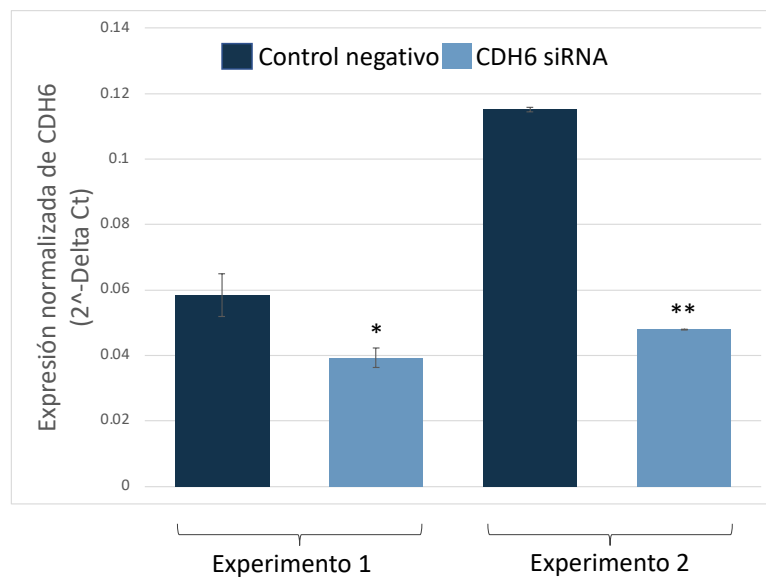


Fig 5. Expresión de CDH6 en la línea celular BT549 antes y después de la transfección.

DISCUSIÓN

La farmacoresistencia representa una de las principales barreras de éxito en el tratamiento contra TNBC. Las células con fenotipos tipo troncales (CSC, por sus siglas en inglés -cancer stem cells-) tienen una importante capacidad de autorrenovación y de diferenciación que contribuyen a la progresión tumoral. En

la mayoría de los casos, la recurrencia del tumor es dada por CSC resistentes en el tumor primario (Malanchi et al., 2012). En este estudio se establecieron las bases para la caracterización *in vitro* de CDH6, el cual podría ejercer un efecto quimioprotector debido a que se encuentra sobreexpresado en el TNBC y que se reporta podría influir en las CSC y desdiferenciación celular, dando como resultado la renovación y la transición EMT, lo que se traduce finalmente en la quimioresistencia (Gooding & Schiemann, 2020). En el caso particular de las líneas celulares MDMB231 Y BT 549, podemos observar que existe una importante expresión de CDH6 por lo que podríamos esperar que esté aportando de manera importante en la supervivencia del tumor y la respuesta a la terapia.

Se sabe que la resistencia de las CSC a fármacos quimioterapéuticos puede ser mediada por múltiples mecanismos intrínsecos y extrínsecos. Aunado a esto las CSC y células desdiferenciadas no pueden volver a adquirir propiedades de resistencia por EMT, por lo que el microambiente, la autofagia y las VE contribuyen en este proceso (Gooding & Schiemann, 2020). Con esto en mente, podríamos esperar que CDH6 sea transferido entre las CSC mediante el transporte mediado por VE, principalmente por vía exosomal.

Para lograr la estandarización de experimentos, primero se obtuvieron las condiciones de crecimientos adecuadas propias de nuestras líneas celulares: las líneas celulares según lo establecido crecen en condiciones de 37°C con 5% de CO₂ y con sus medios respectivos: DMEM para las líneas MDAMB 468 y BT549, y por su parte, el medio RPMI para MDAMB231. Sin embargo, en el caso específico para nuestra línea celular BT549 resultó una de las más difíciles de estandarizar y mantener en crecimiento.

Después de estandarizar las condiciones de proliferación, se comenzó con la determinación de las curvas inhibitorias, en este proceso tuvimos que enfrentar de nuevo diferentes situaciones. El primer paso fue estandarizar el número de células que se debían cultivar porque las tasas de proliferación entre las diferentes líneas son variadas y la confluencia total se alcanzaba a diferentes tiempos, lo que causó que las células se despegaran de la placa de 96 pozos al no tener más superficie de contacto. Esta situación se vio reflejada en los

resultados experimentales pues no eran robustos ni reproducibles, pero se resolvió haciendo pruebas con diferentes números iniciales de células y a través de entender las tasas de duplicación propias de nuestros modelos celulares. La estandarización del número inicial de células se logró con éxito, y funcionará para tener futuros experimentos de evaluación funcional con condiciones óptimas.

