



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Instituto de  
Investigación  
Sanitaria LaFe



PRINCIPE FELIPE  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN

# Estudio de las Implicaciones de la Vía de Señalización de Notch Mediada por Exosomas en Cardioregeneración y Cáncer

## Tesis Doctoral

**Realizada por:** Hernán González-King Garibotti

**Dirigida por:** Dra. Pilar Sepúlveda Sanchis y el  
Dr. Nahuel Aquiles García

**Tutor:** Dr. Ramón Serrano Salom

**Valencia, 13 de Mayo del 2019**





UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Instituto de  
Investigación  
Sanitaria LaFe



PRINCIPE FELIPE  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN

# Estudio de las Implicaciones de la Vía de Señalización de Notch Mediada por Exosomas en Cardioregeneración y Cáncer

## Tesis Doctoral

**Realizada por:** Hernán González-King Garibotti

**Dirigida por:** Dra. Pilar Sepúlveda Sanchis y el

Dr. Nahuel Aquiles García

**Tutor:** Dr. Ramón Serrano Salom

**Valencia, 13 de Mayo del 2019**





## Agradecimientos

Me gustaría dejar expresados aquí mis agradecimientos a aquellas personas que de alguna manera han aportado un granito de arena en este período de formación que ha sido la realización de mi tesis doctoral. Voy a ser objetivo para agradecer a cada una de estas personas en lo que creo que han sido de ayuda para la realización de mi tesis doctoral. Sin embargo, voy a evitar definir las cualidades de estas personas siendo que, con esto, por muchos adjetivos calificativos positivos que les pusiese, siempre estaría limitando a una mera definición lo que realmente son, que es mucho más.

En primer lugar, me gustaría agradecer a Pilar Sepúlveda, mi directora, por darme la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio. He tenido la suerte de caer en este laboratorio y que no haya faltado de nada para la realización de todos y cada uno de los experimentos. Más allá de la buena predisposición para nutrir del fungible necesario en la realización de los experimentos, gracias por dotar de libertad de decisión a los miembros de tu laboratorio lo que considero realmente importante en la formación de cualquier persona que se dedique o se quiera dedicar al mundo de la investigación.

A Nahuel Aquiles García, mi director, gracias por haber sido mi apoyo científico en todo el recorrido, tanto desde Argentina en este último año y pico, como durante el tiempo que compartimos laboratorio; por darme innumerables veces un nuevo punto de vista de las cosas; por haber hecho una etapa más entretenida cuando coincidimos en el laboratorio ya sea a nivel científico como en lo personal, fue muy divertido. Aprendí muchas cosas positivas de ti y “sabe don” que siempre has contribuido con consejos a mis decisiones.

A mis amigos, porque es una ayuda omnipresente. Aquellos que sin la necesidad de intentarlo ya pusieron el hombro y contribuyeron a que uno este mejor si cabe.

A mis compañeros de laboratorio: María, que empezamos a la vez la tesis en este laboratorio y con la que han surgido a partir de muchas discusiones experimentos con muy buenos resultados; Rubénes, Imelda, Akaitz, Rosa, Marina, Delia, Amparo, Rafa, Marta, Marc, Nacho, Estela y Elena. Al equipo de citómica del CIPF: Alicia, Domingo, Mar; que hemos compartido un espacio físico mucho tiempo y son de una gran calidad

humana; a la gente del equipo de mantenimiento o del servicio de limpieza que hemos mantenido charlas innumerables veces ayudando a desconectar un rato o que han estado ahí para echarme una mano con cualquier problema. A Mario del servicio de microscopio electrónico por darme pistachos en el microscopio electrónico esas tardes de viernes tan largas viendo nuestros pésimos resultados de inmunogold, al final nos salió.

A mi familia de Argentina que a pesar de la distancia hacen el ruido suficiente para que uno los tenga siempre presentes, y en especial a mi madre, mi padre y mi hermana, gracias, sois lo mejor que tengo. Estamos "solos" y no hemos necesitado de nada más, los quiero a los 3, a teo también que si no lo digo todos sabemos que es un celosete.

A Sandra, mi mejor amiga, apenas hace un año desde que empezamos un hermoso camino juntos y espero que la vida nos brinde la posibilidad de que dure mucho. Eres una persona hermosa y un apoyo incondicional, espero y deseo que sigamos viviendo muchos más momentos felices, te quiero.



# Índice



<b>Abreviaturas.....</b>	<b>17</b>
<b>Resúmenes.....</b>	<b>23</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>30</b>
<b>1.1 Mecanismos de Comunicación Celular .....</b>	<b>32</b>
<b>1.1.1 Vesículas Extracelulares: los Exosomas .....</b>	<b>35</b>
1.1.1.1 Mecanismo de Formación y Liberación de las Vesículas Extracelulares .....	37
1.1.1.2 Reconocimiento y Señalización de las Vesículas Extracelulares en las Células Diana.....	39
1.1.1.3 Composición Citosólica y de la Membrana de las Vesículas Extracelulares .....	41
<b>1.1.2 La Vía de Señalización de Notch .....</b>	<b>43</b>
1.1.2.1 Activación de la Vía de Notch .....	44
<b>1.1.2.2 Receptores y Ligandos de la Vía de Notch .....</b>	<b>46</b>
1.1.2.2.1 Ligandos de la Vía de Notch.....	46
1.1.2.2.2 Receptores de la Vía de Notch .....	46
<b>1.1.2.3 Interacción entre el Receptor y el Ligando de la Vía de Notch .....</b>	<b>48</b>
<b>1.1.2.4 Tráfico Endocítico de Componentes de Notch y las Ubiquitin Ligasas .....</b>	<b>51</b>
<b>1.2 Terapias Regenerativas.....</b>	<b>52</b>
1.2.1 El Infarto Agudo de Miocardio (IAM) y Tratamiento Convencional .....	52
<b>1.2.2 Terapias Avanzadas para el Tratamiento del IAM.....</b>	<b>55</b>
<b>1.2.3 Terapia Celular en el Tratamiento del IAM .....</b>	<b>56</b>
1.2.3.1 Propiedades de las MSC.....	56
1.2.3.2 Efecto Terapéutico Inducido por las MSC: Hipótesis Paracrina .....	59
1.2.3.3 Respuesta a la Hipoxia: HIF-1 $\alpha$ .....	61
1.2.3.3.1 Relación entre Notch y HIF-1 $\alpha$ .....	64

<b>1.2.4 Angiogenesis</b> .....	<b>64</b>
1.2.4.1 Mecanismos Celulares en la Angiogénesis .....	65
1.2.4.2 Determinación del fenotipo celular CP o CC: La vía de señalización de Notch y VEGF .....	68
<b>1.3 Cáncer</b> .....	<b>70</b>
<b>1.3.1 Mantenimiento de las Señales de Proliferación</b> .....	<b>72</b>
1.3.1.1 Protooncogenes: C-MYC .....	74
1.3.1.2 Genes de Supresión Tumoral.....	75
<b>1.3.2 Invasión y Metástasis: Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT)</b> .....	<b>76</b>
1.3.2.1 Transición Epitelio Mesénquima (EMT): la Vía de Señalización de Notch.....	79
1.3.2.2 Transición Epitelio Mesénquima (EMT): Exosomas Tumorales .....	80
<b>1.3.3 Cáncer de Mama</b> .....	<b>82</b>
1.3.3.1 Subtipos Moleculares .....	83
<b>2. Hipótesis y Objetivos</b> .....	<b>85</b>
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	<b>90</b>
<b>3.1 Animales</b> .....	<b>92</b>
<b>3.2 Tipos Celulares</b> .....	<b>92</b>
<b>3.2.1 Cultivos Primarios</b> .....	<b>92</b>
3.2.1.1 Cultivo Primario de Células Madre Mesenquimales .....	92
3.2.1.2 Cultivo Primario de Endotelio Humano.....	93
<b>3.2.2 Líneas Celulares</b> .....	<b>93</b>
<b>3.2.3 Expansión Celular y Criopreservación</b> .....	<b>94</b>
<b>3.2.4 Recuento de la Viabilidad Celular</b> .....	<b>95</b>

<b>3.3 Técnicas de Genética Molecular</b> .....	<b>95</b>
3.3.1 Transformación y Amplificación Bacteriana.....	97
3.3.2 Extracción y Purificación del DNA Plasmídico.....	97
3.3.3 Transducción Lentiviral.....	98
3.3.4 Síntesis de las Líneas MSC y HIF-MSC.....	100
3.3.5 Síntesis de las Líneas Transgénicas CD63-RFP para Monitorizar Exosomas .....	100
<b>3.4 Co-Cultivos</b> .....	<b>101</b>
<b>3.5 Aislamiento de Exosomas</b> .....	<b>102</b>
3.5.1 Medio de Recolección de Exosomas .....	102
3.5.2 Método de Ultracentrifugación .....	103
3.5.3 Purificación Mediante Ensayo de Afinidad .....	103
<b>3.6 Técnicas Bioquímicas</b> .....	<b>103</b>
3.6.1 Obtención de Extractos Proteicos .....	103
3.6.2 Cuantificación de Proteínas.....	104
3.6.3 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida .....	104
3.6.4 Transferencia Mediante <i>Western Blot</i> .....	105
<b>3.7 Técnicas Moleculares</b> .....	<b>107</b>
3.7.1 Extracción y Cuantificación de RNA .....	107
3.7.2 Transcripción Reversa y PCR en Tiempo Real (qPCR).....	107
3.7.2.1 Transcripción Reversa: Síntesis de cDNA .....	107
3.7.2.2 Cuantificación Relativa de la Expresión Génica por PCR Cuantitativa en Tiempo Real.....	108
3.7.2.3 Análisis de los Resultados de qPCR .....	109
3.7.3 Identificación y Análisis de miRNAs de Exosomas Procedentes de MSC y HIF-MSC.....	109
3.7.3.1 Aislamiento de miRNAs Exosomales.....	110

3.7.3.2 Síntesis del cDNA a partir de los miRNAs Exosomales, qPCR y Análisis .....	110
<b>3.8 Inmunocitoquímica.....</b>	<b>112</b>
<b>3.9 Técnicas de Imagen.....</b>	<b>113</b>
3.9.1 Microscopía Óptica de Fluorescencia.....	113
3.9.2 Microscopía Confocal .....	113
3.9.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) .....	113
3.9.3.1 Adsorción y Fijación de los Exosomas en Rejillas para MET.....	114
3.9.3.2 Contrastado e Inclusión de los Exosomas .....	114
3.9.3.3 Inmunomarcaje con Oro de los Exosomas .....	115
3.9.4 Co-Cultivos: Análisis de la Transferencia de Exosomas .....	116
3.9.4.1 Microscopía Confocal <i>Time-Lapse</i> .....	116
3.9.4.1.1 Cuantificación de la Transferencia de Exosomas.....	117
3.9.5 Cuantificación de la Colocalización de NICD y CD63 en Cultivos de MDA-MB-231 y MCF-7 .....	117
<b>3.10 Cuantificación de la Síntesis y Secreción de Exosomas .....</b>	<b>118</b>
3.10.1 <i>Western Blot</i> .....	118
3.10.2 Actividad Acetilcolinesterasa .....	118
<b>3.11 Ensayos Funcionales <i>In Vitro</i> con Exosomas .....</b>	<b>119</b>
3.11.1 Internalización de Exosomas .....	119
3.11.1.1 Internalización en HUVEC.....	119
3.11.1.2 Internalización en MCF-7 .....	120
3.11.1.2.1 Tinción de Exosomas con Exo-Glow <sup>TM</sup> -Protein EV Labeling Kit.....	120
3.11.3 Estudio de la Actividad de la Vía de Señalización de Notch .....	121
3.11.3.1 Activación/Inhibición de la Vía de Notch.....	121
3.11.3.2 Análisis de la Vía de Notch en HUVEC.....	122

3.11.3.2.1 Inhibición del Ligando Jagged1 en Exosomas de MSC y de HIF-MSC .....	122
3.11.3.3 Análisis de la Vía de Notch en MCF-7.....	123
<b>3.11.4 Ensayo de Formación de Tubos .....</b>	<b>124</b>
<b>3.11.5 Estudios de Proliferación y de Ciclo Celular en MCF-7 .....</b>	<b>125</b>
3.11.5.1 Estudios de Proliferación con Bromo Deoxiuridina (BrdU) .....	125
3.11.5.2 Estudio del Ciclo Celular por Citometría de Flujo en células MCF-7 .....	126
<b>3.11.6 Estudio del Proceso de Transición Epitelio-Mesénquima y la Migración en Cultivos de MCF-7 .....</b>	<b>127</b>
3.11.6.1 Análisis Mediante qPCR e Inmunomarcaje de Marcadores de EMT.....	127
3.11.6.2 Análisis de la Migración en MCF-7.....	127
<b>3.12 Técnicas para el Estudio de la Angiogénesis <i>In vivo</i>: Plug de Matrigel .....</b>	<b>128</b>
3.12.2 Grupos Experimentales.....	129
3.12.2 Procedimiento Quirúrgico .....	130
<b>3.13 Técnicas de Histología.....</b>	<b>130</b>
3.13.1 Inclusión en Parafina, Microtomía y Tinciones .....	130
3.13.2 Inmunocitoquímica .....	131
3.13.2.1 Desparafinado .....	131
3.13.2.2 Desenmascaramiento Antigénico.....	131
3.13.2.3 Inmunofluorescencia de CD31 de las Secciones de los Plug de Matrigel .....	132
<b>3.13 Citometría de Flujo .....</b>	<b>132</b>
<b>3.14 Proteómica .....</b>	<b>133</b>
<b>3.15 Análisis Estadístico .....</b>	<b>133</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>136</b>
<b>4. Resultados Sección A .....</b>	<b>139</b>

<b>4.1 Estabilización de la Expresión de HIF-1<math>\alpha</math> en MSC.....</b>	<b>139</b>
<b>4.2 Aislamiento y Caracterización de los Exosomas Procedentes de MSC o HIF-MSC .....</b>	<b>142</b>
<b>4.3 HIF-1<math>\alpha</math> Induce un Aumento en la Secreción de Exosomas en MSC .....</b>	<b>144</b>
<b>4.4 Análisis del Contenido de miRNAs y Proteínas en Exosomas de MSC y HIF- MSC.....</b>	<b>146</b>
4.4.1 Contenido de miRNAs .....	147
4.4.2 Contenido en Proteínas .....	149
<b>4.5 HIF-1<math>\alpha</math> Incrementa la Incorporación del Ligando Jagged1 en los Exosomas de MSC .....</b>	<b>152</b>
<b>4.6 HIF-1<math>\alpha</math> Induce un Aumento en la Transferencia de Exosomas de MSC a ECs .....</b>	<b>154</b>
<b>4.7 Actividad Funcional del Ligando Jagged1 Incorporado en Exosomas de MSC y HIF- MSC.....</b>	<b>156</b>
<b>4.8 HIF-1<math>\alpha</math> Aumenta el Potencial Angiogénico de los Exosomas de MSC a través de Jagged1 .....</b>	<b>158</b>
4.8.1 Ensayo <i>In vitro</i> de Formación de Tubos .....	158
4.8.2 Ensayo <i>In Vivo</i> de <i>Plug</i> de Matrigel .....	160
<b>4. Resultados Sección B .....</b>	<b>164</b>
<b>4.9 Aislamiento y Caracterización de los Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7 .....</b>	<b>164</b>

<b>4.10 Estudio de la Vía de Señalización de Notch en Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 .....</b>	<b>167</b>
4.10.1 Estudio del Contenido Proteico de los Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7 .....	167
4.10.2 Los Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 Incorporan una Mayor Cantidad de Componentes de la Vía de Señalización de Notch Respecto a los de MCF-7 .....	172
4.10.3 Evaluación de la Actividad sobre la Vía de Señalización de Notch de los Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7.....	173
4.10.3.1 Internalización y transferencia de Proteínas Exosomales Procedentes de MDA-MB-231 o de MCF-7 en Células MCF-7 .....	175
4.10.4 Los Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7 Inducen Cambios en Genes Diana de la Vía de Notch al ser Agregados a Cultivos de MCF-7 .....	176
<b>4.11 Participación de los Componentes de la Vía de Notch Contenidos en Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7 en la Proliferación Celular de MCF-7 .....</b>	<b>178</b>
<b>4.12 Los Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 Inducen el Proceso de EMT en Cultivos de MCF-7 en Parte Debido a N1ICD.....</b>	<b>181</b>
4.12.1 Análisis de Características Morfológicas del Proceso de EMT en Cultivos de MCF-7 .....	181
4.12.2 Detección de Marcadores de EMT Mediante Inmunofluorescencia en Cultivos de MCF-7 .....	184
4.12.3 Análisis de la Expresión Génica de Marcadores de EMT Mediante qPCR en Cultivos de MCF-7 .....	187
4.12.4 Ensayo <i>In vitro</i> para Estudiar la Movilidad Celular en Cultivos de MCF-7 .....	188
<b>5. Discusión.....</b>	<b>192</b>
<b>5.1 Sección A: Estudio de la contribución de los exosomas procedentes de MSC nativas y de HIF-MSC a su potencial angiogénico.....</b>	<b>194</b>
<b>5.2 Sección B: Papel de la vía de señalización de Notch en el proceso de malignización mediado por exosomas procedentes de la línea celular de cáncer de mama metastático MDA-MB-231. ....</b>	<b>202</b>
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>211</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>217</b>

# Abreviaturas

**ACE:** Enzima angiotensina convertasa

**ACE:** Acetilcolinesterasa

**ADAM:** Proteína compuesta por un dominio desintegrina y metaloproteasa

**$\alpha$ -Jagg:** Anticuerpo neutralizador de Jagged-1

**ANK:** Región rica en repeticiones de tipo anquilina

**Anti-:** Anticuerpo contra una proteína específica

**ATCC:** *American Type Cell Culture Collection*

**BCA:** Ácido bicinconínico

**bHLH:** *Basic-helix-loop-helix*

**BrdU:** Bromo desoxiuridina

**CADASIL:** Arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía

**CAR-T:** Linfocitos T con el receptor de antígenos quimérico

**CC:** Célula del tallo de los vasos sanguíneos

**CD:** Clúster de Diferenciación

**cDNA:** DNA complementario

**CLDN:** Claudina

**CP:** Células que dirigen el crecimiento de los vasos sanguíneos localizadas en la punta del vaso

**CRD:** Región rica en residuos de cisteína

**CT:** Región C-terminal

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol

**DLL:** Ligando tipo delta

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DNA:** Ácido desoxiribonucleico

**DSL:** *Delta-serrata-LAG-2*

**EC:** Célula endotelial

**ECT:** Exosomas derivados de células tumorales

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico

**EMT:** Transición epitelio-mesénquima

**ESCRT:** Complejo proteico de transporte endosómico

**EVs:** Vesículas extracelulares

**Fase G:** Fase de crecimiento

**Fase M:** Fase de mitosis

**Fase S:** Fase de síntesis

**FBS:** Suero bovino fetal

**FC:** Fracción constante

**FGF:** Factor de crecimiento fibroblástico

**FIH:** Factor inhibidor de HIF

**FNG:** Glucosiltransferasas de la familia *Fringe*

**FRAP:** Recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo

**GAG:** Glicosaminoglicano

**GFP:** Proteína verde fluorescente

**GI:** Glicosilación

**GMP:** *Good Manufacturing Practices*

**GO:** Ontología génica

**HDC:** Región de heterodímerización de la porción C-terminal

**HDN:** Región de heterodimerización de la porción N-terminal

**HER:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico

**HIF:** Factor inducible por hipoxia

**HPH:** *HIF-prolil-hidroxilasas*

**HRE:** Elemento de respuesta a la hipoxia

**HRP:** Enzima peroxidasa de rábano picante

**HUVEC:** Cultivo primario de células endoteliales humanas aisladas de cordón umbilical

**IAM:** Infarto agudo de miocardio

**ICAM:** Molécula de adhesión intercelular 1

**IF:** Intensidad de fluorescencia

**IgG:** Inmunoglobulina de tipo G

**IL:** Interleuquina

**ILK:** Kinasa unida a integrina

**ILVs:** Vesículas intraluminares

**iPS:** Célula madre pluripotente inducida

**KEGG:** Enciclopedia de genes y genomas de Kioto

**Ki-67:** Marcador de proliferación Ki-67

**LB:** Caldo de Lisogenia

**LC:** Cromatografía líquida

**LGL:** Proteína letal de la larva gigante

**LMP:** Proteína latente de membrana

**LNR:** Dominio rico en residuos de cisteínas

**MAML:** Proteína del tipo *Mastermind*

**MAPK:** Vía de las quinasas activadoras de mitógenos

**MEC:** Matriz extracelular

**MFEG:** Lactadherina

**EMT:** Transición mesénquimal-epitelial

**MET:** Microscopía electrónica de transmisión

**MIB:** Proteína ubiquitín-ligasa E3 de la familia *Mindbomb*

**miRNAs:** Molécula pequeña de ácido ribonucleico de cadena sencilla

**MMP:** Metaloproteasa

**MO:** Médula ósea

**MS:** Espectrometría de masas

**MSC:** Célula madre mesenquimal

**MVBs:** Cuerpos multivesiculares

**NK:** Célula *natural killer*

**NRARP:** Proteínas con dominios repetidos de anquirinas reguladas por Notch

**TAD:** Dominio de transactivación

**NECD:** Dominio extracelular de Notch

**NICD:** Dominio intracelular de Notch

**NOTCH:** Gen homólogo del locus neurogénico de muescas

**Notch:** Proteína homóloga del locus neurogénico de muescas

**NRR:** Región de regulación negativa

**NT:** Región N-terminal

**ODDD:** Dominio de degradación dependiente de oxígeno

**P/S:** Penicilina/Estreptomicina

**p-VHL:** Proteína *Von Hippel-Lindau*

**PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida

**PAS:** Dominio estructural de proteínas tipo PAS

**PAX:** *Paired box gene*

**PBS:** Solución salina tamponada con fosfato

**pCMV:** Promotor del citomegalovirus

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PDGF:** Factor derivado de plaquetas B

**PEST:** Secuencia peptídica rica en residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T)

**PFA:** Paraformaldehído

**PTEN:** Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa

**PVDF:** *Polyvinylidene difluoride*

**qPCR:** PCR cuantitativa

**RA:** Receptores de angiotensina

**RB:** Proteínas asociadas a retinoblastoma

**RAB:** Proteína G monomérica de la súperfamilia de las proteínas RAS

**RAM:** Módulo de asociación a RBPJ

**RBPJ:** Proteína de unión a señales de recombinación supresora de *hairless*

**RFP:** Proteína roja fluorescente

**RIPA:** Tampón de radioinmunoprecipitación

**RLP:** Proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad

**RM:** Receptores de mineralocorticoides

**RM1 o 2:** Medio de recolección 1 o 2

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RO:** RO4929097

**ROI:** Región de interés

**RT:** Transcripción reversa

**SCU:** Sangre de cordón umbilical

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

**SIRT:** Sirtuina

**SMAD:** Proteína homóloga de MAD (*Mothers Against Decantaplegic*)

**SNAIL:** *Zinc finger protein SNAI*

**SNARE:** Receptor *SNAP*

**T:** tiempo

**TA:** Tejido adiposo

**Taq:** DNA polimerasa termoestable

**TBS:** Solución salina tamponada con Tris

**TF:** Factor de transcripción

**TGF:** Factor de crecimiento transformante

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**P53:** Proteína supresora de tumores 53

**Treg:** Linfocito T regulador

**TSG101:** Proteína del Gen de Susceptibilidad a Tumores 101

**TWIST:** *Class A basic helix-loop-helix protein*

**U.A.:** Unidades arbitrarias

**UB:** Ubiquitina

**VAC:** Vesículas Asociadas a Clatrina

**VAD:** Dispositivos de ayuda mecánica al bombeo del corazón

**VEGF:** Factor de crecimiento del endotelio vascular

**VGFR:** Receptor de VEGF

**VSV:** *Vesicular Stomatitis Virus*

**WB:** *Western Blot*

**ZEB:** *Zinc finger E-box-binding*

## Resumen

Las células de los mamíferos secretan una gran variedad de vesículas extracelulares (EV) que participan activamente en la comunicación intercelular. Entre ellas, los exosomas son un tipo de EV cuyo tamaño está comprendido entre los 20 y 150 nanómetros que juegan un papel importante en la comunicación intercelular. De este modo, se ha descrito el papel de los exosomas en distintos procesos como la regeneración de tejidos, la respuesta inmunitaria o en la progresión de diferentes tipos de cánceres.

Por otro lado, se ha observado que la actividad de la vía de señalización de Notch juega un papel muy importante en procesos de diferenciación celular, la angiogénesis o la proliferación, entre otros. Además, se ha relacionado con la aparición y progresión de un gran número de patologías, como el cáncer. Trabajos recientes han advertido que la actividad de la vía de Notch puede regularse mediante un nuevo mecanismo de señalización mediado por exosomas. En este trabajo se profundizó en este nuevo mecanismo de señalización de la vía de Notch en dos contextos diferentes como son las terapias regenerativas y el cáncer.

Un trabajo previamente publicado por nuestro equipo de trabajo demostró que las células madre mesenquimales (MSC) que mantenían una expresión aumentada del factor inducible por hipoxia  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ; HIF-MSC) aumentaban el potencial terapéutico de las MSC nativas en un modelo de infarto agudo de miocardio (IAM) en rata a través de un aumento de la angiogénesis y una reducción de la fibrosis. Varios trabajos han estudiado la relación entre la vía de señalización de Notch y HIF- $1\alpha$ ; así como la influencia de ambos en el proceso angiogénico. Por estos motivos, en este trabajo nos interesamos por evaluar la relación de ambas vías y su efecto sobre la angiogénesis a través de los exosomas liberados por las HIF-MSC y las MSC. Los resultados permitieron observar que la expresión de HIF- $1\alpha$  indujo un aumento en la secreción y la transferencia de exosomas de MSC a cultivos primarios de células endoteliales. Además, se observó que los exosomas derivados de HIF-MSC tenían un mayor potencial angiogénico tanto *in vitro* como *in vivo* en parte debido a una mayor incorporación del ligando de la vía de Notch Jagged1.

En la última década, se ha observado que los exosomas procedentes de células tumorales contribuyen a la progresión tumoral a través de mecanismos como la activación de la transición epitelio mesénquima (EMT), el establecimiento de nichos pre-metastáticos o la inmunomodulación. En este sentido, se sabe que la vía de señalización de Notch es capaz de activar la EMT durante la progresión de distintos tipos de cánceres. Así mismo, los cánceres de mama de peor prognosis han sido reiteradamente relacionados con una desregulación de la vía de señalización de Notch. Por estas razones, nos inquietó la posibilidad de que la señalización de la vía de Notch a través de exosomas estuviera influyendo en la progresión del cáncer de mama. De este modo, estudiamos la presencia de componentes de la vía de señalización de Notch en los exosomas procedentes de dos líneas tumorales de cáncer de mama, una más agresiva (MDA-MB-231) y otra menos agresiva (MCF-7). Así, se observó que varios componentes de Notch se sobreexpresaron en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 en comparación con los procedentes de MCF-7. Fue de particular interés la detección del dominio intracelular con actividad transcripcional de Notch1 (N1ICD) sobreexpresado en los exosomas procedentes de MDA-MB-231. Debido a que previamente había sido demostrado que una sobreexpresión de N1ICD en MCF-7 aumentaba su tumorigenicidad a través de una inducción de la EMT, se evaluó el efecto de los componentes de Notch incorporados en los exosomas procedentes de ambas líneas tumorales sobre cultivos de MCF-7. Nuestros resultados sugieren que los componentes de Notch incorporados en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 son funcionales y contribuyen a la inducción de la EMT al ser agregados a cultivos de MCF-7 en parte debido a la actividad de N1ICD.

## Summary

Mammal cells secrete a great variety of extracellular vesicles (EV) that actively participate in intercellular communication. Among them, exosomes are a type of EV whose size is between 20 and 150 nanometers and play an important role in intercellular communication. In this way, the role of exosomes in different processes such as tissue regeneration, the immune response or in the progression of different types of cancers has been described.

On the other hand, it has been observed that the Notch signaling pathway plays a very important role in processes such as cell differentiation, angiogenesis or proliferation, among others. In addition, it has been related to the appearance and progression of a large number of pathologies, such as cancer. Recent works have shown that the activity of the Notch pathway can be regulated by a new signaling mechanism mediated by exosomes. In this work, we deepened this new signaling mechanism of the Notch signaling pathway in two different contexts: the regenerative therapies and cancer.

A work previously published by our laboratory showed that mesenchymal stem cells (MSC) that maintained an increased expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ; HIF-MSC) increased the therapeutic potential of native MSC in a model of acute myocardial infarction (AMI) in rats through an increase in angiogenesis and a reduction in fibrosis. Several studies have studied the relationship between the Notch signaling pathway and HIF-1 $\alpha$  as well as the influence of both in the angiogenic process. For these reasons, in this work we were interested in evaluating the relationship of both pathways and their effect on angiogenesis through exosomes released by HIF-MSCs and MSCs. The results showed that the expression of HIF-1 $\alpha$  induced an increase in the secretion and the transfer of exosomes of MSC to primary cultures of endothelial cells. In addition, it was observed that exosomes derived from HIF-MSC had a greater angiogenic potential both in vitro and in vivo in part due to a greater incorporation of the Notch ligand Jagged1.

In the last decade, it has been observed that exosomes from tumor cells contribute to tumor progression through mechanisms such as the activation of epithelial to mesenchymal transition (EMT), the establishment of pre-metastatic niches or

immunomodulation. In this sense, it is known that the Notch signaling pathway is capable of activating EMT during the progression of different types of cancers. Likewise, breast cancers of bad prognosis have been repeatedly related to a deregulation of the Notch signaling pathway. For these reasons, we were concerned about the possibility that the signaling of the Notch pathway through exosomes was influencing the progression of breast cancers. In this way, we studied the presence of Notch signaling pathway components in exosomes from the metastatic and more aggressive MDA-MB-231 and the non-metastatic and less aggressive MCF-7 cell lines. It was observed that several Notch components were overexpressed in exosomes from MDA-MB-231 compared to those from MCF-7. Of particular interest was the detection of the intracellular domain with transcriptional activity of Notch1 (N1ICD) overexpressed in MDA-MB-231 exosomes. It has been previously demonstrated that an overexpression of N1ICD in MCF-7 increases its tumorigenicity through an induction of EMT. Because of this, we evaluated the effect of Notch components incorporated in exosomes from both tumoral cell lines on MCF-7 cultures. Our results suggested that Notch components incorporated into MDA-MB-231 exosomes were functional and contributed to the induction of EMT when added to MCF-7 cultures in part due to N1ICD activity.

## Resum

Les cèl·lules dels mamífers secreten una gran varietat de vesícules extracel·lulars (EV) que participen activament en la comunicació intercel·lular. Entre elles, els exosomes són un tipus de EV amb una grandària compresa entre els 20 i 150 nanòmetres que juguen un paper important en la comunicació intercel·lular. D'aquesta manera, s'ha descrit el paper dels exosomes en diferents processos com la regeneració de teixits, la resposta immunitària o en la progressió de diferents tipus de càncers.

D'altra banda, s'ha observat que l'activitat de la via de senyalització de Notch juga un paper molt important en processos de diferenciació cel·lular, la angiogènesis o la proliferació, entre altres. A més, s'ha relacionat amb l'aparició i progressió d'un gran nombre de patologies, com el càncer. Treballs recents han advertit que l'activitat de la via de Notch pot regular-se mitjançant un nou mecanisme de senyalització mediat per exosomes. En aquest treball es va aprofundir en aquest nou mecanisme de senyalització de la via de Notch en dos contextos diferents com són les teràpies regeneratives i el càncer.

Un treball prèviament publicat pel nostre equip de treball va demostrar que les cèl·lules mare mesenquimals (MSC) que mantenen una expressió augmentada del factor inducible per hipòxia  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ; HIF-MSC) augmentaven el potencial terapèutic de les MSC natives en un model d'infart agut de miocardi (IAM) en rata a través d'un augment de la angiogènesis i una reducció de la fibrosi. Diversos treballs han estudiat la relació entre la via de senyalització de Notch i HIF- $1\alpha$ ; així com la influència de tots dos en el procés angiogènic. Per aquests motius, en aquest treball ens vam interessar en estudiar la relació de totes dues vies i el seu efecte sobre la angiogènesis a través dels exosomes alliberats per les HIF-MSC i les MSC. Els resultats van permetre observar que l'expressió de HIF- $1\alpha$  va induir un augment en la secreció i la transferència d'exosomes de MSC a cultius primaris de cèl·lules endotelials. A més, es va observar que els exosomes derivats de HIF-MSC tenien un major potencial angiogènic tant in vitro com in vivo en part a causa d'una major incorporació del lligant de la via de Notch Jagged1.

En l'última dècada, s'ha observat que els exosomes procedents de cèl·lules tumorals contribueixen a la progressió tumoral a través de mecanismes com l'activació de la

transició epiteli mesènquima (EMT), l'establiment de nínxols pre-metastàtics o la immunomodulació. En aquest sentit, se sap que la via de senyalització de Notch és capaç d'activar l'EMT durant la progressió de diferents tipus de càncers. Així mateix, els càncers de mama de pitjor pronòstic han sigut reiteradament relacionats amb una desregulació de la via de senyalització de Notch. Per aquestes raons, ens va inquietar la possibilitat que la senyalització de la via de Notch a través d'exosomes estiguera influïent en la progressió del càncer de mama. D'aquesta manera, estudiem la presència de components de la via de senyalització de Notch en els exosomes procedents de dues línies tumorals de càncer de mama, una més agressiva (MDA-MB-231) i una altra menys agressiva (MCF-7). Així, es va observar que diversos components de Notch es sobreexpressaven en els exosomes procedents de MDA-MB-231 en comparació amb els procedents de MCF-7. Va ser de particular interès la detecció del domini intracel·lular amb activitat transcripcional de Notch1 (N1ICD) sobreexpressat en els exosomes procedents de MDA-MB-231. Debut a que prèviament havia sigut demostrat que una sobreexpressió de N1ICD en MCF-7 augmentava la seua tumorigenicitat a través d'una inducció de l'EMT, es va evaluar l'efecte dels components de Notch incorporats en els exosomes procedents de les dues línies tumorals sobre cultius de MCF-7. Els nostres resultats suggereixen que els components de Notch incorporats en els exosomes procedents de MDA-MB-231 eren funcionals i contribuïen a la inducció de l'EMT en ser agregats a cultius de MCF-7 en part a causa de l'activitat de N1ICD.



# **1. Introducción**



# **1. Introducción**

## **1.1 Mecanismos de Comunicación Celular**

En 1839 Matthias Jakob Schleiden y Theodor Schwann propusieron la teoría celular para los vegetales y los animales, respectivamente. En ella defendieron que todos los organismos estaban compuestos por células, y que todas ellas derivan de otras que les preceden. No obstante, los primeros indicios de vida en la tierra sugieren que los primeros organismos unicelulares monopolizaron la tierra hace más de 4000 millones de años y éstos fueron adaptándose gradualmente a su entorno<sup>1</sup>. La teoría evolutiva establece que estas adaptaciones al ambiente fueron generando formas de vida más complejas, surgiendo a partir de éstos, alrededor de 500 millones de años después, los primeros organismos multicelulares y con ellos aparecieron los mecanismos necesarios para establecer vías de tráfico de información entre sus células<sup>2</sup>.

La comunicación intercelular es el proceso mediante el cual una célula es capaz de influir en el comportamiento de otra. Muchas observaciones sugieren que los mecanismos de comunicación intercelular fueron muy importantes en la evolución de los organismos unicelulares más simples hacia organizaciones más complejas. En este sentido, se han aportado evidencias de que los mecanismos que permiten a las células influir en el comportamiento de otra han existido en la tierra mucho antes de la aparición de los primeros organismos multicelulares <sup>2</sup>. Por ejemplo, en la reproducción sexual de las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, se ha observado que secretan en el ambiente un péptido que es captado por otras haploides del sexo opuesto haciendo que se preparen para el apareamiento. A continuación, ambos organismos haploides se fusionan generando, al final del proceso, células con nuevos reordenamientos genéticos importantes que se traducen en el desarrollo de ventajas adaptativas <sup>2</sup>. Así mismo, la comunicación mediada por interacciones célula-célula se ha considerado esencial para que surgieran los primeros organismos que dan lugar en la actualidad a los cuatro reinos eucariotas (protistas, animales, hongos y plantas) tal y como sugiere la teoría endosimbiótica formulada por Lynn Margulis en 1967 <sup>3</sup>.

De este modo, los mecanismos de comunicación celular han acompañado a las diferentes formas de vida desde tiempos remotos sirviéndoles de herramienta para cooperar y adaptarse en la colonización de diferentes ambientes. En este mismo sentido, varios estudios han sugerido que los mecanismos de comunicación descritos en organismos unicelulares, como las levaduras, están estrechamente relacionados con otros encontrados en células de organismos multicelulares como los animales. Sin embargo, tanto los procesos de duplicación y divergencia genética, como la presión evolutiva que genera la necesidad de coordinar el funcionamiento de un organismo multicelular, han hecho que estos mecanismos de comunicación en animales sean más complejos <sup>2</sup>.

A principios del siglo pasado, en un trabajo publicado por John Newport Langley <sup>4</sup>, se observó que ciertos agentes eran capaces de desencadenar respuestas biológicas. Así, hipotetizó por primera vez la presencia de moléculas receptoras o aceptoras en las células que eran los responsables de sensibilizar a una célula ante ciertas señales o estímulos. En la actualidad, han sido descritos y siguen describiéndose un gran número de receptores y estimuladores diferentes que permiten a las células comunicarse enviando y recibiendo señales de naturaleza bioquímica y mecánica.

Por consiguiente, cada célula de los animales está preparada para responder a un conjunto de señales extracelulares producidas por otras células que actúan en diferentes combinaciones para modular su comportamiento. Prestando atención a la distancia a la que estas señales desarrollan su efecto se pueden clasificar del siguiente modo (Figura 1.1):

- Autocrina: La señal actúa en la célula que la produce, pero se secreta e interacciona con un receptor de la célula.
- Yuxtacrina: La señal actúa sobre células adyacentes en contacto con la célula emisora.
- Paracrina: La señal actúa sobre células situadas en la vecindad de la célula emisora de la señal.

- Endocrina: La señal actúa sobre células localizadas lejos de la célula que la produce. Las células endocrinas producen hormonas que viajan a través de la sangre y llegan a otras regiones del cuerpo.

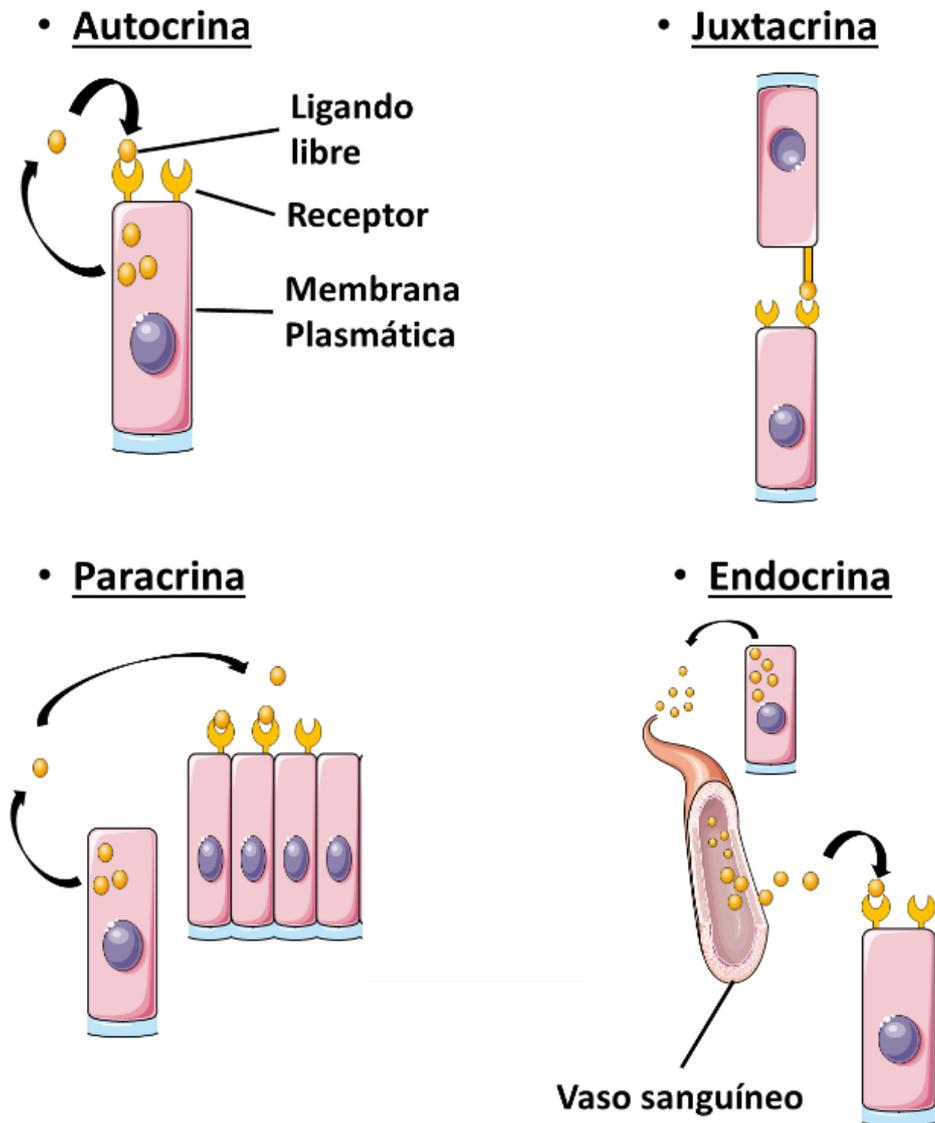


Figura 1.1 Representación de los tipos de señalización celular. Figura creada usando *Servier Medical Art*.

En este trabajo el interés se ha focalizado en un mecanismo de comunicación celular paracrino mediado por EVs. En particular, hemos estudiado la influencia de los exosomas en la actividad de una conocida vía de señalización celular, la Vía de Notch, en dos contextos diferentes: las terapias regenerativas y en el cáncer. Los exosomas son vesículas lipídicas secretadas por las células que, tras su descubrimiento en la década de

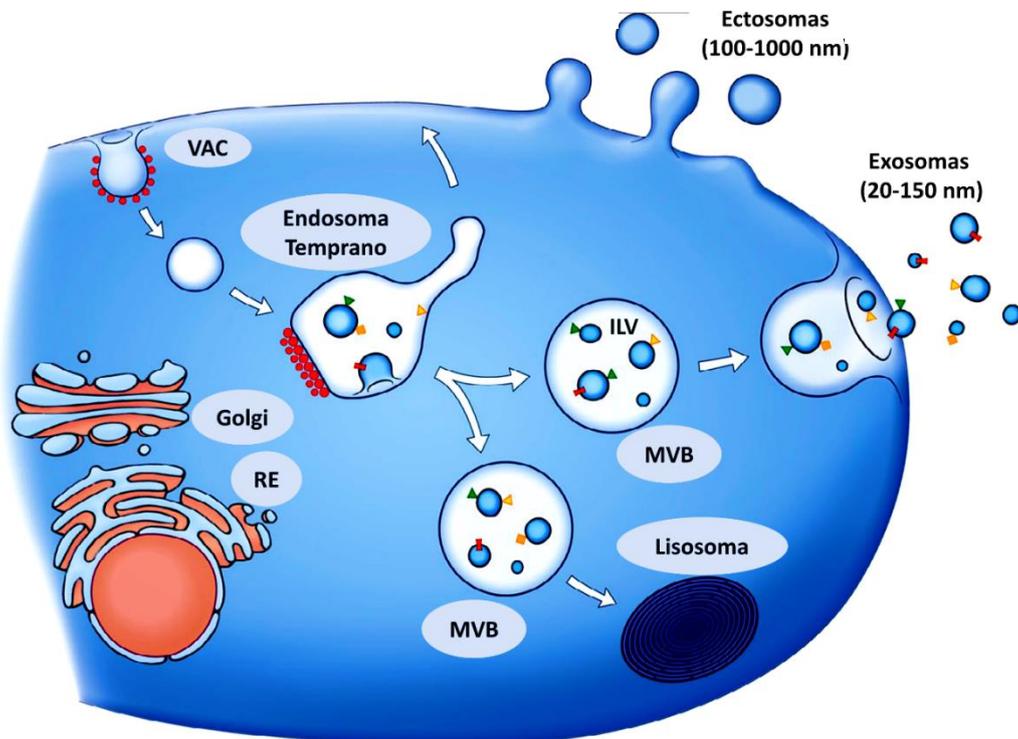
1980<sup>5,6</sup>, fueron consideradas durante años como un mecanismo celular para la liberación de sustancias de desecho. Hoy en día, como se describirá a continuación, ha cambiado la perspectiva del papel de los exosomas existiendo un gran número de estudios que sugieren papeles particularmente importantes en la comunicación intercelular.

### **1.1.1 Vesículas Extracelulares: los Exosomas**

Las células pueden comunicarse con ellas mismas, con células vecinas o con células localizadas a distancias más largas a través de la secreción de vesículas extracelulares (EVs). Estas vesículas son estructuras membranosas esféricas con un interior acuoso y tanto en diferentes regiones de su membrana como en el lumen contienen diferentes combinaciones de biomoléculas como proteínas, lípidos, RNAs, miRNAs, etc. Las células secretan diferentes tipos de EVs que se clasifican en exosomas o ectosomas en función de su tamaño y de la membrana sub-celular que les da origen (Figura 1.2)<sup>7</sup>. Además, existen otro tipo de vesículas extracelulares denominadas cuerpos apoptóticos. Éstos se forman tras la muerte celular programada o apoptosis por fragmentación de la célula muerta, tienen un rango de tamaños alrededor de 1-5  $\mu\text{m}$  y también están compuestos por diferentes combinaciones de proteínas, lípidos, mRNAs, miRNAs, DNA, etc.<sup>8</sup>.

Por un lado, los precursores exosomales, denominados vesículas intraluminales (ILVs), se originan a partir de microinvaginaciones de la membrana en las vesículas procedentes de las rutas de endocitosis o cisternas endocíticas del interior de las células. Una vez se acumulan estas ILVs, las cisternas pasan a denominarse cuerpos multivesiculares (MVBs) (Figura 1.2)<sup>9-12</sup>. Finalmente, los MVBs, en respuesta a algún estímulo o no, se trasladan desde regiones perinucleares de la célula a regiones próximas a la membrana plasmática de la célula donde, tras fusionarse con ella, exocitan su contenido en ILVs al espacio extracelular (Figura 1.2 y 1.3). Las ILVs una vez liberadas al espacio extracelular se denominan exosomas y tienen un rango de tamaños entre 20-150 nm de diámetro (Figura 1.2). Por otro lado, los ectosomas, con un rango de tamaños de 100-1.000 nm de diámetro, se generan rápidamente a partir de evaginaciones de la membrana plasmática de la célula (Figura 1.2)<sup>10,12</sup>. Primero, el futuro contenido de los ectosomas se acumula

en regiones de la cara citosólica de la membrana plasmática que tienen una composición particular, después, estas regiones desarrollan evaginaciones que finalizan con la fisión de la vesícula y su liberación al espacio extracelular (Figura 1.2) <sup>9,10</sup>.



**Figura 1.2 Tipos de vesículas extracelulares.** Los ectosomas se forman directamente a partir de evaginaciones de la membrana plasmática de la célula. Por otro lado, las vesículas intraluminales (ILVs), se forman por invaginaciones de la membrana de las vesículas endocíticas tempranas. Las vesículas endocíticas tempranas pasan a denominarse entonces MVBs. Los MVBs viajan a regiones próximas a la membrana plasmática y tras la fusión con ella liberan las ILVs al espacio extracelular. Las ILVs en el espacio extracelular son los exosomas. Las esferas rojas, simbolizan moléculas de la proteína clatrina (VAC: vesículas asociadas a clatrina). Las proteínas asociadas a la membrana o transmembrana se representan como triángulos o rectángulos, respectivamente. Las flechas blancas indican la dirección de las proteínas, los lípidos y los MVBs entre los orgánulos y la membrana plasmática. RE: Retículo endoplásmico; adaptado de Raposo, G. y colaboradores <sup>9</sup>.

Tanto las diferencias de origen como el mecanismo a través del cual se generan estos dos tipos de vesículas sugieren que los exosomas y los ectosomas son diferentes. Con el objetivo de clarificar las diferencias funcionales, se han realizado numerosos esfuerzos a lo largo de muchos años para tratar de aislar por separado ambas fracciones de EVs. A pesar de haberse optimizado los mecanismos de aislamiento de vesículas de pequeño

tamaño mediante protocolos que combinan ultracentrifugaciones seriadas y ultrafiltración, la mayoría de trabajos publicados en la actualidad que usan el término exosomas se refieren a poblaciones enriquecidas en vesículas de pequeño tamaño con determinados marcadores exosomales y ausencia de otros marcadores de contaminación que comentaremos a continuación<sup>13,14</sup>. No obstante, la mayoría de técnicas que se usan hoy en día no eximen la posibilidad de estar aislando poblaciones enriquecidas en exosomas con cierto contenido en ectosomas<sup>15</sup>. A continuación, se explica el origen, la composición y características de ambas poblaciones de EVs.

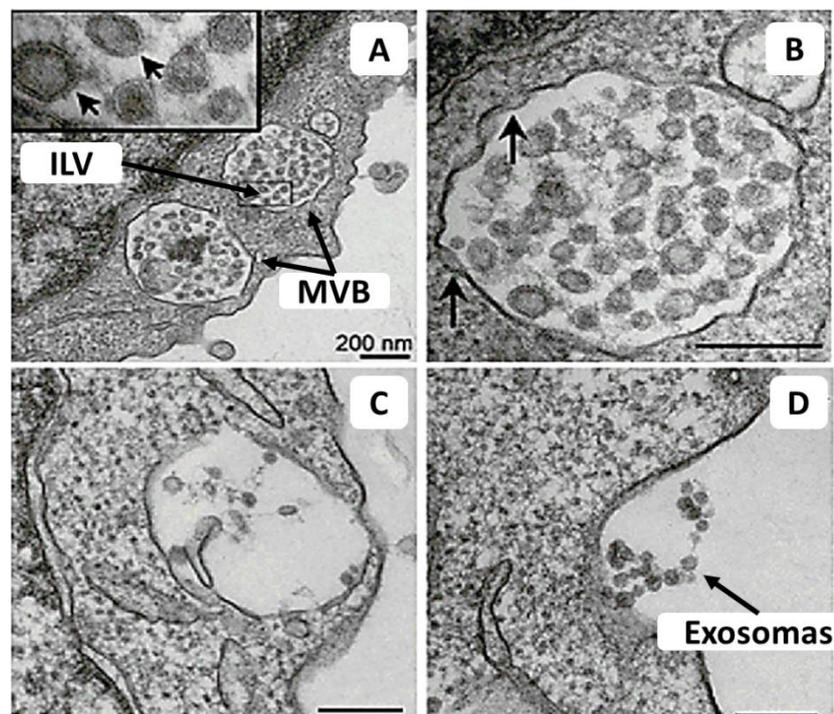
### **1.1.1.1 Mecanismo de Formación y Liberación de las Vesículas Extracelulares**

Ha sido descrito que la formación de las ILVs en el interior de los MVBs depende principalmente de un complejo proteico que participa en el transporte endosómico de diferentes moléculas (ESCRT, del inglés *endosomal sorting complex required for transport*) y de la ceramida<sup>16</sup>. El ESCRT es una maquinaria molecular que se compone de cuatro complejos multiproteicos: (ESCRT)-0, -I, -II y -III, que se asocian a otras proteínas citosólicas como Alix, VPS4 o ARRDC1. Así, este complejo se ha descrito que participa en procesos de remodelado de la membrana plasmática durante las evaginaciones virales, la citocinesis o la autofagia. Del mismo modo, se ha observado también su participación durante la formación de las ILVs contribuyendo a las microinvaginaciones de la membrana en las cisternas endocíticas y en el transporte de determinadas proteínas al interior de las ILVs<sup>7,17-20</sup>. Sin embargo, los detalles de cómo contribuye el complejo ESCRT en la biogénesis de las ILVs continúa siendo un proceso desconocido. Por otro lado, la ceramida es una molécula de carácter lipídico que se encuentra en las membranas de los exosomas. Se ha observado que participa de un modo crítico en las microinvaginaciones de las cisternas endocíticas que dan origen a las ILVs<sup>16</sup>.

El proceso de generación de los ectosomas es menos conocido que el de las ILVs. Sin embargo, tras la acumulación de ciertas moléculas en regiones especiales de la membrana plasmática, se considera que los mecanismos que deben de gobernar el proceso de evaginación y fisión de la membrana plasmática estén relacionados con una

redistribución de los fosfolípidos de la membrana a través de enzimas dependientes de calcio, como las flipasas y las flopasas, y al menos dos complejos ESCRT que activarían procesos análogos a los que ocurren en la formación de las ILVs<sup>7,10</sup>.

A diferencia de los ectosomas que se forman directamente en la membrana plasmática de la célula, las ILVs contenidas en los MVBs tienen que desplazarse de la región perinuclear de las células hacia regiones próximas de la membrana plasmática para fusionarse y finalmente ser liberadas al espacio extracelular (Figura 1.3). Este proceso puede ocurrir de un modo continuo o aumentarse en respuesta a ciertos estímulos como la activación de ciertos receptores, la presencia de ciertos factores de señalización como el AMP cíclico, el calcio o la hipoxia<sup>21,22</sup>. En cambio, los ectosomas, una vez se generan por acumulación de ciertas moléculas en microdominios de la membrana plasmática son liberados rápidamente.



**Figura 1.3** Imágenes de microscopía electrónica del proceso de liberación de exosomas a partir de los MVBs en células madre hematopoyéticas. **A.** Se observan dos MVBs próximos a la membrana plasmática de la célula con gran cantidad de ILVs en su interior. **B.** Zoom en uno de los MVB del apartado A. **C.** El MVB comienza a fusionarse con la membrana plasmática de la célula. **D.** La fusión del MVB con la membrana plasmática termina y las ILVs son liberadas al exterior celular, denominándose a partir de entonces exosomas. Adaptado de *Sahoo, S.* y colaboradores<sup>23</sup>.

Así, en respuesta a los estímulos apropiados, puede incrementarse la movilización de los MVBs hacia la membrana plasmática. Varios trabajos han descrito la participación de varias proteínas G como RAL, RAB27a y RAB27b en la movilización de los MVBs<sup>24,25</sup>. Una vez los MVBs alcanzan la membrana plasmática han de fusionarse con ella en regiones particulares para liberar su contenido al exterior de la célula. Se ha observado que las regiones donde se fusionan las MVBs pueden situarse a lo largo de toda la membrana o en regiones concretas. Varios estudios han sugerido que los complejos proteicos de la familia SNARE se encuentran en los MVBs (P-SNARE) y en la membrana plasmática (dos Q-SNARE: SNAP23 y Sintaxina-1), son importantes en el proceso de fusión entre los MVBs y la membrana plasmática<sup>26</sup>.

Una vez los ectosomas y los exosomas son liberados al espacio extracelular pueden navegar e interactuar de diferentes formas con las membranas plasmáticas de las células diana.

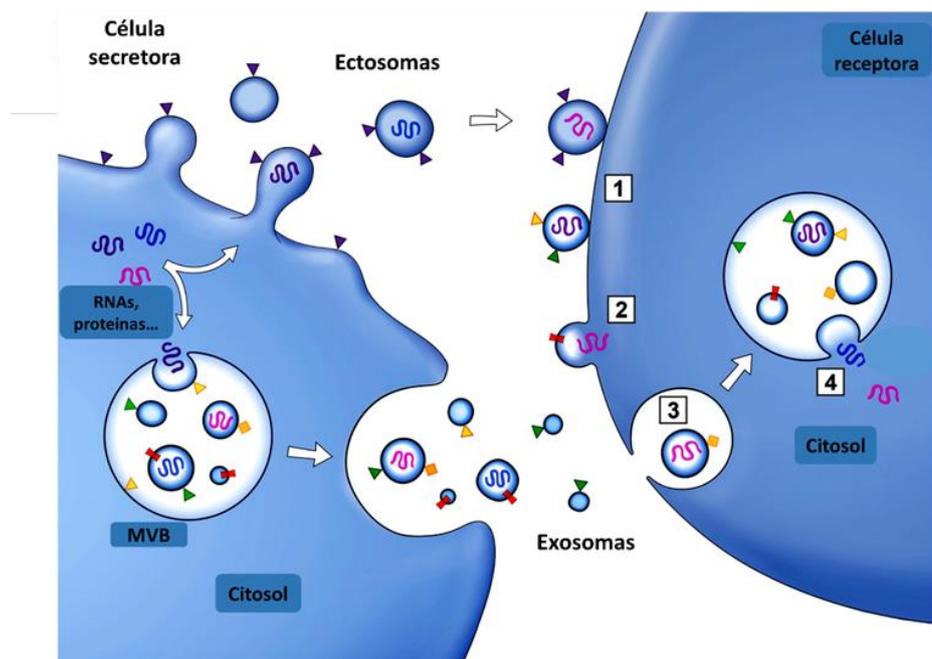
### **1.1.1.2 Reconocimiento y Señalización de las Vesículas Extracelulares en las Células Diana**

Una vez liberadas las EVs pueden quedarse en el espacio extracelular entre las uniones intercelulares, pero también pueden abandonar estas regiones y moverse a lugares más alejados a través de los diferentes fluidos corporales como la linfa o la sangre<sup>27</sup>. Un aspecto interesante de las EVs es el reconocimiento de sus células diana. A pesar de que el mecanismo todavía se desconoce, varios estudios han propuesto una serie de moléculas como las tetraspaninas, las integrinas, los proteoglicanos, las lectinas y moléculas de adhesión como la laminina o la fibronectina como mediadoras del proceso. De este modo, las EVs en función de la composición de proteínas de su membrana podrían tener dianas celulares más o menos específicas<sup>28-31</sup>.

Se han observado diferentes formas a través de las cuales las EVs llevan a cabo su señalización en las células diana. En algunas ocasiones, la señalización se desencadena al interactuar determinados ligandos expuestos en la superficie de las EVs con receptores de las células diana (Figura 1.4)<sup>32</sup>. No obstante, otras veces la señalización mediada por las EVs ocurre después de la fusión de sus membranas con las de la célula

diana y consiguiente liberación del contenido citosólico de las EVs en el interior de la célula (Figura 1.4)<sup>33-35</sup>.

El proceso de fusión puede ocurrir en diferentes localizaciones de la célula. Así, la fusión puede ocurrir directamente con la membrana plasmática; aunque otras veces las EVs se internalizan después de interactuar con ciertos componentes de la membrana plasmática que activan procesos de fagocitosis o macropinocitosis<sup>31,36,37</sup>. En estos casos, las vesículas entran en el sistema endocítico y es ahí donde se terminan de fusionar y liberar su contenido al interior de la célula (Figura 1.4). No obstante, se ha descrito que en algunas ocasiones las vesículas internalizadas pueden volver a secretarse sin llegar a verter su contenido en la célula que los endocita (Figura 1.4)<sup>36,38-41</sup>. Las moléculas involucradas en el proceso de fusión de las membranas plasmáticas todavía se desconocen. Se ha especulado mucho con la participación de otras proteínas que han demostrado tener papeles en la fusión de membranas y que, a su vez, se han identificado en las membranas de las EVs como CD9 y las sincitinas 1 y 2<sup>38,42-47</sup>.



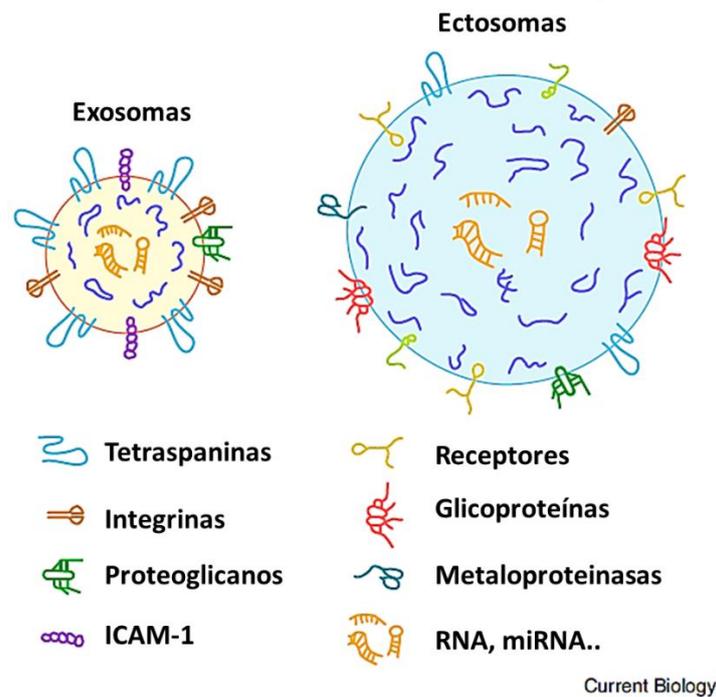
**Figura 1.4 Mecanismos de señalización de las vesículas extracelulares.** La señalización de las vesículas extracelulares puede ser: **1)** por interacción directa de la EV con la membrana plasmática de la célula diana. **2)** Por interacción con la membrana plasmática de la célula diana, fusionándose y vertiendo su contenido en el citosol. **3)** Mediante endocitosis, fagocitosis o macropinocitosis en MVBs. **4)** Dentro de la célula, por fusión con la membrana del compartimento endocítico que las contiene y liberación de su contenido al interior del citosol de la célula. Las proteínas asociadas a la membrana o transmembrana se

representan como triángulos o rectángulos, respectivamente. Las flechas blancas indican la dirección de las proteínas, los lípidos y los MVBs entre los orgánulos y la membrana plasmática. Adaptado de *Raposo, G. y colaboradores*<sup>9</sup>.

El significado de la señalización mediada por las EVs depende de su combinación de biomoléculas. Así, se han descrito tanto diferencias en la composición entre exosomas y ectosomas como también entre las EVs secretadas por diferentes tipos celulares y las secretadas por el mismo tipo celular en estados fisiológicos diferentes<sup>48,49</sup>.

### **1.1.1.3 Composición Citosólica y de la Membrana de las Vesículas Extracelulares**

La caracterización de las membranas lipídicas de las EVs permitió observar que no hay grandes diferencias en cuanto a la composición lipídica de las membranas de los exosomas y los ectosomas. Ambos tipos de vesículas tienen un alto contenido en colesterol, esfingomiélin y ceramida. No obstante, en la membrana de los exosomas se suelen encontrar altas concentraciones del fosfolípido lisobisfosfatídico, ausente en otras membranas celulares<sup>9,10,50</sup>. En cuanto a la composición de proteínas de los exosomas, se ha observado una alta concentración de las tetraspaninas CD63, CD81 y CD9 (Figura 1.5). Aparte de las tetraspaninas, también se ha descrito la presencia de otras proteínas que se suelen usar como marcadores exosomales por su alta concentración en ellos como la flotilina1, TSG101 o Alix. La presencia de estos marcadores junto con la ausencia de otros marcadores como la Calnexina, que está presente en vesículas procedentes del retículo endoplasmático y no en exosomas, se usan para medir la pureza de los aislamientos.



