



Universidad
Zaragoza

TRABAJO FIN DE GRADO

**Exosomas: biomarcadores en cáncer de
mama. Perspectivas diagnósticas y
terapéuticas.**

*Exosomes: biomarkers in breast cancer.
Diagnostic and therapeutic perspectives.*

Autora:

Carolina Perales Calzado

Directora:

Dra. Concepción Junquera Escribano

Departamento de Anatomía e Histología Humanas.

Facultad de Medicina.

Año 2020

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN	6
MATERIAL Y MÉTODOS	8
RESULTADOS	10
1. CÁNCER DE MAMA.....	10
1.1 EPIDEMIOLOGÍA	10
1.2 PATOGÉNESIS DEL CÁNCER DE MAMA	12
1.3 FACTORES PREDICTIVOS Y CLASIFICACIÓN POR SUBTIPOS MOLECULARES	16
1.4 EL ESTROMA TUMORAL EN EL CÁNCER DE MAMA Y SU IMPORTANCIA EN LA METÁSTASIS	19
1.5 TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA.....	20
1.6 NUEVAS PERSPECTIVAS.....	21
2. EXOSOMAS: MICROVESÍCULAS IMPLICADAS EN EL CÁNCER.....	22
2.1 DESCUBRIMIENTO DE LOS EXOSOMAS.....	22
2.2 BIOGÉNESIS DE LOS EXOSOMAS Y UNIÓN CON LA CÉLULA DIANA	22
2.3 COMPONENTES DE LOS EXOSOMAS.....	24
3. EXOSOMAS Y SU PAPEL EN EL CÁNCER DE MAMA.....	28
3.1 INTERACCIÓN DE LOS EXOSOMAS CON LAS CÉLULAS DEL ESTROMA TUMORAL.....	28
3.2 MICROARN CONTENIDO EN EXOSOMAS.....	29
3.3 EXOSOMAS EN LA ANGIOGÉNESIS DEL TUMOR.....	31
3.4 EXOSOMAS Y DESARROLLO DE METÁSTASIS	31
3.5 EXOSOMAS EN LA RESISTENCIA A FÁRMACOS ANTITUMORALES	32
3.6 EXOSOMAS COMO BIOMARCADORES DE CÁNCER	33
3.7 POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LOS EXOSOMAS.....	39
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43

RESUMEN

Los exosomas son pequeñas vesículas de membrana secretadas por la mayoría de las células de organismo, incluidas las células tumorales. Aunque hasta hace poco solo se les atribuía la función de eliminar sustancias de desecho celular, en los últimos años se ha descubierto que están fuertemente implicadas en numerosos procesos de comunicación intercelular, ya que son capaces de transferir material genético a otras células receptoras del organismo, produciendo en éstas cambios en su genotipo, y promoviendo el desarrollo tumoral en numerosos tipos de cánceres, como el de mama, el de próstata, el de páncreas o el melanoma.

En el cáncer de mama, los exosomas desempeñan un importante papel en la tumorigénesis, en la angiogénesis y en el proceso de metástasis tumoral. Dado que es posible identificar la presencia de estas microvesículas en sangre en los pacientes con cáncer, los exosomas podrían utilizarse como biomarcadores circulantes del cáncer, permitiendo un diagnóstico más precoz de la enfermedad y de sus metástasis. Además, debido a su capacidad de transportar moléculas biológicamente activas en su interior, los exosomas se proponen como prometedoros vehículos de fármacos antineoplásicos en el cáncer de mama.

PALABRAS CLAVE

Exosomas, cáncer de mama, patogénesis del cáncer de mama, exosomas y cáncer, biopsia líquida, exosomas como biomarcadores, exosomas en el tratamiento del cáncer de mama.

ABSTRACT

Exosomes are small membrane vesicles secreted by the majority of the body cells, including tumor cells. Although they had been only credited with the function of eliminating cellular waste substances so far, in recent years it has been discovered that they are strongly involved in numerous processes of intercellular communication, since they are capable of transferring genetic material to other receptor cells in the organism, producing changes in their genotype, and promoting the development of tumors in many types of cancer, such as breast cancer, prostate, pancreas or melanoma.

In breast cancer, exosomes play an important role in tumorogenesis, angiogenesis and metastasis. Since it is possible to identify the presence of these microvesicles in the blood of cancer patients, exosomes could be used as circulating biomarkers of cancer, allowing an earlier diagnosis of the disease and its metastases. Furthermore, due to their ability to transport biologically active molecules within them, exosomes are proposed as promising vehicles for antineoplastic drugs in breast cancer.

KEYWORDS

Exosomes, breast cancer, pathogenesis of breast cancer, exosomes and cancer, liquid biopsy, exosomes as biomarkers, exosomes in breast cancer treatment.

ABREVIATURAS

ACH: Anticonceptivos hormonales

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGO2: Proteína Argonauta 2

Anx A2: Anexina A2

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

cADN: ADN circulante

CAM: Moléculas de adhesión celular

CMI: Células mononucleares
inflamatorias

Complejo SNARE: Complejo de proteína
de fijación soluble NSF

ctADN: ADN tumoral circulante

CTC: Células tumorales circulantes

Da: Dalton

Del-1: Proteína de locus 1 de desarrollo
endotelial

EGFR: Factor de crecimiento epidérmico

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción
ligado a enzimas

FAC: Fibroblastos asociados al cáncer

FDA: Food and Drug Administration

FGF: Factor de crecimiento de
fibroblastos

ICAM-1: Molécula de adhesión
intercelular-1

IMC: Índice de masa corporal

ITG β 4: Integrina G β 4

ITG β 5: Integrina G β 5

LPA: Ácido lisofosfatídico

MHC: Complejo mayor de
histocompatibilidad

MiARN: Micro-ARN

MVB: Cuerpos multivesiculares

nm: Nanómetro

NSG: Secuenciación de siguiente
generación

PCR: Reacción en cadena de la
polimerasa

RE: Receptores de estrógenos

RP: Receptores de progesterona

TfR: Receptores de transferrina

TGF- β : Factor de crecimiento
transformante beta

TIMP: Inhibidor tisular de las
metalopeptidasas

TLR: Receptores *toll like*

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TRBP: Proteína de unión en respuesta a
trans-activación

TSH: Terapia hormonal sustitutiva

VCAM-1: Molécula de adhesión celular
vascular-1

VEGF: Factor de crecimiento endotelial
vascular

VEGF-A: Factor de crecimiento vascular
A

VHC: Virus de la hepatitis C

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia
Humana

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es actualmente la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en España. Si bien es cierto que la tasa de mortalidad ha disminuido notablemente en los últimos años gracias al desarrollo de nuevas terapias antineoplásicas y a las técnicas de cribado mediante la mamografía, su elevada incidencia y su mortalidad todavía suponen un gran impacto sanitario en nuestra sociedad, y es por esto por lo que se siguen requiriendo todavía más esfuerzos para desarrollar técnicas de diagnóstico más precoces y protocolos terapéuticos más eficaces.

Los avances científicos y tecnológicos de las últimas décadas han sido decisivos para abordar de una manera más profunda el conocimiento de la biología tumoral y del comportamiento biológico del cáncer, y han permitido que en la actualidad se conozcan numerosas moléculas implicadas en los diferentes tipos de cánceres. En los últimos años han cobrado especial importancia unas pequeñas microvesículas secretadas por la mayoría de las células del organismo que podrían tener un papel fundamental en la tumorigénesis: los exosomas. Aunque su existencia ya se conocía con anterioridad, hasta hace pocos años la única función relevante que se les atribuía era la de la eliminación de sustancias de desecho celular. Cuando comenzaron a estudiarse más profundamente, se descubrió que estos exosomas desempeñaban un importante papel en los procesos de comunicación intercelular, ya que contenían en su interior moléculas biológicamente activas, que eran capaces de transmitir a otras células del organismo.

Siguiendo esta línea de investigación, numerosos estudios en los últimos años han demostrado la implicación de los exosomas en el desarrollo del cáncer y en los procesos de angiogénesis y metástasis. Debido a esto, en la actualidad se están llevando a cabo numerosos estudios en los que los exosomas se proponen como posibles biomarcadores circulantes en sangre en el cáncer de mama y en otros tipos de cánceres, como el de pulmón, el de páncreas o el melanoma. El análisis de estas microvesículas circulantes en sangre podría permitir un diagnóstico más precoz de la enfermedad, o incluso predecir posibles recaídas o metástasis. Además, debido a su importante papel en la comunicación intercelular, los exosomas también se plantean como posibles vehículos para transportar fármacos antineoplásicos.

OBJETIVOS

El objetivo final de esta revisión bibliográfica será tener un conocimiento renovado e íntegro de la biología del cáncer de mama y de la implicación de los exosomas en el mismo, centrándonos en sus posibilidades tanto diagnósticas como terapéuticas. Abordaremos este estudio de forma progresiva dando respuesta a los siguientes objetivos:

1. Se revisará el conocimiento actual sobre la biología del cáncer de mama, sus bases moleculares y los factores patogénicos implicados en su desarrollo.
2. Se profundizará en el conocimiento de los exosomas, así como en el estudio de su composición y sus funciones en el desarrollo tumoral.
3. Se valorará la implicación de los exosomas en el cáncer de mama como mediadores en la comunicación entre las células cancerosas y el estroma, en la progresión tumoral, en la angiogénesis y en los procesos de metástasis.
4. Se destacará, de forma especial, el papel que los exosomas pueden desempeñar como biomarcadores diagnósticos de cáncer, y el uso de los mismos como posibles tratamientos antineoplásicos en el cáncer de mama.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se realizó una revisión bibliográfica de los artículos disponibles en la literatura científica sobre los exosomas, su implicación en el cáncer de mama y sus posibilidades diagnósticas y terapéuticas. Para esto se realizó una búsqueda bibliográfica empleando el motor de búsqueda PubMed, que permite acceso a la base de datos MEDLINE. La búsqueda inicial se realizó mediante la búsqueda de la palabra clave [exosomes and breast cancer], de la cual se obtuvieron 667 resultados. De estos, fueron seleccionados unos 90 artículos que por su título coincidían con el objetivo de la revisión. Fueron leídos los *abstract* y fueron seleccionados 55 de ellos para una comprensión general. Posteriormente para completar la información de esta revisión, se hicieron diferentes búsquedas de artículos en PubMed en diferentes fases. En la revisión se pueden distinguir tres bloques bien diferenciados de artículos:

1. Artículos que hacen referencia a la biología del cáncer de mama, mediante la búsqueda con las palabras clave [biology of breast cancer], [risk factors of breast cancer], [biomarkers in breast cancer].
2. Artículos que hacen referencia a los exosomas, sus componentes y sus funciones, mediante la búsqueda con las palabras clave [exosomes], [exosomes composition biogenesis and function], [exosomes in cancer].
3. Artículos específicos sobre los exosomas en el cáncer de mama y sus posibilidades diagnósticas y terapéuticas, mediante la búsqueda con las palabras clave [exosomes as breast cancer biomarker], [liquid biopsy], [exosomes and breast cancer treatment].

En la mayoría de estas búsquedas en PubMed, se filtraron *artículos publicados en los últimos 5 años (2015-2020)*, aunque en algunos artículos sobre la biología general del cáncer de mama fueron utilizadas revisiones de los últimos 10 años. Además, se utilizaron también los filtros *solo revisiones y solo revisiones sistemáticas*.

Finalmente, fueron seleccionados 33 artículos, que sustentan la base fundamental de esta revisión bibliográfica. Algunos de estos artículos no fueron de libre acceso desde el buscador PubMed, así que fueron revisados desde la plataforma Alcorze, que proporciona acceso libre a numerosos artículos desde la Biblioteca de la Universidad de Zaragoza.