Cómo se mencionó anteriormente se utilizó la técnica de cristal violeta, sin embargo, esta técnica tiene un sesgo importante pues las métricas de conteo pueden confundir el crecimiento celular que tiene lugar durante el experimento y sobreestimar la concentración IC50 (Checa-Rojas, 2018). Para este caso en particular, los medicamentos que afectan la tasa de crecimiento y bloquean la división celular parecerán más resistentes que las líneas que son de crecimiento rápido, aun cuando el efecto biológico por división pueda ser el mismo. Una buena alternativa para eliminar este sesgo en experimentos próximos sería utilizar técnicas que reflejan la proliferación y la viabilidad detectando la actividad metabólica, como por ejemplo el ensayo de viabilidad celular MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromuro). Este ensayo utiliza el potencial redox celular en las células metabólicamente activas para convertir un reactivo salino a base de tetrazolio (MTT) en un producto de formazan, que tiene color violeta y que puede ser leído rápidamente en un lector de placas, donde la absorbancia de este compuesto está relacionada directamente con el número de células viables (Gerlier & Thomasset, 1986).

Al realizar la comparación de nuestros resultados con los reportados en bases de datos y la literatura, nos enfrentamos con otro sesgo importante, la reproducibilidad entre líneas ya definidas con el mismo genotipo pero que están presentes en diversos compartimentos biológicos propios de cada uno de los laboratorios, aun cuando presenten las mismas condiciones del cultivo. Se eligió trabajar con el conjunto de datos del proyecto Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC) debido a que es una compilación robusta de datos públicos sobre la sensibilidad a los medicamentos anticancerígenos de diferentes líneas celulares de diversos tipos de cáncer (Yang et al., 2013, Vis et al., 2016). GDSC reporta una IC50 relativa para nuestras líneas celulares (Tabla 5).

<i>Línea Celular</i>	<i>Fármaco</i>	<i>IC50</i>
<i>MDA MB 231</i>	Paclitaxel	0.088834 μM
	Docetaxel	0.013319 μM
	Doxorrubicina	1.262226 μM
<i>MDA MB 468</i>	Paclitaxel	0.016987 μM
	Docetaxel	0.004357 μM
	Doxorrubicina	0.078248 μM
<i>BT 549</i>	Paclitaxel	0.014418 μM
	Docetaxel	0.021161 μM
	Doxorrubicina	0.989737 μM

Tabla 5. Concentración inhibitoria (IC50) relativa reportada en la base de datos de GDSC.

Nuestros resultados con respecto a lo publicado en las bases de datos, tiene variaciones importantes, e incluso encontramos variaciones entre pases celulares de la misma línea, aun cuando trabajamos con líneas celulares por abajo del pase 25, puesto que la heterogeneidad fenotípica en cultivos celulares puede ocurrir cuando se están realizando procesos de expansión celular, especialmente en líneas celulares de cáncer (Rebuzzini et al., 2016), trabajar con un pasaje arriba del 25, podría aumentar las probabilidades de tener variación genética y epigenética (Pamies et al., 2022). Por lo ya mencionado, es importante prestar atención en el conocer el genotipo de las líneas celulares con las que se trabaja, así como los métodos y materiales empleados que pudieran explicar parte de la variabilidad observada.

Aun con las dificultades que se nos presentaron, ser parte de este proyecto me permitió mejorar mis conocimientos y habilidades técnicas en el manejo de instrumental de laboratorio, protocolos de investigación y la manipulación de líneas celulares, así como reforzar mis habilidades intelectuales en la discusión de diversos aspectos científicos, a pesar de la situación pandémica tuve la oportunidad de hacer trabajo experimental, lo que fortaleció mi formación académica.