**Figura 1.5 Estructura y composición de exosomas y ectosomas.** Se observa un tamaño mayor de los ectosomas respecto a los exosomas. Por otro lado, se pueden observar algunas de las diferencias en cuanto a la composición en algunas de las biomoléculas presentes en exosomas y ectosomas, como la mayor abundancia de tetraspaninas o integrinas en los exosomas o las glicoproteínas en ectosomas. Adaptado de Meldolesi, J<sup>8</sup>.

Por otro lado, en ambas poblaciones de EVs se ha descrito la presencia de proteínas, RNAs o miRNAs presentes en el citosol o la membrana plasmática de las células que los liberan, en menor o igual concentración (Figura 1.5). No obstante, muchos estudios han advertido de la presencia de algunas de estas moléculas en concentraciones superiores a las que se encuentran en la célula lo que sugiere que existen mecanismos específicos para la incorporación de éstas al interior de las vesículas. De este modo, varios trabajos han sugerido que el mecanismo por el cual ciertas proteínas, RNAs o miRNAs se cargan en las EVs ocurre de un modo dependiente de una cooperación del complejo ESCRT junto con otras proteínas. Por ejemplo, varias de las proteínas que han sido identificadas en ILVs están ubiquitinadas. Posteriormente, estas proteínas que han sido etiquetadas para su introducción en exosomas son deubiquitinadas por el complejo ESCRT a través de su interacción con la enzima tirosina fosfatasa (HD-PTP)<sup>18</sup>. Las tetraspaninas también se les ha relacionado con la incorporación de determinadas moléculas en los exosomas,

así como ciertas modificaciones postraduccionales como miristoilaciones, sumoilaciones o palmitoilaciones, se han descrito como etiquetas para la introducción de éstas en exosomas y en ectosomas.

Por consiguiente, en las EVs se pueden encontrar un gran número de moléculas en diferentes combinaciones que puede variar en función del estado fisiológico de la célula que los libera. La combinación de biomoléculas incorporadas dentro de las EVs junto con el estado fisiológico de la célula diana determinará la señalización desencadenada<sup>9,20,26,48,51,52</sup>. En este sentido, se han encontrado muchos tipos de moléculas clave con actividades funcionales muy interesantes una vez son incorporados por la célula diana como Wnt, HIF-1 o el ligando de la vía de Notch Dll4<sup>53-55</sup>. En concreto, la vía de señalización de Notch, como se detallará más adelante, está íntimamente relacionada con la regulación del proceso angiogénico que es clave en la recuperación del tejido cardíaco después de un infarto de miocardio. De este modo, la posibilidad de que componentes de Notch se estuvieran incorporando en los exosomas resultó de especial interés. A continuación, detallaremos el funcionamiento de esta vía de señalización.

### 1.1.2 La Vía de Señalización de Notch

En 1914, John S. Dexter observó una muesca (Notch en inglés) heredable en las alas de algunas de las moscas de la especie *Drosophila melanogaster* mientras trabajaba en el *Olivet College* (Michigan, Estados Unidos). Tres años más tarde, Thomas Hunt Morgan descubrió el alelo responsable al que llamaron Notch<sup>56</sup>. A mediados de 1920, Morgan y sus colaboradores identificaron varios alelos de Notch cuyas mutaciones generaban diferentes respuestas fenotípicas. Más adelante, se descubrió la presencia de más componentes relacionados con esos fenotipos y sus homólogos en otros organismos como *C.elegans* o en animales superiores<sup>57-59</sup>.

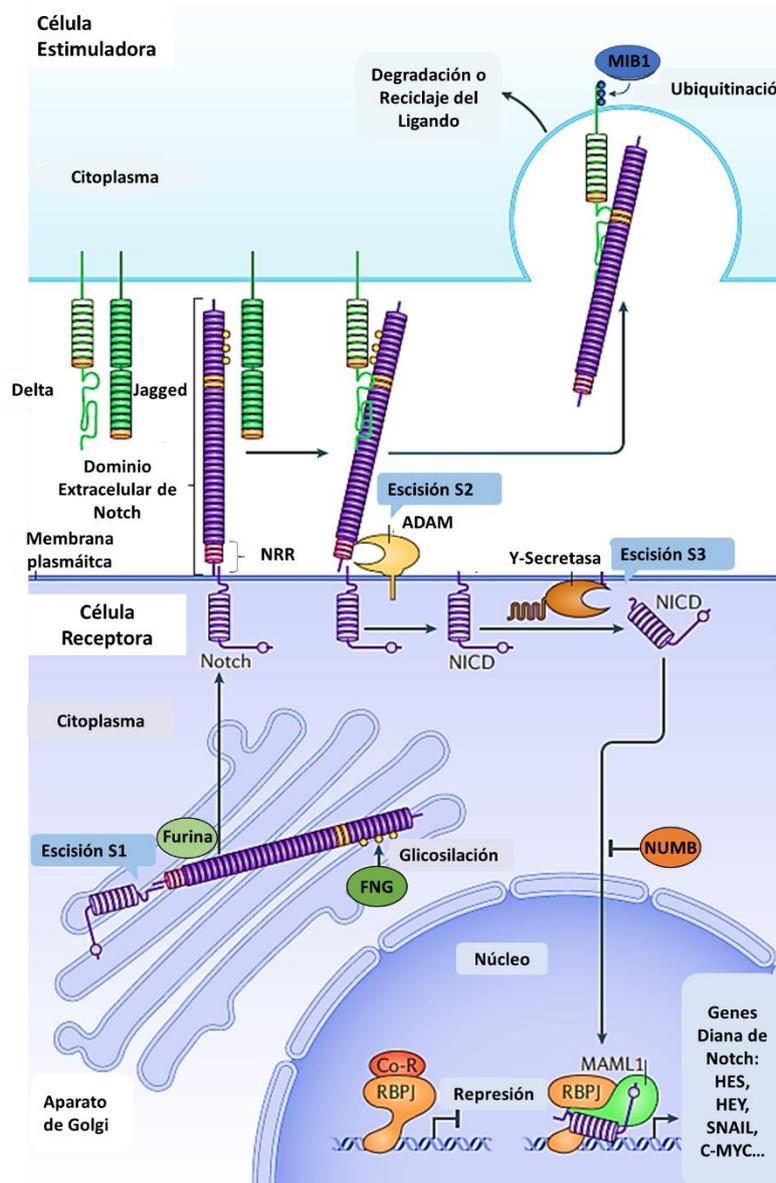
En la actualidad, se sabe que la vía de señalización de Notch es una ruta evolutivamente conservada que participa en muchos procesos biológicos como el estado de diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis, la migración, el desarrollo de órganos, la morfogénesis, etc. Por otro lado, su desregulación se relaciona con la

aparición de patologías como el cáncer, el síndrome de Alagille o la arteriopatía conocida como CADASIL<sup>60-62</sup>. De este modo, se ha visto que la vía de Notch está implicada en procesos muy dispares y con significados contradictorios que la hacen una vía de difícil estudio. A pesar de esto, el mecanismo de señalización es relativamente sencillo, comenzando por la interacción entre un ligando y un receptor, ambos situados en la membrana plasmática de células adyacentes (Figura 1.6).

### 1.1.2.1 Activación de la Vía de Notch

En mamíferos, la vía clásica de activación de la vía de Notch se inicia cuando uno de los ligandos de la vía de Notch tipo Delta o Jagged de una célula (célula estimuladora) interacciona con uno de los receptores de Notch (Notch1-4) de células adyacentes (célula receptora) (Figura 1.6). También existe un mecanismo no canónico de activación de la vía que puede ser tanto dependiente como independiente de ligando<sup>63</sup>. Sin embargo, en este trabajo se estudió el mecanismo clásico de activación. La interacción entre el ligando y el receptor desencadena una serie de cambios conformacionales en el receptor que permiten a proteínas miembros de la familia de las secretasas y las metaloproteasas realizar una doble escisión del receptor de Notch en su cara extracelular e intracelular (Figura 1.6)<sup>64</sup>. En primer lugar, ocurre la escisión extracelular del receptor (escisión S2) que genera el dominio extracelular de Notch (NECD) y posteriormente, el receptor se escinde por su cara intracelular (escisión S3) liberándose el dominio intracelular del receptor de Notch (NICD) (Figura 1.6). A continuación, NICD se transloca al núcleo donde interacciona con la proteína de unión al DNA RBPJ y con la proteína coactivadora de la transcripción de tipo *Mastermind* (MAML1) (Figura 1.6). Esta unión permite a RBPJ dissociarse de otras proteínas que actúan como correpresores de la transcripción y, juntos, este complejo de proteínas formado por NICD, RBPJ y MAML1, activan la transcripción de genes diana de la vía de Notch (Figura 1.6)<sup>65-67</sup>. Los genes diana de la vía de Notch mejor caracterizados son de la familia de *HES* y *HEY*. Sin embargo, se ha demostrado la regulación a nivel transcripcional de muchos otros genes como *C-MYC*, *E-Cadherina*, etc<sup>68,69</sup>. Una vez se genera el NICD a partir del receptor escindido, no existen intermediarios entre la membrana plasmática y el núcleo, por lo

tanto, no se produce ninguna amplificación de la señal y NICD toma la responsabilidad de la activación de los genes diana de la vía.



**Figura 1.6 Vía de señalización de Notch.** La interacción de uno de los ligandos de la vía de Notch (de los tipos Delta o Jagged) expuestos en la membrana plasmática de la célula estimuladora, con uno de los receptores de Notch expuestos en la membrana de la célula receptora, desencadena una serie de escisiones en el receptor (escisiones S2 y S3 por las metaloproteasas ADAM y la γ-secretasa, respectivamente) que inician el proceso de señalización de la vía. Estas escisiones generan los dominios NECD y NICD. Después de la escisión S3, el NICD libre viaja al núcleo donde se asocia, junto con las proteínas RBPJ y MAML1, al DNA. Esta unión provoca la liberación de otros represores de la transcripción que estaban unidos al DNA, permitiendo la transcripción de genes diana de la vía de Notch. Por otro lado, los receptores funcionales de Notch se generan en el aparato de Golgi, donde se escinden por primera vez por la proteasa Furina (escisión S1) y se establecen los patrones de glicosilación por las glucosil-

transferasas de la familia *Fringe* (FNG). Los diferentes patrones de glucosilación del receptor hacen variar sus afinidades de interacción con los diferentes ligandos. Adaptado de *MacGrogan, D.* y colaboradores<sup>70</sup>.

## 1.1.2.2 Receptores y Ligandos de la Vía de Notch

### 1.1.2.2.1 Ligandos de la Vía de Notch

En función de su homología con los dos tipos de ligandos que se descubrieron en *Drosophila*, hay 5 ligandos de la vía de Notch descritos en mamíferos designados como tipo Delta1, 3-4 (Dll1,3-4; del inglés *Delta Like Ligand*) o tipo Serrata1 o 2 (Jagged1 o 2). Todos ellos son proteínas transmembrana de tipo 1, es decir, con un solo paso a través de la membrana plasmática y comparten varias características estructurales (Figura 1.7)<sup>64</sup>. Desde la parte más distal hasta la zona más próxima a la membrana de la región extracelular de los ligandos, comparten las siguientes estructuras: su región N-terminal (NT), los dominios conocidos con el nombre DSL (Delta-Serrate-LAG2) y varias repeticiones del dominio EGF (factor de crecimiento epidérmico) (Figura 1.7)<sup>71,72</sup>. La región N-terminal, los dominios DSL y los dos dominios EGF más próximos a DSL son los que llevan a cabo la interacción con el receptor de Notch (Figura 1.7)<sup>73</sup>. A diferencia de los ligandos tipo Delta, en los ligandos de tipo Jagged hay un mayor número de repeticiones del dominio EGF y en la zona más próxima a la membrana plasmática hay una región adicional rica en residuos de cisteína (CRD) (Figura 1.7)<sup>64</sup>.

La región intracelular de los ligandos es pequeña, contiene muchos residuos de lisina y en ella se encuentra la región C-terminal de la proteína. La función de la región intracelular de los ligandos es la de interactuar con el citoesqueleto de la célula.

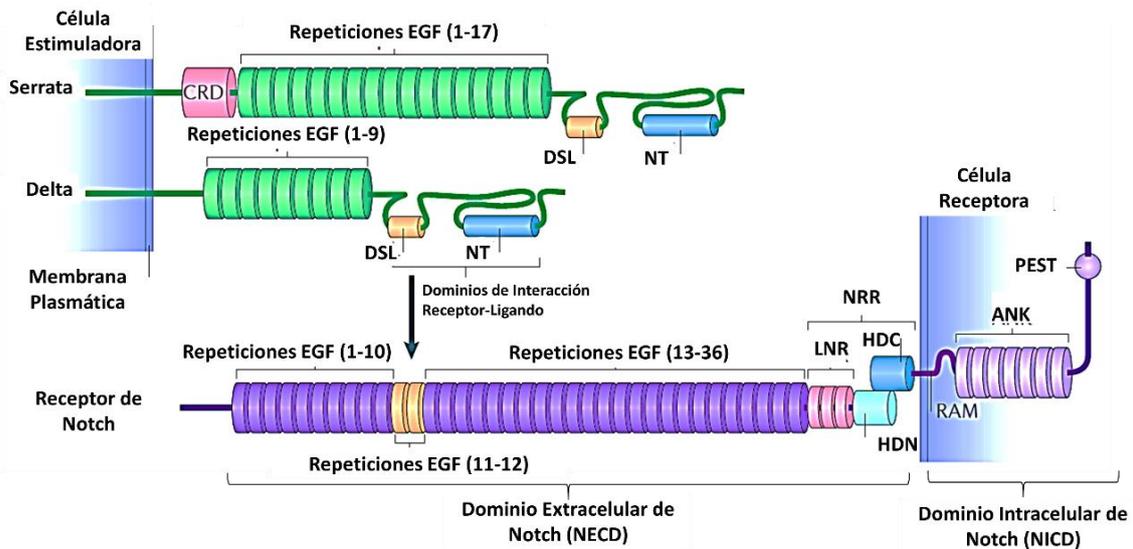
### 1.1.2.2.2 Receptores de la Vía de Notch

Hay 4 tipos de receptores de Notch en mamíferos (Notch1- Notch4). Del mismo modo que los ligandos, los 4 receptores son proteínas transmembrana de tipo 1 y son sintetizados como un único polipéptido que una vez traducido es escindido en el aparato de Golgi por la convertasa conocida con el nombre de Furina (escisión S1) (Figura 1.6)<sup>73</sup>. Esta escisión es imprescindible para generar el heterodímero funcional del receptor que

se transloca a la membrana plasmática, dónde el heterodímero permanece unido a través de una unión no covalente dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ <sup>74</sup>. Una vez en la membrana, el extremo N-terminal de la proteína queda localizado en la cara extracelular y el C-terminal en la intracelular (Figura 1.6 y 1.7). Los 2 heterodímeros que forman el receptor entero se nombran según su situación respecto a la membrana plasmática: dominio extracelular de Notch (NECD) y dominio intracelular de Notch (NICD) (Figura 1.6 y 1.7)<sup>64</sup>.

Por un lado, en la cara extracelular está NECD que es el encargado de interactuar con el ligando (Figura 1.7). Desde la región más distal hasta la membrana plasmática, NECD está compuesto por varias repeticiones del dominio EGF, una región rica en residuos de cisteína (LNR) y finalmente en la zona más cercana a la membrana se localiza la interacción entre los dos heterodímeros del receptor (Figura 1.7)<sup>64</sup>. Los residuos de cisteína y la unión de ambos heterodímeros componen un dominio (región de regulación negativa (NRR)) que impide la escisión por las metaloproteasas de tipo ADAM (escisión S2) si no existe una interacción con un ligando de la vía (Figura 1.7)<sup>75</sup>.

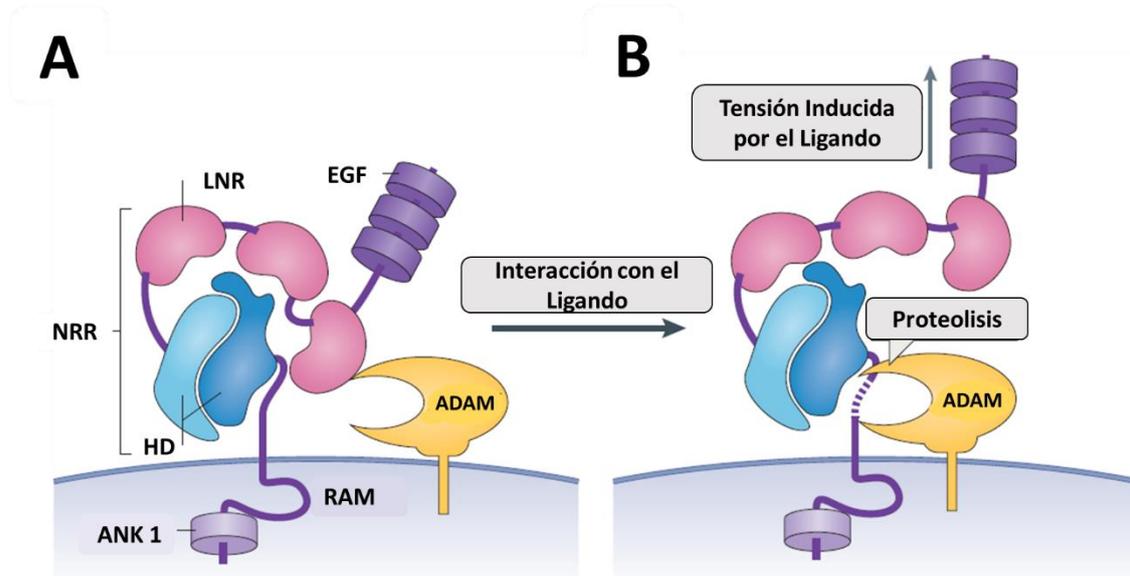
Por otro lado, en la cara intracelular se encuentra NICD que una vez llevada a cabo la escisión por la  $\gamma$ -secretasa (escisión S3) y liberado de la membrana, es el responsable de translocarse al núcleo y ejecutar la activación de la vía. En la estructura de NICD se diferencian varias regiones con diferente función (Figura 1.7). En la zona más cercana a la membrana plasmática se encuentra el módulo de asociación a RBPJ (módulo RAM) y repeticiones de tipo Ankirina (ANK) (Figura 1.7)<sup>76</sup>. Éstos, son necesarios para interactuar con el complejo proteico (RBPJ o CSL) que está unido al DNA suprimiendo la expresión de los genes *Hairless*-LAG1<sup>67,76-78</sup>. Después, cerca del extremo C-terminal hay una secuencia PEST que regula la degradación de NICD (Figura 1.7). Entre las repeticiones de Ankirina y la secuencia PEST de NICD se pueden encontrar también varias señales de localización nuclear y una región que se hipotetiza que puede ser responsable de fenómenos de transactivación<sup>64</sup>.



**Figura 1.7 Estructura y composición de los ligandos y receptores de la Vía de Notch.** CRD: dominio rico en cisteínas. DSL: dominio Delta-Serrate-LAG2. NT: región N-terminal. LNR: Dominio rico en cisteínas del receptor de Notch. HDC y HDN: son las regiones de NICD y NECD, respectivamente, donde interaccionan los dos dominios del heterodímero de Notch. HDC, HDN y LNR, conforman la región de regulación negativa del receptor de Notch: NRR. RAM: Módulo de asociación a la proteína de unión al DNA RBPJ. ANK: Dominio de repeticiones de tipo ankirina. PEST: es la región más próxima al extremo C-terminal del receptor y se encarga de la regulación de la degradación de NICD. Adaptado de *Bray, S. J. y colaboradores*<sup>64</sup>.

### 1.1.2.3 Interacción entre el Receptor y el Ligando de la Vía de Notch

La interacción entre los ligandos de Notch y sus receptores ocurre cuando las regiones extracelulares de ambos componentes que están situados en la membrana de células diferentes entran en contacto. Esta interacción trans- genera un cambio de conformación en el ligando que permite la unión de la proteína MIB1 en su región intracelular (Figura 1.6). La proteína MIB1 dirige la ubiquitinación del ligando en su cara intracelular, lo que inicia el proceso de internalización del ligando, generando una fuerza mecánica que tira del ligando unido al receptor<sup>79</sup>. Esta tensión estira del receptor, quedando expuesta en la región NRR del receptor la diana para la escisión S2 por parte de las metaloproteasas ADAM (Figura 1.8)<sup>75</sup>. Esta escisión separa el dominio NECD de NICD que queda unido por la parte intracelular a la membrana (Figura 1.8). Posteriormente, como ya se ha comentado, se produce la escisión S3 que libera el dominio NICD<sup>80</sup>.

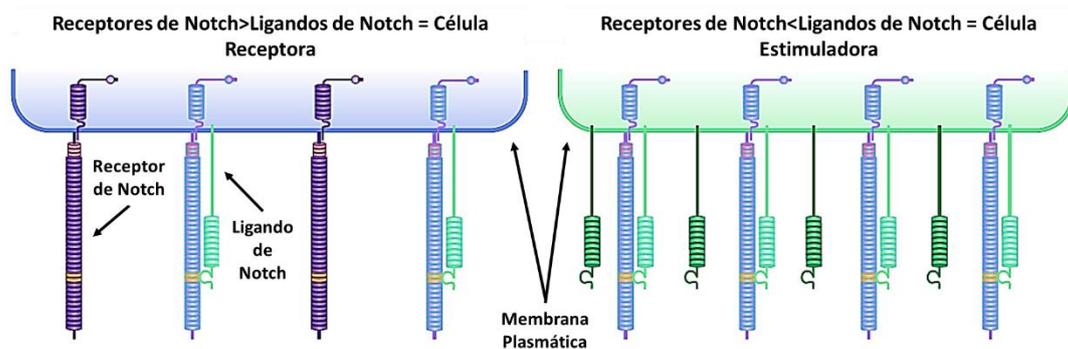


**Figura 1.8 Representación de la escisión S2 del receptor tras la interacción de un receptor de Notch con un ligando de la vía de Notch.** **A.** En ausencia de interacción con un ligando, la región de regulación negativa del receptor (NRR) bloquea la diana de escisión S2 a las metaloproteasas de la familia ADAM. **B.** Tras la interacción con un ligando de la vía de Notch, el ligando estira del receptor. Esa tensión expone la diana de las metaloproteasas ADAM. Entonces, ocurre la escisión S2 del receptor. LNR: Dominio rico en cisteínas del receptor de Notch. HD: es la región de interacción entre NICD y NECD. HDC, HDN y LNR, conforman la región NRR. RAM: Módulo de asociación a la proteína de unión al DNA RBPJ. ANK: Dominio de repeticiones de tipo ankirina. Adaptado de Bray, S. J. y colaboradores<sup>64</sup>.

A excepción del ligando Dll3, al que se le han atribuido exclusivamente funciones inhibitorias de la vía de Notch<sup>81,82</sup>, la interacción en *trans*- de los distintos tipos de ligandos de la vía de Notch con sus receptores provoca la activación canónica de la vía. Sin embargo, muchos trabajos han permitido observar que todos ellos presentan diferencias funcionales<sup>83</sup>.

Por otro lado, se ha visto que los receptores y los ligandos de una misma célula son capaces de interactuar en *cis*- (Figura 1.9). En este caso, el resultado de esta interacción es opuesto al de la interacción en *trans*-. La interacción *cis*- entre receptores y ligandos no activa la vía canónica de señalización. En su lugar, impide que los componentes que interactúan en *cis*- lo hagan en *trans*- y por lo tanto activar la vía. De esta manera, una célula puede regular la actividad de la vía de Notch en función tanto del número como del tipo de receptores y ligandos que tiene en su membrana

plasmática (Figura 1.9). Una célula con más receptores que ligandos siempre tendrá algún tipo de receptor libre para interactuar en *trans*- con un ligando y viceversa. Así, una célula es capaz de definirse como una célula estimuladora ( $n^{\circ}$  ligandos  $>$   $n^{\circ}$  receptores) o receptora ( $n^{\circ}$  ligandos  $<$   $n^{\circ}$  receptores) de la señalización de Notch (Figura 1.9)<sup>81,84,85</sup>.



**Figura 1.9 Interacción en *cis*- entre ligandos y receptores de la vía de señalización de Notch.** La relación entre el  $n^{\circ}$  de receptores y ligandos que una célula tiene define que una célula sea estimuladora o receptora de la señalización de Notch. Adaptado de Bray, S. J. y colaboradores<sup>64</sup>.

De esta manera, como hemos dicho, la activación de la vía de Notch puede tener diferentes significados dependiendo del ligando y del receptor que participen en la interacción en *trans*-. Por otro lado, la célula también es capaz de controlar la expresión de cada tipo de ligando o receptor, así como cuáles de ellos estarán funcionales a través de las interacciones en *cis*-. Estos mecanismos reguladores muestran parte de la complejidad de la vía. Sin embargo, no son las únicas formas de regular la actividad y la especificidad de la vía de Notch. En este sentido, se ha visto que tanto la glicosilación como la endocitosis de ligandos y receptores también juegan un papel importante en regular su actividad<sup>79,86</sup>.

### 1.1.2.5 Tráfico Endocítico de Componentes de Notch y las Ubiquitin Ligasas

La actividad de la vía de Notch sufre cambios debidos a la acción de los factores que controlan la endocitosis y el tráfico de sus receptores y ligandos<sup>87,88</sup>. Como ya se comentó, la endocitosis del ligando tras su interacción con el receptor genera la fuerza mecánica necesaria para exponer la diana de escisión de las proteasas ADAM en la región de regulación negativa (NRR) permitiendo así su corte y el inicio de la ruta (Figura 1.6 y Figura 1.8)<sup>87-95</sup>. Consecuentemente, se ha visto que en ausencia de la ubiquitin ligasa, E3, de la familia de proteínas *Mindbomb* (MIB) o *Neuralized* (NEUR), se ve reducida la internalización de los ligandos con una reducción en la actividad de la vía<sup>94,96-101</sup>. De este modo, dado que la ubiquitinación del ligando es importante para la actividad del ligando se puede saber en función del contenido en las enzimas de las familias NEUR y MIB si una célula es estimuladora o receptora, aportando un mecanismo más que permite los procesos de polarización celular<sup>102-104</sup>.

Se ha observado que los receptores de Notch también pueden ser internalizados debido a la acción de las ubiquitin ligasas, E3, *Itch* y *Deltex*. El tráfico de los receptores no afecta a la actividad de la vía únicamente a través del número de receptores presentes en la superficie celular, sino que se ha descrito que la vía de señalización de Notch, tras la internalización de los receptores, puede ser activada de un modo ligando independiente<sup>87,88,105-108</sup>. Por otro lado, como hemos discutido en la sección 1.1.2.3, varias proteínas presentes en los precursores exosomales pueden estar ubiquitinadas, interpretándose como una etiqueta para su introducción en exosomas.

La vía de señalización de Notch, es relativamente sencilla en cuanto a su mecanismo de acción. Sin embargo, como se ha podido observar, existen varios mecanismos que regulan su actividad, incrementando la versatilidad y complejidad de la vía. Además, esta vía, ha sido clásicamente considerada como un mecanismo de señalización yuxtacrina. Sin embargo, en los últimos años este concepto está cambiando. Este cambio se debe en concreto a un trabajo de Sheldon, H. y sus colaboradores, donde se observó la incorporación de componentes funcionales de la vía en los exosomas<sup>53</sup>. Este descubrimiento implica expandir la vía de Notch hacia nuevos horizontes en los que la

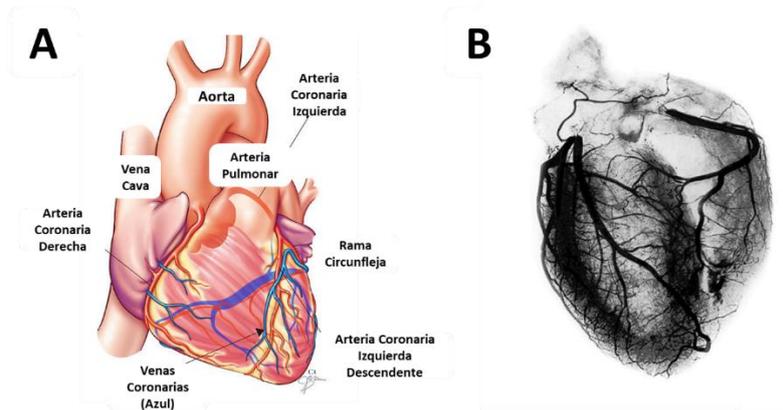
vía puede actuar a mayores distancias debido a su incorporación en exosomas. En este trabajo, se estudió la vía de señalización de Notch y su relación con los exosomas, en dos contextos diferentes: la terapia regenerativa cardíaca y el cáncer de mama.

## **1.2 Terapias Regenerativas**

La medicina regenerativa es una rama de la investigación traslacional que se ocupa del proceso de reemplazo o regeneración de células, tejidos u órganos humanos, para recuperar o reestablecer una función normal. Se ha observado que la capacidad regenerativa de los organismos, y de cada órgano en particular, varía mucho entre las distintas especies, así como en función de su estado de desarrollo. De este modo, se ha observado que el corazón de los humanos, y en general de los mamíferos recién nacidos, retiene una capacidad regenerativa que se pierde en el estado adulto<sup>109-113</sup>. Debido a esto, como describiremos a continuación, las patologías cardíacas que implican la muerte de parte del tejido cardíaco, como puede ser el infarto agudo de miocardio (IAM), son un desafío para el cuerpo humano y requieren del desarrollo de terapias que ayuden a reestablecer la función normal.

### **1.2.1 El Infarto Agudo de Miocardio (IAM) y Tratamiento Convencional**

El corazón es un órgano muscular cuya función principal es bombear la sangre hacia el organismo para aportar oxígeno y nutrientes a los tejidos. A su vez, el músculo cardíaco se nutre a través de la circulación coronaria, la cual se encarga de asegurar la irrigación cardíaca (Figura 1.10)<sup>114</sup>.

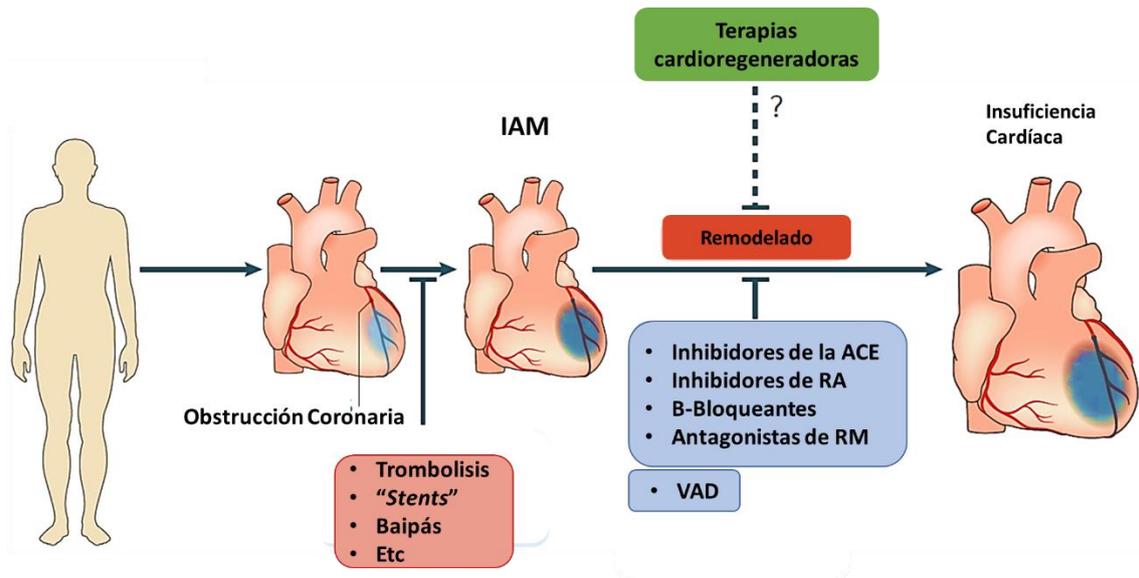


**Figura 1.10 Circulación Coronaria.** A. Esquema de las vías coronarias principales. B. Angiografía que muestra la extensa red formada por la microvasculatura coronaria. Adaptado de [www.clevelandclinic.org](http://www.clevelandclinic.org) y de [www.hashpe.tumblr.com](http://www.hashpe.tumblr.com).

El infarto agudo de miocardio (IAM) se produce por una reducción u obstrucción del flujo sanguíneo en alguna de las arterias coronarias. Esa obstrucción provoca una disminución del flujo sanguíneo en el territorio vascular afectado. Esta disminución no es homogénea en todo el territorio isquémico y se pueden reconocer dos regiones diferentes: una zona en la que prácticamente no hay irrigación (núcleo isquémico) y una zona circundante (zona de penumbra) que mantiene una irrigación parcial, que preserva la viabilidad de las células del músculo cardíaco de la zona. Después del IAM, el miocardio dañado, sobre todo en el núcleo isquémico, es sustituido por tejido fibrótico cicatricial debido a la baja capacidad regeneradora de los cardiomiocitos adultos<sup>115</sup>. Con el tiempo, la sustitución en el corazón de tejido miocárdico por tejido cicatricial resulta en una insuficiencia cardíaca, que se define como la incapacidad del corazón para bombear la cantidad de sangre necesaria que cubre las demandas de oxígeno y nutrientes del organismo. Consecuentemente, el corazón en un intento de reestablecer las demandas de sangre al organismo, sufre un proceso patológico de remodelado (Figura 1.11). En este proceso se aumenta aún más el tejido fibrótico, el tejido miocárdico sigue reduciéndose, el corazón se dilata, la insuficiencia cardíaca se acentúa y finalmente provoca un fallo cardíaco irreversible<sup>116</sup>.

El tratamiento convencional se ha centrado en evitar que empeore la insuficiencia cardíaca después del IAM<sup>117</sup>. En este sentido, los tratamientos se han centrado en

reperfundir el territorio vascular afectado de la forma más rápida posible y en reducir el consumo energético del corazón para evitar la muerte del mayor número posible de cardiomiocitos. Así, se han desarrollado diferentes estrategias como: la lisis del trombo que obstruye las arterias coronarias, la reapertura de la obstrucción mediante el uso de “*stents*” cuando esta es debida a un engrosamiento de las paredes arteriales o la derivación vascular, también denominada *baipás*, que consiste en la introducción de un vaso sanguíneo de otra región del cuerpo del paciente para saltar la zona donde se localiza la obstrucción de la arteria (Figura 1.11) <sup>115</sup>. En combinación con estas aproximaciones, se realizan tratamientos con fármacos como los inhibidores de la enzima angiotensina convertasa (ACE) o de los receptores de angiotensina (RA), que dilatan los vasos sanguíneos para que aumenten el flujo sanguíneo en las regiones afectadas (Figura 1.11). También se suelen usar otros fármacos como los  $\beta$ -bloqueantes o los antagonistas del receptor de mineralocorticoides (RM), cuya función principal es reducir la frecuencia cardíaca, la presión sanguínea y la demanda energética del corazón (Figura 1.11). Estos tratamientos cardioprotectores han logrado reducir la mortalidad debida al IAM<sup>118-120</sup>. Por otro lado, también se han desarrollado tratamientos cuyo objetivo en este caso es servir de soporte mecánico para pacientes que ya sufren insuficiencia cardíaca (Figura 1.11). Así, se han desarrollado dispositivos que ayudan mecánicamente al bombeo del corazón (VAD) para suplir las demandas de sangre del organismo<sup>121,122</sup>. A pesar de los esfuerzos por desarrollar tratamientos eficaces, hoy en día el IAM es la principal causa de muerte en el mundo, con una mortalidad de aproximadamente 9 millones de personas al año, siendo la única solución al problema el trasplante de corazón, que no es una opción realista debido a la complejidad del procedimiento en sí mismo y a la escasez de donantes<sup>123,124</sup>.



**Figura 1.11 Tratamiento convencional del infarto agudo de miocardio.** En los mamíferos adultos, la respuesta por defecto ante un infarto agudo de miocardio (IAM) es la fibrosis, causando la pérdida de contractibilidad cardíaca. El progreso de la patología lleva a la insuficiencia cardíaca. Las terapias convencionales se han centrado en salvar de la muerte celular al miocardio isquémico mediante una reperusión temprana de la zona (recuadro granate) y en evitar el remodelado cardíaco con fármacos o soportes de asistencia mecánica (recuadros azules). Existen un gran número de evidencias preclínicas que han demostrado el prometedor porvenir de las terapias regenerativas. Sin embargo, estas aproximaciones terapéuticas tienen muchos obstáculos para la traslación a la clínica (recuadro verde). Adaptado de Hashimoto, H. y colaboradores<sup>115</sup>.

Por consiguiente, el desarrollo de nuevos tratamientos para el IAM continúa siendo necesario y requiere del esfuerzo conjunto de la comunidad científica para el diseño de nuevas terapias que mejoren las actuales.

## 1.2.2 Terapias Avanzadas para el Tratamiento del IAM

En este contexto, surgieron las terapias avanzadas para el tratamiento del IAM, cuyo objetivo es la regeneración del corazón infartado. En este tipo de terapias, se pueden diferenciar dos grupos: aquellas que hacen uso de células como agente terapéutico y aquellas que no.

Los tratamientos libres de células se han centrado en promover los procesos de regeneración del corazón, tratando de estimular las células residentes. De este modo,

en algunos de ellos se ha intentado transformar los fibroblastos cardíacos que invaden la zona infartada en células cardíacas<sup>125,126</sup> y, en otros, se ha tratado de inducir proliferación en los cardiomiocitos residentes, para que cardiomiocitos de nueva generación vuelvan a poblar la región infartada<sup>127</sup>. Por otro lado, dado que se ha observado que el corazón de los neonatos en los mamíferos es capaz de recuperarse después de sufrir un IAM<sup>111</sup>, se están estudiando los mecanismos que gobiernan la regeneración del corazón para tratar de desarrollar nuevas terapias que estimulen esos mecanismos en el corazón adulto<sup>128,129</sup>.

De igual modo, las terapias que usan células como herramienta terapéutica buscan regenerar la zona afectada, pero mediante el trasplante de células (terapia celular). En este trabajo, se profundizó en describir la procedencia de los efectos beneficiosos observados empleando la terapia celular como estrategia terapéutica del IAM.

### **1.2.3 Terapia Celular en el Tratamiento del IAM**

La terapia celular del IAM tiene como principal objetivo promover la regeneración de la zona afectada del corazón. Con este fin, se han usado diferentes tipos de células que se pueden clasificar en función de su procedencia. Unas son células residentes del corazón<sup>130</sup> y las otras son células de procedencia distinta al corazón. En este sentido, se han usado células de músculo esquelético, células derivadas de médula ósea y células madre mesenquimales (MSC). Estas últimas habían mostrado *in vitro* tener la capacidad de diferenciarse a células cardíacas, creyéndose que serían capaces de proliferar y diferenciarse a cardiomiocitos para repoblar las zonas afectadas del corazón<sup>131-133</sup>. En este trabajo, se realizaron ensayos con MSC.

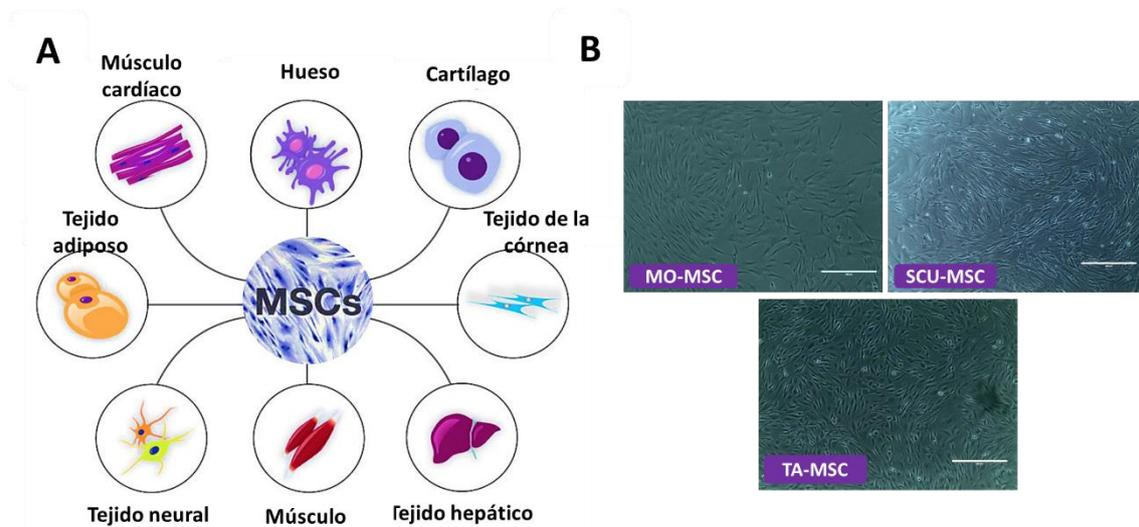
#### **1.2.3.1 Propiedades de las MSC**

Las células madre son aquellas que tienen la capacidad de autorrenovarse y de diferenciarse en distintos tipos celulares<sup>134</sup>. De este modo, estas células se pueden clasificar en función de los tipos celulares a los que se pueden diferenciar (potencia):

- Células madre totipotentes: Son aquellas capaces de crecer y de dar lugar a todos los tipos celulares del organismo. Tienen la capacidad de formar un organismo completo. El cigoto sería un ejemplo de célula madre totipotente<sup>135,136</sup>.
- Células madre pluripotentes: Estas células también pueden dar lugar a todos los tipos celulares. Sin embargo, no son capaces de formar un organismo completo. Las células madre embrionarias serían un ejemplo de célula pluripotente<sup>137,138</sup>.
- Células madre multipotentes: En este caso, la célula madre multipotente solo pueden generar células de su misma capa o linaje de origen embrionario. Un ejemplo serían las células madre de la sangre (hematopoyéticas). Éstas pueden diferenciarse a múltiples tipos celulares sanguíneas<sup>139</sup>.
- Células madre oligopotentes: Estas solo pueden diferenciarse en unos pocos tipos de células como, por ejemplo, las células madre<sup>139</sup>.
- Células madre unipotentes: Son aquellas células también conocidas como progenitoras que, tienen la capacidad de diferenciarse en un solo tipo de células. Un ejemplo son las células madre musculares que pueden diferenciarse exclusivamente a células musculares<sup>140</sup>.
- Células madre pluripotentes inducidas o iPS: Estas células tienen la misma capacidad de crecimiento y de diferenciación que las células madre pluripotentes, pero se generan *in vitro* a partir de distintos tipos de células adultas<sup>139</sup>.

Por consiguiente, las Células Madre Mesenquimales o MSC se consideran células madre multipotentes. Es decir, con la capacidad de diferenciarse a aquellos tipos celulares de su mismo linaje embrionario (Figura 1.12 A). De este modo, se ha observado *in vitro* que las células madre mesenquimales son capaces de diferenciarse a adipocitos, condrocitos, osteocitos y miocitos, entre otros<sup>141</sup>. También se ha observado que, al ser trasplantadas en el útero, estas células son capaces de anidar y diferenciarse a múltiples

tejidos<sup>142</sup>.



**Figura 1.12 Multipotencia y origen de las MSC.** A. Representación de algunos de los tipos celulares en los que las MSC pueden diferenciarse. B. Fotografías mediante microscopía óptica a 100X de MSC aisladas a partir de médula ósea (MO), sangre de cordón umbilical (SCU) o tejido adiposo (TA). Adaptado de [www.stemcellclinic.com](http://www.stemcellclinic.com) y de [www.lgcstandards-atcc.org](http://www.lgcstandards-atcc.org).

Las MSC fueron identificadas por primera vez por Friedenstein y colaboradores y aisladas del estroma de médula ósea por Pittenger y colaboradores en 1999<sup>143,144</sup>. Sin embargo, hoy en día estas células se han podido aislar y cultivar en gran cantidad a partir de orígenes diferentes como sangre periférica adulta, tejido adiposo, piel, pulpa dental, hígado, musculo esquelético, sangre de cordón umbilical, placenta, etc (Figura 1.12 B). Son células con una manipulación *ex vivo* sencilla ya que se adhieren a las superficies plásticas y presentan un tiempo de división corto. Además de la sencillez para aislar un gran número de células, su posterior cultivo *in vitro* y su diferenciación a diferentes tipos celulares, las MSC presentan otra característica que les ha hecho ser un tipo celular atractivo para su elección en terapia celular. Se ha observado que estas células debido a la ausencia o a la reducida expresión de moléculas MHC de clase Ia y MHC de clase II junto a la expresión de citocinas antiinflamatorias, las hacen unas células inmunoprivilegiadas. Esto hace que su trasplante no genere una respuesta de las células T en un entorno alógeno<sup>145</sup>. En consonancia con esto, en 2010, en nuestro equipo de investigación se realizó terapia celular para inducir una mejora en la función cardíaca después de un IAM comparando dos tipos celulares, las MSC derivadas de médula ósea

frente a las células madre hematopoyéticas aisladas de sangre de cordón umbilical. En particular, se observó que las MSC fueron más eficaces que las hematopoyéticas, dado que reducían más el área del infarto y prevenían en cierto grado el remodelado ventricular<sup>146</sup>.

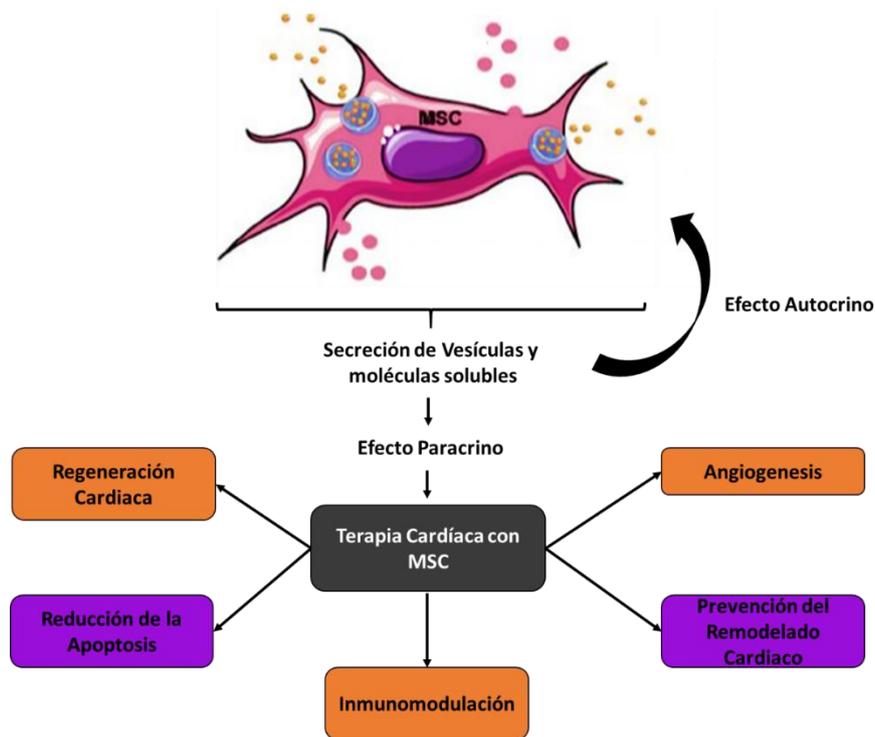
Hay controversia a la hora de establecer de donde proceden los efectos terapéuticos de las terapias celulares con MSC. Sin embargo, la reducida tasa de supervivencia de las MSC trasplantadas ha hecho que gane fuerza la hipótesis que considera que los efectos terapéuticos proceden de las sustancias paracrinas que liberan las MSC en lugar de a procesos de proliferación y transdiferenciación<sup>147</sup>.

### **1.2.3.2 Efecto Terapéutico Inducido por las MSC: Hipótesis**

#### **Paracrina**

En sus inicios la terapia celular con MSC resultó atractiva para la ciencia debido a la multipotencia de estas células y su posible uso como agentes terapéuticos que regeneraran los tejidos dañados. Sin embargo, existen experimentos que han demostrado que las MSC trasplantadas ejercen su efecto terapéutico sin dejar rastro de ellas mismas<sup>148-150</sup>. Existen varios trabajos en los que se ha observado el efecto de las sustancias paracrinas liberadas por las MSC en la zona trasplantada en múltiples procesos como en inmunomodulación, en la diferenciación y/o proliferación de células endógenas. De este modo, se planteó una hipótesis que proponía que el efecto terapéutico de la terapia celular cardíaca con MSC procedía principalmente de la amplia gama de moléculas y vesículas que estas células liberan, conociéndose esta como la “hipótesis paracrina” del efecto terapéutico de las MSC (Figura 1.13)<sup>147,151-154</sup>. Se han descrito distintos tipos de moléculas o vesículas secretadas por las MSC entre las que se destacan: factores de crecimiento, factores que participan en la morfogénesis de tejidos, quimioquinas, citocinas, glicosaminoglicanos (GAGs) o vesículas extracelulares (EVs)<sup>147,151-154</sup>. Muchos estudios han aportado evidencias de la participación de estas sustancias en la protección del tejido cardíaco dañado después de un IAM frente a procesos como: apoptosis, inmunomodulación, estimulación de la angiogénesis,

tamaño de la cicatriz de las zonas infartadas o previniendo el remodelado patológico del tejido (Figura 1.13)<sup>155</sup>.



**Figura 1.13 Mecanismos paracrinos en la terapia celular cardíaca.** Adaptado de Yáñez-Mó, M.y colaboradores<sup>156</sup>.

A pesar de los efectos terapéuticos de las MSC en terapia celular cardíaca en modelos animales, la implementación de este tipo de terapias en ensayos clínicos ha mostrado resultados modestos<sup>157</sup>. Por ello, se han intentado desarrollar estrategias diferentes que procuran mejorar el efecto terapéutico de estas células. Con este objetivo, se han cultivado las MSC previamente a su trasplante en diferentes condiciones (precondicionamientos) como un bajo porcentaje de oxígeno (hipoxia), se han realizado modificaciones genéticas en ellas mediante vectores virales para aumentar la expresión de ciertas proteínas como factores transcripcionales, citoquinas o factores de crecimiento, etc<sup>158</sup>. Como resultado de estas investigaciones se ha visto que, entre otras cosas, el precondicionamiento de las MSC en un ambiente hipóxico antes de ser trasplantadas en un modelo de isquemia, aumentaba la actividad de la vía de supervivencia Akt e incrementaba su efecto terapéutico<sup>159</sup>. Como veremos en el siguiente apartado, la respuesta molecular y celular a la hipoxia viene en gran parte

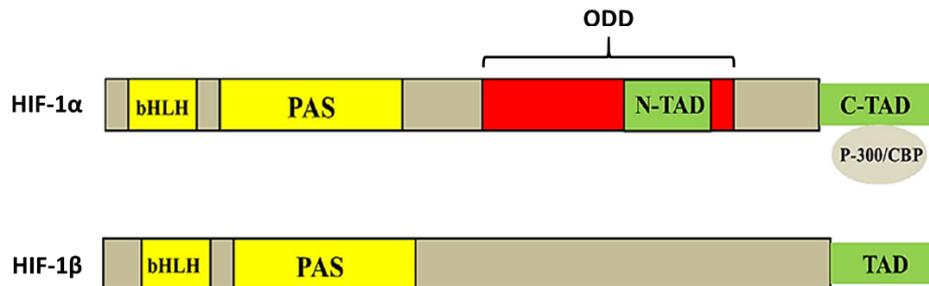
mediada por el factor inducido por hipoxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), que es un factor de transcripción muy sensible a ser inhibido por la célula en presencia de oxígeno<sup>160</sup>. De este modo, nuestro grupo de investigación observó, en un trabajo ya publicado, una mejora en el potencial terapéutico de las MSC cuando éstas habían sido modificadas genéticamente para tener incrementada la expresión de HIF-1 $\alpha$  (HIF-MSC) de forma permanente en un modelo de IAM en rata <sup>161</sup>.

### 1.2.3.3 Respuesta a la Hipoxia: HIF-1 $\alpha$

Los organismos aerobios necesitan oxígeno (O<sub>2</sub>) para producir energía. Es por esto que las células se estresan cuando están en un ambiente con poco oxígeno (hipoxia). Durante las condiciones de hipoxia, las células desarrollan un gran número de respuestas adaptativas con el objetivo de contrarrestar las bajas tensiones de oxígeno. De este modo, las células sometidas a condiciones de hipoxia reducen su consumo energético, detienen su ciclo celular y comienzan a secretar factores que inducen supervivencia y angiogénesis. De entre todas las vías de señalización implicadas en regular la respuesta a la hipoxia, muchos estudios han sugerido que los factores HIF son reguladores clave. En este sentido, se ha observado que HIF-1 está involucrado en la activación de la transcripción de más de 100 genes de respuesta a condiciones de hipoxia. Estos genes están implicados en procesos biológicos como el metabolismo de la glucosa, la proliferación celular, migración, supervivencia y angiogénesis<sup>162</sup>. Gran parte de la función de estos factores viene determinada por su estructura molecular.

El factor transcripcional HIF-1 es una proteína heterodimérica compuesta por dos subunidades, HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$  (Figura 1.14)<sup>163</sup>. Ambas subunidades proteicas contienen dominios bHLH (*basic-helix-loop-helix*)<sup>164,165</sup>. Los dominios bHLH son esenciales para que se forme el heterodímero funcional formado por HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$ , así como para unirse a la secuencia de DNA en los genes diana (Figura 1.14). Se ha descrito la presencia de dos dominios de transactivación (TAD) en HIF-1 $\alpha$ : NH<sub>2</sub>-terminal (N-TAD) y COOH-terminal (C-TAD) (Figura 1.14). Por un lado, N-TAD está implicado en la degradación de HIF-1 $\alpha$ , por el otro, C-TAD se encarga de interactuar con coactivadores como CBP/p300 para regular la expresión de genes diana de HIF-1 $\alpha$  en hipoxia (Figura 1.14)<sup>166</sup>.

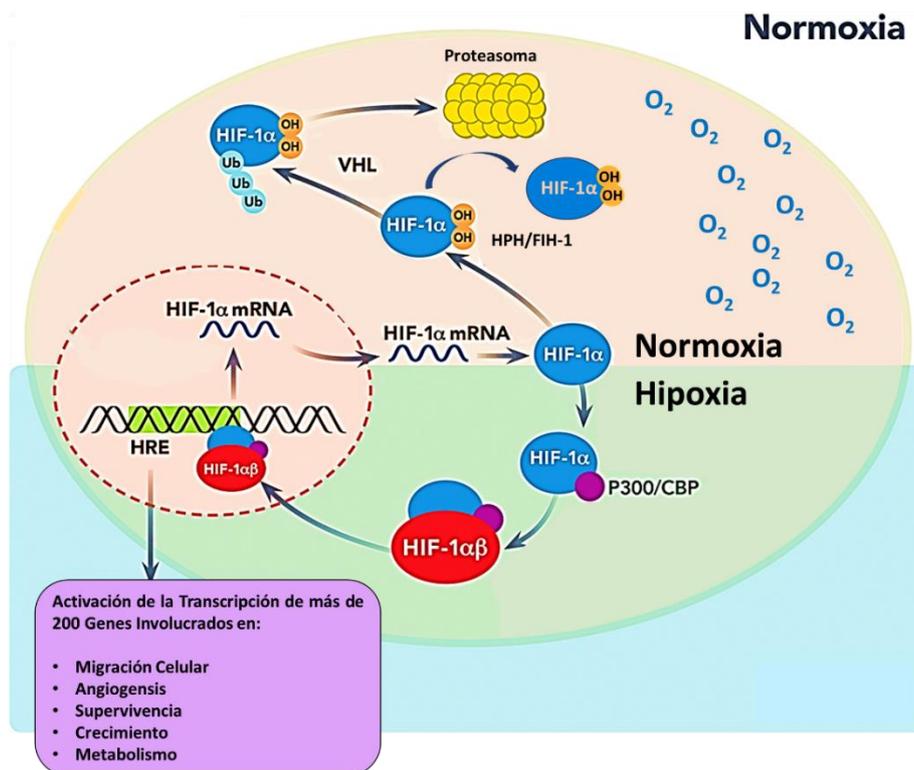
Además, a diferencia de HIF-1 $\beta$ , HIF-1 $\alpha$  presenta en todas sus subunidades un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) (Figura 1.14)<sup>167</sup>. Ambas subunidades de HIF-1 se expresan de forma constitutiva. Sin embargo, debido a esta diferencia estructural, únicamente HIF-1 $\beta$  es estable en presencia de O<sub>2</sub>. Se han descrito dos mecanismos principales que regulan la actividad transcripcional de HIF-1 (Figura 1.15). Ambos mecanismos se pueden clasificar en función de la dependencia con la proteína conocida como Von Hippel-Lindau o VHL, que es una subunidad de una enzima E3 ubiquitin ligasa (Figura 1.15)<sup>168</sup>.



**Figura 1.14 Dominios funcionales de los factores transcripcionales HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$ .** bHLH: dominios *basic-helix-loop-helix*. PAS: dominio conservado tipo PAS. ODD: dominio dependiente de oxígeno. N-TAD y C-TAD: son dominios de transactivación. Estos dos últimos, son los responsables de la actividad transcripcional de HIF. C-TAD interacciona con el coactivador transcripcional CBP/p300. Adaptado de Georgina, N. y colaboradores<sup>160</sup>.

- Mecanismo dependiente de la proteína VHL (Figura 1.15): como se ha comentado, la subunidad HIF-1 $\alpha$  contiene un dominio sensible al O<sub>2</sub>. En este dominio se localizan dos residuos de prolina que sirven de sustrato para un grupo de enzimas conocidas con el nombre de HIF-1 prolil-hidroxilasas (HPH) 167,169. Estas enzimas requieren de O<sub>2</sub>, además de ascorbato y hierro, para llevar a cabo su reacción de hidroxilación. En presencia del oxígeno suficiente y de los otros dos cofactores, las enzimas HPH hidroxilan los residuos de prolina 169,170. Consecuentemente, una vez hidroxilados ambos residuos de prolina de HIF-1 $\alpha$  por las enzimas HPH, la subunidad es reconocida por la proteína VHL y entonces es ubiquitinada degradándose finalmente en el proteasoma 171.-

- Mecanismo independiente de la proteína VHL (Figura 1.15): este es un mecanismo alternativo que usan las células para regular la actividad de HIF-1 a través de la subunidad HIF-1 $\alpha$ . Sin embargo, no requiere de la participación de la proteína VHL. En condiciones normales de O<sub>2</sub>, el factor inhibidor de HIF-1 (FIH-1) dirige una hidroxilación dependiente de oxígeno de un residuo de asparragina en HIF-1 $\alpha$ . Esta hidroxilación impide la interacción de HIF-1 $\alpha$  con el coactivador CBP/p300, bloqueando así la transcripción de genes diana de HIF-1 $\alpha$ <sup>172-175</sup>.



**Figura 1.15 Mecanismos de señalización y regulación de HIF-1 $\alpha$  en condiciones de normoxia e hipoxia.**

El factor transcripcional, HIF-1 $\alpha$ , en presencia de oxígeno (normoxia) se degrada mediante dos mecanismos: dependiente o independiente de la proteína VHL (Von Hippel-Lindau). En ausencia de oxígeno (hipoxia), HIF-1 $\alpha$  se une al coactivador P33/CBP y a HIF-1 $\beta$ , entonces, viaja al núcleo donde activan genes de respuesta a la hipoxia. OH: hidroxilación. Ub: ubiquitinación. HPH: HIF-1 $\alpha$  prolin-hidroxilasas. FIH: factor de inhibición de HIF-1 $\alpha$ . HRE: Elementos del DNA de respuesta a la hipoxia. Adaptado de *Kiers, H. D. y colaboradores*<sup>176</sup>.

Como ya se comentó en la sección 1.1.2 de esta introducción, la vía de señalización de Notch participa con un rol importante en la regulación de una enorme diversidad de

procesos e interacciona con muchas otras vías de señalización. Así, muchos trabajos han descrito una interacción entre la vía de señalización de Notch y HIF-1.

### **1.2.3.3.1 Relación entre Notch y HIF-1**

Muchos trabajos diferentes han relacionado las vías de Notch y HIF-1<sup>177-179</sup>. De este modo, se ha observado que HIF-1 $\alpha$  es capaz de aumentar la actividad de la vía de Notch a través de diferentes mecanismos. Por ejemplo, se ha visto que HIF-1 $\alpha$  puede interactuar físicamente con NICD y contribuir a su estabilización. Por otro lado, Gustafsson y colaboradores con sus experimentos han sugerido que la interacción entre HIF-1 $\alpha$  y Notch es necesaria para mantener el estado indiferenciado de la célula en hipoxia<sup>177</sup>. Alternativamente, también se ha visto que HIF-1 $\alpha$  se puede unir a regiones del promotor del gen diana de la vía de Notch *HES1* para contrarrestar la retroalimentación negativa de la señalización de Notch en las células madre tumorales<sup>180</sup>. Asimismo, se ha observado que HIF-1 $\alpha$  es capaz de aumentar la actividad de la enzima  $\gamma$ -secretasa mediante interacción directa y aumentando así la actividad de la vía de Notch<sup>180</sup>.

En el trabajo publicado por nuestro laboratorio en el que se inyectaron MSC o HIF-MSC en un modelo de IAM en rata, se observó que el incremento en el potencial terapéutico de las HIF-MSC era principalmente debido a un incremento en la proliferación de los cardiomiocitos y del proceso angiogénico, así como a una reducción en la fibrosis<sup>161</sup>. Dada la relación entre las vías de señalización de Notch y HIF-1 con el proceso angiogénico y el protagonismo de las señales paracrinas en el efecto terapéutico de las MSC, en este trabajo nos interesamos en estudiar la influencia de ambas vías en el proceso angiogénico mediado por exosomas.