A partir de los artículos seleccionados, se hizo una lectura comprensiva del artículo completo, y se revisaron aquellos trabajos cuyas referencias bibliográficas podían contener información relevante. Cuatro de estas referencias de otras revisiones fueron revisadas e incluidas en esta revisión por contener información relevante para el trabajo.

Para tener una base más completa sobre la patogénesis del cáncer de mama, su diagnóstico y su tratamiento, se utilizó un libro de Ginecología General, que ha sido citado

en varias ocasiones en este artículo y queda referenciado en la bibliografía que se encuentra al final de este trabajo.

Además, para revisar ciertos datos más específicos del cáncer de mama en España y su prevalencia y mortalidad en nuestro país, se utilizó el buscador Google para revisar archivos específicos, como *Cifras del Cáncer en España en 2020*, que fue encontrado en la web de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), y aparece citado en la bibliografía.

Todos los artículos fueron descargados y almacenados en el gestor bibliográfico Mendeley de Elsevier, y fueron citados siguiendo las normas del estilo *Vancouver*.

RESULTADOS

1. CÁNCER DE MAMA

1.1 EPIDEMIOLOGÍA

En España, el cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en la mujer, y la tercera causa de muerte por cáncer en la población española en general, después del carcinoma de pulmón y el colorrectal. En la actualidad, representa el 36.2% de todos los cánceres diagnosticados en mujeres en nuestro país (**Figura 1**). A nivel mundial, en los últimos años ha representado el 11.6% de los cánceres diagnosticados en todo el mundo para ambos sexos (1).

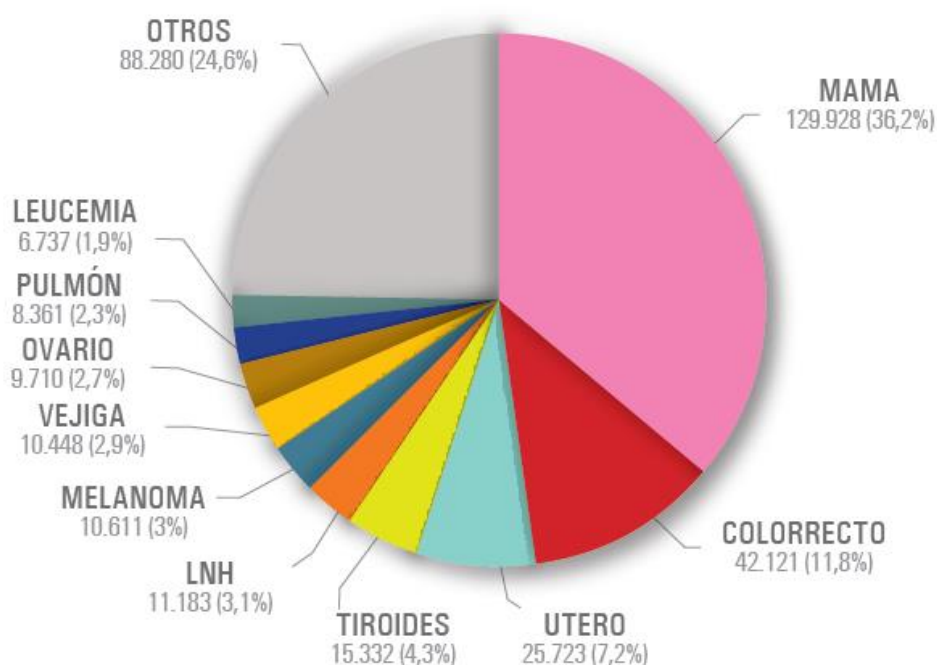


Figura 1. Prevalencia de tumores en mujeres en España. Extraída de: Las cifras del cáncer en España. Sociedad Española de Oncología Médica. 2020 (1)

Desde los primeros registros disponibles, se ha evidenciado una tendencia ascendente del cáncer de mama con incrementos anuales del 1-4%, tanto en los países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo. En España, a partir del 2004, la incidencia de cáncer de mama en mujeres de 45-64 años comenzó a descender al 2,4% anual, mientras que en las mujeres mayores de 64 años se incrementó hasta el 3,3% (2) (**Figura 2**).

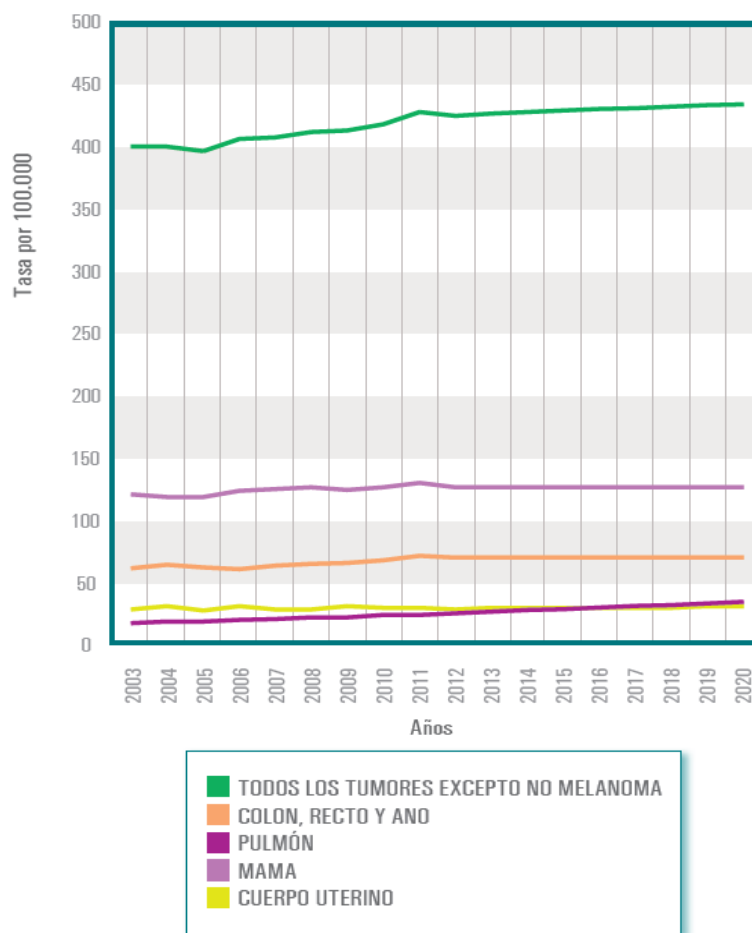


Figura 2. Evolución temporal de los cánceres diagnosticados en España entre los años 2003 y 2020. Extraída de: Las cifras del cáncer en España. Sociedad Española de Oncología Médica. 2020 (1)

Respecto a la mortalidad por cáncer de mama, se experimentó un largo periodo de crecimiento hasta los años 1990, cuando empezó a invertirse la tendencia en muchos países desarrollados, evidenciándose un incremento significativo de la supervivencia. Según las estimaciones de EUROCORE-5, basándose en el análisis de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama en 29 países europeos entre el año 2000-2007, la tasa relativa de supervivencia se ha incrementado en toda Europa, presentando una media de supervivencia a los 5 años del 81,8%, alcanzando su pico máximo en el grupo de 45-54 años, y disminuyendo progresivamente a partir de esa edad. En el ámbito europeo, España tiene la tasa de mortalidad más baja de cáncer de mama y una supervivencia superior a la media, sin embargo, el cáncer de mama continúa siendo la principal causa de muerte en las mujeres entre los 35-54 años de edad (2).

1.2 PATOGÉNESIS DEL CÁNCER DE MAMA

La glándula mamaria está compuesta por tres tipos de líneas celulares, que comprenden las células mioepiteliales, las células de epitelio ductual y las células del epitelio alveolar (3) (**Figura 3**). El epitelio típico de la glándula mamaria es el epitelio estratificado, que está rodeado por una membrana basal (4).

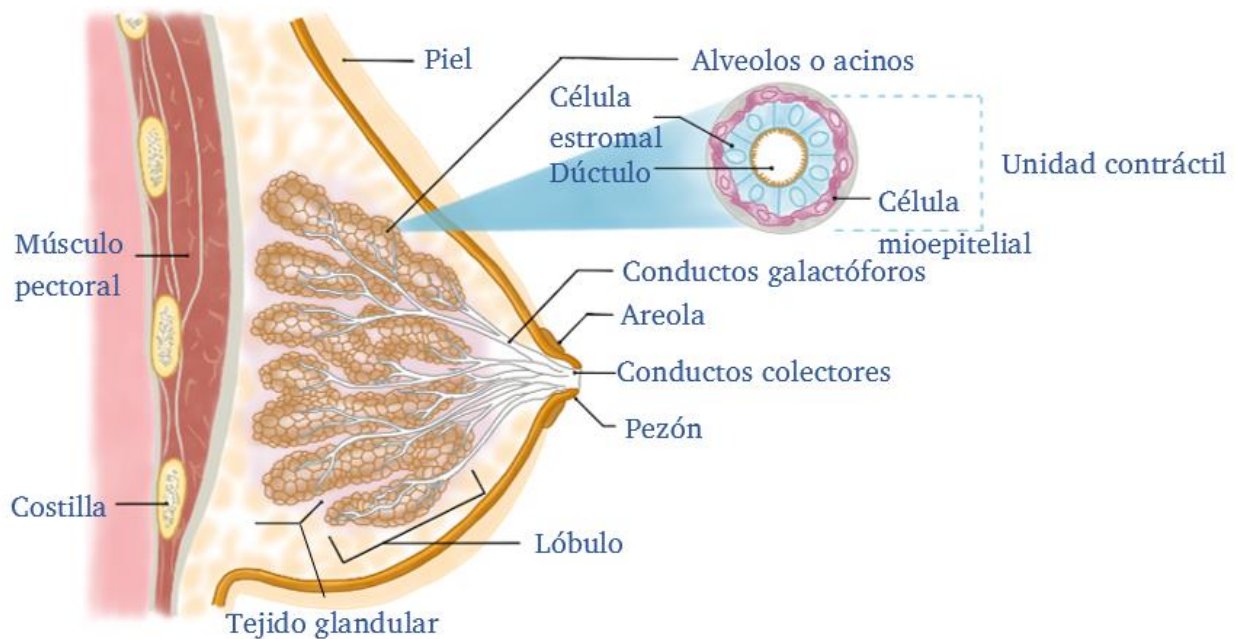


Figura 3. Anatomía de la glándula mamaria. Modificada de una imagen extraída del sitio web <https://www.natalben.com/>

El desarrollo y la remodelación de la glándula mamaria durante la pubertad, el embarazo, la lactancia y la involución de la mama conllevan procesos de proliferación celular rápida, diferenciación y apoptosis. Las necesidades biológicas de proliferación celular y reemplazo celular son llevadas a cabo por las células madres progenitoras que residen en la glándula mamaria (3).

Como veremos a continuación, en el cáncer de mama se produce una proliferación neoplásica de las células mioepiteliales o epiteliales de la glándula mamaria, causada por la asociación de factores genéticos, cambios epigenéticos y factores ambientales (**Tabla 1**).

FACTORES IMPLICADOS EN EL CÁNCER DE MAMA

FACTORES GENÉTICOS		FACTORES EPIGENÉTICOS	FACTORES AMBIENTALES
<p>Antioncogenes alterados que no pueden llevar a cabo su función fisiológica de reparar los daños en el ADN:</p> <p style="text-align: center;">Mutaciones en BRCA 1 y BRCA 2</p>	<p>Protooncogenes mutados que hacen que se sobreexpresen factores de crecimiento e inducen proliferación celular descontrolada</p> <p style="text-align: center;">Mutaciones en HER2</p>	<p style="text-align: center;">Modifican la expresión de los genes sin alterar la secuencia del ADN</p> <p style="text-align: center;">Exposición fetal a:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estradiol E2 - Leptina 	<ul style="list-style-type: none"> - Menarquia temprana - Nuliparidad - Embarazo después de los 30 años - Terapia de reemplazo hormonal o de anticonceptivos hormonales

Tabla 1. Relación de los diferentes factores implicados en el cáncer de mama. Elaboración propia.

