BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE TOMOSYN (STXBP5) EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADA EN BIÓLOGIA

PRESENTA:
BRENDA ITZEL CALDERÓN PÉREZ

DIRECTORA : MARICRUZ ANAYA RUÍZ

ABRIL 2021

INDICE

1. INTRODUCCIÓN 11

1.2. ANTECEDENTES GENERALES 13
1.2.1. ESTADÍSTICAS DEL CANCER 13
1.2.2. CÁNCER Y CARACTERISTICAS DE LAS CÉLULAS 17
1.3. LA GLANDULA MAMARIA **22**
1.3.1. CÁNCER DE MAMA 23
1.3.2. ETAPAS DEL CÁNCER DE MAMA 24
1.3.3. METASTASIS 24
1.3.4. DIAGNÓSTICO 26
1.3.5. TIPOS DE CÁNCER Y SUBTIPOS 27
1.3.6. TRATAMIENTOS 28

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS 29

2.1. COMUNICACIÓN CELULAR A TRAVÉS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES 29
2.1.1. VESÍCULAS CELULARES EN CÁNCER 30
2.1.2. VESÍCULAS DEL SISTEMA NEURONAL 31
2.2. COMPLEJO SNARE 32
2.3. TOMOSYN (STXBP5) 33
2.3.1. TOMOSYN (STXBP5) EN LAS ENFERMEDADES 35

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN 37

4. HIPÓTESIS 39

5. OBJETIVO GENERAL 39

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 39

6. MATERIAL Y MÉTODOS 40

6.1. SITIO DE ESTUDIO 40
6.2. DESCRIPCIÓN DEL MODELO DE ESTUDIO 40
6.3. METODOLOGÍA 41
6.3.1. CULTIVOS CELULARES 42
6.3.2. IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA TOMOSYN (STXBP5) 42
6.3.3. SOBRE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TOMOSYN (STXBP5) 50
6.3.4. EVALUACIÓN DE LA SOBRE EXPRESIÓN DE TOMOSYN (STXBP5) 53
6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS 54

7. RESULTADOS 56

7.1. IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA TOMOSYN (STXBP5) EN LÍNEAS DE CÁNCER DE MAMA 56
56
7.1.1. OBTENCIÓN Y ELABORACIÓN BIO-INFORMÁTICA DE LOS SET´S DE PRIMER´S O CEBADORES CON UNA SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO DE TOMOSYN (STXBP5) PARA RT-PCR. 56
7.1.2. EXPRESIÓN DE TOMOSYN (STXBP5) EN LAS LÍNEAS CELULARES DETERMINADA POR RT-PCR. 57
7.1.3. EXPRESIÓN DE TOMOSYN (SXTBP5) EN LAS LÍNEAS CELULARES DETERMINADA POR WESTERN BLOT. 58
7.1.4. DETERMINACIÓN DE EXPRESIÓN DE TOMOSYN (STXBP5) POR SU INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DETERMINADA POR CITOMETRÍA DE FLUJO. 59
7.1.5. LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA TOMOSYN (STXBP5) EN LAS CELULARES DE LAS LÍNEAS CELULARES POR INMUNOFLUORESCENCIA. **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
7.2. SOBRE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TOMOSYN (STXBP5) 62
7.2.1. CITOMETRÍA DE FLUJO PARA COMPROBAR DE LA SOBRE EXPRESIÓN DE TOMOSYN (STXBP5). 62
7.2.2. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN CÉLULAS QUE SOBRE EXPRESARON A TOMOSYN (STXBP5) 63
7.2.3. ENSAYO DE MUERTE CELULAR GENERADA POR LA SOBREEXPRESIÓN DE TOMOSYN 68

8. DISCUSIÓN 72

9. CONCLUSIÓN 76

10. BIBLIOGRAFÍA 77

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DEL SUBTIPO DE CÁNCER DE MAMA. 28
TABLA 2. CONCENTRACIONES PARA LA CUANTIFICACIÓN PROTEICA DE TOMOSYN (STXBP5). 43
TABLA 3. ANTICUERPOS USADOS EN EL WESTERN BLOT. 45
TABLA 4. ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA LAS TÉCNICAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO E INMUNOFLUORESCENCIA. 48
TABLA 5. PRIMERS DEL VECTOR DE EXPRESIÓN LENTIVIRAL ORF. 50
TABLA 6. SECUENCIA DE LOS SET´S DE PRIMER´S PARA TOMOSYN (STXBP5). 56
TABLA 7. PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS U87MG CON LA SOBRE - EXPRESIÓN DE TOMOSYN (STXBP5). 64
TABLA 8. PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS MDA-MB-231 CON LA SOBREEXPRESIÓN DE TOMOSYN (STXBP5). 66
TABLA 9. PROLIFERACIÓN DE LAS CELULAS MCF7 CON LA SOBRE-EXPRESIÓN DE TOMOSYN (STXBP5). 68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia de cáncer a nivel mundial, datos tomados de GLOBOCAN 2020.. 14
Figura 2. Porcentaje de mortalidad de diferentes cánceres, datos de GLOBOCAN 2020.. 15
Figura 3. Incidencia de tipos de cáncer en México en el 2020. Datos obtenidos del Observatorio Internacional de Cáncer (GLOBOCAN).. 16
Figura 4. Porcentaje de la mortalidad por diferentes tipos de cáncer en México, 2020. Datos obtenidos del Observatorio Internacional de Cáncer (GLOBOCAN). 17
Figura 5. Características de las células cancerígenas. Modificado de Hanahan y Weinberg, cell (2011). 18
Figura 6. Anatomía de la glándula mamaria, (2019). 22
Figura 7. Vesícula extracelular y sus diferentes tipos de cargo, (2019). 30
Figura 8. Estructura-unión del complejo SNARE. Basada de PyMOL, representada en formato PBD, (2004),. 33
Figura 9. Modelo de TOMOSYN (STXBP5), Homo Sapiens (humano), 2019. SWISS-MODEL. 34
Figura 10. Unión de STXBP5 (Tomosyn) con el complejo SNARE, (2019). 35
Figura 11. Esquema de las fases metodológicas. 41
Figura 12. Esquema del Vector pLX304-Blast-V5 por secuencia de Tomosyn (STXBP5), Horizon CCSB-Broad Lentiviral Expression Collection..... 50
Figura 13. Electroforesis obtenida de la hibridación de Tomosyn (STXBP5) con un control HPRT (2-6) y el Set 2 de Tomosyn (8-12) 57
Figura 14. Identificación de Tomosyn de 130 kDa. 58
Figura 15. Citometría de Flujo de las líneas celulares que expresan a la proteína Tomosyn (STXBP5),..... 59
Figura 16. Inmunofluorescencia de la línea celular u87MG. 60
Figura 17. Inmunofluorescencia de la línea celular MDA-MB-231. 61
Figura 18. Inmunofluorescencia de la línea celular MCF7. 61
Figura 20. Proliferación celular de la línea U87MG con sobre – expresión (S.– E.) de Tomosyn (STXBP5).. 63
Figura 21. Proliferación celular de la línea MDA-MB-231 con la sobre- expresión (S.-E.) de Tomosyn (STXBP5).. 65
Figura 22. Proliferación celular de la línea MCF7con sobre-expresión (S.-E.) de Tomosyn (STXBP5). 67
Figura 23. Análisis de muerte celular de las células U87MG con sobre-expresión de Tomosyn (STXBP5) 69
Figura 24. Análisis del ensayo de muerte celular de la línea celular MDA-MB-231, con sobre-expresión de Tomosyn (STXBP5) y del control (sin sobre expresión). 70
Figura 25. Análisis del ensayo de muerte celular de la línea celular MCF7, con sobre expresión de Tomosyn (STXBP5) y del control (sin sobre expresión).. 71

ABREVIATURAS Y SIGLAS

1.	**OMS**	Organización Mundial de la Salud
2.	**NIH**	National Institutes of Healt
3.	**IARC**	International Agency for Research on Cancer
4.	**GLOBOCAN**	Global Cancer Observatory
5.	**INEGI**	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
6.	**ULACCAM**	Unión Latinoamericana Contra el Cáncer de la Mujer
7.	**EV**	Vesículas extracelulares
8.	**DNA**	Ácido desoxirribonucleico
9.	**RNA´s**	Ácido Ribonucleicos
10.	**BRCA 1**	Gen supresor de tumores humano (Breast Cancer 1)
11.	**BRCA2**	Gen supresor de tumores humano (Breast Cancer 2)
12.	**p53**	Gen que elabora una proteína (Tumor Potein 53)
13.	**AECC**	Asociación Española Contra el Cáncer
14.	**CDC**	Centers for Diseases Control and Prevention
15.	**GEICAM**	Grupo Español de Investigación sobre Cáncer de Mama
16.	**PgR**	Receptor a progesterona
17.	**ER**	Receptor a estrógenos
18.	**egrf**	Factor de crecimiento epidérmico
19.	**nm**	Nanómetros
20.	**SNARE**	Complejo de proteínas (Soluble NSF Attachement Proteín)
21.	**ATCC**	American Type Culture Collection
22.	**uv**	Radiación Ultravioleta
23.	**CO2**	Dióxido de carbono
24.	**BSA**	Bovine Serum Albumine
25.	**SFB**	Suero Fetal Bovino
26.	**A/B-**	Antibiótico Penicilina
27.	**RPMI**	Roswell Park Memoria Institute Medium 1640
28.	**PBS**	Buffer o Tampón fosfato salino (Buffer Phospate Saline)
29.	**EDTA**	Ácido etilendiaminotetraacético (Ethylenediaminetetra acetic)
30.	**RIPA**	Buffer o tampón de extracción y lisis celular
31.	**kDa**	Kilo Daltones
32.	**PVDF**	Fluoruro de polivinilideno
33.	**TBS**	Tampón de Tris Salino (Tris-Buffered Saline)
34.	**ncbi**	National Center of Biotechnology Information
35.	**IDT**	Integrated DNA Technologies

RESUMEN

Tomosyn (STXBP5) es una proteína de 130 kDa que pertenece a la familia SNARE. Su función principal está implicada en la regulación del procesos de exocitosis entre membranas, evidenciándose que al sobre-expresarse disminuye la actividad exocítica. Al estar envuelta en esta comunicación celular, Tomosyn (STXBP5) se vuelve clave en la búsqueda de un desciframiento y mejor entendimiento en los procesos de interacción celular y su relación con otras proteínas, razón que justifica estudiar su sobre-expresión en enfermedades asociadas a cambios en la comunicación celular, como el cáncer. En este trabajo, a través de diferentes técnicas moleculares se identificó y caracterizó por primera vez a Tomosyn (STXBP5) en líneas celulares de cáncer de mama (U87MG, MDA-MB-231 Y MCF7). Por medio de una sobre-expresión en las líneas celulares, interesantemente se evidenció que disminuye la proliferación celular y por consiguiente, se mostró un aumento en la muerte celular. Con estos resultados, se puede considerar a Tomosyn (STXBP5) como una proteína clave en la sobrevivencia de células cancerosas, postulándola como un posible blanco para el tratamiento de este padecimiento.

Tomosyn (STXBP5) is a 130 kDa protein which belongs to the SNARE family. Its principal function is implicated in the regulation of the exocytosis process between membranes, evidencing that overexpression is involved in this cellular communication, Tomosyn (STXBP5) becomes key in the search for a deciphering and better understanding of the processes of cellular interaction and its relationship with other proteins, which is the reason for studying its overexpression in diseases associated with changes in cellular communication, such as cancer. In this work, through different molecular techniques, Tomosyn (STXBP5) was identified and characterized for the first time in breast cancer cell lines (U87MG, MDA-MB-231 and MCF7). Through over expression in the cell lines, interestingly it was evidenced that it decreases cell proliferation and consequently showed an increase in cell death. With these results, Tomosyn (STXBP5) can be considered as a key protein in the survival of cancer cells, postulating it as a possible target for the treatment of this disease.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las patologías de mayor preocupación en la sociedad actual, es considerada como la sexta causa de muerte a nivel mundial (OMS, 2018). En este padecimiento se alteran los mecanismos regulatorios de división y muerte celular, pudiendo formar masas celulares llamadas tumores e invadir diferentes tejidos (NIH, 2015). Los principales factores que influyen para el padecimiento de cáncer son asociados a la genética propia del individuo, infección por virus o bacterias y factores predisponentes de nuestro estilo de vida, como una mala alimentación, excesos de tabaquismo, alcoholismo y factores externos como la radiación solar, entre otros (American Cancer Society, 2019).

Las estadísticas mundiales en el 2018, relacionadas a cáncer, registraron 18.1 millones de nuevos casos, presentándose una mortalidad de 9.6 millones de personas (IARC, 2018) y una predicción de más de 20 millones de casos para el 2030 (OMS, 2019). Por el tipo de tejido u órgano donde se desarrolla esta enfermedad, actualmente se reportan más de 100 tipos de cáncer, entre ellos el de mama, que es uno de los más severos; al respecto , ésta neoplasia se posiciona en el segundo lugar en incidencia, justo detrás del cáncer de pulmón. GLOBOCAN informa que en el 2018 se diagnosticaron un poco más de 2 millones de casos nuevos a nivel mundial con este tipo de padecimiento. En México, representa la tercera causa de muerte en mujeres (INEGI, 2018), registrándose 27,283 casos nuevos, que constituye una tasa de incidencia del 41.6 % y una mortalidad del 9.9% (GLOBOCAN, 2018).

El diagnóstico correcto del cáncer de mamá, es una herramienta fundamental para su eliminación y sobrevivencia de la portadora, sobre todo cuando se diagnostica en etapas tempranas (ULACCAM, 2019). Este diagnóstico puede iniciar con una autoexploración, seguido de métodos por imagen (mamografía, ultrasonido, etc.), biopsias del tejido y pruebas químicas. Estas últimas, permiten diagnosticar y clasificar el subtipo o inmunofenotipo de cáncer en:

Luminal A y B, Basal, Her2/neu, y triple negativo, mediante biomarcadores moleculares.

Los biomarcadores permiten definir el tratamiento más idóneo, dependiendo del subtipo de cáncer y puede ser desde quimioterapias, tratamientos hormonales o radioterapéuticos; así como predecir posibles recaídas. Actualmente existen tres biomarcadores: estrógenos, progesterona y el oncogén HER2, (Zepeda *et al*., 2008). La creciente tasa de incidencia y mortalidad de este padecimiento, despierta el interés por descubrir y estudiar nuevas moléculas, que sirvan de biomarcadores para diagnosticar de manera más asertiva el subtipo de tumor y la diseminación celular (Austidillo *et al*., 2010). Una de las propuestas se centra en la red de comunicación celular a través de vesículas extracelulares.

Las vesículas extracelulares (EV) son estructuras provenientes de las propias células, que pueden ser fragmentos proteicos, lípidos o RNAs. Éstas se encuentran envueltas por una membrana que las protege y faculta para recorrer grandes distancias, comunicando así a las células, sin necesidad de contacto directo (Sandoval *et al*., 2014). Este tipo de comunicación se da tanto en células normales, como en células anormales o cancerígenas, sobre todo en el proceso de invasión a otros tejidos (Zhang *et al*., 2014). Las EV regulan el comportamiento de las células de nuestro sistema, que pueden ser desde las reproductivas hasta células del sistema neuronal, (Kalra *et al*., 2016).

En la comunicación neuronal, las vesículas son las responsables de liberar el neurotransmisor que desencadenará el comportamiento sucesivo de estas células. Este mecanismo se realiza por la fusión de la vesícula extracelular con la membrana plasmática y la liberación del cargo de la vesícula, proceso conocido como exocitosis (Südhof, 2014), el cual se realiza con la participación de complejos proteicos, que son formados por una familia de proteínas denominadas SNARE; entre las que se encuentran, sintaxinas, SNAP´s y sinaptobrevinas, que se localizan en ciertas zonas de las membranas plasmáticas predestinadas a fusionarse (Merino *et al*., 2009).

Por otra parte, existen varias proteínas regulando el proceso de exocitosis, entre ellas destaca Tomosyn o sintaxin binding portein 5 (STXBP5). Una proteína SNARE que se ubica en el citosol de la membrana plasmática, que tiene unión con sintaxina 1 y SNAP25, cuyo rol es cambiar la logística vesicular; estudios demuestran que cuando se une a este complejo, disminuye la actividad del proceso de exocitosis, impidiendo o bloqueando la comunicación celular (Ashery *et al*., 2009).

1.2. ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1. ESTADÍSTICAS DEL CÁNCER

Con base a un análisis en 195 países, se estimó que en el 2016, el cáncer fue la sexta causa de muerte en el mundo (OMS, 2020). Para el 2020, se registraron un poco más de 19 millones de casos nuevos y con una clasificación de GLOBOCAN basada en su tasa de incidencia, como se muestra en la Figura 1, se reportó que el 54% de los casos se concentraron en 7 órganos específicos y el 46% restante, se distribuyó en una gran diversidad de tejidos y órganos como la piel, riñón, leucemias, etc.; esto posiblemente debido a que son órganos blancos, más expuestos a factores tanto ambientales, malos hábitos de vida y factores genéticos.

Comentado [m1]: YA ESTAN CIFRAS 2020.. SOLO CORROBORA ESTAS Y PON BIBLIOGRAFIA

El cáncer de mama es el que tiene una mayor incidencia con 2 261 419 (11.7%) de casos, casi igualado por el de pulmón que registró 2 206 771 (11.4%) casos, en tercer lugar está el cáncer de colon con 1 931 590 (10%) y después por orden cronológico se ubicaron el cáncer de próstata (7.3%), de estómago (5.6%), de hígado (4.7%) y cervicouterino (3.1%).

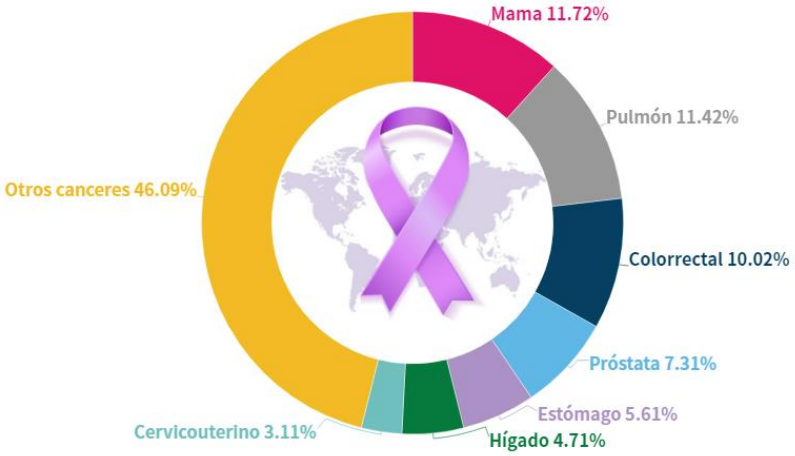

Figura 1. Incidencia de cáncer a nivel mundial, datos tomados de GLOBOCAN 2020. Edición propia.