## **1.2.4 Angiogenesis**

Durante el desarrollo embrionario, las células endoteliales (ECs) ensamblan la red ramificada de tubos que forman los vasos sanguíneos. Esta red permite el transporte de fluidos, nutrientes, células circulantes, hormonas y gases hasta todos o casi todos los

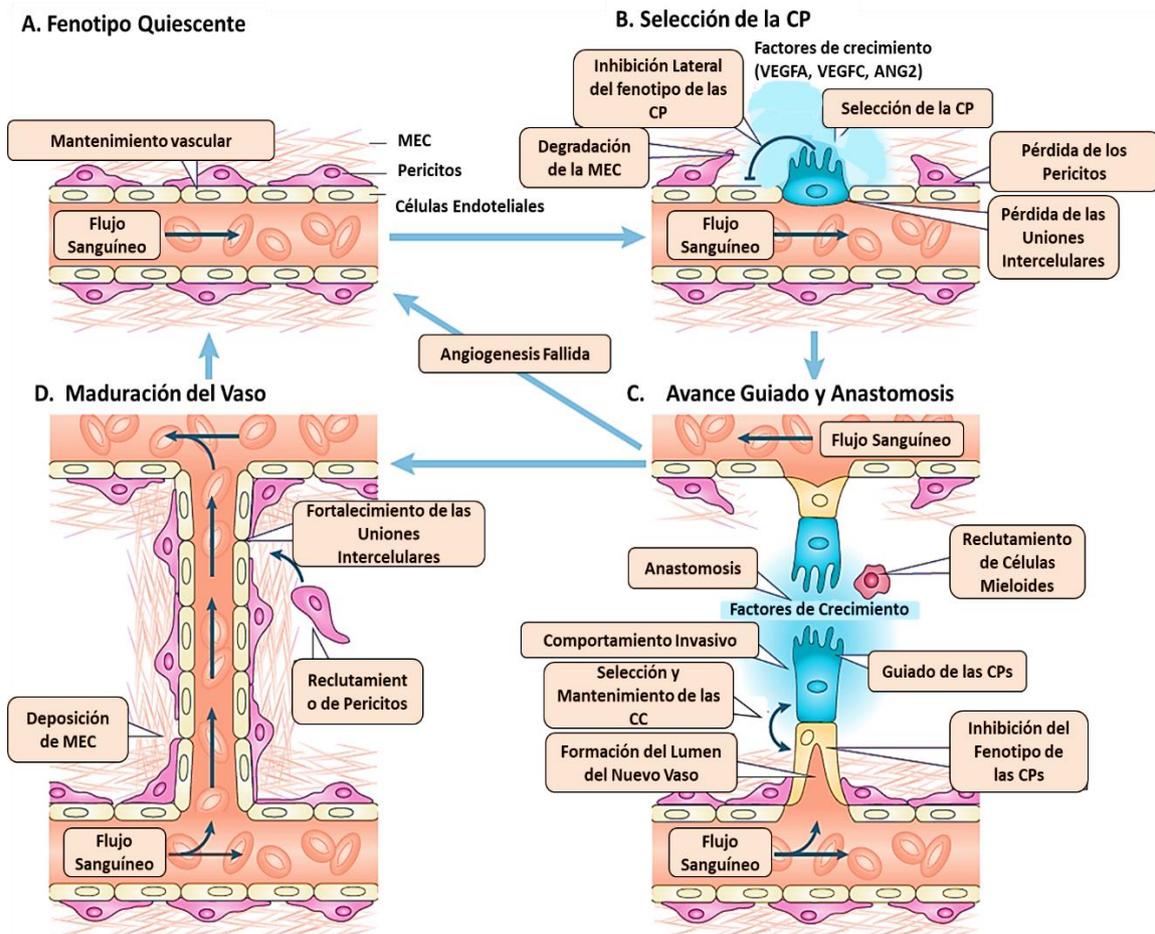
tejidos del organismo en los vertebrados. Finalmente, en el organismo adulto, la vasculatura consiste en un conjunto jerárquico de vasos compuesto por arterias, arteriolas, capilares, vénulas y venas que permiten la circulación de la sangre oxigenada entre el corazón, los pulmones y los tejidos. Aunque el sistema vascular del organismo adulto es muy complejo, la mayoría de vasos sanguíneos que se forman lo hacen en forma de brotes a partir de vasos pre-existentes. Este proceso se conoce como angiogénesis y su desequilibrio contribuye a la aparición de numerosas enfermedades<sup>181</sup>. Así, por ejemplo, una angiogénesis insuficiente es el principal factor limitante en la recuperación de patologías isquémicas mientras que, la estimulación de la angiogénesis por las células cancerosas promueve la neovascularización de los tumores, el crecimiento y, la progresión hacia el proceso metastático. De este modo, considerando los beneficios que puede conllevar en la clínica la manipulación terapéutica de la angiogénesis patológica, en las últimas décadas ha resultado muy atractivo el estudio de los mecanismos que controlan este proceso<sup>181</sup>.

#### **1.2.4.1 Mecanismos Celulares en la Angiogénesis**

La angiogénesis es un proceso complejo con varias etapas que culmina con la formación de nuevos vasos sanguíneos. Para ello, es imprescindible un control y una coordinación perfecta del comportamiento de las ECs. Los vasos sanguíneos ya establecidos, se caracterizan por tener un espacio o lumen del vaso, por donde fluye la sangre, formado por una monocapa de ECs inactivas (Figura 1.16). Estas células, están recubiertas por la cara externa de una membrana basal que a su vez contiene pericitos distribuidos de forma dispersa por diferentes regiones del vaso (Figura 16). Este fenotipo quiescente de las ECs se mantiene hasta que se detectan en el ambiente señales que estimulan la angiogénesis (señales proangiogénicas) (Figura 1.16). En ese momento, las ECs sufren un profundo cambio en su comportamiento que consiste en una pérdida de las uniones entre ellas, una activación de proteasas que degradan la membrana basal que les recubre y la adquisición de un comportamiento invasivo y migratorio muy marcado que permite iniciar la formación del nuevo vaso (Figura 1.16)<sup>181,182</sup>. De todas las ECs que reciben las señales proangiogénicas, solamente un pequeño grupo de ellas son las que experimentan ese cambio de comportamiento que dará lugar a la formación de nuevos

vasos. Estas ECs son las células de la punta del vaso que se está formando (CPs), las cuales, desarrollan filopodios que les permiten percibir y responder a señales de atracción o repulsión que guían el crecimiento del vaso en el microambiente (Figura 1.16)<sup>183,184</sup>. Por otro lado, las ECs que van apareciendo detrás de las CPs (células del cuerpo del vaso, CCs) a medida que se va formando el nuevo vaso mantienen un fenotipo menos migrador, pero son claves para el soporte de los nuevos vasos que están creciendo (Figura 1.16). Así, generan el tronco de los nuevos capilares y mantienen la conexión con el vaso a partir del cual surgen<sup>182,185,186</sup>.

Una vez iniciado el proceso, el brote de ECs continúa en una dirección definida hasta que conecta con los vasos adyacentes y realizan anastomosis, permitiendo la fusión del vaso de nueva generación con el vaso pre-existente que contacta (Figura 1.16). Cuando las CPs entran en contacto con otras ECs, pierden su fenotipo migrador, establecen uniones estrechas con las ECs y se fusionan, formando un lumen continuo sin obstrucciones que permite el flujo sanguíneo (Figura 1.16). Aunque el conocimiento del proceso anastomótico es limitado, parece claro que en el proceso deben de estar involucrados otros tipos celulares además de las ECs (Figura 1.16). Así, se ha sugerido que ciertas poblaciones de macrófagos deben de participar como chaperonas celulares que promueven la anastomosis vascular (Figura 1.16)<sup>187</sup>. Además, el reclutamiento de células accesorias es un factor crítico en el proceso de maduración del vaso sanguíneo de nueva generación. Factores como el factor derivado de las plaquetas B (PDGFB) y TGF- $\beta$ 1 se ha descrito que reclutan células perivasculares como pericitos o células de la musculatura lisa para estabilizar las paredes de los vasos de nueva generación (Figura 1.16)<sup>182,188,189</sup>. Así mismo, el depósito de la membrana basal en la cara externa de las ECs y el refuerzo de las uniones entre ellas contribuye también a la supresión del fenotipo migrador y al restablecimiento del comportamiento quiescente (Figura 1.16).



**Figura 1.16 Mecanismos celulares en el proceso angiogénico.** Las concentraciones de factores de crecimiento establecen las células endoteliales de los vasos sanguíneos cambien su fenotipo quiescente hacia un fenotipo de célula migradora. Esa célula será la célula de la punta del vaso (CP) sanguíneo que migrará en función de los gradientes de concentración de los factores de crecimiento del ambiente hasta encontrar otro vaso y mediante anastomosis generar uno nuevo. Las células detrás de la CP serán las células del cuerpo del vaso (CC). Estas, mantendrán el contacto con el vaso de origen y formarán el sostén y lumen del nuevo. Adaptado de *Herbert, S. P.* y colaboradores<sup>190</sup>.

Por consiguiente, un proceso clave en el proceso angiogénico es la determinación del comportamiento de las ECs como CPs o como CCs. Las pistas moleculares que guían ese cambio en el comportamiento de las ECs son complejas y aún no se conocen por completo. Sin embargo, hay cierto consenso en algunas de ellas. De este modo, la vía de señalización de Notch junto con la señalización a través del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) se consideran hoy en día los principales reguladores del proceso<sup>191–193</sup>.

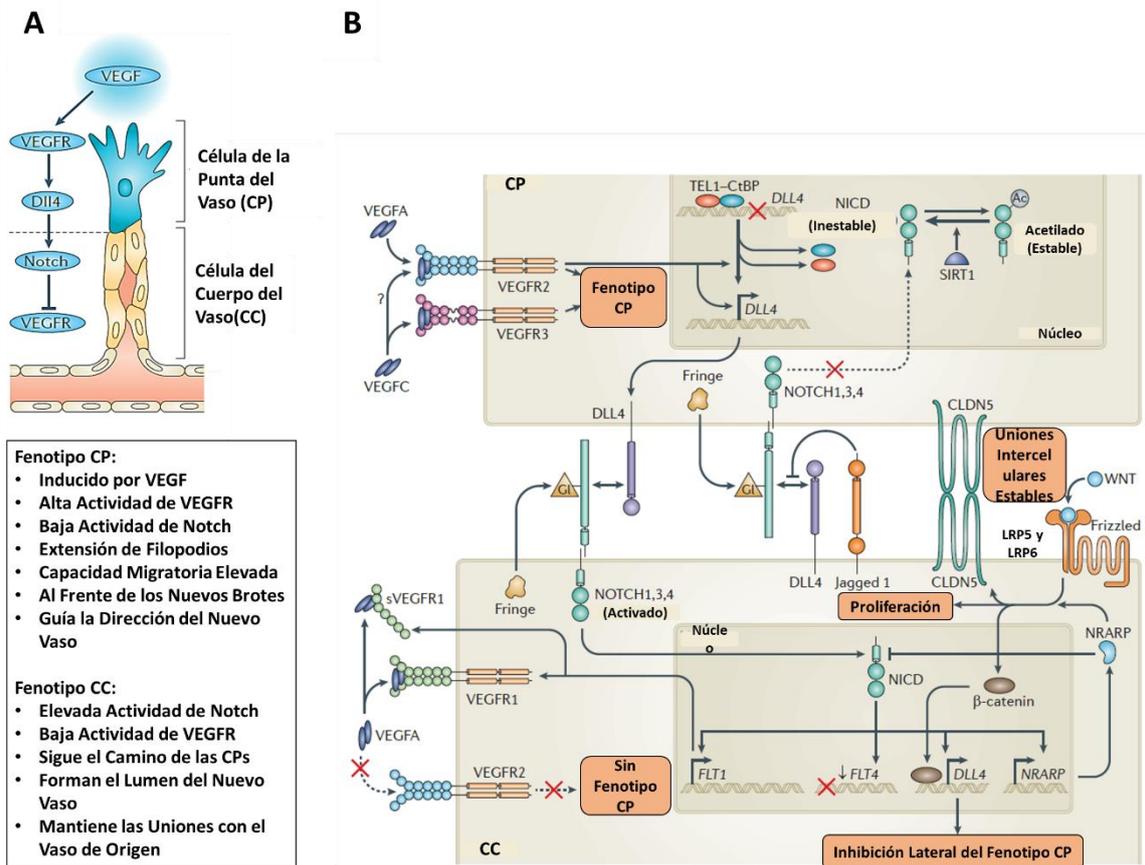
### 1.2.4.2 Determinación del fenotipo celular CP o CC: La vía de señalización de Notch y VEGF

El factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGFA) es el principal regulador que inicia la formación de nuevos vasos sanguíneos durante el desarrollo, el crecimiento y las enfermedades<sup>191–193</sup>. Durante la angiogénesis, el VEGFA se une al receptor de VEGF-2 (VEGFR2) y activa varias vías de señalización como la vía de las quinasas activadoras de mitógenos (MAPKs), la AKT y la de las fosfolipasas Cy. Como resultado, la señalización desencadenada por VEGFA promueve la proliferación de las células endoteliales, la extensión de filopodios, la degradación de la membrana basal y quimiotaxis (Figura 1.16 y 1.17)<sup>182,184</sup>. De este modo, esta señalización es la iniciadora del cambio de comportamiento de las ECs hacia un fenotipo más migrador e invasivo, característico de las CPs, que guían y activan el proceso angiogénico (Figura 1.16 y 1.17). La expresión de VEGFA se activa principalmente por la hipoxia, por lo que el proceso angiogénico se inicia rápidamente en respuesta a una deficiencia en las concentraciones de oxígeno en el ambiente durante el desarrollo, el crecimiento y en los procesos patológicos<sup>194</sup>.

Por otro lado, hay muchos estudios que sugieren un papel fundamental de la señalización por la vía de Notch en la toma de decisiones a la hora de determinar los fenotipos endoteliales CPs o CCs (Figura 1.17)<sup>195,196</sup>. Distintos trabajos en ratones y en pez zebra han observado que la expresión de Dll4 en las CPs activan la señalización de Notch en las células endoteliales CCs adyacentes para inhibir lateralmente el fenotipo CP y así mantener una organización jerárquica en las células endoteliales del vaso que se está formando<sup>197–203</sup>. En concordancia con esto, se ha observado que la señalización desencadenada por VEGFA en las ECs promueve la expresión del ligando de la vía de Notch Dll4 (Figura 1.17). Por lo tanto, las ECs que estén sometidas a una mayor señalización de VEGFA serán las que desarrollen el cambio de comportamiento hacia CPs mientras que, en las células adyacentes a las CPs, este fenotipo será reprimido.

En contraste con la represión del fenotipo de las CPs que ejerce la señalización de la vía de Notch a través del ligando Dll4, el ligando Jagged1 de la vía de Notch se encuentra principalmente en las CCs y promueve la formación de células con el fenotipo de las CPs estimulando la angiogénesis (Figura 1.17)<sup>204</sup>. Así, estos descubrimientos sugieren que

los ligandos de la vía de Notch Jagged1 y Dll4 son importantes y cumplen roles opuestos en la determinación del fenotipo de las CPs y en el proceso angiogénico, que debe de tener implicaciones importantes en la formación de las ramificaciones vasculares de los diferentes tejidos.



**Figura 1.17 Mecanismos moleculares implicados en el proceso de selección del fenotipo de las células de la punta del vaso sanguíneo.** NRARP: Proteínas con dominios repetidos de ankirinas reguladas por Notch. GI: Glucosilación. SIRT1: Sirtuina 1. CLDN5: Claudina 5. LRP: Proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad. El fenotipo CP se establece sobre todo por la señalización mediada por el factor de crecimiento endotelial (VEGF). Posteriormente, se mantienen los fenotipos CP y CC por la interacción de varias vías. Entre estas vías se encuentra la vía de Notch cuya señalización diferencial entre ambos fenotipos juega un rol importante en el mantenimiento de estos. Adaptado de *Herbert, S. P.* y colaboradores<sup>190</sup>.

Además, como ya se ha puntualizado en secciones anteriores, en los últimos años se ha sugerido un nuevo mecanismo de señalización de la vía de Notch en el proceso angiogénico mediado por exosomas. En este sentido, se ha observado la presencia del

ligando Dll4 en exosomas procedentes de ECs con el fenotipo de las CPs. Estos exosomas pueden ser captados por las células adyacentes aumentando el ratio de Dll4 en las ECs vecinas y favoreciendo las ramificaciones vasculares<sup>53</sup>.

## 1.3 Cáncer

El crecimiento humano es el proceso biológico a través del cual un infante experimenta una serie de cambios morfológicos y funcionales que lo transforman en un adulto. En este proceso, entre otras cosas, se aumenta el número de células del organismo a través de la división celular. Sin embargo, el proceso de división celular se mantiene durante el resto de la vida del adulto. El organismo humano, mediante este proceso, de forma muy controlada, logra dar lugar a células nuevas que renuevan total o parcialmente el contenido celular de sus órganos y tejidos respetando siempre su morfología y tamaño. En ocasiones, por diversos motivos, algunas células del organismo crecen sin control generando una masa anormal de células, cuyo crecimiento excede y está descoordinado con el de los tejidos u órganos normales y que persiste en su anormalidad después de que haya cesado el estímulo que provocó el cambio<sup>205</sup>. Esta masa anormal de células se conoce como neoplasia y puede afectar a la función y a la homeostasis del órgano o el tejido que las alberga. En función de la capacidad de la masa anormal de células para colonizar y proliferar en diferentes órganos y tejidos o no, proceso que se conoce como metástasis, se pueden diferenciar dos tipos de neoplasias: las malignas y las benignas, respectivamente. El conjunto de problemas que se derivan de ese crecimiento descontrolado de las neoplasias malignas es lo que se conoce como cáncer<sup>206,207</sup>.

El cáncer es una de las causas principales de muerte alrededor del mundo, causando en 2015 alrededor de 8,8 millones de defunciones<sup>208,209</sup>. Muchos trabajos han sugerido que la dieta, el tabaquismo o la exposición a ciertos compuestos químicos son agentes de riesgo que favorecen la aparición espontánea de células cancerosas en el organismo. De este modo, se ha observado que el proceso de aparición de células cancerosas en humanos se debe a un proceso de varias etapas en el que una célula comienza a acumular alteraciones genéticas que conducen, poco a poco, a una transformación de una célula normal en una célula cancerosa. En este sentido, se ha propuesto un modelo

análogo al de la evolución propuesta por Darwin para explicar este proceso de malignización<sup>206,210</sup>. Además, en parte debido a su incrementada tasa de crecimiento, se ha descrito que las células cancerosas presentan mayor inestabilidad genética que las células normales<sup>210</sup>.

La inestabilidad genética de las células cancerosas hace que el estudio de su comportamiento y el desarrollo de terapias sea muy complicado. A pesar de la complejidad que engloba el cáncer, se han descrito diez características que por lo general se cumplen en los distintos tipos de cáncer y que se encargan de orquestar el crecimiento maligno de las células cancerosas (Figura 1.18)<sup>211</sup>. Estas diez características son: la capacidad de mantener las señales de proliferación permanentemente activas, ser insensibles a supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, invadir y desarrollar metástasis en otros tejidos, inducir el proceso angiogénico permanentemente, replicarse de forma infinita, tener desregulado el metabolismo energético, evitar ser destruidas por el sistema inmune del organismo, tener mayor inestabilidad genética y de generar inflamación. A continuación, se prestará especial atención a la proliferación y al proceso de invasión y metástasis de las células cancerosas dado que fueron objeto de estudio en este trabajo.



Figura 1.18 Características de las células cancerosas. Adaptado de Hanahan, D. y colaboradores<sup>211</sup>.

### 1.3.1 Mantenimiento de las Señales de Proliferación

El proceso de proliferación celular de las células eucariotas consiste en la división o mitosis de una célula progenitora en dos células hijas idénticas. Para que esto ocurra, la célula progenitora tiene que entrar en el proceso denominado ciclo celular, siendo éste un proceso irreversible (Figura 1.19). La célula que entra en ciclo se denomina “proliferante” y en todo momento está sintetizando componentes necesarios para el proceso. Sin embargo, el DNA solo se sintetiza en una sola etapa del ciclo. Así, el momento de la síntesis del DNA divide el ciclo en 4 fases bien diferenciadas: fase M, G1, S y G2, que ocurren de forma ordenada (Figura 1.19). La fase M corresponde a la mitosis o división nuclear que normalmente culmina con la división de la célula o citoquinesis (Figura 1.19). A continuación, el intervalo entre la mitosis y el inicio de la replicación del DNA se conoce como la fase G1 (Figura 1.19). En esta fase, la célula es metabólicamente activa y crece, pero no sintetiza DNA. La fase G1 es seguida por la fase S o de síntesis, en la cual ocurre la replicación del DNA (Figura 1.19). Una vez terminado el proceso de replicación del DNA existe un intervalo hasta que ocurre la mitosis y la citocinesis, este intervalo es la fase G2 (Figura 1.19). En esta fase la célula continúa creciendo y sintetiza proteínas importantes para el proceso de mitosis<sup>212</sup>.

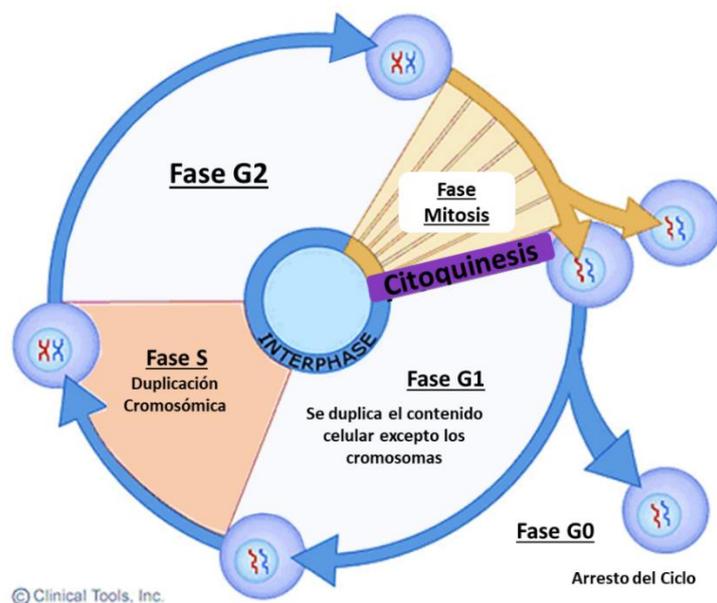


Figura 1.19 Diagrama del ciclo celular. Adaptado de [www.le.ac.uk](http://www.le.ac.uk).

La duración de las fases del ciclo celular varía considerablemente en función del tipo celular. Algunos tipos de células en los mamíferos dejan de dividirse (Fase G0) y otras lo hacen sólo ocasionalmente en función de las necesidades de recuperar células que han sido dañadas o simplemente mueren. Esto último ocurre con los fibroblastos de la piel, del hígado o del pulmón, entre otros. De este modo, los tejidos y órganos, aún con un proceso de proliferación celular activo, mantienen una homeostasis que posibilita una arquitectura y funcionamiento normales<sup>212</sup>.

Por consiguiente, en los mamíferos se controlan cuidadosamente la producción de señales tanto extracelulares (por ejemplo, factores de crecimiento) como intracelulares que conducen a la entrada y progresión de las células en el proceso de ciclo celular. Existen una enorme cantidad de componentes reguladores del ciclo celular, de los cuales muchos aún por descubrir. Sin embargo, hoy en día los genes que regulan el proceso se dividen en tres grandes grupos<sup>212</sup>:

- Genes que codifican para componentes necesarios para avanzar en las diferentes fases del ciclo celular: ciclinas, proteínas para preparar el citoesqueleto celular, enzimas y precursores de la síntesis del DNA, etc.
- Genes activadores del ciclo celular o protooncogenes: los productos proteicos de su expresión regulan positivamente la proliferación para que las células en estado de quiescencia entren en la fase S y finalmente se dividan.
- Genes supresores tumorales: su expresión codifica para proteínas que frenan el ciclo celular y lo desvían hacia un estado no proliferativo de senescencia o a la muerte celular programada, también conocida como apoptosis. El proceso regulado por el producto proteico de estos genes se activa si se generan señales en la célula que le permiten interpretar que algo no funciona correctamente.

En cuanto a las células cancerosas, la comunidad científica ha observado que la característica fundamental de estas células es su habilidad de mantener una proliferación continua. En este sentido, se ha observado que las células cancerosas mantienen esa proliferación continua a través de una desregulación de los procesos que controlan la entrada y la progresión de la célula en el ciclo celular como la expresión de protooncogenes y de genes de supresión tumoral.

### 1.3.1.1 Protooncogenes: C-MYC

Como ya se mencionó en la sección anterior, los protooncogenes son genes cuyos productos proteicos (oncoproteínas) promueven la entrada de las células en el proceso de ciclo celular. Se ha observado en muchos tipos de cánceres la presencia de alteraciones en la expresión de protooncogenes como *RAS*, *RAF* o *C-MYC* que contribuyen al mantenimiento de la proliferación tumoral. En este apartado, como ejemplo, comentaremos las alteraciones observadas en el protooncogén *C-MYC*<sup>211</sup>.

Han pasado cerca de 40 años desde el descubrimiento del protooncogén *C-MYC*, acumulándose desde entonces más de 19.000 trabajos de investigación relacionados con este gen. A día de hoy, se han observado una gran diversidad de mecanismos que desregulan la expresión de la oncoproteína MYC. En sus inicios, el estudio del proceso de activación de la expresión de *C-MYC* dejó perpleja a la comunidad científica debido a que, a diferencia de otros protooncogenes como *H-RAS*, que aumentaban su expresión a causa de la aparición de mutaciones en su secuencia, en la secuencia de *C-MYC* no se observaban mutaciones genéticas<sup>213</sup>. En su lugar, se identificaron tres mecanismos nuevos que posibilitan la activación oncogénica. Estos fueron: la mutagénesis insercional, las translocaciones cromosómicas y la amplificación génica<sup>214</sup>. Así, a partir de su descubrimiento, uno de los hallazgos más importantes fue observar que la desregulación de *C-MYC* y probablemente de otros oncogenes no está restringida a cambios genéticos en el locus del gen en cuestión. Además, se ha descrito que hay muchos mecanismos que pueden desregular la expresión de *C-MYC* y de otros oncogenes sin necesidad de que exista una mutación genética. Un ejemplo es la señalización por Notch1, que se ha observado que puede activar directamente la expresión de *C-MYC*<sup>215</sup>. Estudios adicionales han demostrado que *C-MYC* puede participar en muchas funciones diferentes a parte de la proliferación celular como: la diferenciación celular, la adhesión celular, la migración, la angiogénesis, etc<sup>214</sup>.

Los primeros trabajos que observaron alteraciones en la expresión de diferentes protooncogenes se aventuraron a hipotetizar que un simple aumento en la expresión de estos genes y las señales desencadenadas por sus productos proteicos eran suficientes para incrementar la proliferación de las células tumorales y consecuentemente la de los tumores. No obstante, estudios posteriores revelaron que

una expresión excesiva de oncoproteínas como RAS, RAF o MYC pueden generar en la célula respuestas que contrarrestan el efecto de las mismas induciendo procesos de senescencia y/o apoptosis celular<sup>211,216,217</sup>. Estos resultados aparentemente paradójicos parecían evidenciar la presencia de un mecanismo de defensa en las células diseñado para eliminar células que estén experimentando una señalización excesiva a través de algún mecanismo concreto<sup>211</sup>. Más adelante, se vio que estos mecanismos de defensa eran el producto de la expresión de los genes de supresión tumoral.

### **1.3.1.2 Genes de Supresión Tumoral**

Las células tumorales además de mantener activas las señales que permiten mantener una proliferación permanente, necesitan evitar los mecanismos que regulan negativamente los procesos de proliferación celular. Muchos de estos mecanismos dependen de los genes de supresión tumoral. Se han descubierto muchos supresores tumorales que limitan el crecimiento celular de cánceres en animales o humanos. Los dos supresores tumorales más conocidos y en los que más se han centrado los trabajos de investigación a lo largo de la historia son los que codifican para las proteínas: asociadas a retinoblastoma (RB) y P53. Ambas proteínas actúan como puntos de regulación clave que gobiernan el control en las decisiones celulares que permiten la proliferación o, alternativamente, activar programas de apoptosis o senescencia celular<sup>211</sup>.

La comunidad científica diferencia las proteínas de supresión tumorales RB y P53 en función de la procedencia de las señales que se encargan de interpretar en la célula. Así, RB suele iniciar señales de inhibición del crecimiento celular que tienen su origen principalmente en el exterior celular y, por otro lado, P53 suele recibir señales de estrés o de sensores que sugieren un funcionamiento incorrecto de algún elemento del interior de la célula<sup>211</sup>. De cualquier modo, en ambos casos, experimentos de ganancia y pérdida de función en ratones han demostrado su rol esencial en el control de la proliferación tumoral, permitiéndose en su ausencia, junto con una señal de crecimiento celular permanente como podría ser una expresión incrementada de un protooncogén, un progreso vigoroso hacia procesos cancerosos<sup>214,218,219</sup>.

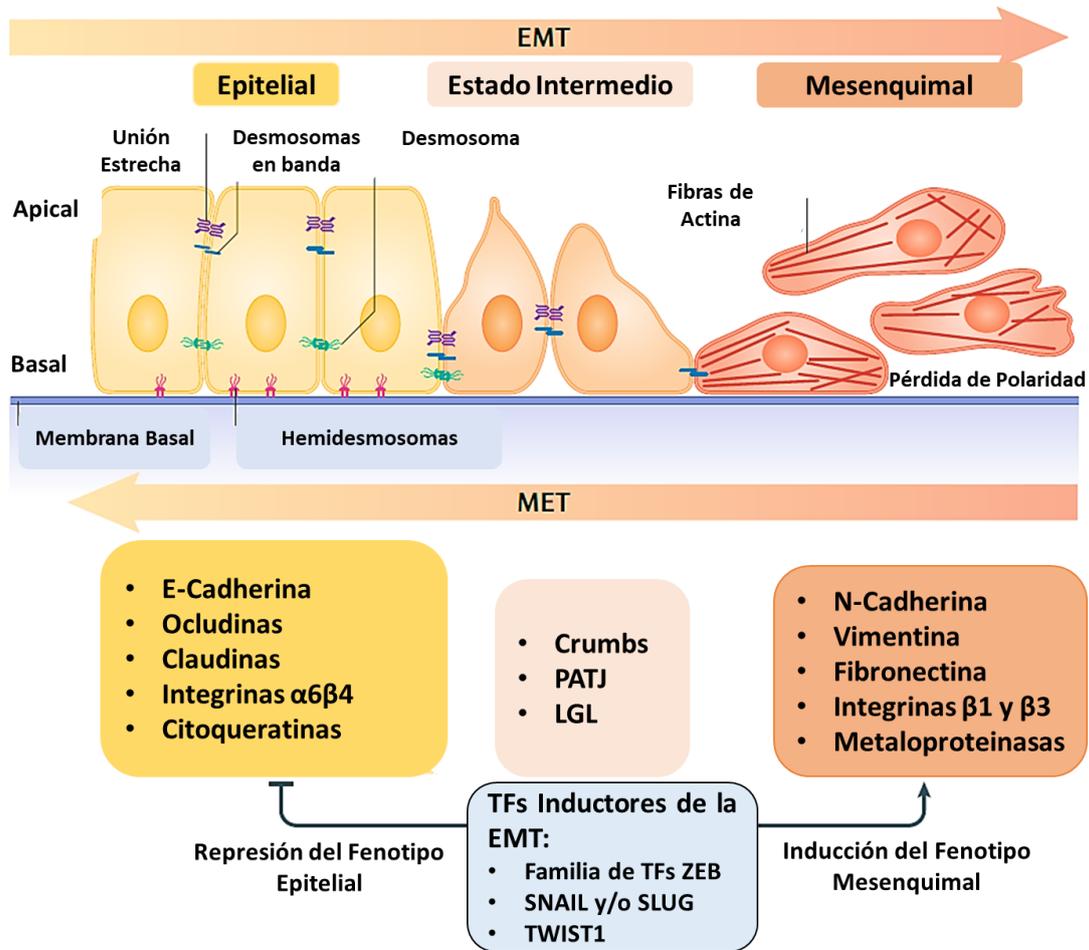
De este modo, el mantenimiento de la proliferación es una característica fundamental de las células cancerosas. Sin embargo, como ya se ha mencionado, no es la única. La mayoría de los procesos cancerosos con peor pronóstico son aquellos que, además de mantener una proliferación elevada y fuera de control, tienen otras capacidades adquiridas debido a su inestabilidad genética. Un ejemplo de otro mecanismo muy importante en el progreso hacia cánceres agresivos es la capacidad de colonizar nuevos tejidos y formar nuevas masas de células tumorales. Este proceso se conoce como metástasis y se ha sugerido en numerosos trabajos que se ve favorecido por procesos de transición de células epiteliales hacia fenotipos más mesenquimales (transición EMT) tanto de las células del tumor como de las circundantes<sup>220,221</sup>. Se ha observado que en el proceso de EMT participan un gran número de factores y entre ellos los exosomas de las células tumorales y de los alrededores.

### **1.3.2 Invasión y Metástasis: Transición Epitelio-Mesenquimal**

La transición epitelio-mesenquimal (EMT) es un proceso de reprogramación celular reversible que transforma de manera transitoria a las células con fenotipo epitelial en células con un fenotipo similar al mesenquimal (Figura 1.20)<sup>222-224</sup>. Las células resultantes con un fenotipo más mesenquimal pueden revertir la transición EMT en un proceso que transcurre en sentido contrario conocido como transición mesenquimal-epitelial (MET) (Figura 1.20). La transición EMT guarda un papel importante en muchos pasos de la embriogénesis, como la gastrulación o la morfogénesis de los tejidos durante el desarrollo y también en procesos de cicatrización en los adultos<sup>223-225</sup>. Por otro lado, se ha observado que la progresión de muchos cánceres que afectan a los tejidos epiteliales (carcinomas), si no en todos, depende de la activación del proceso de la EMT en las células cancerosas<sup>220,221</sup>. De este modo, en el contexto neoplásico, trabajos que estudian la influencia de la activación de la EMT en células de los carcinomas han descrito que esta activación puede dotar a las células de ciertas características de malignidad como: la capacidad de ser células iniciadoras de procesos tumorales, elevada motilidad con la habilidad de diseminar a otras regiones y resistencia a la muerte por

acción tanto de ciertos agentes quimioterápicos como por el sistema inmunitario adaptativo<sup>226-232</sup>.

Habitualmente, las células que forman el epitelio en los tejidos del cuerpo muestran una polaridad apical-basal y se encuentran unidas lateralmente a través de uniones estrechas y de adherencia (Figura 1.20). Estas últimas están formadas por moléculas epiteliales de cadherina (E-Cadherina) localizadas en la superficie celular (Figura 1.20). Esta estructura también se puede apreciar *in vitro*, donde las células se sitúan formando una monocapa con un aspecto similar a un pavimento de adoquines. Esta organización con las moléculas de E-Cadherina en la superficie celular es crucial para guardar la integridad estructural del epitelio. Tras la activación de la EMT se reprime la expresión de la E-Cadherina, lo que desencadena la pérdida de la morfología poligonal semejante a los adoquines característica de las células epiteliales (Figura 1.20). De este modo, las células adquieren una morfología similar a un huso característica de las células mesenquimales (Figura 1.20). Esto se ve acompañado de la expresión de marcadores asociados al fenotipo mesenquimal, entre los que se encuentran la Cadherina neural (N-Cadherin), la vimentina o la fibronectina (Figura 1.20)<sup>225</sup>. Se han descrito varios factores transcripcionales (TF) que actúan pleiotropicamente y en combinaciones diferentes induciendo la expresión de genes que promueven el fenotipo mesenquimal y reprimen la expresión de genes que mantienen el epitelial (Figura 1.20)<sup>223-225</sup>. A estos factores transcripcionales inductores de la EMT se les denomina TFs-EMT (Figura 1.20). Varias vías de señalización influyen en la inducción de la EMT, encontrándose entre ellas la vía de señalización de Notch.



**Figura 1.20 Esquema de un programa de transición epitelio-mesénquima típico.** Las células epiteliales con una polaridad apical-basal característica se mantienen unidas por uniones estrechas, *adherens* y desmosomas. A su vez, se mantienen unidas a la membrana basal a través de hemidesmosomas. Estas células expresan moléculas que se asocian con el fenotipo epitelial y ayudan a mantener la polaridad celular (moléculas dentro de los recuadros amarillo y naranja claro). La inducción de la transición de epitelio a mesénquima (EMT) lleva a la expresión de factores de transcripción inductores de la EMT (TFs-EMT) como ZEB, SNAIL y TWIST, que inhiben la expresión de genes asociados al fenotipo epitelial y activan la expresión de genes asociados al fenotipo mesenquimal (moléculas dentro del recuadro naranja). Esto resulta en cambios celulares como el desensamblaje de uniones intercelulares características del epitelio o la pérdida de la polaridad apical-basal a través de la represión de las proteínas Crumbs, PATJ y LGL. Esta pérdida de características epiteliales se acompaña de una ganancia de características mesenquimales. A su vez, el fenotipo más mesenquimal, conlleva una reorganización del citoesqueleto y la expresión de una serie de moléculas y TFs-EMT que promueven y mantienen el fenotipo. Durante la EMT, las células adquieren comportamientos más migratorios e invasivos. El proceso de EMT es reversible. MET: transición mesénquima-epitelio. Adaptado de Dongre, A. y colaboradores<sup>231</sup>.

### 1.3.2.1 Transición Epitelio Mesénquima (EMT): la Vía de Señalización de Notch

Como se ha puntualizado al inicio de este trabajo, la vía de señalización de Notch está involucrada en procesos de control del destino celular, diferenciación y proliferación<sup>64,233</sup>.

Un gran número de publicaciones han sugerido una participación de la vía de Notch en la inducción de la EMT tanto en tejidos sanos como en aquellos que sufren un crecimiento neoplásico de células (Figura 1.21). Los primeros trabajos que reflejaron esta relación lo hicieron en base a estudios en los que embriones que carecían de la expresión de Notch1 o de su compañero transcripcional, RBPJ, eran incapaces de expresar SNAIL, uno de los TFs-EMT más estudiados<sup>234</sup>. De este modo, no podían activar la EMT en el endocardio que es necesaria para la generación del resto de tipos celulares. Además de su papel en la activación de la EMT en los tejidos sanos, varios de los componentes de la vía de señalización de Notch se han relacionado en la regulación de la EMT en diferentes tipos de carcinomas como el cáncer de mama, de pulmón, pancreático o en el carcinoma de células escamosas<sup>235–237</sup>.

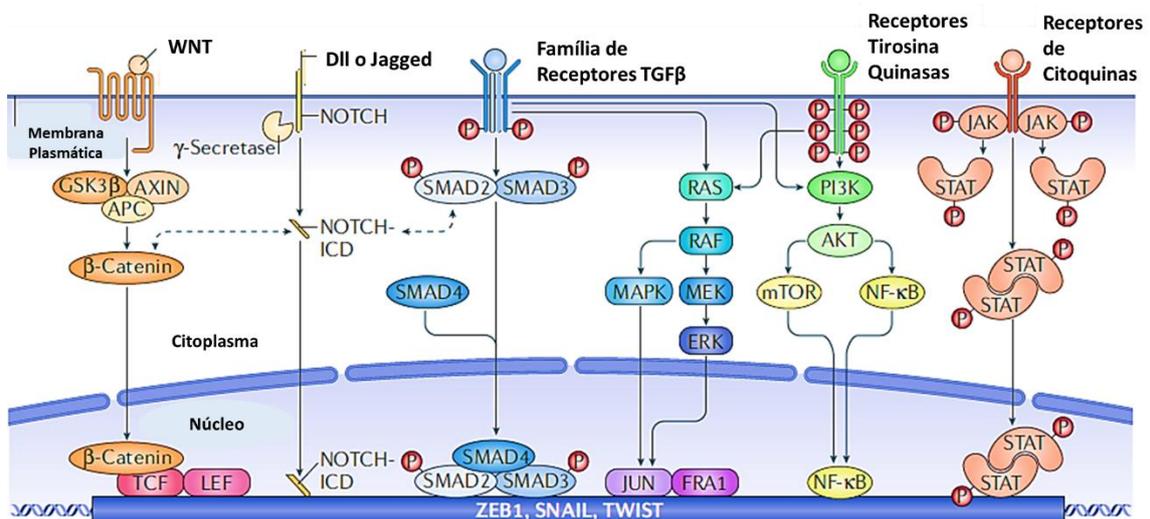


Figura 1.21 Vías de señalización que activan la EMT a través de la activación de la transcripción de factores transcripcionales inductores de EMT como ZEB1, SNAIL o TWIST. Adaptado de Dongre, A. y colaboradores<sup>232</sup>.

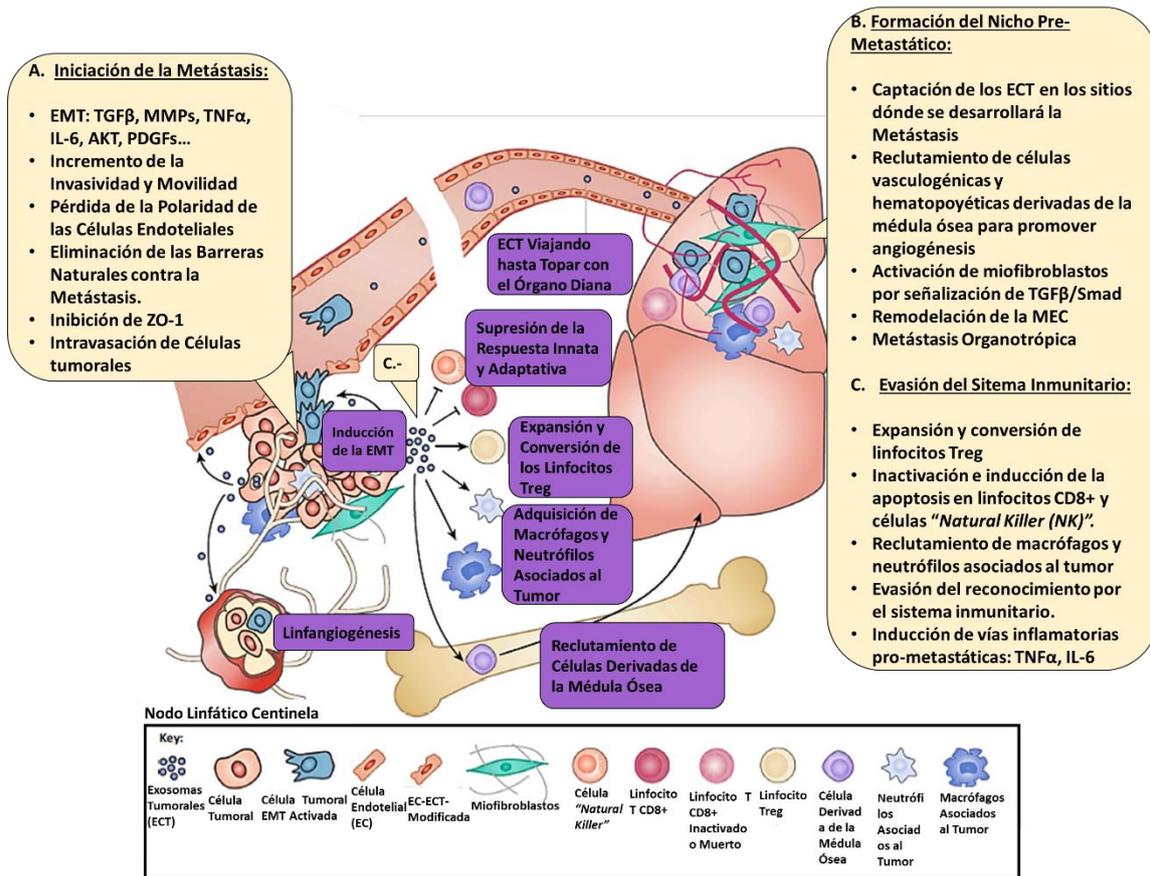
La expresión elevada del marcador de superficie celular CD44 se ha asociado de forma repetida con células epiteliales cancerosas que han entrado en un estado más mesenquimal con capacidad de iniciar procesos tumorales. En este sentido, la sobreexpresión del dominio intracelular activado del receptor de Notch1 (N1ICD) induce la activación de la EMT e incrementa la proporción de células con una expresión aumentada de CD44 en carcinomas de células escamosas<sup>238</sup>. Adicionalmente, trabajos realizados con células de cáncer de mama han sugerido un aumento en la agresividad tumoral a través de una inducción de la EMT con la sola sobreexpresión a nivel celular de N1ICD<sup>239</sup>. Cabe destacar también la presencia de altos niveles de expresión de componentes de la vía de Notch en los márgenes de tumores, que comúnmente expresan marcadores de la EMT como vimentina. Estas observaciones sugieren un papel importante de la vía en la regulación de la EMT<sup>238,240,241</sup>. De este modo, se cree que la inducción de la EMT a través de Notch se debe a la regulación de varios TFs-EMT como SNAIL o SLUG que directamente reprimen la expresión de la E-Cadherina e inducen la expresión de vimentina y fibronectina<sup>234,242,243</sup>.

### **1.3.2.2 Transición Epitelio Mesénquima (EMT): Exosomas**

#### **Tumorales**

Como ya se ha comentado previamente, el contenido en biomoléculas de los exosomas puede variar en función del estado fisiológico de la célula que los libera. De este modo, se ha observado que los exosomas procedentes de células tumorales (ECT) pueden contener biomoléculas que son capaces de activar la EMT como metaloproteasas de la matriz (MMPs), miR-100, LMP1, HIF-1 $\alpha$  o TGF $\beta$  que, además, inducen cambios en el ambiente que favorecen la progresión tumoral (Figura 1.22)<sup>244</sup>. En este sentido, en la actualidad varios estudios han sugerido un modelo en el que los exosomas procedentes de células tumorales contribuyen en la progresión de los tumores de la siguiente manera (Figura 1.22): en primer lugar, los ECT promueven señales autocrinas y paracrinas dentro del ambiente del tumor primario y activan el proceso de EMT en las células epiteliales del tumor<sup>245-249</sup>. En segundo lugar, los ECT viajan por la sangre y la linfa y son captados por tejidos y órganos que están alejados del tumor primario y preparan un nicho donde

las células que diseminan del tumor primario son capaces de anidar y eventualmente colonizar (nicho pre-metastático)<sup>250–252</sup>. Además, en un trabajo publicado por Hoshino, A. y colaboradores han observado que los exosomas determinan el órgano en el que generan el nicho pre-metastático en función del código de integrinas que llevan los ECT en su superficie<sup>253</sup>. En tercer lugar, los ECT modulan el sistema inmunitario del hospedador permitiendo una progresión tumoral desenfrenada<sup>254–256</sup>.



**Figura 1.22 Contribución de los exosomas derivados de células tumorales en la progresión del cáncer.** Las células tumorales liberan exosomas (ECTs) que desarrollan diferentes tipos de señales en el ambiente que las rodea. **A.** Los ECTs están implicados en el inicio de la metástasis a través de una activación de las vías que inducen la transición epitelio mesénquima (EMT) y de la eliminación de las barreras naturales que encapsulan los tumores. **B.** Los ECTs también contribuyen a la metástasis estableciendo el nicho pre-metastático mediante el reclutamiento de células madre derivadas de la médula ósea, la activación de miofibroblastos, la activación del remodelado de la matriz extracelular y la angiogénesis. **C.** También se ha observado que los ECTs contribuyen a la progresión del cáncer al ayudar a las células cancerosas a evadir al sistema inmune. Treg: linfocito T regulador. TGFβ: factor de crecimiento transformante-β. TNFα: factor de necrosis tumoral-α. IL-6: interleuquina-6. AKT: proto-oncogen Akt. ILK1: quinasa 1 unida a

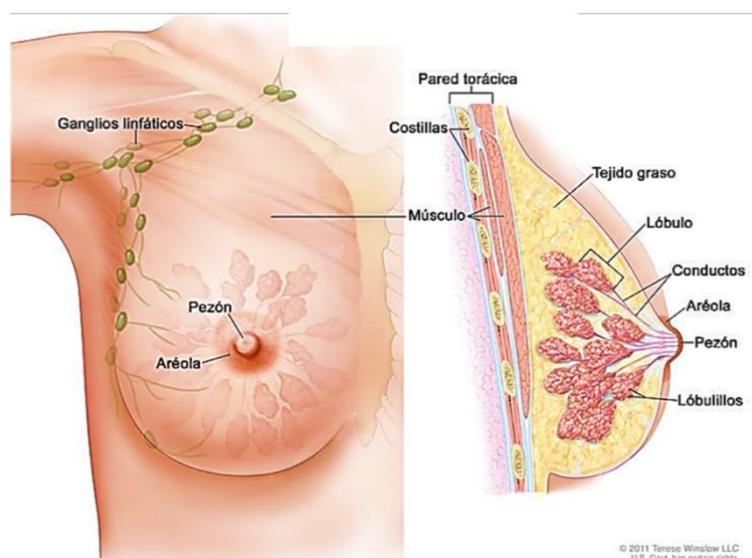
integrina. PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas. ZO-1: unión estrecha-1. Adaptado de *Syn, N. y colaboradores*<sup>244</sup>.

En este trabajo se estudió la cooperación entre la vía de Notch y los exosomas derivados de células tumorales en el contexto del cáncer de mama. De este modo, en el siguiente punto se comentará el cáncer de mama y los tipos moleculares descritos hoy en día.

### 1.3.3 Cáncer de Mama

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente y con mayor mortandad entre las mujeres, afectando a alrededor de 2,1 millones de mujeres cada año. En 2018 se estima que 627.000 mujeres murieron a causa del cáncer de mama, lo que implica alrededor del 15 % del número total de muertes por cáncer<sup>257</sup>.

A grandes rasgos, el seno está formado por dos tipos principales de tejidos, los tejidos glandulares y los de soporte (Figura 1.23). Los tejidos glandulares contienen las glándulas responsables de producir leche (lobulillos) y los ductos por donde circula la leche hasta el pezón (Figura 1.23). Por otro lado, los tejidos de soporte incluyen el tejido adiposo o graso y el conectivo fibroso (Figura 1.23). El seno también está infiltrado con tejido linfático que retira los fluidos celulares y de desecho (Figura 1.23)<sup>258</sup>.



**Figura 1.22 Anatomía del seno femenino.** Se observan 4 tipos de tejidos: el tejido adiposo o graso que forma la mayor parte del seno. El tejido glandular, compuesto por los lóbulos, lobulillos, los conductos y

el pezón. El tejido muscular, más cercano a las costillas. El tejido linfático, que infiltra todo el seno y funciona drenando las sustancias de desecho del seno y de centinela inmunológica. Adaptado de [www.visualsonline.cancer.gov](http://www.visualsonline.cancer.gov).

Existen varios tipos de tumores que pueden desarrollarse en diferentes sitios del seno. La mayoría de tumores surgen a partir de crecimientos neoplásicos benignos que se inician en las células epiteliales presentes en los ductos (cáncer ductal), otros se inician en las células epiteliales de los lobulillos (cáncer lobular) y los menos frecuentes se originan a partir del resto de tejidos presentes en el seno<sup>258</sup>. El tumor resultante, que comienza como una anomalía leve, pasa a ser grave al invadir tejidos vecinos y, finalmente, desarrolla metástasis a otras partes del cuerpo entre las cuales destacan el pulmón, el hueso y el cerebro<sup>257</sup>.

### **1.3.3.1 Subtipos Moleculares**

Una de las maneras de clasificar los diferentes subtipos de cáncer de mama además de por el tejido donde se originan, su invasividad, etc., es a través de su firma molecular. De este modo, evaluando la expresión de los receptores hormonales de estrógenos y/o progesterona, el nº de copias génicas del receptor del factor de crecimiento epidérmico a consecuencia de una amplificación del gen HER2 (HER2-positivo) y la tasa de proliferación en función de la expresión del marcador Ki67, se pueden diferenciar 5 subtipos de cáncer de mama con diferente pronóstico<sup>259</sup>:

- Luminal A: las células cancerosas expresan receptores hormonales de estrógenos y/o de progesterona. Sin embargo, no expresa el receptor del factor de crecimiento epidérmico HER2 y suele tener niveles bajos del marcador de proliferación celular Ki67.
- Luminal B: las células cancerosas expresan receptores hormonales de estrógenos y/o progesterona, pueden o no expresar HER2 y proliferan más que las del subtipo luminal A (niveles más altos de Ki67).

- Triple negativo: las células cancerosas de este subtipo de cáncer de seno no expresan receptores hormonales de estrógenos o progesterona ni HER2. Este tipo de cáncer es más frecuente en pacientes con el gen de supresión tumoral *BRCA1* mutado. Este se considera el subtipo más agresivo y con peor pronóstico.
- De tipo normal: este subtipo es similar al luminal A, las células cancerosas contienen receptores hormonales de estrógenos y/o progesterona, no expresan HER2 y presenta niveles bajos de Ki67.

Hoy en día, la evaluación de la firma molecular de las células tumorales del cáncer de mama es muy importante para determinar el tratamiento. Los tratamientos del cáncer de mama más utilizados consisten en: la eliminación de los tumores primarios y de los ganglios linfáticos que le rodean mediante cirugía, terapia de radiación, terapia hormonal y quimioterapia. Adicionalmente, se están realizando avances prometedores en el desarrollo de inmunoterapias, donde cabe destacar el desarrollo de células T “inmunoentrenadas” *in vitro* para reconocer antígenos tumorales también conocidas como células CAR-T<sup>260,261</sup>. Es notorio el esfuerzo en el desarrollo de tratamientos contra el cáncer de mama. Sin embargo, como se puntualizó al comienzo de este bloque, sigue siendo responsable de una elevada mortandad en el mundo entero. En ese punto, cumple un papel muy importante la investigación básica para seguir conociendo los mecanismos biológicos y moleculares que gobiernan la fisiopatología del cáncer de mama.

## **2. Hipótesis y Objetivos**



## **2. Hipótesis y objetivos**

Las características regenerativas de las MSC las han llevado a ser propuestas como agentes terapéuticos en múltiples patologías isquémicas como el IAM. No obstante, su aplicación en ensayos clínicos arrojó resultados modestos para las expectativas de la comunidad científica. Es por esto que en los últimos años se ha estudiado la procedencia de sus efectos terapéuticos y se ha tratado de potenciarlos. En este sentido, en 2013 en un trabajo publicado por nuestro laboratorio se demostró que la estabilización de la expresión de HIF-1 $\alpha$  en MSC (HIF-MSC) aumentaba el efecto terapéutico de estas células en un modelo de IAM en rata. Este efecto era en parte debido a un aumento en la angiogénesis. De este modo, siendo consistentes con la hipótesis paracrina, en este trabajo estudiamos la contribución de los exosomas secretados por las HIF-MSC en el potencial angiogénico de estas células. La expresión de HIF-1 $\alpha$  está estrechamente relacionada con la conocida vía de señalización de Notch. Además, trabajos recientes han advertido de un nuevo mecanismo de señalización de la vía de Notch mediado por exosomas. Debido a la importancia que guarda esta vía de señalización en la regulación del proceso angiogénico, hipotetizamos que la vía de señalización de Notch podría estar contribuyendo al potencial terapéutico de las HIF-MSC a través de sus exosomas. Con estas premisas, los objetivos específicos fueron:

- 1- Estudiar el efecto de la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  en MSC sobre el contenido y la tasa de secreción de exosomas.
- 2- Estudiar la posible presencia de componentes de la vía de Notch en los exosomas procedentes de MSC y de HIF-MSC.
- 3- Monitorizar la transferencia de exosomas procedentes de MSC y de HIF-MSC a células endoteliales.
- 4- Evaluar el papel de la vía de señalización de Notch en el potencial angiogénico de los exosomas procedentes de MSC nativas y de HIF-MSC.

Por otra parte, en los últimos años múltiples trabajos han demostrado la contribución de los exosomas procedentes de células tumorales a la progresión de distintos tipos de tumores. En este sentido, se han estudiado las biomoléculas incorporadas en los exosomas procedentes de células tumorales y sus efectos, tanto para entender mejor los mecanismos que posibilitan la progresión tumoral como para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas. Por otro lado, la desregulación de la vía de señalización de Notch está íntimamente relacionada con la progresión del cáncer. A la luz del descubrimiento de un nuevo mecanismo de señalización de la vía de Notch mediado por exosomas, poco se ha estudiado de su participación en los efectos sobre la progresión tumoral. En concreto, los cánceres de mama de peor prognosis son aquellos que presentan una sobreactivación de la vía de señalización de Notch. Por este motivo, en el presente trabajo hipotetizamos que los exosomas procedentes de células tumorales de cáncer de mama podrían estar incorporando componentes funcionales de la vía de señalización de Notch. Con esta idea, los objetivos fueron los siguientes:

- 1- Analizar el contenido proteico global de los exosomas procedentes de las líneas tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7.
- 2- Analizar la presencia de componentes de la vía de señalización de Notch en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7.
- 3- Evaluar la actividad sobre la vía de señalización de Notch de los exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7 al ser agregados a cultivos celulares *in vitro*.
- 4- Estudiar la influencia de la actividad sobre la vía de señalización de Notch contenida en los exosomas de líneas celulares de cáncer de mama sobre procesos de malignización tumoral como la EMT o proliferación celular.



# **3. Materiales y** **Métodos**



## **3. Materiales y Métodos**

### **3.1 Animales**

El manejo de los animales se realizó según los requisitos estipulados por el Real Decreto 53/2013 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, y atendiendo a todas las normas y recomendaciones del Comité de Ética y de Bienestar Animal (CEBA) del Instituto de Investigación sanitaria La Fe y del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

En este trabajo se utilizaron ratones *nude* (nu/nu) (Charles River Laboratories inc.) para los ensayos de plug de matrigel. Se trata de ratones que carecen de timo. De este modo, son ratones incapaces de producir células-T de defensa, ergo, son inmunodeficientes.

### **3.2 Tipos Celulares**

En el presente trabajo se estudiaron los siguientes tipos celulares: cultivos primarios de Células Madre Mesenquimales (MSC) humanas modificadas genéticamente o no mediante transducción lentiviral, cultivos primarios de células endoteliales humanas aisladas de cordón umbilical (HUVEC, del en inglés *Human umbilical vein endothelial cells*) y líneas celulares derivadas de epitelio tumoral de cáncer de mama metastásico (MDA-MB-231) y no metastásico (MCF-7). Todos los tipos celulares fueron cultivados en un incubador Forma Series II modelo 3141 (Thermo Fisher Scientific) a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.2.1 Cultivos Primarios**

##### **3.2.1.1 Cultivo Primario de Células Madre Mesenquimales**

Las MSC en pase 1/2 se adquirieron del Banco Nacional de Líneas Celulares a través de la Fundación Inbiobank (San Sebastián, España) donde fueron procesadas según los

procedimientos de referencia ISO90001:2000 bajo condiciones GMP. El medio de cultivo utilizado para su mantenimiento y expansión fue el Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-bajo en glucosa, con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1% penicilina-estreptomicina (P/S). Todos los componentes obtenidos de la casa comercial Gibco.

### **3.2.1.2 Cultivo Primario de Endotelio Humano**

El endotelio humano utilizado en este estudio provino de venas de cordón umbilical humano HUVECs. Dicho cultivo primario fue adquirido de ATCC (American Type Culture Collection) y el medio de cultivo utilizado para su mantenimiento fue EGM-2 BulletKit (Lonza).

### **3.2.2 Líneas Celulares**

Desde el establecimiento de la primera línea tumoral de células de cáncer de mama, BT-20, en 1958<sup>262</sup>, se han establecido más de 80 líneas nuevas a partir de biopsias de distintos subtipos tumorales con el objetivo de modelar *in vitro* de la forma más representativa posible la enfermedad. Sin embargo, las líneas usadas con mayor frecuencia en los trabajos de investigación son las MCF-7, T47D y MDA-MB-231<sup>263</sup>. En concreto en este trabajo se emplearon las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 cuyas características son las siguientes:

- MCF-7: es una línea tumoral de células invasivas no metastáticas de cáncer de mama aislada en 1970 a partir de un tumor de una paciente caucásica de 69 años. El tumor primario fue un carcinoma invasivo localizado en el ducto mamario. Expresa receptores para estrógenos y progesterona, pero carece de expresión de receptores del factor de crecimiento epitelial. Por esto la línea MCF-7 se la clasifica dentro del subtipo molecular de cáncer de mama Luminal A. Además, estas células retienen varias características del epitelio mamario, incluyendo la capacidad de procesar el estradiol a través de receptores citoplasmáticos de estrógenos y la de formar en cultivo parches de células con morfología semejante a un pavimento de adoquines.

- MDA-MB-231: es una línea tumoral de células metastáticas de cáncer de mama aislada en 1973 a partir de una muestra de derrame pleural de una paciente caucásica de 51 años. El tumor primario fue un carcinoma localizado en el revestimiento interno de las glándulas mamarias. Estas células no expresan receptores para estrógenos o progesterona y tampoco el receptor del factor de crecimiento epitelial. Por esto a la línea MDA-MB-231 se la clasifica dentro del subtipo molecular del cáncer de mama triple negativo.

Ambas líneas celulares se obtuvieron de la colección de cultivos ATCC y el medio de cultivo empleado para su mantenimiento fue DMEM-alto en glucosa, con 10% de suero fetal bovino y 1% de P/S.

### **3.2.3 Expansión Celular y Criopreservación**

Los diferentes tipos celulares estudiados se cultivaron hasta alcanzar un 80% de confluencia y luego se realizaron pases celulares. Para ello, las células se sometieron a una digestión con tripsina/EDTA 1X (Gibco), una combinación de una proteasa capaz de romper tanto las uniones intercelulares como las uniones al sustrato y un quelante de cationes divalentes que retiene el  $\text{Ca}^{+2}$ . Esto impide que el  $\text{Ca}^{+2}$  actúe como cofactor en las uniones intercelulares. Tras su conteo se sembraron a la densidad adecuada para cada tipo celular.

Para su congelación, las células se lavaron con PBS y se despegaron de la placa de cultivo mediante una digestión de 5 min con tripsina/EDTA 1X. Las células en suspensión se recogieron con el medio de cultivo correspondiente. La acción de la tripsina se ve inhibida debido al gran número de inhibidores de proteasas existentes en el FBS. La solución de medio completo y tripsina/EDTA se homogeneizó y se centrifugó a 200 g durante 5 min. El sedimento se resuspendió en un volumen pequeño de medio de cultivo. Tras su conteo se introdujo 1 millón de células en 900  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo completo en el interior de un criotubo. Para evitar que el descenso brusco de la temperatura dañe la viabilidad de las células a congelar se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de un agente crioprotector (DMSO) a los 900  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo con las células, teniendo al final una solución al 10% en DMSO. Una vez homogeneizada la solución los criotubos

se cerraron y se introdujeron en un recipiente con isopropanol que permite un descenso gradual de la temperatura (1 °C/h). En este recipiente se llevan a los congeladores y se depositaron a -80 °C. Pasadas 24 h, los criotubos se trasladaron a un contenedor de nitrógeno líquido.

### **3.2.4 Recuento de la Viabilidad Celular**

La viabilidad celular de las suspensiones celulares obtenidas mediante la digestión con tripsina/EDTA se analizó mezclando en un tubo 10 µL de la suspensión en cuestión con 10 µL de azul tripán al 0,2 % en PBS. El azul tripán es un colorante que es capaz de entrar en las células. Sin embargo, las células viables son capaces de expulsarlo, pero no las muertas. Se colocaron 10 µL de dicha solución en una cámara de Neubauer y se procedió al recuento de las células viables (sin teñir) en los cuadrados más grandes, haciendo uso de un microscopio óptico. Como cada recuadro tiene un lado de 1 mm y una altura aproximadamente de 0,1 mm, el área de los mismos es de 1 mm<sup>2</sup> y el volumen de 0,1 mm<sup>3</sup> (0,00010 mL). Por lo tanto, se cuentan las células de varios recuadros y después se divide el número total de células por el número de recuadros contados. Esa media se multiplica por 10.000 y se obtiene el número de células/µL. La fórmula sería la siguiente:  $\text{N}^{\circ} \text{ de células viables/mL} = 10.000 \times \text{N}^{\circ} \text{ células contadas en la cámara} \times 2 \text{ (dilución)}$ .