1.2.1 Factores genéticos

El estudio de la expresión génica es una parte imprescindible para el conocimiento sobre origen del cáncer, así como el análisis del origen de genes promotores de mutaciones involucrados en el desarrollo del cáncer (3). Son numerosos los genes que se han identificado en relación con el cáncer de mama. Las mutaciones inactivadoras en genes supresores de tumores y la amplificación anormal de los protooncogenes desempeñan un papel fundamental en los procesos de proliferación celular y de progresión tumoral (5).

Como se desarrollará a continuación, en el cáncer de mama existen fundamentalmente dos tipos de genes que llevan a la proliferación celular incontrolada:

BRCA1 y BRCA2

La mayoría de los cánceres de mama se deben a mutaciones que se producen de forma esporádica, mientras que sólo un 5-10% de los cánceres de mama son de carácter hereditario (5).

Dentro los cánceres de mama hereditarios, destaca la importancia de dos genes: BRCA1 y BRCA2, que son dos antioncogenes que se encuentran en los cromosomas 17q21 y 13q12 respectivamente, y ambos se heredan con carácter autosómico dominante (5).

Estos genes son los responsables de aproximadamente el 20-25% de los cánceres de mama hereditarios, y del 5-10% de cánceres de mama a nivel general. Ambos intervienen en la reparación biológica de daños en el ADN, y cuando se produce su mutación, se pierde su capacidad inhibidora tumoral, contribuyendo a aumentar el riesgo de proliferación celular, especialmente en la mama y el ovario.

La prevalencia de cáncer de mama en mujeres portadoras de las mutaciones de estos genes es de 10-30 veces mayor que en las mujeres que no las han heredado. Siguiendo esta línea, los últimos estudios apuntan a que en las mujeres portadoras de mutaciones en BRCA1, la prevalencia de cáncer de mama es del 65% a los 70 años de edad, y de un 45% a la misma edad en las mujeres portadoras de mutaciones en BRCA2 (4).

Numerosos estudios demuestran que el riesgo de cáncer de mama hereditario aumenta cuanto más cercano es el familiar, más numerosos son los casos en la familia y más temprana es la edad de aparición. Además, se ha evidenciado una relación significativa entre la edad temprana al diagnóstico y la frecuencia de mutaciones en los genes BRCA (6).

Receptor HER2

En el cáncer de mama también se encuentran alteraciones en los genes que codifican para receptores específicos. La existencia de un tipo de receptor en una célula hace que esta sea sensible y responda a los efectos biológicos de la sustancia con la que tiene afinidad el receptor. La presencia de estos receptores alterados en las células permite que diferentes moléculas actúen como mitógenos, activando genes que promueven la tumorigénesis y la transformación maligna de las células (3).

HER2, también conocido como erbB-2 o Neu, es un oncogén implicado en los cánceres no hereditarios de mama, y se encuentra en el cromosoma 17q12. Es un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de la familia de tirosin-quinasa (5).

Se han identificado cuatro tipos de factor de crecimiento epidérmico: EGRF HER1, HER2, HER3 y HER4. La sobreexpresión de los receptores HER2 y/o del gen HER2 se ha descrito en el 25% de las pacientes con cáncer de mama. Estos receptores activan diversas vías de señalización intracelular promoviendo la diferenciación y proliferación de las células tumorales. Además, recientes estudios han demostrado la existencia de una fuerte relación entre la expresión de receptores de estrógenos, receptores de progesterona y la expresión de Her2 (3).

Junto a los receptores hormonales, HER2 es el marcador pronóstico y predictivo más importante en el cáncer de mama. Desde hace varias décadas, se sabe que los cánceres de mama con sobreexpresión de HER2 representan un subtipo biológico muy agresivo, por lo que es necesario identificar si las pacientes sobreexpresan o no este receptor a la hora de decidir el tratamiento. En el año 1998 se aprobó el uso terapéutico de trastuzumab (7), un anticuerpo monoclonal que bloquea específicamente al receptor HER2, y es en la actualidad el tratamiento adyuvante de elección para los cánceres de mama HER2 positivos (8). Su introducción en la práctica clínica supuso un gran cambio en la evolución de la enfermedad de estas pacientes, cuyo curso clínico mejoró de manera muy significativa (9).

Otros genes implicados en el cáncer de mama

Además de los genes citados anteriormente, existen otros genes, como p53 (gen supresor de tumores cuya función es impedir la proliferación de células con genomas aberrantes), que también pueden encontrarse mutado en cánceres de tipo hereditario (6).

En la patogénesis del cáncer de mama también se encuentra implicada la mutación de C-myc. C-myc es un protooncogén se encuentra en el cromosoma 8q24 y codifica a la proteína Myc, que es un importante factor de transcripción genética. Algunos de los genes regulados por C-myc (como MT1, HTERT o PEG10), desempeñan funciones vitales en la iniciación y progresión del cáncer de mama. La sobreexpresión de C-myc se observa predominantemente en la fase invasiva de los carcinomas de mama, mientras que no se detecta esta amplificación en los tejidos benignos (5).

Se ha verificado la existencia de diversos genes mutados asociados a determinados subtipos clínicos de cáncer de mama, por ejemplo, las mutaciones en el gen TP53 suelen estar relacionados con niveles altos en el biomarcador de proliferación Ki67 (valor más habitual para determinar el índice proliferativo) y tumores de alto grado histológico. Del mismo modo en cánceres con bajo índice de proliferación Ki67 se han detectado mutaciones en los genes MAP3K1 y MAP4K2 que están asociados a un buen pronóstico. Otros cambios genéticos que aumentan el riesgo de padecer cáncer de mama incluyen mutaciones del gen PTEN (síndrome de Cowden), STK11 (síndrome de Peutz-Jeghers) (10).

En uno de los trabajos más extensos sobre los genes implicados en el cáncer de mama, se llevó a cabo la secuenciación de 560 genomas de pacientes con cáncer de mama, y se identificaron cinco nuevos genes cancerígenos (MED23, FOXP1, MLLT4, XBP1 y ZFP36L1). Se establecieron un total de 93 genes mutados (31 dominantes, 60 recesivos y 2 inciertos) que están implicados en la patogénesis de la enfermedad. Probablemente, existan más genes implicados en el cáncer de mama, pero estos presentan una baja frecuencia de presentación. Podemos decir que en la actualidad se conocen los genes que albergan la mayoría sustancial de las mutaciones conductoras de esta enfermedad (10).

1.2.2 Cambios epigenéticos

La epigenética es el conjunto de mecanismos que modifican la actividad y la expresión de los genes sin alterar la secuencia del ADN. En el desarrollo del cáncer de mama están involucrados diferentes mecanismos dependientes de ambiente hormonal fetal, con información que se hereda de madres a hijas a través de las células somáticas. Estas modificaciones epigenéticas pueden producir cambios en el desarrollo de la glándula mamaria, así como incrementar la vulnerabilidad del tejido epitelial para la transformación maligna (3).

Se ha propuesto que los cambios epigenéticos que consiguen modificar el ambiente hormonal podrían ser la exposición durante la vida fetal a estradiol E2 y a

leptina, que modificarían las características heredables de la glándula mamaria, y se manifestarían durante la edad adulta mediante cambios en las unidades terminales ductuales (3).

1.2.3 Factores ambientales

Dentro de los factores ambientales, se ha estudiado que las mujeres que han padecido una menarquia temprana (aparición del primer ciclo menstrual de manera precoz) tienen riesgo aumentado de sufrir cáncer de mama. También la nuliparidad o el embarazo después de los 30 años son factores que han demostrado aumentar este riesgo. Por otro lado, la toma exógena de hormonas, como la terapia hormonal sustitutiva (THS) o los métodos anticonceptivos hormonales (ACH), se han relacionado con una mayor incidencia de cáncer de mama. Por último, la dieta alta en grasas y baja en fibra, y la obesidad, también se han demostrado como factores predisponentes para el desarrollo de cáncer de mama en los últimos años (4).

1.3 FACTORES PREDICTIVOS Y CLASIFICACIÓN POR SUBTIPOS MOLECULARES

Todas las células poseen receptores en su membrana, en su citoplasma y en el núcleo. Diferentes moléculas, como las hormonas, se unen a dichos receptores provocando una respuesta celular. Como se desarrollará a continuación, en el cáncer de mama hay tres receptores hormonales que son usados como marcadores tumorales: receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP) y receptor de leptina.

La expresión o no de estos receptores hormonales permite clasificar los tumores de mama por subtipos moleculares. En la práctica clínica se identifica la presencia de estos receptores mediante estudios inmunohistoquímicos y genética molecular, antes de iniciar el tratamiento (8).

Receptores de estrógenos (RE)

Los receptores de estrógenos pertenecen a la súper familia de receptores nucleares, ya que se encuentran y actúan en el núcleo celular (3). Entre el 70-75% de los carcinomas infiltrantes de mama expresan positividad para estos receptores (9).

Se conocen tres tipos de receptores de estrógenos: RE α , RE β y RE_m (membrana). Los receptores RE α y RE β son los más estudiados en cáncer de mama, ya que actúan en la sobreactivación de la transcripción de genes oncogénicos (C-fos, C-myc) por los estrógenos en las mujeres, que promueven el descontrol del ciclo celular y de la apoptosis. Por lo tanto, los niveles elevados de estrógenos en el organismo, son actualmente considerados un factor de riesgo en el desarrollo del cáncer de mama (3).

La expresión de receptores de estrógeno constituye un factor pronóstico favorable y un potente factor predictivo a la hormonoterapia. Aproximadamente el 30-40% de las mujeres con cáncer de mama avanzado que expresan RE tendrán una respuesta favorable al tratamiento hormonal, a la vez que la respuesta al tratamiento hormonal en pacientes

con cáncer de mama precoz que expresan sobreexpresión de receptores de estrógenos, es muy positiva en términos de supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad (9).

Receptores de progesterona (RP)

Los receptores de progesterona son sintetizados en mayor cantidad en tejidos sensibles a los estrógenos, como el tejido mamario (3). Los receptores de progesterona son expresados en un 60-70% de los casos de carcinoma ductal infiltrante de mama (9). Se ha estudiado que la expresión de estos receptores son resultado de la acción biológica de los estrógenos, lo cual explica mayores niveles de receptores de progesterona en mujeres premenopáusicas que en postmenopáusicas (3). Algunos estudios recientes sugieren que un nivel bajo de expresión de RP, generalmente por debajo del 20%, podría tener implicaciones pronósticas negativas (9).

En general, la correlación entre la expresión de RE y RP positivos es buena (**Tabla 2**), y aproximadamente el 64% de los casos de cáncer de mama presentan perfil RE positivo y RP positivo (3). Sin embargo, pueden observarse un 10% de casos RE positivos y RP negativos en los que el riesgo de recaída es mayor que siendo ambos marcadores positivos. En menos del 5% de las pacientes pueden observarse RP positivos y RE negativos (9).