El papel de CDH6 y su función como cargo exosomal no está del todo dilucidado, sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo representan las bases para la evaluación funcional de la actividad *in vitro* del gen CDH6, que previamente ha sido identificado como sobre-expresado en experimentos de condicionamiento exosomal de líneas celulares resistentes por el laboratorio que me recibió (Datos no publicados) y también ha sido reportado en la literatura

como un transcrito exosomal involucrado en la resistencia a fármacos en diversos tipos de cáncer (Ji et al., 2018, Gugnoni et al., 2017, Sancisi et al., 2013). Con base en el entendimiento de la actividad del gen CDH6, creemos que su expresión, y posible transporte por vesículas extracelulares principalmente exosomal, es relevante en la respuesta a quimioterapia y en otros procesos que favorecen el desarrollo y progresión del cáncer. Elucidar estas características significaría un importante avance en la mejora de pacientes con TNBC.

CONCLUSION

El entrenamiento obtenido durante esta parte del proyecto permitió establecer los parámetros de estandarización en todos los experimentos realizados, que a su vez serán empleados en la posterior caracterización funcional de CDH6. Si bien CDH6 no está expresado en todos nuestros modelos celulares, en los que sí, se encuentra altamente expresado por lo que podríamos esperar que contribuya de manera importante en la respuesta tumoral. Añadido a esto se conoce que los genes asociados a CDH6 están involucrados en el ciclo celular, donde podría formar parte clave de la promoción y mantenimiento de las células cancerosas, por lo que en estos casos donde se encuentra sobreexpresado, podría aportar una resistencia importante a la terapia. CDH6 ya se ha utilizado con otros fármacos como una propuesta alternativa a otros cánceres, por lo que las posteriores investigaciones sobre CDH6 podrían significar un avance importante en tratamientos más específicos y menos invasivos que permitan superar la resistencia a los quimiofármacos en el TNBC.

BIBLIOGRAFIA

Ahn, H. J., Jung, S. J., Kim, T. H., Oh, M. K., & Yoon, H. K. (2015). Differences in Clinical Outcomes between Luminal A and B Type Breast Cancers according to the St. Gallen Consensus 2013. *Journal of breast cancer*, 18(2), 149–159. <https://doi.org/10.4048/jbc.2015.18.2.149>

Alcaide Lucena, M., Rodríguez González, C., de Reyes Lartategui, S., Gallart Aragón, R., Sánchez Barrón, M., García Rubio, J., & Torné Poyatos, P. (2021). Molecular classification of breast cancer. Treatment and prognosis implications. *Cirugía Andaluza*, 32(2), 155–159. <https://doi.org/10.37351/2021322.9>

Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., & Wood, M. J. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature reviews Drug discovery*, 12(5), 347-357.

Arnold, M., Morgan, E., Rungay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Gralow, J. R., Cardoso, F., Siesling, S., & Soerjomataram, I. (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 66, 15–23. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.08.010>

Au Yeung, C. L., Co, N. N., Tsuruga, T., Yeung, T. L., Kwan, S. Y., Leung, C. S., ... & Mok, S. C. (2016). Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1. *Nature communications*, 7(1), 1-14.

Bell, B. M., Kirk, I. D., Hiltbrunner, S., Gabrielsson, S., & Bultema, J. J. (2016). Designer exosomes as next-generation cancer immunotherapy. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 12(1), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.011>

Berx, G., & Van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6), a003129.

Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E., & Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature reviews Clinical oncology*, 13(11), 674-690.

Brenton, J. D., Carey, L. A., Ahmed, A. A., & Caldas, C. (2005). Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application?. *Journal of clinical oncology*, 23(29), 7350-7360.

Burstein, M. D., Tsimelzon, A., Poage, G. M., Covington, K. R., Contreras, A., Fuqua, S. A., ... & Brown, P. H. (2015). Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 21(7), 1688-1698.

Chan, W. L., Martinez-Cannon, B. A., Chavarri-Guerra, Y., & Kwong, G. W. T. (2022). Perspectives on Geriatric Oncology Research Presented at the 2021 San Antonio Breast Cancer Symposium: A Young International Society of Geriatric Oncology Report. *Journal of Geriatric Oncology*. <https://doi.org/10.1016/j.jgo.2022.03.006>

Calabuig-Fariñas, S., Lobo de Mena, M., & García-García, J. Á. (2021). Update on systemic treatment in early triple negative breast cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 13, 1758835920986749-1758835920986749.

Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(2), 118-132.

Campbell, H. K., Maiers, J. L., y DeMali, K. A. (2017). Interplay between tight junctions & adherens junctions, *Experimental cell research*, 358(1), 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.061>

Casal, J. I., & Bartolomé, R. A. (2018). RGD cadherins and $\alpha 2\beta 1$ integrin in cancer metastasis: A dangerous liaison. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1869(2), 321–332. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.04.005>

Casal, JI y Bartolomé, RA (2019). Más allá de la N-cadherina, relevancia de las cadherinas 5, 6 y 17 en la progresión y metástasis del cáncer. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*, 20 (13), 3373.

Checa-Rojas A. (2018). Tinción de Cristal Violeta (0.5%) en cultivo de células adherentes. *Conogasi, Conocimiento para la vida*. <https://conogasi.org/articulos/tincion-de-cristal-violeta-0-5-en-cultivo-de-celulas-adherentes/>

Chen, X., & Song, E. (2019). Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nature reviews Drug discovery*, 18(2), 99-115.

Chen, Z., Yang, L., Cui, Y., Zhou, Y., Yin, X., Guo, J., ... & He, Q. Y. (2016). Cytoskeleton-centric protein transportation by exosomes transforms tumor-favorable macrophages. *Oncotarget*, 7(41), 67387.

Chinnappan, M., Srivastava, A., Amreddy, N., Razaq, M., Pareek, V., Ahmed, R., Mehta, M., Peterson, J. E., Munshi, A., & Ramesh, R. (2020). Exosomes as drug delivery vehicle and contributor of resistance to anticancer drugs. *Cancer letters*, 486, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.05.004>

Cho, E. A., Patterson, L. T., Brookhiser, W. T., Mah, S., Kintner, C., & Dressler, G. R. (1998). Differential expression and function of cadherin-6 during renal epithelium development. *Development*, 125(5), 803-812.

Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>

Dalmay, T., & Edwards, D. R. (2006). MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene*, 25(46), 6170-6175.

Du, J., Fan, J. J., Dong, C., Li, H. T., & Ma, B. L. (2019). Inhibition effect of exosomes-mediated Let-7a on the development and metastasis of triple negative breast cancer by down-regulating the expression of c-Myc. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(12), 5301–5314. https://doi.org/10.26355/eurrev_201906_18197

Dong, H., Wang, W., Chen, R., Zhang, Y., Zou, K., Ye, M., ... & Han, J. (2018). Exosome-mediated transfer of lncRNA-SNHG14 promotes trastuzumab chemoresistance in breast cancer. *International Journal of Oncology*, 53(3), 1013-1026.

Douglas Hanahan; Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 1 January 2022; 12 (1): 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

NCI, (2021). La naturaleza del cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es#definicion-del-cncer>

Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 6(4), 259–269. <https://doi.org/10.1038/nrc1840>

García Garre, E., Luengo-Gil, G., de la Morena Barrios, P., & Ayala de la Peña, F. (2016). *Microvesículas en cáncer de mama. Revista de Senología y Patología Mamaria*, 29(3), 125–131. doi:10.1016/j.senol.2016.06.005

Gajdosova, V., Lorencova, L., Kasak, P., & Tkac, J. (2020). Electrochemical nanobiosensors for detection of breast cancer biomarkers. *Sensors*, 20(14), 4022.

Genovese, I., Ilari, A., Assaraf, Y. G., Fazi, F., & Colotti, G. (2017). Not only P-glycoprotein: Amplification of the ABCB1-containing chromosome region 7q21 confers multidrug resistance upon cancer cells by coordinated overexpression of an assortment of resistance-related proteins. *Drug Resistance Updates*, 32, 23-46.

Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (2022) Relative sensitivity of BT549. Recuperado de la base de datos de Genomics of Drug Sensitivity in Cancer, https://www.cancerrxgene.org/cellline/BT-549/905951?screening_set=GDSC2

Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (2022) Relative sensitivity of MDA-MB-231. Recuperado de la base de datos de Genomics of Drug Sensitivity in Cancer, https://www.cancerrxgene.org/cellline/MDA-MB-231/905960?screening_set=GDSC2

Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (2022) Relative sensitivity of MDA-MB-468. Recuperado de la base de datos de Genomics of Drug Sensitivity in Cancer, https://www.cancerrxgene.org/cellline/MDA-MB-468/908123?screening_set=GDSC2

Ghanbari, Tara, Azadbakht, Mehri, Vesi-Raygani, Asad, & Khazaei, Mozafar. (2016). Isolation of Breast Cancer Stem Cell from MDA-MB231 Cell Line Using Vincristine. *International Journal of Morphology*, 34(4), 1197-1202. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022016000400003>

Gugnoni, M., Sancisi, V., Gandolfi, G., Manzotti, G., Ragazzi, M., Giordano, D., ... & Ciarrocchi, A. (2017). Cadherin-6 promueve la EMT y la metástasis del cáncer al restringir la autofagia. *Oncogen*, 36 (5), 667-677.

Gooding, A. J., & Schiemann, W. P. (2020). Epithelial-Mesenchymal Transition Programs and Cancer Stem Cell Phenotypes: Mediators of Breast Cancer Therapy Resistance. *Molecular cancer research : MCR*, 18(9), 1257–1270. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-20-0067>

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

Hilton, S. H., & White, I. M. (2021). Advances in the analysis of single extracellular vesicles: A critical review. *Sensors and Actuators Reports*, 3, 100052. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2021.100052>

Howlader, N., Cronin, K. A., Kurian, A. W., & Andridge, R. (2018). Differences in Breast Cancer Survival by Molecular Subtypes in the United States. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 27(6), 619–626. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-0627>

Huang, C., Park, C. C., Hilsenbeck, S. G., Ward, R., Rimawi, M. F., Wang, Y. C., ... & Schiff, R. (2011). β 1 integrin mediates an alternative survival pathway in breast cancer cells resistant to lapatinib. *Breast cancer research*, 13(4), 1-15.

Hyter, S., Hirst, J., Pathak, H., Pessetto, Z. Y., Koestler, D. C., Raghavan, R., Pei, D., & Godwin, A. K. (2017). Developing a genetic signature to predict drug response in ovarian cancer. *Oncotarget*, 9(19), 14828–14848. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23663>

Hwang, S. Y., Park, S., & Kwon, Y. (2019). Recent therapeutic trends and promising targets in triple negative breast cancer. *Pharmacology & therapeutics*, 199, 30-57.

INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama. Comunicación de prensa [Internet]. [Citado 2022 Feb 13. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2020/Cancerma20.pdf>

Instituto Nacional del Cáncer (2021) *¿Qué es el cáncer?* Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>

Ji, Q., Xu, X., Song, Q., Xu, Y., Tai, Y., Goodman, S. B., Bi, W., Xu, M., Jiao, S., Maloney, W. J., & Wang, Y. (2018). miR-223-3p Inhibits Human Osteosarcoma Metastasis and Progression by Directly Targeting CDH6. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(5), 1299–1312. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.03.009>

Kanchanapally, R., Deshmukh, S. K., Chavva, S. R., Tyagi, N., Srivastava, S. K., Patel, G. K., ... & Singh, S. (2019). Drug-loaded exosomal preparations from different cell types exhibit distinctive loading capability, yield, and antitumor efficacies: a comparative analysis. *International journal of nanomedicine*, 14, 531.

Karthikeyan, S., Lantvit, D. D., Chae, D. H., & Burdette, J. E. (2016). Cadherin-6 type 2, K-cadherin (CDH6) is regulated by mutant p53 in the fallopian tube but is not expressed in the ovarian surface. *Oncotarget*, 7(43), 69871.

Lakhani, S. R., & O'Hare, M. J. (2000). The mammary myoepithelial cell-Cinderella or ugly sister? *Breast Cancer Research*, 3(1), 1-4.

Lee, J. S., Yost, S. E., & Yuan, Y. (2020). Neoadjuvant treatment for triple negative breast cancer: recent progresses and challenges. *Cancers*, 12(6), 1404.

Li, X., Corbett, A. L., Taatizadeh, E., Tasnim, N., Little, J. P., Garnis, C., ... & Li, I. T. (2019). Challenges and opportunities in exosome research—Perspectives from biology, engineering, and cancer therapy. *APL bioengineering*, 3(1), 011503.

Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R., & Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043), 834–838. <https://doi.org/10.1038/nature03702>

Luo, S., Lin, R., Liao, X., Li D., & Yuzhou Q. (2021) Identification and verification of the molecular mechanisms and prognostic values of the cadherin gene family in gastric cancer. *Sci Rep* **11**, 23674 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03086-1>

Lv, M. M., Zhu, X. Y., Chen, W. X., Zhong, S. L., Hu, Q., Ma, T. F., ... & Zhao, J. H. (2014). Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein. *Tumor Biology*, *35*(11), 10773-10779.

Ma, C., Zhao, J. Z., Lin, R. T., Zhou, L., Chen, Y. N., Yu, L. J., ... & Zhang, T. (2018). Combined overexpression of cadherin 6, cadherin 11 and cluster of differentiation 44 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oncology letters*, *15*(6), 9498-9506.

Macías Abraham, Consuelo. (2006). Moléculas de adhesión: Importancia en la respuesta inmune e inflamatoria. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, *22*(2) Recuperado en 24 de noviembre de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892006000200003&lng=es&tlng=es.

Malanchi, I., Santamaria-Martínez, A., Susanto, E., Peng, H., Lehr, H. A., Delaloye, J. F., & Huelsken, J. (2012). Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*, *481*(7379), 85-89.

Maravillas-Montero, José Luis, & Martínez-Cortés, Ismael. (2017). Los exosomas de las células presentadoras de antígeno y su papel en la regulación de las respuestas inmunológicas. *Revista alergia México*, *64*(4), 463-476. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i4.285>

Mao, X., Xu, J., Wang, W., Liang, C., Hua, J., Liu, J., ... & Shi, S. (2021). Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. *Molecular cancer*, *20*(1), 1-30.

Milman, N., Ginini, L., & Gil, Z. (2019). Exosomes and their role in tumorigenesis and anticancer drug resistance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, *45*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.07.003>

Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M. Á., ... & Sánchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*.

Ng, C. K., Schultheis, A. M., Bidard, F. C., Weigelt, B., & Reis-Filho, J. S. (2015). Breast cancer genomics from microarrays to massively parallel sequencing: paradigms and new insights. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *107*(5).

Obenauf, A. C., & Massagué, J. (2015). Surviving at a distance: organ-specific metastasis. *Trends in cancer*, *1*(1), 76-91.

Pareja, F., Geyer, F. C., Marchiò, C., Burke, K. A., Weigelt, B., & Reis-Filho, J. S. (2016). Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. *NPJ breast cancer*, *2*, 16036. <https://doi.org/10.1038/npjbcancer.2016.36>

Pamies, D., Leist, M., Coecke, S., Bowe, G., Allen, D. G., Gstraunthaler, G., Bal-Price, A., Pistollato, F., de Vries, R. B. M., Hogberg, H. T., Hartung, T., & Stacey, G. (2022). Guidance document on Good Cell and Tissue Culture Practice 2.0 (GCCP 2.0). *ALTEX*, 39, 30–70. <https://doi.org/10.14573/altex.2111011>

Pertz, O., Bozic, D., Koch, A. W., Fauser, C., Brancaccio, A., & Engel, J. (1999). A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *The EMBO journal*, 18(7), 1738-1747.

Perocheau, D., Touramanidou, L., Gurung, S., Gissen, P., & Baruteau, J. (2021). Clinical applications for exosomes: Are we there yet?. *British journal of pharmacology*, 178(12), 2375–2392. <https://doi.org/10.1111/bph.15432>

Pouliot, Y. (1992). Análisis filogenético de la superfamilia de las cadherinas. *Bioensayos*, 14 (11), 743-748.

Rebuzzini, P., Zuccotti, M., Redi, C. A., & Garagna, S. (2016). Achilles' heel of pluripotent stem cells: genetic, genomic and epigenetic variations during prolonged culture. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 73(13), 2453–2466. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2171-8>

Reis-Filho, J. S., Simpson, P. T., Gale, T., & Lakhani, S. R. (2005). The molecular genetics of breast cancer: the contribution of comparative genomic hybridization. *Pathology-Research and Practice*, 201(11), 713-725.