## **3.3 Técnicas de Genética Molecular**

Durante la realización de este trabajo se han empleado técnicas convencionales para la manipulación de material genético, con el fin de poder editarlo e introducirlo de manera estable en los cultivos eucariotas. Para modificar genéticamente los diferentes cultivos de células eucariotas se utilizaron vectores lentivirales.

Por un lado, las MSC se modificaron genéticamente para que expresasen de forma estable el gen de respuesta a hipoxia-1α (HIF-1α; HIF-MSC) con el vector pWPI-HIF-GFP. El vector sin HIF-1α se usó como control (Figura 3.1) y se introdujo del mismo modo en los cultivos de MSC. Tanto estas células como los exosomas derivados de ellas se usaron como control en todos los experimentos.

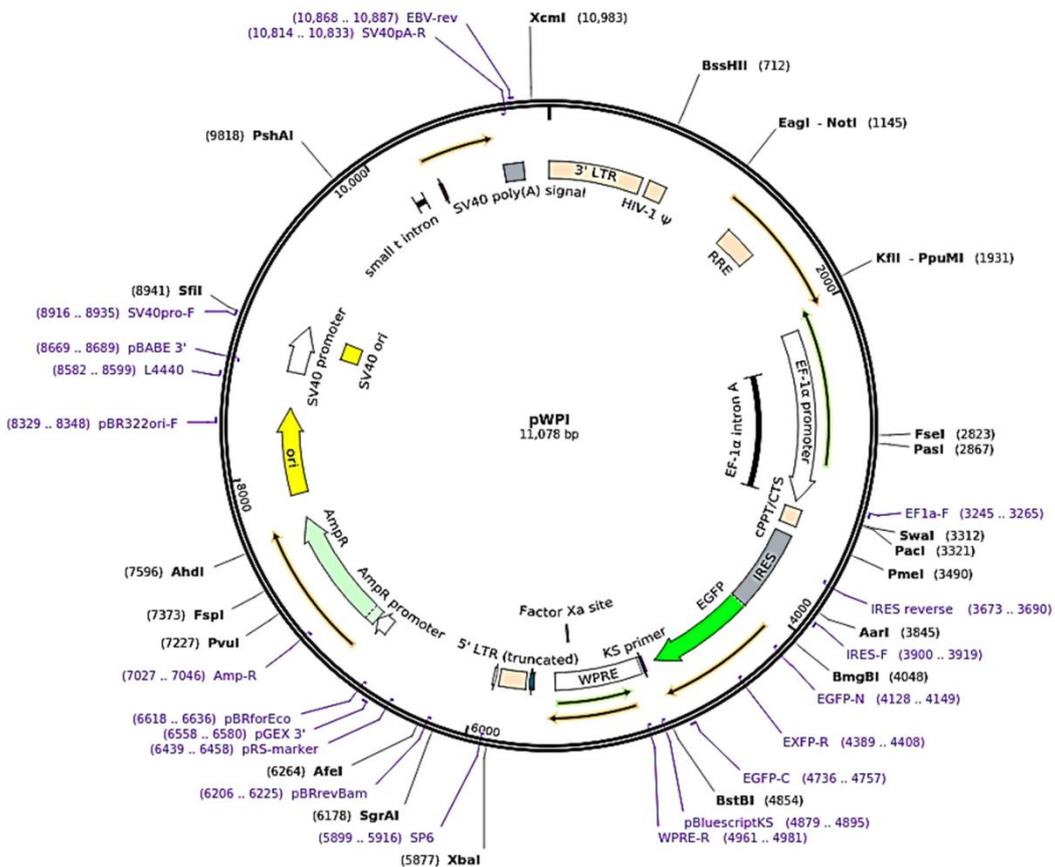


Figura 3.1 Vector comercial pWPI de la casa comercial Addgene. Adaptado de [www.addgene.com](http://www.addgene.com).

Por otro lado, para monitorizar el tráfico celular de exosomas, los cultivos de células eucariotas se modificaron genéticamente con una construcción genética que contiene el gen del marcador de exosomas CD63 fusionado al gen de la proteína roja fluorescente (RFP) (Figura 3.2). Esto permite realizar un seguimiento de los exosomas procedentes de aquellas células modificadas.

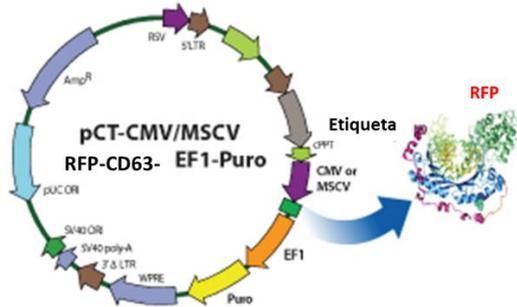


Figura 3.2 Vector comercial pCT-CMV/MSCV RFP-CD63-EF1-Puro o pCT-CD63-RFP. Adaptado de [www.systembio.com](http://www.systembio.com).

Los vectores lentivirales se adquirieron en forma de plásmidos de las casas comerciales Addgene (pWPI-GFP) y System Biosciences (pCT-CD63-RFP). El vector pWPI-GFP-HIF fue producido en el laboratorio a partir del vector comercial pWPI-GFP (Addgene)<sup>161</sup>. Como se describe a continuación, los plásmidos fueron amplificados y purificados para posteriormente ser empleados para generar los vectores lentivirales.

### **3.3.1 Transformación y Amplificación Bacteriana**

Una vez adquiridos los plásmidos de la casa comercial, estos se amplificaron introduciéndolos en bacterias de la cepa DH5 $\alpha$ . Para ello, 100  $\mu$ L de bacterias se mezclaron con 200 ng de plásmido disuelto en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miliQ y se incubaron en hielo 20 min. Seguidamente, se realizó un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos y se volvieron a incubar en hielo 2 min. A continuación, se añadió 1 mL de LB (Lysogeny broth; Thermo Fisher Scientific) precalentado a 42 °C para su posterior incubación en un agitador orbital a 180 revoluciones por minuto (r.p.m) durante 1 h a 37 °C. Una vez transcurrido ese tiempo las muestras se centrifugaron a 0,4 g durante 1 min y el pellet se resuspendió en 50-100  $\mu$ L de LB que se añadió a placas de crecimiento bacteriano de LB-agar (LB, 5g/L agar bacteriológico) suplementadas con ampicilina a 100  $\mu$ g/mL. Estas placas se incubaron en una estufa a 37 °C durante toda la noche para la obtención de las colonias bacterianas. Los plásmidos utilizados en este trabajo tienen un gen de resistencia al antibiótico ampicilina, de modo que todas aquellas bacterias que hubiesen incorporado el plásmido, y no el resto, serían capaces de crecer en las placas de LB-agar suplementadas con el antibiótico. Las placas con las colonias obtenidas se guardaron a 4 °C hasta su uso.

### **3.3.2 Extracción y Purificación del DNA plasmídico**

Las colonias obtenidas en la sección 3.3.1 se picaron individualmente y se inocularon en tubos con 3 mL de LB suplementado con el antibiótico de selección (ampicilina 100  $\mu$ g/mL) y se incubó a 37 °C en agitación a 180 r.p.m durante 8 h. Transcurrido ese tiempo, se inocularon 2 de los 3 mL en matraces con 200 mL de LB con el antibiótico de selección (Ampicilina 100  $\mu$ g/mL) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C en agitación a 180

r.p.m. Al día siguiente se procedió a la extracción del DNA plasmídico mediante el Kit Plasmid Maxiprep (Jetstar).

El DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop ND1000) y las calidades de las muestras se corroboraron en función de los ratios de absorbancia 260/280 nm (un valor de 1,8 indica que la contaminación por RNA es despreciable) y 230/260 nm (un rango comprendido entre 2,0-2,2 indica que la contaminación de la muestra por proteínas u otras moléculas es muy baja). Posteriormente el DNA se diluyó a una concentración de trabajo de 1 µg/mL.

### 3.3.3 Transducción Lentiviral

Para generar los vectores lentivirales que posteriormente se usarían vehículos para introducir el material genético de interés en los diferentes cultivos de células eucariotas se utilizaron células HEK 293T como línea empaquetadora. Para la producción de los vectores lentivirales, las células HEK 293T se transfectaron con los plásmidos PAX2 y VSV (Addgene). Estos plásmidos, aportaban el resto de componentes necesarios para que las células fueran capaces de producir los virus y empaquetar el constructo genético de interés dentro de la partícula Lentiviral. El proceso de generación de los vectores lentivirales e infección se llevó a cabo del siguiente modo:

- Día 1: Siembra. El día de antes de la transfección se sembraron 3 placas de 55 cm<sup>2</sup> con  $6 \times 10^6$  de células HEK 293T. 1 placa de HEK 293T por cada placa de 55 cm<sup>2</sup> del cultivo eucariota a infectar.
- Día 2: Transfección. Una hora antes de empezar la transfección, el medio de cultivo de las células HEK 293T se sustituyó por DMEM-alto en glucosa suplementado con P/S al 1 % y cloroquina a 25 µM (Sigma Aldrich). La cloroquina es un compuesto químico que mejora la eficiencia de la transfección. A continuación, se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución A: Compuesta por 5  $\mu\text{L}$  del plásmido de interés, 3  $\mu\text{L}$  del plásmido PAX2, 1,5  $\mu\text{L}$  del vector VSV, 62  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  a 2 M y 428,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  miliQ estéril (el stock de los plásmidos siempre fue de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).
- Solución B: Compuesta por 500  $\mu\text{L}$  de tampón HBS 2X (NaCl a 280 mM, tampón HEPES a 50 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , todos los reactivos de Sigma Aldrich), con un pH de 7 unidades y estéril.

Una vez preparadas la solución A y la solución B, se procedió a agregar “gota a gota” un volumen de la solución A sobre la solución B (solución A: B). Al mismo tiempo, la mezcla de ambas soluciones se agitaba en un vórtex. Una vez preparada la solución A: B, ésta se agregó a cada una de las placas de HEK 293T y se incubaron 8 h. Transcurridas las 8 h, se cambió el medio de las HEK 293T y se sustituyó por el medio de cultivo de las células a infectar, pero con la particularidad de no agregarle el FBS. En este medio se incubaron 48 h. En este tiempo la línea empaquetadora HEK 293T produce los lentivirus con la construcción genética de interés en el interior.

- Día 4: Recolección de las partículas lentivirales e infección. Transcurridas las 48 h, el medio de las células HEK 293T se recogió y se filtró con filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  (Sartorius) para eliminar las células que hayan podido quedar en suspensión. El medio de las células a infectar se sustituyó por el medio de las HEK 293T previamente filtrado. Antes de agregarles el medio a las células a infectar, este se suplementó con el polímero catiónico polibreno a 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Sigma Aldrich) que mejora la eficiencia de infección. Las células a infectar se incubaron en este medio con las partículas lentivirales entre 5-6 h. Transcurrido ese tiempo, el medio de las células se reemplazó por su medio de cultivo habitual.

Todas las modificaciones genéticas realizadas en este trabajo tienen la particularidad de tener un gen para la expresión de la proteína fluorescente verde o roja. De este modo, transcurridas 48-72 h desde la infección, se evaluó la eficiencia de la infección se

mediante citometría de flujo ya que los plásmidos correspondientes contienen la proteína fluorescente verde GFP.

### 3.3.4 Síntesis de las Líneas MSC y HIF-MSC

Las MSC se transfectaron usando lentivirus portadores de los plásmidos pWPI-GFP y pWPI-HIF-GFP, que codifican para la proteína verde fluorescente (GFP) y el factor inducible por hipoxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) en el caso de pWPI-HIF-GFP. Una vez integradas en el DNA genómico de la MSC, ambas construcciones establecen una expresión constitutiva de la proteína GFP o de la proteína HIF-1 $\alpha$  al estar bajo el control del promotor EF-1 (Figura 3.3).

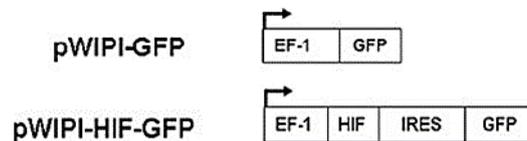


Figura 3.3 Esquema representativo de la clonación del gen HIF-1 $\alpha$  en el vector comercial pWPI.

De esta manera las células transfectadas con pWPI-GFP se denominaron MSC y las transfectadas con pWPI-HIF-GFP se denominaron HIF-MSC.

### 3.3.5 Síntesis de las Líneas Transgénicas CD63-RFP para Monitorizar Exosomas

Las tetraspaninas son una familia de proteínas de membrana que se encuentran en todos los eucariotas pluricelulares. Actualmente se cree que su función está relacionada con el anclaje de otras proteínas de membrana<sup>264</sup>. Los exosomas poseen abundantes cantidades de tetraspaninas en su superficie las cuales se consideran como antígenos específicos de dichas estructuras celulares<sup>265</sup>. En particular, la tetraspanina CD63 ha sido utilizada en estudios previos para realizar el seguimiento del tráfico de exosomas en células<sup>266</sup>. En este trabajo las células MSC o HIF-MSC fueron transfectadas mediante lentivirus con el plásmido lentiviral pCT-CD63-RFP (pCMV, Exosome/Secretory, CD63 Tetraspanin Tag) ([www.systembiosciences.com](http://www.systembiosciences.com)) como se describió en la sección 3.3.3.

Las células resultantes, denominadas MSC-CD63-RFP o HIF-MSC-CD63-RFP, expresan el marcador exosomal CD63 fusionado a la proteína RFP. Una vez integradas en el DNA genómico de las MSC o HIF-MSC, el plásmido logra que la proteína RFP fusionada a la proteína CD63 se expresen de manera constitutiva al estar bajo el control del promotor de citomegalovirus.

El cultivo fue enriquecido en células transducidas mediante una selección con 5 µg/mL de puomicina (Life Technologies) ya que el plásmido pCT-CD63-RFP contiene un gen de resistencia a la puomicina. La eficiencia de la transfección fue evaluada por citometría de flujo cuantificando el porcentaje de la población celular RFP.

### **3.4 Co-Cultivos**

Para evidenciar y cuantificar la transferencia de exosomas entre MSC o HIF-MSC y células endoteliales se realizaron co-cultivos entre estos tipos celulares en los cuales se monitorizó y cuantificó el tráfico exosomal mediante análisis de microscopía confocal de CD63 fusionado a RFP.

Para observar el tráfico de exosomas en MSC o HIF-MSC se construyeron las células MSC-CD63-RFP y las HIF-MSC-CD63-RFP. Para analizar el tráfico exosomal de MSC o HIF-MSC a las células endoteliales HUVEC se realizaron co-cultivos de 24 h por separado sembrando  $15 \times 10^3$  MSC-CD63-RFP o HIF-MSC-CD63-RFP y  $10^5$  HUVEC sobre discos de vidrio de 25 mm (Thermo Scientific, Menzel Gläser, Braunschweig, Alemania). Dado que las células MSC-CD63-RFP y las HIF-MSC-CD63-RFP emiten en verde y rojo, en cambio las HUVEC no emiten fluorescencia por sí mismas, la fluorescencia roja que se detectase en las HUVEC sería debida a la transferencia de exosomas de las MSC-CD63-RFP o las HIF-MSC-CD63-RFP. Pasadas 24 h de co-cultivo, la señal RFP acumulada en células HUVEC se analizó mediante la técnica de recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP) en el microscopio confocal de láser invertido Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania). Para ello, el medio condicionado del co-cultivo se filtró usando filtros de 0,22 µm (Sarstedt) para eliminar restos celulares en suspensión y las vesículas extracelulares de gran tamaño. El medio

filtrado se volvió a poner en el mismo pocillo, los discos de vidrio se colocaron en cámaras Attofluor cell chamber (Invitrogen) y se montaron en el microscopio confocal para la adquisición de imágenes.

## **3.5 Aislamiento de Exosomas a partir de Medios de Cultivo**

### **3.5.1 Medio de Recolección de Exosomas**

Puesto que el FBS contiene exosomas que interferirían en el estudio, se usaron dos estrategias diferentes para evitarlo.

Por un lado, en el medio de recolección de exosomas derivados de células MSC o HIF-MSC (RM1) el FBS se sustituyó por un cóctel definido de nutrientes que consistió en DMEM-bajo en glucosa, con L-glutamina y piruvato de sodio (Sigma-Aldrich Química S.A.), 1% solución de aminoácidos no esenciales (NEAA, Sigma-Aldrich Química S.A.), 1% MEM Eagle Vitamin mix (Lonza), 1% insulina-transferrina-selenio (ITS, Gibco) y 1% P/S.

Por otro lado, en el medio de recolección de exosomas derivados de MCF-7 y MDA-MB-231 (RM2) se eliminaron los exosomas y otras vesículas del FBS mediante ultracentrifugación tal y como describe C. They y sus colaboradores<sup>267</sup>. De forma breve el proceso consistió en preparar DMEM-alto en glucosa al 20% de FBS, ultracentrifugarlo a 100.000 g durante 16 h para posteriormente recoger el sobrenadante. En esta ultracentrifugación las vesículas del FBS precipitan y forman un sedimento que se desecha. El sobrenadante se recogió y se le agregó un volumen de DMEM-alto en glucosa. El medio generado entonces se filtró con un sistema de filtración de 0,22  $\mu\text{m}$  (Sigma Aldrich) y se suplementó con penicilina/estreptomicina al 1%.

Las células donadoras de exosomas se incubaron 48 h en RM1 o RM2 para posteriormente aislar sus exosomas mediante ultracentrifugación.

### **3.5.2 Método de Ultracentrifugación**

El aislamiento de los exosomas secretados por las células al medio extracelular se realiza mediante centrifugaciones diferenciales del medio de cultivo<sup>267</sup>. En este trabajo, se incubaron los cultivos en los medios sin exosomas descritos en la sección 3.5.1 (RM1 o RM2). Una vez incubadas 48 h, se recogió el medio de cultivo y se centrifugó a 2.000 g durante 20 min para precipitar células vivas o muertas en suspensión. El sobrenadante se centrifugó a 10.000 g durante 30 min para precipitar el debris celular y luego se pasó por un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ . Los exosomas fueron obtenidos mediante una ultracentrifugación a 100.000 g durante 70 min en una ultracentrífuga CP80NX (Hitachi, Chiyoda, Tokio, Japón). El precipitado de exosomas fue resuspendido en PBS, o en diferentes tipos de soluciones según el análisis a realizar. Todos los pasos de centrifugación se llevaron a cabo a 4 °C.

### **3.5.3 Purificación Mediante Ensayo de Afinidad**

Para analizar el contenido de miRNA presentes en los exosomas, se utilizó el kit de purificación de exosomas ExoQuick-TC (SystemBioscience) según las especificaciones del fabricante. Las MSC o HIF-MSC fueron incubadas durante 48 h en RM1. Pasadas 48 h, 10 mL de medio de cultivo se centrifugó a 2000 g durante 15 min y se agregaron 2 mL de ExoQuick-TC. La mezcla se incubó durante 16 h a 4 °C y luego se centrifugó a 1.500 g durante 30 min para obtener el sedimento de exosomas. El sedimento se resuspendió en el tampón de lisis proporcionado por el Kit de aislamiento y se procedió a la extracción de los miRNAs exosomales.

## **3.6 Técnicas Bioquímicas**

### **3.6.1 Obtención de Extractos Proteicos**

Para la obtención de los extractos proteicos se trabajó en todo momento en hielo. En primer lugar, los cultivos celulares se lavaron 2 veces con PBS frío y se añadió tampón de lisis RIPA (Sigma Aldrich). El tampón de lisis se suplementó con una mezcla de

inhibidores de proteasas (Complete, Roche) e inhibidores de fosfatasas (Sigma Aldrich). Las células se levantaron con un rascador estéril, se transfirieron a un tubo Eppendorf y se pipeteó repetidas veces con el fin de disgregar y lisar el extracto. A continuación, se incubaron en hielo durante 20 min y se centrifugaron en una centrifuga refrigerada (Eppendorf 5417 R) a 4 °C a máxima velocidad durante 15 min. Posteriormente el sobrenadante con las proteínas en suspensión se transfirió a un tubo Eppendorf y las muestras se conservaron a -80 °C.

### **3.6.2 Cuantificación de Proteínas**

Una vez obtenidos los extractos proteicos se cuantificó la cantidad de proteína mediante el método BCA (BCA protein assay kit (Pierce, Cultek). El ensayo BCA está basado en el ácido bicinconínico (BCA) para la detección y cuantificación colorimétrica de la cantidad de proteína total de una muestra. La cuantificación de proteína total se realizó en una placa de 96 pocillos. En primer lugar, se preparó la solución de trabajo formada por las soluciones A (carbonato sódico, bicarbonato sódico, ácido bicinconínico, tartrato sódico en hidróxido sódico 0,1 M) y B (sulfato de cobre al 4%) en una proporción de 50:1 respectivamente. A continuación, se añadieron 10 µL de cada estándar (para realizar la curva patrón) o de la muestra al pocillo correspondiente, se agregaron 190 µL por pocillo de la solución de trabajo y se agitó durante 30 s en un agitador orbital. La placa se cubrió y se incubó a 37 °C durante 30 min. Tras el periodo de incubación la placa se enfrió a temperatura ambiente y la absorbancia se midió a 562 nm en un lector Victor con el programa Wallac 1420 Workstation.

### **3.6.3 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida**

La electroforesis es una técnica utilizada para la separación de proteínas según su tamaño molecular. Para ello, se dota de carga eléctrica a las proteínas y se les hace migrar a través de una matriz porosa debido a la aplicación de un campo eléctrico constante. De este modo, las proteínas más pequeñas migran más rápido al avanzar más rápido que las grandes a través de los poros de la matriz. Para que las proteínas migren

en función de su carga y de forma uniforme se les dota de carga negativa mezclando el tampón en el que están disueltas con el detergente SDS. En nuestro caso, las proteínas se analizaron por SDS-PAGE (electroforesis en gel de acrilamida con SDS que además también actúa como agente desnaturizante) en un sistema discontinuo donde un primer gel con poros grandes (al 6% de poliacrilamida) produce la acumulación de todas las proteínas en el frente de migración (o inicio del segundo gel). Esta acumulación nos asegura que todas las proteínas empiezan a migrar en el mismo momento. Y en el segundo gel, con poros más pequeños, cuyo porcentaje de poliacrilamida varía en función del tamaño de las proteínas que se quieran detectar, es donde ocurre la separación por tamaños de las proteínas. Para el análisis se cargaron 30 µg de proteína total. Antes de realizar la carga, se añadió a las muestras tampón de carga 5 veces más concentrado que la concentración final (15% SDS (Sigma-Aldrich), 50% glicerol (Sigma-Aldrich), 0,1% azul de bromofenol (Sigma-Aldrich), 16% β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), 312,5 mM Tris-HCl, pH 6,8) y se calentaron a 96°C durante 5 min. Mediante dicho proceso se logra la desnaturización completa de las proteínas. Para su separación por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida, se utilizó el sistema MiniProtean II (Bio-Rad) y un tampón compuesto por 27 mM glicina, 0,1% SDS, 50 mM tris-HCl. Como marcador de pesos moleculares se utilizó el marcador SM0441 (Fermentas, MD). La electroforesis se realizó a 100 voltios (V) hasta que las muestras entraron en el gel separador, momento en que se pasó a 150 V durante aproximadamente 70-80 min.

### **3.6.4 Transferencia Mediante *Western Blot***

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon™-P Transfer Membrane, Millipore), previamente activada con metanol (2 min), durante 1 h a 60 V en un aparato MiniProtean II (Bio-Rad) y con un tampón de transferencia compuesto por 20% metanol, 20 mM tris y 150 mM glicina. Tras la transferencia, la membrana se lavó con TBS (tris HCl 0,1 M pH 8, NaCl 150 mM (Sigma-Aldrich) y se incubó en la solución de bloqueo (TBS BLOT-QuickBlocker (Chemicon) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación suave en un agitador Stuart SSM1. A continuación, se incubó la membrana

toda la noche a 4°C en agitación suave con el anticuerpo primario correspondiente. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 min en agitación con TBS y la membrana se incubó con un anticuerpo secundario unido a HRP durante 1 h a temperatura ambiente en agitación suave. Luego se realizaron 3 lavados de 10 min en agitación con TBS y se reveló la membrana. En la tabla 3.1 se detallan los anticuerpos primarios y secundarios utilizados:

**Tabla 3.1 Listado de anticuerpos primarios utilizados para WB**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Especie</b>	<b>Casa Comercial</b>
anti-CD63	1/500	Conejo	Santa Cruz
anti-CD9	1/500	Conejo	Santa Cruz
anti-CD81	1/500	Conejo	Santa Cruz
anti-TSG101	1/500	Conejo	Santa Cruz
anti-Alix	1/500	Conejo	Santa Cruz
anti-GAPDH	1/500	Ratón	Santa Cruz
anti- $\alpha$ -Tubulina	1/500	Ratón	Sigma Aldrich
anti-Flotilina1	1/500	Conejo	Cell signaling
anti-Calnexina	1/500	Conejo	Cell signaling
anti-Jagged1	1/500	Conejo	Cell signaling
anti-Jagged2	1/500	Conejo	Cell signaling
anti-Dll1	1/500	Conejo	Cell signaling
anti-Dll3	1/500	Conejo	Cell signaling
anti-Dll4	1/500	Conejo	Cell signaling
anti-NICD	1/500	Conejo	Cell signaling
anti-Notch-R1	1/500	Ratón	Santa Cruz
anti-HIF-1 $\alpha$	1/500	Ratón	BD
anti-ratón IgG HRP	1/20000	Cabra	Promega
anti-conejo IgG HRP	1/10000	Cabra	Santa Cruz

La detección de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia empleando el kit ECL- plus (Amersham). Las membranas se cubrieron con papel transparente y se procedió a su revelado mediante películas CURIX RP2 PLUS (Agfa) o en el instrumento detector de quimioluminiscencia Amersham Imager 600 (Life Technologies).

## 3.7 Técnicas Moleculares

### 3.7.1 Extracción y Cuantificación de RNA

Para realizar la extracción del RNA de las células eucariotas en cultivo, las placas se colocaron en hielo, se realizaron dos lavados con PBS frío y a continuación se usó el kit RNAsyPlus Mini Kit (Qiagen). El proceso, de forma breve, consistió en lisar las células con el tampón de lisis celular y tisular RLT (suplementado con  $\beta$ -mercaptoetanol (10  $\mu$ L/mL)) para la posterior purificación por columna del RNA.

La determinación de la concentración de RNA de las muestras se realizó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Se depositó 1  $\mu$ L de muestra en el NanoDrop ND-1000 y a partir de su espectro se calculó la concentración total de RNA de las muestras. Las calidades de las mismas se corroboraron en función de los ratios de absorbancia 260/280 nm (un valor de 2,0 se considera que los contaminantes del tipo ácidos nucleicos o de espectro de absorción similar son despreciables) y 230/260 nm (un rango entre 2,0-2,2 indica una ínfima contaminación por proteínas u otras moléculas de espectro de absorbancia similar).

### 3.7.2 Transcripción Reversa y PCR en Tiempo Real

El estudio de la expresión génica a partir del RNA total de las células se realizó mediante PCR en tiempo real (qPCR). Para ello, en primer lugar, se hace una transcripción reversa (RT) por una retrotranscriptasa del RNA convirtiéndolo en DNA complementario (cDNA). A continuación, el cDNA sintetizado se empleó como molde en una reacción de PCR.

#### 3.7.2.1 Transcripción Reversa: Síntesis de cDNA

La transcripción reversa tal y como su nombre indica implica el proceso inverso a la transcripción del DNA a RNA. De este modo, desde una muestra de RNA que actúa como molde se obtiene un DNA complementario a ese RNA. Para la síntesis de cDNA a partir del RNA de las muestras se utilizó el kit de transcripción reversa de gran capacidad

(Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones del proveedor. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf con los ciclos de temperatura que se describen en la tabla 3.2 partiendo de 1 µg de RNA como molde de la reacción junto el resto de componentes necesarios proporcionados por el kit (hexámeros de secuencia aleatoria, dNTPs, Buffer de reacción, retrotranscriptasa y agua). El cDNA sintetizado se guardó a -20 °C hasta la realización de la qPCR.

**Tabla 3.2 Programa empleado para la retrotranscripción del RNA a cDNA.**

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	25 °C	10 min
2	2	37 °C	60 min
3	1	85 °C	5 min
4	-	4 °C	∞

### 3.7.2.2 Cuantificación Relativa de la Expresión Génica por PCR

#### Cuantitativa en Tiempo Real

Los cebadores para realizar la qPCR se adquirieron del servicio KiCqStart™ Primers (Sigma Aldrich). Este servicio vende cebadores prediseñados ya testados, que pueden usarse para estudiar la expresión de los genes de interés. Se adquirieron los pares de cebadores para cuantificar los genes humanos *HES1*, *HEY1*, *HEY2*, *JAGGED1*, *C-MYC*, *E-CADHERINA*, *N-CADHERINA*, *VIMENTINA*, *OCLUDINA-1*,  $\beta$ -*CATENINA*, *HIF-1 $\alpha$* , *ACTINA-B*. Este último se utilizó como control interno o *housekeeping*.

La amplificación del cDNA de cada gen de interés se realizó utilizando el par de cebadores correspondiente junto con SYBR green master mix y Taq (Light Cycler 480 SYBR Green 1 Master Roche) en el termociclador Light Cycler 480 (Roche). El SYBR green master mix y Taq contiene la DNA-polimerasa (PCR) que permite, con ayuda de los cebadores, la amplificación específica del gen de interés para su cuantificación. Cada reacción de PCR contenía 3 µL de cDNA sintetizado en el paso anterior, 1µL Taq DNA polimerasa NETZYME (1 U/µL, NEED), 2,5 µL tampón de la polimerasa 10x, 1µL MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2,5 µL dNTPs 2mM, 0,5 µL cebador en dirección 3'→5' 6 µM, 0,5 µL cebador en dirección 5'→3' 6 µM y la cantidad suficiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mili-Q para un volumen final de

15 µL. Una vez preparada la reacción, las muestras se introdujeron en el termociclador siguiendo las condiciones de amplificación mostradas en la tabla 3.3.

Tabla 3.3 Programa empleado para la amplificación en la reacción de qPCR.

Paso	Temperatura	Duración	Nº Ciclos
Pre-Incubación	95 °C	10 min	
Amplificación	95 °C	15 s	45
	58 °C	10 s	
	72 °C	20 s	
Curva de Melting	94 °C	5 s	1
	60 °C	15 s	
	97 °C	Continuo	
Enfriamiento	4 °C	10 s	

### 3.7.2.3 Análisis de los Resultados de qPCR

Los resultados se analizaron haciendo uso del software Light Cycler 480 SW 1,5 (Roche), se normalizaron frente a los genes *housekeeping* (*ACTINA-B*) y se expresaron como incremento del número de veces que la expresión aumentaba o disminuía respecto a los valores del tratamiento control. Las muestras se analizaron por triplicado.

### 3.7.3 Identificación y Análisis de miRNAs de Exosomas

#### Procedentes de MSC y HIF-MSC

Se realizó la identificación y comparación de los niveles de expresión de los miRNA de exosomas procedentes de medio de cultivo de MSC y HIF-MSC cultivadas según las condiciones descritas en la sección 3.2.1.1. Para ello, se utilizó el kit Human Complete SeraMir Exosome RNA Amplification and Profiling kit for Media and Urine (SystemBioscience) según las indicaciones del fabricante. Este kit permite analizar de forma comparativa, mediante la reacción de PCR cuantitativa, los niveles de miRNAs contenidos en los exosomas procedentes de medio de cultivo.

### 3.7.3.1 Aislamiento de miRNAs Exosomales

Para extraer los miRNAs de los exosomas procedentes del medio de cultivo de MSC y HIF-MSC se procedió del siguiente modo: en primer lugar, se obtuvo el sedimento de exosomas a partir del medio de cultivo como se describe en la sección 3.5.2. Después, ese sedimento se resuspendió en tampón de lisis y se agregaron 5 µL de SeraMir control RNA *spike-in*. Hecho esto, se procedió a seguir las instrucciones que provee el kit para la purificación por columnas de los miRNAs exosomales. Una vez obtenidos los miRNAs, se cuantificaron utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

### 3.7.3.2 Síntesis del cDNA a partir de los miRNAs Exosomales, qPCR y Análisis

La síntesis del cDNA y las qPCRs se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. En la Figura 3.4 se puede ver un esquema del proceso de amplificación de los miRNAs.

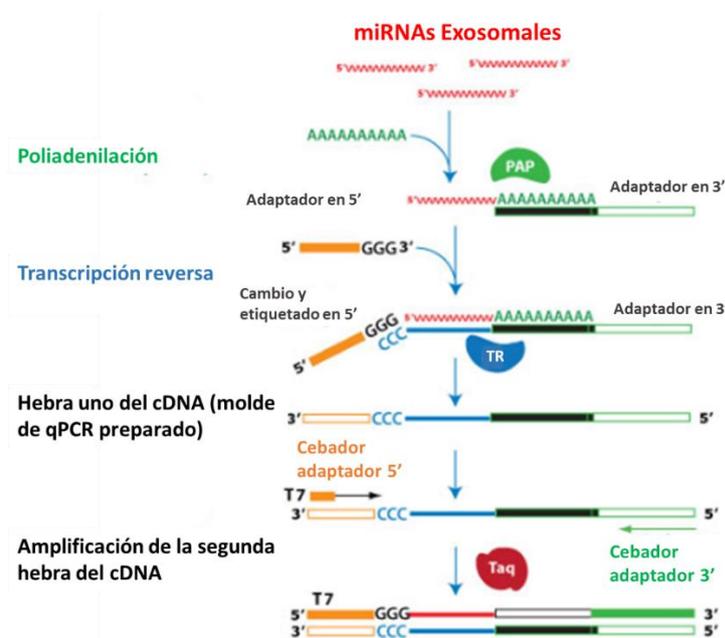


Figura 3.4 Síntesis de cDNA para la detección por qPCR de miRNAs exosomales. Adaptado de [www.SystemBio.com](http://www.SystemBio.com).

Después de ser obtenidos los miRNAs con las columnas de purificación que provee el kit, se agregó una cola de poli adeninas mediante la enzima poli-A polimerasa. Esta cola poli-A sirve de anclaje para unir un adaptador poli-T. Seguidamente, se utilizó la transcriptasa reversa para realizar la síntesis del cDNA. El resultado es un cDNA que contiene por un lado en su extremo 5' una secuencia poli-T que en la reacción de qPCR será reconocido por un primer universal y, por otro lado, su extremo 3' será reconocido por un cebador en dirección 3'->5' específico para el miRNA que se desee detectar. El kit contiene 380 cebadores para amplificar y reconocer 380 miRNAs diferentes. También contiene los controles internos SeraMir control RNA *spike-in* para poder comparar los diferentes experimentos. Los SeraMir control RNA *spike-in* son secuencias de ribonucleótidos que imitan la presencia de miRNAs y dado que se agregan a una concentración conocida sirven para cuantificar comparativamente el resto de miRNAs. Los controles que se amplifican por separado deben tener un ciclo umbral (Ct; *cycle threshold*) entre el ciclo 15 y 20 de la reacción de qPCR.

Para las amplificaciones de qPCR se utilizaron placas de 384 pocillos (Roche, LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, White; High-performance reaction device tailor-made for the LightCycler® 480 Instruments, 384-well versión), empleando Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), un fluorocromo que al unirse al DNA de doble cadena emite luz verde ( $\lambda_{\max}$ : 522 nm) al ser excitado con luz azul ( $\lambda_{\max}$ : 488 nm). Esta señal es detectada por el termociclador de la qPCR (LightCycler® 480, Roche).

Para el análisis de los miRNAs humanos se utilizó el software Free Analysis Software for Human 384 SeraMir qPCR Profiler array (.xls), ambos programas de la empresa System Bioscience. Se consideraron como significativos, valores de inducción o de represión de los microRNAs superiores a 3 veces entre las diferentes condiciones (miRNAs derivados de MSC o HIF-MSC).

De la reacción de qPCR se obtiene el valor de Ct y el programa analiza de forma comparativa los niveles de miRNA procedentes de dos muestras diferentes al normalizar cada una de las 380 comparaciones de Ct con el valor promedio de Ct obtenido de los controles.

### 3.8 Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica es una técnica para la localización de moléculas en las células o en los tejidos mediante el empleo de anticuerpos.

Las células se sembraban sobre discos de vidrio de 25 mm (Thermo Scientific, Menzel Gläser) o sobre placas de 12 pocillos especiales para inmunocitoquímicas (12 well silicone chamber for cell culture and immunofluorescence staining; Ibidi). Una vez terminados los tratamientos experimentales, las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con PFA al 2% durante 10 min a temperatura ambiente y se lavaron de nuevo 3 veces con PBS. Las células se conservaron en PBS con azida sódica (Panreac) al 0,05% y 4 °C si no se iba a continuar con la técnica el mismo día. A continuación, las muestras se bloquearon con PBS, 2% de suero de cabra (GS, Gibco) y 0,1% de Triton X-100 durante 1 h a 37 °C. Después, se incubaron con el/los anticuerpos primarios correspondientes 18 h a 4 °C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS y se incubaron con el/los anticuerpos secundarios correspondientes en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación con el/los anticuerpos secundarios, se realizaron 4 lavados de 5 min con PBS, se agregaron 20 µL del medio de montaje con DAPI (4',6- diamidino-2-fenilindol, es una molécula fluorescente que se une a regiones del DNA enriquecidas en adenina y timina y se utiliza para marcar el núcleo de células fijadas (ProLong Gold antifade with DAPI, Molecular Probes-Invitrogen)). Finalmente, se colocaron los discos de vidrio sobre un portaobjetos o se retiraron las celdillas de silicona de las placas Ibidi, convirtiéndolas en un portaobjetos, se cubrieron con un cubre-objetos (Menzel-Glaser, Afora) y se sellaron con laca de uñas. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se resumen en la tabla 3.4.

**Tabla 3.4 Anticuerpos empleados en las inmunofluorescencias.**

Anticuerpo	Dilución	Especie	Casa Comercial
Anti-E-Cadherina	1/50	Ratón	Agilent
Anti-N-Cadherina	1/100	Ratón	BD Biosciences
Anti-C-Myc	1/200	Ratón	Sigma Aldrich
Anti-CD63-488	1/100	Ratón	Thermo Fisher Scientific
Anti-NICD	1/200	Conejo	Abcam
Anti-CD31	1/100	Ratón	Pharmigen
Alexa Fluor 488	1/500	Cabra	Life Technologies
Alexa-Fluor 555	1/500	Cabra	Life Technologies

## 3.9 Técnicas de Imagen

### 3.9.1 Microscopía Óptica de Fluorescencia

Una vez realizada las Inmunocitoquímicas de fluorescencia, las preparaciones se observaron y fotografiaron en el microscopio óptico DM6000 de Leica, equipado con la cámara en blanco y negro Leica DFC350 y se analizaron con el software Leica Application Suite Version 2.4.0 R1. Las adquisiciones de las diferentes longitudes de onda se hicieron de forma secuencial con distintos filtros de barrera (adecuados para cada uno de los fluorocromos) y posteriormente se combinaron en una única imagen superpuesta en color.

### 3.9.2 Microscopía Confocal

La microscopía confocal es un tipo de técnica de microscopía que a diferencia de la microscopía de campo amplio hace uso de un colimador de orificio limitante o *pinhole* que aumenta el contraste y la definición de las imágenes. El colimador se encarga de evitar que los fotones que provienen de diferentes planos focales de la muestra lleguen al fotomultiplicador y que de este modo no sean detectados. Esto permite realizar fotos secuenciales a diferentes planos y crear una composición de imagen 3D sin efectos de solapamiento de señales. Las preparaciones se analizaron con el microscopio confocal Leica TCS SP8 Hyvolution II. Se hicieron incidir sobre las muestras láseres con diferentes longitudes de onda de excitación y emisión para captar las fluorescencias correspondientes a los diferentes fluorocromos. El análisis se realizó con ayuda del servicio de microscopía confocal del Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia.

### 3.9.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

La microscopía electrónica de transmisión es una técnica que hace incidir un haz de electrones sobre la muestra obteniéndose la imagen de la combinación de los electrones que son capaces o no de atravesarla. Esos electrones que atraviesan la muestra son

detectados por una pantalla de fósforo generando una imagen que puede ser visualizada de forma directa por el operador. Esta técnica es una de las técnicas de referencia para estudiar la presencia y las características morfológicas de los exosomas al finalizar su proceso de aislamiento. Para visualizar los exosomas con un microscopio electrónico de transmisión (MET) es necesario que primero sean adsorbidos y contrastados en rejillas de microscopía electrónica. La adsorción y el contrastado de los exosomas a las rejillas se realizó en todos los pasos colocando, con ayuda de unas pinzas de microscopía electrónica, las rejillas sobre gotas de diferente composición química que se formaban depositando un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de las diferentes soluciones sobre Parafilm<sup>®</sup> (Sigma Aldrich). Las muestras de microscopía electrónica se analizaron en el servicio de microscopía electrónica del Centro de Investigación Príncipe Felipe con un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G2 Spirit (FEI Europe) equipado con una cámara fotográfica (Olympus Soft Image Solutions GmbH).

### **3.9.3.1 Adsorción y Fijación de los Exosomas en Rejillas para**

#### **MET**

Para tal fin, 10  $\mu\text{L}$  de la fracción exosomal obtenida a partir de 240 mL de medio de cultivo (resuspendida en PBS) se depositaron en forma de gota en parafilm y se colocó sobre ella una rejilla de carbono Formwar durante 20 min. En estos 20 min, los exosomas se pegan a la rejilla mediante atracciones electrostáticas. Transcurridos los 20 min de adsorción, los exosomas se fijaron 10 min en PBS-PFA al 2% (PFA para microscopía electrónica de transmisión; Aurion) y se realizaron 2 lavados de 2 min en PBS. Después, se realizó otra fijación de 5 min con PBS-glutaraldehído al 1 % (glutaraldehído para microscopía electrónica de transmisión; Aurion). Posteriormente, se hicieron 8 lavados de 2 min con agua destilada y se procedió al contraste de los exosomas.

### **3.9.3.2 Contrastado e Inclusión de los Exosomas**

Como se ha explicado con anterioridad, la imagen en un microscopio electrónico de transmisión se genera a partir de los electrones que atraviesan la muestra. Para poder ver estructuras bajo un haz de electrones es necesario que parte de los electrones sean

desviados por la muestra. Esto se logra mediante la unión de compuestos capaces de desviar los electrones (compuestos electrodensos) a las ultraestructuras celulares, un proceso conocido como contrastado. El contrastado de los exosomas se hizo utilizando acetato de uranilo que precipita en presencia de proteínas, moléculas en las que se encuentran enriquecidas las membranas biológicas como lo son las membranas exosomales. Para el contrastado de los exosomas se realizó una primera incubación de 5 min en acetato de uranilo al 1 % en PBS y una segunda de 10 min a 4°C sobre metil-celulosa al 1% con acetato de uranilo al 1%. La metil-celulosa mejora la estabilidad de las membranas logrando una mayor preservación de las ultraestructuras. Tras un secado de las rejillas a temperatura ambiente de 30 min, las rejillas se observaron en el microscopio electrónico.

### **3.9.3.3 Inmunomarcaje con Oro de los Exosomas**

El inmunomarcaje con oro permite el estudio de marcadores exosomales o proteínas presentes en exosomas mediante visualización directa en un MET gracias al reconocimiento específico de anticuerpos conjugados a moléculas de oro. Para realizar el inmunomarcaje con oro, el precipitado obtenido por ultracentrifugación se resuspendió en 200 µL de una solución de PBS, se adsorbió a rejillas de carbono formwar y se fijaron con una solución de PBS-PFA al 2% tal y como se describe en la sección 3.9.3.1. Una vez fijados con PFA, se hicieron 2 lavados de 3 min con PBS, 4 lavados de 3 min con una solución de PBS con glicina (Sigma Aldrich) a 50 mM que permite bloquear los grupos aldehído que hayan podido quedar libres tras la fijación con PFA. Después, las rejillas se bloquearon durante 10 min en solución de bloqueo (PBS al 1% de gelatina de piel de pescado (CFG; Aurion)) y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes disueltos en solución de bloqueo durante 1 h. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-CD63, anti-TSG101 y anti-NICD (todos de Abcam). Transcurrida la hora, se hicieron 6 lavados de 3 min con PBS y se incubaron 30 min con proteína-A conjugada a oro (que tiene afinidad por las inmunoglobulinas) en solución de bloqueo. Posteriormente, se realizaron 8 lavados de 2 min en PBS, se fijaron de nuevo durante 5 min en PBS-glutaraldehído al 1% y se realizaron 8 lavados más de 2 min en

agua destilada. Finalmente, se contrastaron y se observaron con el MET tal y como se describe en la sección 3.9.3.2.

## **3.9.4 Co-Cultivos: Análisis de la Transferencia de Exosomas**

Tal y como se describió en la sección 3.4, para el estudio de la transferencia de exosomas entre MSC o HIF-MSC y las células endoteliales humanas se realizaron co-cultivos de MSC-CD63-RFP o HIF-MSC-CD63-RFP con HUVEC y se midió y cuantificó por análisis de microscopía confocal.

### **3.9.4.1 Microscopia Confocal *Time-Lapse***

El *time lapse* o cámara rápida es una técnica usada en cinematografía que habitualmente es usada para observar sucesos que ocurren por lo general a velocidades muy lentas como pueden ser los movimientos de células en cultivo o en nuestro caso, la transferencia de exosomas. La técnica se basa en la fotografía y consiste en tomar fotos espaciadas en el tiempo del mismo campo visual para después hacerlos transcurrir muy rápidamente.

Para observar si las MSC-CD63-RFP o las HIF-MSC-CD63-RFP en co-cultivo con células endoteliales humanas eran capaces de transferirles exosomas, se hizo uso de la técnica conocida como FRAP (recuperación de la fluorescencia después de un fotoblanqueo). Pasadas 24 h de co-cultivo, los discos se colocaron en cámaras Attofluor cell chamber (Invitrogen), se montaron en el microscopio confocal y de todas las células endoteliales humanas que mostraban fluorescencia roja en su interior (procedente de las MSC-CD63-RFP o las HIF-MSC-CD63-RFP ya que por sí mismas no tenían fluorescencia) se seleccionó una y se le eliminó la fluorescencia acumulada con un láser de 460-480 nm. Hecho esto, se tomaron fotos bidimensionales en pseudo-color (255 niveles de color) de la célula HUVEC fotoblanqueada cada 30 min durante 3 h. El tamaño de pixel fue de 1024 x 1024 y el diámetro del colimador Airy 1. La fluorescencia roja que fuese apareciendo en la célula HUVEC fotoblanqueada procedería de la transferencia de exosomas de MSC-CD63

o HIF-MSC-CD63-RFP en función del co-cultivo en cuestión. Los *time lapse* fueron adquiridos con un microscopio confocal de láser invertido Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems) usando el objetivo 40X Plan-Apochromat-Lambda Blue 1.4 N.A. Las longitudes de onda de excitación utilizadas fueron: 561 nm (láser DPSS) para la detección de las construcciones con RFP (CD63-RFP) y 488 nm (láser argón) para la detección de las construcciones con GFP (pWPI-GFP o pWPI-HIF-GFP). Durante las observaciones los co-cultivos se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.9.4.1.1 Cuantificación de la Transferencia de Exosomas**

Para la cuantificación de la transferencia de exosomas entre las MSC-CD63-RFP o las HIF- MSC-CD63-RFP y las células endoteliales se cuantificó la recuperación de la fluorescencia de la célula endotelial fotoblanqueada tras 3 h de co-cultivo respecto a la fluorescencia inicial de la misma célula antes de ser fotoblanqueada. Para ello, se midió la intensidad de fluorescencia de las regiones de interés (ROI) del interior de la célula fotoblanqueada tanto antes como a distintos tiempos después del fotoblanqueo con el software ImageJ (NIH).

#### **3.9.5 Cuantificación de la Colocalización de NICD y CD63 en Cultivos de MDA-MB-231 y MCF-7**

Para estudiar la colocalización del dominio intracelular de Notch 1 y CD63 en MDA-MB-231 y MCF-7 se sembraron en placas de 12 pocillos (Ibidi) y se dejaron crecer hasta un 50 % de confluencia, después se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con PFA al 2% y se realizó una inmunocitoquímica de fluorescencia doble para NICD (anticuerpo secundario Alexa 565) y CD63 (anticuerpo primario conjugado a Alexa488). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las adquisiciones se realizaron de forma secuencial en un microscopio confocal Leica TCS SP8 Hyvolution II usando el objetivo de inmersión 63X Plan-Apochromat-Lambda Blue 1.4 N.A. La cuantificación se realizó montando las imágenes en verde y rojo del mismo campo visual y contando el número de gránulos

que se marcaban tanto en rojo como en verde (dando un color amarillo) en cada célula. Para esta cuantificación se usó el software ImageJ (NIH).

## 3.10 Cuantificación de la Síntesis y Secreción de Exosomas

### 3.10.1 *Western Blot*

Los exosomas se encuentran enriquecidos en las tetraspaninas CD81, CD9 y CD63. Una de las formas para estudiar de forma comparativa la secreción de exosomas entre MSC y HIF-MSC fue analizando por *Western Blot* la expresión de estas tetraspaninas en sus exosomas<sup>22,268</sup>. Para la cuantificación, se sembraron la misma cantidad de células tanto de MSC como de HIF-MSC y se aislaron sus exosomas a partir de la misma cantidad de medio de recolección (200 mL).

### 3.10.2 Actividad Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa (ACE) es la principal enzima con actividad colinesterasa del cuerpo humano. Es una enzima que cataliza la ruptura de la acetilcolina y de algunos otros ésteres de la colina que funcionan como neurotransmisores. La ACE se encuentra principalmente en las sinapsis químicas y su actividad sirve para finalizar la transmisión sináptica. Sin embargo, está descrito que esta enzima se encuentra también en los exosomas de varios tipos celulares<sup>268</sup>. Por lo tanto, puede utilizarse la actividad acetilcolinesterasa de las fracciones exosomales para cuantificar de modo comparativo la secreción de exosomas. Una mayor actividad de acetilcolinesterasa se correlacionaría con una mayor cantidad de exosomas en la fracción exosomal purificada.

De este modo, para estudiar el efecto de la expresión de HIF-1 $\alpha$  en la secreción de exosomas en MSC, se analizó la actividad acetilcolinesterasa en sus exosomas. Para ello, se sembraron el mismo número de MSC y HIF-MSC, se incubaron 48 h en medio de

recolección y se aislaron sus exosomas partiendo del mismo volumen de medio de cultivo (240 mL). El sedimento de exosomas se resuspendió en 50  $\mu$ L de PBS, de los cuales, 30  $\mu$ L se depositaron en un pocillo de una placa de 96 pocillos (Sarstedt). Entonces, se agregó a cada pocillo acetiltiocolina a 1,25 mM y 5,5'-di-tio-bis (2-nitrobenzoic acid) a 0,1mM (ambos reactivos de Sigma Aldrich) en un volumen final de 300  $\mu$ L y se monitorizó el cambio de absorbancia a 412 nm cada 5 min en un espectrofotómetro Wallac Victor<sup>2</sup>V 1420 Multilabel (Perkin Elmer). Los resultados se representan como actividad de la ACE tras 30 min de reacción a 37 °C.

## **3.11 Ensayos Funcionales *In vitro* con Exosomas**

### **3.11.1 Internalización de Exosomas**

La internalización de exosomas procedentes de MSC o de HIF-MSC y de MDA-MB-213 o de MCF-7 se estudió por separado en dos tipos celulares. Por un lado, en células endoteliales humanas y, por otro lado, en la línea tumoral no metastática de cáncer de mama MCF-7. Para ello se usaron 2 aproximaciones diferentes. Para la internalización de exosomas procedentes de MSC o de HIF-MSC en HUVEC se agregó medio de recolección filtrado e incubado 48 h con las células MSC-CD63-RFP o HIF-MSC-CD63-RFP a células endoteliales. Para la internalización de exosomas provenientes de MDA-MB-231 o de MCF-7 en MCF-7 se aislaron sus exosomas, se tiñeron sus proteínas de rojo con Exo-Glow<sup>TM</sup>-Protein EV Labeling Kit (System Biosciences) y se agregaron a cultivos de MCF-7.

#### **3.11.1.1 Internalización en HUVEC**

Para demostrar la internalización de exosomas procedentes de MSC o de HIF-MSC en HUVEC se recogió el medio de recolección previamente incubado con MSC-CD63-RFP o de HIF-MSC-CD63-RFP, se filtró por 0,22  $\mu$ m y se agregó a células endoteliales en cultivo. Para ello, las células endoteliales habían sido previamente sembradas sobre discos de vidrio de 25 mm de diámetro. Una vez se agregó el medio de recolección a las células

endoteliales, el disco de vidrio con las células se colocó en cámaras Attofluor cell chamber (Invitrogen) y se observaron en el microscopio confocal. En el confocal se mantuvieron 30 min a 37 °C y con una mezcla humidificada de 95 % de aire y 5 % de CO<sub>2</sub>. Transcurridos los 30 min, se sacaron fotos de luz transmitida y con el láser de excitación de 561 nm (DPSS) para la detección de la fluorescencia roja (CD63-RFP) en las HUVEC procedentes de MSC-CD63 o de HIF-MS-C-CD63-RFP. Las observaciones se realizaron en el microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems).

### **3.11.1.2 Internalización en MCF-7**

Para evidenciar si células MCF-7 en cultivo eran capaces de internalizar exosomas procedentes de MDA-MB-231 o de MCF-7, éstas se sembraron en placas de 12 pocillos de la marca Ibidi (12 Well Chamber, removable; Ibidi) y se dejaron crecer hasta el 50 % de confluencia. Por otro lado, se aislaron exosomas del medio de recolección incubado durante 48 h con las células MDA-MB-231 o MCF-7. Estos exosomas, se tiñeron con Exo-Glow™-Protein EV Labeling Kit (System Biosciences) y se agregaron 30 µg/mL a los cultivos de MCF-7. Las células con los exosomas se incubaron 30 min a 37 °C. Pasados los 30 min, las células se lavaron 3 veces con PBS, se fijaron con PFA al 2%, se agregaron 20 µL del medio de montaje con DAPI (ProLong Gold antifade with DAPI, Molecular Probes-Invitrogen) y se montaron colocando un cubreobjetos por encima. Las preparaciones se sellaron con laca de uñas y se observaron al microscopio confocal.

#### **3.11.1.2.1 Tinción de Exosomas con Exo-Glow™-Protein EV Labeling Kit**

La tinción de los exosomas aislados a partir de medio de recolección incubado con MDA-231-MB o MCF-7 se realizó antes del último paso de ultracentrifugación durante el protocolo de purificación de exosomas por ultracentrifugación descrito en la sección 3.5.2. El sedimento con los exosomas se resuspendió en PBS y se incubó 20 min en agitación a 37 °C con la solución de tinción Exo-Glow™-Protein EV Labeling Kit 500X (System Biosciences). Transcurridos los 20 min, se lavaron con PBS y se hizo el último paso de ultracentrifugación del protocolo de aislamiento por ultracentrifugación. El

sedimento final se resuspendió en 200  $\mu$ L de PBS, se cuantificó por BCA y se agregó a los cultivos como se describe en la sección 3.11.1.2.

### **3.11.3 Estudio de la Actividad de la Vía de Señalización de Notch**

La vía de señalización de Notch se activa en el momento que uno de los ligandos de la vía interacciona con uno de sus receptores. Cuando esto ocurre, el receptor cambia su conformación haciendo accesible un dominio de escisión situado en su parte intracelular. La enzima encargada de realizar la escisión por la región intracelular del receptor de Notch activado es la  $\gamma$ -secretasa. Esta escisión libera el dominio intracelular de Notch que termina translocándose al núcleo y activando genes diana de la vía<sup>64</sup>.

En los últimos años se ha demostrado que cambios en la vía de señalización de Notch pueden ser inducidos por componentes de Notch cargados en exosomas. En este trabajo, para estudiar si los exosomas eran capaces de inducir cambios en esta vía se estudió la expresión de genes diana de la vía mediante qPCR.

Como control positivo de la activación de la vía de Notch las células se sembraron en placas previamente recubiertas con el ligando de la vía de Notch Jagged1 y como control negativo las células se trataron con el agente quimioterapéutico conocido con el nombre RO4929097 (RO).

#### **3.11.3.1 Activación/Inhibición de la Vía de Notch**

En los experimentos de este trabajo para la activación de la vía se realizó un recubrimiento de los pocillos con el ligando de la vía Jagged1 dónde a posteriori se sembraban las células. El recubrimiento de los pocillos se realizó del siguiente modo:

- Primero, los pocillos se incubaron 30 min a 37 °C con una solución de inmunoglobulina que reconoce la fracción constante de anticuerpos humanos

(IgG-Fc humana; de Jackson ImmunoResearch Laboratories) a una concentración de 6,48 µg/mL.

- Transcurridos los 30 min, se realizó 1 lavado con PBS y se bloqueó con DMEM-bajo en glucosa al 10 % en FBS y 1 % en P/S durante 1 h a 37 °C.
- Posteriormente, los pocillos se lavaron 1 vez con PBS y se recubrieron durante 2 h a 37 °C con una solución que contenía una quimera del ligando de la vía de Notch Jagged1 con la región constante de las inmunoglobulinas humanas (Jag1-Fc). Esta quimera es reconocida por la IgG-Fc agregada en el primer paso, permitiendo que el ligando quede adherido y recubriendo el pocillo.

A continuación, las células se sembraron en los pocillos recubiertos con Jagged1 a una confluencia del 70 %. Para la activación de la vía se incubaron en estos pocillos durante 24 h. Posteriormente, las células se lavaron con PBS, se extrajo el RNA total y se analizaron los genes de la vía de Notch mediante qPCR.

Para la inhibición de la vía de Notch se realizó un tratamiento con el agente quimioterápico RO de Xcess Bioscience a una concentración de 10 µM durante 48 h. RO inhibe de manera específica la enzima  $\gamma$ -secretasa impidiendo así la escisión del receptor de Notch activado y la liberación de NICD. Pasadas las 48 h, las células se lavaron 2 veces con PBS, se extrajo el RNA total y se analizó la expresión de los genes diana de la vía mediante qPCR.

### **3.11.3.2 Análisis de la Vía de Notch en HUVEC**

Para analizar los cambios en la actividad de la vía en células de endotelio humano se dejaron crecer hasta llegar a una confluencia del 70 % en placas de 6 pocillos. Una vez alcanzada la confluencia deseada se les retiró el medio completo (EGM-2) con factores de crecimiento y se sustituyó por un medio basal (EBM-2) sin factores de crecimiento y suplementado con 1 % de BSA (Sigma Aldrich), mix de vitaminas (Lonza), aminoácidos no esenciales (Gibco) y penicilina/estreptomicina (Gibco). Las células se mantuvieron 4 h en este medio y después se trataron durante 2 h con 30 µg/mL de exosomas de MSC

o HIF-MSC. Después de 2 h de tratamiento las HUVEC se lavaron 2 veces con PBS, se les extrajo el RNA total y se estudió la expresión de genes diana de la vía de Notch por qPCR.

### **3.11.3.2.1 Inhibición del Ligando Jagged1 en Exosomas de MSC y HIF-MSC**

La posibilidad de inhibir la actividad de ligandos de la vía de Notch mediante anticuerpos neutralizadores ha sido descrita previamente<sup>269–271</sup>. Para inhibir el ligando de la vía de Notch contenido en exosomas procedentes de MSC y de HIF-MSC se realizó una incubación de 1 h en agitación a 37 °C con 6 µg/mL del anticuerpo neutralizador anti-Jagged1 (ab10580; Abcam, Cambridge, UK) antes del último paso de ultracentrifugación del protocolo de aislamiento de exosomas descrito en la sección 3.5.2. La unión de este anticuerpo al ligando Jagged1 bloquea la interacción entre el ligando y el receptor de Notch. Tras un lavado final con PBS, los exosomas se ultracentrifugaron y el sedimento se resuspendió en 100 µL de PBS. Estos exosomas se cuantificaron y agregaron a los cultivos de HUVEC tal y como se describe en la sección 3.11.3.1 para estudiar la influencia del ligando Jagged1 contenido en exosomas de MSC o HIF-MSC en la actividad de la vía de Notch inducida en HUVEC.

### **3.11.3.3 Análisis de la Vía de Notch en MCF-7**

Para estudiar si los exosomas, aislados de medio de recolección de las líneas MDA-MB-231 o MCF-7, eran capaces de inducir cambios en la vía de señalización de Notch en cultivos de la línea de células tumorales de cáncer de mama no metastático se realizó el siguiente experimento; las células MCF-7 se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 70 % en placas de 48 pocillos. Una vez alcanzada la confluencia deseada se sustituyó el medio de cultivo por DMEM-alto en glucosa suplementado con BSA al 1 % (Sigma Aldrich), aminoácidos no esenciales al 1 % (Gibco) y penicilina/estreptomina (Gibco). Pasadas 4 h de incubación en este medio, se agregaron al cultivo 30 µg/mL de exosomas aislados a partir de medio de cultivo de MDA-MB-231 o de MCF-7. Las células se incubaron 2 h con estos exosomas, se lavaron 2 veces con PBS y se extrajo el RNA total para el estudio la expresión de genes diana de la vía de Notch mediante qPCR.

Para evaluar la actividad del NICD contenido en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 el tratamiento aquí descrito se realizó también sobre células tratadas previamente durante 48 h con RO y por lo tanto sin la capacidad de generar NICD y activar la vía.

### **3.11.4 Ensayo de Formación de Tubos**

Uno de los experimentos más utilizados para estudiar el potencial angiogénico de diferentes compuestos es el ensayo de formación de tubos *in vitro*<sup>53,272,273</sup>. En este experimento se analizan las estructuras en forma de tubo y otros parámetros que son representativos de la capacidad angiogénica que muestran las células endoteliales en respuesta a diferentes tratamientos. Estas estructuras las forman dentro de una matriz porosa que se genera a partir de Matrigel (Growth Factor-reduced Matrigel; BD Biosciences). El Matrigel son un conjunto de proteínas extracelulares de naturaleza gelatinosa que tienen la particularidad de mantenerse en estado líquido a 4 °C y de gelificar formando una matriz porosa a 37 °C.