La tasa de mortalidad a nivel mundial es significativa, por lo que cada país estructura una estrategia para poder combatir los decesos por esta causa; sin embargo, a pesar de que se han redoblado esfuerzos para poder combatir esta enfermedad, la tasa de mortalidad del 2020 fue del 51.6% de los casos registrados.

A diferencia del porcentaje de incidencia arriba mencionado, los casos de muerte por cáncer fueron porcentualmente mayores en pulmón con un 18% y el de mama ocupó la quinta posición con 6.9% de los decesos, posiblemente debido a que existe un protocolo de autoexploración que facilita una detección temprana. Como se muestra en la Figura 2, el 39.2% de las muertes por cáncer se concentraron de manera significativa en pulmón, en menor medida y casi al mismo nivel colorrectal, hígado, estómago y en porcentajes menores, el cáncer de mama, de esófago y páncreas (GLOBOCAN, 2020).

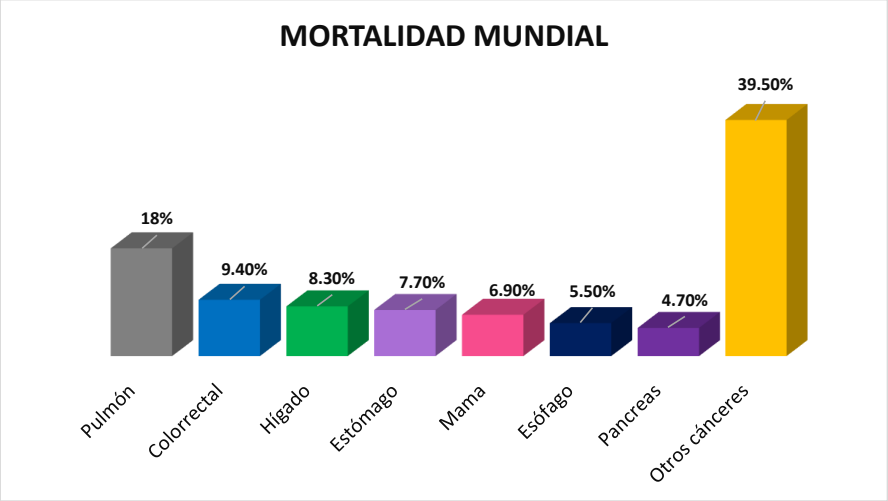

Figura 2. Porcentaje de mortalidad de diferentes cánceres, datos de GLOBOCAN 2020. Edición propia.

En México se registraron 195 499 casos de cáncer en el año 2020 (Figura 3), y la tendencia a futuro puede ser similar a la predicha a nivel mundial. A pesar de las campañas de prevención que se ofrecen a la población para la prevención y detección temprana, el cáncer con mayor incidencia es el cáncer de mama con 29 929 casos (15.3%), seguido del cáncer en próstata 26 742 (13.6%). La causa de que estos dos tipos de cáncer se presenten en la población, se relacionan con factores hereditarios; al respecto, Castro *et al.* (2019), asociaron esta patología a mutaciones en el oncogén supresor de tumores BRCA2.

Dentro de los factores de riesgo más marcados en la población Mexicana y que puede afectar de manera significativa su salud, son los malos hábitos alimenticios, por lo que el cáncer colorrectal con 14 901 casos (7.6%) se encuentra en tercer lugar. Otros tipos de cáncer con incidencia significativa son el de tiroides y el cervicouterino. Los cinco tipos de cáncer antes mencionados, representan el 46.8% y el porcentaje complementario (53.2% o 92 238 casos), corresponde a toda una gama de tipos, que aunque son minoritarios, representan un importante problema de salud pública.

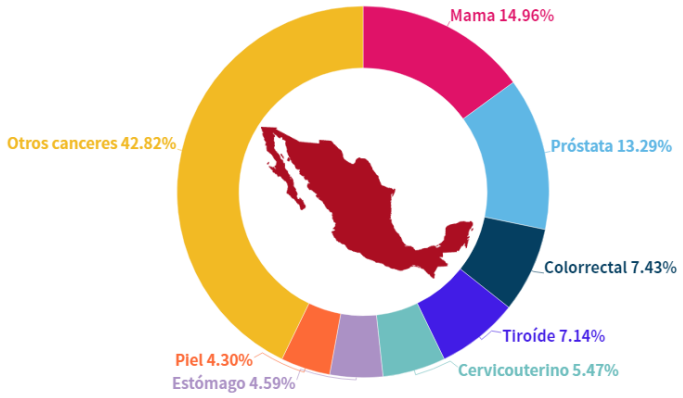

Figura 3. Incidencia de tipos de cáncer en México en el 2020. Datos obtenidos del Observatorio Internacional de Cáncer (GLOBOCAN). Edición propia.

A nivel nacional, la incidencia de cáncer dentro de la población mexicana provocó 90 222 muertes, que representa un 46.1% de los casos totales reportados para esta enfermedad (GLOBOCAN, 2020). Esta patología es estimada como la cuarta causa de defunción en la población mexicana, por debajo de padecimientos de corazón, COVID-19 y diabetes (INEGI, 2018). Según datos recaudados de GLOBOCAN (Figura 4), el cáncer de mama es el más mortal, pues solo en el año 2020, cobró 7 931 (8.7%) vidas. Después se encuentra el cáncer colorrectal con 7 755 (8.5%). Casi en el mismo nivel de mortalidad que el cáncer de mama y colorrectal, se encuentra el de próstata e hígado. En un segundo grupo se encuentra el cáncer de pulmón y el de estómago, finalmente un tercer grupo donde se ubica la leucemia. Estos siete tipos mencionados son causales del 57.6% de las muertes debidas a cáncer, dejando un importante porcentaje a otros tejidos.

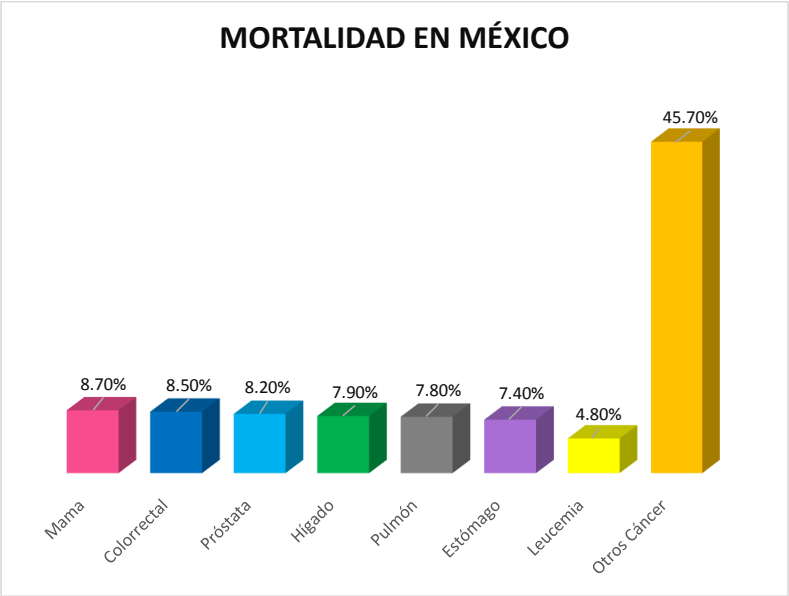

Figura 4. Porcentaje de la mortalidad por diferentes tipos de cáncer en México, 2020. Datos obtenidos del Observatorio Internacional de Cáncer (GLOBOCAN). Edición propia.

1.1.2. CÁNCER Y CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS

La definición de cáncer, se centra en la capacidad de las células para desarrollar autonomía y no regirse por los mecanismos que regulan su replicación, por lo que pueden producir anaplasia o tumores, e invadir a otros tejidos (Cajaraville et al., 2011). Según Hanaganh y Weinberg (2011), las células cancerígenas son definidas por 10 características (Figura 5), que modifican su vida celular, como se aborda en los siguientes párrafos.

Figura 5. Características de las células cancerígenas. Modificado de Hanahan y Weinberg, cell (2011).

1) Mutación e inestabilidad genómica

En una célula normal existen varios mecanismos que controlan la acumulación de mutaciones en el material genético, lo cual ocurre de manera espontánea. Esto es predispuesto por distintos factores como, ambientales, agentes biológicos y/o genética del individuo. Los mecanismos consisten en la detención del ciclo celular, reparaciones de DNA y la destrucción de la célula por apoptosis. Sin embargo, en las células cancerígenas todos estos mecanismos de control, son eliminados por las mismas mutaciones que se transmite generacionalmente de célula en célula, dando pie a una inestabilidad genómica.

2) La inflamación tumorigénica

Los tejidos se encuentran formados por diferentes tipos de células, cuando estas producen una aglomeración, se forma un tumor que puede ser benigno (células normales) o maligno (células cancerígenas). En los tumores malignos, las células cancerígenas establecen una colaboración con otras células que se encuentren en el tejido, como fibroblastos anormales, endoteliales y células pertenecientes al sistema inmune adaptativo e innato.

Este conjunto de células van a propiciar a que se desarrolle un microambiente tumoral, el cual se encarga de dar soporte tanto nutricional como funcional. En este “nuevo” microambiente, las células del sistema inmune adaptativo e innato, disrupten con su trabajo principal de barrera vigilante, y efectúan una señalización para iniciar con un proceso de inflamación. Durante este, se promueve la activación de factores que impulsan el crecimiento tumoral. El efecto que provoca un estrés genotóxico en las células, permite el desarrollo de nuevas mutaciones y estímulos para que las células migren hacia un nuevo tejido, es decir el proceso de metástasis.

3) Señalización proliferativa sostenida y sin restricción.

Normalmente las células obtienen el estímulo de crecimiento para entrar al ciclo celular, por factores o señales externas. Estos estímulos, que en su mayoría son factores de crecimiento, se dirigen a los receptores ubicados en la superficie de la membrana, mandando una respuesta al estímulo y consecutivamente activan las vías de señalización intracelular. Sin embargo, en las células cancerígenas estas se vuelven hipersensibles a dichos estímulos por las mutaciones de los genes que son encargados de la proliferación celular, lo cual modifica el nicho celular y el proceso de señalización para continuar con su proliferación continuamente.

4) Evasión de supresores de crecimiento.

Las células cancerígenas tienden a tener una hipersensibilidad a estímulos de proliferación, por lo que disminuye las respuestas a los estímulos que inhiben el crecimiento. Evaden todos los posibles mecanismos que tiene naturalmente para su regulación, los cuales son controlados por genes supresores de tumores como p53, BRCA1 y BRAC2; los cuales en una célula tumoral son mutados para desinhibir su actividad.

5) Evasión de la apoptosis.

Las células anormales del cáncer como ya se mencionó, tienden a disolver todas las señales que por normatividad regulan sus procesos de funcionalidad y perdurabilidad. Esto implica evadir señales tanto de manera extrínseca como intrínseca, que llevan a desencadenar a la apoptosis o muerte programada.

6) Potencial de replicación (inmortalidad).

Una vez inhibiendo todo el mecanismo y señalizaciones que llevan a la célula a la apoptosis, las células cancerígenas generan la activación de una inmortalización. Por lo general la célula normal tiene un límite de replicación celular llamado Hayflic, permitiendo que esta solo se reproduzca las veces necesarias señaladas por su información de expresión de una proteína llamada telomerasa. Esta agrega fragmentos de ADN a los extremos de los cromosomas (Telómeros), pero en cada replicación, estos telómeros sufren un acotamiento, provocando por ende que las células tengan un límite y se prepare para una muerte por apoptosis.

Sin embargo, en células cancerígenas existe un aumento en la expresión de esta proteína, la cual continúa agregando fragmentos repetitivos, evitando que los telómeros se acorten en cada repetición y por consecuencia se desprograma su muerte por apoptosis (Sánchez, 2013).

7) Supresión de la respuesta del sistema inmune.

La funcionalidad del sistema inmune es la inmunovigilancia y blindar la protección ante cualquier agente peligroso previéndonos de respuestas para poder combatir en situaciones que comprometan la estabilidad de nuestro sistema. Cuando clones cancerígenos se propagan, este los elimina por un operativo que es realizado por las células del sistema inmune innato y adaptativo que detectan un patrón proteico diferente.

Sin embargo, las células cancerígenas pueden mutar variando patrones de expresión, por ende, cambia todo para su reconocimiento por parte del antígeno. Las fallas en este sistema para reconocer este tipo de células dejan al sistema inmunocomprometido, dejando a la célula proliferar y entrar en

equilibrio con respecto a las células del sistema inmune y continuar con su proliferación.

8) Activación de invasión y metástasis.

Una característica fundamental por la cual esta patología, tiene mayor probabilidad de muerte para quien lo padece es, la invasión y metástasis. Cuando un grupo de células del tumor primario, tienen la capacidad de diseminarse a distancia de su origen e invadir otros tejidos. Esto es debido a una mutación que reduce la expresión de proteínas como la E-cadherina, la cual permiten mantener a las células adheridas entre sí y a la matriz celular. Por lo cual, la célula tumoral pierde el anclamiento a un epitelio específico.

9) Desregularización energética de la célula.

Todas las modificaciones a las que se somete una célula cancerígena para su supervivencia desestabilizan su ciclo normal, por lo que se ve obligada a reprogramar su metabolismo energético. Una célula normal de manera aeróbica procesa la glucosa necesaria para su mantenimiento y poderlo convertir en la mitocondria, en dióxido de carbono. La célula tumoral al mutar y obtener poco oxígeno (efecto Warburg), tiene que seguir generando la misma glucosa para su subsistencia por lo que, sobre expresan transportadores de oxígeno como GLUT1 y poseer más disponibilidad.

10) Angiogénesis

La desregularización energética conlleva a que la célula tumoral opte por una angiogénesis sostenida. La angiogénesis es el proceso por el cual, se forman nuevos vasos sanguíneos de los mismos pre-existentes para poder llevar oxígeno y nutrientes ante el estímulo tumoral. Toda esta reacción es a través de las vías en las que participan factores tanto, pro y anti-angiogénicos. Esto deriva una señal de hipoxia local; es decir la ausencia de oxígeno del tejido, y desencadena la cascada para generar la angiogénesis.

1.3. LA GLANDULA MAMARIA

La mama es un órgano glandular que se sitúa en el pecho. Este órgano está formado por tejido adiposo, glándulas y tejido conjuntivo. Una mama madura femenina como se representa en la Figura 6, comprende de 10 a 20 lóbulos o glándulas mamarias, agrupadas en lobulillos, que se encargan de producir la leche materna (NIH, 2019). Estos, se conectan a conductos galactóforos de diferentes tamaños, desembocando a un conducto (ducto) principal en el pezón, que se encuentra rodeado por la areola (Valdez *et al.,* 2015).

Los vasos sanguíneos proporcionan sangre a las glándulas y vasos linfáticos para almacenar a la linfa. Estos vasos linfáticos por su parte, conectan a los ganglios linfáticos que se encuentran en las axilas y el esternón (AECC, 2018). La función principal de la mama es la generación de la lactancia, para alimentar a las crías; la cual es una característica primordial en los mamíferos. El proceso de maduración de la mama se finaliza con la gestación en el proceso de lactancia, el cual se ve regulado por el sistema endócrino con la segregación de estrógenos y progesterona (Valdez *et al*., 2015).

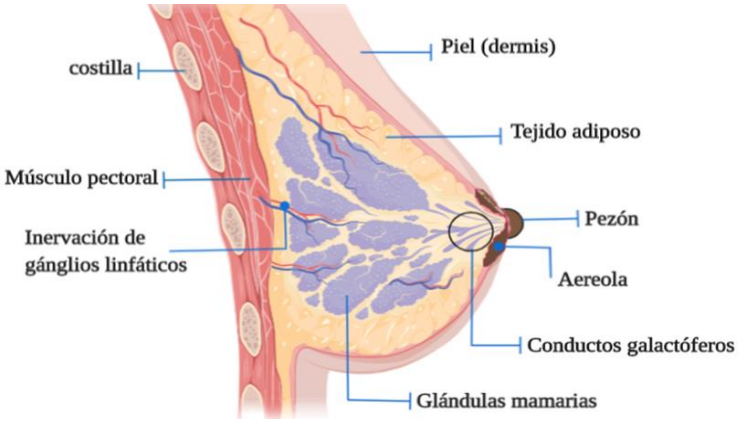

Figura 6. Anatomía de la glándula mamaria. Editada en Biorender (2019).

1.1.3. CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama, es una neoplasia que se da en las células de las glándulas mamarias, degenerando y transformando a las células en tumorales (ROCHE, 2020). En el 2020, GLOBOCAN diagnosticó 2 261 419 casos nuevos a nivel mundial. En México, esta neoplasia registró 29 929 casos nuevos, es la más incidente en mujeres y representa la tercera causa de muerte (INEGI, 2018). Los factores que desencadenan un cáncer de mama son: la edad avanzada; puesto a que la media de diagnóstico de cáncer de mamario es de 50 años en adelante (CDC, 2018).

Otro factor es la predisposición de genética, sobre todo si los genes BRCA1 y BRCA2, (encargados de la reparación del ADN y de la inhibición de tumores), se encuentran mutados provocando que puedan ser heredados de generación en generación, (Chirivella *et al*., 2018). La inestabilidad hormonal provoca que la segregación de estrógenos y progesterona que no cumplan con su estadio normal, desencadena menstruación precoz antes de los 12 años y menopausia tardía.

Por otra parte, la falta de embarazos o embarazos tardíos también pueden desencadenar esta neoplasia (CDC, 2018). Factores relacionados con nuestro estilo de vida actual. Una de las causantes tiene que ver con la dependencia de químicos como; el exceso de tabaquismo, alcohol, o medicamentos (Breast cancer, 2017).