Receptores sobreexpresados	Porcentaje de respuesta al tratamiento hormonal
RE + / RP +	70-77 %
RE + / RP -	11-27 %
RE - / RP +	11-46 %
RE - / RP -	11-44 %

Tabla 2. Patrones de respuesta al tratamiento hormonal en diversos perfiles de receptores hormonales. Extraída de: Santillán-Benítez JG, et al. Expresión génica y receptores hormonales en cáncer mamario. Rev Med e Investig. 2013; 1(1):17-24. (3)

Receptores de leptina

La leptina es una hormona que se sintetiza y secreta principalmente en el tejido adiposo y su función principal en el organismo es regular el equilibrio energético. Actúa a través del anclaje con el dominio extracelular de su receptor específico de membrana, expresado en tejidos como la placenta, páncreas o estómago. Diversos estudios han revelado que, mediante la sobreexpresión de receptores de leptina en tejido mamario, se activan vías de señalización JAK2/STAT3, que activan genes como C-myc, Cyclin D1, Erg-1 y Bcl-2, entre otros, que promueven el crecimiento y la proliferación celular descontrolada. Por otro lado, los niveles de leptina se correlacionan positivamente con los valores de índice

de masa corporal (IMC), por lo que a día de hoy la obesidad se considera un factor de riesgo más en el desarrollo de cáncer de mama (3).

No todos los cánceres de mama tienen el mismo comportamiento biológico, por lo que las pacientes pueden presentar respuestas diferentes al tratamiento en función de la expresión positiva o negativa de los receptores hormonales y de la sobreexpresión de HER2. Además de los criterios anatómicos clásicos -tamaño del tumor, nódulos linfáticos afectados y metástasis- (TNM), se ha establecido una clasificación molecular en subtipos para establecer el pronóstico y planificar el tratamiento de una forma individualizada (2) (Tabla 3).

Luminal A	Luminal B-	Triple negativo o basal	HER2 sobreexpresado
RE positivo	RE positivo	RE negativo	RE negativo
RP <20	RP positivo o negativo	RP negativo	RP negativo
HER2 negativo	HER 2 negativo o positivo	HER2 negativo	HER 2 positivo
Ki 67 bajo	Ki 67 alto	Ki 67 alto	Ki 67 alto

Tabla 3. Clasificación molecular del cáncer de mama por perfil inmunohistoquímico. Adaptada de: Merino Bonilla JA et al. Breast Cancer in the 21st Century. 2017; 59(5):368–79. (2)

Luminal A: representan el 40% de los cánceres de mama. Presentan alta expresión de receptores hormonales y baja expresión de HER2. Tienen un índice de proliferación bajo y suelen tener buen pronóstico (8).

Luminal B: representan el 20% de los tumores de mama. Presentan alta expresión de receptores hormonales y expresión variable de HER2. Se caracterizan por tener un alto índice de proliferación, y por lo tanto presentan peor pronóstico que los luminal A. Los tumores luminales expresan receptores hormonales, por lo que suelen mostrar buena respuesta al tratamiento con hormonoterapia (8).

Triple negativo o Basal: representan el 15-20% de los tumores de mama. Se denominan triple negativo porque no expresan receptores hormonales ni sobreexpresión de HER2. Tienen una alta expresión de genes de proliferación celular y presentan inestabilidad genómica. Además, suelen presentarse en pacientes con mutaciones en BRCA-1. Son los de peor pronóstico, ya que solo son sensibles a la quimioterapia (8).

HER2 sobreexpresado: representan el 10-15% de todos los tumores. Presentan una alta expresión de HER2 y no suelen expresar receptores hormonales. Se caracterizan por tener un índice de proliferación alto y por ser de peor pronóstico que los tumores luminales. Responden al tratamiento con trastuzumab, que actúa bloqueando específicamente al receptor HER2 (8).

1.4 EL ESTROMA TUMORAL EN EL CÁNCER DE MAMA Y SU IMPORTANCIA EN LA METÁSTASIS

Entre los diferentes tipos de células que forman el estroma del cáncer de mama, se encuentran los fibroblastos asociados al cáncer (FAC), las células endoteliales de los vasos sanguíneos y los adipocitos. La mayoría de los fibroblastos asociados al cáncer derivan de los fibroblastos del propio tejido mamario, aunque también pueden derivar de las células madre mesenquimales, células epiteliales, adipocitos o células endoteliales. Los FAC promueven la progresión tumoral mediante varios mecanismos, ya que pueden ejercer fuerzas contráctiles que facilitan la invasión de las células cancerosas, son capaces de degradar y remodelar la matriz extracelular y pueden promover la angiogénesis tumoral, mediante la secreción de factores de crecimiento y citoquinas (11).

Durante los últimos años, Eiro y su equipo (11) han contribuido a establecer una caracterización funcional de los componentes del estroma tumoral de la mama. Entre estos se encuentran las metaloproteasas de la matriz y sus inhibidores celulares TIMP (Inhibidor Tisular de las Metalopeptidasas), las citoquinas y los receptores *toll like* (TLR, del inglés toll like receptors) (11).

Metaloproteasas de matriz

Las metaloproteasas de la matriz son capaces de degradar la matriz extracelular y la membrana basal de los tumores, facilitando así la invasión tumoral y el desarrollo de metástasis (**Figura 4**). Además, son capaces de promover la angiogénesis, la activación de la proliferación o la inhibición de la apoptosis. En diferentes estudios se ha demostrado que las pacientes con tumores de mama infiltrados por fibroblastos asociados al cáncer y que muestran una alta expresión de metaloproteasas y de TIMP, presentan una elevadísima tasa de desarrollo de metástasis a distancia, en comparación con las pacientes con tumores con un bajo perfil de metaloproteasas y TIMP (11, 12).

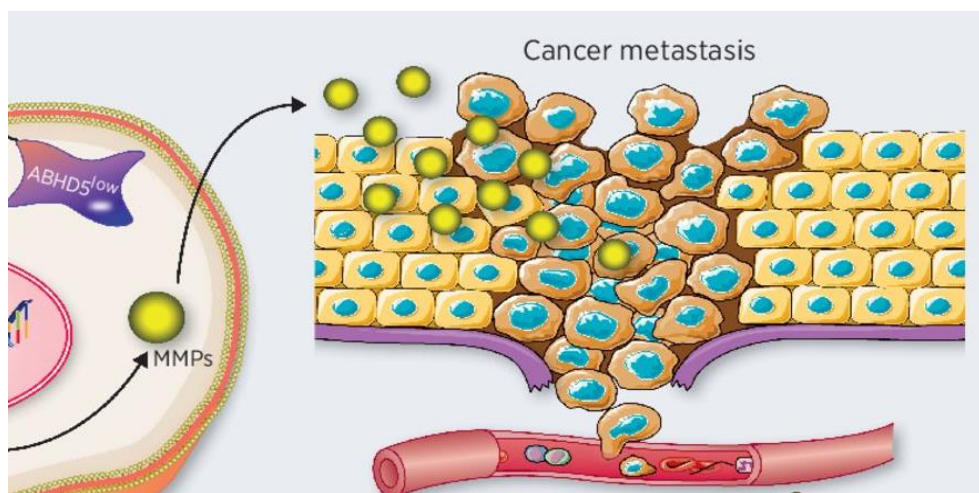


Figura 4. Metaloproteasas degradando la matriz extracelular del tumor. Mecanismo de invasión tumoral y metástasis. Extraída de: Shang S, Ji X, Zhang L et al. Macrophage ABHD5 suppresses matrix metalloproteinase expression and cancer metastasis. *Cancer Res.* 2019; 79(21):5513–26. (12)

Citoquinas

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular que desempeñan un importante papel en los procesos inflamatorios. También intervienen en la comunicación intercelular de células inmunes con células del estroma tumoral, regulando procesos tales como la proliferación, la supervivencia y la migración celular, así como promoviendo la evasión de las células cancerosas a la respuesta inmune. Varios estudios asocian los elevados niveles séricos de citoquinas con la agresividad tumoral y la recurrencia en el cáncer de mama (11).

Receptores *toll like*

Los TLR son receptores que canalizan señales de activación en una variedad de células inflamatorias relacionadas con el sistema inmune. Las células cancerosas también expresan TLR, y sus señales contribuyen a estimular la liberación de citoquinas que, a su vez, favorecen el reclutamiento de células inflamatorias. Por otro lado, los TLR estimulan la proliferación de las células cancerosas y su resistencia a la apoptosis, así como su capacidad invasiva y metastásica mediante la regulación de metaloproteasas e integrinas. Eiro y su equipo (11) demostraron que la expresión de TLR-4 por las células mononucleares inflamatorias se asoció a mayor incidencia de metástasis por vía hematológica, mientras que la expresión de TLR-9 por los fibroblastos asociados al cáncer se correlacionó con una menor incidencia de desarrollo de metástasis. Este hecho, indica que TLR-9 podría tener un papel protector frente a la progresión tumoral, ya que es capaz de activar a los linfocitos B y a las células dendríticas induciendo una potente respuesta inmune contra el tumor (11).

1.5 TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA

Las terapias sistémicas como la quimioterapia y la hormonoterapia adyuvante, junto con el cribado mamográfico, han sido factores decisivos en el descenso de la mortalidad por cáncer de mama que se observó a partir de los años 1990. Un metaanálisis de numerosos ensayos realizado con datos recopilados hasta el año 2000, evidenció que estos tratamientos reducían el riesgo de recidiva a los 5 años y la tasa anual de mortalidad por cáncer de mama a los 15 años (2). Otro de los cambios que se consolidó a finales del siglo XX fue la posibilidad de administrar la quimioterapia antes del tratamiento quirúrgico, primero con intención de rescatar casos inoperables, y posteriormente ampliando sus indicaciones con la finalidad de disminuir el desarrollo de posibles metástasis tumorales (13).

Por otro lado, otro de los nuevos avances terapéuticos que están implicados actualmente en la disminución del impacto de la mortalidad por cáncer de mama es el desarrollo de fármacos biológicos como el trastuzumab, que ha demostrado mejorar significativamente el intervalo libre de enfermedad y la supervivencia en las pacientes con receptores HER2 positivos (2).

Respecto al tratamiento quirúrgico, la American Society of Breast Surgeons recomienda la cirugía conservadora de la mama frente a la mastectomía radical siempre que sea posible, y desaconseja la mastectomía contralateral profiláctica en mujeres de riesgo medio que presentan cáncer de mama unilateral. También, en las últimas guías se aconseja la biopsia selectiva del ganglio centinela preferiblemente al vaciamiento axilar, ya que presenta menor iatrogenia y las tasas de supervivencia demostradas son equivalentes (2).

1.6 NUEVAS PERSPECTIVAS

El conocimiento más profundo de la biología tumoral y del comportamiento biológico del cáncer de mama que ha tenido lugar en las últimas décadas, han permitido un abordaje más específico y eficiente de la enfermedad. Así, la expresión de receptores hormonales y la sobreexpresión de moléculas como HER2, resultan esenciales a día de hoy para decidir el tratamiento de elección, y han desplazado en gran manera el papel de la quimioterapia tradicional (13).

Además de los biomarcadores clásicos como los RE y HER2, en los últimos años se está investigando el prometedor papel de una serie microvesículas específicas que podrían actuar como vehículo de transporte para modificar de forma selectiva el comportamiento tumoral: los exosomas (7). Estos exosomas, pequeñas vesículas derivadas de diferentes tipos de células, se han demostrado fuertemente implicadas en el desarrollo de tumores y en la progresión a metástasis. Desde un punto de vista diagnóstico, la detección precoz de estas vesículas en las pacientes podría acelerar su diagnóstico y permitir una detección precoz de recidivas o metástasis (13); y desde un punto de vista terapéutico, podrían tener un potencial papel en el desarrollo de terapias futuras contra el cáncer de mama (14).

2. EXOSOMAS: MICROVESÍCULAS IMPLICADAS EN EL CÁNCER

Los exosomas son pequeñas vesículas de membrana de origen endosomal, que son secretadas por la mayoría de las células del organismo, y que desempeñan un importante papel en las comunicaciones intercelulares (15).