En este trabajo, se utilizó este ensayo para evaluar la contribución del ligando de la vía de Notch Jagged1 contenido en los exosomas procedentes de MSC y de HIF-MSC al potencial angiogénico mostrado por sus exosomas. Para ello, se sembraron 25.000 células endoteliales por pocillo en una placa de 96 pocillos que había sido recubierta previamente con 50 µL de Matrigel en cada pocillo donde se iban a sembrar células. Las células se sembraron con medio basal (EBM-2) suplementado con BSA al 0,5 %, aminoácidos no esenciales al 1 % y P/S al 1 %, y se trataron o no con 30 µg/mL de exosomas, incubados o no con el inhibidor de Jagged1, que se habían aislado por ultracentrifugación a partir de medio de recolección previamente incubado durante 48 h con MSC o HIF-MSC. Una vez agregados los diferentes tratamientos, las células endoteliales se incubaron 12 h y después se analizó la formación de estructuras en forma de tubos. Para evaluar las estructuras formadas por las células endoteliales humanas en el Matrigel se tomaron fotos con el objetivo 50X en un microscopio óptico (Leica). Estas fotografías se enviaron al servicio de análisis de imagen Wimasis para el análisis de los diferentes parámetros angiogénicos.

### **3.11.5 Estudios de Proliferación y de Ciclo Celular en MCF-7**

Para evaluar la influencia sobre la proliferación y el ciclo celular de los tratamientos con exosomas de MDA-MB-231 o de MCF-7 en MCF-7 y su relación con los cambios inducidos en la vía de señalización de Notch se realizaron ensayos de bromodesoxiuridina (BrdU) y de ciclo celular mediante citometría.

#### **3.11.5.1 Estudios de Proliferación con Bromo Desoxiuridina (BrdU)**

Para el ensayo de BrdU las células MCF-7 se sembraron sobre pocillos de placas de 96 pocillos a una densidad de 100.000 células/cm<sup>2</sup>. Al día siguiente, el medio de cultivo se sustituyó por DMEM-alto en glucosa sin factores de crecimiento y suplementado con BSA al 0,5 % y P/S al 1%. Las células se incubaron 5 h en este medio y posteriormente, se agregaron a los cultivos 30 µg/mL de exosomas procedentes de MDA-MB-231 o de MCF-7. Al mismo tiempo que se agregaron los exosomas, se agregó el BrdU que es un nucleósido análogo de la timidina que se incorpora en el DNA cuando el DNA de una célula en división se replica. En estas condiciones se incubaron 4 h. A continuación, se lavaron las células 2 veces con PBS y se fijaron con PFA al 2%. Acto seguido, se realizó una inmunofluorescencia para la detección de las células que hubiesen incorporado BrdU a su DNA (sección 3.8.2.3.1) debido a los procesos de división celular. Finalmente se sacaron fotos y se cuantificaron los núcleos que habían incorporado BrdU mediante el programa In Cell Analyzer 1000 Workstation software (GE Healthcare). Los resultados se representaron como el porcentaje de núcleos que habían incorporado BrdU respecto del total de los núcleos (núcleos marcados con DAPI).

### 3.11.5.2 Estudio del Ciclo Celular por Citometría de Flujo en Células MCF-7

Para analizar el ciclo celular en MCF-7 mediante citometría de flujo las células se incubaron con un tampón hipotónico (citrato trisódico pentahidratado a 2,8  $\mu$ M, RNasa a 10 mg/mL, Tritón X-100 1  $\mu$ L/1mL; todos de Sigma Aldrich) suplementado con Ioduro de propidio (IP; Sigma Aldrich). Por un lado, el tampón hipotónico hace que las células exploten por un cambio brusco de la presión osmótica quedando los núcleos intactos en suspensión. Por otro lado, el IP es un compuesto químico fluorescente cuando se intercala en el DNA y se suele emplear entre otras cosas para analizar el contenido en DNA de las células. Analizar el contenido en DNA de las células permite saber la fase de división en la que está predominantemente dicho cultivo celular. Debido a su sencillez, es un ensayo habitualmente empleado para estudiar el efecto de diversos tratamientos sobre la proliferación de diferentes cultivos de células.

Las condiciones experimentales para analizar el ciclo celular en MCF-7 fueron idénticas a las descritas para el ensayo de BrdU en la sección 3.11.5.1 con la diferencia de que en este experimento no se agregó BrdU 5 h después del ayuno en factores de crecimiento y que transcurridas las 4 h de tratamiento las células no fueron fijadas. En su lugar, transcurridas las 4 h después de agregar los tratamientos con exosomas las células se incubaron 30 min a 37 °C en el tampón hipotónico suplementado con IP. Pasados los 30 min, la solución con los núcleos se pasó a tubos de citometría para su análisis con el citómetro de flujo CytoFLEX S (Beckman Coulter). El IP ( $\lambda_{\text{excitación Máx}} = 535$ ) se excitó con el láser rojo y el análisis de los resultados se hizo con el software FlowJo\_V10.

### **3.11.6 Estudio del Proceso de Transición Epitelio-Mesénquima (EMT) y la Migración en Cultivos de MCF-7**

#### **3.11.6.1 Análisis Mediante qPCR e Inmunomarcaje de Marcadores de EMT**

La Transición Epitelio-Mesénquima (EMT) son un conjunto de procesos que culminan con la conversión de células con un fenotipo epitelial en uno mesenquimal o cuasi-mesenquimal. Existen un gran número de marcadores que ven alterada su expresión en el transcurso del proceso de EMT<sup>231</sup>. En este trabajo, se estudió el proceso de EMT mediante la subida o la bajada en la expresión de determinados marcadores mediante qPCR, análisis de la morfología celular e inmunofluorescencia. El experimento se desarrolló del mismo modo independientemente del destino final de las células.

Para realizar este ensayo las células MCF-7 se sembraron en pocillos de placas de 48 pocillos a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup>. Al día siguiente de ser sembradas, se les cambió el medio de cultivo por RM2 cuya composición fue descrita en la sección 3.5.1. Posteriormente, 30 µg/mL de exosomas aislados por ultracentrifugación a partir de RM2 previamente incubado 48 h con cultivos celulares de MDA-MB-231 o de MCF-7 se agregaron a los cultivos de MCF-7, tratadas o no con el inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa RO. Esto se repitió cada 24 h durante 7 días. El RM2 de los cultivos celulares se fue cambiando con cada dosis de exosomas (cada 24 h). Después de 1 semana de tratamientos, se tomaron fotos de las células con un microscopio óptico, se lavaron con PBS 2 veces, se fijaron con PFA al 2 % o se lisaron para la extracción del RNA total y se estudiaron los marcadores de EMT (E-Cadherin, N-Cadherin, Vimentina u Ocludina1 entre otros) por inmunofluorescencia o qPCR, respectivamente.

#### **3.11.6.2 Análisis de la Migración en MCF-7**

La metástasis tumoral implica el abandono del nicho del tumor primario de las células cancerosas para colonizar y formar tumores secundarios en otros órganos y/o tejidos del organismo. En este proceso se considera un factor importante la capacidad de las

células cancerosas de migrar e invadir nuevos ambientes. Si bien la capacidad invasiva y de migración son procesos diferentes, en ambos casos, se ha descrito la importancia de la activación del proceso de EMT<sup>226,231</sup>. De este modo, tras estudiar el proceso de EMT en los cultivos de MCF-7 bajo las diferentes condiciones experimentales se estudió la migración de estas células en las mismas condiciones. Para ello, 210.000 o 180.000 células de MCF-7 se sembraron en cada pocillo de placas de 48 pocillos o en insertos de *transwell* (Corning) con un tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Por un lado, las células sembradas en las placas de 48 pocillos, 24 h después de la siembra, formaban una monocapa en cada pocillo de la placa. En esta monocapa se realizó una raya de extremo a extremo del pocillo con la punta de una pipeta de 10  $\mu\text{L}$ . Una vez se realizó la raya se delimitaron unas coordenadas en cada pocillo y se fueron sacando fotografías a 100X aumentos cada 12 h de las células bajo las diferentes condiciones experimentales con una cámara fotográfica Canon acoplada a un microscopio óptico Leica. La migración se cuantificó en función del área de la raya a diferentes tiempos usando el software ImageJ. Por otro lado, las MCF-7 sembradas en la parte de arriba, 24 h después de la siembra se les cambio el medio del inserto por un DMEM-bajo en glucosa sin FBS suplementado con BSA al 0,5% y P/S al 1%. El medio de cultivo de la parte inferior en el que va sumergido el inserto se sustituyó por RM2 suplementado con IGF-1 (Sigma Aldrich) a 50 ng/mL para estimular la migración de las células. Pasadas 48 h, se lavaron los insertos, se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con metanol frío al 100% 10 min. Después, las células que no habían migrado (en la parte superior del inserto) se eliminaron con un hisopo. Una vez se retiraron las células incapaces de migrar, las células de la parte inferior del inserto se tiñeron con cristal violeta, se sacaron fotos a 200X en un microscopio óptico y se contó el número de células de cada inserto bajo las distintas condiciones experimentales.

### **3.12 Técnicas para el Estudio de la Angiogénesis *In vivo*: *Plug* de Matrigel**

Un ensayo frecuentemente utilizado para el estudio del proceso angiogénico inducido por compuestos de diferente naturaleza es el ensayo de *Plug* de Matrigel<sup>272,274,275</sup>. Este

ensayo consiste en la inyección subdérmica de una solución de Matrigel (growth factor-reduced Matrigel; BD Biosciences) en el animal que se vaya a experimentar. El Matrigel es el nombre comercial para una mezcla de proteínas gelatinosas secretadas por una línea de células de sarcoma de ratón (Engelbreth-Holm-Swarm) que tiene diversas aplicaciones, como el crecimiento de células madre pluripotentes inducidas o iPSC, ensayos de invasividad tumoral o el ensayo de *Plug* de Matrigel. Esta solución se presenta en estado líquido a 4 °C y al calentarse a 37 °C gelifica formando una matriz porosa con distintas aplicaciones. Por ello, una vez el Matrigel es inyectado de forma subdérmica en el ratón, su temperatura corporal permite que el Matrigel gelifique y forme una matriz porosa en forma de bola o *Plug* donde el endotelio es capaz de penetrar con mayor o menor eficiencia para la formación de nuevos vasos sanguíneos. De este modo, en este trabajo la solución de Matrigel se mezcló con exosomas derivados de MSC o HIF-MSC con el ligando Jagged1, bloqueado o no, para evaluar la contribución del ligando al potencial angiogénico de estos exosomas.

### **3.12.2 Grupos Experimentales**

Se utilizaron un total de 18 ratones nu/nu macho (Charles River Laboratories) en el estudio. Los 18 animales se dividieron en 6 grupos experimentales a los que se les inyectó una solución de Matrigel en estado líquido (a 4 °C) mezclado con los diferentes tratamientos.

Los 6 grupos experimentales objeto de estudio fueron los siguientes: grupo 1, se inyectó Matrigel mezclado con el vehículo PBS (control del experimento; Ctrl); grupo 2, el Matrigel inyectado se mezcló con el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF; control positivo del experimento); grupos 3 y 4, el Matrigel en este caso se mezcló con 30 µg/mL de exosomas aislados por ultracentrifugación a partir de medio de recolección previamente incubado con cultivos celulares de MSC o de HIF-MSC, respectivamente; y grupos 5 y 6, donde el Matrigel se mezcló con 30 µg/mL de exosomas aislados por ultracentrifugación a partir de medio de recolección previamente incubado con cultivos celulares de MSC o de HIF-MSC a los cuales se les había inhibido o no el ligando de la vía de Notch Jagged1 (sección 3.11.3.2.1), respectivamente.

### 3.12.2 Procedimiento Quirúrgico

El procedimiento consistió en inyectar en ambos flancos de un ratón nu/nu de 6-8 semanas la mezcla del Matrigel con los diferentes componentes. Para ello, los ratones se sedaron con Sevoflurano (Sevorane®) para que no se movieran durante la inyección. Una vez inyectada la mezcla de Matrigel se mantuvo 2 min al ratón dormido para evitar que el ratón se mueva e impida la gelificación correcta del Matrigel. Pasados los 2 min, el ratón se devolvió a su jaula y se dejó que se despertara. Tras el día de inyección, los ratones se mantuvieron en jaulas provistas de alimento y agua durante 14 d. Posteriormente, los ratones se sacrificaron por asfixia en una cámara de CO<sub>2</sub> y se procedió a la extracción de los *Plugs* de Matrigel con ayuda de material de cirugía. Una vez extraídos, éstos se lavaron con PB 0,1 M (Panreac) y se fijaron en PFA al 4 %. Posteriormente se procedió como se detalla en la sección 3.13. En todo momento previo a la inyección, la mezcla de Matrigel se mantuvo a 4 °C.

## 3.13 Técnicas de Histología

Para estudiar la presencia de células y vasos sanguíneos en el interior de los *Plugs* extraídos de los flancos de los ratones inyectados con las diferentes mezclas de Matrigel se realizaron tinciones (Tinción Tricrómica de Masson y Hematoxilina-Eosina) e inmunofluorescencias para estudiar la presencia del marcador de células endoteliales CD31. Con este objetivo, previamente los *Plugs* se incluyeron en bloques de parafina y se cortaron con un microtomo.

### 3.13.1 Inclusión en Parafina, Microtomía y Tinciones

Una vez extraídos los *plugs* de matrigel, se les hicieron 2 lavados en Tampón fosfato (PB) 0,1 M (Panreac), se fijaron en PFA al 4% toda la noche y al día siguiente se lavaron 4 veces con PB 0,1 M. Después, se realizó la inclusión en bloques de parafina con la máquina de inclusión HistoCore Arcadia (Leica Biosystems). Una vez incluidos en bloques de parafina, éstos se cortaron con un microtomo (Leica Biosystems) obteniendo cortes de los dos extremos y del centro del *Plug* para no menospreciar en el estudio

ninguna región del *Plug*. Los cortes se depositaron sobre portaobjetos gelatinizados (Thermo Fisher Scientific). Estas preparaciones se usaron para realizar las inmunocitoquímicas (sección 3.13.2) y las tinciones: Tricrómica de Masson y hematoxilina-eosina. Todas las tinciones fueron realizadas de forma automatizada en la máquina ArtisanLink Pro (Dako).

## **3.13.2 Inmunocitoquímica**

Para las inmunocitoquímicas de las diferentes secciones del *Plug* los cortes tuvieron que ser previamente desparafinados y posteriormente se les realizó un proceso de desenmascaramiento antigénico.

### **3.13.2.1 Desparafinado**

El proceso de desparafinado consistió en lo siguiente: primero se calentaron los cortes en los portaobjetos a 60 °C durante 25 min. Después, se hicieron 2 inmersiones de 10 min en un disolvente orgánico que disuelve la parafina (xilol; Panreac). Posteriormente, para retirar el xilol de la muestra se hicieron lavados consecutivos de 10 min en alcoholes gradualmente de menor % de pureza (2 lavados en alcohol 100 %, 1 lavado en alcohol al 96 % y el último lavado en alcohol 70 %). Finalmente, se realizó 1 lavado de los cortes de 10 min en agua destilada.

### **3.13.2.2 Desenmascaramiento Antigénico**

Muchas veces la estructura tridimensional que las proteínas tienen en estado nativo se ve alterada por los procesos de fijación con PFA e inclusión en parafina. Ocasionalmente, debido a esto, los epítomos que se desean identificar están tan alterados que hace imposible su reconocimiento por los anticuerpos. Sin embargo, hay estrategias para revertir este cambio conformacional permitiendo que puedan volver a ser reconocidos por los anticuerpos. Este tipo de estrategias se conocen como procesos de desenmascaramiento antigénico. En este trabajo, a los cortes una vez desparafinados se les realizó un desenmascaramiento antigénico que consistió en lo siguiente: los

portaobjetos con los cortes procedentes del plug se sumergieron en tampón de citrato (citrato 0,01 M con un pH de 6.0) a 90 °C en un baño termostático (Biogen) durante 15 min. Finalmente, se realizaron 4 lavados de 5 min con PBS.

### **3.13.2.3 Inmunofluorescencia de CD31 de las Secciones de los Plug de Matrigel**

Una vez retirada la parafina de las secciones de los *Plug* situados sobre los portaobjetos y realizado el proceso de desenmascaramiento antigénico se inició la inmunofluorescencia para la detección del marcador endotelial CD31. Para ello, los cortes colocados sobre los portaobjetos se permeabilizaron con PBS-Tween 0,1% (Sigma Aldrich) durante 5 min. Después, se bloquearon 1 h con PBS al 10 % en suero de cabra. Seguidamente, las muestras se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario en solución de bloqueo. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario, se hicieron 3 lavados de 5 min con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario en solución de bloqueo durante 1 h. Pasada la hora de incubación, se hicieron 4 lavados de 5 min con PBS, se agregaron 20 µL de medio de montaje con DAPI (ProLong Gold antifade with DAPI, Molecular Probes-Invitrogen) y se montaron. El montaje se realizó colocando un cubreobjetos (Menzel-Glaser, Afora) sobre los cortes colocados sobre los portaobjetos con el medio de montaje y se sellaron con laca de uñas. Posteriormente, todas las preparaciones se observaron y se sacaron fotografías con el microscopio confocal. El análisis de los vasos sanguíneos generados dentro del Matrigel se realizó cuantificando la cantidad total de señal fluorescente en cada foto de cada condición debida a la presencia del marcador de células endoteliales CD31. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se resumen en la tabla 3.4.

## **3.13 Citometría de Flujo**

Para analizar la expresión de la proteína GFP en MSC y en HIF-MSC, las células se sembraron en placas de 55 cm<sup>2</sup> a una densidad de 1.500 células/cm<sup>2</sup>. Cuando el cultivo alcanzó una confluencia del 75 %, las células se tripsinizaron y se centrifugaron a 0,2 g

durante 5 min. El sedimento de células se resuspendió en 1 mL de DMEM-bajo en glucosa al 10 % de FBS y 1 % de P/S y se realizó un contaje de la concentración celular. Posteriormente, se depositaron en tubos de citometría un volumen final de 2 mL a una concentración celular de 500.000 células/mL. Las células marcadas con GFP se identificaron por su epifluorescencia verde con el citómetro de flujo Cytomics FC 500 de Beckman Coulter por el servicio de citómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

### **3.14 Proteómica**

Para examinar el efecto de la expresión del gen de respuesta a hipoxia 1 $\alpha$  sobre el contenido proteico de los exosomas derivados de MSC, las MSC y las HIF-MSC se cultivaron durante 48 h con el RM1, descrito en la sección 3.5.1. Tras la incubación, se aislaron los exosomas desde el medio de cultivo por ultracentrifugación y la fracción exosomal obtenida fue resuspendida en tampón de lisis RIPA. El extracto proteico fue cargado con tampón Laemmli en un gel SDS-PAGE y la electroforesis se detuvo una vez que la banda de proteínas recorriera 1 cm en la zona resolutive del gel. A continuación, se cortó la poliacrilamida del carril con todas las proteínas y se digirió con tripsina. La digestión se detuvo con TFA a una concentración final del 1% y se realizó una doble extracción con ACN para generar la mezcla de péptidos (muestra). Las muestras fueron analizadas por cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Para ello, se cargó 5  $\mu$ l de cada muestra en una columna trampa (NanoLC Column, 3 $\mu$  C18-CL, 350  $\mu$ m x 0.5 mm; Eksigen), se desalaron con TFA y después se cargaron en una columna analítica (LC Column, 3  $\mu$  C18-CL, 75  $\mu$ m x 12 cm, Nikkyo). Los péptidos fueron analizados en el espectrómetro de masas nanoESI qTOF (5600 TripleTOF, ABSCIEX). Los datos obtenidos para las muestras fueron analizados con el software String. Todo el proceso se realizó en el servicio de proteómica de la Universidad de Valencia.

### **3.15 Análisis Estadístico**

Todos los resultados de los experimentos realizados están expresados como media  $\pm$  desviación estándar (DS) o error estándar (ES). Se comprobó la normalidad de las

distribuciones de las variables con el test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov y Willcoxon se estudiaron las diferencias de medias para parámetros cuantitativos mediante la aplicación del test de la t de Student para la comparación de dos medias. Los análisis fueron realizados con los programas SPSS 9.0 y Graphpad 5. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con  $p < 0,05$ , con un intervalo de confianza del 95%.



# 4. Resultados



## **4. Resultados**

En este trabajo se estudió el mecanismo de señalización de la vía de Notch mediado por exosomas. Para ello se exploraron dos entornos de investigación diferentes, por un lado, la contribución del citado mecanismo al campo de la regeneración tisular y las terapias avanzadas y por otro a explorar su contribución en la fisiopatología tumoral, en concreto en el cáncer de mama. Los resultados de ambas partes se exponen en dos secciones para facilitar la interpretación:

**Sección A:** Estudio de la contribución de los exosomas procedentes de MSC nativas y de HIF-MSC a su potencial angiogénico.

**Sección B:** Papel de la vía de señalización de Notch en el proceso de malignización inducido por exosomas de la línea celular de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231.

## **4. Resultados**

### **Sección A:**

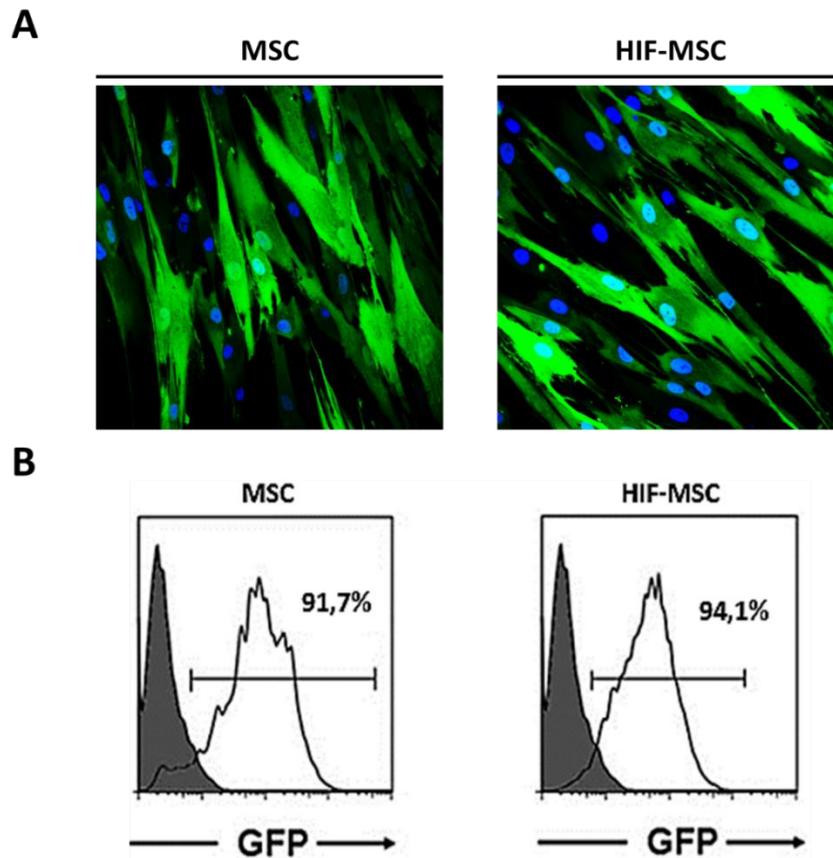
Estudio de la contribución de los exosomas procedentes de MSC nativas y de HIF-MSC a su potencial angiogénico.

#### **4.1 Estabilización de la Expresión de HIF-1 $\alpha$ en MSC**

El preconditionamiento de las células madre mesenquimales mediante cultivo en un entorno hipóxico no sólo incrementa su supervivencia sino también su potencial terapéutico<sup>276</sup>. HIF-1 $\alpha$  juega un papel central en la adaptación de las células a los ambientes con bajas concentraciones de oxígeno<sup>170</sup> y además ha demostrado ser un factor clave en el incremento de su supervivencia y de su potencial terapéutico<sup>161</sup>.

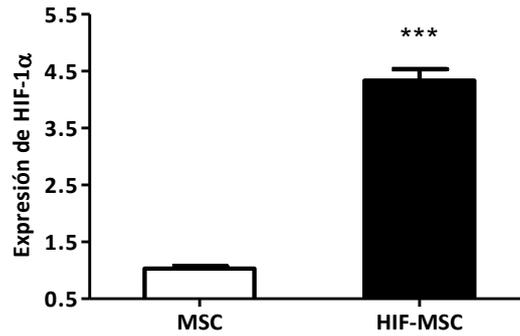
Con el fin de simular en las MSC los efectos producidos por la estabilización de HIF-1 $\alpha$ , este factor de transcripción se sobreexpresó en MSC mediante clonación en el vector lentiviral comercial pWPI-GFP, tal y como se describe en la sección 3.3. Así, el gen de HIF-1 $\alpha$  se incorporó en este vector que posteriormente se introdujo en las MSC (HIF-MSC) mediante transducción Lentiviral quedando el gen HIF-1 $\alpha$  bajo una expresión constitutiva. Al mantenerse los cultivos en normoxia, las polihidroxilasas y la maquinaria del proteasoma mantienen la capacidad de degradación de la proteína HIF1- $\alpha$ . Sin embargo, el promotor del vector lentiviral mantendría una expresión elevada de HIF-1 $\alpha$  que superaría la capacidad de degradación de la célula. Por otro lado, el vector comercial (pWPI-GFP) sin modificar se introdujo en las MSC (MSC) y se usó en todo momento como control para estudiar las diferencias inducidas por la expresión de HIF-1 $\alpha$ . Una vez transducidas las MSC con los vectores lentivirales que llevaban las construcciones genéticas de interés (pWPI-GFP y pWPI-HIF-GFP) se observó mediante microscopía de fluorescencia la expresión de GFP en los cultivos de MSC y HIF-MSC y se cuantificó el porcentaje de infección mediante citometría de flujo a través de la expresión de GFP.

Después de la infección, se observó que entre el 90 y el 95 % de las MSC eran positivas para la proteína fluorescente GFP (Figura 4.1).



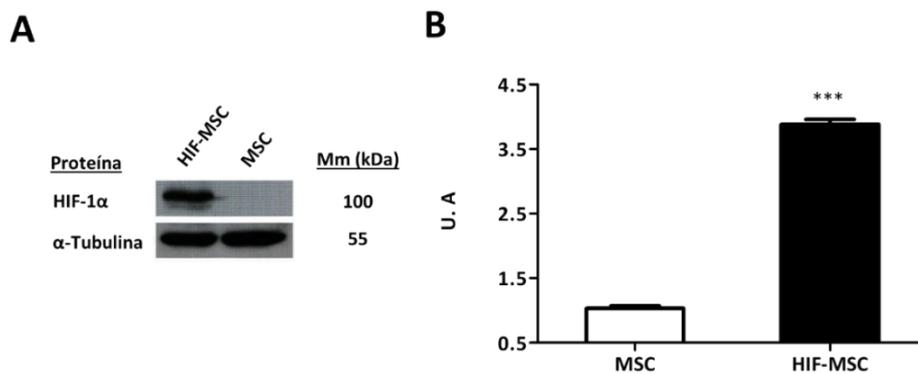
**Figura 4.1 Marcaje Lentiviral de MSC.** **A.** Imágenes representativas mediante microscopía de fluorescencia a 100X de cultivos de MSC transducidos con el vector pWPI-GFP (MSC) o pWPI-GFP-HIF (HIF-MSC). Verde: expresión de GFP. Azul: Núcleos teñidos con DAPI. **B.** Evaluación mediante citometría de la transducción de los vectores pWPI-GFP y pWPI-GFP-HIF en cultivos de MSC a través de la expresión de la proteína verde fluorescente GFP. El análisis de citometría de la expresión de GFP en las MSC mostró una eficiencia de la infección lentiviral de las MSC superior al 90 %.

Después de verificar que los cultivos de MSC y de HIF-MSC expresaban la proteína fluorescente GFP que indicaba que las células habían sido transducidas con los vectores de interés, se analizó la expresión específica del mRNA del gen HIF-1 $\alpha$  a partir del RNA total de ambos cultivos celulares mediante qPCR (Figura 4.2). La qPCR constató que el gen de respuesta a la hipoxia se estaba sobreexpresando en las MSC transducidas con el vector pWPI-GFP-HIF.



**Figura 4.2** El mRNA del gen HIF-1 $\alpha$  se sobreexpresa en cultivos de HIF-MSC respecto a los de MSC. El nivel del mRNA del gen HIF-1 $\alpha$  se cuantificó mediante qPCR en HIF-MSC (barra negra) y se normalizó frente al de MSC (barra blanca). Los valores se representan como la meda  $\pm$  la DS de tres experimentos independientes. \*\*\* P<0,001. N: 3.

Para confirmar que el gen HIF-1 $\alpha$  se expresaba de forma correcta, se analizó la presencia de la proteína HIF-1 $\alpha$  en extractos de proteína total de cultivos de HIF-MSC frente a cultivos de MSC. El análisis por WB de los extractos de proteína procedentes de cultivos de HIF-MSC y de MSC en condiciones normales de oxígeno, mostraron que la proteína HIF-1 $\alpha$  se sobreexpresaba en HIF-MSC en comparación con MSC (Figura 4.3).

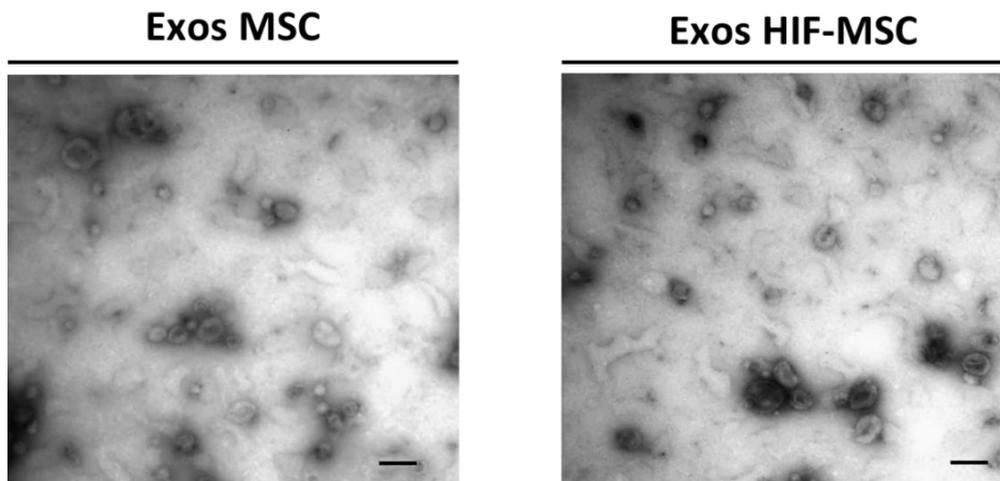


**Figura 4.3** La proteína HIF-1 $\alpha$  se sobreexpresa en extractos de proteína total procedentes de cultivos de HIF-MSC respecto a los de MSC. **A.** WB de la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  a partir de extractos de proteína total de cultivos de MSC y HIF-MSC. Mm: Masa molecular. **B.** Análisis densitométrico del WB de la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  en MSC (barra blanca) y HIF-MSC (barra negra). Se utilizó la proteína  $\alpha$ -Tubulina como control de carga. Los resultados se representan como la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes. U.A: Unidades Arbitrarias. \*\*\* P<0,001. N: 3.

## 4.2 Aislamiento y Caracterización de los Exosomas

### Procedentes de MSC o HIF-MSC

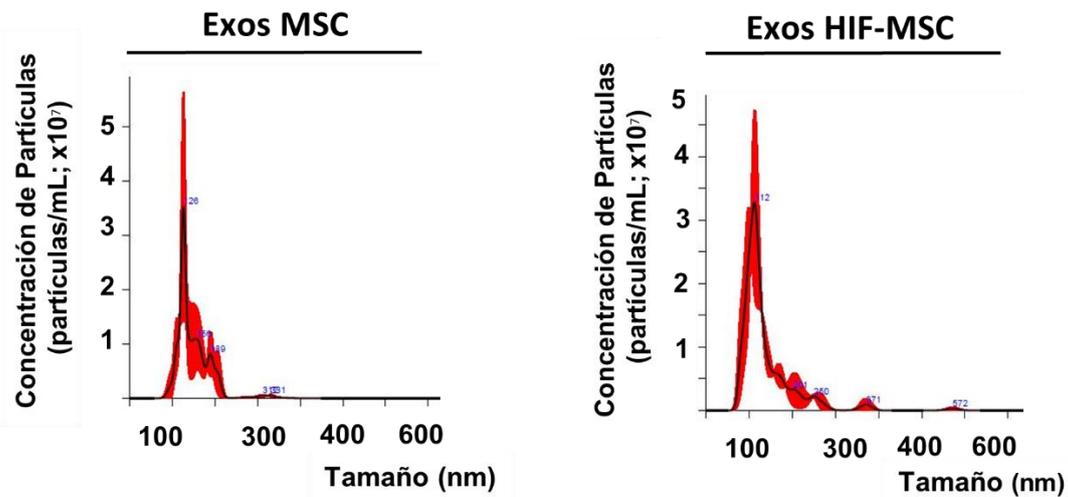
Muchos estudios demuestran que es posible aislar exosomas a partir del medio de cultivo de diferentes tipos celulares<sup>151</sup>. Con el objetivo de confirmar el aislamiento de exosomas mediante un protocolo de ultracentrifugación a partir del medio de cultivo de MSC y HIF-MSC, se analizaron las fracciones exosomales aisladas mediante técnicas de microscopía electrónica, seguimiento de nanopartículas y *Western Blot*. La técnica más empleada para estudiar las características morfológicas y tamaños de los aislados exosomales es la microscopía electrónica de transmisión. De este modo, lo primero que se hizo fue observar al microscopio electrónico las fracciones exosomales aisladas mediante ultracentrifugación a partir del medio de recolección de exosomas en el que se incubaron las MSC o las HIF-MSC durante 48 h (Figura 4.4). Este análisis demostró la presencia de vesículas con la apariencia y tamaño característico de los exosomas (30-150 nm).



**Figura 4.4** Análisis morfológico mediante microscopía electrónica de transmisión de los exosomas aislados por ultracentrifugación a partir del medio de recolección de MSC y HIF-MSC. Barra de escala: 150 nm.

Después, se estudió la distribución de tamaños de las nanopartículas presentes en la muestra mediante Nanosight. El rango de tamaños que se observó en las fracciones

exosomales aisladas estaba comprendido dentro del rango de tamaños característico de las vesículas exosomales (Figura 4.5).



**Figura 4.5** Estudio de la distribución de tamaños de las nanopartículas presentes en las fracciones exosomales aisladas mediante ultracentrifugación a partir del medio de recolección de MSC y HIF-MSC. El estudio se realizó con el instrumento NanoSight NS300. Puede observarse que el rango de tamaños se encuentra principalmente entre los 50 y los 150 nm. Eje vertical: (x10<sup>7</sup>) partículas/mL; Eje horizontal: tamaño en nanómetros (nm).

Debido a su origen intracelular, los exosomas contienen gran cantidad de tetraspaninas y aunque estas moléculas están presentes en otras estructuras celulares, cuando se detectan en extractos aislados por un protocolo de ultracentrifugación específico desde el medio de cultivo de las células se asocian a los exosomas. Entre las tetraspaninas destacan: CD9, CD63 y CD81. Así, para corroborar la presencia y riqueza en exosomas de las fracciones exosomales procedentes de MSC o de HIF-MSC aisladas a partir de su medio de recolección, se procedió al estudio de estos marcadores exosomales mediante WB. Además, se estudió la presencia de marcadores exclusivamente celulares como la Calnexina, con el objetivo de descartar una posible contaminación celular o de vesículas extracelulares de otro origen en la muestra. Los resultados obtenidos por WB revelaron que las fracciones exosomales aisladas a partir del medio de recolección de MSC o HIF-MSC, tenían un alto contenido en marcadores exosomales (CD81, CD9 y CD63) y carecían de Calnexina (Figura 4.6). Este resultado indicó la presencia de

exosomas en los aislados y de otros contaminantes como células, vesículas de distinto origen u otros fragmentos celulares.

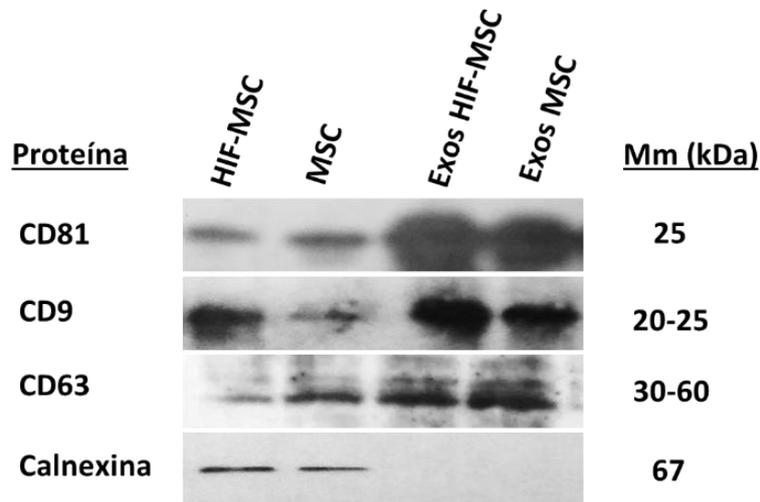


Figura 4.6 Análisis mediante WB de los marcadores exosomales CD81, CD9 y CD63 y del marcador celular Calnexina a partir de extractos de proteína total de HIF-MSC y MSC y de sus fracciones exosomales aisladas mediante ultracentrifugación a partir del medio de recolección de HIF-MSC o MSC (Exos HIF-MSC y Exos MSC, respectivamente). Mm: Masa molecular.

### 4.3 HIF-1 $\alpha$ Induce un Aumento en la Secreción de Exosomas en MSC

Se ha descrito que el proceso de secreción de exosomas puede verse afectado por diversos factores<sup>22,267</sup>. Entre ellos, se ha demostrado que la hipoxia aumenta la secreción de exosomas<sup>277</sup>. En este sentido, un análisis de expresión génica diferencial entre HIF-MSC y MSC realizado previamente en nuestro laboratorio, mostró relación entre las vías de secreción y la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  en MSC. Un resumen de los procesos relacionados con los genes expresados de forma diferencial en HIF-MSC respecto de MSC se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1 Análisis GO de los resultados del análisis de la micromatriz de expresión génica diferencial en HIF-MSC frente a MSC.

Identificación GO	Función Biológica	p-Valor
GO:0031988	Vesículas asociadas a membrana	4.72e-04
GO:0070062	Vesículas extracelulares; Exosomas	5.55e-04
GO:0051046	Regulación de la secreción	6.53e-04
GO:0010647	Estimulación de la comunicación celular	6.79e-04
GO:0046903	Secreción	7.15e-04
GO:0031982	Vesículas	7.22e-04
GO:0009605	Respuesta a estímulos externos	1.26e-03
GO:0006887	Exocitosis	3.72e-03
GO:0010646	Regulación de la comunicación celular	5.66e-03

Por consiguiente, tanto la bibliografía como el análisis de las diferencias en la expresión génica entre MSC y HIF-MSC mostraban indicios de una posible vinculación entre la expresión de HIF-1 $\alpha$  y un incremento en la secreción de exosomas. Por ello, se estudió el efecto de la expresión de HIF-1 $\alpha$  en la secreción de exosomas de MSC.

Con este fin, por un lado, se aislaron los exosomas procedentes de iguales cantidades de medio de cultivo de MSC y de HIF-MSC sembradas previamente a la misma densidad para cuantificar por WB la cantidad de tetraspaninas en las fracciones exosomales. Como control de la densidad celular se usaron las cuantificaciones por WB de las tubulinas (Figura 4.7). El análisis comparativo de las cantidades de tetraspaninas CD63, CD9 y CD81, mostró una mayor cantidad en los extractos procedentes de HIF-MSC.

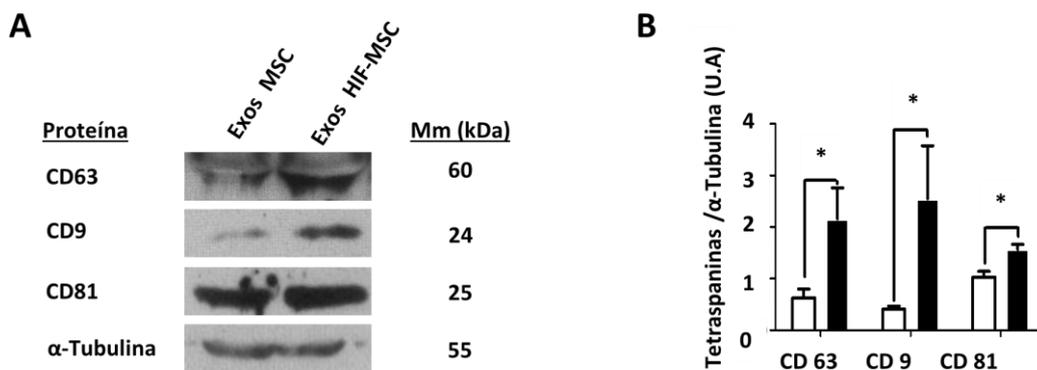
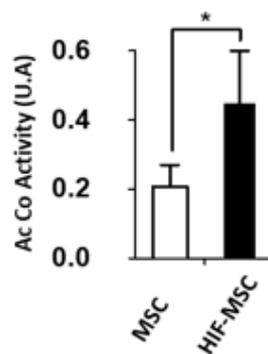


Figura 4.7 Análisis semicuantitativo mediante WB de la cantidad de exosomas secretados por MSC y HIF-MSC a través de la detección de las tetraspaninas CD63, CD9 y CD81 en extractos de proteína total de las fracciones exosomales aisladas. A. Detección mediante sWB de tetraspaninas y tubulinas a partir de la proteína total extraída de la fracción exosomal o celular derivada de MSC o de HIF-MSC. Mm: Masa

molecular. **B.** Análisis densitométrico de la señal detectada mediante WB de las tetraspaninas en la fracción exosomal derivada de MSC o de HIF-MSC. La señal detectada a partir de la detección de la Tubulina se usó para normalizar la señal procedente de las tetraspaninas en la fracción exosomal de MSC o de HIF-MSC. Barras blancas: MSC; Barras negras: HIF-MSC; U.A: Unidades arbitrarias. Los valores se expresan como la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes; \*  $P < 0,05$ . N: 3.

Por otro lado, se midió la actividad de la Acetilcolinesterasa, una enzima específica de microvesículas y exosomas, en las fracciones exosomales procedentes del mismo número de células de MSC o de HIF-MSC (Figura 4.8). Los resultados de este ensayo mostraron una mayor actividad enzimática en la fracción exosomal aislada a partir de medio de recolección de HIF-MSC que de MSC, lo que sugirió una vez más que la expresión de HIF-1 $\alpha$  provocaba un incremento en la secreción de exosomas en MSC.



**Figura 4.8** Cuantificación de la actividad de la AcetilColinesterasa (ACE) en exosomas aislados a partir del mismo volumen de medio de recolección en el que se incubaron el mismo número de células de MSC o de HIF-MSC. Puede observarse una mayor actividad en las fracciones exosomales de HIF-MSC (barra negra) respecto a las de MSC (barra blanca). U.A: Unidades arbitrarias. Resultados mostrados como la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes; \*  $P < 0,05$ . N: 3.

## 4.4 Análisis del Contenido de miRNAs y Proteínas en Exosomas de MSC y HIF-MSC

Los exosomas contienen una gran variedad de moléculas incluyendo mRNAs, miRNAs y proteínas que son cruciales para la comunicación mediada por exosomas<sup>278</sup>. En este trabajo se analizó la influencia de la expresión de HIF-1 $\alpha$  en MSC sobre el contenido en

miRNAs y proteínas presentes en sus exosomas. En ambos casos el diseño experimental fue el detallado en la Figura 4.9.

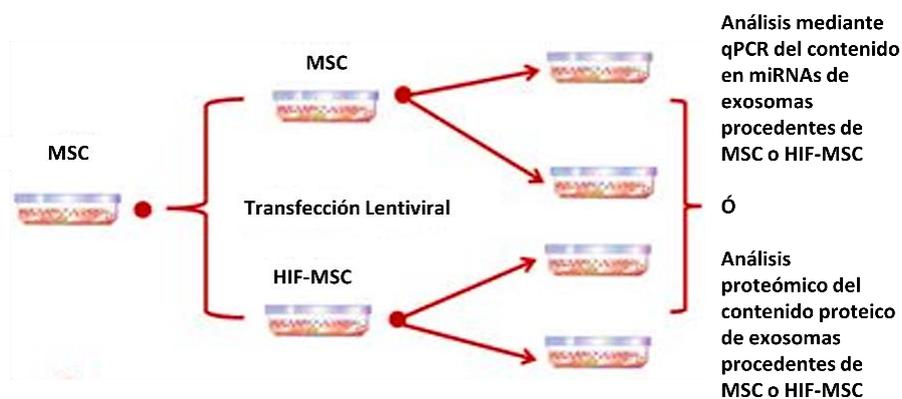


Figura 4.9 Esquema del diseño experimental para la detección y cuantificación de miRNAs y proteínas exosomales procedentes de MSC o de HIF-MSC mediante qPCR o proteómica, respectivamente.

#### 4.4.1 Contenido de miRNAs

El resultado del análisis por qPCR de los miRNAs es el que se muestra en la Figura 4.10. Este análisis sugirió que varios miRNAs como el miR-15, miR-16, miR-17, miR-31, miR-126, miR-145, miR221, miR-222, miR-320a y miR-424, estaban sobreexpresados en los exosomas procedentes de HIF-MSC respecto a los de MSC. En particular fue interesante el miR-31, que había sido detectado previamente en microvesículas procedentes de células madre derivadas de tejido adiposo con una contribución a la migración y formación de vasos *in vivo*<sup>279</sup>.

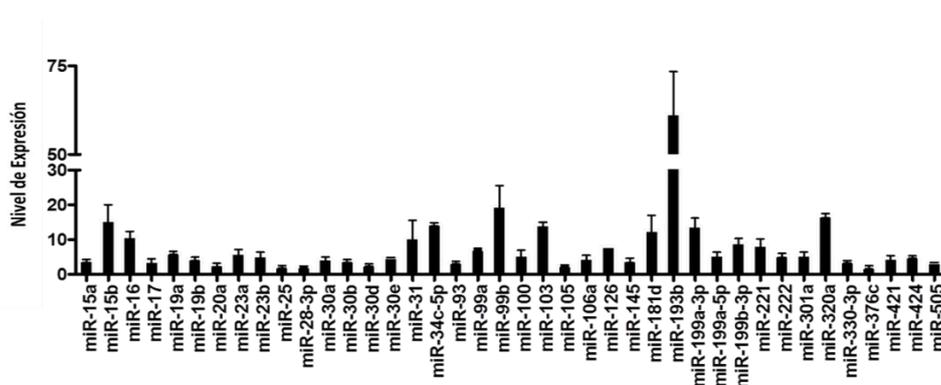


Figura 4.10 Análisis mediante qPCR de los miRNAs sobreexpresados en exosomas procedentes de HIF-MSC respecto a los de MSC (Nivel de expresión; expresión en MSC=1).

Para estudiar las vías biológicas con las que guardaban relación los miRNAs expresados de forma diferencial en exosomas procedentes de HIF-MSC respecto de MSC se realizó un estudio de Ontología Génica (GO) (Tabla 4.2). Los resultados mostraron una relación con procesos asociados a vías de secreción, de comunicación celular, de formación de capilares sanguíneos. La vía de señalización de Notch también aparecía significativamente relacionada en exosomas derivados de HIF-MSC respecto a los derivados de MSC.

**Tabla 4.2 Análisis GO de los miRNAs presentes de forma diferencial en exosomas procedentes de HIF-MSC respecto a los de MSC.**

<b>Identificación GO</b>	<b>Función biológica</b>	<b>p-Valor</b>
GO:0046907	<b>Transporte intracelular</b>	9.19e-79
GO:0042127	<b>Regulación de la proliferación celular</b>	4.20e-55
GO:0016192	<b>Transporte mediado por vesículas</b>	3.83e-48
GO:0016477	<b>Migración celular</b>	2.43e-36
GO:0001944	<b>Desarrollo de la vasculatura</b>	3.36e-30
GO:0001568	<b>Desarrollo de vasos sanguíneos</b>	1.66e-29
GO:0035295	<b>Desarrollo de tubos</b>	2.47e-27
GO:0001666	<b>Respuesta a hipoxia</b>	1.95e-21
GO:0001525	<b>Angiogénesis</b>	4.33e-21
GO:0016050	<b>Organización de vesículas</b>	4.30e-12
GO:0030509	<b>Vía de señalización de BMP</b>	1.25e-10
GO:0007219	<b>Vía de Señalización de Notch</b>	5.67e-09
GO:0006903	<b>Etiquetado para empaquetado en vesículas</b>	1.17e-06
GO:0010595	<b>Estimulación de la migración endotelial</b>	2.61e-06
GO:0007223	<b>Vía de Señalización de Wnt</b>	4.95e-05
GO:0060395	<b>Transducción de la vía de la proteína SMAD</b>	1.26e-04
GO:0032509	<b>Transporte en endosomas mediante el empaquetado en cuerpos multivesiculares</b>	2.19e-03

Por otro lado, también se realizó un estudio de mapeo para analizar las funciones biológicas de los genes diana de esos miRNAs (análisis KEGG). La función de alguno de los genes diana de los miRNAs encontrados en los exosomas de MSC o de HIF-MSC se resume en la Tabla 4.3. Entre ellos podemos citar por su particular interés para la terapia regenerativa los relacionados con el ciclo celular, con la vía de señalización de Notch, con el proceso angiogénico o con la glicólisis/gluconeogénesis.

**Tabla 4.3 Análisis KEGG de los miRNAs presentes de forma diferencial en exosomas procedentes de HIF-MSC respecto a los de MSC.**

Identificación KEGG	Función biológica	p- Valor
hsa04110	Ciclo celular	2.18e-22
hsa04520	Uniones intercelulares	1.95e-17
hsa04310	Vía de señalización de Wnt	3.47e-16
hsa04350	Vía de señalización TGF- $\beta$	4.84e-11
hsa04330	Vía de Señalización de Notch	4.99e-10
hsa04370	Vía de Señalización de VEGF	7.91e-09
hsa04620	Receptor tipo Toll-like	2.56e-09
hsa04512	Interacción de receptores de la matriz extracelular	7.65e-07
hsa00010	Glicólisis/gluconeogénesis	1.45e-07
hsa04630	Vía de señalización Jak-Stat	1.12e-06
hsa03060	Exportación de proteínas	7.71e-05

#### 4.4.2 Contenido en Proteínas

Para estudiar el contenido en proteínas de los exosomas procedentes de medio de recolección de MSC o de HIF-MSC se realizó cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Un resumen de las proteínas identificadas en los exosomas procedentes de MSC o de HIF-MSC se puede observar en las Tablas 4.4 y 4.5.

Tabla 4.4 Resumen de las proteínas identificadas en los exosomas procedentes de MSC.

Código de la proteína	Nombre de la proteína
VTN	<i>Vitronectin</i>
PENK	<i>Proenkephalin-A</i>
NEGF2	<i>Midkine</i>
Hsp70	<i>Heat shock-related 70 protein 2</i>
Tspan-28	<i>Tetraspanin-28</i>
COL1A1	<i>Collagen <math>\alpha</math>1</i>
LGALS3BP	<i>Galectin-3-binding protein</i>
Ubiquitin-C	<i>Polyubiquitin-C</i>
HSPG	<i>Basement membrane-heparan sulfate proteoglycan</i>
SDCBP	<i>Syntenin-1</i>
SFRP1	<i>Secreted frizzled-related protein1</i>
MFGE8	<i>Lactadherin</i>

Tabla 4.5 Resumen de las proteínas identificadas en los exosomas procedentes de HIF-MSC.

Código de la proteína	Nombre de la proteína
Hx	<i>Hemopexin</i>
TF	<i>Serotransferrin</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
Hsp70	<i>Heat shock-related 70 protein 2</i>
Tspan-28	<i>Tetraspanin-28</i>
TGF $\beta$	<i>Erithrocyte band 7 integral membrane protein</i>
EGF_2	<i>EGF-like repeat</i>
Ubiquitin-C	<i>Polyubiquitin-C</i>
Ubiquitin-B	<i>Polyubiquitin-B</i>
Tspan-4	<i>Tetraspanin-4</i>
ITG- $\beta$ 1	<i>Integrin <math>\beta</math>1</i>
MFGE8	<i>Lactadherin</i>

El análisis de la combinación de proteínas obtenido por MS en los exosomas procedentes de MSC o de HIF-MSC sugirió una red de interacciones entre ellas (Figura 4.11). Un punto interesante fue la presencia de la proteína ubiquitina entre las proteínas de ambos extractos exosomales, ya que la ubiquitina se ha relacionado en varios estudios con el empaquetamiento de proteínas en los exosomas<sup>18,280</sup>.



Tabla 4.6 Análisis GO de las proteínas presentes en exosomas procedentes de HIF-MSC.

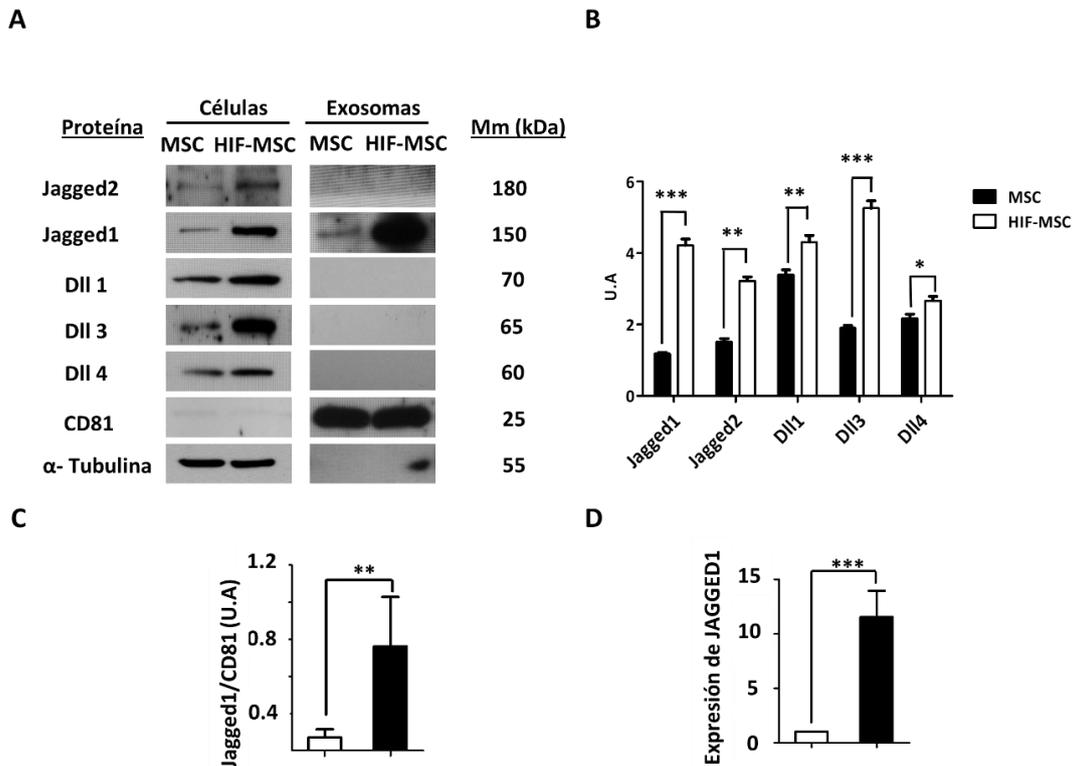
Identificación GO	Función biológica	p-Valor
GO:0002682	Regulación del Sistema inmune	1.06e-10
GO:0007155	Adhesión Celular	3.16e-10
GO:0007220	Procesamiento del receptor de Notch	2.35e-8
GO:0016192	Transporte mediado por vesículas	2.95e-7
GO:0007219	Señalización de la vía de Notch	1.75e-6
GO:0001819	Regulación positiva de las citoquinas	1.19e-5
GO:0048514	Morfogénesis de vasos sanguíneos	1.78e-5
GO:0031175	Desarrollo de neuronas	3.83e-5
GO:0001568	Desarrollo de vasos sanguíneos	4.63e-5
GO:0001525	Angiogénesis	1,00e-03
GO:0072358	Desarrollo del sistema cardiovascular	5.38e-3
GO:0061061	Desarrollo de estructuras musculares	2.91e-2
GO:0005976	Metabolismo de polisacáridos	1.88e-6
GO:0050776	Regulación de la respuesta inmune	2.6e-6
GO:0071456	Respuesta celular a la hipoxia	1.24e-5
GO:0036294	Respuesta celular a niveles de oxígeno bajos	1.33e-5
GO:0007219	Vía de señalización de Notch	2.15e-5
GO:0006006	Metabolismo de la glucosa	2.72e-5

Fue de particular interés la aparición en el análisis de la vía de señalización de Notch como ruta biológica relacionada con el contenido de miRNAs y proteínas de los exosomas derivados de MSC o de HIF-MSC.

## 4.5 HIF-1 $\alpha$ Incrementa la Incorporación del Ligando Jagged1 en los Exosomas de las MSC

El estudio del contenido proteico y de miRNAs de los exosomas sugirió una relación entre la expresión de HIF-1 $\alpha$  y la vía de señalización de Notch. Aunque los ligandos de la vía de Notch suelen estar presentes en la membrana plasmática, también pueden encontrarse en vesículas extracelulares<sup>53</sup>. De este modo, se investigó la presencia de los ligandos de la vía de Notch en los exosomas procedentes de MSC y de HIF-MSC mediante WB (Figura 4.12 A). Todos los ligandos de la vía de Notch se pudieron observar en los extractos de proteína celular y se observó una mayor expresión en aquellos que provenían de HIF-MSC (Figura 4.12 B). Sin embargo, solamente se detectó Jagged1 en

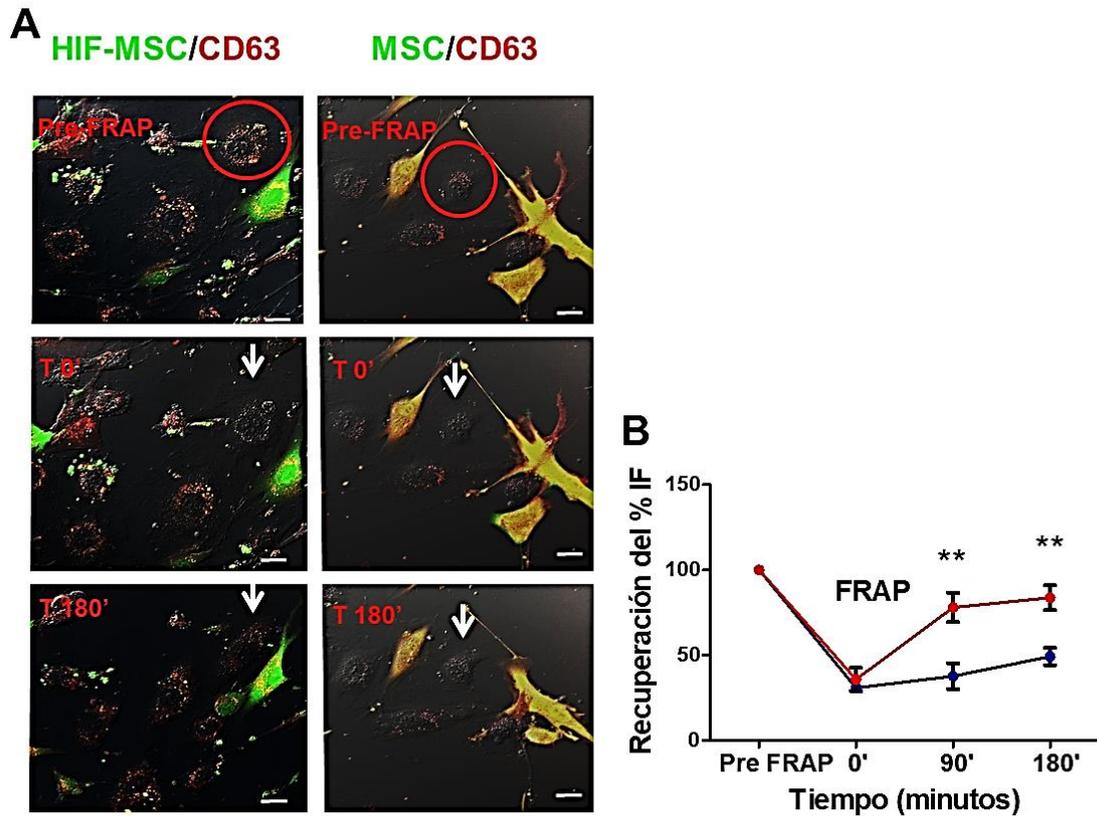
los extractos procedentes de las fracciones exosomales. Además, su contenido era significativamente mayor en exosomas derivados de los cultivos de HIF-MSC respecto a los de MSC (Figura 4.12 A y C). Por otro lado, se analizó mediante qPCR la expresión del RNA mensajero de Jagged1 y se observó una sobreexpresión en HIF-MSC (Figura 4.12 D).



**Figura 4.12** Los ligandos de la vía de señalización de Notch se sobreexpresan en las células HIF-MSC respecto de las MSC. Únicamente Jagged1 se encontró en exosomas derivados de MSC, incorporándose en mayor cantidad en los procedentes de HIF-MSC. **A.** Estudio mediante WB de los ligandos de la vía de Notch (Jagged1-2, Dll1,3-4) en exosomas procedentes de medio de recolección de MSC o de HIF-MSC. Como control de carga de exosomas se utilizó la tetraspanina CD81 y para los extractos celulares  $\alpha$ -tubulina. Mm: Masa molecular. **B.** Análisis densitométrico de la señal obtenida mediante WB de la detección de los componentes de Notch a partir de los extractos de proteína total procedentes de MSC (barra negra) o de HIF-MSC (barra blanca). La señal detectada se normalizó frente a la de la tubulina. **C.** Análisis densitométrico de la expresión de Jagged1 detectada en el WB procedente de la proteína total de exosomas derivados de MSC (barra blanca) o de HIF-MSC (barra negra). Los niveles de proteína se normalizaron frente a los de la tetraspanina CD81. **D.** Estudio mediante qPCR de la expresión del mRNA de Jagged1 en MSC (barra blanca) o en HIF-MSC (barra negra). U.A: Unidades arbitrarias. Resultados mostrados como la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes;  $P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$  and  $***P < 0,001$ . N: 3.