Para finalizar, otro de los factores que actualmente sigue siendo fundamental para el desarrollo de diversas enfermedades, es la obesidad y el sobrepeso. Esta desorganización del metabolismo, derivado de la mala alimentación y el sedentarismo afecta 39% de la población adulta a nivel mundial; este padecimiento en mujeres, aumenta la posibilidad de desarrollar cáncer de mama en la etapa post-menopaúsica (Neuhouser e*t al.,* 2015)

1.1.4. ETAPAS DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama se desarrolla en 5 estadios, debido a que la célula pasa por varios cambios graduales, hasta tener la capacidad de liberar factores de transcripción, proteínas que modifiquen al nicho celular para poder seguir con su replicación y proliferación en órgano blanco (Cancerquest, 2020).

El estadio 0, es cuando las células del cáncer no tienen aún la capacidad de ser invasivas y se encuentran *in situ* en el tejido de origen. En el estadio 1, las células empiezan a replicarse sin control formando un pequeño tumor o bulto que mide máximo dos centímetros de diámetro sin invadir otros blancos.

Estadio 2, el tumor sigue midiendo dos centímetros y se extiende a los ganglios cercanos como el axilar. El siguiente estadio es el 3, en este el nódulo o tumor no ha alcanzado los 5 centímetro de diámetro pero sí ha migrado a las axilas y que el tumor se haya extendido a blancos cercanos de la glándula mamaria o lobulillos. Finalmente, el estadio 4 es un estado agresivo, pues el tumor ya se ha expandido a otros tejido y órganos cercanos, pues modifica sus nuevos blancos y así realizar metástasis (Roche Y America Cancer Society, 2019).

1.1.5. METASTASIS

La metástasis es un proceso que realizan las células tumorales de diseminación del sitio de origen a otros blancos (GEICAM, 2015). Se estima que una hay una relación asociada a la mortalidad en pacientes que padecen, cáncer metastásico (Cancerquest, 2019). Este proceso complejo, comprende varios cambios en las células y la transformación del nicho celular. La metástasis empieza con una transición de las células epiteliales a mesénquimales (EMT), esto implica la pérdida de adhesión al tejido o sustrato por parte de la célula y el contacto célula-célula, debido a la inhibición de las proteínas que aumentan su movilidad como la glucoproteína E-Cadherina, (Troncoso *et al*., 2017).

En la siguiente etapa las células tumorales realizan una invasión local. Esta migración es limitada por una barrera llamada lámina basal, que organiza y separa a los epitelios. Esta lámina se encuentra compuesta de proteínas-glicoproteínas y son reservorios de varios factores de crecimiento (Valastyan *et al.,* 2011). Para poder traspasar esta barrera proteica las células tumorales cuentan con la facultad de segregar un conjunto de enzimas de la familia metaloproteasa, las cuales tienen el rol de ser tijeras moleculares que cortan y degradan a la lámina basal, liberando el reservorio de factores de crecimiento (Troncoso et *al.,* 2017).

Una vez eliminando a la lámina basal y contando con movilidad, las células se transportan, ya sea por el sistema de las glándulas linfáticas y por el sistema sanguíneo (Roche, 2011). Para pasar el sistema circulatorio, estas células malignas estimulan la angiogénesis y atraviesan las paredes de los vasos sanguíneos. Posteriormente, las células se enfrentan a un reto de sobrevivencia en la circulación, pues pueden ser detectadas por el sistema inmunológico; sin embargo, estás células no se encuentran indefensas, puesto que desarrollan un mecanismo para evitar esta respuesta, lo cual es característico en una célula cancerígena (Valastyan *et al*., 2011).

Las células flotan por el torrente sanguíneo hasta encontrar un blanco que les proporcione un nicho accesible. Para que esto ocurra, las células realizan una extravasación para salir del torrente sanguíneo, pasando de nuevo por los vasos sanguíneos del órgano blanco, estableciéndose y modificando el nicho a uno pre-metastásico y así continuar con su proliferación (Arvelo *et al*., 2016). El nicho pre-metastásico, se forma incluso antes de que lleguen las células tumorales metastásicas al órgano diana. Este nicho se encuentra formado por diversas proteínas, factores de crecimiento y de vesículas extracelulares secretadas por las células del tumor primario; las cuales son enviadas al nicho pre-metastásico para comunicar a ambos (Peinado *et al*., 2017).

Una vez formado el nicho pre-metastásico la célula tumoral primaria empieza a comunicarse con éste y poder viajar al órgano diana, proliferar y realizar así la metástasis. Los órganos dianas más recurrentes para realizar este proceso, son los pulmones, hígado, cerebro y huesos, (Paget, 1989).

1.1.6. DIAGNÓSTICO

El correcto diagnóstico del cáncer de mamá, sobre todo en etapas tempranas es una herramienta fundamental para eliminarlo y garantizar la sobrevivencia de quien lo padece (ULACCAM, 2019). La autoexploración juega un papel importante, revisando que no haya nódulos o secreciones extrañas; el diagnóstico consiste en varios pasos. Se inicia con métodos de imagen, como la mamografía, una técnica basada en rayos x que potencian la visualización del tejido mamario.

Otro método de imagen es la ecografía, donde ondas sonoras de alta frecuencia, generan imágenes en una pantalla de manera digital. Se recomienda que las mujeres a partir de los 40 años se realicen una cada 2 años, puesto que ayuda a diagnosticar el cáncer en etapas tempranas. En caso de tener menos de 30 años se realizan las ecografías basándose en un ultrasonido, aportando datos de tumores formados por líquidos o por masa sólida.

Ya descubierto el tumor, se pasa a realizar una biopsia; es decir, la extracción del tejido de la mama microscópica, esto se puede extraer por punción, endoscopia o intervención quirúrgica. Ya extraído se analiza distinguiendo el estadio, el subtipo y distribución de células tumorales, con la valoración de los biomarcadores o receptores hormonales (Progesterona y Estrógenos) y del gen HER2 (American Cancer Society, 2019).

1.1.7. TIPOS DE CÁNCER DE MAMA Y SUBTIPOS

Esta neoplasia se puede clasificar por su nivel de invasión, existen cánceres de tipo *in situ*; cuando el cáncer se encuentra dentro de los conductos galactóforos y no traspasa a otros órganos. Por otra parte, se le denomina cáncer de tipo infiltrante cuando rompe los conductos galactóforos e invade en primera estancia al tejido adiposo que rodea el conducto, para posteriormente invadir a las glándulas lactantes y diseminarse a través, del sistema linfático y sanguíneo para poder llegar a otros órganos diana, (Roche, 2011).

Comentado [H2]: Completa la idea.

La segunda clasificación es por el tipo de tejido de origen y aspecto de las células, los cánceres se pueden originar en los lóbulos o glándulas mamarias y ductales en la parte de revestimiento del conducto. Dentro del tipo de cánceres ductales existen invasivos y generan otros subtipos; el mieloide, mucinoso o coloide y el tubular (American Cancer Society, 2019).

La clasificación molecular, se realiza a través de receptores hormonales, los cuales especifican el subtipo de cáncer; actualmente solo existen 5 biomarcadores y clasifican en: **subtipo basal**, el cual presenta ausencia del receptor de estrógenos (RE), del receptor de progesterona (PgR) y del receptor de HER2/neu (HER2); sin embargo es positivo a las citoqueratinas CK14, CK5/6 o al factor de crecimiento epidérmico (EGRF).

El subtipo **luminal A**, corresponde a receptores hormonales positivos: RP y RE y negativo a Her2; el **luminal B** se divide en dos; luminal B positivo a RP, RE y HER2 y luminal B positivo a RP y ER pero negativo a Her2. En el tipo **HER2**, los los factores de RP y RE son negativos, y positivo al factor de Her2. Por último se encuentra el **subtipo triple negativo**; puesto que da negativo a los biomarcadores de RP, ER y HER2 (Tabla 1) (Zepeda *et al*., 2008, Austudillo *et al*., 2014 y Rakha *et al*., 2010).

Tabla 1. Clasificación del subtipo de cáncer de mama.

INMUNOFENOTIPO (RECEPTORES)					
SUBTIPO	RE	RP	HER2/neu	EGRF	CK14/CK5/6
LUMINAL A	+	+	--	--	--
LUMINAL B	+	+	+/-	--	--
BASAL	--	--	--	+	+
HER2/neu	--	--	+	--	--
TRIPLE NEGATIVO	--	--	--	--	--

1.1.8. TRATAMIENTOS

Una vez identificado el tumor, los diferentes análisis clínicos y patológicos, indicarán la mejor opción de tratamiento y predecir también posibles recaídas, (Austudillo *et al.*, 2014). Existen cinco tratamientos para combatir el cáncer de mama: uno es la cirugía: consiste en la extirpación del tumor y puede realizarse por tres métodos, la segmentectomía, la tumorectomía y la mastectomía radical modificada (NIH, 2017).

La radioterapia, se enfoca en aplicar una dosis de radiaciones ionizantes, se encarga de eliminar a las células cancerosas, a través de rayos modifican el ADN de estás, permitiendo que se obtenga nuevas mutaciones que impiden la sobrevivencia de ésta (Cancerquest, 2018). Otro tratamiento es por Terapia Hormonal, dado que las células tienden a quedarse con la habilidad de responder a cambios hormonales y modificarse dependiendo de la señal, este tratamiento se da por el bloqueo a los receptores endócrinos de progesterona y estrógenos, lo que inhibe el crecimiento y el desarrollo de la célula. Esta terapia se suministra por la ingesta de medicamentos como el Tamoxifeno, e inhibidores de la Aromatasa (NIH, 2017).

Al igual que la terapia hormonal; la Terapia Biológica, consiste en la administración de fármacos los cuales servirán como vehículos o agentes de acción, que estimulan la respuesta del sistema inmunológico y como consecuencia, activen los mecanismos de reconocimiento de células

anormales, con el fin de llevarlas a su eliminación por apoptosis. Dentro de esta misma terapia se encuentra el suministro de anticuerpos específicos que reconocen el sitio y ataque directamente a una célula cancerígena (NIH, 2017).

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Comentado [m3]: CHECA LA NUMERACIÓN

2.1. COMUNICACIÓN CELULAR A TRAVÉS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Actualmente, una de las tendencias en investigación se enfoca en la búsqueda de una amplia gama de biomarcadores que permiten clasificar de manera más asertiva el subtipo de cáncer y la posible diseminación temprana de este padecimiento. Lo que llevaría a encontrar nuevos tratamientos que, dependiendo de esa clasificación maximicen su potencial de acción para combatir a las células anormales. Pero sobre todo el uso de biomarcadores que identifiquen cánceres de tipo triple negativo, pues a la fecha es uno de los subtipos más mortífero (Austudillo *et al.*, 2014 y Breast cancer, 2019).

Una de las propuestas para el nuevo desarrollo de biomarcadores, se basa en la comunicación celular a través de vesículas extracelulares (Skog *et al*., 2008). Este enfoque se debe al descubrimiento de los científicos Súdhof, Schekman y Rothman, ganadores del premio Nobel de Fisiología en el 2013, quienes postulan la existencia de una maquinaria celular que permite indirectamente la comunicación entre estas. A través del tráfico de moléculas o cargos en el interior de un orgánulo llamado vesícula extracelular, que regulan el comportamiento celular y garantizan su sobrevivencia (Yánez-Mo *et al*., 2015, Kalra *et al.,* 2016 y Thery *et al*., 2002).

Las vesículas extracelulares, son estructuras que provienen de las propias células; se forman por una bicapa (membrana) alrededor de 80 a 90 nanómetros en diámetro. Se han identificado los cargos más comunes en las vesículas extracelulares, los cuales son: fragmentos de tipo proteicos, lípidos,

RNAs, micromoléculas, etc. Las vesículas extracelulares, se encuentran clasificadas en 2 grandes grupos, los exosomas (50 a 100 nm) y las microvesículas (100 a 1000 nm). Estas tienen, la capacidad de recorrer grandes distancias para poder comunicar a las células sin la necesidad de contacto directo (Sandoval *et al*., 2014) y vincularse a varios sistemas fisiológicos, incluyendo al sistema neuronal (Faure *et al.,* 2006).

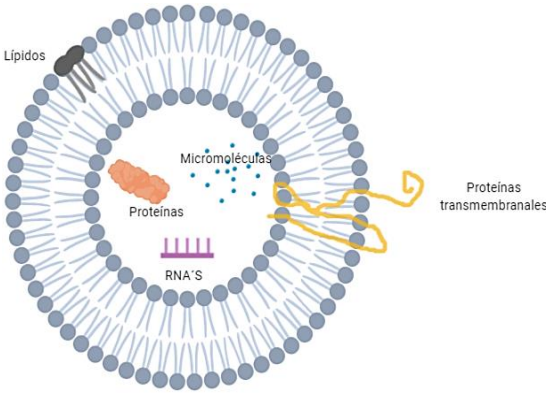

Figura 7. Vesícula extracelular y sus diferentes tipos de cargo. Edición en Biorender (2019).

2.1.1. Vesículas celulares en cáncer

Posterior al descubrimiento de la comunicación celular, las vesículas extracelulares han sido de gran estudio en varias patologías sobre todo las degenerativas neuronales, tales como Alzheimer y el síndrome de Parkinson, principalmente (Gómez *et al*., 2018). Actualmente se sigue estudiando este mecanismo vesicular empleándolo sobre todo para la detección de diferentes enfermedades y también en la implementación en terapias dirigidas (Andaloussi *et al*., 2013). En cáncer, se han desarrollado varias investigaciones sobre estas vesículas secretadas por las células malignas, concluyendo en que poseen la habilidad de regular la trasmisión de señales oncogénicas a través de la comunicación autócrina y/o parácrina; pues traspasan RNAs y proteínas para el desarrollo tumoral. También son encargadas de los procesos de regulación

en cuanto a la progresión tumoral, es decir la proliferación, des-diferenciación, invasión y migración, en el establecimiento de nichos pre-metástásicos, al igual que en la producción de factores inflamatorios, la angiogénesis y la inhibición de la respuesta inmune (Bouvy *et al.,* 2014 y Ciardiello *et al*., 2016).

La propuesta de utilizar a las vesículas extracelulares como biomarcadores ha sido considera y ha denotado que al estudiar los efectos de estas vesículas que regulan estos procesos en cascada, se podría disminuir su potencialidad de proliferación. En un estudio realizado por Peínado y colaboradores en el 2012, se comprueba que la inhibición de proteínas Rab´s (reguladoras de la comunicación vesicular), específicamente Rab27A, reduce el crecimiento y diseminación de células de melanomas metásticas, reeducando al sistema progenitor, en este caso la médula ósea. De la misma familia Rab´s, el grupo de Hendrix et al., (2010), remarca que al bloquear por completo a RAB27B específicamente, se inhibe la proliferación *in vitro* de células de adenocarcinoma metastásico de mama. Otros estudios estipulan como una nueva terapia anticancerígena, aquella que es a través de la eliminación de las vesículas del suero de la sangre, mediante diálisis dirigidos por anticuerpos y lectinas, lo cual capturará las vesículas y elimina la captación de vesículas e inhibirá a las células cancerígenas, factores de crecimiento de tumores y los procesos metastásicos, (Nashida *et al.,* 2017 y Marleau *et al*., 2012).

2.1.2. Vesículas del sistema neuronal

En el sistema neuronal, las células se comunican a través de la transmisión sináptica mediante neurotransmisores, que a su vez, se encuentran sintetizados en las vesículas y liberados en el espacio extracelular (Kandel y Cols., 2000). A estos procesos se le conoce como exocitosis y endocitosis, y constituyen un caso particular de tráfico vesicular, en donde la membrana de la vesícula se fusiona con la membrana plasmática de la célula.

El proceso de exocitosis consiste de 3 etapas fundamentales. En la primera etapa, las vesículas extracelulares que almacenan al neurotransmisor, se

preparan para la interacción de la vesícula sináptica con la membrana plasmática, el docking o atraque vesicular, lo que produce la maduración vesicular, que conlleva a generar una competencia secretora, proceso denominado priming (Chen, *et al.,* 2001). Por último, la fusión de las membranas que se desencadena por la entrada de Calcio producida por el potencial de acción.

En la segunda etapa fundamental, el protagonismo es de un complejo de proteínas, el cual está conformado por un factor sensible a N-etilmaleina NSF, proteínas SNARE, proteínas SM y proteínas Rab´s. Donde el factor NSF (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor, NSF) es el encargado de la generación de formas monoméricas de las proteínas SNARE. Las proteínas SM son un grupo de 7 proteínas solubles que tiene como función, estabilizar la unión de proteínas SNARE y la regulación de este, una vez formado este complejo la célula recibe la señal de fusionarse.

En la última parte, una vez que sucede la exocitosis, el tráfico vesicular se dispone a trabajar al contrario del ciclo, ahora desde la membrana plasmática hacia el interior celular, empleando el mecanismo de la endocitosis, donde se reciclan las membranas vesiculares que servirán para una nueva exocitosis (Bustillos *et al*., 2009).

2.2. Complejo SNARE

Comentado [m4]: Ch eca bien el texto..

El complejo SNARE (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor-Attachment protein Receptor), es una super familia conformada por 36 proteínas. Estas proteínas tienen la particularidad, de formar un motivo SNARE cuando entran en contacto entre sí. Este consiste en un ramillete súper enrollado helicoidal con 4 hélices α (Alfas), paralelas y compactadas, que le dan al complejo proteico estabilidad conformacional. En el dominio SNARE, se sitúan 16 capas o anillos integrados por cadenas laterales de aminoácidos pertenecientes a los propios motivos, (Brunger, 2005; Südorf*, 1995* y 2004; Galli *et al*., 2004 y Zylbersztejn *et al*., 2011).

Comentado [m5]: Que no es figura 8??

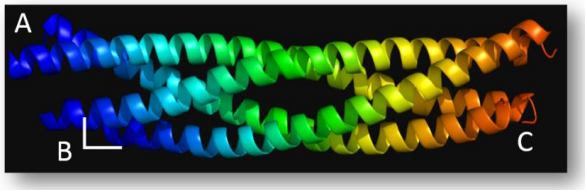

Figura 8. Estructura-unión del complejo SNARE. Basada de PyMOL, representada en formato PBD (2004), ramillete conformado por A) Sintaxina 1, B) Snap 25 (Dos ramilletes) y c) sinaptobrevina o VAMP 2.