Reis-Filho, J.S. & Tutt, A.N.J. (2008), Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*, 52: 108-118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02889.x>

Rosenberger, L., Ezquer, M., Lillo-Vera, F., Pedraza, P. L., Ortúzar, M. I., González, P. L., ... & Alcayaga-Miranda, F. (2019). Stem cell exosomes inhibit angiogenesis and tumor growth of oral squamous cell carcinoma. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.

Rovira, J., Diekmann, F., Campistol, J. M., & Ramírez-Bajo, M. J. (2017). Uso terapéutico de las vesículas extracelulares en insuficiencia renal aguda y crónica. *Nefrología*, 37(2), 126–137. doi:10.1016/j.nefro.2016.04.0

Sánchez-Sánchez, L., Vazquez-Hernandez, V. and López-Marure, R. (2005) *Papel de las cadherinas en la metástasis - UNAM*, Revista de Educación Bioquímica. 24(3,4): 97-103.

Sancisi, V., Gandolfi, G., Ragazzi, M., Nicoli, D., Tamagnini, I., Piana, S., & Ciarrocchi, A. (2013). Cadherin 6 is a new RUNX2 target in TGF- β signalling pathway. *PLoS one*, 8(9), e75489.

San Miguel Fraile, P., Gómez de María, C., Donis Quintairos, L., Carrera Vázquez, A., Iglesias Martínez, P., & Barreiro Barbosa, M^aJ.. (2007). Expresión de cadherina E y cateninas en los carcinomas uroteliales. *Actas Urológicas Españolas*, 31(4), 355-360.

Simpson, P. T., Reis-Filho, J. S., Gale, T., & Lakhani, S. R. (2005). Molecular evolution of breast cancer. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 205(2), 248-254.

Singh, S., Numan, A., Maddiboyina, B., Arora, S., Riadi, Y., Md, S., ... & Kesharwani, P. (2021). The emerging role of immune checkpoint inhibitors in the treatment of triple-negative breast cancer. *Drug discovery today*, 26(7), 1721-1727.

Schey, K. L., Luther, J. M., & Rose, K. L. (2015). Proteomics characterization of exosome cargo. *Methods (San Diego, Calif.)*, 87, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.03.018>

Spellicy, S. E., & Stice, S. L. (2021). Tissue and stem cell sourced extracellular vesicle communications with microglia. *Stem Cell Reviews and Reports*, 17(2), 357-368.

Streuli, C. H. (2009). Integrins and cell-fate determination. *Journal of cell science*, 122(2), 171-177.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Sotomayor, M., Gaudet, R., & Corey, D. P. (2014). Sorting out a promiscuous superfamily: towards cadherin connectomics. *Trends in cell biology*, 24(9), 524-536.

Tang, W., Xia, M., Liao, Y., Fang, Y., Wen, G., & Zhong, J. (2022). Exosomes in triple negative breast cancer: From bench to bedside. *Cancer letters*, 527, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.12.009>

Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews immunology*, 2(8), 569-579.

Vella, L. J., Behren, A., Coleman, B., Greening, D. W., Hill, A. F., & Cebon, J. (2017). Intercellular resistance to BRAF inhibition can be mediated by extracellular vesicle-associated PDGFR β . *Neoplasia*, 19(11), 932-940.

Villarreal-Garza, C., Mohar, A., Bargallo-Rocha, J. E., Lasa-Gonsebatt, F., Reynoso-Noverón, N., Matus-Santos, J., Cabrera, P., Arce-Salinas, C., Lara-Medina, F., Alvarado-Miranda, A., Ramírez-Ugalde, M. T., & Soto-Perez-de-Celis, E. (2017). Molecular Subtypes and Prognosis in Young Mexican Women With Breast Cancer. *Clinical breast cancer*, 17(3), e95–e102. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2016.11.007>

Villarreal-Garza, C., Ferrigno, A. S., Mesa-Chavez, F., Platas, A., Miaja, M., Fonseca, A., Cruz-Ramos, M., Mohar, A., Bargallo-Rocha, J. E., & Chapman, J. W. (2021). Improving Collection of Real-World Data: The Experience of the Joven & Fuerte Prospective Cohort for Mexican Young Women With Breast Cancer. *Clinical breast cancer*, 21(6), e675–e680. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2021.04.005>