## 4.6 HIF-1 $\alpha$ Aumenta la Transferencia de Exosomas de MSC a ECs

Para monitorizar el tráfico de exosomas entre diferentes tipos celulares, se transdujeron los cultivos de MSC o HIF-MSC con un vector lentiviral que expresaba la tetraspanina CD63 fusionada a RFP (CD63-RFP). De esta manera, los exosomas secretados por estas células (MSC-CD63-RFP o HIF-MSC-CD63-RFP) expresaban el marcador exosomal CD63 fusionado a RFP. Así, las células resultantes tenían fluorescencia roja (CD63-RFP) y verde (pWPI-GFP). Los resultados mostrados en la sección 4.3 sugieren que la expresión de HIF1- $\alpha$  provoca una mayor secreción de exosomas, de este modo, se realizó un ensayo de recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP) para explorar si ese incremento en la secreción de exosomas se traducía en una mayor transferencia de exosomas de MSC a las células endoteliales humanas (HUVEC). Pasadas 24 h de cocultivo directo de las células endoteliales con MSC-CD63-RFP o HIF-MSC-CD63-RFP, se analizó la presencia de fluorescencia roja en las células HUVEC y se observó que esta adquiría un aspecto granular característico de un marcaje vesicular (Figura 4.13 A). Después, se seleccionó una célula endotelial a la que se le eliminó la fluorescencia de color rojo mediante pulsos láser (círculo blanco en la Figura 4.13 A) y, entonces, se realizó un *time-lapse* de 3 h con el microscopio confocal. A partir de las fotografías adquiridas durante esas 3 h, se midió la recuperación de fluorescencia roja en las células endoteliales, que sería directamente proporcional a las vesículas transferidas desde las MSC-CD63-RFP o HIF-MSC-CD63-RFP. La cuantificación de la recuperación de fluorescencia roja, reflejó una recuperación mayor en las células endoteliales cocultivadas con las células HIF-MSC-CD63-RFP en comparación con aquellas cocultivadas con MSC-CD63-RFP (Figura 4.13 B). Estos resultados indicaron que el tráfico de exosomas de MSC-CD63-RFP o HIF-MSC-CD63-RFP a las células endoteliales parecían incrementarse debido a la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  en MSC.

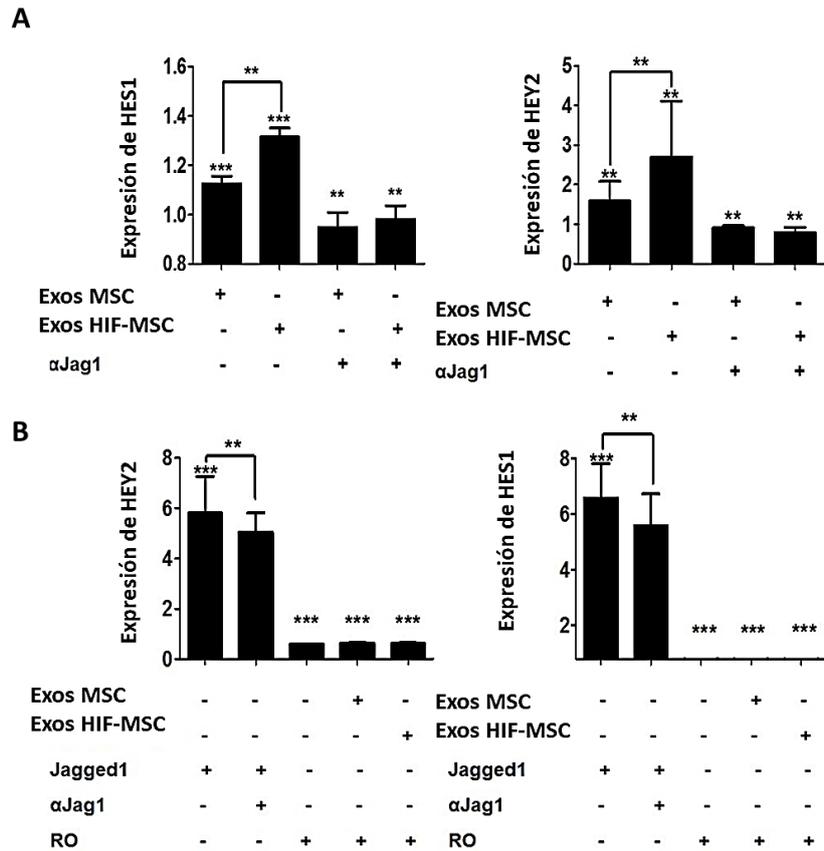


**Figura 4.13 Estudio del aumento de la transferencia de exosomas de MSC a células endoteliales debido a la expresión de HIF-1 $\alpha$  en MSC. A.** Recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo en células endoteliales co-cultivadas con MSC-CD63-RFP o HIF-MSC-CD63-RFP: círculo rojo, célula fotoblanqueada; flecha, célula fotoblanqueada después de 0, 180 min del fotoblanqueo; **pre-frap**, fotografía del microscopio confocal de las células antes del fotoblanqueo; **T0'**, fotografía de las células con el microscopio confocal después del fotoblanqueo a tiempo 0'; **T180'**, fotografía de las células con el microscopio confocal 180 min después del fotoblanqueo. Las imágenes fueron obtenidas con una magnificación de 400x. **B.** Porcentaje de recuperación de la fluorescencia de la célula endotelial fotoblanqueada a los tiempos de 0, 90 y 180 min después del fotoblanqueo co-cultivadas con células MSC-CD63-RFP (línea punteada de color azul) o células HIF-MSC-CD63-RFP (línea punteada de color rojo). Los resultados son relativos a T0' y se muestran como la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes; \*\*P<0,01. N: 3.

## 4.7 Actividad Funcional del Ligando Jagged1

### Incorporado en Exosomas de MSC y HIF-MSC.

Como se observó que los exosomas de MSC o HIF-MSC incorporaban el ligando de la vía Notch Jagged1, se estudió si este ligando contenido en los exosomas era capaz de inducir cambios en la actividad transcripcional de genes diana de la vía de Notch en HUVEC. Con este fin, los exosomas aislados a partir del medio de recolección MSC o las HIF-MSC, se agregaron a cultivos de células HUVEC y se dejaron actuar durante 2 h. Pasadas las 2 h, se analizó mediante qPCR la actividad transcripcional de los genes diana de la vía de Notch *HES1* y *HEY2* en HUVEC. Los resultados mostraron que el nivel de expresión de *HES1* y *HEY2* era significativamente mayor en células HUVEC tratadas con exosomas que procedían de las células HIF-MSC respecto a los de MSC (Figura 4.14 A). Este efecto se perdía si los exosomas habían sido previamente incubados con un anticuerpo neutralizador de Jagged1, sugiriendo una activación específica de la vía de Notch a través del Jagged1 incorporado en los exosomas (Figura 4.14 A). Como control positivo, se extrajo RNA y se analizó mediante qPCR la expresión de *HES1* o *HEY2* en células HUVEC que se sembraron 24 h antes sobre pocillos previamente recubiertos con el ligando Jagged1. Por otro lado, como control negativo, se trataron las células HUVEC con el inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa RO. Como se esperaba, estos tratamientos resultaron en un aumento y un descenso en los niveles transcripcionales de los genes *HES1* y *HEY2*, respectivamente. Además, se observó que las HUVEC tratadas con exosomas procedentes de MSC o de HIF-MSC y RO mostraban la misma inhibición que las HUVEC tratadas solamente con RO (Figura 4.14 B).



**Figura 4.14 Aumento de la expresión de genes diana de la vía de Notch en células HUVEC tratadas con exosomas procedentes de MSC o HIF-MSC. A.** Análisis mediante qPCR de la expresión de los genes diana de la vía de Notch *HES1* y *HEY2* en células HUVEC tras 2 h de incubación con exosomas procedentes de MSC o HIF-MSC previamente incubados o no con un anticuerpo neutralizador de Jagged1 ( $\alpha$ -Jag). **B.** Análisis mediante qPCR de la expresión de *HES1* y *HEY2* en células HUVEC sembradas sobre placas recubiertas con Jagged1 o tratadas con el inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa RO. Por un lado, las células sembradas sobre un recubrimiento de Jagged1 (Jagged1) se trataron también con  $\alpha$ -Jag. Por otro lado, a células HUVEC tratadas con RO también se les agregaron exosomas procedentes de MSC o HIF-MSC. Exos MSC: Exosomas procedentes de MSC; Exos HIF-MSC: Exosomas procedentes de HIF-MSC. Los resultados se representan como la media del aumento de la expresión respecto al tratamiento control (células HUVEC incubadas con el vehículo, PBS)  $\pm$  DS de tres experimentos independientes; \*\* $P < 0,01$  y \*\*\* $P < 0,001$ . N: 3.

## 4.8 HIF-1 $\alpha$ Aumenta el Potencial Angiogénico de los Exosomas de MSC a través de Jagged1

Dado que la vía de señalización de Notch está involucrada en la formación y ramificación de vasos sanguíneos a través en parte de la señalización mediada por el ligando Jagged1 de la vía<sup>182</sup>, lo siguiente fue evaluar el papel del ligando Jagged1 incorporado en los exosomas de MSC y de HIF-MSC en el potencial angiogénico de estas células. Para estudiar esto, se realizaron dos tipos de ensayos, el ensayo *in vitro* de formación de tubos con HUVEC y el ensayo *in vivo* de *Plug* de Matrigel.

### 4.8.1 Ensayo *In vitro* de Formación de Tubos

Las células HUVEC se sembraron sobre Matrigel y se trataron con exosomas procedentes de MSC o HIF-MSC que previamente habían sido incubados o no con el anticuerpo neutralizador de Jagged1 ( $\alpha$ -Jag). Las condiciones experimentales fueron las definidas en la Figura 4.15.

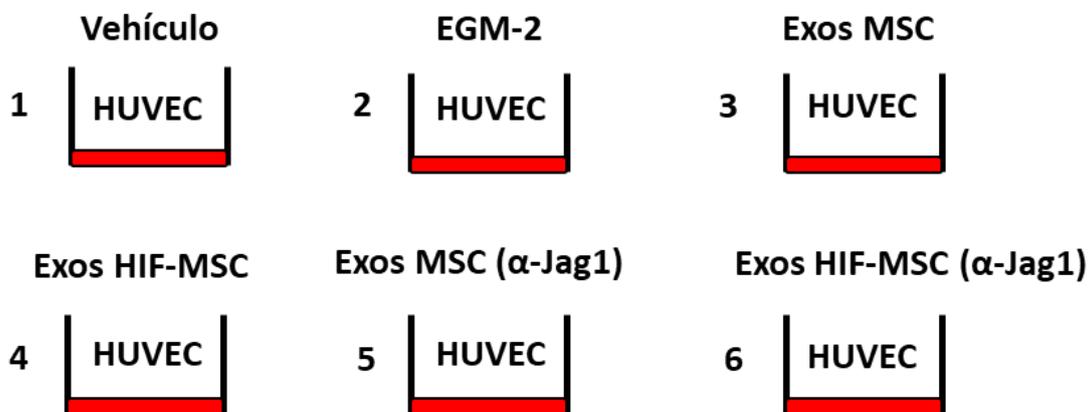
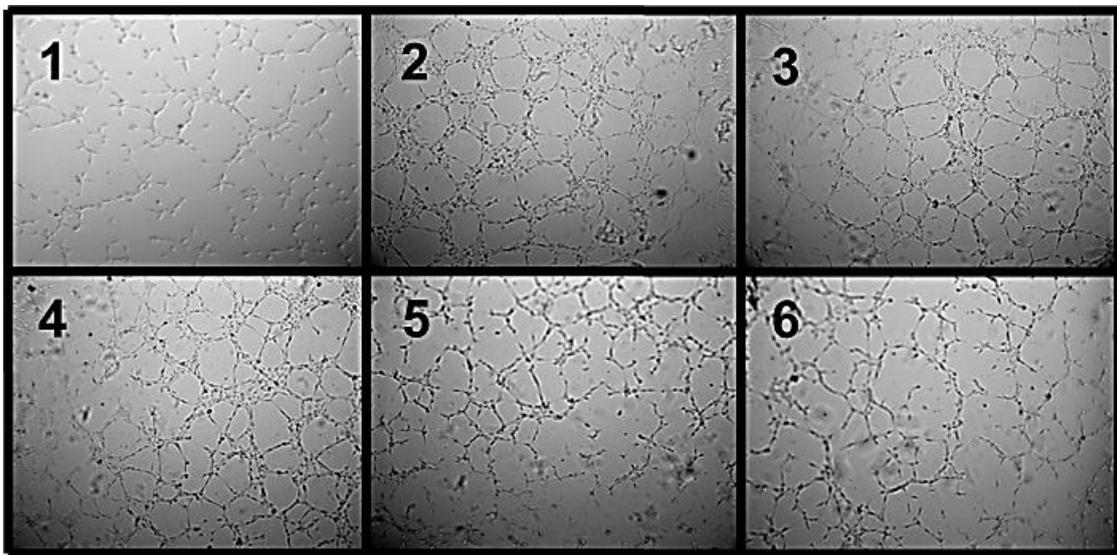


Figura 4.15 Condiciones experimentales del ensayo de formación de tubos *in vitro* para evaluar el papel del Jagged1 incorporado en los exosomas procedentes de MSC o de HIF-MSC en el proceso angiogénico.

1: Control del experimento (HUVEC sembradas sobre matrigel con medio basal y tratadas con PBS (vehículo)). 2: Control positivo del experimento (HUVEC sembradas sobre matrigel y cultivadas con EGM-2). 3, 4, 5 y 6: HUVEC sembradas sobre matrigel y tratadas con 30  $\mu$ g/mL de exosomas procedentes de medio de recolección de MSC o de HIF-MSC previamente incubados o no con  $\alpha$ -Jag.

Pasadas 12 h, se realizó una evaluación visual de la formación de tubos mediante microscopía óptica y se adquirieron fotos en diferentes campos a 100 aumentos. Algunas fotografías representativas de las estructuras formadas por las células HUVEC bajo las diferentes condiciones son las que se muestran en la Figura 4.16. En ellas, se puede observar que las células endoteliales tratadas con exosomas derivados de MSC o HIF-MSC mostraron un número mayor de estructuras en forma de tubo que las HUVEC tratadas con el vehículo (Control; Figura 4.15, apartado B condiciones 3 y 4). Este incremento desaparecía con  $\alpha$ -Jag sugiriendo que la formación de tubos era inducida por los exosomas de un modo Jagged1 dependiente (Figura 4.15 B, condiciones 5 y 6).



**Figura 4.16** Imágenes representativas de las estructuras formadas por las células HUVEC en un ensayo *in vitro* de formación de tubos bajo las diferentes condiciones experimentales definidas en la Figura 4.15. **1:** Control del experimento (HUVEC sembradas sobre matrigel con medio basal y tratadas con PBS (vehículo)). **2:** Control positivo del experimento (HUVEC sembradas sobre matrigel y cultivadas con EGM-2). **3, 4, 5 y 6:** HUVEC sembradas sobre matrigel y tratadas con 30  $\mu$ g/mL de exosomas procedentes de medio de recolección de MSC o de HIF-MSC previamente incubados o no con  $\alpha$ -Jag. Fotografías obtenidas con un microscopio óptico con magnificación de 100x.

A continuación, se cuantificaron las fotografías haciendo uso del servicio Wimasis. Este análisis mostró que cuando se comparaba la capacidad de inducir la formación de tubos entre los exosomas procedentes de MSC o HIF-MSC en células HUVEC, los parámetros de análisis como el número de tubos, de bucles, de puntos de ramificación y de redes

eran significativamente mayores cuando se agregaban exosomas procedentes de HIF-  
MSC a las células HUVEC y además dependiente de Jagged1 (Figura 4.17).

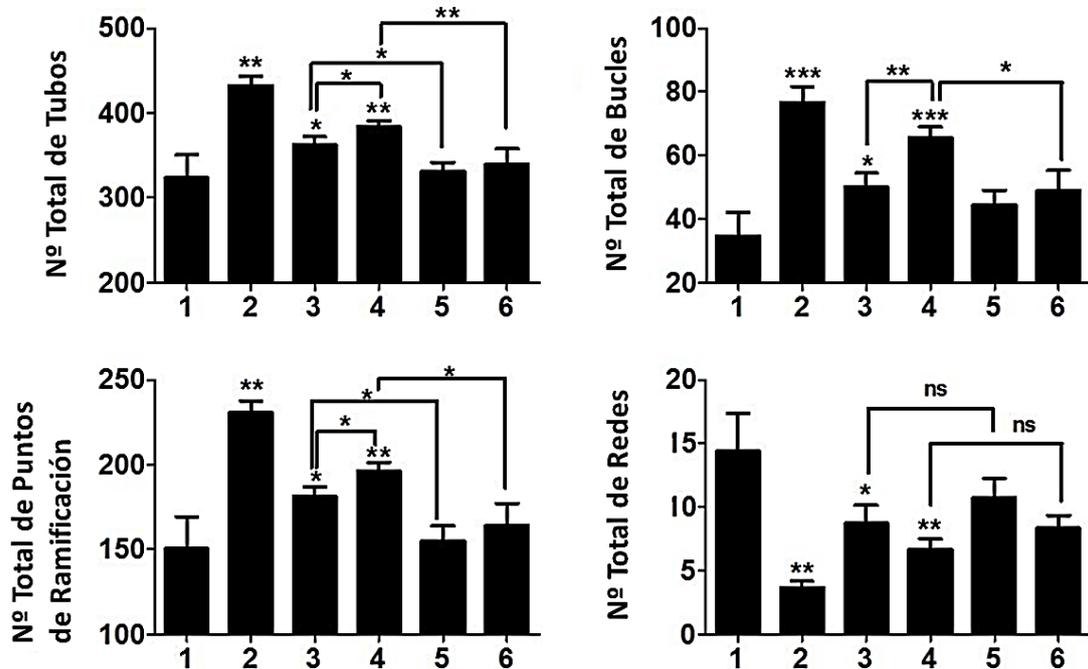
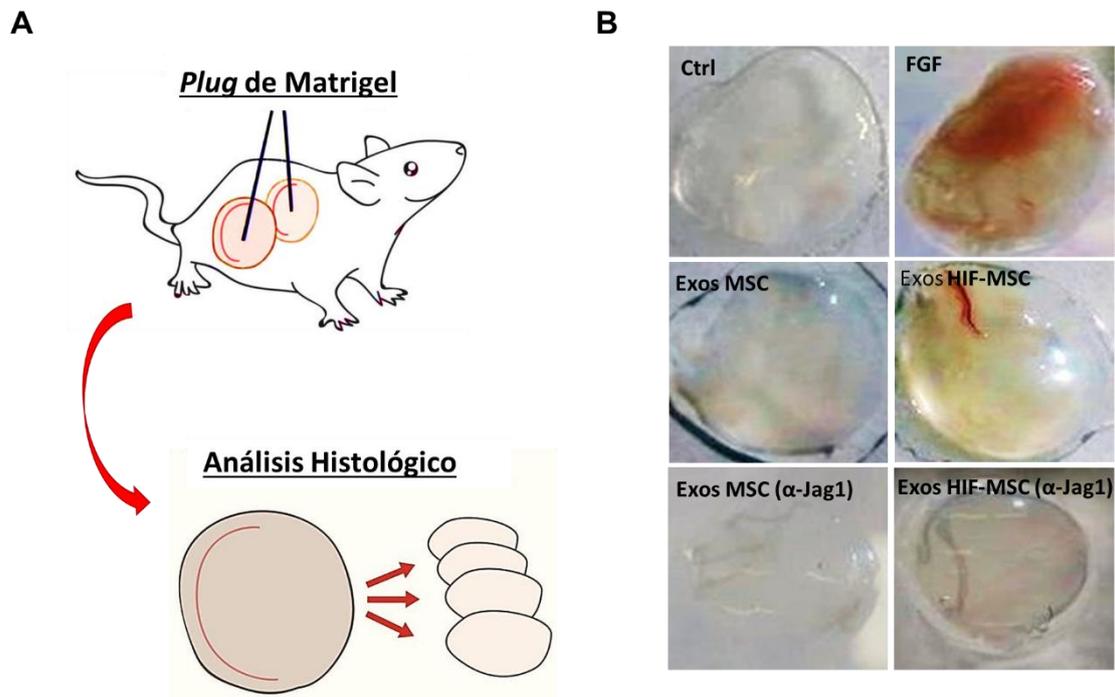


Figura 4.17 Análisis de las fotografías adquiridas del ensayo *in vitro* de formación de tubos en células HUVEC bajo las condiciones experimentales definidas en la Figura 4.15. El análisis de las fotografías adquiridas se realizó con el servicio Wimasis. Los parámetros evaluados por el servicio de análisis fueron: el número total de tubos, el número total de bucles, el número total de puntos de ramificación y el número total de redes. Los resultados se representan como la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  y \*\*\* $P < 0,001$ ; ns: las diferencias observadas no alcanzan la significatividad estadística. N: 3.

### 4.8.2 Ensayo *In vivo* de *Plug* de Matrigel

Finalmente, se evaluó *in vivo* el efecto observado *in vitro* de los exosomas procedentes de MSC o de HIF-MSC en el proceso de neovascularización. Para ello, se realizó un ensayo de *plug* de Matrigel en ratones nu/nu. Tras 14 días en el animal, se recuperaron los *plugs* (Figura 4.18 A). La observación a simple vista de los *plugs* de matrigel recuperados, mostraban una vascularización abundante en el control positivo (matrigel con FGF) y pobre en el control (matrigel con vehículo) (Figura 4.18 B). En los *plugs* de matrigel tratados con exosomas procedentes de células MSC o HIF-MSC, también se

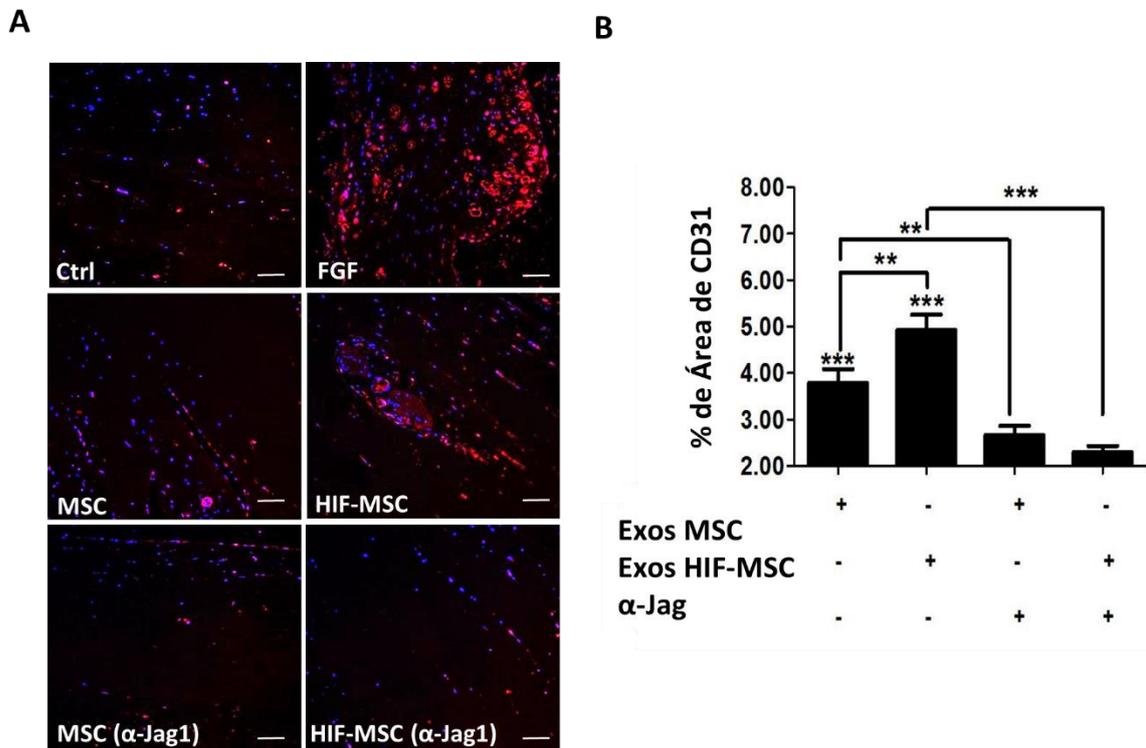
podían observar más vascularizados que el control, sobre todo aquellos cargados con exosomas de HIF-MSC (Figura 4.18 B). Sin embargo, aquellos *plugs* cargados con exosomas procedentes de MSC o de HIF-MSC previamente incubados con el anticuerpo neutralizador de Jagged1, mostraban a simple vista una vascularización similar a la del *plug* con el tratamiento control.



**Figura 4.18 Neovascularización inducida por los exosomas derivados de MSC o de HIF-MSC en un ensayo de *plug* de matrigel en ratones *nu/nu*.** **A.** Esquema del procedimiento experimental del ensayo de *plug* de matrigel. **B.** Fotografías representativas de los *plugs* de matrigel recuperados tras 14 días en ratones *nu/nu* bajo diferentes tratamientos. **Ctrl:** control del experimento, *plug* de matrigel mezclado con el vehículo (PBS); **FGF:** control positivo del experimento, *plug* de matrigel mezclado con el factor de crecimiento fibroblástico- $\beta$ ; **MSC:** *plug* de matrigel mezclado con exosomas procedentes de MSC; **HIF-MSC:** *plug* de matrigel mezclado con exosomas procedentes de HIF-MSC; **MSC ( $\alpha$ -Jag1):** *plug* de matrigel mezclado con exosomas procedentes de MSC previamente incubados con  $\alpha$ -Jag1; **HIF-MSC ( $\alpha$ -Jag1):** *plug* de matrigel mezclado con exosomas procedentes de HIF-MSC previamente incubados con  $\alpha$ -Jag1.

Una vez los *plugs* de matrigel fueron recuperados, se realizó un análisis inmunohistológico mediante inmunofluorescencia para cuantificar la presencia de vasos sanguíneos mediante la detección del marcador endotelial CD31 (Figura 4.19). Se observó que, los exosomas de ambos tipos celulares inducían la formación de nuevos vasos de una forma Jagged1 dependiente. Además, los exosomas procedentes de HIF-

MSC inducían una mayor formación de vasos que aquellos procedentes de MSC (Figura 4.19).



**Figura 4.19** Cuantificación de la vascularización mediante la detección inmunofluorescente del marcador endotelial CD31 en secciones histológicas de los *plugs* de matrigel. **A.** Marcaje en rojo de CD31 en los *plugs* de matrigel. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las imágenes fueron obtenidas con una magnificación de 100x. **B.** Cuantificación mediante ImageJ del porcentaje de área positiva para CD31. Los resultados se representan como la media  $\pm$  DS respecto del tratamiento control de tres experimentos independientes; \*\* $P < 0,01$  y \*\*\* $P < 0,001$ . N: 3.



## **4. Resultados**

### **Sección B:**

Papel de la vía de señalización de Notch en el proceso de malignización inducido por exosomas de la línea celular de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231.

### **4.9 Aislamiento y Caracterización de los Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7**

Para aislar exosomas a partir del medio de cultivo de MDA-MB-231 y de MCF-7, se incubaron en medio de recolección y se realizó un protocolo de ultracentrifugaciones seriadas. Finalmente, la fracción exosomal aislada se examinó mediante microscopía electrónica, seguimiento de nanopartículas con el instrumento NanoSight NS300 y WB, igual que en la sección 4.2.

El análisis mediante microscopía electrónica de las fracciones exosomales procedentes de MDA-MB-231 o de MCF-7 (EMDA-MB-231 o EMCF-7 respectivamente), mostró que las fracciones exosomales contenían vesículas con los tamaños y características morfológicas típicas de exosomas (Figura 4.20).

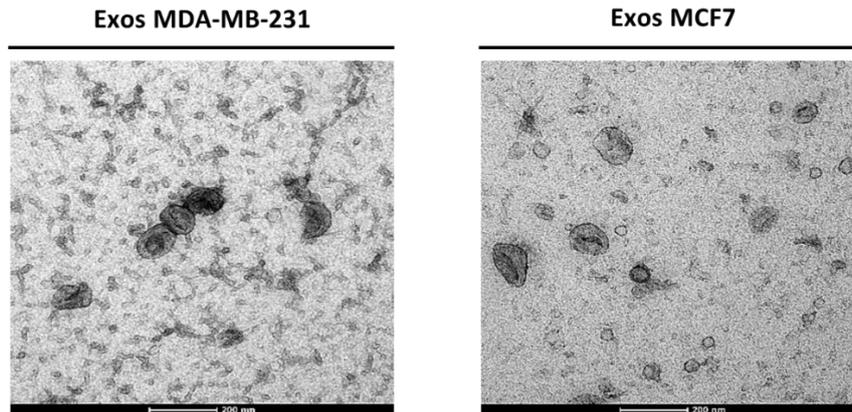


Figura 4.20 Análisis morfológico mediante microscopía electrónica de las fracciones exosomales aisladas mediante ultracentrifugación a partir de los medios de recolección de exosomas procedentes de MDA-MB-231 o de MCF-7. Barra de escala: 200 nm.

Para estudiar el rango de tamaños de las fracciones exosomales, se utilizó el equipo NanoSight NS300, con el que se pudo observar que las partículas presentes en las fracciones exosomales de ambos tipos celulares se encontraba dentro del rango de tamaños de 30-150 nm característico de las muestras de exosomas (Figura 4.21).

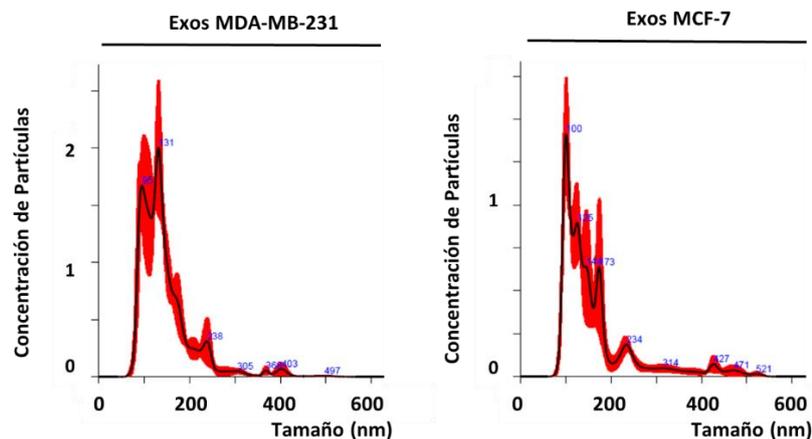
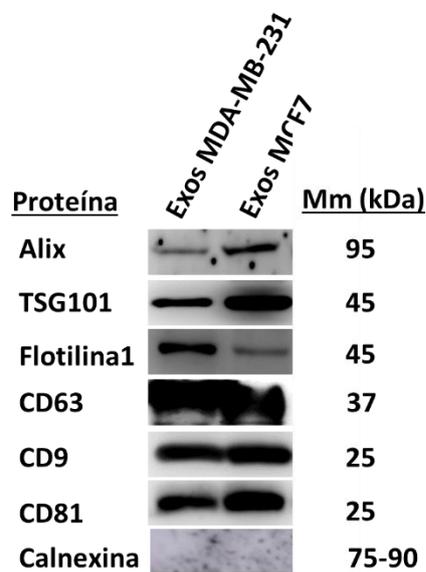


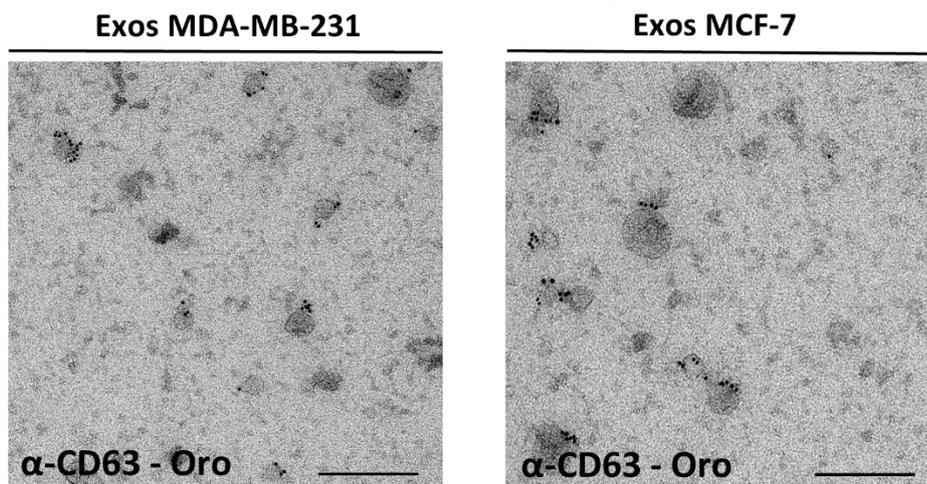
Figura 4.21 Análisis de la distribución de tamaños de las fracciones exosomales aisladas por ultracentrifugación a partir del medio de recolección de MDA-MB-231 y de MCF-7 mediante el instrumento de seguimiento de nanopartículas NanoSight NS300. Puede observarse que el rango de tamaños se encuentra principalmente entre los 50 y los 150 nm. En el eje vertical: ( $\times 10^7$ ) partículas/mL; y tamaño en nanómetros (nm) en el eje horizontal.

En el análisis mediante WB se examinaron, por un lado, los marcadores exosomales Alix, TSG101, Flotilina1, CD63, CD9 y CD81, y por otro, la posible presencia del marcador de retículo endoplásmico Calnexina para descartar la presencia de cuerpos vesiculares de otros orígenes. Además, mediante inmunomarcaje con oro se analizó la presencia de CD63 en las fracciones exosomales. Ambas técnicas permitieron observar altas concentraciones de marcadores exosomales en las muestras aisladas mediante ultracentrifugación a partir del medio de recolección de MDA-MB-231 o de MCF-7 (Figura 4.22), así como la ausencia de Calnexina en los aislados (Figura 4.22 A).

**A**



**B**



**Figura 4.22** Análisis mediante WB y microscopía electrónica de marcadores exosomales en las fracciones exosomales procedentes de MDA-MB-231 (Exos MDA-MB-231) o de MCF-7 (Exos MCF-7). A. Detección por WB de los marcadores exosomales Alix, TSG101, Flotilina1, CD63, CD9, CD81 y el marcador celular

Calnexina en extractos de proteína total de Exos MDA-MB-231 o de Exos MCF-7. Mm: Masa molecular. **B.** Microscopía electrónica para el inmunomarcaje con oro utilizando el anticuerpo contra el marcador exosomal CD63 ( $\alpha$ -CD63) en Exos MDA-MB-231 o Exos MCF-7. Barra de escala: 200 nm.

## **4.10 Estudio de la Vía de Señalización de Notch en Exosomas Procedentes de MDA-MB-231.**

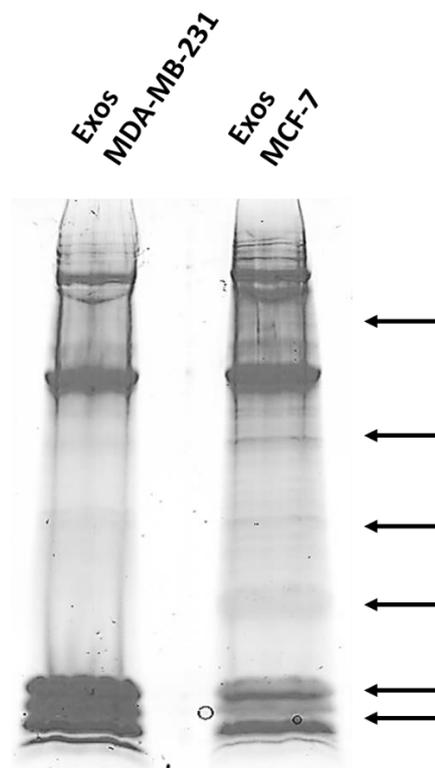
Los desajustes en la vía de Notch pueden conducir al desarrollo de patologías como el cáncer<sup>64</sup>. Trabajos recientes han demostrado que mutaciones en NOTCH1 tienen una participación directa en diferentes tipos de leucemias y cánceres de mama<sup>281,282</sup>. En este sentido se observó que la diferencia en las líneas tumorales de cáncer de mama metastásicas (MDA-MB-231) y no metastásicas (MCF-7) eran en parte debidas a una mayor actividad de Notch1 en MDA-MB-231<sup>239</sup>. Además, la sobreexpresión del dominio intracelular del receptor de Notch1 (N1ICD) en MCF-7 hacía que estas células adquirieran características más agresivas mediante la inducción de la transición de epitelio a mesénquima (EMT).

En la primera sección de resultados de este trabajo, se observó que el ligando funcional de la vía de Notch Jagged1 podía incorporarse en exosomas. Siendo Notch una vía íntimamente relacionada con el desarrollo tumoral, en esta sección se estudió la relación entre los posibles componentes de la vía de señalización de Notch incorporados en exosomas derivados de la línea tumoral metastática MDA-MB-231, y su actividad sobre la vía de señalización de Notch en la línea tumoral MCF-7.

### **4.10.1 Estudio del Contenido Proteico de los Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7**

Varios estudios han demostrado que los exosomas procedentes de MDA-MB-231 o de MCF-7 presentan diferencias en el contenido en biomoléculas como proteínas o miRNAs<sup>283</sup>.

Con el objetivo de estudiar el contenido proteico de los exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7, se realizó un estudio de identificación de proteínas totales en los exosomas procedentes de ambas líneas celulares mediante espectrometría de masas. En primer lugar, los exosomas se aislaron del medio de recolección de MDA-MB-231 y de MCF-7 y tras su lisis se cargaron en un gel de poliacrilamida para su posterior separación por SDS-PAGE (30 µg de proteína exosomal por pocillo). Tras la electroforesis, el gel se tiñó con azul coomassie (Figura 4.23). A simple vista, se observaron diferencias en el patrón de bandas de las proteínas exosomales derivadas de ambas líneas celulares. Algunas de las diferencias se señalan en la Figura 4.23.



**Figura 4.23** Detección de proteínas exosomales de MDA-MB-231 y de MCF-7 mediante separación en gel de SDS-PAGE y posterior tinción con azul coomassie.

A partir del extracto total de proteínas obtenido desde exosomas secretados por MDA-MB-231 y MCF-7 se realizó un análisis proteómico mediante espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para identificar las proteínas presentes en ambos extractos (un resumen se puede encontrar en la Tabla 4.7 y la Tabla 4.8).

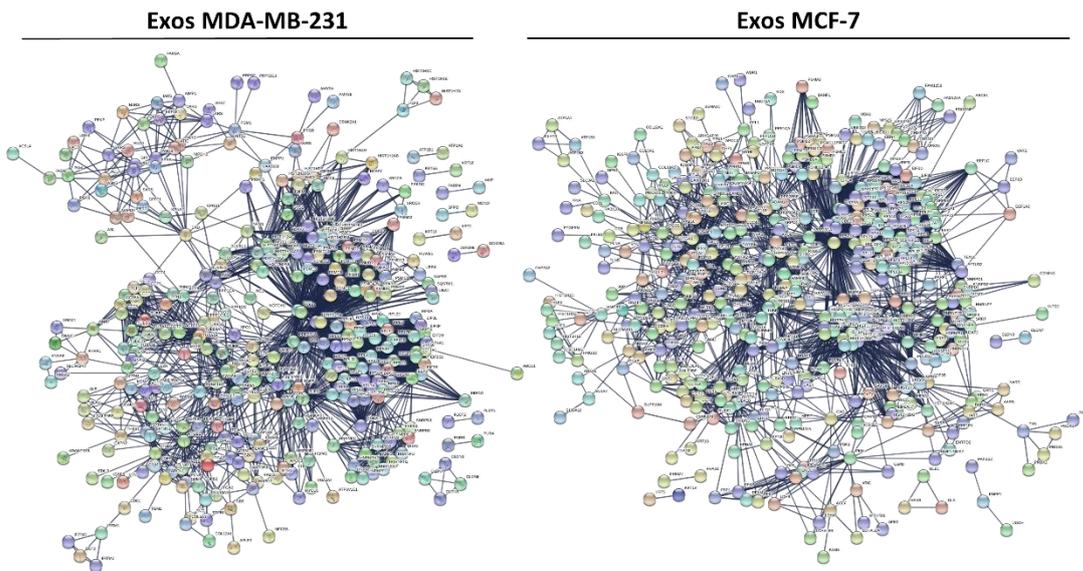
Tabla 4.7 Resumen de las proteínas identificadas en los exosomas procedentes de MDA-MB-231.

Código de la proteína	Nombre de la proteína
Notch1	<i>Neurogenic locus notch homolog protein 1</i>
UB	<i>Ubiquitin</i>
CD81	<i>Tetraspanin-28</i>
CD9	<i>Tetraspanin-9</i>
ICAM1	<i>Intercellular molecule 1</i>
TGFβ	<i>Transforming growth factor-β</i>
SDCBP	<i>Syntenin-1</i>
RAB10	<i>Ras-related protein Rab-10</i>
MFGE8	<i>Lactadherin</i>
APOB	<i>Apolipoprotein B-100</i>
RAB7A	<i>Ras-related protein Rab-7a</i>
PKM	<i>Pyruvate kinase</i>
VIM	<i>Vimentin</i>
CEMIP	<i>Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein</i>
RNF149	<i>E3 ubiquitin-protein ligase RNF149</i>

Tabla 4.8 Resumen de las proteínas identificadas en los exosomas procedentes de MCF-7.

Código de la proteína	Nombre de la proteína
Notch2	<i>Neurogenic locus notch homolog protein 2</i>
UB	<i>Ubiquitin</i>
Notch3	<i>Neurogenic locus notch homolog protein 3</i>
CD9	<i>Tetraspanin-9</i>
CDH1	<i>E-Cadherin</i>
ARRDC1	<i>Arrestin domain-containing protein</i>
RAB5A	<i>Ras-related protein Rab-5A</i>
CD81	<i>Tetraspanin-28</i>
PCDH1	<i>Protocadherin-1</i>
RAB14	<i>Ras-related protein Rab-14</i>
TSPAN15	<i>Tetraspanin-15</i>
UBR4	<i>E3 ubiquitin-protein ligase UBR4</i>

Además, con las proteínas identificadas diferencialmente en cada muestra se analizaron las interacciones entre ellas mediante el software STRING. Estos resultados mostraron una red de interacciones muy compleja (figura 4.24)



**Figura 4.24** Red de interacciones entre las proteínas contenidas en los exosomas procedentes de medio de cultivo de MDA-MB-231 (Exos MDA-MB-231) o de MCF-7 (Exos MCF-7) obtenido mediante el Software STRING.

Fue de particular interés la detección de proteínas relacionadas con la vía de Notch como subunidades de la  $\gamma$ -secretasa en ambos extractos, de Notch1 entre las proteínas contenidas en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de Notch2 y 3 en los procedentes de MCF-7 (Tabla 4.5 y Tabla 4.6). También fue interesante la aparición de moléculas relacionadas con rutas de ubiquitinación de proteínas dado que es uno de los procesos sugeridos para regular el direccionamiento de ciertas proteínas a los exosomas<sup>284,285</sup>; la presencia de marcadores exosomales como MFGE8, CD9, ICAM1, o de tráfico de vesículas de origen intracelular como RAB7A, RAB5A entre otros.

También se estudiaron los procesos biológicos que guardaban relación con las proteínas identificadas de manera diferencial en ambas muestras de exosomas mediante un análisis deGO. Algunos de ellos se resumen en las Tablas 4.9 y 4.10.

**Tabla 4.9** Análisis de Ontología Génica de las proteínas presentes diferencialmente en exosomas procedentes de MDA-MB-231.

Identificación GO	Función biológica	p-Valor
GO.0043312	Desgranulación de neutrófilos	7.23e-22
GO.0044772	Transición de la fase de mitosis del ciclo celular	6.45e-21
GO.0002376	Procesos del sistema inmunitario	5.20e-19
GO.2000045	Regulación de la transición G1/S	5.18e-19
GO.0090263	Regulación positiva de la vía de Wnt	1.64e-17
GO.0042060	Cicatrización de heridas	7.21e-13
GO.0010647	Regulación positiva de la comunicación celular	2.48e-08
GO.0008283	Proliferación celular	0.0366
GO.0001568	Desarrollo de vasos sanguíneos	0.00354
GO.0001503	Osificación	0.00519
GO.0016192	Transporte mediado por vesículas	8.69e-23
GO.0045055	Exocitosis regulada	2.33e-22
GO.0006606	Importación de proteínas al núcleo	0.0192

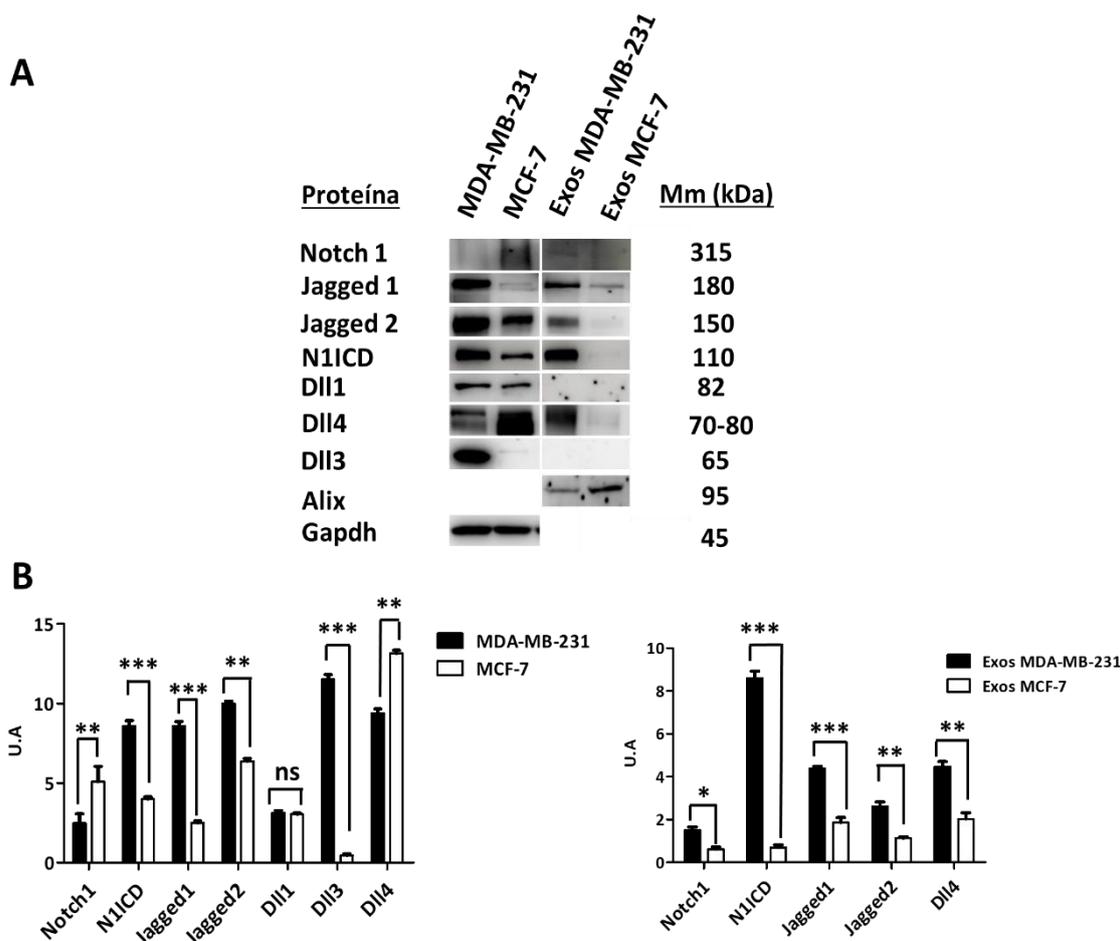
**Tabla 4.10** Análisis de Ontología Génica de las proteínas presentes diferencialmente en exosomas procedentes de MCF-7.

Identificación GO	Función biológica	p-Valor
GO.0006810	Transporte	7.56e-21
GO.0007155	Adhesión celular	1.29e-09
GO.0016192	Transporte mediado por vesículas	6.41e-17
GO.0060429	Desarrollo epitelial	5.27e-07
GO.0036258	Ensamblaje de MVB	4.77e-06
GO.0098609	Adhesión célula-célula	1.67e-05
GO.0007154	Comunicación celular	0.00015
GO.0002253	Activación del sistema inmunitario	0.0015
GO.0016049	Crecimiento celular	0.0033
GO.0098773	Desarrollo de la piel	0.0036
GO.2000147	Regulación positiva de la motilidad celular	0.0037
GO.0016055	Vía de señalización de Wnt	0.0060

De este modo, fue especialmente interesante la aparición en el análisis proteómico de algunos componentes de la vía de señalización de Notch indicando una posible regulación de la vía a través de los exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7.

#### **4.10.2 Los Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 Incorporan una Mayor Cantidad de Componentes de la Vía de Señalización de Notch Respecto a los de MCF-7**

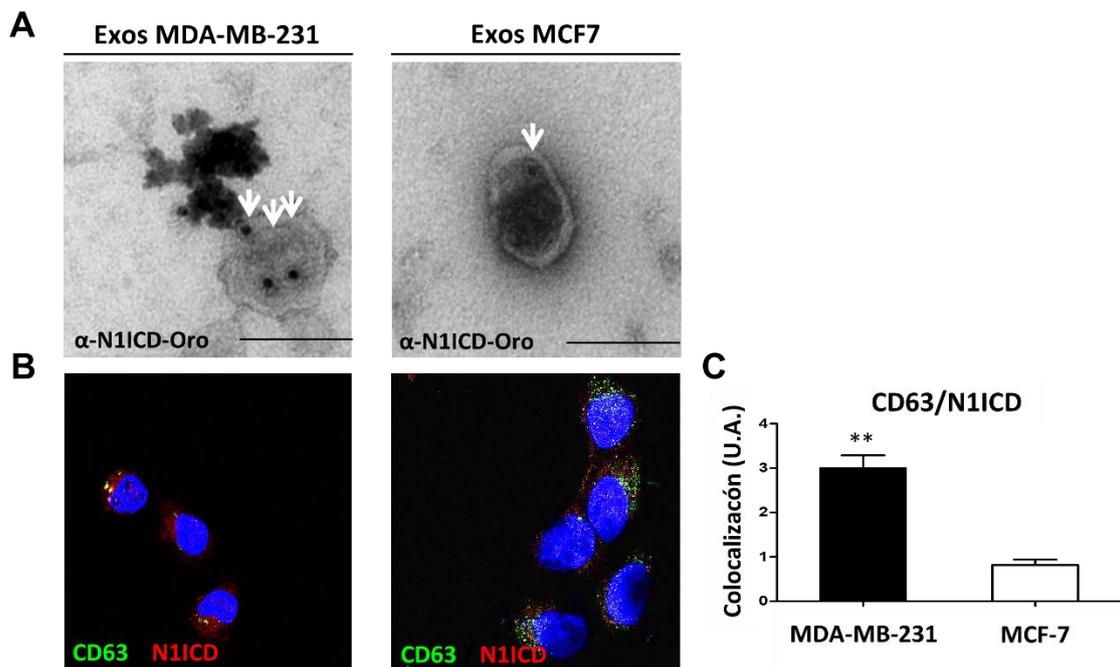
El análisis proteómico de los exosomas de ambas líneas celulares detectó la presencia de proteínas que participan en la señalización de la vía de Notch. Así, en esta sección se estudió más en profundidad mediante WB la posible presencia de los componentes de la vía de Notch en extractos proteicos de células y exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7. El análisis mediante WB permitió observar diferencias en la expresión de los diferentes componentes de Notch estudiados. En concreto, lo que se observó fue una sobreexpresión a nivel celular de los componentes de Notch: Jagged1, Jagged2, N1ICD, y Dll3 en la línea MDA-MB-231 y de Dll4 y Notch1 en MCF-7. También se observó que los exosomas de MDA-MB-231 y de MCF-7 se cargaban con Jagged1-2, Dll4 y N1ICD, y todos se incorporaban en mayor cantidad en los exosomas procedentes de la línea MDA-MB-231 (Figura 4.25). Además, la presencia de N1ICD en exosomas procedentes de MCF-7 era muy baja.



**Figura 4.25** Los componentes de la vía de Notch se encuentran en mayor cantidad tanto a nivel celular como a nivel exosomal en la línea tumoral de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 respecto a la no metastásica MCF-7. **A.** Estudio de los ligandos de la vía de Notch (Jagged1-2, Dll1,3-4), del receptor de Notch1 y del dominio intracelular de la vía de Notch1 (N1ICD) en extractos de proteína total de células, y de exosomas procedentes de medio de recolección de MDA-MB-231 o de MCF-7. Como control de carga de exosomas se utilizó Alix y para los extractos celulares Gapdh. Mm: Masa molecular. **B.** Análisis densitométrico de la expresión de los componentes de Notch en células (gráfica de la izquierda) y en exosomas (gráfica de la derecha) de MDA-MB-231 (barra negra) o de MCF-7 (barra blanca). Los niveles de proteína se normalizaron frente a los de Alix. U.A: Unidades arbitrarias. Resultados mostrados como la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes; ns: no tiene significancia estadística; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  and \*\*\*  $P < 0,001$ . N:3.

En este sentido, la presencia de N1ICD en exosomas también se analizó mediante la técnica de inmunomarcaje con oro de microscopía electrónica y por su co-localización con proteínas específicas de exosomas mediante microscopía confocal (Figura 4.25). Para estudiar la co-localización, se realizó un doble inmunomarcaje con anti-N1ICD (rojo)

y anti-CD63 (verde) en un cultivo de MDA-MB-231 o de MCF-7 (Figura 4.26 B) y se observó la presencia de estructuras intracelulares positivas para ambos anticuerpos (puntos de color amarillo en la Figura 4.26 B). La co-localización de N1ICD y CD63 se cuantificó en ambos cultivos celulares (Figura 4.26 C). El resultado mostró que en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 había mayor cantidad de estructuras N1ICD + y CD63 +, lo que sugería una vez más que N1ICD estaba presente en mayor cantidad en los exosomas derivados de MDA-MB-231 en comparación con los derivados de MCF-7.



**Figura 4.26 Identificación de N1ICD en exosomas de MDA-MB-231 y de MCF-7 mediante microscopía electrónica y colocalización con CD63.** **A.** Microscopía electrónica para el inmunomarcaje con oro utilizando el anticuerpo anti-N1ICD en exosomas derivados de MDA-MB-231 (Exos MDA-MB-231) o de MCF-7 (Exos MCF-7). Barra de escala: 50 nm. **B.** Fotografías de fluorescencia del inmunomarcaje doble con anticuerpos anti-N1ICD (rojo) y anti-CD63 (verde) en cultivos de MDA-MB-231 o de MCF-7. Barra de escala: 50 nm. **C.** Cuantificación de los puntos de co-localización (amarillos) para el doble inmunomarcaje de los cultivos de MDA-MB-231 y de MCF-7. U.A: Unidades arbitrarias. Resultados mostrados como la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes; ns: no tiene significancia estadística; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  and \*\*\*  $P < 0,001$ . N: 3.

### **4.10.3 Evaluación de la Actividad sobre la Vía de Señalización de Notch de los Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7**

Como se ha comentado previamente, se ha observado que la sobreexpresión de N1ICD en MCF-7 contribuye a que las células adquieran características tumorales más agresivas<sup>239</sup>. En la sección anterior, los resultados han sugerido que los exosomas procedentes de la línea tumoral metastática MDA-MB-231 tienen un mayor contenido en componentes de la vía de Notch en comparación con los procedentes de MCF-7. Entre estos componentes se encontraba el dominio intracelular activado de Notch1, N1ICD. De este modo, en esta sección estudiamos la funcionalidad de estos componentes y para ello, lo primero fue analizar la transferencia de exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7 a cultivos de MCF-7.

#### **4.10.3.1 Internalización y Transferencia de Proteínas Exosomales Procedentes de MDA-MB-231 o de MCF-7 en Células MCF-7**

Estudios previos han sugerido que los exosomas de MDA-MB-231 o de MCF-7 pueden ser captados por cultivos de células de MCF-7 *in vitro*<sup>286</sup>. Con el objetivo de corroborar esto, se realizó un experimento en el que los exosomas aislados a partir del medio de recolección de MDA-MB-231 o de MCF-7 se tiñeron usando el kit “ExoGlow-Protein EV Labeling Kit”. Este kit lleva incluido un compuesto que tiñe las proteínas exosomales de color rojo y permite realizar un seguimiento de estas. De este modo, los exosomas teñidos de ambas líneas celulares se agregaron a cultivos de MCF-7 y se estudió la presencia de estructuras rojas en las células mediante microscopía confocal (Figura 4.27). En este análisis se pudieron observar estructuras de color rojo en las células MCF-7 tras añadir exosomas teñidos de rojo.

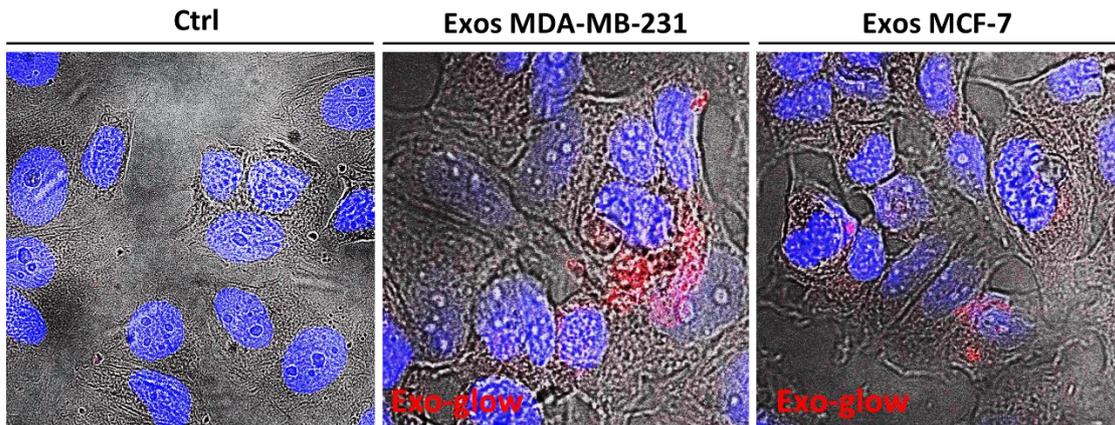
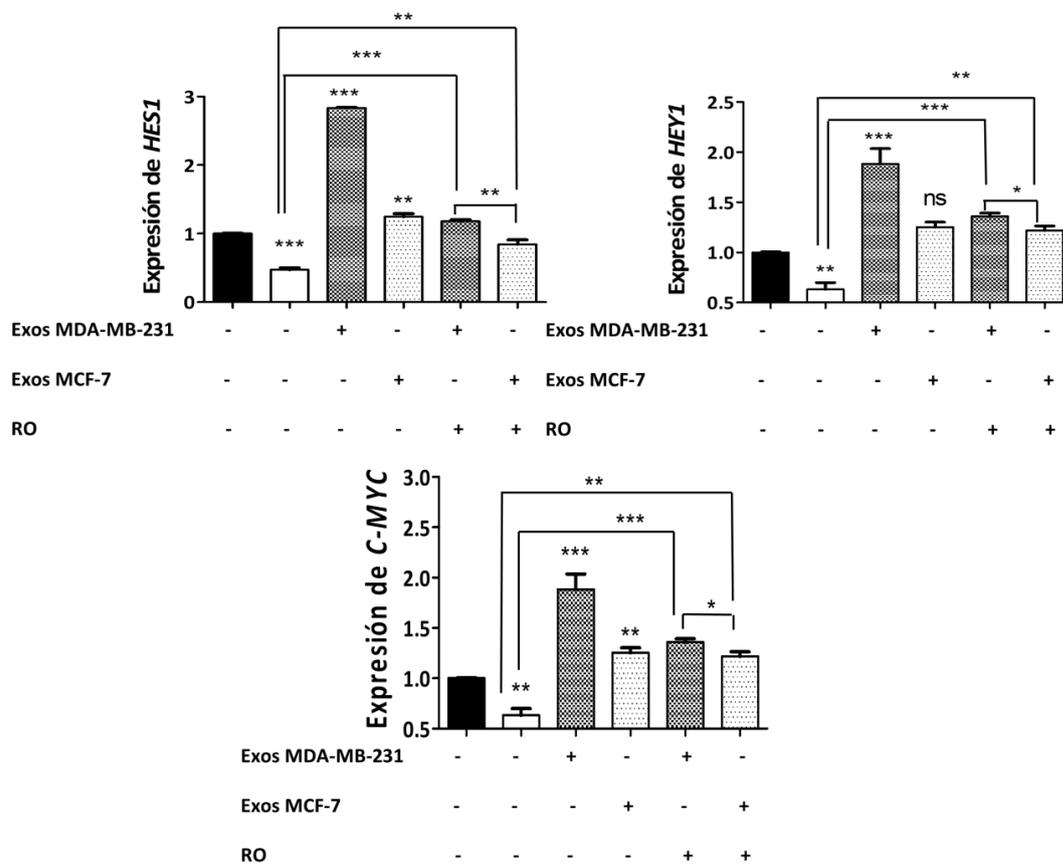


Figura 4.27 Análisis mediante microscopía confocal de la internalización y transferencia de proteínas exosomales (señal roja) procedentes de MDA-MB-231 o de MCF-7 a cultivos de MCF-7. Fotografías tomadas a 400X.

#### 4.10.4 Los Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7 Inducen Cambios en Genes Diana de la Vía de Notch al ser Agregados a Cultivos de MCF-7

El dominio intracelular de Notch es una pieza clave en la activación de la vía. Para estudiar el efecto de los componentes de la vía de Notch incorporados en los exosomas procedentes de MDA-MB-231, se agregaron exosomas aislados desde cultivos de MDA-MB-231 a cultivos de MCF-7. Además, como control se utilizaron exosomas de MCF-7. También, para estudiar sólo el efecto del N1ICD incorporado en los exosomas, se trataron o no los cultivos de MCF-7 con el inhibidor de la gamma secretasa, RO. Por lo tanto, aquellas células tratadas con el inhibidor carecían de la capacidad de generar NICD y activar la vía de Notch por sí mismas. Después de 2 h de incubación con los exosomas, se estudió mediante qPCR la expresión de los genes diana de la vía de Notch, *HES1*, *HEY1* y *C-MYC*, en presencia o ausencia del inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa. Se observó que los exosomas procedentes de cultivos de MDA-MB-231 inducían cambios más destacables en la expresión de los genes diana de la vía de Notch en comparación con aquellos procedentes de MCF-7. En presencia de RO, los exosomas derivados de MDA-MB-231 indujeron también un aumento mayor en la expresión de los genes diana de la vía de Notch en comparación con los exosomas derivados de MCF-7. Estos resultados

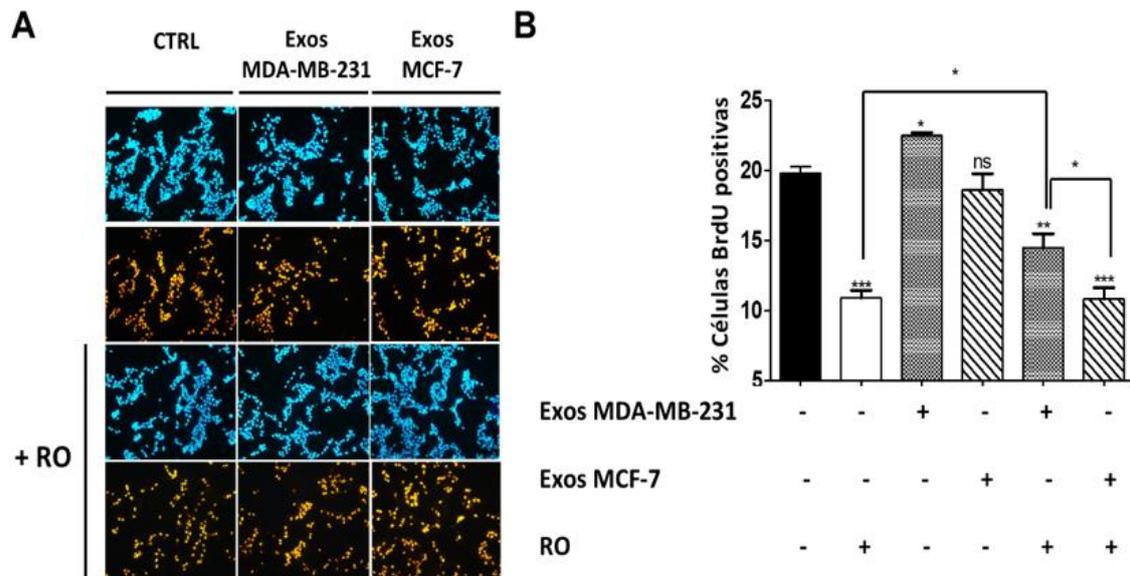
sugerían que los componentes de Notch incorporados en los exosomas de ambas líneas celulares eran funcionales. También puede deducirse que la mayor cantidad de componentes de Notch en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 podían ser los responsables del mayor aumento en la expresión de los genes diana de la vía en MCF-7. Además, los cultivos de MCF-7 en presencia de RO y tratadas con exosomas procedentes de MDA-MB-231 seguían mostrando una expresión elevada de los genes diana de la vía de Notch. Esto sugería que el N1ICD contenido en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 podría ser el causante de la reversión del efecto del inhibidor sobre la expresión de los genes diana (Figura 4.28).