Cada proteína, se encuentra formada de entre 60 a 70 aminoácidos. Una de las principales conformaciones que se da por el ramillete de 4 alfa hélices paralelas (Figura 8), es la de Sintaxina 1 que se une con Snap-25 en la membrana plasmáticas (t-SNARE) y VAMP 2 o sinaptobrevina que se encuentra en la membrana vesicular (v-SNARE). Sin embargo, para que se de esta fusión plasmática existen reguladores como lo son las proteínas SM, Amisyn (STXBP6) y Tomosyn (STXBP5) entre otras, (Scales *et al.,* 2002; Bustillo *et al.,* 2006).

2.3. TOMOSYN (STXBP5)

La regulación del funcionamiento de membranas es un mecanismo sumamente complejo, que se define en espacio-tiempo; ya que predestina la formación de señales sinápticas que disparan el comportamiento de los sistemas (Janh *et al*., 2006). Existen varias proteínas regulando el proceso de docking y priming vesicular, entre ellas encontramos a Tomosyn o Sintaxin Binding Protein 5 (STXBP5).

Esta proteína tiene un peso molecular de 130 kDa, cuenta con tres dominios: una región C–terminal con un radical SNARE. La segunda región es una N-terminal enriquecida con repeticiones WD40, formando súper enrollamientos helíticos. El último es un dominio hipervariable, que permite la unión de la proteína a diferentes estructuras (Ashery, *et al*., 2009), como lo muestra la Figura 9. Tomosyn (STXBP5) presenta tres isoformas, la principal llamada m-

Tomosyn, la segunda de mayor tamaño b- Tomosyn y por ultimo una de menor tamaño s-Tomosyn. Cada una de las isformas tiene sitios claves de expresión, la isoforma m y s-tomosyn, se encuentran principalmente en cerebro, mientras que la isoforma b- Tomosyn se expresa de manera ubicua, (Yokoyama *et al*., 1999). Esta proteína es expresada por el gen STXBP5 que se encuentra en el cromosoma 6 en humanos.

Comentado [H6]: Hice la figura de abajo más pequeña, perdón creo que modifique el dibujo..ponlo como lo tenias porfa, solo que mucho más chico, considero que estaba muy grande.. ponle algún marco, etc..

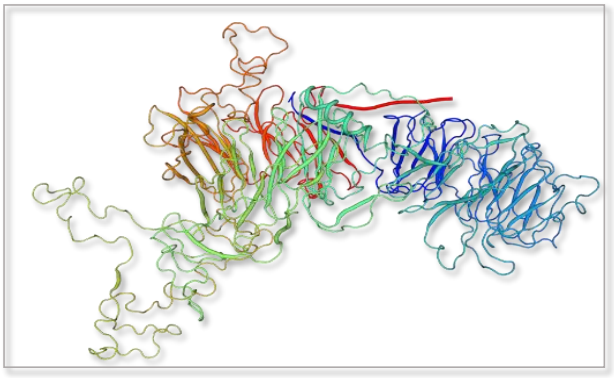

Figura 9. Modelo de TOMOSYN (STXBP5), Homo Sapiens (humano), 2019. SWISS-MODEL. A) Dominio C- terminal en rojo-naranja, B) Dominio N-terminal WD40 en verdes y C) Dominio hipervariable en azul marino.

Tomosyn (STXBP5) se encuentra en el citosol y se caracteriza por tener una unión a Sintaxina 1, por esta unión recibe su nombre: donde “Tomo” en japonés significa amigo y “Syn” de Sintaxina. Se ha demostrado que esta unión disminuye competitivamente la actividad de una proteína SM Much18 y VAMP2, disociándola de Sintaxina 1 y SNAP 25 (Fujitai, *et al.* 1998; Geerts *et al*., 2017 y Zylbersztejn *et al*., 2011).

Tomosyn (STXBP5) tiene el papel de cambiar la logística vesicular. Estudios demuestran que cuando se sobre-expresa, inhibe la movilización y la fusión competente de vesículas, pues bloquea el proceso de priming; es decir el paso que permite el acercamiento entre la membrana de la vesícula y la membrana citoplasmática, Figura 10, (Yizhar, *et al.*, 2007 y Uri Ashery *et al.,* 2009).

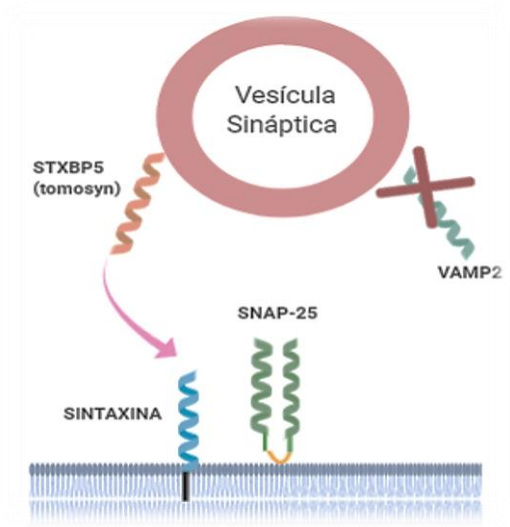

Figura 10. Unión de STXBP5 (Tomosyn) con el complejo SNARE, edición Biorender (2019).

2.3.1. Tomosyn (STXBP5) en las enfermedades

Debido a la actividad de regulación que tiene Tomosyn, esta ha sido estudiada para visualizar la importancia de la proteína en la salud vascular y neuronal. El efecto regulatorio de Tomosyn, se da por su dominio de repetición WD40. Se ha estudiado que la sobre-expresión de esta proteína, inhibe cualquier proceso de fusión entre membranas plasmáticas con vesículas de células secretoras neuroendócrinas y neuronales. Si bien, todavía no se tiene un panorama de la selectividad de Tomosyn con respecto a su regulación, esta puede inhibir la mayoría de los fusionamientos, o actuar como facilitadora de secreción de otro tipos de células (Ahery *et al.,* 2009).

Para contrastar este efecto de la sobre-expresión, se ha visualizado en ratones que, mutaciones al gen de stxp5 o un agotamiento en él, es decir una expresión menor de la proteína, aumenta la transmisión sináptica (Sakisaka *et al.,* 2008). Tras estos estudios Davis y colaboradores, se percataron que la expresión del gen de stxbp5 tiene un papel importante en el desarrollo de niños con enfermedades neurosicológicas como el autismo.

Otro papel en el que se encuentra inversa a Tomosyn, es en la regulación de la secreción de las células β-pancreáticas, las cuales son encargadas de la formación de la insulina. Pues esta, se encuentra expresada dentro de los compartimientos de los gránulos secretores de insulina, esto se demostró, por la sobre-exprsión de Tomosyn (STXBP5) en células β de ratón, la cual disminuyó significativamente la exocitosis celular (Zhang *et al*., 2006).

En 2006, Cheviet y colaboradores, silenciaron la expresión de Tomosyn en células β-de rata INS-1E, específicamente llegaron a que además de expresarse en los gránulos, esta entra en acción en un proceso posterior de acoplamiento, el cual prepara los gránulos secretores para la fusión y es necesario para mantener la exocitosis de las células beta pancreáticas, Mientras que también su expresión es importante para la respuesta a los secretagogos o sustancias liberadora de insulina externas como medicamentos.

Tomosyn se encuentra directamente relacionada con la secreción y regulación de la comunicación celular, por lo que es también clave en la red de proteínas que regulan el factor homeostático Von Willebrand. Este factor es el encargado de señalizar a las plaquetas de posibles daños, de reparar vasos rotos y células endoteliales.

Schillemans y colaboradores en el 2019, demostraron que niveles bajos de este factor incrementa el riesgo de padecer hemorragias sanguíneas y trombosis. Este padecimiento es de alta importancia, debido a una correlación que tiene con el cáncer, ya que los pacientes pueden presentar estos síntomas en neoplasias o cánceres en etapas avanzadas (Monreal *et al*., 2006 y Levitan et al., 1999); sin embargo, también se puede mostrar como primer síntoma de un cáncer que aún no muestra síntomatología, (Riete, 2017).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el cáncer de mama es una de las patologías en la que año tras año incrementa su incidencia y mortalidad en México y el mundo entero, clasificándose como un problema de salud pública de primer orden. Se estima que para el 2030 los casos de este padecimiento se incrementen en un 75% (OMS, 2018). Debido a este incremento de casos, las autoridades de salud han impulsado estrategias de detección temprana, clasificación del cáncer y tratamiento adecuado para garantizar la sobrevivencia del paciente.

Cabe señalar que dichas estrategias son inservibles puesto que la mayoría de los nuevos casos son detectados en etapas avanzadas, y son cánceres de tipo silencioso (triples negativos) o los tratamientos no funcionan. Por lo anterior, es necesario buscar nuevos métodos de detección, clasificación y tratamiento, pero ante todo un mayor entendimiento de todos los componentes y partícipes de los procesos que conlleva a la generación de este padecimiento.

Tras el descubrimiento del mecanismo de comunicación celular, a través de vesículas extracelulares, por los Doctores Südhorf, Rothman y Schekman en el 2013, se ha abierto un punto de partida, para entender mejor a la composición del ambiente celular tanto en células normales como tumorales.

La propuesta de estudio sobre estas vesículas (proteínas, lípidos o RNA´s), impone una nueva estrategia para el estudio de estas y su relación con los procesos tumorales, lo cual conllevaría, a la detección de nuevas moléculas (biormarcadores) capaces de detectar un ambiente tumoral e incluso regular este mismo, o de uso terapéutico.

Una de las piezas claves, es entender el papel que juegan estas vesículas y como interaccionan entre ellas, su regulación y de manera puntual, cuál es su participación en desarrollo tumoral. Actualmente se han estudiado diferentes

complejos asociados a vesículas extracelulares, pero sigue sin entenderse por completo el papel que juegan en patologías como el cáncer de mama.

Debido a estos descubrimientos sobre estas proteínas, en el laboratorio de Biología celular del Centro de Investigación Biomédica de Oriente, se ha enfocado en abrir una línea de investigación sobre estas proteínas. Entre las que se encuentran la glupoproteína sv2, proteínas VAMP´s, RAB´s y algunas metaloproteasas.

4. HIPÓTESIS

- Si la función de Tomosyn (STXBP5) es inhibir el proceso de comunicación vesicular, al sobre expresarla disminuirá la proliferación celular de las líneas de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF7.

5. OBJETIVO GENERAL

- Determinar si la sobre expresión de la proteína Tomosyn (STXBP5) tiene efecto en la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama.

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar y caracterizar la expresión de la proteína Tomosyn (STXBP5) en las líneas celulares de cáncer de mama.
- Sobreexpresar la proteína Tomosyn (STXBP5) en las líneas celulares de cáncer de mama.
- Evaluar los efectos de la sobreexpresión de Tomosyn (STXBP5) en líneas de celulares de cáncer de mama.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Sitio de estudio

Este trabajo de realizó en el laboratorio de Biología Celular I del Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR), perteneciente al Instituto Mexicano Del Seguro Social (IMSS). El cual se ubica en la clínica No. 5, Km 4.5 Carretera Federal Atlixco-Metepec., 74360 Metepec, Puebla, México. Este centro de investigación es especializado en Biología Celular, Biología Molecular, Biología de la Reproducción, Biotecnología de Productos Naturales, Virología y Oncoinmunología.

6.2. Descripción del modelo de estudio

En el presente estudio se utilizaron tres líneas celulares de cáncer de mama con morfología epitelial, correspondiendo a un control positivo y 2 líneas celulares problema. Estas fueron adquiridas de la casa comercial ATCC, substraídas del humano (*Homo sapiens*).

La línea control positiva fue la U87MG (ATCC), de tipo adherente, obtenida de tejido de cerebro con padecimiento de glioblastoma. La segunda línea celular utilizada fue la triple negativa MDA-MB-231 (ATCC), de tipo epitelial y adhesiva, que fue obtenida de tejido de la glándula de mama de un adenocarcinoma en una etapa de metástasis, invasivo y tumorigénica. La tercera línea celular utilizada fue la MCF7 (ATCC) de tipo epitelial y adhesiva, que fue obtenida de tejido de la glándula mamaria de un adenocarcinoma en una etapa de metástasis.

Las líneas celulares U87MG (ATCC) y la MDA-MB-231 (ATCC), se cultivaron con medio DMEM suplementado con SFB al 10% y 5% de A/B- penicilina. La tercera línea MCF7 (ATCC) se cultivó con el medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10% y 5% de A/B- penicilina. Las líneas se mantuvieron en zona de esterilidad, adquirida por la campana de flujo laminar/UV y se almacenaban para su confluencia o crecimiento en una incubadora a 37°C y 5% de CO2.

Dichas especificaciones se realizaron bajo el protocolo de la casa comercial ATCC.

6.3. Metodología

Para describir los efectos de la sobreexpresión de la proteína Tomosyn (STXBP5), la metodología consistió en cuatro fases como se muestra en la Figura 11. La primera fase consistió en el mantenimiento y crecimiento de las líneas celulares de cáncer de mama y glioblastoma, a través de cultivos específicos. La segunda se enfocó en identificar la proteína Tomosyn (STXBP5), a través de diferentes técnicas de detección y comprobación de su expresión en nuestro modelo de estudio, misma que se explican en párrafos subsecuentes.

Una vez detectada la proteína, se realizó la transfección de las células con el fin de poder sobreexpresar a Tomosyn (STXBP5). Esta transfección se elaboró

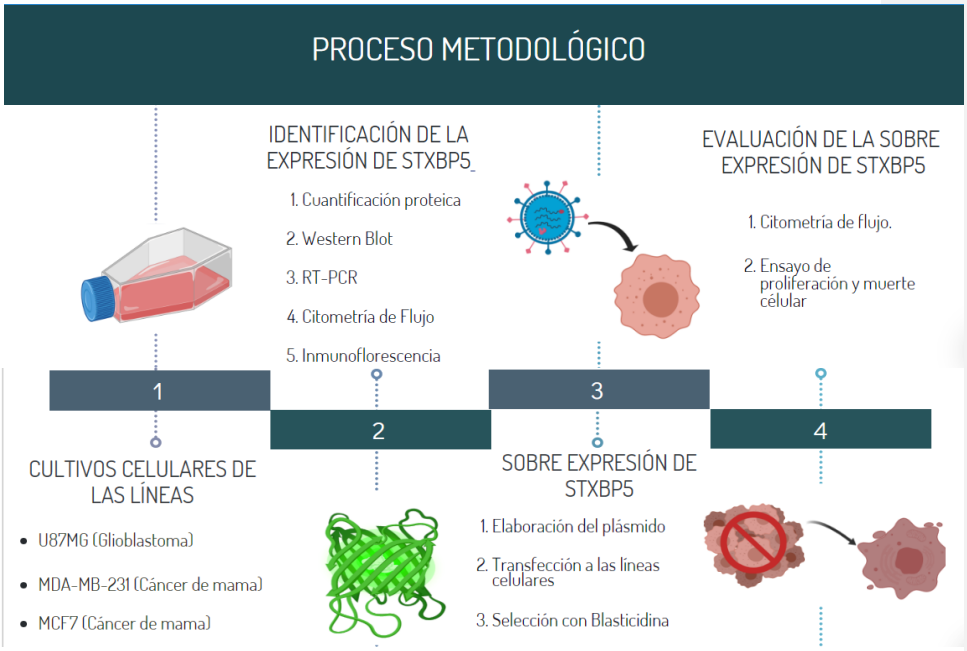

Figura 11. Esquema de las fases metodológicas.

por el método de DNA recombinante a través de un vector y seleccionando las células con sobreexpresión. En la última fase, se evaluó el efecto de dicha sobreexpresión, en las líneas celulares, a través de la proliferación y muerte celular.

6.3.1. Cultivos celulares

Las líneas celulares se cultivaron bajo las condiciones especificadas por la casa comercial ATCC de donde se obtuvieron. Todo el material ocupado se esterilizó con rayos UV durante 10 minutos. Se sembraron en cajas de cultivos de 25 ml estériles, realizando cultivos en monocapa; el cultivo se lavó con un buffer fosfato salino (PBS) y luego se le agregó el medio correspondiente.

Una vez obtenido la confluencia necesaria (70% a 90%), se tripsinizó con PBS-EDTA obteniendo una pastilla o pellet de las células, el cual se pasó a un tubo eppendorf, se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos. Para verificar la viabilidad del cultivo celular, se contabilizó el número de células con una cámara de Neubauer.

6.3.2. Identificación de la proteína Tomosyn (STXBP5)

6.3.2.1. Identificación de la proteína Tomosyn (STXBP5) mediante Western Blot

6.3.2.1.1. Obtención de extractos celulares

Para la obtención de extractos proteicos de las líneas celulares, los pellets se lavaron 3 veces con PBS, para eliminar cualquier residuo de medio de cultivo. Posteriormente, se agregó un tampón de extracción o lisis RIPA ([Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 1%, deoxicolato sódico 1%, SDS 0.1%, pH 7,4] complementado con inhibidores de proteasas (IP). Se sometieron a choques térmicos congelando a una temperatura de -81 °C por 5 minutos, se volvió a descongelar y homogenizar por pipeteo, este proceso se realizó 3 veces. Una vez terminada la lisis se centrifugó a 12,500 por 12 minutos a 4 °C,

(Sigma, 2016) y el sobrenadante corresponde al extracto total el cual se alicuotó y se almacenó a -20°C.

6.3.2.1.2. Cuantificación proteica por método Bradford

La cuantificación proteica se obtuvo a través del método de Bradford con azul de Coomassie G-250, se partió de la proteína Albumina (BSA) como estándar (Bradford, 1976). La curva se realizó con las diluciones mostradas en la tabla 2, que cumplen con el rango analítico del método. En una placa de 96 pozos se agregó por duplicado 200 µL de los estándares (ABS) y de las muestras de las líneas celulares, midiendo una absorbancia de 595 nm, en un lector Multi-Modal Synergy HTX y el software Gen5.

Tabla 2. Concentraciones para la cuantificación proteica de Tomosyn (STXBP5).

ALBUMINA (BSA)	H_2O	BRADFORD
0 uL	50 uL	1 mL
2.5 uL	47.5 uL	1 mL
5 uL	45 uL	1 mL
10 uL	40 uL	1 mL
15 uL	35 uL	1 mL
20 uL	30 uL	1 mL
25 uL	25 uL	1 mL
Líneas celulares estudiadas		
1 uL	40 uL	1 mL

Se graficó los resultados de absorbancia, en función de la concentración y se realizó análisis de regresión lineal simple. En donde, se consideró R^2 > 0,95 para que la curva sea estadísticamente aceptable. A partir de la ecuación de la

recta ($y = mx + b$), se despejó el valor de concentración que se requiere de concentración de las muestras de las líneas celulares para 30, 50 y 100 µg.