Vis, D. J., Bombardelli, L., Lightfoot, H., Iorio, F., Garnett, M. J., & Wessels, L. F. (2016). Multilevel models improve precision and speed of IC50 estimates. *Pharmacogenomics*, 17(7), 691–700. <https://doi.org/10.2217/pgs.16.15>

- Wei, D., Zhan, W., Gao, Y., Huang, L., Gong, R., Wang, W., ... & Kang, T. (2021). RAB31 marks and controls an ESCRT-independent exosome pathway. *Cell research*, 31(2), 157-177.
- Webber, J. P., Spary, L. K., Sanders, A. J., Chowdhury, R., Jiang, W. G., Steadman, R., ... & Clayton, A. (2015). Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene*, 34(3), 290-302.
- Wu, Y., Jin, X., Harrison, O., Shapiro, L., Honig, B. H., & Ben-Shaul, A. (2010). Cooperativity between trans and cis interactions in cadherin-mediated junction formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(41), 17592-17597.
- Xie, F., Zhou, X., Fang, M., Li, H., Su, P., Tu, Y., ... & Zhou, F. (2019). Extracellular vesicles in cancer immune microenvironment and cancer immunotherapy. *Advanced Science*, 6(24), 1901779.
- Xu, Y., Liu, Y., Yang, C., Kang, L., Wang, M., Hu, J., ... & Tang, H. (2016). Macrophages transfer antigens to dendritic cells by releasing exosomes containing dead-cell-associated antigens partially through a ceramide-dependent pathway to enhance CD 4+ T-cell responses. *Immunology*, 149(2), 157-171.
- Yang, C., Zhao, X., Cui, N., & Liang, Y. (2017). Cadherins Associate with Distinct Stem Cell-Related Transcription Factors to Coordinate the Maintenance of Stemness in Triple-Negative Breast Cancer. *Stem cells international*, 2017, 5091541. <https://doi.org/10.1155/2017/5091541>
- Yang, W., Soares, J., Greninger, P., Edelman, E. J., Lightfoot, H., Forbes, S., Bindal, N., Beare, D., Smith, J. A., Thompson, I. R., Ramaswamy, S., Futreal, P. A., Haber, D. A., Stratton, M. R., Benes, C., McDermott, U., & Garnett, M. J. (2013). Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC): a resource for therapeutic biomarker discovery in cancer cells. *Nucleic acids research*, 41(Database issue), D955–D961. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1111>
- Zhao, S., Mi, Y., Guan, B., Zheng, B., Wei, P., Gu, Y., Zhang, Z., Cai, S., Xu, Y., Li, X., He, X., Zhong, X., Li, G., Chen, Z., & Li, D. (2020). Tumor-derived exosomal miR-934 induces macrophage M2 polarization to promote liver metastasis of colorectal cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00991-2>
- Zhou, M., Chen, J., Zhou, L., Chen, W., Ding, G., & Cao, L. (2014). Pancreatic cancer derived exosomes regulate the expression of TLR4 in dendritic cells via miR-203. *Cellular immunology*, 292(1-2), 65-69.
- Zhou, H. M., Zhang, J. G., Zhang, X., & Li, Q. (2021). Targeting cancer stem cells for reversing therapy resistance: Mechanism, signaling, and prospective agents. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 1-17.
- Zeng, A. L., Yan, W., Liu, Y. W., Wang, Z., Hu, Q., Nie, E., ... & You, Y. P. (2017). Tumour exosomes from cells harbouring PTPRZ1–MET fusion contribute to a malignant phenotype and temozolomide chemoresistance in glioblastoma. *Oncogene*, 36(38), 5369-5381.
- Zuo, L. L., Zhang, J., Liu, L. Z., Zhou, Q., Du, S. J., Xin, S. Y., ... & Lu, J. H. (2017). Cadherin 6 is activated by Epstein–Barr virus LMP1 to mediate EMT and metastasis as

an interplay node of multiple pathways in nasopharyngeal carcinoma. *Oncogenesis*, 6(12), 1-16.