**Figura 4.28** Análisis mediante qPCR de la expresión de los genes diana de la vía de Notch *HES1*, *HEY1* y *c-MYC* en MCF-7. Análisis mediante qPCR a partir del RNA total de MCF-7 de la expresión de los genes diana de la vía de Notch *HES1*, *HEY1* y *c-MYC* después de ser incubadas, en presencia o ausencia de RO, 2 h con exosomas procedentes de cultivos de MDA-MB-231 o de MCF-7 (Exos MDA-MB-231, Exos MDA-MB-231 + RO, Exos MCF-7 o Exos MCF-7 + RO,). Resultados mostrados como la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes; ns: no tiene significancia estadística; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  and \*\*\*  $P < 0,001$ . N: 3.

## **4.11 Participación de los Componentes de la Vía de Notch Contenidos en Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7 en la Proliferación Celular de MCF-7**

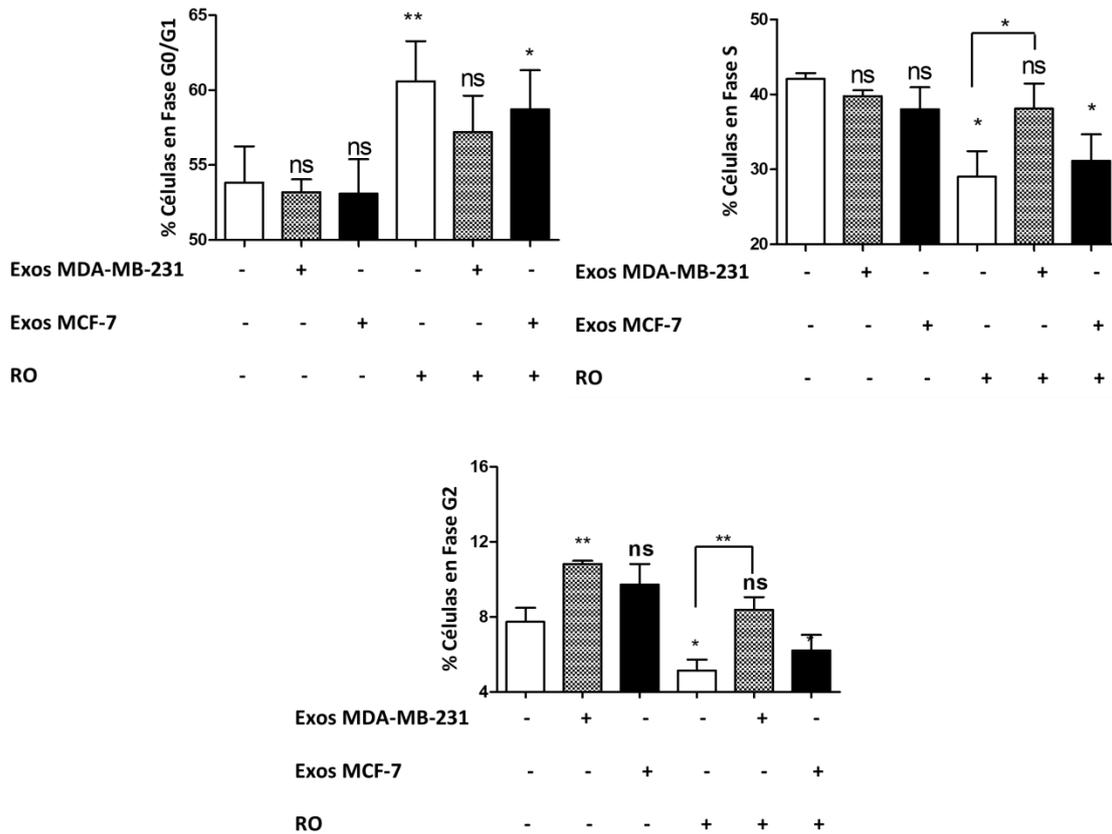
Trabajos previos han observado una relación directa entre Notch1 y el protooncogén *C-MYC* y su influencia sobre la proliferación tanto de células tumorales como normales<sup>68,287</sup>. Los resultados de la sección anterior sugirieron que los exosomas procedentes de MDA-MB-231 inducían un aumento en la expresión de *C-MYC* en parte mediada por N1ICD. De este modo, en esta sección, se estudió mediante un ensayo de BrdU el efecto de los exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7, en presencia y ausencia de RO, sobre la tasa de división celular de MCF-7 (Figura 4.29). Por un lado, se observó que al agregar a cultivos de MCF-7 exosomas procedentes de MDA-MB-231 se incrementaba el número de células de MCF-7 en división. Por otro lado, el inhibidor de la vía de Notch RO, redujo significativamente el porcentaje de células en división respecto del control viéndose el efecto parcialmente revertido al agregar junto con el inhibidor, los exosomas procedentes de MDA-MB-231, sugiriendo una vez más que el efecto podía ser dependiente del N1ICD contenido en los exosomas procedentes de MDA-MB-231.



**Figura 4.29** Los exosomas procedentes de MDA-MB-231 y no de MCF-7, inducen un aumento en la proliferación y recuperan parcialmente la proliferación de MCF-7 bajo los efectos del inhibidor de la vía de Notch RO. **A.** Imágenes representativas de cada condición experimental del ensayo de BrdU, tomadas a una magnificación de 100X. Total de los núcleos en azul y BrdU en naranja. **B.** Cuantificación del porcentaje de células que incorporaron BrdU respecto del total (teñidas con DAPI) en las fotografías tomadas de cada condición experimental. Resultados mostrados como la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes; ns: no tiene significancia estadística; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  and \*\*\*  $P < 0,001$ . N: 3.

La proliferación celular implica la entrada de una célula en el proceso de ciclo celular que culmina con la división o mitosis de una célula dando lugar a dos células idénticas a partir de la primera. Así, durante el ciclo celular, se cumplen una serie de fases conocidas como: fase G0/G1 o fase estacionaria, fase de síntesis o fase S y fase G2 o fase de mitosis. Estas fases son fácilmente reconocibles en función de la cantidad de DNA que contiene una célula. De este modo, también estudiamos qué fases del ciclo celular se veían afectadas bajo las distintas condiciones experimentales ensayadas en el experimento de BrdU (Figura 4.30). Para ello, se agregaron de nuevo exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7 a cultivos de MCF-7 tratadas o no con RO. En el estudio de citometría se observó que al inhibir la vía de Notch en MCF-7 con RO, las células frenaron su ciclo en la fase G0/G1 y se redujo la cantidad de células en las fases S y G2. Por otro lado, se vio que las MCF-7 tratadas con exosomas procedentes de MDA-MB-231 aumentaron la cantidad de células en la fase G2. Además, sólo cuando los cultivos de MCF-7 se trataron

con RO y con exosomas procedentes de MDA-MB-231 se revertía, al menos parcialmente, el efecto del inhibidor. Esta reversión, no se observó al tratar las células con RO y con exosomas procedentes de cultivos de MCF-7, lo que parecía indicar de nuevo que los efectos podrían estar al menos en parte mediados por una señalización de la vía de Notch dependiente del N1ICD incorporado en los exosomas de MDA-MB-231.



**Figura 4.30** Los exosomas procedentes de MDA-MB-231 y no de MCF-7 inducen un aumento de la mitosis y una recuperación parcial de la proliferación de MCF-7 bajo los efectos del inhibidor de la vía de Notch RO. Análisis con FlowJo\_V10 de los datos adquiridos mediante citometría de flujo. Resultados mostrados como la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes; ns: no tiene significancia estadística; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  and \*\*\*  $P < 0,001$ .

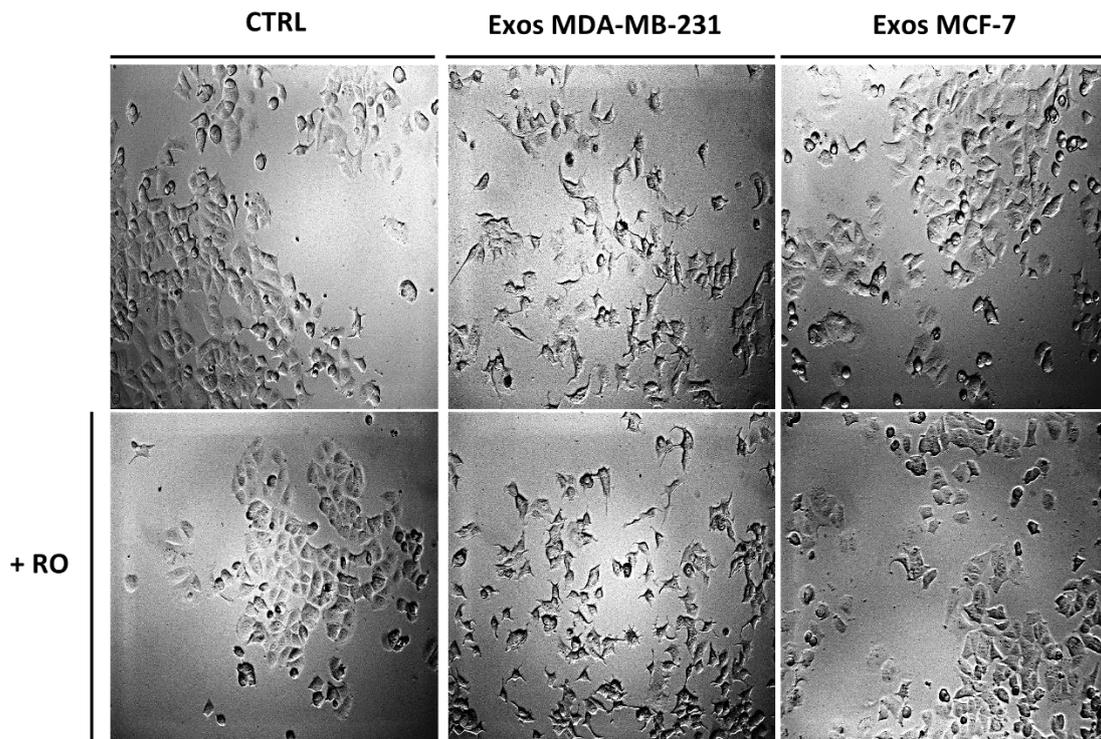
## **4.12 Los Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 Inducen el Proceso de EMT en Cultivos de MCF-7 en Parte Debido a N1ICD**

La vía de Notch es considerada una vía de señalización inductora de la EMT<sup>232</sup>. Además, ha sido descrito que la expresión de N1ICD en cultivos de MCF-7 les confiere comportamientos más agresivos a través de una inducción del proceso de EMT<sup>239</sup>. De este modo, lo siguiente fue evaluar el efecto de los exosomas derivados de MDA-MB-231 y de sus componentes de la vía de señalización de Notch, sobre el proceso de EMT en cultivos de MCF-7.

### **4.12.1 Análisis de Características Morfológicas del Proceso de EMT en Cultivos de MCF-7**

Las células epiteliales en cultivo aparecen manteniendo múltiples contactos entre ellas, con pocas protuberancias y formando parches similares a un pavimento de adoquines. En cambio, las células con un fenotipo más mesenquimal reducen el contacto entre ellas apareciendo más individualizadas y aumentan el nº de protuberancias<sup>231</sup>. Estas características pueden ser observadas a simple vista mediante microscopía óptica. Para analizar la influencia de la vía de Notch y del N1ICD contenido en exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7 sobre la activación de la EMT en cultivos de MCF-7 se tomaron fotografías con un microscopio óptico de los cultivos sin tratar y tratados con exosomas de ambos tipos celulares, en presencia o ausencia de RO (Figura 4.31). A partir de estas fotografías se realizó una exploración visual directa de los rasgos morfológicos que pudieran ser significativos del proceso de EMT (Figura 4.31). Se pudo observar que las células tratadas con el inhibidor de la vía de señalización de Notch RO mostraban un aspecto más epitelial, aumentando los contactos entre células y formando parches de células con una morfología similar a un pavimento de adoquines. En cambio, las células MCF-7 tratadas con exosomas procedentes de MDA-MB-231, y no de MCF-7, mostraban reducido el contacto entre las células apareciendo más células individuales (Figura 4.31).

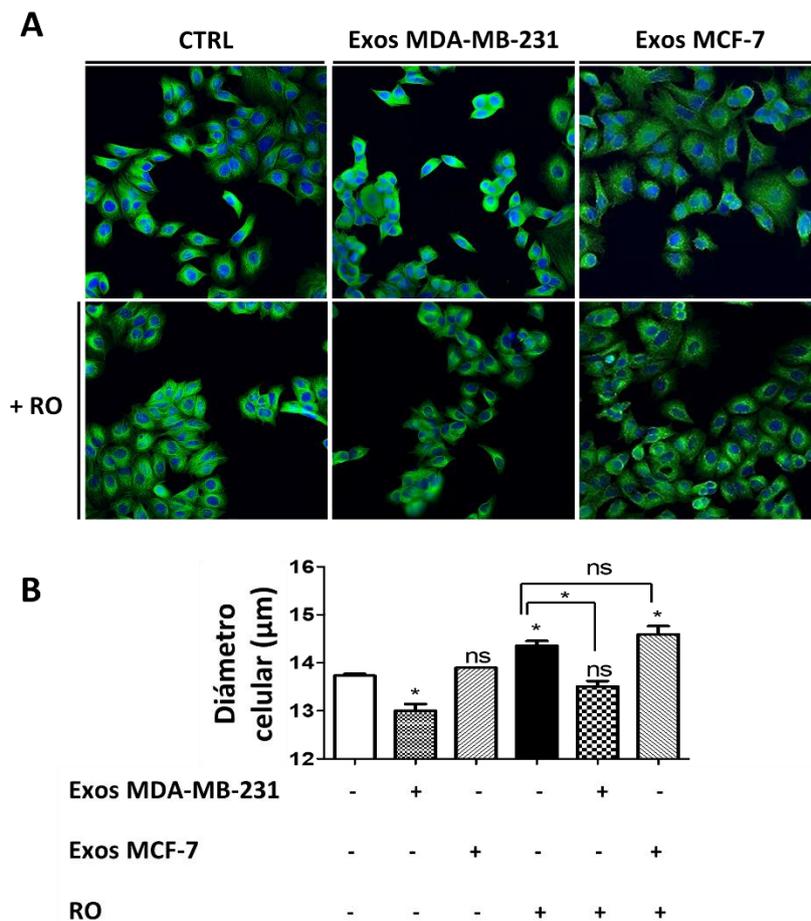
En estas células también se observaban más protuberancias que en las células control. Por otro lado, se vio que las células tratadas con RO y con exosomas procedentes de MDA-MB-231, y no de MCF-7, veían revertido el efecto del inhibidor RO, apareciendo de nuevo principalmente más células individualizadas y con más protuberancias que las células tratadas solamente con RO o el control. Estos resultados sugirieron que los exosomas procedentes de MDA-MB-231 podrían estar induciendo el proceso de EMT en parte debido al N1ICD contenido en sus exosomas ya que eran capaces de revertir los efectos del inhibidor de la vía de Notch RO.



**Figura 4.31 Estudio de la EMT mediante exploración directa con un microscopio óptico de la morfología celular de cultivos de MCF-7 tratados, en presencia o ausencia del inhibidor RO, con exosomas procedentes de MDA-MB-231 o de MCF-7. Imágenes representativas de cada condición experimental tomadas a una magnificación de 100X.**

Por otro lado, varios trabajos han señalado un comportamiento más agresivo en células de pequeño tamaño<sup>288-290</sup>. Por ello se analizó el tamaño de las MCF-7 bajo las distintas condiciones experimentales ensayadas en la Figura 4.31. Con este fin, se realizó una inmunofluorescencia contra la proteína Tubulina (Figura 4.32). Después, se adquirieron fotografías de las células en campos elegidos al azar con el instrumento automatizado

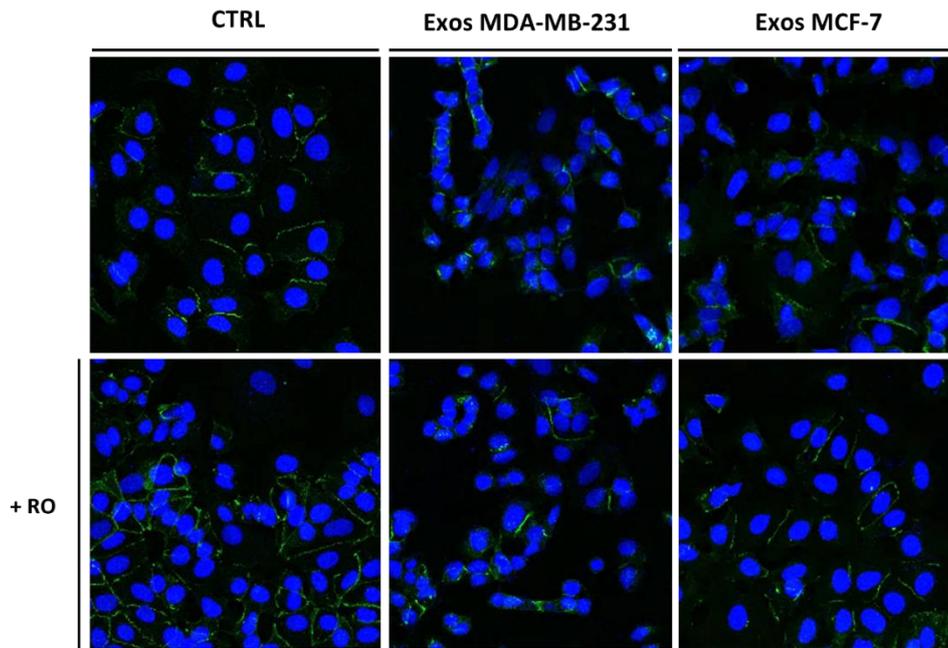
Incell y se analizó el diámetro de las células, a través de la señal verde correspondiente a la detección de la Tubulina de las MCF-7, mediante el software Incell Analyzer (Figura 4.32). Se pudo observar un aumento en el diámetro de las MCF-7 tratadas con RO. Sin embargo, las MCF-7 tratadas con exosomas procedentes de MDA-MB-231, pero no de MCF-7, veía reducido su diámetro. Cuando se agregó RO junto con exosomas procedentes de MDA-MB-231, pero no de MCF-7, se recuperó un diámetro similar al control, aunque continuaba apreciándose una tendencia hacia un diámetro de menor tamaño.



**Figura 4.32 Análisis morfológico de cultivos de MCF-7 tratadas, en presencia o ausencia del inhibidor RO, con exosomas procedentes del medio de recolección de MDA-MB-231 o de MCF-7. A.** Imágenes representativas del estudio de la morfología celular por microscopía de fluorescencia mediante el Inmunomarcaje de la proteína del citoesqueleto,  $\alpha$ -tubulina (verde). **B.** Cuantificación del diámetro celular de MCF-7 bajo las diferentes condiciones experimentales. Imágenes representativas de cada condición experimental tomadas a una magnificación de 200X. Resultados mostrados como la media  $\pm$  DS de dos experimentos independientes; ns: no tiene significancia estadística; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  and \*\*\*  $P < 0,001$ . N: 2.

## 4.12.2 Detección de Marcadores de EMT Mediante Inmunofluorescencia en Cultivos de MCF-7

La EMT se acompaña de un cambio en la expresión y localización de proteínas marcadoras del fenotipo epitelial o mesenquimal. De este modo, una de las formas de detectar el proceso de EMT es a través del estudio de marcadores epiteliales como la E-cadherina y/o la Ocludina1 y mesenquimales como la N-cadherina y/o la Vimentina. Así, se estudió la localización y expresión del marcador epitelial E-cadherina y del mesenquimal N-cadherina mediante inmunomarcaje fluorescente en las células tratadas, en presencia o ausencia del inhibidor RO, con exosomas aislados a partir del medio de recolección de MDA-MB-231 o de MCF-7 (Figura 4.33, Figura 4.34 y Figura 4.35). Este análisis, permitió observar que en los cultivos tratados con RO se detectaba mayor señal procedente de la E-cadherina (Figura 4.33 y Figura 4.35; señal de color verde). También se observó que, las MCF-7 tratadas con RO mostraban una señal procedente de la E-cadherina localizada preferentemente en las regiones intercelulares. Por otro lado, cuando los cultivos eran tratados con exosomas de MDA-MB-231 ocurría lo contrario, se observaba una reducción en la señal procedente del inmunomarcaje de E-cadherina. Además, cuando los exosomas procedentes de MDA-MB-231 se agregaban a los cultivos de MCF-7 tratados con RO se observaba una reversión del efecto observado cuando los cultivos eran tratados solamente con el inhibidor. Sin embargo, los exosomas de MCF-7 al ser agregados sobre cultivos de MCF-7, tratadas o no con RO, no parecieron inducir cambios significativos sobre la señal procedente del marcador epitelial ni el mesenquimal. Otro aspecto interesante a resaltar fue que, en los cultivos de MCF-7 tratados, en presencia o ausencia de RO, con exosomas procedentes de MDA-MB-231, la señal procedente del inmunomarcaje de la E-cadherina parecía cambiar su localización a regiones principalmente perinucleares (Figura 4.33 y Figura 4.35).



**Figura 4.33** Imágenes representativas de microscopía confocal del inmunomarcaje con anti-E-Cadherina (verde) en cultivos de MCF-7 tratados, en presencia o ausencia de RO, con exosomas procedentes del medio de recolección de MDA-MB-231 y de MCF-7. Imágenes representativas de cada condición experimental tomadas a una magnificación de 200X.

Por otro lado, la señal de la N-Cadherina (Figura 4.34 y Figura 4.35; señal de color rojo) disminuía en los cultivos de MCF-7 tratados con RO. Sin embargo, esta señal aumentaba en los cultivos de MCF-7 tratados con exosomas de MDA-MB-231, y no de MCF-7, tanto en presencia como ausencia de RO. Los exosomas de MCF-7 no parecieron inducir cambios significativos en la cantidad de señal debida a la detección la N-Cadherina respecto a las células control.

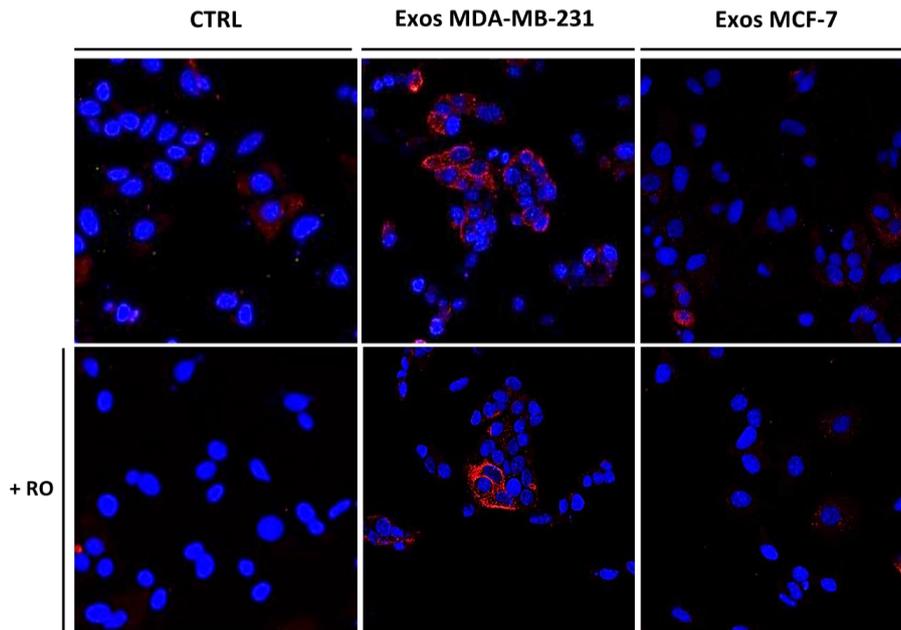


Figura 4.34 Imágenes representativas de microscopía confocal del Inmunomarcaje con anti-N-Cadherina (roja) en cultivos de MCF-7 tratados, en presencia o ausencia de RO, con exosomas procedentes del medio de recolección de MDA-MB-231 y de MCF-7. Imágenes representativas de cada condición experimental tomadas a una magnificación de 200X.

En conjunto, los resultados mostrados en las Figuras 4.33, 4.34 y 4.35, sugieren nuevamente que el N1ICD contenido en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 podría estar participando en la inducción del proceso de EMT al ser capaz de revertir total o parcialmente el efecto de RO sobre la EMT en cultivos de MCF-7.

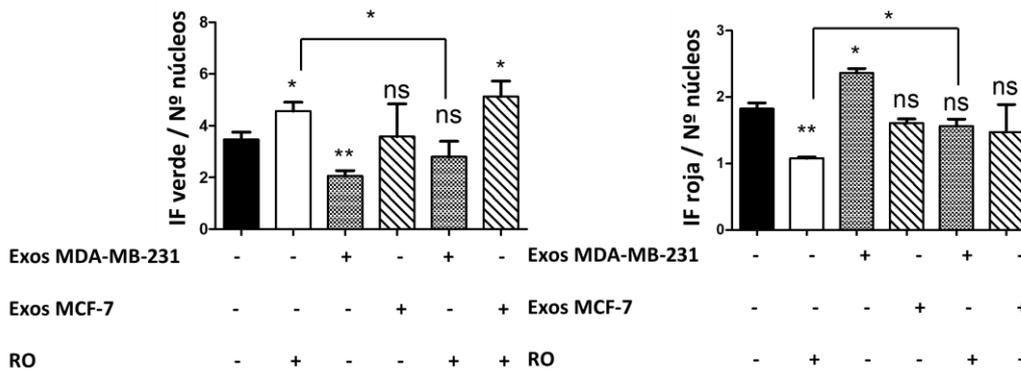


Figura 4.35 Cuantificación de la fluorescencia total respecto al número de núcleos de las imágenes adquiridas mediante microscopía confocal del inmunomarcaje fluorescente de E-Cadherina (IF verde) o N-Cadherina (IF roja) en cultivos de MCF-7 tratados, en presencia o ausencia de RO, con exosomas procedentes del medio de recolección de MDA-MB-231 y de MCF-7. IF: Intensidad de Fluorescencia. Resultados mostrados como la media  $\pm$  DS de dos experimentos independientes; ns: no tiene significancia estadística; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  and \*\*\*  $P < 0,001$ . N: 2.

### 4.12.3 Análisis de la Expresión Génica de Marcadores de EMT Mediante qPCR en Cultivos de MCF-7

Otra manera de analizar el proceso de EMT es mediante qPCR<sup>239</sup>. Así, se aisló el RNA total de los cultivos de células de MCF-7 tratadas, en presencia o ausencia de RO, con exosomas de MDA-MB-231 y de MCF-7. Se analizó mediante qPCR la expresión de marcadores epiteliales (*E-CADHERINA* y *OCLUDINA1*) y mesenquimales (*N-CADHERINA* y *VIMENTINA*) (Figura 4.36). A nivel transcripcional se observó que, al inhibir la vía de Notch con RO en cultivos de MCF-7, la expresión de los genes marcadores de epitelio aumentaba mientras que disminuía la de los genes marcadores mesenquimales. En cambio, al agregar a esos cultivos de MCF-7 exosomas procedentes de MDA-MB-231, y no de MCF-7, ocurrió lo contrario, la expresión de los genes marcadores de epitelio disminuía y aumentaba la de los mesenquimales. Por otro lado, al agregar exosomas procedentes de MDA-MB-231 a cultivos de MCF-7 tratados con RO se revertía el efecto de RO. Nuevamente, estos resultados sugirieron que los exosomas procedentes de MDA-MB-231 inducían el EMT al ser agregados a cultivos de MCF-7 en parte debido al N1ICD contenido en sus exosomas.

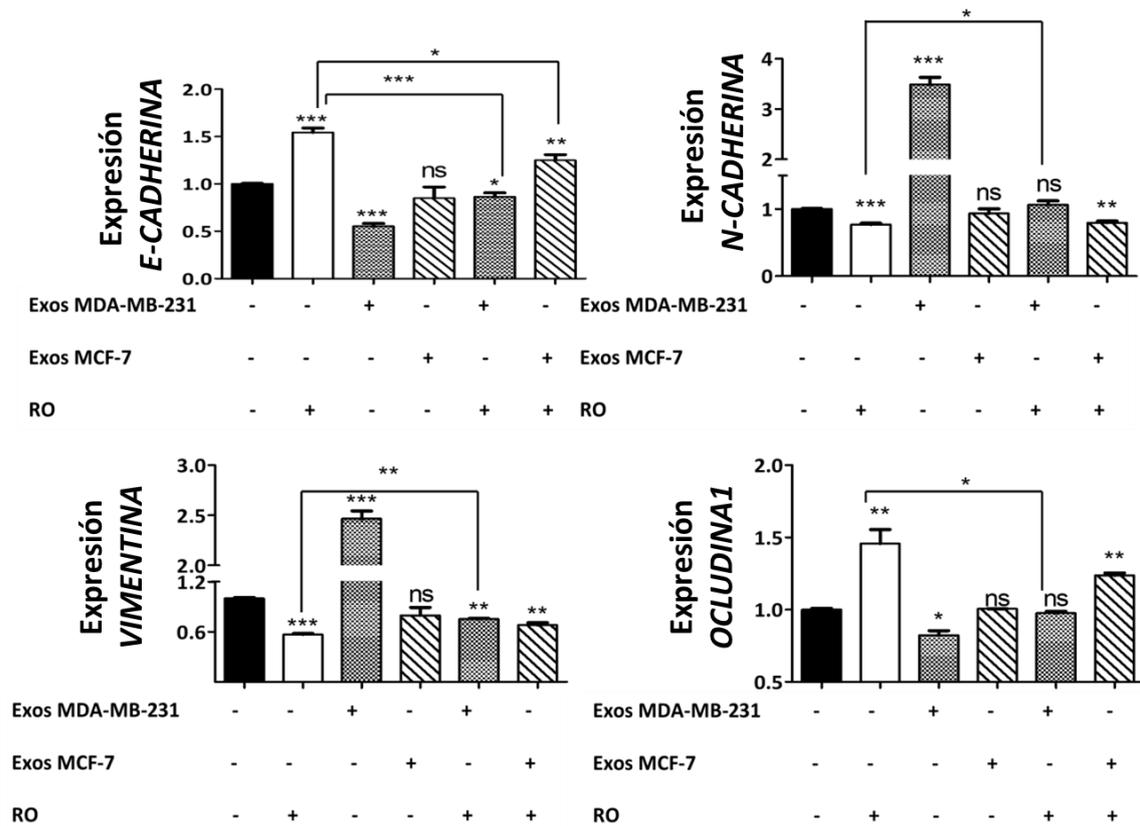
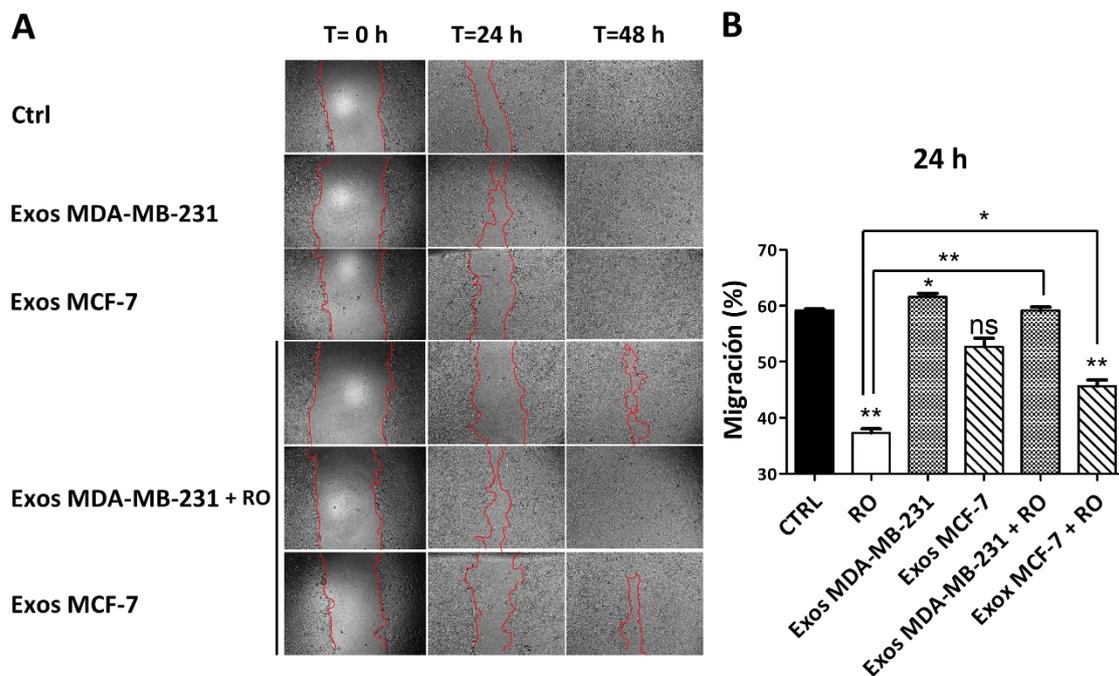


Figura 4.36 Análisis mediante qPCR de la inducción de la EMT en cultivos de MCF-7 tratados, en presencia o ausencia de RO, con exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7. Análisis mediante qPCR de la expresión de genes marcadores de epitelio (*E-CADHERINA*, *OCLUDINA1*) y de mesénquima (*VIMENTINA*, *N-CADHERINA*) a partir del RNA total extraído de MCF-7 bajo las diferentes condiciones experimentales. Resultados mostrados como la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes; ns: no tiene significancia estadística; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  and \*\*\*  $P < 0,001$ . N: 3.

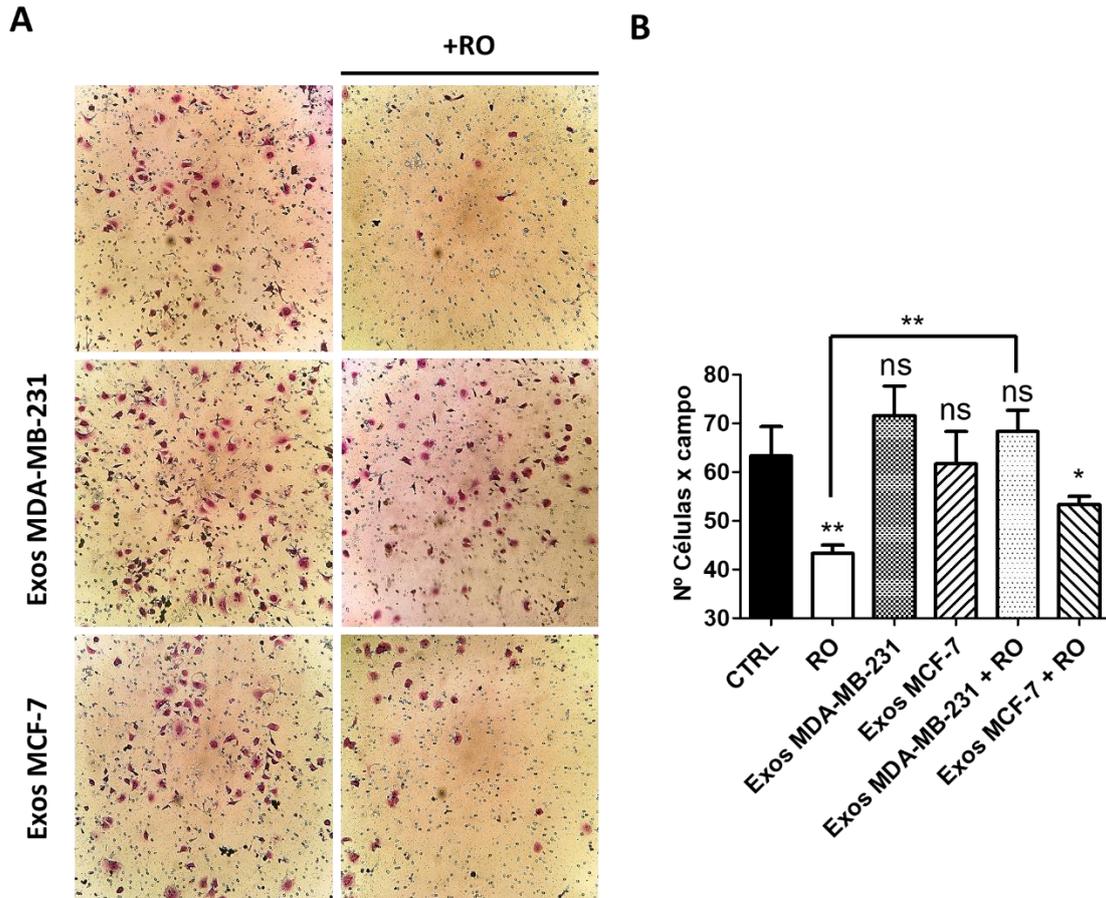
#### 4.12.4 Ensayo *In vitro* para Estudiar la Movilidad Celular en Cultivos de MCF-7

Esta descrito que la activación de la EMT aumenta la movilidad celular y la invasividad de las células tumorales<sup>232</sup>, por lo que una de las formas de confirmar si la EMT está siendo activada es mediante el estudio de la migración celular. Así, se realizaron dos experimentos *in vitro* para evaluar la movilidad celular de los cultivos de MCF-7 tratados con exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7, en presencia o no del inhibidor de la vía de Notch RO (Figura 4.37 y Figura 4.38). Se observó que los cultivos de MCF-7 tratados con RO presentaban una capacidad migratoria reducida en comparación a las

células control. Las células MCF-7 tratadas con RO y exosomas procedentes de MCF-7 tenían una capacidad migratoria similar a la de los cultivos tratados solamente con RO. No obstante, los cultivos de MCF-7 tratados con exosomas procedentes de MDA-MB-231 parecían mostrar una mayor movilidad. Fue de particular interés observar que aquellos cultivos en los que se agregaba el inhibidor RO junto con exosomas procedentes de MDA-MB-231, recuperaban la movilidad de las células control. Una vez más los resultados parecían indicar que el N1ICD contenido en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 era funcional y podía estar mediando, al menos en parte, los efectos sobre la EMT y el comportamiento en MCF-7 inducidos por los exosomas procedentes de MDA-MB-231.



**Figura 4.37** Análisis de la migración mediante un experimento *in vitro* de *scratch* en cultivos de MCF-7 tratados, en presencia o ausencia de RO, con exosomas procedentes de MDA-MB-231 o de MCF-7. **A.** Fotografías de microscopía óptica (100X) a diferentes tiempos (T=0 h: 0 h; T=24 h: 24 h; T= 48 h: 48 h) de la raya realizada en la monocapa de células MCF-7 bajo las diferentes condiciones experimentales. **B.** Cuantificación del % de migración de las MCF-7 bajo las diferentes condiciones experimentales. Resultados mostrados como la media  $\pm$  DS de dos experimentos independientes; ns: no tiene significancia estadística; \*P<0,05, \*\*P<0,01 and \*\*\* P<0,001. N: 2.



**Figura 4.38** Análisis de la migración en *transwell* con cultivos de MCF-7 tratados, en presencia o ausencia de RO, con exosomas procedentes de MDA-MB-231 o de MCF-7. **A.** Fotografías de microscopía óptica de los cultivos de MCF-7 bajo las diferentes condiciones experimentales (200X). **B.** Cuantificación del número de células MCF-7 en la parte de abajo del inserto bajo las diferentes condiciones experimentales. Resultados mostrados como la media  $\pm$  DS de dos experimentos independientes; ns: no tiene significancia estadística; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  and \*\*\*  $P < 0,001$ . N: 2.



# 5. Discusión



## **5. Discusión**

### **5.1 Sección A: Estudio de la contribución de los exosomas procedentes de MSC nativas y de HIF-MSC a su potencial angiogénico.**

Las MSC han sido propuestas como agentes terapéuticos para el tratamiento de diferentes patologías isquémicas como el infarto agudo de miocardio (IAM)<sup>291–293</sup>. A pesar de que todavía se desconocen los mecanismos que subyacen la capacidad de inducir angiogénesis por las MSC<sup>294</sup>, se ha hipotetizado mucho al respecto y se han situado como principales agentes la secreción de varios factores de crecimiento como VEGF o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)<sup>295–297</sup>. Por otro lado, varios estudios en los que se han utilizado diferentes modelos de patologías vasculares han permitido observar que gran parte de la capacidad regenerativa de las MSC viene mediada por efectos paracrinos<sup>298,299</sup>. Así, trabajos recientes han recapitulado los efectos terapéuticos de las MSC utilizando los exosomas liberados por estas células. Sin embargo, las vías a través de las cuales estas vesículas desarrollan su efecto continúan siendo desconocidas. En un estudio publicado por nuestro equipo de trabajo, se demostró que la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  en MSC incrementaba su potencial terapéutico cuando se las utilizaba en terapia celular cardiaca en un modelo de IAM en rata, debido en parte a un aumento de la angiogénesis en la zonas adyacentes al IAM<sup>161</sup>. De este modo, en este trabajo, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  en MSC sobre la composición, la tasa de secreción y el potencial angiogénico de los exosomas liberados por HIF-MSC.

Ha sido previamente descrito que la tasa de secreción de exosomas puede variar en función de las condiciones de cultivo como la hipoxia<sup>277,300</sup>, hipotetizándose un posible papel de los factores HIF-1 en el proceso. En este trabajo, observamos que las HIF-MSC

secretan más exosomas que las MSC (Figura 4.7, Figura 4.8). Se conocen varias moléculas como las proteínas Rab, SNARE o las moléculas de ceramida, que están relacionadas con los procesos de secreción de exosomas. Sin embargo, sigue sin tenerse un modelo completo del proceso y no se conoce el mecanismo por el cual se observa un aumento en la secreción de exosomas. No obstante, la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  ha sido relacionada con un aumento en la expresión de la proteína Rab22A, que está implicada en la formación de microvesículas<sup>301</sup>. Esta asociación podría ser un buen punto de partida para ahondar en el mecanismo por el cual la señalización a través de HIF-1 $\alpha$  provoca un aumento de la secreción de exosomas.

Para caracterizar los exosomas procedentes de MSC y de HIF-MSC se realizó, por un lado, un análisis de su contenido proteico global mediante proteómica (Figura 4.11, Tablas 4.4 y 4.5). Lo primero que se pudo observar fue que la composición de proteínas de los exosomas procedentes de MSC variaba en función de la expresión de HIF-1 $\alpha$ . Resulta de interés el hecho de que varias de las proteínas detectadas en los exosomas de HIF-MSC establecían relaciones a través de la ubiquitina. En concordancia con esto, como se comentó en la introducción, estudios previos han relacionado la ubiquitina como una etiqueta para la incorporación de moléculas en las vías de secreción celular, así como su incorporación a exosomas<sup>280</sup>. Por otro lado, también se estudió el contenido en miRNAs de los exosomas procedentes de ambos tipos celulares (Figura 4.10). De entre ellos destaca el hecho de una mayor presencia en exosomas procedentes de HIF-MSC de los miRNAs: miR-15, miR-16, miR-17, miR-31, miR-126, miR-145, miR-221, miR-222, miR-320a y miR-424, que habían sido previamente relacionados en otros trabajos con un papel en el proceso angiogénico<sup>279,302,303</sup>. Así mismo, los análisis GO y KEGG del patrón de miRNAs predominante en exosomas procedentes de HIF-MSC, mostraron una relación con procesos de tráfico vesicular, con la regulación positiva de la comunicación celular y también con rutas de señalización directamente emparentadas con la hipoxia o con una estabilización de HIF-1 $\alpha$  como las rutas de Wnt, TGF- $\beta$  o VEGF<sup>304,305</sup>. Además, cabe mencionar que, tanto el análisis proteómico como de los miRNAs contenidos en los exosomas procedentes de MSC o de HIF-MSC, guardaron relación con procesos de regulación de la vía de señalización de Notch. Este último aspecto hizo aumentar nuestro

interés sobre la señalización de esta vía a través de los exosomas liberados por MSC y HIF-MSC.

En los últimos años, se han dado a conocer una gran cantidad de estudios que sugieren una estrecha relación entre las vías de señalización de HIF-1 $\alpha$  y de Notch a diferentes niveles<sup>177,180,306-308</sup>. Así, se ha observado en varios de ellos que un aumento en la expresión de HIF-1 $\alpha$  puede dar lugar a un aumento en la expresión de algunos componentes de la vía de Notch como sus ligandos o sus receptores a través de una estabilización de NICD o de un aumento en la actividad de la vía a través de una interacción directa con la  $\gamma$ -secretasa<sup>180,307,309</sup>. Por otro lado, se ha visto que el ligando de la vía de Notch Dll4 puede ser incorporado en exosomas procedentes de la línea tumoral U87 y de células endoteliales HUVEC<sup>53</sup>. Por este motivo, y junto a los datos resultantes de nuestros análisis ómicos, se hipotetizó que HIF-1 $\alpha$  pudiera estar influyendo en los patrones de expresión de los componentes de la vía de Notch tanto a nivel celular como exosomal. En consonancia con esto, observamos que la sobreexpresión en normoxia de HIF-1 $\alpha$  aumentaba las cantidades de todos los ligandos de la vía de Notch a nivel celular (Figura 4.12). Además, observamos por primera vez que el ligando de la vía de Notch, Jagged1, era el único ligando que se incorporaba en los exosomas procedentes de MSC y que la expresión de HIF-1 $\alpha$  aumentaba también las cantidades totales de ligando en los exosomas. En concordancia con nuestras observaciones, en un estudio proteómico reciente publicado por Anderson, J. D. y sus colaboradores se detectó la presencia exclusivamente del ligando de la vía de Notch Jagged1 en vesículas extracelulares liberadas por MSC derivadas de médula ósea<sup>310</sup>. La discusión de si esta observación es particular de las MSC o si por el contrario es aplicable a otros tipos celulares requiere de más estudios. Otro aspecto que puede resultar interesante estudiar es el mecanismo de incorporación de ligandos de la vía de Notch en exosomas. En este trabajo, no se ha profundizado en esta cuestión. Sin embargo, los resultados del análisis proteómico de los exosomas procedentes de MSC y de HIF-MSC sugieren que sus proteínas establecen relaciones a través de la ubiquitina. En este sentido, la endocitosis de los ligandos de la vía de Notch viene muchas veces regulada por ubiquitinaciones en sus dominios intracelulares<sup>95,96,100</sup>. Además, en un trabajo publicado por mi compañera de laboratorio Ciria, M. y sus colaboradores se describió

un *crossstalk* entre la vía de Notch, HIF-1 $\alpha$  y la modificación postraducciona SUMO que se ha visto implicada también en la incorporación específica de biomoléculas en los exosomas<sup>311</sup>. Estas observaciones nos llevaron a hipotetizar que estas modificaciones postraduccionales pueden ser responsables de la internalización de Jagged1 en los exosomas procedentes de MSC y de HIF-MSC. Cabe decir también que la relación entre la ubiquitinación y la internalización del ligando Jagged1 en exosomas ya fue señalada en trabajos previos a este<sup>158,276</sup>.

A fin comprender los procesos involucrados en las características terapéuticas de las MSC, el objetivo inicial de este trabajo fue estudiar mecanismos moleculares que estuvieran participando en el potencial angiogénico de los exosomas procedentes de MSC y de HIF-MSC. De este modo, se decidió realizar estudios funcionales con los exosomas derivados de ambos tipos celulares sobre cultivos primarios de células endoteliales, HUVEC (ECs). Previamente a la realización de los ensayos funcionales, se monitorizó la transferencia de los exosomas de MSC y de HIF-MSC a las ECs (Figura 4.13). En ambos casos se observó transferencia de exosomas a las ECs. No obstante, la cuantificación de esta transferencia sugirió un tráfico de exosomas superior cuando los co-cultivos eran con HIF-MSC, presumiblemente debido al incremento en la secreción de exosomas que se había observado al mantener una expresión elevada de HIF-1 $\alpha$  en las MSC.

Ha sido descrita la capacidad de los exosomas de estimular las células diana por interacción directa de sus proteínas de superficie o mediante transferencia e incorporación de estas en la membrana plasmática de la célula que los recibe<sup>53,312</sup>. Por otro lado, también se sabe que las ECs HUVEC expresan receptores funcionales de la vía de señalización de Notch en su membrana plasmática<sup>313</sup>. En este trabajo se observó que la adición de exosomas procedentes del medio de recolección de MSC y de HIF-MSC a cultivos de HUVEC inducen cambios en la actividad de la vía de señalización de Notch de estas células (Figura 4.14). Además, los exosomas procedentes de HIF-MSC indujeron una activación de la vía mayor que los de MSC, probablemente debido a la mayor cantidad de ligando Jagged1. Para confirmar la especificidad de la activación de la vía de Notch en HUVEC por el ligando de Notch Jagged1, se inhibió el ligando, mediante un anticuerpo neutralizador, contenido en los exosomas derivados de MSC o de HIF-MSC

antes de agregarlos a los cultivos de células endoteliales. Estos exosomas, a diferencia de aquellos sin incubar con el anticuerpo neutralizador de Jagged1, no fueron capaces de inducir cambios significativos en la actividad de la vía de Notch en HUVEC. Estos resultados, sustentaron que, los cambios inducidos en la actividad de Notch en HUVEC por los exosomas de MSC o de HIF-MSC procedía de una estimulación específica de Jagged1.

En los prolegómenos de este manuscrito se explicó que el proceso angiogénico requiere de una fina coordinación entre la aparición de nuevos vasos sanguíneos y el mantenimiento de los existentes, correspondiéndole un papel muy importante en este proceso a la señalización a través de la vía de Notch<sup>314,315</sup>. En particular, se han apuntado los ligandos de la vía, Jagged1 y Dll4 como componentes clave de la vía de Notch en la regulación de este proceso, y con significados opuestos<sup>190,204,316</sup>. En contraste con la señalización mediada por Dll4, Jagged1 se ha propuesto como un ligando proangiogénico, funcionando a través de una inhibición de la señalización de la vía de Notch desencadenada por Dll4<sup>53,204</sup>. En consecuencia, nos aventuramos a hipotetizar que el incremento en la cantidad de ligando Jagged1 incorporado en los exosomas procedentes de HIF-MSC, podría ser el responsable, al menos en parte, del incremento en el potencial angiogénico desencadenado por estas células. Mediante un ensayo *in vitro* de formación de tubos con células HUVEC se observó que el ligando Jagged1 incorporado en los exosomas de MSC o de HIF-MSC influía en la capacidad de inducir la formación de estructuras características del proceso angiogénico como, las estructuras en forma de tubo o de bucle (Figura 4.15, Figura 4.16 y Figura 4.17). Profundizando en nuestra hipótesis, se observó mediante un experimento *in vivo* de plug de matrigel que existía una formación de vasos sanguíneos de nueva generación en el matrigel de una manera dependiente del ligando Jagged1 incorporado en los exosomas procedentes de MSC o de HIF-MSC (Figura 4.18 y Figura 4.19). Por consiguiente, ambos estudios, *in vitro* e *in vivo*, mostraron que el ligando Jagged1 incorporado en exosomas era importante en la inducción y/o regulación del proceso angiogénico. La complejidad del proceso angiogénico hace que sea un proceso difícil de estudiar. Varios trabajos han sugerido que el ligando Jagged1 de la vía de Notch contribuye a la angiogénesis *in vivo* en diferentes fases del proceso, incluyendo la formación de la pared arterial o en la

diferenciación de progenitores endoteliales a células endoteliales<sup>314,317,318</sup>. No obstante, van a ser necesarios más estudios para comprender de un modo más completo la contribución del ligando Jagged1 incorporado en exosomas en este proceso.

El trabajo correspondiente a esta perimar etapa de la tesis fue publicado en 2017 en la revista Stem Cells. Sin embargo, se podría objetar que en este trabajo no somos capaces de demostrar que la inducción de la angiogénesis proceda de la interacción directa entre el ligando Jagged1 asociado a la membrana de los exosomas con los receptores de Notch localizados en la membrana plasmática de las células endoteliales o que la inducción, alternativamente, proceda de la activación debido a la transferencia del ligando de las MSC o las HIF-MSC a las HUVEC. En la sección introductoria de este trabajo se explicó que la activación de la vía de Notch requiere, en primer lugar, de la interacción de un ligando de la vía con uno de los receptores de Notch. En segundo lugar, esta interacción provoca una ubiquitinación por la proteína MIB1 en la región intracelular del ligando y esta ubiquitinación induce al citoesqueleto unido a la región intracelular del ligando a que estire de él. Esa fuerza de tensión permite la exposición de su diana en el receptor para su escisión y consiguientemente, la activación de la vía. De este modo, la activación requiere de un citoesqueleto capaz de estirar del ligando y de la proteína MIB1 para desencadenar la ubiquitinación del ligando. Ha sido descrita la presencia de componentes del citoesqueleto en los exosomas, así como de la proteína MIB1<sup>101</sup>. Por consiguiente, el proceso de activación de la vía de Notch a través de exosomas y la consiguiente inducción del proceso angiogénico, es probable que esté ocurriendo tanto por transferencia como por interacción directa del ligando cargado en la superficie de los exosomas de MSC o de HIF-MSC con el receptor localizado en la membrana plasmática de las células endoteliales.

Algunos de los miRNAs expresados de manera diferencial en los exosomas procedentes de HIF-MSC, incluyendo miR99b, miR181a, miR181b, miR105 y miR125, regulan la expresión de proteínas de uniones intercelulares que pueden contribuir al proceso angiogénico<sup>319</sup>. No obstante, considerando que la adición de anticuerpos neutralizadores del ligando Jagged1 eliminó prácticamente por completo la actividad de Notch en HUVEC y redujo la angiogénesis, esto podría indicar que la respuesta celular a la señalización de la vía de Notch debe de ser importante en la coordinación de la

respuesta angiogénica. Este fenómeno podría estar haciendo a la célula más receptiva a otros factores proangiogénicos incorporados en los exosomas como miRNAs o factores de crecimiento<sup>319</sup>. De cualquier modo, van a ser necesarios más estudios para conocer la aportación de cada elemento en el proceso.

La ineficacia de las terapias convencionales en el tratamiento de patologías isquémicas como el IAM requiere del desarrollo de nuevas terapias que mejoren la prognosis. En este sentido, los exosomas podrían ser empleados como vehículos para ciertos fármacos o moléculas con un potencial terapéutico. En consonancia con esto, se están realizando ensayos clínicos con exosomas para el tratamiento de diferentes tipos de patologías. De ejemplo sirve el uso de exosomas del plasma sanguíneo en el tratamiento de úlceras cutáneas ([www.clinicaltrials.gov/identifiers NCT0256264](http://www.clinicaltrials.gov/identifiers/NCT0256264)). No obstante, continúa siendo importante, para conseguir que los exosomas se utilicen como vehículos terapéuticos, profundizar en aquellos mecanismos que dirigen la incorporación de ciertas moléculas potencialmente terapéuticas en exosomas, así como los mecanismos moleculares que gobiernan efectos terapéuticos de los exosomas en conjunto.



## **5. Discusión**

### **5.2 Sección B: Papel de la vía de señalización de Notch en el proceso de malignización mediado por exosomas procedentes de la línea celular de cáncer de mama metastático MDA-MB-231.**

Se ha observado que las biomoléculas incorporadas en los exosomas derivados de las células tumorales (ECTs) contribuyen a la diseminación y progresión de los tumores<sup>15</sup> a través de la desregulación de distintas vías de señalización que pueden aumentar la permeabilidad vascular que facilita la diseminación de células tumorales, la activación de la EMT y/o el establecimiento de nichos pre-metastáticos en órganos alejados del tumor primario<sup>47,250,252,253</sup>.

Como se ha descrito previamente en este trabajo, la vía de señalización de Notch está involucrada en el aumento de la agresividad de diferentes tipos de cáncer como el cáncer de mama<sup>320-322</sup>. En la sección A de la discusión, se ha visto que el ligando funcional de la vía de Notch Jagged1 se incorpora en los exosomas procedentes de MSC y contribuye al potencial angiogénico de los exosomas procedentes de las HIF-MSC. No obstante, poco se ha dicho acerca de la posible incorporación de componentes de la vía de Notch en exosomas procedentes de células tumorales, y de una posible contribución de la señalización de la vía de Notch mediada por exosomas a la progresión tumoral. Teniendo en cuenta nuestras observaciones, en esta sección del trabajo nos interesamos en estudiar una posible relación entre los exosomas procedentes de células tumorales de cáncer de mama, su actividad sobre la vía de señalización de Notch y la contribución de este efecto a la progresión tumoral. Para este estudio, se escogieron dos tipos distintos de líneas tumorales de cáncer de mama: MDA-MB-231 y MCF-7. La línea MDA-MB-231, en comparación con la línea MCF-7, es una línea más agresiva

debido a su mayor capacidad de metastatizar a otros tejidos u órganos a partir del tumor primario<sup>263</sup>.

Con este objetivo, en primer lugar se puso a punto en el laboratorio el aislamiento de exosomas procedentes de las células tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231 y de MCF-7 a partir de medio de cultivo, como previamente había sido descrito (Figura 4.20 – Figura 4.22)<sup>283,286</sup>.

En segundo lugar, se estudió la composición proteica global de los exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7 mediante proteómica y se realizó un análisis de ontología genética con las proteínas presentes de forma diferencial entre ambas muestras (Figura 4.23 y Figura 4.24, Tabla 4.7 – Tabla 4.10). Este análisis, consistente con trabajos previos, permitió observar en ambos casos, una relación con procesos biológicos como la reorganización de la matriz extracelular, el sistema inmunológico, la migración celular, el ciclo celular, el desarrollo de vasos sanguíneos, los sistemas de transporte de endomembranas, la organización de vesículas o una regulación positiva de la vía de Wnt<sup>323–327</sup>. Además, muchas relaciones entre las proteínas identificadas en los exosomas procedentes de ambos tipos celulares se establecían a través de la ubiquitina. De particular interés fue la identificación de proteínas relacionadas con el procesamiento de componentes de Notch como la subunidad de la  $\gamma$ -secretasa Nicastrina en los exosomas procedentes de ambos tipos celulares, y de componentes de los receptores de Notch2 y 3 en las muestras de exosomas procedentes de MCF-7 o de Notch1 en las procedentes de MDA-MB-231.

Distintos estudios han observado que la señalización a través de Notch2 y 3 se relaciona con una supresión de la tumorigénesis<sup>328–330</sup>. No obstante, la sobreestimulación de la vía de Notch a través de Notch1 se correlaciona con fenotipos más agresivos de cáncer de mama<sup>331,332</sup>. Así mismo, estas diferencias en la actividad de la vía de señalización de Notch se ha correlacionado con la mayor agresividad de la línea tumoral MDA-MB-231 en comparación con MCF-7<sup>239</sup>. Por estos motivos, nos interesó confirmar la detección de Notch1 y evaluar la presencia de componentes de la vía de Notch en los exosomas procedentes de ambas líneas celulares (Figura 4.25). Para ello, se analizó la presencia de dichos componentes en las fracciones celulares y exosomales procedentes de MDA-MB-231 y MCF-7. A nivel celular se observó la sobreexpresión en MDA-MB-231 de los

ligandos de la vía de Notch Jagged2, Jagged1 y Dll3, y del dominio activado de Notch1 N1ICD en comparación con MCF-7, como previamente había sido descrito<sup>239,333,334</sup>. No obstante, Dll4 y el receptor entero de Notch1 aparecieron sobreexpresados a nivel celular en MCF-7. La detección de una mayor cantidad de receptor de Notch1 entero en MCF-7 podría concordar con la menor cantidad de N1ICD detectada en estas células, ya que como fue descrito en la sección introductoria de este trabajo, la activación de la vía a través de un ligando implica dos escisiones seriadas del receptor. Por otro lado, se pudo observar por primera vez la incorporación de componentes de Notch en exosomas procedentes de las líneas tumorales MDA-MB-231 y de MCF-7. Se detectó la presencia del receptor entero de Notch1, de N1ICD y de los ligandos Jagged2, Jagged1 y Dll4 en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7. Además, todos ellos se sobreexpresaron en los que procedían de MDA-MB-231. De particular interés fue la detección de cantidades muy diferentes del factor transcripcional N1ICD en los exosomas exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7, habiendo una mayor cantidad en los primeros. De este modo, su presencia en exosomas se confirmó mediante inmunodetección con oro del N1ICD endógeno en exosomas aislados a partir del medio de cultivo y mediante su colocalización, a nivel celular, con el marcador de MVBs CD63 en ambas líneas celulares (Figura 4.26). Estos resultados permitieron corroborar que el N1ICD se estaba incorporando en mayor cantidad tanto en los exosomas una vez aislados a partir del medio de cultivo como en los MVBs de las MDA-MB-231 en comparación con las MCF-7. Se han propuesto varios mecanismos para la incorporación selectiva de determinadas moléculas en MVBs como la ubiquitinación del supresor tumoral PTEN o la modificación de biomoléculas con la etiqueta SUMO<sup>285,311,335,336</sup>. Los resultados de proteómica mostrados tanto en la sección A como en la presente sección B podrían ser indicativos de que este mecanismo de marcaje puede estar participando en la incorporación de proteínas en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7. Así, dado que la ubiquitinación de los componentes de Notch determina su localización subcelular<sup>94,99</sup>, puede ser interesante en el futuro el estudio de este mecanismo y su posible relación con la incorporación de estos componentes en exosomas.