6.3.2.1.3. Separación de proteínas por peso molecular en geles de SDS-PAGE y transferencia

Las muestras de interés se prepararon para un corrimiento electroforético, a las cuales se disolvieron con un buffer de carga de muestra (60 mM de Tris-HCl, pH 6.8, 10% de glicerol, 2% de dodecilsulfato sódico, 1% de 2-mercaptoetanol y 0,002% de azul de bromofenol), se hirvieron durante 5 minutos para desnaturalizar la proteína y se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C. Obtenida las muestras se colocaron en geles SDS-PAGE al 10%, junto a un marcador de peso molecular (PageRuler prestained Protein Ladder, ThermoFisher) de amplio rango (10–170 kDa). Para el corrimiento electroforético se utilizó un sistema de cámara vertical Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, Madrid, España), a 100 V por 90 minutos y un buffer de corrimiento (25 mM de Tris-base, 192 mM de glicina y 1% de SDS).

Posteriormente, las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de PVDF o nitrocelulosa mediante una transferencia húmeda (buffer de transferencia: 25 mM de Tris-HCl pH 8,8; 192 mM de glicina; 20% de Metanol) a 90 V durante 1 hora. Se lavó la membrana con TBS 1X (TrisHCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0) y se bloqueó con un buffer de BSA (Albumina) al 5% y TBS-TWEEN (TBS y 0,2% de Tween-20) al 1%, durante una hora con agitación constante.

6.3.2.1.4. Inmunodetección

Se lavó la membrana con TBS 1X (TrisHCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0) y se bloqueó con un tapón de BSA (Albumina) al 5% y TBS-TWEEN (TBS y 0,2% de Tween-20) al 1%, durante una hora con agitación constante. Se volvió a lavar con TBS 1X y se incubó con una dilución del primer anticuerpo el Anti-

Tomosyn (STXBP5), especificaciones en la tabla 3, con TBS- TWEEN y ABS al 5%, durante toda la noche a 4 °C y bajo agitación constante.

Al día siguiente, se realizaron 6 lavados con TBS 1X y la membrana se incubó con el anticuerpo secundario, una dilución de Anti-conejo HRP (tabla 3), más TBS 1X y ABS 5%, durante 2 horas en agitación y a temperatura ambiente. Después la membrana se lavó varias veces y se reveló utilizando el substrato luminol (Thermo Scientific), escaneado la membrana con una cámara escáner para Western Blot por quimioluminiscencia (C-DIGIT- LI- COR), de la casa comercial BONSAI LAB.

Tabla 3. Anticuerpos usados en el Western Blot.

NOMBRE	TIPO	ORIGEN	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Anti-Tomosyn (STXBP5) ab41271	Policlonal	Conejo	1:500	ABCAM
Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) ab97064	Policlonal	Burro	1:100	ABCAM

6.3.2.2. Identificación de la proteína Tomosyn (STXBP5) por RT-PCR

6.3.2.2.1. Diseño de Primers u oligonucleótidos.

Para la amplificación de ADN de Tomosyn (STXBP5) por PCR, se elaboraron los pares de Primers u Oligonucleótidos específicos, los cuales se obtuvieron por la secuencia de RNAm de la proteína Tomosyn (STXBP5) (BC113382.1:49-3396 Homo sapiens syntaxin binding protein 5 (tomosyn), mRNA (cDNA clone MGC141942 IMAGE: 8322434), complete cds), que se obtuvo por la página de base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI). Posteriormente, se formularon los primer con las herramientas de diseño de oligonucleótidos Primer Quest Tool que se encuentran en la página de IDT tecnonologies (https://www.idtdna.com/PrimerQuest). Una vez obtenidos los

Comentado [m7]: Corrobora toda esta información

oligonucleótidos por la casa comercial se hidrataron según las especificaciones sugeridas.

6.3.2.2.2. Extracción de RNA de las líneas celulares.

Se obtuvo un pellet de las líneas celulares y se extrajo el RNA a través del kit de RNeasy mini Kit (QIAGEN). El RNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría a través de un Nanophotometer marca Pearl en una dilución 1:3 y para comprobar la pureza del RNA se corrió una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% con Bromuro de Etidio, incluyendo el marcador de peso molecular (Thermo Scientific, GeneRuler 100 bp DNA Ladder, de 10 – 1000 pb), a 80 mA durante una hora con buffer de TBE 1X (Tris (pH 7.6) 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2mM). Finalmente, el gel se visualizó en un transiluminador UV**.**

6.3.2.2.3. Retro-Transcripción y amplificación

Purificado el RNA se realizó una digestión con DNAsas para eliminar cualquier DNA contaminante, usando el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA synthesis (Thermo Scientific). Terminada la digestión, se volvió a cuantificar por espectrofotometría con el nanophotometer Pearl, sin diluciones. Posteriormente, se sintetizó el cDNA con el mismo kit, el cual se incubó por 5 minutos a 25°C, seguido de 60 minutos a 42°C y finalmente, 5 minutos a 75°C.

Posteriormente se realizó la amplificación como lo marca el kit utilizando los primer´s u oligonucleótidos previamente diseñados para Tomosyn, una Taq DNA polimerasa del DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) con las especificaciones necesarias que se detallan. Obteniendo las reacciones, se amplificó en el termociclador (eppendorf). Los ciclos seguidos fueron: desnaturalización inicial (94°C por 3 minutos) solo en el primer ciclo, desnaturalización (94°C por 30 segundos), alineamiento (54.8°C y 52°C por 30 segundos) y extensión final (72°C por 45 segundos) por 35 ciclos. Para comprobar la hibridación de las muestras y los primers u oligonucleótidos del PCR, se corrió un gel de agarosa al 0.8% en las mismas condiciones que la anterior.

6.3.2.3. Titulación de anticuerpos.

Para las técnicas de citometría de flujo e inmunofluorescencia, previamente se tituló un anticuerpo para la proteína STXBP5. Del anticuerpo anti-STXBP5 (Tomosyn) de la casa comercial ABCAM, se utilizaron diluciones las siguientes diluciones: 1:50,1:100, 1:200 y 1:500. Una vez analizado las diluciones de los anticuerpos en cada técnica, se establecieron en las proporciones que muestra la tabla 4.

Comentado [m8]: Reestrucrura este párrafo. Se clara y concreta.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para las técnicas de Citometría de Flujo e Inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Tipo	Origen	Técnica	Dilución	Casa comercial
Anti-Tomosyn	Policlonal	Conejo	Citometría de Flujo	1:50	ABCAM
			Inmunofluorescencia	1:100	
Alexa Fluor 488	Policlonal	Cabra	Citometría de Flujo	1:1000	ABCAM
			Inmunofluorescencia	1:100	

6.3.2.4. Citometría de flujo

Se utilizó un pellet con 500,000 células de cada línea celular, este se homogenizó con citofix para fijar las células y se lavó con perm/wash del kit (BD de la casa comercial Termo-Fisher). Se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos; se separó el pellet para dividirlo en 3 partes iguales, conjugado con los dos anticuerpos (anti- tomosyn y Alexa Fluor 488), el segundo con solo el anticuerpo secundario (Alexa Fluor) y una Auto-florescencia (sin anticuerpos). El primer tratamiento se le agregó un anticuerpo primario Anti-Tomosyn con ABS al 1%, y se incubando durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, el primer tratamiento y el segundo se incubaron por 3 horas a 37°C con el anticuerpo secundario ALEXA FLUOR 488 (ABCAM) en una dilución 1:100. El tercer Auto-florescencia solo con células de las líneas celulares con ABS al 1%. Los tratamientos se mantuvieron en la obscuridad y se llevarón analizar en el citómetro de flujo FACS CANTO II, perteneciente al CIBIOR.

Comentado [H9]: Pon casa comercial

6.3.2.5. Inmunofluorescencia

Se suspendieron 3000 células de cada línea celular en medio de cultivo, en un portaobjetos de 12 pozos se sembraron 70 uL en cada pozo, los cuales se resguardaron en cajas Petri estériles, dejándolos incubar por 12 horas a 37 °C para su adhesión celular. Posteriormente se fijaron las células con metanol al (100%) a temperatura ambiente por 30 minutos. Inmediatamente se incubaron las células en una solución de BSA 1% - PBS y se permeabilizaron las células con Tritón–X100, se lavaron con PBS.

Para evitar especificaciones de los anticuerpos se bloqueó con una solución PBS-Tween y BSA al 1%. Seguido se agregó una dilución del anticuerpo primario Anti-Tomosyn, como lo marca la tabla 4, dejándolo incubando a 4 °C por 12 horas. Terminado la incubación se lavó y se agregó la dilución del anticuerpo secundario, un anticuerpo conjugado con fluorocromos Alexa 488 (Tabla 4) y el marcador de fluorescencia DAPI de la casa comercial Thermo Fisher, se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Se visualizó con los objetivos 20X y se analizó en un microscopio de epifluorescencia Zeiss con sistema de ApoTome.

6.3.3. Sobre expresión de la proteína Tomosyn (STXBP5)

6.3.3.1. Elaboración del plásmido (vector) para la generación de virus de transfección

Comentado [H10]: Alinea el texto

Para la elaboración del plásmido se utilizaron bacterias *E. coli* transformadas y como vector de expresión un lentiviral ORF (OHS6085 CCSB-Broad Lentiviral Expression Glycerol Stock; representado en la figura 12) el cual es para la proteína de Tomosyn (STXBP5 (humano)). Con la secuencia primer´s de la Tabla 5.

Tabla 5. Primers del vector de expresión lentiviral ORF.

Nombre	Secuencia	Sitio de restricción
ORF-Tomosyn (Forward)	5'-CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG - 3'	3´: attR2
ORF-Tomosyn (Reverse)	5'- TACGGGAAGCAATAGCATGA - 3'	5´: attR1

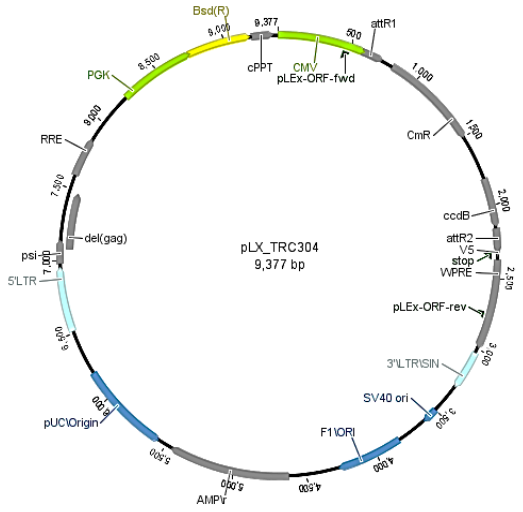

Figura 12. Esquema del Vector pLX304-Blast-V5 por secuencia de Tomosyn (STXBP5), Horizon CCSB-Broad Lentiviral Expression Collection.

El proceso consistió en la inoculación de las bacterias *E. coli* en medio estéril de caldo LB (Triptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L y NaCl 10g/L) y adicionado con el antibiótico ampicilina 100µg/ml, que selecciona a las bacterias transformadas, dejándolo incubar por 24 horas a 37°C. Posteriormente se obtuvo un pellet mediante centrifugación. Se extrajeron purificaron los plásmidos con el protocolo del kit ZymoPURE Plasmid Midiprep D4200.

Una vez obtenido los plásmidos se cuantificaron en el equipo Nanophotometers Palmer (IMPLEN) y se realizó su restricción con la enzima EcoRI para corroborar el plásmido. Una vez realizada la restricción del plásmido con EcoRI y albumina (10 µg/µL), se incubó por 4 horas a 37°C y se realizó un corrimiento electroforético a 80 volts.

6.3.3.2. Generación del virus de transfección

Se sembraron 500, 000 células por pozo en una placa de 12 pozos, se utilizó la línea celular 293T, la cual es usada para la expresión de proteínas y virus, estas se sembraron con medio DMEM adicionado con suero bovino fetal (SFB) al 10 % y antibiótico Ampicilina, hasta que se adhirieron.

Una vez terminado el proceso de adhesión, se transfectó a las células con una reacción con medio DMEM sin suero bovino fetal, y un kit de plásmidos empaquetadores pVSV (pMD2.g), pRE, pRSV, además de la secuencia para Tomosyn (pLX305) y polietilenimina (1 µg/ml). Todo se mezcló con vortex y posteriormente se dejó incubar la reacción por 15 minutos a temperatura ambiente.

6.3.3.3. Transfección del virus a las células para la sobre expresión de Tomosyn (STXBP5).

Después de la incubación se cambió el medio a las células 239T y se agregó nuevo, se añadió por goteo la reacción previamente preparada para no dañar a los complejos de transfección que contiene, es decir, los plásmidos pVSV(pMD2.g), pRE, pRSV, además de la secuencia para Tomosyn (pLX305).

Se mezcló todo en una placa, cuidadosamente de manera orbital y se dejó incubar toda la noche en condiciones de cultivo. Al siguiente día se volvió a cambiar el medio y se dejó incubar por 24 horas. Al día siguiente se recolecto el sobrenadante y se agregó medio nuevo dejándolo incubar por otras 24 horas, para así obtener un sobrenadante de 24 horas y otro de 48 horas.

Los sobrenadantes obtenidos, se mezclaron y se centrifugó para eliminar las células y restos celulares que pudieran existir. Lo siguiente fue añadirles Polibreno (10 mg/ml) y mezclar todo con el vortex, se obtuvo una concentración final de 0.8 µg/ml. Después, los sobrenadantes que ya contienen los virus, fueron alicuotados y se congelaron a -80°C hasta su uso**.**

6.3.3.4. Selección con Blasticidina

Posteriormente se transfectó a las líneas celulares U87MG, MDA-MB-231 y MCF7 con los virus previamente realizados. Donde se sembraron en placas de 12 pozos con 300, 000 células en cada uno, dejándolo incubar hasta su adhesión, las células se les agregó un agente que garantiza la transfección como lo es el Polibreno, este se suministró con una concentración de 0.8 µg/ml y se dejó incubar por 1 hora a 37 °C.

A estos cultivos después se le agregó medio, SBF y el antibiótico blasticidina como lo indica las especificaciones de la secuencia pLX305 (Horizon, 2018). El suministro de blasticidina se hace con una dilución seriada, donde se ocupa 1000 µl de medio y 10 µg/µL de blasticidina como dilución madre, pasando 500 uL de lo obtenido por

5 tubos eppendorf más 500 uL en cada tubo de manera fija. Obtenida las diluciones de 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0 µg/µL.

Se ocupó una placa de 96 pozos para le sembrado de células transfectadas de cada línea célular, y aplicando el medio con las diferentes diluciones. El tratamiento se realizó por 8< días, donde se cambiaba el medio cada 24 horas. Para seleccionar la concentración adecuada de blasticidina se tiñó con azul de comassie G-250 y se analizó con el software gen 5 en un lector de placas Multi-ModalSynergy HTX.

6.3.4. Evaluación de la sobreexpresión de Tomosyn (STXBP5)

Después de la transfección de las células con el plásmido y selección de células, se volvió a resembrar esas células y se crecieron cultivos para poder cuantificar la sobreexpresión por medio de citometría de flujo, para obtener así, información relacionada con su nueva actividad, en donde se realizó un ensayo de proliferación y otro de muerte celular.

6.3.4.1. Citometría de flujo de la sobreexpresión de Tomosyn.

De los cultivos transfectados de las tres líneas (U87MG, MDA-MB-231 y MCF7), se utilizó un pellet de 500,000 células y otro de células no transfectadas, como control. Al igual que la anterior citometría, este se homogenizó con Citofix para fijar las células y se lavó con perm/wash del kit (BD Thermo-Fisher). Se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos, se utilizaron las mismas condiciones de anticuerpos que se muestran en la tabla 4; se agregó el anticuerpo primario con BSA 1%. Al día siguiente, se incubó durante 3 horas a 37°C con el anticuerpo secundario ALEXA FLUOR 488. Las muestras se mantuvieron en la obscuridad y se analizaron en el citómetro de flujo FACS CANTO II.

6.3.4.2. Ensayo de proliferación y muerte celular

Para medir la proliferación celular de las líneas celulares (U87MG, MDA-MB-231 y MCF7) con sobreexpresión de Tomosyn (STXBP5), se sembraron 2000 células por pozo en placas de 96 pozos. Se incubaron toda la noche con sus respectivos medios sin SBF, más Blasticidina. Este experimento se midió por medio de la confluencia celular, la cual se determinó por un análisis del área ocupada por las células, la cual se monitoreo cada 4 horas durante 48 horas por el equipo IncuCyte ZOOM (essenbioscience).

El ensayo se realizó por duplicado y cada línea celular transfectada tuvo su grupo control (sin sobre expresión). Una vez terminado el ensayo de proliferación, se continuó con el ensayo de muerte celular. El cual se midió por la tinción celular de Ioduro de Propidio (IP); ocupando una concentración de 1 uM. Este agente fluorescente, tiene la característica de teñir a las células muertas debido a la integridad de su membrana, y excluye a células vivas ya que no hay ningún cambio morfológico en la membrana a comparación de las células muertas. Al finalizar la tinción con IP se analizó la absorbancia en el Multi-ModalSynergy HTX y el software Gen 5.

6.4. Análisis Estadísticos

Se empleó el análisis estadístico conveniente para cada uno los experimentos. Para la citometría de flujo sin sobre expresión se empleó una ANOVA de una vía con un post-hoc de Tukey la cual compara todos los grupos, dando la intensidad media de fluorescencia.

Para la citometría en la que se cuantificó la sobre expresión de Tomosyn, se utilizó otra ANOVA de una vía con un post-hoc de Dunnette comparando los grupos con sus controles. Los datos obtenidos de la actividad de proliferación, se analizaron con una ANOVA de dos vías y un post-hoc de Bonferroni.

Mientras que los ensayos de muerte celular se analizaron con una t-Student no pareada que compara el tratamiento control diferente al tratamiento de la sobre expresión. Todos los análisis se realizaron a través del programa Graph Prism 6.

7. RESULTADOS

7.1. Identificación de la proteína Tomosyn (SRXBP5) en líneas de cáncer de mama

7.1.1. Obtención y elaboración bio-informática de los set´s de primer´s o cebadores con una secuencia de reconocimiento de Tomosyn (STXBP5) para RT-PCR.

Una vez analizados todos los set´s arrojados por las herramientas de la página de IDT (Integrate DNA Tecnologies), se obtuvieron dos set´s viables, como se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Secuencia de los set´s de primer´s para Tomosyn (STXBP5).