2.1 DESCUBRIMIENTO DE LOS EXOSOMAS

Estas vesículas fueron descritas por primera vez en 1983 cuando los grupos de Philip Stahl en Estados Unidos y Johnstone en Canadá observaron, mediante la microscopía electrónica, endosomas multivesiculares que podían fusionarse con la membrana plasmática de los reticulocitos (glóbulos rojos que no han alcanzado su total madurez) y liberar en ellas sus contenidos, además de liberar numerosas vesículas pequeñas al espacio extracelular (16, 17).

Finalmente, en 1987 se propuso el término “exosomas” para definirlos (15). En este primer momento, solo se conocía su función como “basureros celulares” que utilizaban determinadas células del organismo para eliminar sustancias de desecho celular (18).

A nivel de investigación científica, los exosomas permanecieron olvidados durante los siguientes 10 años, hasta que Raposo en 1996 (19) demostró que los linfocitos B transformados por el virus de Epstein-Barr secretaban exosomas que transportaban moléculas esenciales para la respuesta inmune adaptativa, entre estas moléculas llevaban antígenos pertenecientes al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), a células T específicas. Dos años después, se demostró que las células dendríticas también secretaban exosomas que llevaban estos mismos antígenos, por lo que se hipotetizó que podrían promover la inducción de respuestas inmunes antitumorales en ratones *in vivo*. Estos resultados fueron los primeros que indicaron que los exosomas podrían desempeñar un papel activo en la comunicación celular, al menos en el sistema inmune (15).

Durante los años posteriores, el desarrollo de las técnicas de análisis de proteínas permitió demostrar que los exosomas no contenían un conjunto aleatorio de proteínas en su interior, sino un conjunto específico de ciertas familias de proteínas, provenientes de la membrana plasmática, de la vía endocítica y del citosol, (15) lo que demostró que los exosomas eran secretados de manera activa por las células vivas (2).

El próximo avance en la investigación sobre las funciones de los exosomas se produjo en 2007, cuando el grupo de Jan Lötvald en Suecia describió la presencia de ARN mensajero (ARNm) y microARN (miARN) dentro de estas vesículas (15).

2.2 BIOGÉNESIS DE LOS EXOSOMAS Y UNIÓN CON LA CÉLULA DIANA

Los exosomas son vesículas de 30-100 nm de tamaño que se originan en el interior de la célula a partir de los cuerpos multivesiculares (MVB), que son estructuras que a su vez provienen de los endosomas tempranos (18). Los endosomas tempranos son sáculos de

membrana formados a partir de las vesículas endocíticas primarias procedentes de los procesos de endocitosis (20). Estos endosomas tempranos pueden seguir dos vías:

- a) En la mayoría de las células, el destino principal de los endosomas tempranos es fusionarse con lisosomas, compartimentos ácidos que contienen hidrolasas lisosómicas, que llevarán a cabo la degradación su contenido (20) (función de “basureros celulares”).
- b) Por otro lado, los endosomas tempranos pueden convertirse en endosomas tardíos, también llamados cuerpos multivesiculares (21) (**Figura 5**). Esta conversión a cuerpos multivesiculares tiene lugar en la membrana del endosoma y está regulada por dos proteínas Rab25 con su efector VPS34/p150 (22). En los cuerpos multivesiculares, se produce un proceso de gemación de membranas hacia el interior del lumen, formándose paquetes de vesículas que llevan moléculas específicas tanto en su membrana como en el interior, que contienen proteínas, ARN mensajero y microARN del citoplasma (18). Posteriormente, los cuerpos multivesiculares son guiados hacia la periferia celular, mediante un proceso regulado por Rab27b (22). Finalmente, con la ayuda del complejo SNARE (del inglés, *Complex Soluble NSF Attachment Protein*) se produce la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática de la célula contenedora, para liberar los exosomas al espacio extracelular, y una vez liberadas, estos viajan hasta la célula diana con la que se fusionarán para liberar su contenido (8).

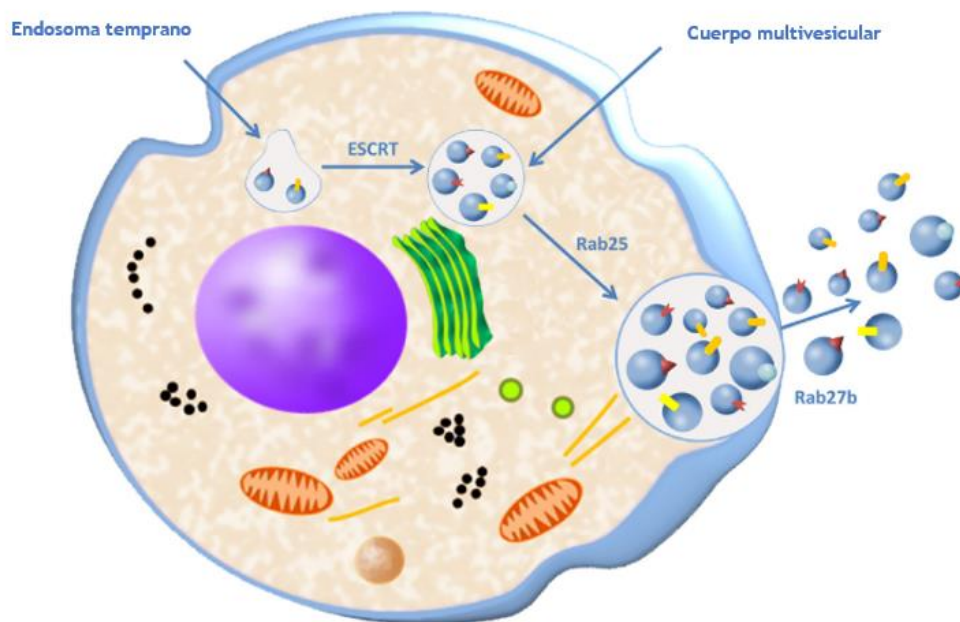


Figura 5. Formación de exosomas a partir de cuerpos multivesiculares en el interior celular. Modificada de: Steinbichler TB, Dudás J, Riechelmann H, et al. The role of exosomes in cancer metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2017; 44:170–81. (21)

Cuando llegan al espacio extracelular, los exosomas establecen diversos modos de interacción con las células diana (**Figura 6**): mediante la interacción receptor-ligando, en el que las proteínas de membrana de los exosomas interactúan con los receptores de la célula diana produciendo la activación de diversas vías de señalización; mediante fusión con la membrana plasmática y liberación directa de su contenido en el citoplasma celular; o mediante incorporación de vesículas en la célula diana por procesos de endocitosis o fagocitosis (18).

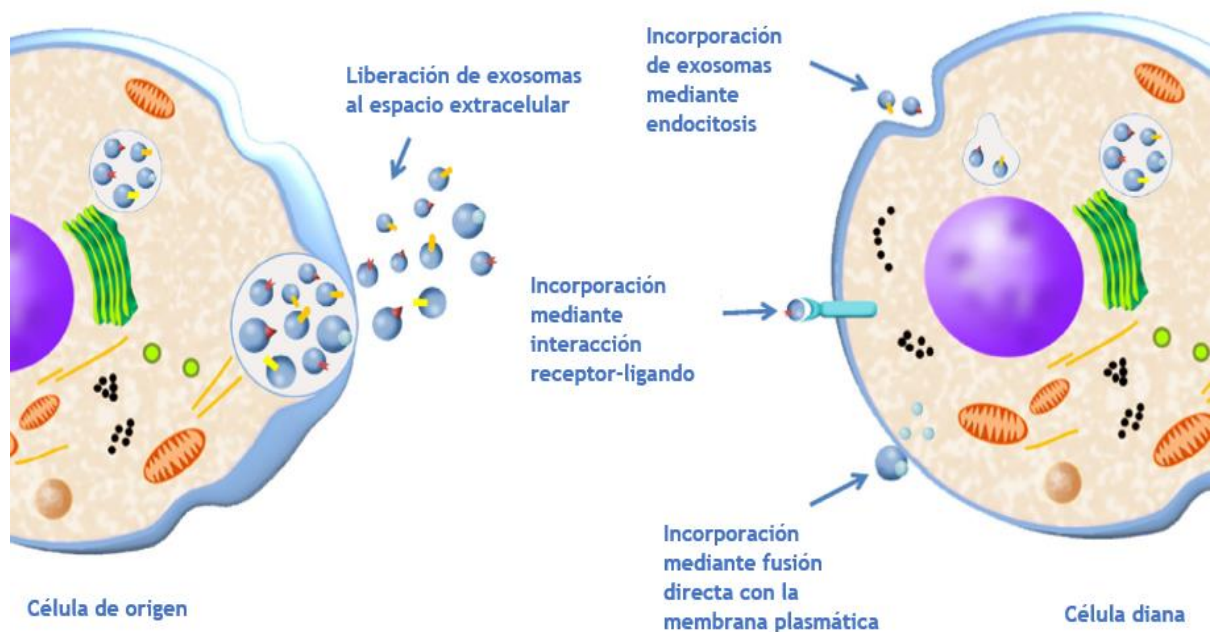


Figura 6. Incorporación de los exosomas a la célula diana mediante tres tipos de modos de interacción: endocitosis, interacción receptor-ligando y fusión con la membrana. Modificada de: Steinbichler TB, Dudás J, Riechelmann H, et al. The role of exosomes in cancer metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2017; 44:170–81. (21)

2.3 COMPONENTES DE LOS EXOSOMAS

Los exosomas están compuestos por un conjunto de proteínas y ácidos nucleicos específicos que pueden servir para identificar su origen celular. Además, contienen en su interior lípidos como el colesterol o la esfingomiélin, que están implicados en su diferenciación hacia exosomas. Debido a su origen endosomal, todos los exosomas contienen proteínas de transporte de membrana, proteínas de fusión y proteínas implicadas en la biogénesis multivesicular (**Figura 7**) (23).

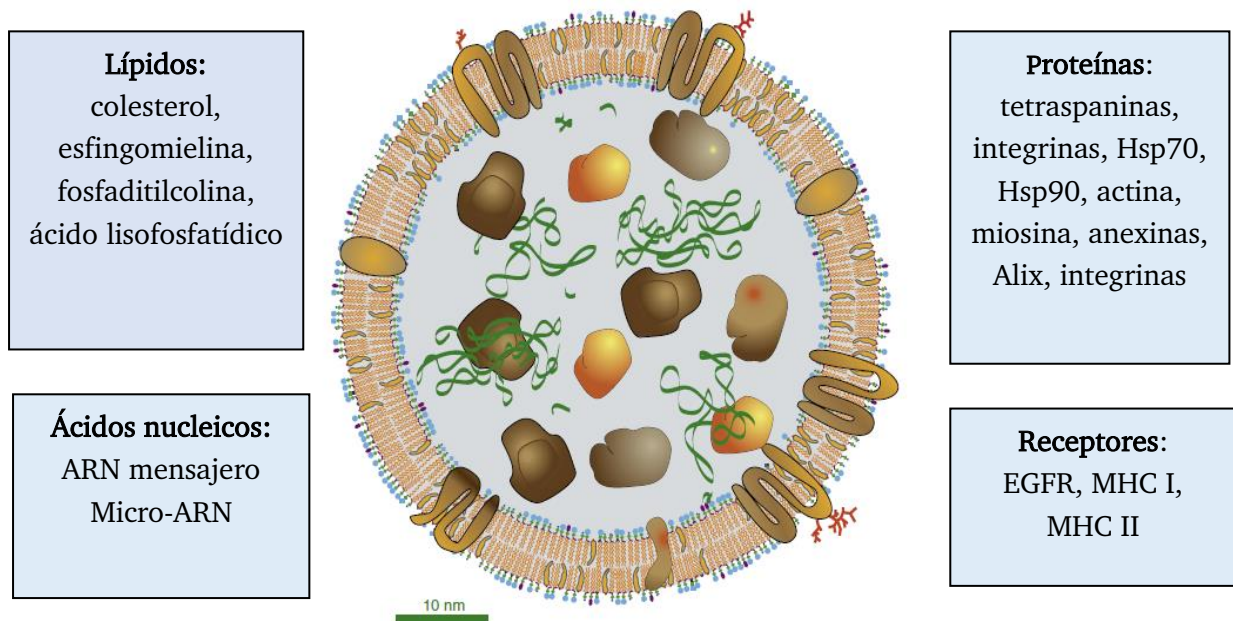


Figura 7. Composición de los exosomas. Modificada de: Vlassov A V, Magdaleno S, Setterquist R et al. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1820(7):940–8. (23)

Proteínas

Los exosomas contienen un subconjunto concreto de proteínas celulares que dependen del tipo de célula que las secreta (proteínas específicas), mientras que otras se encuentran en la mayoría de los exosomas independientemente del tipo de célula (proteínas no específicas) (20). En la superficie de los exosomas se encuentran además moléculas de adhesión celular (CAM), integrinas, tetraspaninas, MHC clase I y clase dos II, presentadoras en linfocitos B y células dendríticas junto con receptores de transferrina (TfR) (8).