Varios trabajos han demostrado la capacidad de los exosomas de inducir cambios en las vías de señalización de las células que los reciben a través de la transferencia de diferentes moléculas como factores de transcripción, receptores, ligandos o factores de crecimiento<sup>15,245,312</sup>. Por estas razones, nos resultó interesante estudiar la funcionalidad del N1ICD contenido en los exosomas. De este modo, mediante la transferencia del N1ICD, los exosomas procedentes de MDA-MB-231 podrían estar activando la señalización de la vía de Notch sin la participación directa de un receptor de Notch1 en la célula que los recibe. Para evaluar la actividad transcripcional del N1ICD contenido en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7, nos basamos en un trabajo publicado en 2013, por Bolós, V. y sus colaboradores en el que demostraron que la sobreexpresión de N1ICD en MCF-7 incrementaba su capacidad de inducir tumores en un modelo murino a través de una activación de la EMT<sup>239</sup>. Por este motivo, se decidió emplear las células MCF-7 como modelo para el estudio de la actividad transcripcional del N1ICD incorporado en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7. Con esta premisa, en primer lugar, se confirmó la transferencia de los exosomas y de sus proteínas procedentes de MDA-MB-231 y MCF-7 a cultivos de MCF-7 ( Figura 4.27)<sup>286,337</sup>.

Una vez se confirmó la transferencia de proteínas exosomales procedentes de MDA-MB-231 y MCF-7 a cultivos de MCF-7, se evaluó su actividad transcripcional sobre genes diana de la vía de Notch como *HES1*, *HEY1* o *C-MYC*, al ser agregados a cultivos de MCF-7 (Figura 4.28)<sup>68,234,287</sup>. Estos resultados mostraron que los exosomas procedentes de MDA-MB-231 inducían una activación mayor sobre los genes diana de la vía de Notch al ser agregados a cultivos de MCF-7 en comparación a los procedentes de MCF-7, probablemente debido a la mayor cantidad de componentes de Notch. Así mismo, la activación también era superior cuando se agregaban exosomas procedentes de MDA-MB-231 a cultivos de MCF-7 tratadas con el inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa RO en comparación a los procedentes de MCF-7. Estos resultados sugerían que el aumento en la actividad transcripcional sobre genes diana de Notch en las MCF-7 podría deberse al menos en parte a la funcionalidad del factor transcripcional N1ICD sobreexpresado en exosomas procedentes de MDA-MB-231 ya que los ligandos detectados en los exosomas no tendrían actividad funcional en la célula aceptora debido al tratamiento con RO.

La señalización a través de Notch1 y la expresión de *C-MYC* se han descrito como impulsores del crecimiento y/o iniciadores de procesos tumorales mamarios a través de la regulación de los procesos de proliferación y apoptosis y de la entrada y progresión de las células en el ciclo celular, respectivamente<sup>338-340</sup>. Además, varios trabajos han descrito la regulación directa de la expresión del protooncogén *C-MYC* a través de Notch1<sup>68</sup>. De este modo, se estudió la relación entre la actividad de la vía de señalización de Notch de los exosomas procedentes de ambas líneas celulares y la proliferación de las MCF-7 (Figura 4.29 y Figura 4.30). Los exosomas procedentes de MDA-MB-231, y no los de MCF-7, indujeron un incremento en la proliferación al ser agregados a cultivos de MCF-7. Por otro lado, el porcentaje de células MCF-7 en división se redujo a la mitad cuando se trataban con el inhibidor de la vía de Notch RO (Figura 4.29). Este resultado se acompañaba de un aumento del porcentaje de células en las fases G0/G1 y una reducción en la fase S y en la G2 (Figura 4.30). No obstante, los exosomas procedentes de MDA-MB-231, y no los procedentes de MCF-7, revirtieron total o parcialmente los efectos de RO al ser agregados simultáneamente a cultivos de MCF-7 (Figura 4.29 y Figura 4.30). En conjunto, estos resultados sugerían que la reversión en la reducción del número de células proliferantes producido por RO podría ser debida a una recuperación de la señalización de Notch a través de la transferencia del N1ICD contenido en los exosomas procedentes de MDA-MB-231.

La inducción de la EMT aumenta la capacidad de migración y la invasividad de las células tumorales<sup>232</sup>. En este sentido, se ha descrito que la progresión maligna de todos o casi todos los tipos de carcinomas depende de una activación de la EMT en las células tumorales<sup>220,221</sup>. Ha sido ampliamente documentado el papel de la vía de Notch como un inductor crítico de la EMT durante el desarrollo normal de diferentes tejidos y órganos y en un gran número de tumores<sup>222,224,225</sup>. Así mismo, ha sido descrito que los exosomas derivados de células tumorales también son capaces de activar la EMT a través de diversos mecanismos<sup>232</sup>. No obstante, poco se ha dicho de la relación entre la activación de la EMT, los ECTs y la vía de señalización de Notch. En este contexto, nos interesamos por estudiar la influencia de la actividad de Notch contenida en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7 en la EMT al ser agregados a cultivos de MCF-7. Para ello, los exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7 se

agregaron a cultivos de MCF-7 en presencia o ausencia del inhibidor de la vía de Notch, RO, y se analizó su morfología, la expresión de marcadores de EMT y la migración celular (Figura 4.31 – Figura 4.38). Se observó que los exosomas procedentes de MDA-MB-231, pero no los de MCF-7, al ser agregados a los cultivos de MCF-7 activaron la EMT e incrementaron la movilidad de las células. Sin embargo, el inhibidor de Notch RO al ser agregado a los cultivos de MCF-7 provocó el efecto inverso, redujo de forma crítica la EMT y la migración de las MCF-7 como previamente había sido descrito<sup>69,239,341,342</sup>. De particular interés fue que al tratar conjuntamente las MCF-7 con RO y con los exosomas procedentes de MDA-MB-231, pero no con los de MCF-7, se rescató el efecto de RO, igualándose los niveles de expresión de los marcadores de EMT y de migración celular a los de las células control. No obstante, la morfología y la expresión de la E-Cadherina de las MCF-7 tratadas con RO y exosomas procedentes de MDA-MB-231 mantenían unos valores similares a los de las MCF-7 tratadas solamente con los exosomas procedentes de MDA-MB-231. Varios trabajos han advertido de la importancia de la expresión de la E-Cadherina en el mantenimiento de las uniones intercelulares y en consecuencia de la morfología epitelial<sup>232</sup>. Por lo tanto, es posible que la reducción de la expresión de la E-Cadherina observada en las MCF-7 tratadas simultáneamente con RO y exosomas procedentes de MDA-MB-231 sea la responsable de las diferencias morfológicas respecto a las células control. En conjunto, estos resultados sugerían nuevamente que el N1ICD podría estar mediando la activación de la EMT y el aumento en la migración en las MCF-7 en presencia de RO tratadas con exosomas procedentes de MDA-MB-231.

La expresión de genes diana de la vía de Notch puede verse alterada por componentes no proteicos como miRNAs o las concentraciones de  $Ca^{+2}$  extracelular<sup>63,74</sup>. Así también, se ha descrito la presencia de varias moléculas en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 como TGF- $\beta$  que pueden contribuir a la activación de la EMT. Por estos motivos, sería interesante aumentar la especificidad de nuestros experimentos y describir con mayor exactitud los efectos del N1ICD incorporado en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 en la activación de la vía de Notch y de la EMT mediante la inhibición de su actividad transcripcional. Con este cometido los exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7 se intentaron electroporar con anticuerpos que neutralizaran la actividad de N1ICD como previamente había realizado Melo, S.A. y sus colaboradores

para bloquear la actividad del complejo ribonucleoproteico Dicer contenido en exosomas procedentes de MDA-MB-231<sup>283</sup>. Sin embargo, en nuestra aproximación no se consiguieron resultados reproducibles<sup>343,344</sup>. Otra posible estrategia pendiente para confirmar la actividad del N1ICD contenido en los exosomas procedentes de MDA-MB-231, es la inhibición de la producción del NICD en las células MDA-MB-231 mediante el tratamiento con RO, aislar sus exosomas y compararlos con la funcionalidad de los exosomas nativos procedentes de MDA-MB-231.

En definitiva, en este trabajo se aportan evidencias de un nuevo mecanismo de señalización de la vía de Notch, que le añade un nivel más de complejidad a través de la incorporación en exosomas, procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7, de los ligandos Jagged2-1, Dll4, del receptor de Notch1 y del N1ICD. Así mismo, nuestros resultados sugieren que el factor transcripcional N1ICD incorporado en los exosomas de MDA-MB-231 contribuye, al menos en parte, a la inducción de procesos de proliferación y migración celular a través de la expresión de *C-MYC* y de la activación de la EMT en MCF-7. En la actualidad, múltiples trabajos han advertido de la importancia de los mecanismos de comunicación intercelular mediados por exosomas entre las células tumorales y las células del resto del organismo para propiciar la progresión de los tumores<sup>15,244</sup>. En este sentido, a falta de un experimento *in vivo* que lo confirme, confiamos en que este nuevo mecanismo de señalización a través de la transferencia del N1ICD en exosomas está participando en dicho proceso. Además, clasificando los componentes de Notch incorporados en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 o de MCF-7 en función de su papel biológico, la sobreexpresión de N1ICD en los exosomas de MDA-MB-231 puede suponer una desregulación muy importante en la señalización a través de esta vía ya que podría estar activándola inclusive en células que ni siquiera expresen receptores de la vía.

Varios trabajos han estudiado la influencia de la señalización a través de Notch1 en las células de los alrededores del tumor sobre la progresión tumoral. En este sentido, se ha observado que la actividad a través de Notch1 en el endotelio facilita la metástasis a través de un aumento en la expresión de VCAM1<sup>345</sup>. Así mismo, la señalización a través de N1ICD se considera determinante también en la regulación de la inmunidad antitumoral o el mantenimiento de las células madre tumorales<sup>342,346</sup>. De manera

análoga, se ha observado que aumentos en la señalización a través de Notch1 tiene propiedades sumamente oncogénicas. En este sentido, la expresión de N1ICD en osteocitos inmaduros es suficiente para la aparición de tumores óseos<sup>321,347</sup>. Así mismo, las translocaciones cromosómicas que provocan la expresión constitutiva de Notch1 se correlacionan con la aparición espontánea de leucemias linfoblásticas de mala prognosis<sup>331,348</sup>. De este modo, será interesante en el futuro estudiar este nuevo mecanismo de señalización a través del N1ICD incorporado en los exosomas y su influencia sobre la angiogénesis, el sistema inmune, la formación de los nichos pre-metastáticos, etc., así como sobre la capacidad de transformar células sanas en células cancerosas.

Las propiedades oncogénicas de la vía de señalización de Notch en un gran número de cánceres ha llevado al desarrollo de terapias que se centran en inhibir su señalización. En este sentido, se han desarrollado distintas aproximaciones terapéuticas con dianas en distintas etapas de la ruta como los inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa (IGSs), anticuerpos neutralizadores de ligandos y receptores de Notch o compuestos que bloquean la activación de la transcripción de genes diana<sup>349,350</sup>. Varias de estas aproximaciones han obtenido buenos resultados sobre todo reduciendo la angiogénesis tumoral, aumentando la aparición de linfocitos T citotóxicos que reconozcan y eliminen las células tumorales o reduciendo el reclutamiento de células procedentes de la médula ósea al microambiente tumoral que contribuyan a la progresión tumoral<sup>271,351-353</sup>. Sin embargo, la función pleiotrópica de la vía de señalización de Notch y probablemente el desconocimiento de otros mecanismos de activación no clásicos como el propuesto en este trabajo, ha hecho complicada la progresión hacia terapias eficaces<sup>64</sup>. En este sentido, en los últimos años se están tratando de desarrollar nuevas estrategias que aumenten la especificidad de las dianas de Notch a regiones del microambiente tumoral como la incorporación de IGSs en nanopartículas dirigidas a las células tumorales<sup>354</sup>. No obstante, la comprensión precisa de la contribución de la vía de señalización de Notch a la progresión de un tipo concreto de cáncer es un prerrequisito para entender mejor los resultados obtenidos en los ensayos preclínicos y para el perfeccionamiento de las terapias. Por todo esto, confiamos con vehemencia en que este nuevo mecanismo de señalización de la vía de Notch a través de exosomas, y sin necesidad de una interacción

entre un ligando y un receptor en la célula que los recibe, va a contribuir a la interpretación de la participación de la ruta en la fisiopatología del cáncer y otras patologías.

# **6. Conclusiones**



## 6. Conclusiones

- La estabilización de la expresión del factor inducible por hipoxia, HIF-1 $\alpha$ , en MSC cambia el contenido global de miRNAs y proteínas de sus exosomas.
- La expresión estable de HIF-1 $\alpha$  en MSC aumenta la secreción y la transferencia de exosomas de MSC a células endoteliales *in vitro*.
- La expresión de HIF-1 $\alpha$  en MSC aumenta la expresión de los ligandos de la vía de Notch a nivel celular.
- Los exosomas procedentes de MSC contienen el ligando de la vía de Notch, Jagged1.
- La expresión estable de HIF-1 $\alpha$  en MSC aumenta la cantidad del ligando de la vía de Notch Jagged1 incorporado en sus exosomas.
- Los exosomas derivados de HIF-1 $\alpha$ -MSC inducen cambios mayores en la expresión de genes diana de la vía de Notch que los derivados de MSC al ser agregados a cultivos de células endoteliales humanas *in vitro*, debido al mayor contenido del ligando Jagged1 en sus exosomas.
- Los exosomas procedentes de HIF-1 $\alpha$ -MSC inducen un aumento en la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* en comparación con los exosomas procedentes de MSC debido, en parte, al mayor contenido de Jagged1 en sus exosomas.
- Los exosomas derivados de las líneas tumorales de cáncer de mama metastática, MDA-MB-231, y la no metastática, MCF-7, muestran diferencias en su composición proteica global.

- Los componentes de la vía de señalización de Notch N1ICD, Jagged1, Jagged2 y Dll3 se sobreexpresan en la línea MDA-MB-231 mientras que Notch1 y Dll4 se expresan más en MCF-7. No se observan diferencias significativas en la expresión a nivel celular del ligando Dll1 entre las líneas tumorales MDA-MB-231 y MCF-7.
- Se observan diferencias en el contenido de componentes de Notch entre los exosomas derivados de la línea tumoral MDA-MB-231 y de MCF-7. Así, los componentes de la vía de señalización de Notch N1ICD, Jagged2, Jagged1 y Dll4 se incorporan en mayor cantidad en los exosomas procedentes de MDA-MB-231 en comparación a los de MCF-7. Sin embargo, Notch1 se encuentra en mayor cantidad en los exosomas derivados de MCF-7.
- El N1ICD a nivel celular en MDA-MB-231 y en MCF-7 se encuentra en el núcleo, en el citoplasma y en colocalización con marcadores de cuerpos multivesiculares como CD63. Esta colocalización es mayor en la línea tumoral MDA-MB-231.
- Los exosomas procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7 y sus proteínas pueden internalizarse al ser agregados a cultivos de MCF-7 *in vitro*.
- Los exosomas procedentes de la línea tumoral MDA-MB-231 inducen mayores cambios en la expresión de genes diana de la vía de Notch que los de MCF-7 al ser agregados a cultivos de MCF-7 *in vitro* debido, en parte, a la mayor cantidad de N1ICD incorporado.
- El N1ICD contenido en los exosomas derivados de MDA-MB-231 contribuye a la inducción de la proliferación al ser agregados a cultivos de MCF-7 *in vitro*.
- Los exosomas derivados de MDA-MB-231 inducen la EMT al ser agregados a cultivos de MCF-7 *in vitro*. Este efecto viene parcialmente mediado por el N1ICD incorporado en los exosomas procedentes de MDA-MB-231.

- Los exosomas procedentes de MDA-MB-231 al ser agregados a cultivos de MCF-7 *in vitro* inducen un aumento en la migración debido, al menos en parte, al N1ICD contenido en sus exosomas.



# **7. Bibliografía**



## 7. Bibliografía

1. Pohorille, A. & Deamer, D. Self-assembly and function of primitive cell membranes. *Res. Microbiol.* **160**, 449–456 (2009).
2. Alberts, B., Johnson, A. D, Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. *Molecular biology Of The Cell (sixth edition)*. (2014).
3. Torday, J. S., and Rehan, V. K. *Evolutionary biology, cell-cell communication, and complex disease*. (2011).
4. Maehle, A. `` Receptive Substances ’ ’: John Newport Langley and his Path to a Receptor Theory of Drug Action. **3**, 153–174 (2004).
5. Harding, C., Heuser, J. & Stahl, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* **97**, 329–339 (1983).
6. Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M. & Johnstone, R. M. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* **101**, 942–948 (1985).
7. Colombo, M., Raposo, G. & Thery, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 255–292 (2014).
8. Meldolesi, J. Exosomes and ectosomes in intercellular communication. *Curr. Biol.* **28**, R435–R444 (2018).
9. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Biol. Chem.* **200**, 373–383 (2013).
10. Cocucci, E. & Meldolesi, J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.* **25**, 364–372 (2015).
11. Raposo, G. *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183**, 1161–1172 (1996).
12. Heijnen, H. F., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J. & Sixma, J. J. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* **94**, 3791–3799 (1999).
13. Greening, D. W., Xu, R., Gopal, S. K., Rai, A. & Simpson, R. J. Proteomic insights into extracellular vesicle biology – defining exosomes and shed microvesicles. *Expert Rev. Proteomics* **14**, 69–95 (2017).
14. Choi DS., Kim DK., K. Y. and G. Y. Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes. *Mass Spectrom. Rev.* **47**, 987–992 (2009).
15. Tkach, M. & Thery, C. review communication by extracellular vesicles : where we are and where we need to Go. *Cell* **164**, 1226–1232 (2016).

16. Trajkovic, K. *et al.* Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* **319**, 1244–1247 (2008).
17. Lo Cicero, A., Stahl, P. D. & Raposo, G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. *Curr. Opin. Cell Biol.* **35**, 69–77 (2015).
18. Buschow, S. I., Liefhebber, J. M. P., Wubbolts, R. & Stoorvogel, W. Exosomes contain ubiquitinated proteins. *Blood Cells, Mol. Dis.* **35**, 398–403 (2005).
19. Colombo, M. *et al.* Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell Sci.* **126**, 5553–5565 (2013).
20. Hurley, J. H. & Hanson, P. I. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 556–566 (2010).
21. Messenger, S. W., Woo, S. S., Sun, Z. & Martin, T. F. J. A Ca(2+)-stimulated exosome release pathway in cancer cells is regulated by Munc13-4. *J. Cell Biol.* **217**, 2877–2890 (2018).
22. Garcia, N. A., Ontoria-Oviedo, I., González-King, H., Diez-Juan, A. & Sepúlveda, P. Glucose starvation in cardiomyocytes enhances exosome secretion and promotes angiogenesis in endothelial cells. *PLoS One* **10**, 1–23 (2015).
23. Sahoo, S. *et al.* Exosomes from human CD34(+) stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity. *Circ. Res.* **109**, 724–728 (2011).
24. Hyenne, V. *et al.* RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion. *J. Cell Biol.* **211**, 27–37 (2015).
25. Ostrowski, M. *et al.* Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* **12**, 19–30 (2009).
26. Wei, Y. *et al.* Pyruvate kinase type M2 promotes tumour cell exosome release via phosphorylating synaptosome-associated protein 23. *Nat. Commun.* **7**, 1–12 (2017).
27. Nawaz, M. & Fatima, F. Extracellular Vesicles, Tunneling Nanotubes, and Cellular Interplay: Synergies and Missing Links. *Front. Mol. Biosci.* **4**, 50 (2017).
28. Lösche, W., Scholz, T., Temmler, U., Oberle, V. & Claus, R. A. Platelet-derived microvesicles transfer tissue factor to monocytes but not to neutrophils. *Platelets* **15**, 109–115 (2004).
29. Chivet, M. *et al.* Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons. *J. Extracell. vesicles* **3**, 24722 (2014).
30. Fitzner, D. *et al.* Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J. Cell Sci.* **124**, 447–458 (2011).
31. Jiang, J., Kao, C.-Y. & Papoutsakis, E. T. How do megakaryocytic microparticles target and deliver cargo to alter the fate of hematopoietic stem cells? *J. Control.*

- Release* **247**, 1–18 (2017).
32. Gabrielli, M. *et al.* Active endocannabinoids are secreted on extracellular membrane vesicles. *EMBO Rep.* **16**, 213–220 (2015).
  33. Mulcahy, L. A., Pink, R. C., Raul, D. & Carter, F. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. vesicles* **1**, 1–14 (2014).
  34. Heusermann, W. *et al.* Exosomes surf on filopodia to enter cells at endocytic hot spots, traffic within endosomes, and are targeted to the ER. *J. Cell Biol.* **213**, 173–184 (2016).
  35. French, K. C., Antonyak, M. A. & Cerione, R. A. Extracellular vesicle docking at the cellular port: extracellular vesicle binding and uptake. *Semin. Cell Dev. Biol.* **67**, 48–55 (2018).
  36. Nakase, I., Kobayashi, N. B., Takatani-Nakase, T. & Yoshida, T. Active macropinocytosis induction by stimulation of epidermal growth factor receptor and oncogenic Ras expression potentiates cellular uptake efficacy of exosomes. *Sci. Rep.* **5**, 10300 (2015).
  37. Feng, D. *et al.* Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* **11**, 675–687 (2010).
  38. Prada, I. & Meldolesi, J. Binding and fusion of extracellular vesicles to the plasma membrane of their cell targets. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1296 (2016).
  39. Tian, T. *et al.* Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J. Biol. Chem.* **289**, 22258–22267 (2014).
  40. Nanbo, A., Kawanishi, E., Yoshida, R. & Yoshiyama, H. Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized via caveola-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in target cells. *J. Virol.* **87**, 10334–10347 (2013).
  41. Lim, J. P. & Gleeson, P. A. Macropinocytosis : an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 836–843 (2011).
  42. Tachibana, I. & Hemler, M. E. Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *J. Cell Biol.* **146**, 893–904 (1999).
  43. Miyado, K. *et al.* The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *PNAS* **105**, 12921–12926 (2008).
  44. Podbilewicz, B. Virus and cell fusion mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 111–139 (2014).
  45. Yu, C. *et al.* GCMa regulates the syncytin-mediated trophoblastic fusion. *J. Biol. Chem.* **277**, 50062–50068 (2002).
  46. Larsson, L.-I., Bjerregaard, B. & Talts, J. F. Cell fusions in mammals. *Histochem. Cell Biol.* **129**, 551–561 (2008).

47. Vargas, A. *et al.* Syncytin proteins incorporated in placenta exosomes are important for cell uptake and show variation in abundance in serum exosomes from patients with preeclampsia. *FASEB J.* **28**, 3703–3719 (2014).
48. Willms, E. *et al.* Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci. Rep.* **6**, 22519 (2016).
49. Antonyak, M. A., Wilson, K. F. & Cerione, R. A. R(h)oads to microvesicles. *Small GTPases* **3**, 219–224 (2012).
50. Tricarico, C., Clancy, J. & Souza-Schorey, C. D. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases* **8**, 220–232 (2017).
51. Shurtleff, M. J., Temoche-Diaz, M. M., Karfilis, K. V, Ri, S. & Schekman, R. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *Elife* **5**, 1–23 (2016).
52. Thakur, B. K. *et al.* Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* **24**, 766–799 (2014).
53. Sheldon, H. *et al.* New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood* **116**, 2385–2394 (2010).
54. Gross, J. C., Chaudhary, V., Bartscherer, K. & Boutros, M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat. Cell Biol.* **14**, 1–12 (2012).
55. Aga, M. *et al.* Exosomal HIF1  $\alpha$  supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes. *Oncogene* **33**, 4613–4622 (2014).
56. Morgan, T. H. The theory of the gene. *Am. Nat.* **51**, 513–544 (1917).
57. Greenwald, I. *lin-12*, a nematode homeotic gene, is homologous to a set of mammalian proteins that includes epidermal growth factor. *Cell* **43**, 583–590 (1985).
58. Austin, J. & Kimble, J. *glp-1* is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*. *Cell* **51**, 589–599 (1987).
59. Artavanis-Tsakonas, S. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770–776 (1999).
60. Bauer, R. C. *et al.* Jagged1 (JAG1) mutations in patients with tetralogy of fallot or pulmonic stenosis. *Hum. Mutat.* **31**, 594–601 (2010).
61. Xue, Y. *et al.* Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 723–730 (1999).
62. Joutel, A. *et al.* Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* **383**, 707–710 (1996).
63. Andersen, P., Uosaki, H., Shenje, L. T. & Kwon, C. Non-canonical Notch signaling : emerging role and mechanism. *Trends Cell Biol.* **22**, 257–265 (2012).

64. Bray, S. J. Notch signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 722–735 (2016).
65. Jarriault, S. *et al.* Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* **377**, 355–358 (1995).
66. Borggrefe, T. & Oswald, F. The Notch signaling pathway: Transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell. Mol. life Sci.* **66**, 1631–1646 (2009).
67. Kovall, R. A. & Blacklow, S. C. *Mechanistic insights into Notch receptor signaling from structural and biochemical studies. Current topics in developmental biology* **92**, (Elsevier Inc., 2010).
68. Amthor, H. *et al.* NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *PNAS* **104**, 18261–18266 (2007).
69. Shao, S. *et al.* Notch1 signaling regulates the epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer in a Slug-dependent manner. *Mol. Cancer* **14**, 28 (2015).
70. MacGrogan, D., Munch, J. & de la Pompa, J. L. Notch and interacting signalling pathways in cardiac development, disease, and regeneration. *Nat. Rev. Cardiol.* **15**, 685–704 (2018).
71. Matsugo, S. *et al.* Structural basis of Notch1 engagement of Delta-like 4. *Science (80-. )*. **347**, 847–854 (2015).
72. Cordle, J. *et al.* A conserved face of the Jagged / Serrate DSL domain is involved in Notch trans -activation and cis -inhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 849–857 (2008).
73. Chillakuri, C. R. *et al.* Structural analysis uncovers lipid-binding properties of Notch ligands. *Cell Rep.* **5**, 861–867 (2013).
74. Rand, M. D. *et al.* Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric Notch receptors. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1825–1835 (2000).
75. Gordon, W. R. *et al.* Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 295–300 (2007).
76. Kopan, R. & Ilagan, M. X. G. The canonical Notch signaling pathway : unfolding the activation mechanism. *Cell* **137**, 216–233 (2009).
77. Nam, Y., Sliz, P., Song, L., Aster, J. C. & Blacklow, S. C. Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. *Cell* **124**, 973–983 (2006).
78. Wilson, J. J. & Kovall, R. A. Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA. *Cell* **124**, 985–996 (2006).
79. Itoh, M. *et al.* Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev. Cell* **4**, 67–82 (2003).
80. Musse, A. A., Meloty-Kapella, L. & Weinmaster, G. Notch ligand endocytosis:

- mechanistic basis of signaling activity. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 429–436 (2012).
81. Ladi, E. *et al.* The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *J. Cell Biol.* **170**, 983–992 (2005).
  82. Hoyne, G. F., Chapman, G., Sontani, Y., Pursglove, S. E. & Dunwoodie, S. L. A cell autonomous role for the Notch ligand Delta-like 3 in alphabeta T-cell development. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 696–705 (2011).
  83. Kopan, R., Chen, S. and Liu, Z. Alagille, Notch, and robustness: why duplicating systems does not produce redundancy. *Pediatr. Nephrol.* **29**, 651–657 (2015).
  84. David, A. Mechanism and significance of cis -inhibition in Notch signalling. *Curr. Biol.* **2**, 40–47 (2011).
  85. Sprinzak, D. *et al.* Cis -interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. *Nature* **465**, 86–90 (2010).
  86. Panin, V. M. & Papayannopoulos, V. Fringe modulates Notch – ligand interactions. *Nature* **387**, 663–665 (1997).
  87. Fortini, M. E. & Bilder, D. Endocytic regulation of Notch signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**, 323–328 (2009).
  88. Yamamoto, S., Charng, W.-L. & Bellen, H. J. Endocytosis and intracellular trafficking of Notch and its ligands. *Curr. Top. Dev. Biol.* **92**, 165–200 (2010).
  89. Benedito, R. *et al.* The Notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* **137**, 1124–1135 (2009).
  90. D’Amato, G. *et al.* Sequential Notch activation regulates ventricular chamber development. *Nat. Cell Biol.* **18**, 7–20 (2016).
  91. Marklund, U. *et al.* Domain-specific control of neurogenesis achieved through patterned regulation of Notch ligand expression. *Development* **137**, 437–445 (2010).
  92. LeBon, L., Lee, T. V., Sprinzak, D., Jafar-Nejad, H. & Elowitz, M. B. Fringe proteins modulate Notch-ligand cis and trans interactions to specify signaling states. *Elife* **25**, e02950 (2014).
  93. Parks, A. L., Klueg, K. M., Stout, J. R. & Muskavitch, M. A. Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* **127**, 1373–1385 (2000).
  94. Weinmaster, G. & Fischer, J. A. Notch ligand ubiquitylation: what is it good for? *Dev. Cell* **21**, 134–144 (2011).
  95. Meloty-Kapella, L., Shergill, B., Kuon, J., Botvinick, E. & Weinmaster, G. Notch ligand endocytosis generates mechanical pulling force dependent on dynamin, epsins, and actin. *Dev. Cell* **22**, 1299–1312 (2012).
  96. Wang, W. & Struhl, G. Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in *Drosophila*. *Development* **132**, 2883–

- 2894 (2005).
97. Overstreet, E., Fitch, E. & Fischer, J. A. Fat facets and liquid facets promote Delta endocytosis and Delta signaling in the signaling cells. *Development* **131**, 5355–5366 (2004).
  98. Lai, E. C., Roegiers, F., Qin, X., Jan, Y. N. & Rubin, G. M. The ubiquitin ligase *Drosophila* Mind bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta. *Development* **132**, 2319–2332 (2005).
  99. Daskalaki, A. *et al.* Distinct intracellular motifs of Delta mediate its ubiquitylation and activation by Mindbomb1 and Neuralized. *J. Cell Biol.* **195**, 1017–1031 (2011).
  100. Le Borgne, R., Remaud, S., Hamel, S. & Schweisguth, F. Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of delta and serrate signaling in *Drosophila*. *PLOS Biol.* **3**, e96 (2005).
  101. Koo, B.-K. *et al.* An obligatory role of mind bomb-1 in notch signaling of mammalian development. *PLoS One* **2**, e1221 (2007).
  102. Le Borgne, R. & Schweisguth, F. Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. *Dev. Cell* **5**, 139–148 (2003).
  103. Yoon, K.-J. *et al.* Mind bomb 1-expressing intermediate progenitors generate notch signaling to maintain radial glial cells. *Neuron* **58**, 519–531 (2008).
  104. Dong, Z., Yang, N., Yeo, S.-Y., Chitnis, A. & Guo, S. Intralineaage directional Notch signaling regulates self-renewal and differentiation of asymmetrically dividing radial glia. *Neuron* **74**, 65–78 (2012).
  105. Vaccari, T., Lu, H., Kanwar, R., Fortini, M. E. & Bilder, D. Endosomal entry regulates Notch receptor activation in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* **180**, 755–762 (2008).
  106. Thompson, B. J. *et al.* Tumor suppressor properties of the ESCRT-II complex component Vps25 in *Drosophila*. *Dev. Cell* **9**, 711–720 (2005).
  107. Troost, T., Jaeckel, S., Ohlenhard, N. & Klein, T. The tumour suppressor Lethal (2) giant discs is required for the function of the ESCRT-III component Shrub/CHMP4. *J. Cell Sci.* **125**, 763–776 (2012).
  108. Vaccari, T. & Bilder, D. The *Drosophila* tumor suppressor vps25 prevents nonautonomous overproliferation by regulating notch trafficking. *Dev. Cell* **9**, 687–698 (2005).
  109. Poss, K. D., Wilson, L. G. & Keating, M. T. Heart regeneration in zebrafish. *Science* **298**, 2188–2190 (2002).
  110. Porrello, E. R. & Olson, E. N. A neonatal blueprint for cardiac regeneration. *Stem Cell Res.* **13**, 556–570 (2014).
  111. Haubner, B. J. *et al.* Functional recovery of a human neonatal heart after severe myocardial infarction. *Circ. Res.* **118**, 216–221 (2016).

112. Bergmann, O. *et al.* Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* **324**, 98–102 (2009).
113. Laflamme, M. A. & Murry, C. E. Heart regeneration. *Nature* **473**, 326–335 (2011).
114. Komaru, T. *et al.* Coronary microcirculation physiology and pharmacology. *Pharmacol. Ther.* **86**, 217–261 (2000).
115. Hashimoto, H., Olson, E. N. & Bassel-duby, R. Therapeutic approaches for cardiac regeneration and repair. *Nat. Rev. Cardiol.* **15**, 585–600 (2018).
116. Cohn, J. N., Ferrari, R. & Sharpe, N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* **35**, 569–582 (2000).
117. Sacks, C. A., Jarcho, J. A. & Curfman, G. D. Paradigm shifts in heart-failure therapy-a timeline. *N. Engl. J. Med.* **371**, 989–991 (2014).
118. Packer, M. *et al.* Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1651–1658 (2001).
119. Yusuf, S., Pitt, B., Davis, C. E., Hood, W. B. & Cohn, J. N. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.* **325**, 293–302 (1991).
120. Pitt, B. *et al.* The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized aldactone evaluation study investigators. *N. Engl. J. Med.* **341**, 709–717 (1999).
121. Rose, E. A. *et al.* Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1435–1443 (2001).
122. Bristow, M. R. *et al.* Cardiac-resynchronization therapy with or without an implantable defibrillator in advanced chronic heart failure. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2140–2150 (2004).
123. Roth, G. A. *et al.* Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015. *J. Am. Coll. Cardiol.* **70**, 1–25 (2017).
124. Yacoub, M. Cardiac donation after circulatory death: a time to reflect. *Lancet* **385**, 2554–2556 (2015).
125. Ieda, M. *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* **142**, 375–386 (2010).
126. Song, K. *et al.* Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature* **485**, 599–604 (2012).
127. Xin, M. *et al.* Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *PNAS* **110**, 13839–13844 (2013).
128. Xin, M., Olson, E. N. & Bassel-Duby, R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 529–541 (2013).

129. Porrello, E. R. *et al.* Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* **331**, 1078–1080 (2011).
130. Beltrami, A. P. *et al.* Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* **114**, 763–776 (2003).
131. Menasche, P. *et al.* The myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* **117**, 1189–1200 (2008).
132. Meyer, G. P. *et al.* Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: Eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (Bone marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* **113**, 1287–1294 (2006).
133. Hare, J. M. *et al.* Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA* **308**, 2369–2379 (2012).
134. Zakrzewski, W., Dobrzynski, M., Szymonowicz, M. & Rybak, Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, 68 (2019).
135. Mitalipov, S. & Wolf, D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **114**, 185–199 (2009).
136. Hanna, J. H., Saha, K. & Jaenisch, R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* **143**, 508–525 (2010).
137. Ulloa-Montoya, F., Verfaillie, C. M. & Hu, W.-S. Culture systems for pluripotent stem cells. *J. Biosci. Bioeng.* **100**, 12–27 (2005).
138. He, S., Nakada, D. & Morrison, S. J. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**, 377–406 (2009).
139. Boheler, K. R. Pluripotency of human embryonic and induced pluripotent stem cells for cardiac and vascular regeneration. *Thromb. Haemost.* **104**, 23–29 (2010).
140. Hsu, Y.-C. & Fuchs, E. A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 103–114 (2012).
141. Sekiya, I., Vuoristo, J. T., Larson, B. L. & Prockop, D. J. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *PNAS* **99**, 4397–4402 (2002).
142. Mackenzie, T. C. & Flake, A. W. Multilineage differentiation of human MSC after in utero transplantation. *Cytotherapy* **3**, 403–405 (2001).
143. Friedenstein, A. J. *et al.* Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.* **2**, 83–92 (1974).

144. Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143–147 (1999).
145. Rasmusson, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research* **312**, 2169–2179 (2006).
146. Armiñán, A. *et al.* Mesenchymal stem cells provide better results than hematopoietic precursors for the treatment of myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **55**, 2244–2253 (2010).
147. Caplan, A. I. & Correa, D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell* **9**, 11–15 (2011).
148. Le Blanc, K. *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* **371**, 1579–1586 (2008).
149. Ortiz, L. A. *et al.* Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *PNAS* **104**, 11002–11007 (2007).
150. Shabbir, A., Zisa, D., Suzuki, G. & Lee, T. Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a non-invasive therapeutic regimen. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **296**, H1888–97 (2009).
151. Kordelas, L. *et al.* MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia* **28**, 970–973 (2014).
152. Amable, P. R., Teixeira, M. V. T., Carias, R. B. V., Granjeiro, J. M. & Borojevic, R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Res. Ther.* **5**, 53 (2014).
153. Eirin, A. *et al.* MicroRNA and mRNA cargo of extracellular vesicles from porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Gene* **551**, 55–64 (2014).
154. Eirin, A. *et al.* Comparative proteomic analysis of extracellular vesicles isolated from porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Sci. Rep.* **6**, 36120 (2016).
155. Mirotsov, M., Jayawardena, T. M., Schmeckpeper, J., Gnechchi, M. & Dzau, V. J. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **50**, 280–289 (2011).
156. Yanez-Mo, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. vesicles* 27066 (2015).
157. Samsonraj, R. M. *et al.* Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl. Med.* **6**, 2173–2185 (2017).
158. Samper, E., Diez-Juan, A., Montero, J. A. & Sepúlveda, P. Cardiac cell therapy: boosting mesenchymal stem cells effects. *Stem Cell Rev.* **9**, 266–280 (2012).
159. Rosová, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D. & Nolte, J. a. Hypoxic preconditioning

- results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **26**, 2173–82 (2008).
160. Masoud, G. N. & Li, W. HIF-1  $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 378–389 (2015).
  161. Cerrada, I. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 alpha contributes to cardiac healing in mesenchymal stem cells-mediated cardiac repair. *Stem Cells Dev.* **22**, 501–511 (2013).
  162. Semenza, G. L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 167–171 (2001).
  163. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *PNAS* **92**, 5510–5514 (1995).
  164. Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R. & Semenza, G. L. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **271**, 17771–17778 (1996).
  165. Wang, G. L. & Semenza, G. L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **270**, 1230–1237 (1995).
  166. Yamashita, K., Discher, D. J., Hu, J., Bishopric, N. H. & Webster, K. A. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *J. Biol. Chem.* **276**, 12645–12653 (2001).
  167. Bruick, R. K. & McKnight, S. L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**, 1337–1340 (2001).
  168. Iwai, K. *et al.* Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *PNAS* **96**, 12436–12441 (1999).
  169. Epstein, A. C. *et al.* *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**, 43–54 (2001).
  170. Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 721–732 (2003).
  171. Maxwell, P. H. *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**, 271–275 (1999).
  172. Block, K. M. *et al.* Direct inhibition of hypoxia-inducible transcription factor complex with designed dimeric epidithiodiketopiperazine. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 18078–18088 (2009).
  173. Dann, C. E. 3rd, Bruick, R. K. & Deisenhofer, J. Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1: An asparaginyl hydroxylase involved in the hypoxic response pathway. *PNAS* **99**, 15351–15356 (2002).

174. Lando, D. *et al.* FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* **16**, 1466–1471 (2002).
175. McNeill, L. A. *et al.* Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the beta-carbon of asparagine-803. *Biochem. J.* **367**, 571–575 (2002).
176. Kiers, H. D. *et al.* Immunologic consequences of hypoxia during critical illness. *Anesthesiology* **1**, 237–249 (2016).
177. Gustafsson, M. V *et al.* Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev. Cell* **9**, 617–628 (2005).
178. Mukherjee, T., Kim, W. S., Mandal, L. & Banerjee, U. Interaction between Notch and Hif-alpha in development and survival of *Drosophila* blood cells. *Science* **332**, 1210–1213 (2011).
179. Wang, Y., Liu, Y., Malek, S. N., Zheng, P. & Liu, Y. Targeting HIF1alpha eliminates cancer stem cells in hematological malignancies. *Cell Stem Cell* **8**, 399–411 (2011).
180. Villa, J. C. *et al.* Nontranscriptional role of hif-1 $\alpha$  in activation of  $\gamma$ -secretase and notch signaling in breast cancer. *Cell Rep.* **8**, 1077–1092 (2014).
181. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298–307 (2011).
182. Adams, R. H. & Alitalo, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 464–478 (2007).
183. De Smet, F., Segura, I., De Bock, K., Hohensinner, P. J. & Carmeliet, P. Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 639–649 (2009).
184. Gerhardt, H. *et al.* VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* **161**, 1163–1177 (2003).
185. Iruela-Arispe, M. L. & Davis, G. E. Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Dev. Cell* **16**, 222–231 (2009).
186. Kamei, M. *et al.* Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature* **442**, 453–456 (2006).
187. Fantin, A. *et al.* Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* **116**, 829–840 (2010).
188. Gaengel, K., Genove, G., Armulik, A. & Betsholtz, C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 630–638 (2009).
189. Jain, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* **9**, 685–693 (2003).

190. Herbert, S. P. & Stainier, D. Y. R. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat. Publ. Gr.* **12**, 551–564 (2011).
191. Lohela, M., Bry, M., Tammela, T. & Alitalo, K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 154–165 (2009).
192. Coultas, L., Chawengsaksophak, K. & Rossant, J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* **438**, 937–945 (2005).
193. Shibuya, M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J. Biochem. Mol. Biol.* **39**, 469–478 (2006).
194. Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* **9**, 677–684 (2003).
195. Roca, C. & Adams, R. H. Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev.* **21**, 2511–2524 (2007).
196. Phng, L. K. & Gerhardt, H. Angiogenesis: A Team Effort Coordinated by Notch. *Dev. Cell* **16**, 196–208 (2009).
197. Siekmann, A. F. & Lawson, N. D. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature* **445**, 781–784 (2007).
198. Hellström, M. *et al.* Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* **445**, 776–780 (2007).
199. Leslie, J. D. *et al.* Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis. *Development* **134**, 839–844 (2007).
200. Lobov, I. B. *et al.* Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *PNAS* **104**, 3219–3224 (2007).
201. Suchting, S. *et al.* The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *PNAS* **104**, 3225–3230 (2007).
202. Noguera-Troise, I. *et al.* Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* **444**, 1032–1037 (2006).
203. Ridgway, J. *et al.* Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* **444**, 1083–1087 (2006).
204. Benedito, R. *et al.* The Notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* **137**, 1124–1135 (2009).
205. The spread of tumours in the human body. *BJS* **22**, 196 (1934).
206. Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23–28 (1976).
207. Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* **8**, 98–101 (1989).
208. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural,

- environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* **388**, 1659–1724 (2016).
209. Plummer, M. *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet* **4**, e609-16 (2016).
  210. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
  211. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Review hallmarks of Cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
  212. Cooper, G. M. The cell: a molecular approach. *Yale J. Biol. Med.* **87**, 603–604 (2014).
  213. Malumbres, M. & Barbacid, M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature reviews. Cancer* **3**, 459–465 (2003).
  214. Meyer, N. & Penn, L. Z. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 976–990 (2008).
  215. Weng, A. P. *et al.* c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev.* **20**, 2096–2109 (2006).
  216. Evan, G. I. & d’Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: hot or what? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**, 25–31 (2009).
  217. Lowe, S. W., Cepero, E. & Evan, G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**, 307–315 (2004).
  218. Lipinski, M. M. & Jacks, T. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene* **18**, 7873–7882 (1999).
  219. Ghebranious, N. & Donehower, L. A. Mouse models in tumor suppression. *Oncogene* **17**, 3385–3400 (1998).
  220. Ye, X. *et al.* Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature* **525**, 256–260 (2015).
  221. Krebs, A. M. *et al.* The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nat. Cell Biol.* **19**, 518–529 (2017).
  222. Nieto, M. A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 1541–1547 (2009).
  223. Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A. & Thiery, J. P. EMT: 2016. *Cell* **166**, 21–45 (2016).
  224. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871–890 (2009).
  225. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428 (2009).
  226. Mani, S. A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with

- properties of stem cells. *Cell* **133**, 704–715 (2008).
227. Singh, A. & Settleman, J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* **29**, 4741–4751 (2010).
  228. Morel, A.-P. *et al.* Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* **3**, e2888 (2008).
  229. Shibue, T. & Weinberg, R. A. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 611–629 (2017).
  230. Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R. & Weinberg, R. A. Emerging biological principles of metastasis. *Cell* **168**, 670–691 (2017).
  231. Terry, S. *et al.* New insights into the role of EMT in tumor immune escape. *Mol. Oncol.* **11**, 824–846 (2017).
  232. Dongre, A. & Weinberg, R. A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, v (2019).
  233. Osborne, B. A. & Minter, L. M. Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 64–75 (2007).
  234. Timmerman, L. A. *et al.* Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev.* **18**, 99–115 (2004).
  235. Bao, B. *et al.* Notch-1 induces epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells. *Cancer Lett.* **307**, 26–36 (2011).
  236. Yuan, X. *et al.* Notch signaling and EMT in non-small cell lung cancer: biological significance and therapeutic application. *J. Hematol. Oncol.* **7**, 87 (2014).
  237. Tang, Y., Tang, Y. & Cheng, Y.-S. miR-34a inhibits pancreatic cancer progression through Snail1-mediated epithelial-mesenchymal transition and the Notch signaling pathway. *Sci. Rep.* **7**, 38232 (2017).
  238. Natsuizaka, M. *et al.* Interplay between Notch1 and Notch3 promotes EMT and tumor initiation in squamous cell carcinoma. *Nat. Commun.* **8**, 1758 (2017).
  239. Bolós, V. *et al.* Notch activation stimulates migration of breast cancer cells and promotes tumor growth. *Breast Cancer Res.* **15**, R54 (2013).
  240. Liu, L. *et al.* Notch3 is important for TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer bone metastasis by regulating ZEB-1. *Cancer Gene Ther.* **21**, 364–372 (2014).
  241. Xing, F. *et al.* Hypoxia-induced Jagged2 promotes breast cancer metastasis and self-renewal of cancer stem-like cells. *Oncogene* **30**, 4075–4086 (2011).
  242. Saad, S., Stanners, S. R., Yong, R., Tang, O. & Pollock, C. A. Notch mediated epithelial to mesenchymal transformation is associated with increased expression of the Snail transcription factor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1115–

- 1122 (2010).
243. Fukusumi, T. *et al.* The NOTCH4-HEY1 pathway induces epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **24**, 619–633 (2018).
  244. Syn, N., Wang, L., Sethi, G., Thiery, J. & Goh, B. Exosome-mediated metastasis: from epithelial – mesenchymal transition to escape from immunosurveillance. *Trends Pharmacol. Sci.* **37**, 606–617 (2016).
  245. Aga, M. *et al.* Exosomal HIF1alpha supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes. *Oncogene* **33**, 4613–4622 (2014).
  246. You, Y. *et al.* Matrix metalloproteinase 13-containing exosomes promote nasopharyngeal carcinoma metastasis. *Cancer Sci.* **106**, 1669–1677 (2015).
  247. Franzen, C. A. *et al.* Urothelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition after exposure to muscle invasive bladder cancer exosomes. *Oncogenesis* **4**, e163 (2015).
  248. Jeppesen, D. K. *et al.* Quantitative proteomics of fractionated membrane and lumen exosome proteins from isogenic metastatic and nonmetastatic bladder cancer cells reveal differential expression of EMT factors. *Proteomics* **14**, 699–712 (2014).
  249. Escrevente, C., Keller, S., Altevogt, P. & Costa, J. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer* **11**, 108 (2011).
  250. Peinado, H. *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **18**, 883–891 (2012).
  251. Hood, J. L., San, R. S. & Wickline, S. A. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res.* **71**, 3792–3801 (2011).
  252. Costa-Silva, B. *et al.* Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* **17**, 816–826 (2015).
  253. Hoshino, A. *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329–35 (2015).
  254. Fabbri, M. *et al.* MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *PNAS* **109**, E2110-6 (2012).
  255. Ye, S.-B. *et al.* Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* **5**, 5439–5452 (2014).
  256. Clayton, A., Al-Taei, S., Webber, J., Mason, M. D. & Tabi, Z. Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J. Immunol.* **187**, 676–683 (2011).

257. Harbeck, N. & Gnant, M. Breast cancer. *Lancet* **389**, 1134–1150 (2017).
258. Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P. & Sharma, K. K. Various types and management of breast cancer: an overview. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **1**, 109–126 (2010).
259. Dai, X. *et al.* Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am. J. Cancer Res.* **5**, 2929–2943 (2015).
260. Bajgain, P. *et al.* CAR T cell therapy for breast cancer: harnessing the tumor milieu to drive T cell activation. *J. Immunother. cancer* **6**, 34 (2018).
261. Tong, C. W. S., Wu, M., Cho, W. C. S. & To, K. K. W. Recent advances in the treatment of breast cancer. *Front. Oncol.* **8**, 227 (2018).
262. Lasfargues, E. Y. & Ozzello, L. Cultivation of human breast carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **21**, 1131–1147 (1958).
263. Dai, X., Cheng, H., Bai, Z. & Li, J. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. *J. Cancer* **8**, 3131–3141 (2017).
264. Hemler, M. E. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 801–811 (2005).
265. Pols, M. S. & Klumperman, J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp. Cell Res.* **315**, 1584–1592 (2009).
266. Mittelbrunn, M. *et al.* Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat. Commun.* **2**, 282 (2011).
267. Theyry, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. cell Biol.* **Chapter 3**, Unit 3.22 (2006).
268. Garcia, N. A., Moncayo-Arlandi, J., Sepulveda, P. & Diez-Juan, A. Cardiomyocyte exosomes regulate glycolytic flux in endothelium by direct transfer of GLUT transporters and glycolytic enzymes. *Cardiovasc. Res.* **109**, 397–408 (2016).
269. Li, D., Masiero, M., Banham, A. H. & Harris, A. L. The notch ligand JAGGED1 as a target for anti-tumor therapy. *Front. Oncol.* **4**, 254 (2014).
270. Sharma, A. *et al.* A novel monoclonal antibody against Notch1 targets leukemia-associated mutant Notch1 and depletes therapy resistant cancer stem cells in solid tumors. *Sci. Rep.* **5**, 11012 (2015).
271. Yuan, X. *et al.* Notch signaling: An emerging therapeutic target for cancer treatment. *Cancer Lett.* **369**, 20–27 (2015).
272. Huang, M. *et al.* BET bromodomain suppression inhibits VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability by blocking VEGFR2-mediated activation of PAK1 and eNOS. *Sci. Rep.* **6**, 23770 (2016).
273. DeCicco-Skinner, K. L. *et al.* Endothelial cell tube formation assay for the in vitro study of angiogenesis. *J. Vis. Exp.* **1**, e51312–e51312 (2014).

274. Koo, H.-J. *et al.* Introduction of methyl groups at C2 and C6 positions enhances the antiangiogenesis activity of curcumin. *Sci. Rep.* **5**, DOI: 10.1038/srep14205 (2015).
275. Kong, D., Li, Y., Wang, Z., Banerjee, S. & Sarkar, F. Inhibition of angiogenesis and invasion by 3,3'-diindolylmethane is mediated by the nuclear factor-kappaB downstream target genes MMP-9 and uPA that regulated bioavailability of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res.* **67**, 3310–3319 (2007).
276. Rosova, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D. & Nolte, J. A. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **26**, 2173–2182 (2008).
277. King, H. W., Michael, M. Z. & Gleadle, J. M. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* **12**, 421 (2012).
278. Théry, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 581–93 (2009).
279. Kang, T. *et al.* Adipose-derived stem cells induce angiogenesis via microvesicle transport of miRNA-31. *Stem Cells Transl. Med.* **5**, 440–450 (2016).
280. Lu, A. & Pfeffer, S. R. A CULLINARY ride across the secretory pathway: more than just secretion. *Trends Cell Biol.* **24**, 389–399 (2016).
281. Ellisen, L. W. *et al.* TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* **66**, 649–661 (1991).
282. Reedijk, M. *et al.* High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Res.* **65**, 8530–8537 (2005).
283. Melo, S. A. *et al.* Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell* **26**, 707–721 (2014).
284. Moreno-Gonzalo, O., Villarroya-Beltri, C. & Sánchez-Madrid, F. Post-translational modifications of exosomal proteins. *Front. Immunol.* **5**, 383 (2014).
285. Putz, U. *et al.* The tumor suppressor PTEN is exported in exosomes and has phosphatase activity in recipient cells. *Sci. Signal.* **25**, 243–256 (2012).
286. Zomer, A. *et al.* In Vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. *Cell* **161**, 1046–1057 (2015).
287. Dai, Y. *et al.* Silencing of Jagged1 inhibits cell growth and invasion in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* **5**, e1170 (2014).
288. Adegbola, T., Connolly, C. E. & Mortimer, G. Small cell neuroendocrine carcinoma of the breast: a report of three cases and review of the literature. *J. Clin. Pathol.* **58**, 775–778 (2005).
289. Raber, B., Dao, T., Howard, E. & Bredeweg, A. Primary small-cell carcinoma of

- the breast. *Proc. (Baylor Univ. Med. Center)* **75205**, 200–202 (2017).
290. Shin, S. J., DeLellis, R. A., Ying, L. & Rosen, P. P. Small cell carcinoma of the breast: a clinicopathologic and immunohistochemical study of nine patients. *Am. J. Surg. Pathol.* **24**, 1231–1238 (2000).
291. Amado, L. C. *et al.* Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *PNAS* **102**, 11474–11479 (2005).
292. Barbash, I. M. *et al.* Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* **108**, 863–868 (2003).
293. Gandia, C. *et al.* Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells* **26**, 638–645 (2008).
294. Rosova, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D. & Nolte, J. a. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **26**, 2173–2182 (2008).
295. Deuse, T. *et al.* Hepatocyte growth factor or vascular endothelial growth factor gene transfer maximizes mesenchymal stem cell-based myocardial salvage after acute myocardial infarction. *Circulation* **120**, S247-54 (2009).
296. Ding, W. *et al.* Platelet-derived growth factor (PDGF)-PDGF receptor interaction activates bone marrow-derived mesenchymal stromal cells derived from chronic lymphocytic leukemia: implications for an angiogenic switch. *Blood* **116**, 2984–2993 (2010).
297. Fierro, F. A., Kalomoiris, S., Sondergaard, C. S. & Nolte, J. A. Effects on proliferation and differentiation of multipotent bone marrow stromal cells engineered to express growth factors for combined cell and gene therapy. *Stem Cells* **29**, 1727–1737 (2011).
298. Bronckaers, A. *et al.* Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacol. Ther.* **143**, 181–196 (2014).
299. Meyerrose, T. *et al.* Mesenchymal stem cells for the sustained in vivo delivery of bioactive factors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 1167–1174 (2010).
300. Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Madrid, F. & Mittelbrunn, M. Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Semin. Cancer Biol.* **28**, 3–13 (2014).
301. Wang, T. *et al.* Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. *PNAS* **111**, E3234-42 (2014).
302. Guimbellot, J. S. *et al.* Correlation of microRNA levels during hypoxia with predicted target mRNAs through genome-wide microarray analysis. *BMC Med.*

- Genomics* **2**, 15 (2009).
303. Kulshreshtha, R. *et al.* A microRNA signature of hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1859–1867 (2006).
304. Lee, M. *et al.* Hypoxia-inducible VEGF gene delivery to ischemic myocardium using water-soluble lipopolymer. *Gene Ther* **10**, 1535–1542 (2003).
305. Wu, C. *et al.* Wnt/ $\beta$ -catenin coupled with HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathways involved in galangin neurovascular unit protection from focal cerebral ischemia. *Sci. Rep.* **5**, 16151 (2015).
306. Ciria, M. *et al.* Mesenchymal stem cell migration and proliferation are mediated by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  upstream of notch and SUMO pathways. *Stem Cells Dev.* **26**, 973–985 (2017).
307. Qiang, L. *et al.* HIF-1 $\alpha$  is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating Notch signaling pathway. *Cell Death Differ.* **19**, 284–294 (2011).
308. Gao, W. *et al.* Notch-1 mediates hypoxia-induced angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **64**, 2104–2113 (2012).
309. Tian, Q. *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 induces migration and invasion through Notch signaling. *Int. J. Oncol.* **47**, 728–738 (2015).
310. Anderson, J. D. *et al.* Comprehensive proteomic analysis of mesenchymal stem cell exosomes reveals modulation of angiogenesis via nuclear factor-KappaB signaling. *Stem Cells* **34**, 601–613 (2016).
311. Villarroya-Beltri, C. *et al.* Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* **4**, 2980 (2013).
312. Hirota, K. & Semenza, G. L. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **59**, 15–26 (2006).
313. Harrington, L. S. *et al.* Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc. Res.* **75**, 144–154 (2008).
314. Limbourg, F. P. *et al.* Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis. *Circulation* **111**, 1826–1832 (2005).
315. Dufraigne, J., Funahashi, Y. & Kitajewski, J. Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. *Oncogene* **27**, 5132–5137 (2008).
316. Souza, B. D., Miyamoto, A. & Weinmaster, G. The many facets of Notch ligands. *Oncogene* **1**, 5148–5167 (2008).
317. Sassoli, C. *et al.* Mesenchymal stromal cells affect cardiomyocyte growth through juxtacrine Notch-1/Jagged-1 signaling and paracrine mechanisms: clues for cardiac regeneration. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **51**, 399–408 (2011).
318. Olsauskas-Kuprys, R., Zlobin, A. & Osipo, C. Gamma secretase inhibitors of Notch signaling. *Onco. Targets. Ther.* **6**, 943–955 (2013).

319. Ge, X. *et al.* MiR-21 alleviates secondary blood-brain barrier damage after traumatic brain injury in rats. *Brain Res.* **1603**, 150–157 (2015).
320. Radtke, F. & Raj, K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat. Rev. Cancer* **3**, 756–767 (2003).
321. Tao, J. *et al.* Notch Activation as a Driver of Osteogenic Sarcoma. *Cancer Cell* **26**, 390–401 (2014).
322. Meurette, O. & Mehlen, P. Notch signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **34**, 536–548 (2018).
323. Chiba, M., Kubota, S., Sato, K. & Monzen, S. Exosomes released from pancreatic cancer cells enhance angiogenic activities via dynamin-dependent endocytosis in endothelial cells in vitro. *Sci. Rep.* **8**, 11972 (2018).
324. Hu, Y.-B. *et al.* Exosomal Wnt-induced dedifferentiation of colorectal cancer cells contributes to chemotherapy resistance. *Oncogene* **38**, 1951–1965 (2018).
325. Zhang, X. *et al.* Tumor-derived exosomes induce N2 polarization of neutrophils to promote gastric cancer cell migration. *Mol. Cancer* **17**, 146 (2018).
326. Wolfers, J. *et al.* Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat. Med.* **7**, 297–303 (2001).
327. Brown, M. *et al.* Lymphatic exosomes promote dendritic cell migration along guidance cues. *J. Cell Biol.* **217**, 2205–2221 (2018).
328. Xu, P. *et al.* The different role of Notch1 and Notch2 in astrocytic gliomas. *PLoS One* **8**, e53654 (2013).
329. Galic, V. *et al.* NOTCH2 as a tumor suppressor in epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **125**, S134 (2012).
330. Cui, H., Kong, Y., Xu, M. & Zhang, H. Notch3 functions as a tumor suppressor by controlling cellular senescence. *Cancer Res.* **73**, 3451–3459 (2013).
331. Ellisen, L. W. *et al.* TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* **66**, 649–661 (1991).
332. Dievart, A., Beaulieu, N. & Jolicoeur, P. Involvement of Notch1 in the development of mouse mammary tumors. *Oncogene* **18**, 5973–5981 (1999).
333. Pamarthy, S. *et al.* The Vacuolar ATPase  $\alpha$ 2-subunit regulates Notch signaling in triple-negative breast cancer cells. *Oncotarget* **6**, (2015).
334. Chen, J., Imanaka, N. & Griffin, J. Hypoxia potentiates Notch signaling in breast cancer leading to decreased E-cadherin expression and increased cell migration and invasion. *British journal of cancer* **102**, (2009).
335. Vlassov, A. V, Magdaleno, S., Setterquist, R. & Conrad, R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta* **1820**, 940–948 (2012).

336. Corrado, C. *et al.* Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 5338–5366 (2013).
337. Harris, D. A. *et al.* Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement. *PLoS One* **10**, e0117495–e0117495 (2015).
338. Bolos, V., Grego-Bessa, J. & de la Pompa, J. L. Notch signaling in development and cancer. *Endocr. Rev.* **28**, 339–363 (2007).
339. Rizzo, P. *et al.* Cross-talk between notch and the estrogen receptor in breast cancer suggests novel therapeutic approaches. *Cancer Res.* **68**, 5226–5235 (2008).
340. Efstratiadis, A., Szabolcs, M. & Klinakis, A. Notch, Myc and breast cancer. *Cell Cycle* **6**, 418–429 (2007).
341. Palagani, V. *et al.* Epithelial mesenchymal transition and pancreatic tumor initiating CD44+/EpCAM+ cells are inhibited by  $\gamma$ -secretase inhibitor IX. *PLoS One* **7**, e46514 (2012).
342. Suman, S., Das, T. P. & Damodaran, C. Silencing NOTCH signaling causes growth arrest in both breast cancer stem cells and breast cancer cells. *Br. J. Cancer* **109**, 2587 (2013).
343. Tek N. Lamichhane<sup>†</sup>, Rahul S. Raikert<sup>†</sup>, and S. M. J. Exogenous DNA loading into extracellular vesicles via electroporation is size-dependent and enables limited gene delivery. *Mol. Pharmacol.* **12**, 3650–3657 (2016).
344. Hood, J. L., Scott, M. J. & Wickline, S. A. Maximizing exosome colloidal stability following electroporation. *Anal. Biochem.* **448**, 41–49 (2014).
345. Wieland, E. *et al.* Endothelial Notch1 activity facilitates metastasis. *Cancer Cell* **31**, 355–367 (2017).
346. Cho, O. H. *et al.* Notch regulates cytolytic effector function in CD8+ T cells. *J. Immunol.* **182**, 3380 LP-3389 (2009).
347. Sethi, N., Dai, X., Winter, C. G. & Kang, Y. Tumor-derived jagged1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging Notch signaling in bone cells. *Cancer Cell* **19**, 192–205 (2011).
348. Weng, A. P. *et al.* Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Signal.* **269**, 269–271 (2014).
349. Ntziachristos, P., Lim, J. S., Sage, J. & Aifantis, I. From fly wings to targeted cancer therapies: a centennial for notch signaling. *Cancer Cell* **25**, 318–334 (2014).
350. Takebe, N. *et al.* Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **12**, 445 (2015).
351. Paris, D. *et al.* Inhibition of angiogenesis and tumor growth by  $\beta$  and  $\gamma$ -secretase inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* **514**, 1–15 (2005).

352. Wang, S.-H. *et al.* The blockage of Notch signalling promoted the generation of polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells with lower immunosuppression. *Eur. J. Cancer* **68**, 90–105 (2016).
353. Mao, L. *et al.*  $\gamma$ -Secretase inhibitor reduces immunosuppressive cells and enhances tumour immunity in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* **142**, 999–1009 (2018).
354. Mamaeva, V. *et al.* Mesoporous silica nanoparticles as drug delivery systems for targeted inhibition of Notch signaling in cancer. *Mol. Ther.* **19**, 1538–1546 (2011).