Nombre	Secuencia	Temperatura hibridación
SET 2 (Forward)	5´- CCT GAG GAC GAT TCT CCA AAT AG - 3´	54.8 °C
SET 2 (Reverse)	5´- CTA TTT GGA GAA TCG TCC TCA GG - 3´	54.8 °C
SET 5 (Forward)	5´- CAG GAA CTG GAG CTG GAT TAC - 3´	55.1 °C
SET 5 (Reverse)	5´- GTA ATC CAG CTC CAG TTC CTG - 3´	55.1 °C

Estas secuencias se ocuparon para llevar acabo el PCR, mediante el cual se identificó a Tomosyn (STXP5) en las líneas celulares U87 MG, MDA-MB-231 y MCF7. Se probó con los dos set´s de secuencias obtenidas, se realizaron ensayos con temperaturas graduales en el termociclador, que iban desde 45 °C hasta 55°C. Una vez analizada cada PCR, se obtuvo la temperatura más adecuada que fue de 54.8°C y el set con mayor afinidad para la hibridación de la secuencia de Tomosyn (STXBP5) fue el set 2.

7.1.2. Expresión de Tomosyn (STXBP5) en las líneas celulares determinada por RT-PCR.

Una vez obtenidas las temperaturas adecuadas del set 2, se realizó una PCR de punto final para determinar la expresión de Tomosyn (STXBP5) en las tres líneas celulares estudiadas, tal y como se muestra en la Figura 13.

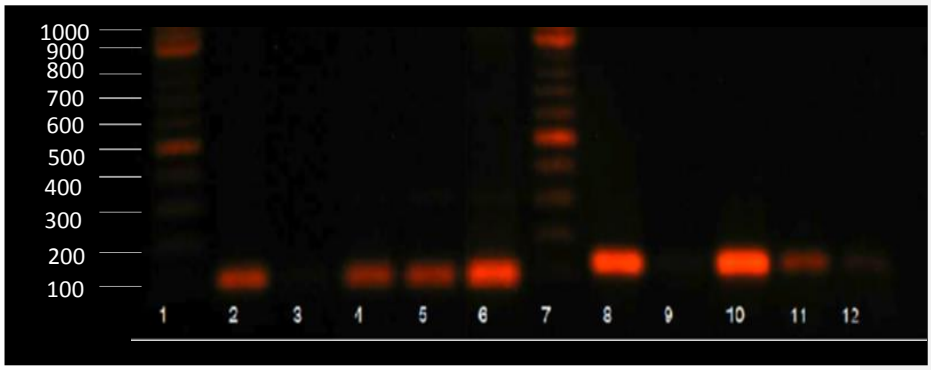

Figura 13. Electroforesis obtenida de la hibridación de Tomosyn (STXBP5) con un control HPRT (2-6) y el Set 2 de Tomosyn (8-12)

En este experimento se demostró que si hay presencia de Tomosyn en las líneas celulares de interes. Los carriles 1-6 fueron hibridados con un control endógeno de HPRT. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular de (100pb), el carril 2 muestra el control positivo utilizando un cDNA de la línea celular MCF7, previamente testado. El carril 3 corresponde a un control negativo,sin la presencia de un cDNA. Posteriormente, en el carril 4 se ubica el cDNA de la línea celular de glioblastoma U87MG, seguido de la línea celular MDA-MB-231 (carril 5) y por ultimo la línea celular MCF7 (carril 6).

Los carriles (7-12) corresponden a la hibridación con la secuencias del set 2 para Tomosyn (STXBBP5), en el mismo orden que los primeros 6 carriles.

El resultado de la RT-PCR, como se muestra en la figura 13 evidenció la expresión de Tomosyn (STXBP5) en la línea célular U87MG (carril 10), la cual que tuvo una mayor hibridación con respecto a la linea celular triple negativa MDA-MB-231 (carril 11) y se aprecia una menor expresión en la línea celular MCF7 (Carril12).

7.1.3. Identificación de Tomosyn (SXTBP5) por Western Blot.

La Figura 14, muestra el resultado del Western Blot en donde se puede apreciar una ligera banda de 130 kDa, que corresponde a Tomosyn en el extracto proteico de cerebro de ratón (carril 3), sin embargo, en el extracto de la línea celular de Glioblastoma, no se alcanzó a identificar dicha proteína (carril 4).

Es necesario realizar más ensayos para encontrar las condiciones idóneas para poder identificar a Tomosyn en los dos controles positivos anteriormente mencionados y por ende en las líneas celulares de cáncer de mama de interés.

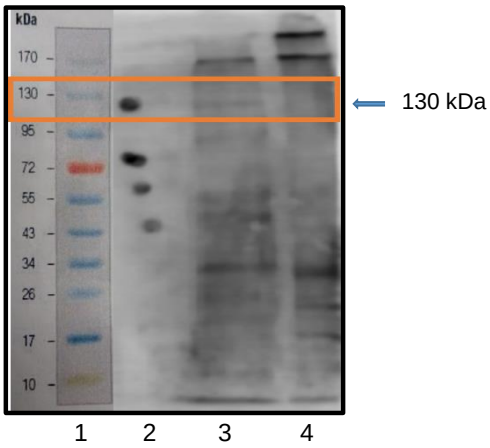

Figura 14. Identificación de Tomosyn de 130 kDa.
1: MPM, 2: MPM por quimioluminiscencia (43, 55 72 y 130 kDa),
3: extracto de cerebro de ratón y 4: extracto de la línea celular U87MG.

7.1.4. Determinación de la expresión de Tomosyn (STXBP5) por Citometría de Flujo.

Esta herramienta se utilizó para comprobar la expresión de Tomosyn (STXBP5) en las líneas celulares propuestas. Los resultados de la Figura 15 muestran la intensidad media de fluorescencia emitida por las poblaciones experimentales y en donde se demuestra que Tomosyn (STXBP5) está expresado en las tres líneas celulares.

El análisis estadístico compara las tres líneas celulares, de las cuales se realizó 3 repeticiones para cada línea celular. Obteniendo una $P<0.0021$, demostrando que las medias son altamente significativas. La intensidad media de fluorescencia mostrada entre la línea U87MG contra MDA-MB-231 y entre MDA-MB-231 y MCF7, presentan una diferencia significante ($P<0.05$). Sin embargo, entre las líneas celulares U87MG y MCF7 la comparación de la intensidad de fluorescencia no fue altamente significante ($P>0.005$).

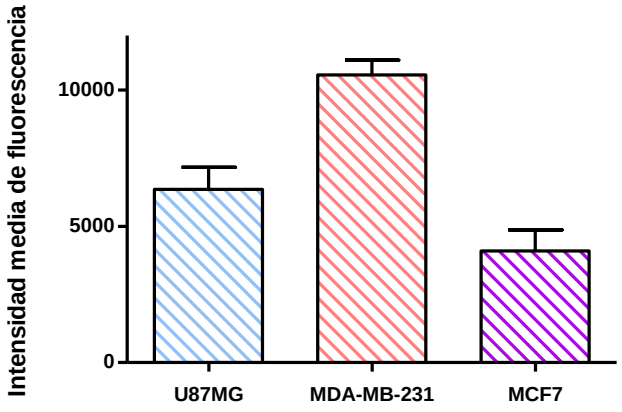

Figura 15. Citometría de Flujo de las líneas celulares que expresan a la proteína Tomosyn (STXBP5), donde P<0.0021.

Localización de la proteína Tomosyn (STXBP5) por Inmunofluorescencia en diferentes líneas celulares.

Para corroborar la expresión de Tomosyn (STXBP5) dentro de las células, se llevó a cabo ensayos de inmunofluorescencia. Como se establece la metodología, se sometieron a las células con un conjugado de anticuerpos, el primario Anti-Tomosyn, el anticuerpo secundario fluorocromo Alexa 488 y con un marcador fluorescente DAPI, revelando el núcleo de las células. Las inmufluorescencias de las células se registraron con un objetivo 20X en el microscopio de epifluorescencia con sitema ApoTome 2. Estas imágenes se analizaron con el software ZEN 2.

Para cada línea celular se incluyó, una autoflorescencia sin anticuerpos (A), (B) solo con el anticuerpo secundario, Alexa 488. En la expresión de Tomosyn (C) con los anticuerpos, Anti-Tomosyn (Primario) y Alexa 488 (Secundario). La figura D, muestra la señal de Tomosyn (STXBP5) sin los núcleos con los anticuerpos. Se pudo localizar a Tomosyn (STXBP5) en las líneas celulares, su distribución se ve en el citoplasma de las células, y envolviendo al núcleo y con una señal uniforme (flecha), como los muestra las Figuras 16, 17 y 18.

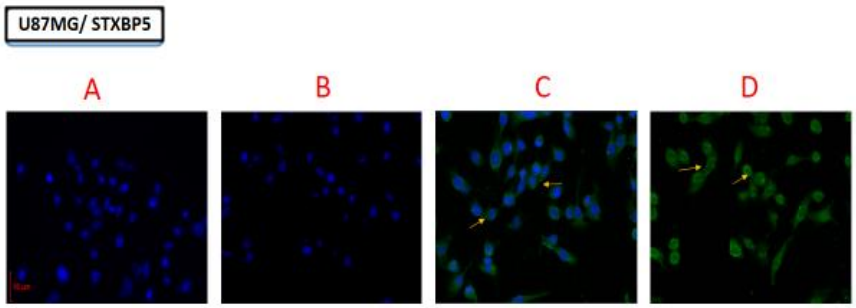

Figura 16. Inmunofluorescencia de la línea celular u87MG. A) Autofluorescencia, B) Solo con anticuerpo secundario, C) anticuerpos primario y secundario y D) señal de la proteína Tomosyn sin los núcleos. Las células se fijaron con metanol puro y permeabilizadas con tritón x100. Seguido del anticuerpo primario, el policlonal de conejo para Tomosyn (STXBP5) (1:100), con el anticuerpo policlonal de conejo Alexa 488 (1:100) y DAPI.

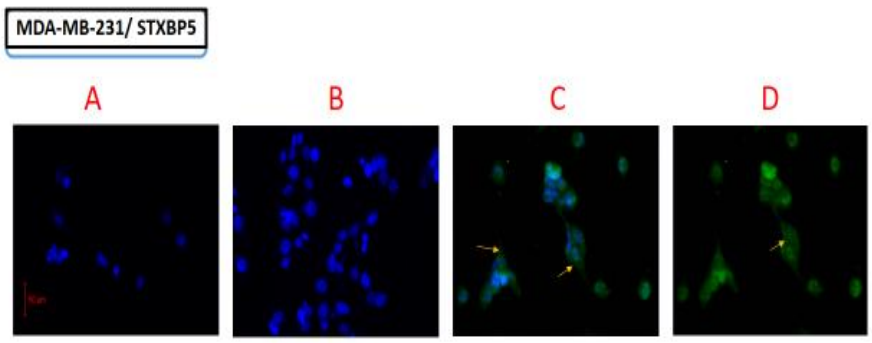

Figura 17. Inmunofluorescencia de la línea celular MDA-MB-231. A) Autofluorescencia, B) Solo con anticuerpo secundario, C) anticuerpos primario y secundario y D) señal de la proteína Tomosyn sin los núcleos. Las células se fijaron con metanol puro y permeabilizadas con tritón x100. Seguido del anticuerpo primario, el policlonal de conejo para Tomosyn (STXBP5) (1:100), con el anticuerpo policlonal de conejo Alexa 488 (1:100) y DAPI.

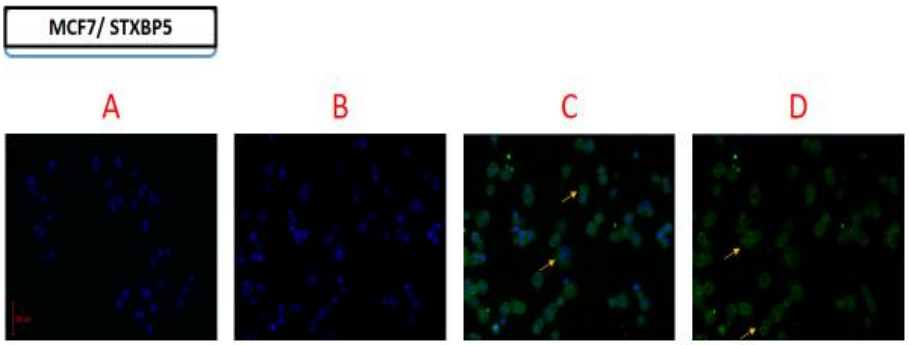

Figura 18. Inmunofluorescencia de la línea celular MCF7. A) Autofluorescencia, B) Solo con anticuerpo secundario, C) anticuerpos primario y secundario y D) señal de la proteína Tomosyn sin los núcleos. Las células se fijaron con metanol puro y permeabilizadas con tritón x100. Seguido del anticuerpo primario, el policlonal de conejo para Tomosyn (STXBP5) (1:100), con el anticuerpo policlonal de conejo Alexa 488 (1:100) y DAPI.

7.2. Sobreexpresión de la proteína Tomosyn (STXBP5)

7.2.1. Citometría de flujo para comprobar la sobre-expresión de Tomosyn (STXBP5).

Para cuantificar la sobreexpresión de Tomosyn (STXBP5) en las células transfectadas U87MG, MDA-MB-231 y MCF7, se realizó una citometría de flujo comparándolas con su control, es decir; con células normales sin la transfección. Las gráficas 19 muestran la sobreexpresión de dicha proteína en las 3 líneas celulares estudiadas.

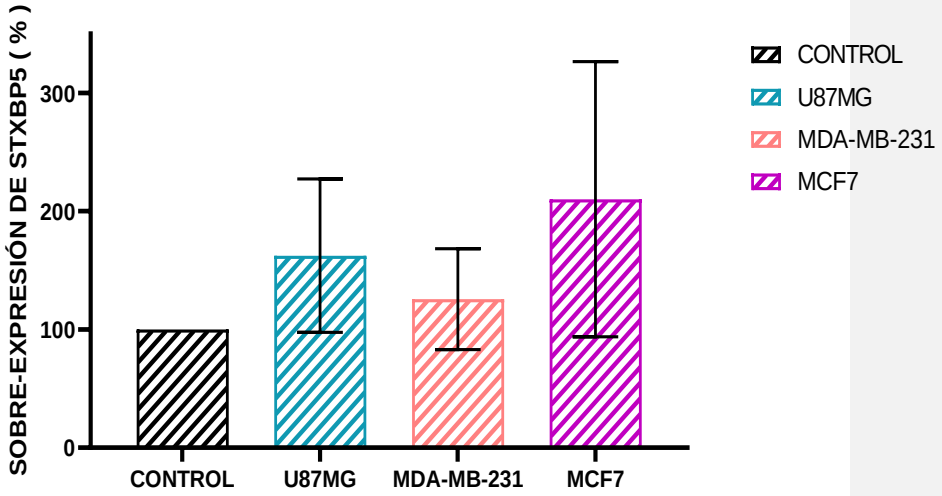

Figura 19. Sobre- expresión de Tomosyn (STXBP5), en las líneas celulares U87MG, MDA-MB-231 Y MCF7, P 0.3113.

Se analizó la sobreexpresión de Tomosyn a través de una ANOVA de una vía con un estudio pos-hoc de Dunette el cual compara a las medias de las células transfectadas con un control. En donde el valor del grupo control se determinó como el 100%. El análisis nos determinó que, no existe un efecto significativo entre las medias de las líneas celulares con sobreexpresión con respecto a los controles, mostrando una P de 0.3113 (P>0.005). Donde la línea celular U87MG mostró solo una sobreexpresión de un 62.3%, mientras que la línea celular triple negativa

MDA-MB-231 mostró una sobreexpresión del 25.6%. Mientras que la línea celular MCF7 tuvo una mayor sobreexpresión la cual fue de, un 110%.

7.2.2. Ensayo de proliferación celular en células que sobre - expresan a Tomosyn (STXBP5)

Con la finalidad de seguir caracterizando la actividad de Tomosyn (STXBP5) en las células de interés, se realizaron ensayos de proliferación celular. El ensayo se midió durante 48 horas, en donde la población fue de 2000 células/pozo, y se tomaron registros cada 4 horas en el equipo IncuCyte ZOOM.Las siguientes gráficas muestran la proliferación de las células U87MG (Figura 20), MDA-MB-231 (Figura 21) y la línea MCF7 (Figura 22), a las cuales se les sobre-expresó Tomosyn (STXBP5) con sus respectivos controles (sin sobreexpresión).

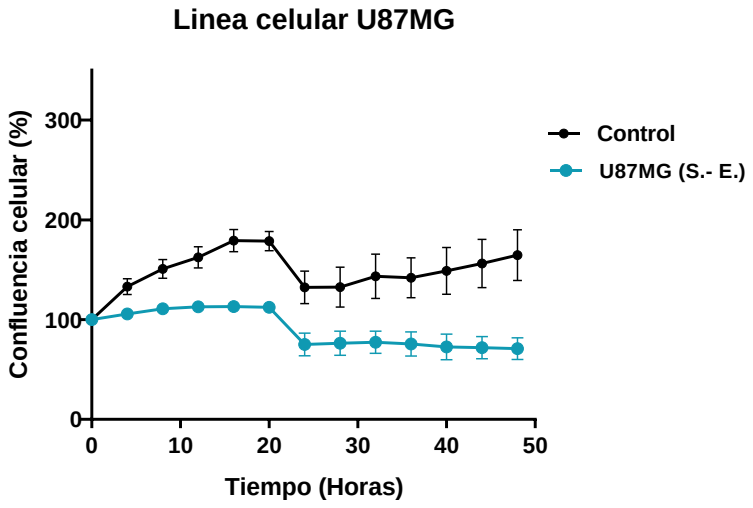

Figura 20. Proliferación celular de la línea U87MG con sobre – expresión (S.– E.) de Tomosyn (STXBP5). Se utilizó como control a células sin la sobreexpresión de la proteína y se tomaron registros cada 4 horas durante 48 horas, $P < 0.001$.

El ensayo de la figura 20, se presenta a la proliferación de la línea celular células U87MG con su control, el efecto de la sobre-expresión con respecto al tiempo, donde su P<0.001. En la tabla 7, podemos visualizar que al avanzar las horas hay una disminución en la proliferación de las células sobre-expresadas; a las 48 horas las células transfectadas disminuye un 93.69% en comparación con las células control; mientras que, con respecto de la población inicial esta disminuye un 29.09%. El ensayo demostró que las células sobre-expresadas con Tomosyn (STXBP5) tienden a disminuir la proliferación celular.