Por otro lado, se encontraron un grupo de proteínas no específicas de los exosomas, en concreto, proteínas que intervienen en la transferencia y en la fusión de las membranas de las vesículas como Rab2, Rab7, proteínas de choque térmico como Hsc70 y Hsc90, proteínas del citoesqueleto (actina, miosina, tubulina) y la proteína Alix que media en la formación de los MVB (22).

Lípidos

La composición lipídica de los exosomas es similar a la de sus células productoras. Los lípidos tienen un papel importante en la protección del exosoma, y además participan en su biogénesis y diferenciación. Entre los lípidos implicados en la formación del exosoma, destaca el papel del ácido lisofosfatídico (LPA), que se encuentra en la membrana interna de los MVB. También la esfingomiélinea y la fosfatidilcolina ayudan a distinguir numerosos

tipos de vesículas, siendo el contenido de esfingomiélinea mayor que el de fosfatidilcolina dentro de los exosomas (22).

Además, los estudios han demostrado que los exosomas en contacto con las células diana podrían cambiar la composición lipídica de las células receptoras, especialmente en su composición de colesterol y de esfingomiélinea, desempeñando un papel relevante en la homeostasis celular (22).

Ácidos nucleicos

En la última década, numerosos grupos de investigación han analizado la presencia de material genético en los exosomas. Jan Lötvald y su grupo en Suecia, descubrieron en 2007 la presencia de ARN mensajero y microARN dentro de estas vesículas (18). La mayoría de los estudios han demostrado la presencia de ARN pequeño, incluido ARNm y microARN, con niveles bajos o indetectables de ARN ribosómico 18S y 28S (20). Hasta el momento, se han descrito 1.639 microARN y 1.300 ARN mensajeros exosomiales, muchos de los cuales están ausentes en el citoplasma de las células de origen, lo que significa que el conjunto de exosomas no refleja perfectamente el contenido de la célula de origen (8).

Los grupos de Ratajczak, Skog y Valadi, demostraron en 2008 que el ARNm no se incorporaba al azar en los exosomas, y la comparación específica de microARN intracelular y extracelular demostró que se producía una selección de secuencias específicas de microARN para la exportación extracelular. Se ha observado que los exosomas portadores de microARN transportan diferentes subconjuntos de secuencias de microARN, lo que sugiere la existencia de diferentes mecanismos de selección de carga de los microARN. Un estudio reciente ha identificado una secuencia proteica específica unida al microARN, formando una ribonucleoproteína, que permite inducir el direccionamiento a los exosomas en las células T (18, 22).

Se demostró que los ARNm incluidos en las vesículas pueden exportarse al exterior de la célula, ser vertidos en la célula receptora y traducirse en proteínas dentro de estas, lo que sugiere que los exosomas son capaces de transferir información genética (22).

Los exosomas se pueden formar a partir de una gran variedad de células: los fibroblastos, las células intestinales, neuronas, adipocitos y células tumorales, y se encuentran en muchos fluidos biológicos, como la leche materna, el líquido sinovial, la sangre, la orina, el líquido amniótico y los derrames ascíticos. Además de su función como vesículas para la degradación de sustancias de desecho, numerosos estudios han demostrado que también juegan un importante papel en diversos procesos biológicos, como la apoptosis celular, la angiogénesis, la coagulación, la homeostasis y las vías de señalización intracelular, por su capacidad de transmitir ARN, proteínas y lípidos a las células diana con las que entran en contacto (24).

En la actualidad, existen una gran cantidad de datos que destacan sus posibles funciones como mensajeros durante el desarrollo de diferentes tipos de tumores (25)

(Figura 8). Aunque la investigación científica de las últimas tres décadas ha permitido un considerable aumento del conocimiento de los exosomas, demostrar sus funciones fisiológicas *in vivo* sigue siendo actualmente un gran desafío en este campo (15).

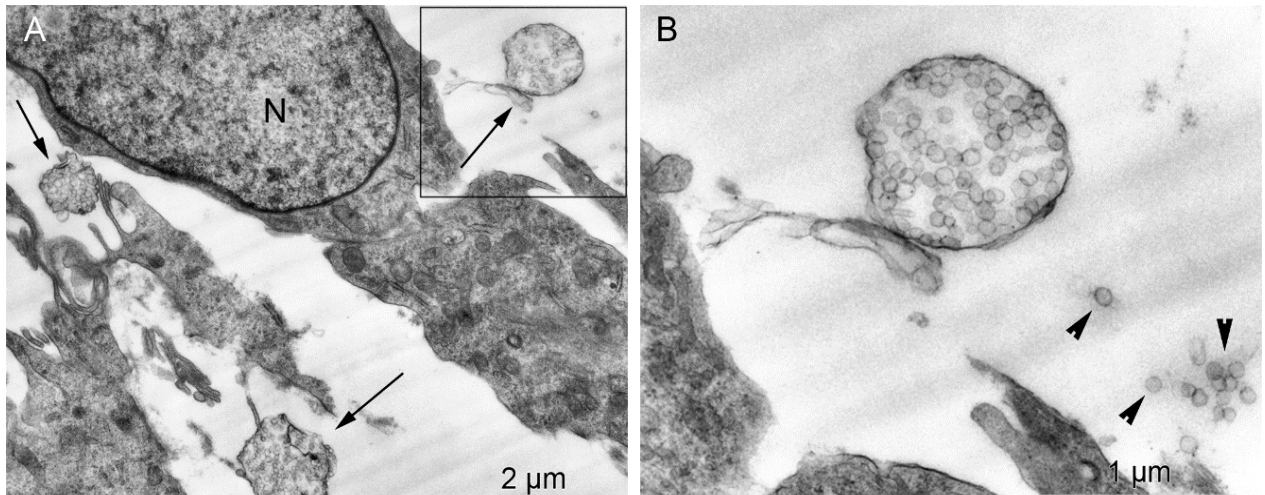


Figura 8. Imagen de microscopía electrónica. **A.** Esferosomas liberados por células tumorales de un tumor del estroma gastrointestinal (GIST) (flecha). **B.** Detalle de A. Desde el interior del esferosoma se liberan exosomas que interaccionan con las células vecinas (puntas de flecha).

Extraída de: Junquera C, Castiella T, Muñoz G et al. Biogenesis of a new type of extracellular vesicles in gastrointestinal stromal tumors: ultrastructural profiles of spherosomes. *Histochem Cell Biol.* 2016; 146(5):557–67. (25)

3. EXOSOMAS Y SU PAPEL EN EL CÁNCER DE MAMA

Como se ha explicado anteriormente, los exosomas se consideran importantes mediadores de la comunicación intercelular, ya que son capaces de transferir moléculas biológicamente activas a otras células receptoras locales o distantes (26). De esta manera, son capaces de transmitir información desde las células tumorales, transfiriendo su carga biológica de ARNm, microARN y ADN, así como diversas proteínas celulares, ácidos nucleicos, citoquinas, enzimas y cofactores. Esta transferencia de material puede emitir señales que produzcan la reprogramación celular de la célula receptora (11). De esta manera se ha identificado que los exosomas están implicados en el desarrollo de los tumores, en la supresión del sistema inmune del organismo, la angiogénesis y en la metástasis (27).

Se ha demostrado que los pacientes con cáncer tienen un mayor número de exosomas circulantes en comparación con los pacientes sanos, por lo tanto, la detección de exosomas podría utilizarse para fines diagnósticos y pronósticos en el cáncer de mama (28).

En la biología del cáncer, el estudio de los productos metabólicos producidos por las células tumorales es muy importante; a estos estudios, en la actualidad, se suman los datos que está aportando el conocimiento de las proteínas y los ácidos nucleicos que transportan los exosomas en su interior (29). El estudio de los componentes de los exosomas tumorales puede ayudar a estudiar el origen del tumor, su evolución y a definir terapias adecuadas (30).

3.1 INTERACCIÓN DE LOS EXOSOMAS CON LAS CÉLULAS DEL ESTROMA TUMORAL

Como se ha definido anteriormente, en el estroma de los tumores de mama se identifican diferentes tipos de células: los fibroblastos asociados al cáncer, las células endoteliales de los vasos sanguíneos y los adipocitos (11).

Se sabe que las células cancerosas son grandes productoras de exosomas, que están presentes en el medio tumoral y en los fluidos corporales de las pacientes con cáncer. Los exosomas del estroma tumoral pueden mediar señales paracrinas con células no cancerosas del ambiente tumoral, y promover la supervivencia y la expansión de las células cancerosas (11) (**Figura 9**).

Mediante la comunicación mediada por exosomas, las células tumorales también son capaces de activar a los fibroblastos asociados al cáncer, lo que les lleva a adquirir propiedades tumorigénicas (29).

La exposición de células sanas a exosomas derivados del estroma puede promover la tumorigénesis y producir que diferentes líneas celulares de cáncer de mama se vuelvan resistentes a la terapia. Además, los exosomas derivados de los fibroblastos asociados al cáncer parecen favorecer la motilidad de las células del nicho tumoral en el cáncer de mama (31).

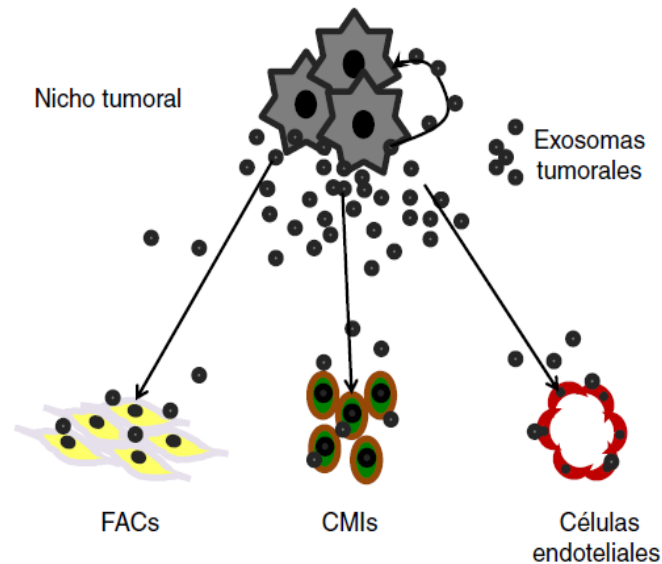


Figura 9. Comunicación paracrina mediante exosomas tumorales entre las células cancerosas y las células del microambiente tumoral. Extraída de: Eiro N, Cid S, Fraile M, Vizoso FJ. Importancia de la investigación sobre el estroma tumoral en el cáncer de mama. *Rev Senol Patol Mamar.* 2019; 32(1):17–25. (11)

3.2 MICROARN CONTENIDO EN EXOSOMAS

En los últimos años se ha estudiado que los microARN contenidos en los exosomas liberados por las células tumorales pueden ser un factor importante en la formación del tumor y en su capacidad de metástasis (18).