Comentado [H11]: Reestructura la idea.

Tabla 7. Proliferación de las células U87MG con la sobre - expresión de Tomosyn (STXBP5).

TIEMPO (hrs)	CONTROL (%)	PROLIFERACIÓN (%)
0	100	100
4	133.2	105.7
8	150.8	110.8
12	162.4	112.8
16	179.2	113.2
20	178.7	112.4
24	132.4	75.13
28	132.5	76.44
32	143.4	77.27
36	142.1	75.64
40	148.8	72.63
44	156.3	71.82
48	164.6	70.91

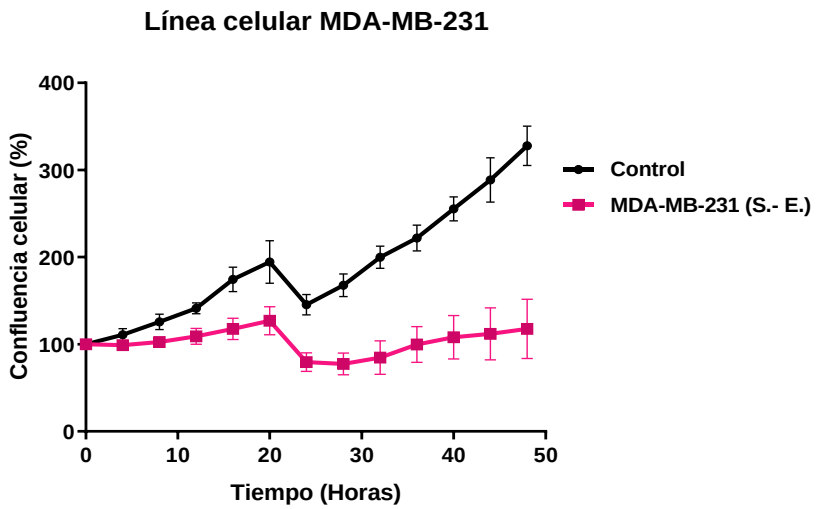

Figura 21. Proliferación celular de la línea MDA-MB-231 con la sobre- expresión (S.-E.) de Tomosyn (STXBP5). Midiendo cada 4 horas durante 48 horas, y con un control sin sobre expresión, P < 0.001.

Al igual que a la línea celular U87MG el tratamiento en la línea celular MDA-MB-231 generó, una disminución en la actividad proliferativa de las células. La evaluación arroja una P<0.001 entre las interacciones. Esta disminución se puede ver en la Figura 21, en donde a partir de las 24 horas hay una disminución en su actividad proliferativa. La tabla 8, muestra que durante las 48 horas, las células control proliferaron en un 327%, mientras que la proliferación de las células con la sobre expresión con Tomosyn (STXBP5) solo fue de un 17%. Si se compara el control contra la sobre expresión final, se obtiene que esta actividad de proliferación disminuye en un 210%.

Tabla 8. Proliferación de las células MDA-MB-231 con la sobreexpresión de Tomosyn (STXBP5).

TIEMPO (hrs)	CONTROL (%)	PROLIFERACIÓN (%)
0	100	100
4	110.8	99.01
8	125.8	102.7
12	141.3	109.1
16	174.3	117.6
20	194.4	126.9
24	145.3	79.59
28	167.6	77.36
32	199.9	84.77
36	221.8	99.62
40	255.3	108.0
44	288.7	111.8
48	327.7	117.7

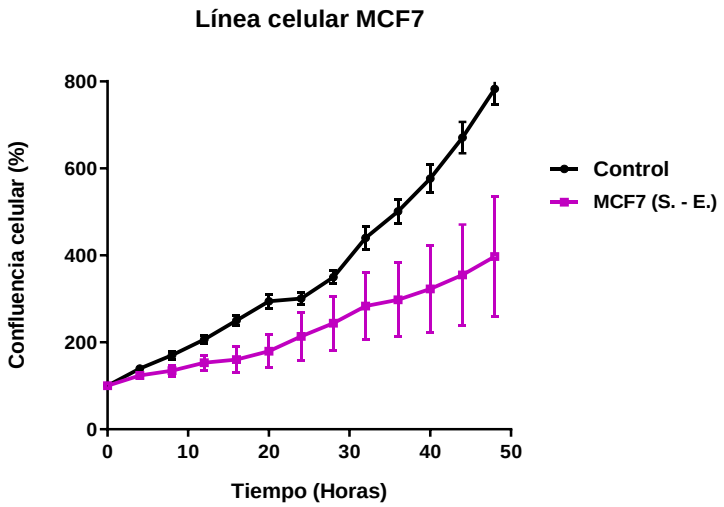

Figura 22. Proliferación celular de la línea MCF7con sobre-expresión (S.-E.) de Tomosyn (STXBP5). Midiendo cada 4 horas durante 48 horas, y con un control sin sobre expresión. P<0.0024.

La actividad proliferativa de línea celular MCF7 mostró un P<0.0024. A pesar de que las células siguen proliferando, a las 48 horas la tasa proliferativa de las células transfectadas solo aumenta un 297.2%, con respecto al valor inicial, mientras que el control aumenta un 682.4%, la proliferación como lo muestra la tabla 9, disminuyen en total un 385% con respecto al incremento de la tasa de las células control.

Tabla 9. Proliferación de las células MCF7 con la sobre-expresión de Tomosyn (STXBP5).

TIEMPO (hrs)	CONTROL (%)	PROLOFERACIÓN (%)
0	100	100
4	139.5	123.6
8	170.4	134.7
12	206.3	153.2
16	250.3	160.4
20	294.3	179.6
24	300.5	213.4
28	349.7	243.6
32	439.8	283.2
36	500.8	297.6
40	576.2	322.4
44	670.3	355.0
48	782.4	397.2

7.2.3. Ensayo de muerte celular generada por la sobreexpresión de Tomosyn

Finalizado el ensayo de proliferación celular, las células se tiñeron con Ioduro de Propiodio (IP) a una concentración 1 µM con la finalidad de analizar la muerte celular y así determinar si la disminución en la actividad proliferativa es debido a la muerte celular asociada a la sobreexpresión de Tomosyn.

Así, la tinción con Ioduro de Propidio (PI) se representó como el porcentaje de confluencia de células positivas a la tinción de PI y se normalizó al porcentaje la confluencia total. Estos parámetros se determinaron para las tres líneas celulares y el resultado se analizó a través de una T- Student no pareada. Este ensayo nos permite visualizar y corroborar que la actividad proliferativa de una célula determina también la tasa de muerte de la misma.

En la línea celular U87MG representada en la Figura 23, se aprecia que las células control presentan muy poca muerte, pues su media es de 0.006%. Mientras que en las células sobre-expresadas con Tomosyn, aumentó el porcentaje de muerte celular (0.06%). El análisis indica que la comparación entre el control y las células U87MG sobre - expresadas tienen una diferencia de P <0.001**.**

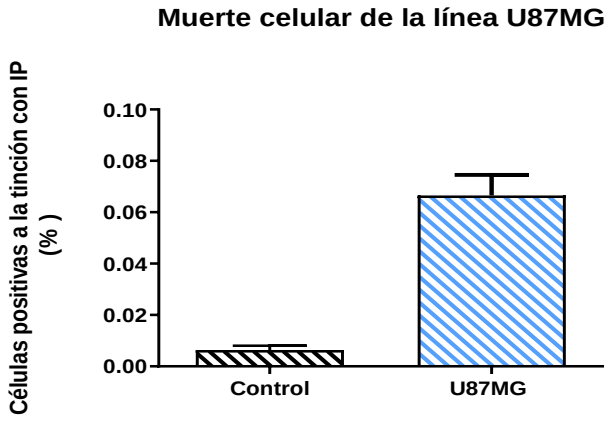

Figura 23. Análisis de muerte celular de las células U87MG con sobre-expresión de Tomosyn (STXBP5) y de las células control (sin sobreexpresión). Tinción con Ioduro de Propidio (IP) a las 48 hrs. P<0.001.

En Relación a la línea MDA-MB-231 (Figura 23) la muerte celular, fue muy parecida a la línea celular U87MG, en donde el porcentaje del control de esta líneas fue de 0.016% y para su sobre expresión incrementó a un 0.06%. Indicando que la sobre- expresión tuvo un efecto significativo con una p<0.0011.

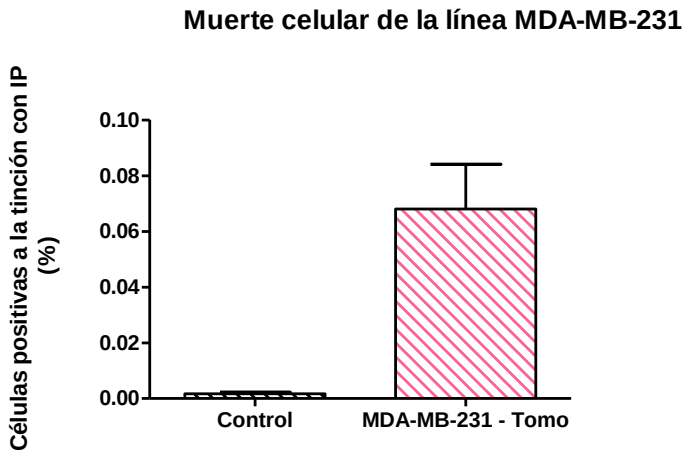

Figura 234. Análisis del ensayo de muerte celular de la línea celular MDA-MB-231, con sobre-expresión de Tomosyn (STXBP5) y del control (sin sobre expresión). Medida con ioduro de propidio (IP) a las 48 hrs., P <0.0011.

Como se puede visualizar, la línea celular MCF7 en la Figura 27 es la que presenta menos muerte celular por parte del grupo control con un porcentaje de 0.0009 y la línea control con una notable diferencia de 9.833e-005, es decir que no hubo muertes en las líneas celulares. Lo cual arroja una p<0.001 donde la comparación es altamente significativa.

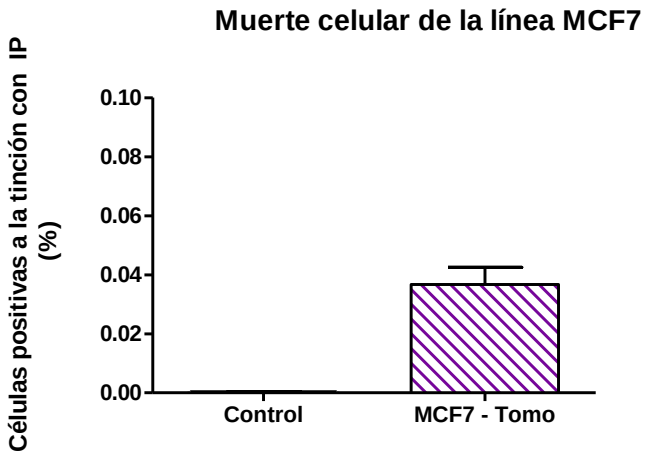

Figura 25. Análisis del ensayo de muerte celular de la línea celular MCF7, con sobre expresión de Tomosyn (STXBP5) y del control (sin sobre expresión). Medida con ioduro de propidio (IP) a las 48 hrs., P<0.001.

En resumen, podemos notar que en las tres líneas celulares estudiadas, la condición de sobreexpresión con Tomosyn, modifica el patrón de proliferación normal de las células y por lo tanto la muerte de las mismas. A menor proliferación mayor muerte celular y viceversa. En donde las líneas celulares de cáncer de mama, MDA-MB-231 y MCF7, son las que más muerte generó la sobre – expresión.

8. DISCUSIÓN

Ante la necesidad de encontrar nuevos enfoques que auxilien en el combate contra el cáncer, se ha desarrollado varias estrategias que permitan una nueva valoración profunda de todo lo que implica esta patología, que van desde los mecanismos por los que se rige, cuánto afecta a la población, posibles causas, generación de nuevos marcadores que ayuden a detectarlo de manera más precisa y también nuevos tratamientos (Liao *et al*., 2008). El descubrimiento de los mecanismos de comunicación entre células a través de las vesículas extracelulares ha dado pie a tal desarrollo, no solo por su mecanismo de comunicación, sino que también, por su conservación durante la evolución, por lo que se podría encontrar en cualquier modelo (Slebe *et al*., 2016).

Actualmente la proteómica nos permite desarrollar un campo de investigación sobre proteínas o vesículas extracelulares y así, visualizar sus interacciones y comportamiento en diversas enfermedades. Para ser más específica, la rama de la oncoproteómica nos permite ver las interacciones de proteínas con las células cancerígenas (Cho *et al.,* 2007, y Zhang *et al*., 2008). Como ya se ha descrito, por medio del estudio de estas proteínas, encontramos que estas tienen un papel importante en desarrollo del cáncer; pues no solo permiten comunicarse entre células normales, sino que se ha visto que las células progenitoras del cáncer cuando desarrollan este mecanismo de comunicación con este complejo de vesículas extracelulares ayudan a promover la angiogénesis, desestabilizando por completo la inmuno-vigilancia, e induciendo la eliminación de moléculas terapéuticas que estimulan a la apoptosis (Paggetti *et al*., 2015, Antonyak *et al.,* 2014 y Ginestra *et al.,* 1998).

En el presente estudio se analizó en líneas celulares de cáncer de mama el efecto de Tomosyn (STXBP5), una proteína que pertenece a un complejo de vesículas extracelulares y que regula el proceso de exocitosis (Yizhar, *et al*., 2003). La literatura ha reportado a Tomosyn con un peso aproximado de 130

kDa (Yasuyuki, *et al*. 1998). Es importante señalar que hasta la fecha no se ha reportado a esta proteína en líneas celulares, específicamente de cáncer de mama, por lo que la presencia de esta proteína se pudo comprobar por medio de 4 herramientas.

El primer acercamiento en la identificación de dicha proteína, la realizamos a través de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y posteriormente, mediante ensayos de Western blot, de las tres líneas celulares estudiadas: U87MG, MDA-MB-231, MCF7. Además utilizamos un control positivo de expresión de Tomosyn, y el cual fue un extracto proteico de cerebro de ratón. Cabe señalar que hasta la fecha no se encuentra registro de esta proteína en células de cáncer de mama, pero si se ha evidenciado por este método en muestras de células endoteliales como las HAEC's (Human aortic endothelial cells), HUVEC´s (Human Umbilical Vein Endothelial) y en células de embrionarias de riñón como HEK-239 (Qiuyu *et al*., 2014).

Por otra parte, se pudo confirmar que Tomosyn (STXBP5) si se expresa en las células de cáncer de mama, por la detección con RT- PCR (punto final), demostrando la hibridación de las secuencias o primer´s dirigidas a Tomosyn (STXBP5) con el cDNA de las líneas celulares de interés. Este resultado arrojó una banda con el peso molecular esperado. Para poder tener otra herramienta que ayude a validar la expresión de Tomosyn (STXBP5), la Citometría de Flujo exhibe la intensidad de fluorescencia media en las células estudiadas, la cual confirmó que la proteína sí se encuentra en las tres líneas celulares estudiadas y que posee una expresión altamente significativa. Además, se concluyó que la línea celular triple negativa MDA-MB-231 presentó la intensidad más alta en comparación con las demás células.

Para finalizar con la identificación y caracterización de esta proteína, la técnica de inmunofluorescencia evidenció la localización de Tomosyn en las células, y en donde se confirma la presencia de esta proteína en el citosol de las tres

líneas celulares de interes: U87MG, MDA-MB-231 y MCF7; su ubicación concuerda con la descripción en la literatura por Yokoyama*, et al*., 2000.

Comentado [H12]: Reestructura la idea

Posteriormente, en este trabajo evaluamos si la proteína STXBP5 juega un papel clave en la proliferación celular, específicamente, en líneas celulares de cáncer de mama. Siguiendo la premisa del papel descrito de Tomosyn (STXBP5), como regulador en el proceso de exocitosis, la cual genera una inhibición en la movilización y la fusión competente de vesículas con la membrana celular, es decir la comunicación celular (Yizhar, et al., 2003 y Uri Ashery et al., 2009). Se determinó que para poder ver un efecto comprobable de esa interferencia en la comunicación celular por lo que se sobre expresó a esta proteína.

La sobre expresión de esta proteína se ha estudiado en un modelo relacionado con los factores Von Willebrand, claves en el sistema de reparación de vasos sanguíneos, sangrados y trombosis; este proceso se encuentra estrictamente regulado por una vasta red de proteínas y fusión vesicular (Leebeek *et al*., 2016). STXBP5 se encuentra vinculada a esta regulación y rige a proteínas como Sintaxinas (STX), Sintaxinas de unión (STXBP), proteína asociada a sinaptosoma (SNAP), factores de NSF y VAMP´S, los cuales permiten un buen nivel de los factores de Von Willebrand (VWF).

La sobre expresión de esta misma demostró una disminución de la exocitosis celular, como lo marca la literatura (Ashery *et al.,* 2009). Los estudios sobre gránulos de segregación de insulina, también estipulan una disminución de esta actividad por la sobre-expresión (Zhang *et al*., 2006). La segregación de factores de Von Willebrand, también se vio afectado, pues impidió la comunicación, por lo que se determinó que Tomosyn se visualiza como una proteína “switch”. Es decir, que causa el bloqueo de la comunicación proteica si se encuentra sobre - expresada, y si no se sobre-expresa, esta permite la comunicación entre células, (Schillemans *et al.,* 2019).

Comentado [H13]: No entendí, se mas clara

Hasta la fecha no se tiene información sobre la función que pudiera tener Tomosyn en el cáncer de mama. Nuestros resultados de su sobre-expresión señalan una baja en la proliferación celular y aumento de la muerte celular en las líneas de cáncer de mama, así como de la línea celular de glioblastoma U87MG.

Por lo anterior, se podría suponer que al estimular a esta proteína, se impide la conjunción del complejo, la cual se forma para comunicar a la membrana de la vesícula con la membrana celular, es decir el proceso de exocitosis. Y así realizar la comunicación celular que necesita las células cancerígenas. Siguiendo la misma conducta que con la regulación de la segregación de factores de Von Willebrand y de segregación en gránulos de insulina, demostrando una vez más que Tomosyn (STXBP5) suple una función de regulación en la comunicación celular.

9. CONCLUSIONES

- Se identificó por primera vez a la proteína Tomosyn (STXBP5) con un peso molecular de 130 kDa en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF7, además dicha proteína se localiza en el citosol.

- Se logró sobreexpresar a la proteína Tomosyn (SXTBP5) a través del sistema lentiviral pLX304-Blast-V5 en las líneas celulares de cáncer de mama y glioblastoma.

- Las células cancerosas expuestas a la sobreexpresión de Tomosyn (STXBP5), presentaron un efecto negativo en su proliferación celular.

- La sobreexpresión de Tomosyn (STXBP5) aumentó la muerte celular tanto en la línea de glioblastoma (U87MG) como en las dos líneas de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF7).

- Los resultados encontrados nos incentivan a seguir estudiando a Tomosyn (STXBP5) y poder determinar el papel que pudiera estar jugando en la regulación de la comunicación celular en las líneas celulares de cáncer mama.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud, (2018). Las diez principales causas de defunción. [Nota descriptiva]. Recuperado de: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death.

2. National Institute of Health, (2015). Naturaleza del Cáncer, conjunto de enfermedades relacionadas. Recuperado de: https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es.

3. American Cancer Society, (S.F.). Sobre el cáncer, generalidades. Recuperado de: https://www.cancer.org/es/cancer.html, en (2019).

4. International Agency for Research on Cancer, (2018). Cancer Today, Data and Methods: Incidence. Recuperado de: https://gco.iarc.fr/today/data-sources-methods#title-inc.

5. Organización Mundial de la Salud, (2020) . WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. World Health Organization. https://apps.who.int/iris/handle/10665/330745.

6. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R., Torre L., Jemal A., (2018). Global cancer statistics 2018: Global Observatory of Cancer (GLOBOCAN) estimate of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 68(6):394–424. https://doi.org/10.3322/caac.21492.

7. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, (02 Febrero, 2018). Estadística a propósito del día mundial contra el cáncer. [Comunicado de prensa]. Recuperado de: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_nal.pdf.

8. Unión Latinoamericana Contra el Cáncer de la Mujer, (S.F.). Cáncer de mama, información general, diagnostico. Recuperado de: https://www.ulaccam.org/deteccion-cancer-mama, en (2019).

9. Zepeda E., Recinos E., Cuéllar M., Robles C., y Maafs E., (2008). Molecular classification of breast cancer. *Cirugia y cirujanos*, *76*(1): 87-93.

10. Astudillo H., Ruíz E., González D., Barajas J., Lázaro J., Maldonado H., y Valero V., (2014). Biomarcadores del cáncer de mama vs firmas genómicas: hacía la búsqueda de una terapia personalizada. Revista Nacional de Mastología, 4(1): 9-17.

11. Sandoval A., Hernández P., Guerrero J., Anaya M., y Rosas N., (2017). Las vesículas extracelulares y su papel en la salud y el cáncer. Alianzas y tendencias, 2(2): 29-32.

12. Zhang B., Yin Y., Chai L., y Kiang L., (2014). Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles. Frontiers in immunology, 5: 518.

13. Kalra H., Drummen G., y Mathivanan S., (2016). Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. International journal of molecular sciences, 17(2): 170.

14. Südhof T., (2014). The molecular machinery of neurotransmitter release (Nobel lecture). Angewandte Chemie International Edition, 53(47): 12696-12717.

15. Merino D., Martín Y., y Artalejo A., (2009). La maquinaria molecular de la exocitosis:¿ un nuevo marcador en las enfermedades neurodegenerativas?. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.

16. Ashery U., Bielopolski N., Barak B. y Yizhar O., (2009). Friends and foes in synaptic transmission: the role of tomosyn in vesicle priming. Trends in neurosciences, 32(5): 275-282.

17. Castro E., Romero N., Pozo A., Lozano R., y Medina A., (2019). Original report abstract PROREPAIR-B: A Prospective Cohort Study of the Impact of Germline DNA Repair Mutations on the Outcomes of Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer.

18. Cajaraville G., Carreras J., Massó J., y Tamés J., (2002). Oncología. Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria, capítulo 14: 1171-1126.

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

20. Sánchez C., (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. Revista Médica Clínica Las Condes, 24(4): 553-562.

21. Asociación Española Contra el Cáncer, (2018). ¿Qué es el cáncer de mama?, Anatomía de la mama. Recuperado de: https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-mama/que-es-cancer-mama.

22. Valdés V., y Pérez A., (2015). Fisiología de la glándula mamaria y lactancia. UNICEF Chile.

23. National Institute of Health, (2020). PDQ sobre el tratamiento para adultos. PDQ Tratamiento del cáncer de seno (mama) en adultas. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Recuperado de: https://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/paciente/tratamiento-seno-pdq.

24. Roche Pacientes España, (S.F.). ¿Qué es el cáncer de mama?. Recuperado de: https://rochepacientes.es/cancer/mama.html, en (2019).

25. Centro para el control y la prevención de enfermedades, (2018). División de prevención de enfermedades, ¿Cuáles son los factores de riesgo del cáncer de mama?. Recuperado de: https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/risk_factors.

26. Chirivella I., y Garcés V., (2018). Cáncer de mamá hereditario más allá de BRCA1/BRCA2. Genética médica y genómica, 2(2):67-77.

27. Breast Cancer, (2017). Riesgo de padecer cáncer de mama y factores riesgo. Recuperado de: https://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancer_de_mama.

28. Neuhouser L., Aragaki K., Prentice L., Manson E., Chlebowski R., Carty L., y Urrutia P., (2015). Overweight, obesity, and postmenopausal invasive breast cancer risk: a secondary analysis of the women's health initiative randomized clinical trials. JAMA oncology, 1(5), 611-621.

29. CancerQuest, (S.F.). Cáncer de mamá, estadios y tratamientos. Recuperado: https://www.cancerquest.org/es/para-los-pacientes/cancer-por-tipo/cancer-de-mama#pathology-report-staging, en (2020).

30. Fundación Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama, (2015). Guía resumida de práctica clínica para el diagnóstico de cáncer de mama metastásico. Recuperado de: https://portal.guiasalud.es/wp-content/uploads/2019/06/gpc_538_geicam_cancer_mama_resumida.pdf.

31. Troncoso D., Perpiñan I., Mancera A., Pachón S., Chaparro V., Camargo M., Vargas L., Ramírez A., Montoya C., Valderrama A., Rojas A., y Arboleda A., (2017). Transición epitelio mesénquima: de lo molecular a lo fisiológico. Universitas Médica, 58(4).

32. Valastyan S., Weinberg R., (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. Cell, 147(2):275-92.

33. Farma R., (2011). Hablemos del cáncer de mama [tríptico informativo]. Recuperado de: http://fecma.vinagrero.es/documentos/HABLEMOS_DE_CANCER_MAMA.pdf.

34. Arvelo F., Sojo F., y Cotte C., (2016). Tumour progression and metastasis. Ecancermedicalscience, 10:617.

35. Peinado H., Zhang H., Matei I., Costa-Silva B., Hoshino A., Rodrigues G., Psaila B., Kaplan R., Bromberg J., Kang Y., Bisell M., Cox T., Giaccia A., Erle J., Hiratsuka S., Ghajar C., y Lyden D., (2017). Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. Nat Rev Cancer 17: 302–317.

36. Paget S., (1989). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. Cancer Metastasis Rev., 8(2):98-101.

37. Rakha E., Reis-Filho J., Baehner F., Dabbs D., Decker T., Eusevi V., Fox S., Ichihara S., Jacquemier J., Lakhani S., Palacios J., Richardson A., Schnitt S., Schmitt F., Tan P., Tse G., Badve S., y Ellis I., (2010). Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. Breast Cancer Res 12(4):1-12.

38. Board, P. A. T. E. (2017). Breast Cancer Treatment (Adult)(PDQ®). In PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. National Cancer Institute (US).

39. Skog J., Würdinger T., Van Rijn S., Meijer H., Gainche L., Curry T., Carter B., Krichevsky A., y Breakefield X., (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. Nature cell biology, 10(12), 1470-1476.

40. Yáñez-Mó M., Siljander P.,Andreu Z., Bedina A., Borràs F., Buzas E., Buzas K., Casal E., Cappello F., Carvalho J., Colás E., Cordeiro-da Silva A., Fais E., Falcon J., Ghobrial I., Giebel B., Gimona M., Graner M., Gursel I., Gursel M., Heegaard N., Hendrix A., Kierulf P., Kokubun K., Kosanovic M., Kralj-Iglic V., Krämer E., Laitinen S., Lässer C., Lener T., Ligeti E., Linē A., Lipps G., Llorente A., Lötvall J., Manček M., Marcilla A., Mittelbrunn M., Nazarenko I., Nolte-‘t E., Nyman T., O'Driscoll L., Olivan M., Oliveira C., Pállinger E., Del Portillo E., Reventós J., Rigau M., Rohde E., Sammar M., Sánchez F., Santarém N., Schallmoser K., Stampe M., Stoorvogel W., Stukelj R., Van der Grein S., Vasconcelos M., Wauben M., y Wever O., (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions, Journal of Extracellular Vesicles, 4(1):27066.

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

42. Fauré J., Lachenal G., Court M., Hirrlinger J., Chatellard-Causse C., Blot B., Granger J., Schoehn G., Goldberg Y., Boyer V., y Kirchhoff F., (2006).

Exosomes are released by cultured cortical neurones. Molecular and Cellular Neuroscience, 31(4): 642-648.

43. Gómez M., y Morales R., (2018). Exosomas en la propagación de enfermedades neurodegenerativas. Archivos de Neurociencias, 23(3): 6-18.

44. Andaloussi E., Mäger I., Breakefield O., y Wood J., (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. Nature reviews Drug discovery, 12(5), 347-357.

45. Bouvy C., Gheldof D., Chatelain C., Mullier F., y Dogne M., (2014). Contributing role of extracellular vesicles on vascular endothelium haemostatic balance in cancer. Journal of Extracellular Vesicles, 3(1): 24400.

46. Ciardiello C., Cavallini L., Spinelli C., Yang J., Reis M., De Candia P., Minciacchi V., Di Vizio D., (2016). Focus on Extracellular Vesicles: New Frontiers of Cell-to-Cell Communication in Cancer. International Journal of Molecular Sciences, 17(2):175.

47. Peinado H., Alečković M., Lavotshkin S., Matei, I., Costa-Silva B., Moreno-Bueno G., Hergueta M., Williams C., García G., Ghajar C., Nitadori A., Skog J., Hoffman C., Badal K., García B., Callahan M., Yuan J., Martins V., Kaplan R., Brady M., Wolchok J., Chapman P., Kang Y., Bromberg J., y Lyden D., (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine*, *18*(6): 883-891.

48. Hendrix A., Maynard D., Pauwels P., Braems G., Denys H., Van den Broecke R., Lambert J., Van Belle S., Cocquyt V., Gespach C., Bracke M., Seabra MC., Gahl WA., Wever O., Westbroek W.,(2010). Effect of the secretory small GTPase Rab27B on breast cancer growth, invasion, and metastasis. Jounal of the National Cancer Institute, 102:866–80.

49. Nishida N., Tominaga N., Takeshita F., Sonoda H., Yoshioka Y., & Ochiya T., (2017). Disruption of circulating extracellular vesicles as a novel therapeutic strategy against cancer metastasis. Molecular Therapy, 25(1): 181-191.

50. Marleau A., Chen C., Joyce J., y Tullis R., (2012). Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. Journal of translational medicine, 10(1): 1-12.

51. Kendal y cols 2001.

52. Chen Y., Scales S., y Scheller, R., (2001). Sequential SNARE assembly underlies priming and triggering of exocytosis. Neuron, 30(1): 161-170.

53. Bustillos D., Gutiérrez Y., y Rodríguez A., (2009). La maquinaria molecular de la exocitosis:¿ un nuevo marcador en las enfermedades neurodegenerativas?. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.

54. Brunger A., (2005). Structure and function of SNARE and SNARE-interacting proteins. Quartely Reviews of Biophysics, 38(1):1-47.

55. Südhof T., (1995). The synaptic vesicle cycle: A cascade of protein-protein interactions. Nature 375: 645–653.

56. Südhof T., (2004). The synaptic vesicle cycle. Annual Reviews of Neuroscience, 27: 509-547.

57. Galli T., y Haucke V., (2004). Cycling of synaptic vesicles: how far? How fast!. Science's STKE, (264), re19-re19.

58. Zylbersztejn K., y Galli T., (2011). Vesicular traffic in cell navigation. The FEBS journal, 278(23): 4497-4505.

59. Scales S., Hesser B., Masuda E., y Scheller R., (2002). Amisyn, a novel syntaxin-binding protein that may regulate SNARE complex assembly. Journal of Biological Chemistry, 277(31): 28271-28279.

60. Jahn R., y Scheller R., (2006). SNAREs—engines for membrane fusion. Nature reviews Molecular cell biology, 7(9): 631-643.

61. Ashery U., Bielopolski N., Barak B., e Yizhar O., (2009). Friends and foes in synaptic transmission: the role of tomosyn in vesicle priming. Trends in neurosciences, 32(5): 275-282.

62. Yokoyama S., Shirataki H., Sakisaka T., Takai Y., (2000). Three Splicing Variants of Tomosyn and Identification of Their Syntaxin-Binding Region. Biochemical and Biophysical Research Communications, 256 (1): 218-222.

63. Fujita Y., Shirataki H., Sakisaka T., Asakura T., Ohya T., Kotani H., Yokoyama S., Nishioka H., Matsuura Y., Mizoguchi A., Takai Y., y Scheller, R., (1998). Tomosyn: a syntaxin-1–binding protein that forms a novel complex in the neurotransmitter release process. Neuron, 20(5): 905-915.

64. Geerts C., Mancini R., Chen N., Koopmans F., Li K., Smit A., van Weering J., Verhage M., y Groffen A., (2017). Tomosyn associates with secretory vesicles in neurons through its N-and C-terminal domains. PLoS ONE, 12(7).

65. Yizhar O., Lipstein N., Gladycheva S., Matti U., Ernst S., Rettig J., Stuenkel E.,y Ashery, U., (2007). Multiple functional domains are involved in tomosyn regulation of exocytosis. Journal of neurochemistry, 103(2): 604-616.

66. Sakisaka T., Yamamoto Y., Mochida S., Nakamura M., Nishikawa k., Izhisaki H., Okamoto M., Miyoshi J., Fujiyoshi Y., Manabe T., Takai Y., (2008). Dual inhibition of SNARE complex formation by tomosyn ensures controlled neurotransmitter release. Journal of Cell Biology, 183 (2): 323–337.

67. Davis L., Meyer K., Rudd D., Librant A., Epping E., Sheffield V., Wassink T., (2009). Novel copy number variants in children with autism and additional developmental anomalies. Journal of Neurodevelop Disord *,* 1:292–301.

68. Cheviet S., Bezzi P., Ivarsson R., Reström E., Viertl D., Kasas S., Catsicas S., Regazzi R., (2006). Tomosyn-1 is involved in a post-docking event required for pancreatic β-cell exocytosis. Journal of Cell Science 119: 2912-2920.

69. Zhang W., Lilja L., Mandic S., Gromada J., Smidt K., Janson J., Takai Y., Bark C., Berggren P., Meister B., (2006). Tomosyn is expressed in beta cells and negatively regulates insulin exocytosis. Diabetes. Mar; 55(3):574-81.

70. Leebeek F., Loon J, Dehghan A., Weihong T., Trompet S., McArdle W., Asselberg F., Chen M., López L., Saonli H., Stott D., Rumley A., Gansevoort R., Davies G., Wilson J., Witteman J., Cao X.,, Craen A.,Bakker S., Psaty B., Starr J., Hofman A., Jukema W., Deary I., Hayward C., Harst P., DO Lowe P., Folsom A., Strachan D., Smith N., Maat M., O'Donnell C., (2016). Genome-wide association studies identify genetic loci for low von Willebrand factor levels. European Journal of Human Genetics 2 (24):1035–1040

71. Schillemans M., Karampini E., Kat M., y Bierings R., (2019). Exocytosis of Weibel–Palade bodies: how to unpack a vascular emergency kit. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 17(1): 6-18.

72. Monreal M., Falgá C., Valdés M., Suarez C., Gabriel F., Tolosa C., Montes J., y Riete Investigators., (2006). Fatal pulmonary embolism and fatal bleeding in cancer patients with venous thromboembolism: findings from the RIETE registry. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 4(9): 1950-1956.

73. RIETE Investigators, Tafur A., Caprini J., Cote L., Trujillo-Santos J., Del Toro J., y Garcia F., (2017). Predictors of active cancer thromboembolic outcomes. Thrombosis and haemostasis, 117(06): 1192-1198.

74. Levitan N, Dowlati A, Remick S, Tahsildar H, Sivinski I, Beyth R, Rimm A. Rates of initial and recurrent thromboembolic disease among patients with malignancy versus those without malignancy. Risk analysis using Medicare claims data, (1999); 7(8): 285–91.

75. Liao M., Sendurai A., Wenjun G., Elinor E., Ayyakkannu A.,, Alicia Z., Brooks M., Ferenc R., Cheng Z., Michail S., Campbell L., Polyak K., Brisken C., Yang J., Weinberg R., (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. Cell, 133 (4): 704 -715.

76. Slebe F., Rojo F., Vinaixa M., García M., Testoni G., Guiu M.,Planet E., Samino S., Arenas E.,Beltran A., Rovira A., Lluch A., Salvatella X., Yanes O., Albanell J., Guinovart J., Gomis R., (2016). FoxA and LIPG endothelial lipase control the uptake of extracellular lipids for breast cancer growth. Nature Communications, 1 (7): 11199.

77. Cho R., Dalerba P., Clarke M., (2007). Cancer Stem Cells: Models and Concepts. Annual Review of Medicine, 1 (58): 267-284.

78. Zhang Z., Liu, L., Casal R., Wang X., Hayashi R., Appella E., Kopelovich L., DeLeo A., (2016). Targeting cancer stem cells with p53 modulators. Oncotarget, 7(29): 45079–45093.

79. Paggetti J., Haderk F., Seiffert M., Janji B., Distler U., Ammerlaan W., Jin Y., Kim A., Adam J., Lichter P., Solary E., Berchem G., Moussay E., (2015). Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. Blood, 126 (9): 1106–1117.

80. Antonyak, M. A., & Cerione, R. A. (2014). Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer. Cancer Cell Signaling, 147-173.

81. Ginestra A., La Placa M., Saladino F., Cassara D., Nagase H., Vittorelli M., (1998). The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. Anticancer research, 18(5A): 3433-3437.