Los microARN son pequeños ARN no codificantes, de longitudes que varían entre 18 y 25 nucleótidos. Son capaces de modular la expresión genética a nivel postranscripcional, uniéndose a los ARN mensajeros diana a través de secuencias complementarias, bloqueando así la expresión de ARNm y por tanto frenando la síntesis de proteínas en varios tipos de cánceres (32).

El descubrimiento de la presencia de estos microARN contenidos en los exosomas, sugirió la posibilidad de que existiera una regulación directa mediada por microARN en las células tumorales receptoras, ya que estos microARN pueden bloquear los ARN de genes supresores de tumores, favoreciendo la transformación de las mismas. (28).

Los exosomas contienen en su interior la enzima Dicer (**Figura 10**) y la proteína de unión a ARN en respuesta a trans-activación (TRBP), que provocan la maduración de

los pre-microARN en microARN. En este proceso interviene la proteína Argonauta 2 (AGO2), que se une a un microARN y lo guía a su ARNm complementario (31, 33).

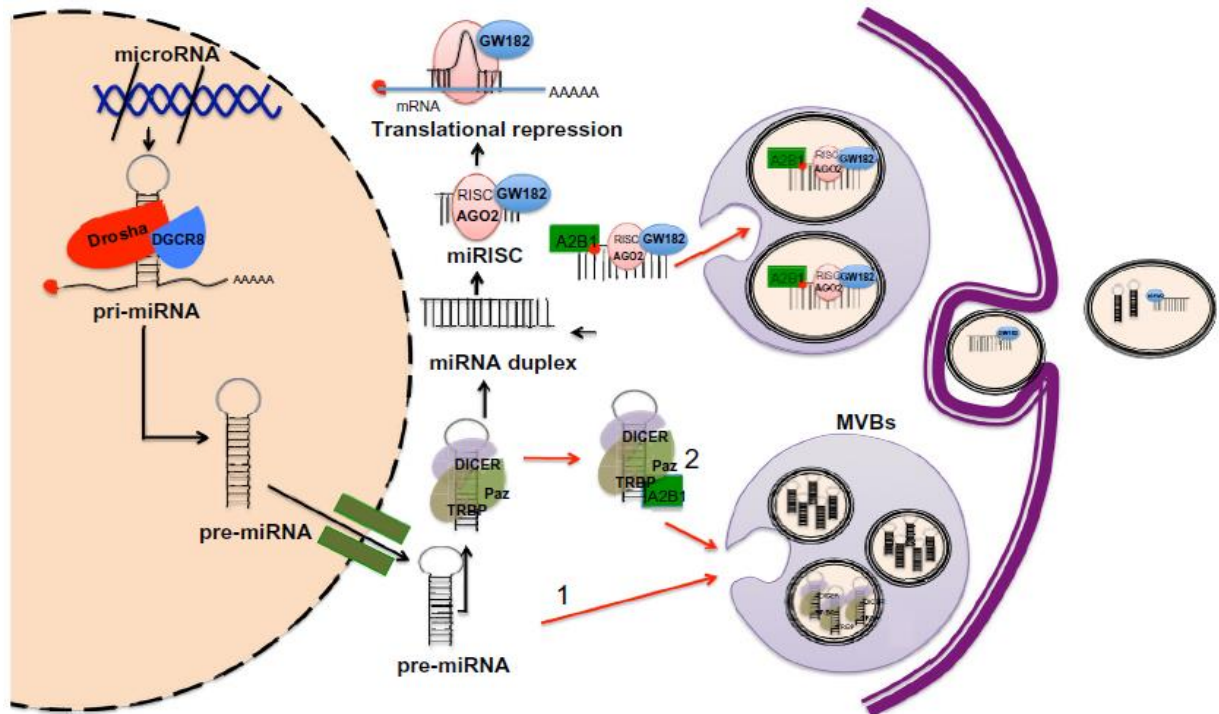


Figura 10. Formación de microARN, su incorporación a los exosomas y liberación al espacio extracelular. Extraída de: Salido-Guadarrama I, Romero-Cordoba S, et al. MicroRNAs transported by exosomes in body fluids as mediators of intercellular communication in cancer. *Onco Targets Ther.* 2014; 7(1):1327–38. (33)

Los conocimientos más recientes sobre la biología de los microARN exosómicos parecen indicar que estos pueden contener en su interior contenido molecular de diferentes células cancerosas. Los microARN contenidos en los exosomas se han demostrado implicados tanto en favorecer como en frenar el crecimiento tumoral, conferir resistencia a los fármacos antitumorales y promover la metástasis (28).

Son varios los estudios en los que se han analizado los microARN exosómicos circulantes en pacientes con cáncer de mama. En 2014, Eichelser y su equipo (34) llevaron a cabo un estudio con 50 casos con cáncer de mama y 12 controles de mujeres sanas. En este estudio, se demostró que los niveles de microARN-101, microARN-372 y microARN-373 eran significativamente más altos en los casos de cáncer de mama que en las mujeres sanas. Curiosamente, en el análisis por subgrupos basado en el estado de los receptores de estrógenos y progesterona, se demostró que los niveles de microARN-373 eran más altos en los tumores triple negativo, lo que apoya su implicación en la expresión de fenotipos más agresivos (34). De esta manera, el análisis de los microARN exosómicos en sangre podría ser útil para la detección precoz del cáncer o para controlar la respuesta

al tratamiento. Desde una perspectiva terapéutica, se están investigando estrategias para interferir en los niveles de microARN exosómicos promotores de tumores o para añadir microARN de genes supresores de tumores mediante el suministro exosómico (28).

3.3 EXOSOMAS EN LA ANGIOGÉNESIS DEL TUMOR

Las células cancerosas requieren oxígeno y nutrientes adecuados para su crecimiento y desarrollo. La angiogénesis inducida por tumores suministra el oxígeno y los nutrientes necesarios al tumor, a la vez que sirve para eliminar los materiales de desecho de este (24). Diferentes estudios han demostrado que los exosomas tumorales intervienen en la angiogénesis tumoral mediante su capacidad para transportar factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), citoquinas proinflamatorias y proteasas. Estas podrían modular la expresión de genes relacionados con la angiogénesis como son los genes que codifican citoquinas, factor inhibidor de migración de macrófagos, y genes para el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), como el VEGF-R2 (7).

Se han descrito tetraspaninas de superficie en los exosomas liberados por tumores que pueden activar, de forma remota, a las células endoteliales en reposo, produciendo la germinación de las células endoteliales y la maduración de progenitores de células endoteliales mediante la regulación positiva de los genes relacionados con la angiogénesis. Además, en estudios *in vitro*, en los que se trataron células endoteliales con exosomas derivados de tumores, se observó una neovascularización como resultado de aumentos en la expresión de la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) (24).

3.4 EXOSOMAS Y DESARROLLO DE METÁSTASIS

La metástasis tumoral es un proceso complejo en el que se requiere la interacción entre las células cancerosas y microambientes adecuados en órganos específicos. Las células cancerosas secretan moléculas bioactivas solubles o encerradas en los exosomas que permiten la remodelación de la matriz extracelular y la reprogramación de diferentes tipos de células en órganos distantes, hasta establecer los nichos premetastásicos adecuados. Los exosomas derivados de tumores ayudan a preparar estos nichos mediante la activación de células progenitoras hematopoyéticas a través del intercambio de las oncoproteínas mediada por exosomas (24) (**Figura 11**). También se ha demostrado que la secreción de factores solubles como el factor de crecimiento vascular A (VEGF-A), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) inducen la expresión de las proteínas inflamatorias S100A8 y S100A9 (35).

Se sabe que ciertos tipos de tumores tienden a generar metástasis en determinados órganos, proceso que se denomina "organotropismo metastásico". La tendencia de los tumores por determinados órganos es una de las mayores incógnitas de la oncología actual. Además de la existencia de determinados genes asociados a generar tumores con

riesgo de metástasis en ciertos órganos, recientemente se ha descubierto un mecanismo que aporta nuevos datos a estas preferencias de las metástasis: las células tumorales tienen en su superficie integrinas, que funcionan a modo de “códigos postales”. Estas moléculas permiten dirigir los exosomas a tejidos u órganos específicos (35).

Centrándonos en el cáncer de mama, se sabe que este tiende a metastatizar especialmente en pulmón, hígado, cerebro y hueso. Se ha estudiado que las integrinas contenidas en los exosomas de cáncer de mama guían los exosomas hacia determinados órganos. En concreto, la integrina Gβ4 (ITGβ4) se ha correlacionado positivamente con el desarrollo de metástasis pulmonares, mientras que la integrina Gβ5 (ITGβ5) exosómica estaba altamente asociada a las metástasis hepáticas (24).

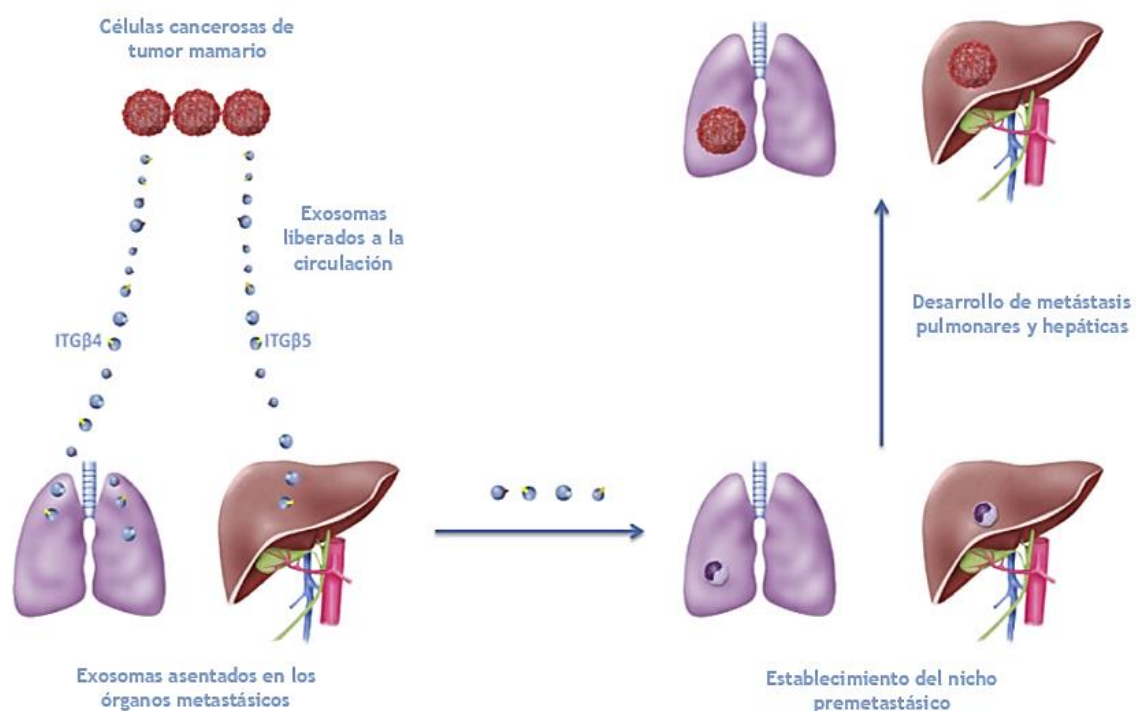


Figura 11. Fenómeno de organotropismo metastásico guiado por integrinas en el cáncer de mama. Modificada de: Steinbichler TB, Dudás J, Riechelmann H, Skvortsova II. The role of exosomes in cancer metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2017; 44:170–81 (21)

3.5 EXOSOMAS EN LA RESISTENCIA A FÁRMACOS ANTITUMORALES

Como se explicará a continuación, los exosomas derivados de las células tumorales son capaces de provocar que el tumor desarrolle resistencia contra los tratamientos antineoplásicos.

La resistencia terapéutica puede ser transferida a través de los cambios que producen los microARN que contienen los exosomas y que posteriormente transfieren a las células receptoras (18). En este sentido, se han identificado algunos microARN que

pueden conferir resistencia al tratamiento con tamoxifeno, que es junto con los inhibidores de la aromatasa, el principal tratamiento antitumoral para los tumores con receptores hormonales positivos. Sempere et al. (28) han demostrado que existen microARN contenidos en exosomas, como microARN-221 y microARN-222, que pueden conferir resistencia al tamoxifeno, ya que estos microARN regulan negativamente los receptores de estrógeno α (RE α). Además, es posible que células tumorales resistentes al tratamiento con tamoxifeno puedan transferir estos microARN-221 y microARN-222 a células que son sensibles al tamoxifeno, pudiendo aumentar así su resistencia al tratamiento antitumoral (28). Se ha demostrado que las células tumorales resistentes a los fármacos muestran una mayor liberación de fármacos quimioterápicos a través de los exosomas (29).

Por otro lado, los exosomas tienen la capacidad de interferir en las vías de circulación del fármaco, de tal manera que los fármacos y sus correspondientes metabolitos pueden ser encapsulados y expulsados en vesículas (18). En el cáncer de mama HER2 positivo, los exosomas secretados por el tumor contienen en su superficie la proteína HER2, y se ha demostrado que estos exosomas son capaces de unirse y secuestrar al fármaco trastuzumab, disminuyendo de este modo su potencial terapéutico. La secreción de exosomas ricos en HER2 en cáncer de mama podría ser un factor que contribuyera al desarrollo de la resistencia a los tratamientos anti-HER2 en el cáncer de mama (7).

Debido a estas características que confieren los exosomas tumorales en la disminución de la respuesta terapéutica, en la actualidad se plantea la posibilidad de desarrollar inhibidores de exosomas para conseguir aumentar la sensibilidad de las células tumorales a los tratamientos contra el cáncer (18).

3.6 EXOSOMAS COMO BIOMARCADORES DE CÁNCER

Debido a la presencia de los exosomas liberados por células tumorales circulantes en sangre, los exosomas podrían ser utilizados como biomarcadores en determinados tipos de cánceres, entre ellos el cáncer de mama. El análisis de estos exosomas circulantes se puede llevar a cabo mediante una novedosa técnica, conocida como biopsia líquida.

La biopsia líquida se ha convertido en una técnica revolucionaria que proporciona nuevas perspectivas y dimensiones en el campo de la oncología médica (36). Esta técnica permite la detección de células tumorales circulantes (CTCs), ADN circulante libre (cADN), ADN tumoral circulante (ctADN) y exosomas circulantes, y podría convertirse en una fuente de información genómica en los pacientes con cáncer (36).

La biopsia líquida se puede obtener mediante la extracción de la sangre, así como de otros fluidos orgánicos como son la saliva, la orina, el líquido pleural, el líquido amniótico, la leche materna o el líquido cefalorraquídeo (30).

Las biopsias quirúrgicas se consideran a día de hoy el *gold standard* para el diagnóstico y la elección del tratamiento, sin embargo, presentan deficiencias inherentes a la propia técnica como la falta de accesibilidad en determinados cánceres, la falta de información sobre la heterogeneidad espacial y temporal del tumor, el riesgo de efectos adversos para el paciente por el propio procedimiento de la biopsia y el alto coste económico (36).

Las ventajas principales (**Tabla 4**) que aporta en comparación con la biopsia quirúrgica es que es un método mínimamente invasivo ya que puede realizarse mediante una simple extracción sanguínea. Por otro lado, puede realizarse cuando el acceso para biopsiar el tejido tumoral no sea posible, superando las limitaciones de acceso a los tejidos (36). Además, al ser incruenta y conllevar menor riesgo para los pacientes, permite el control de una manera más frecuente (37) y permite poder evaluar la respuesta al tratamiento en tiempo real, sirviendo como marcador temprano de recurrencia, resistencia o metástasis, y permitiendo llevar a cabo una detección rápida de las mutaciones *de novo*. (38).

En cuanto a sus desventajas, uno de los mayores retos actuales radica en la dificultad para obtener información tanto de ctADN como de CTC, ya que la presencia de estas en sangre es limitada (37). Además, la falta de estandarización de la técnica hace que todavía no exista una validación clínica suficiente para la implantación de este método como protocolo rutinario en el diagnóstico y seguimiento del cáncer (36).

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none"> • Es mínimamente invasiva para el paciente • Requiere solo una pequeña extracción de sangre • Puede realizarse cuando el acceso para la biopsia quirúrgica no sea posible • Permite el control de los pacientes de una manera más frecuente • Permite evaluar la respuesta al tratamiento en tiempo real • Permite detectar precozmente recurrencias, metástasis o mutaciones <i>de novo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Cantidades limitadas de ctADN y de CTCs en circulación sanguínea. • Falta de estandarización de la técnica para la implantación en la práctica clínica

Tabla 4. Exposición de las ventajas y desventajas de la biopsia líquida. Tabla de elaboración propia.

La FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos aprobó la primera prueba mediante biopsia líquida en junio de 2016 para análisis de mutaciones del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) en pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico estudiando la mutación EGRF v2, para seleccionar a los pacientes candidatos a tratamiento con inhibidores de EGRF (36).

Métodos de análisis en la biopsia líquida

A continuación, se desarrollarán los diferentes métodos para el aislamiento y el posterior análisis del ADN circulante, las células tumorales circulantes y los exosomas circulantes en la sangre, obtenidos mediante la técnica de biopsia líquida.

El ADN circulante puede ser aislado de la sangre mediante disolventes orgánicos como el fenol o el cloroformo. Posteriormente, se lleva a cabo la secuenciación para la detección, cuantificación y caracterización molecular de estos ADN. Tras el aislamiento (**Figura 12**), se realiza una amplificación mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y una secuenciación NSG (del inglés, *Next Generation Sequencing*), que es capaz de detectar cambios en el ADN, como la hipermetilación, la hipometilación, deleciones, amplificaciones, reordenamiento cromosómico y diferentes mutaciones (36).

Las células tumorales circulantes pueden aislarse mediante sistemas de filtración, mientras que el aislamiento de los exosomas se lleva a cabo primero por centrifugación y posteriormente se analizan sus componentes mediante métodos convencionales como el ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) o el Western Blot (método de electrotransferencia) (36).

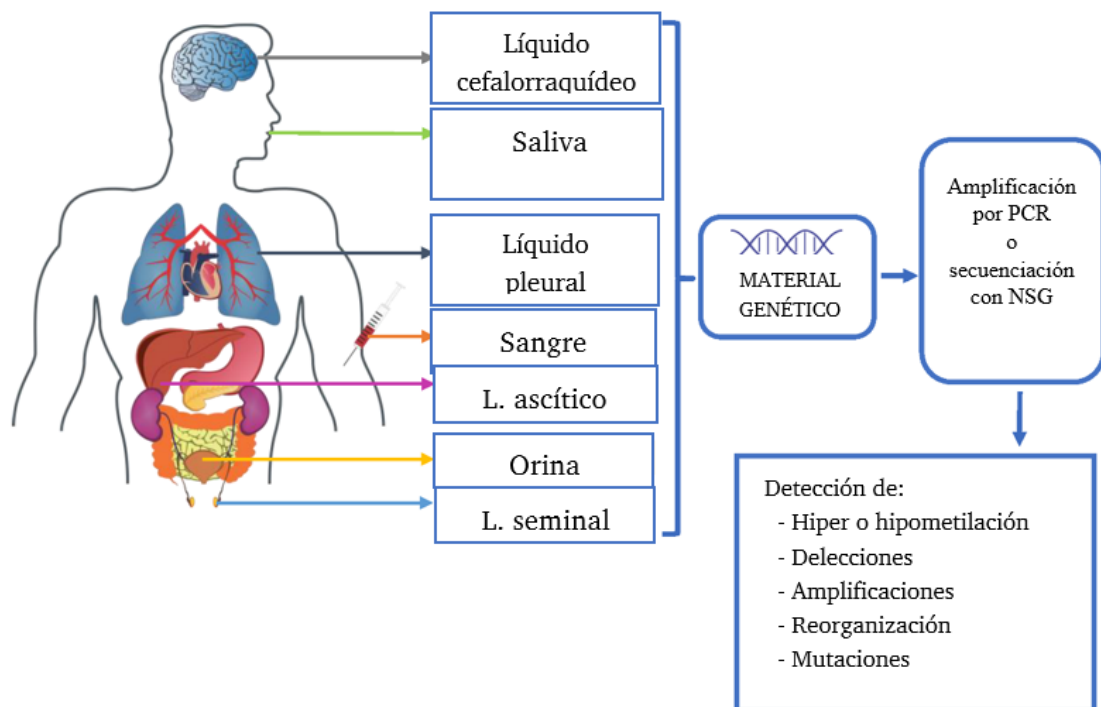


Figura 12. Método de análisis mediante biopsia líquida. Modificada de: Mathai R, Vidya R, Reddy B, et al. Potential Utility of Liquid Biopsy as a Diagnostic and Prognostic Tool for the Assessment of Solid Tumors: Implications in the Precision Oncology. J Clin Med. 2019; 8(3):373 (36)

Numerosos grupos de científicos se están focalizando en el desarrollo de biomarcadores más eficientes y precisos de cáncer. Además de los biomarcadores tumorales clásicos, estas moléculas circulantes en sangre se están convirtiendo en una fuente muy accesible, que proporciona amplia información sobre las características biológicas del tumor obtenidas mediante biopsia líquida (32).

Las últimas investigaciones han demostrado que mediante la biopsia líquida se pueden identificar biomarcadores específicos de cáncer como EGFR, KRAS, HER2, RET o SEPT9 en los fluidos corporales de los pacientes con cáncer (36) (**Tabla 5**). El uso de estos marcadores como detección temprana del cáncer permite una intervención terapéutica, y por lo tanto, podría mejorar la supervivencia de los pacientes con cáncer (39).

Tipo de cáncer	Genes detectados
Cáncer colorrectal	KRAS, BRAF, TP53, APC, CEA, SEPT9
Cáncer de mama	HER2, BRCA1
Cáncer de pulmón	KRAS, EGFR, BRAF, ERBB2, PIK3CA, ALK, ROS1, RET, HER2, MET
Cáncer hepatocellular	TP53, CTNNB1, PTEN, CDKN2A, ARID1A, MET, CDK6, EGFR, MYC, BRAF, FGFR1, ERBB2
Cáncer gástrico	MUC1, CK19, HER2, TERT, CEA

Tabla 5. Genes detectados mediante biopsia líquida en diferentes tipos de cáncer. Extraída de: Mathai R, Vidya R, Reddy B, et al. Potential Utility of Liquid Biopsy as a Diagnostic and Prognostic Tool for the Assessment of Solid Tumors. J Clin Med. 2019; 8(3):373 (36)

Análisis de ADN circulante

El ADN circulante es liberado a la circulación sanguínea como fragmentos de apoptosis y necrosis de las células del organismo (36). Se ha demostrado que la cantidad de ADNc aumenta con el crecimiento tumoral. Así, se estima que los pacientes con tumores de aproximadamente 100 gramos de tamaño ($\approx 3 \times 10^{10}$ células neoplásicas) liberan diariamente el 3.3% del ADN del tumor a la circulación (36).

Las mutaciones, variaciones del número de copias, cambios de metilación o variaciones los nucleótidos que se encuentran en el ADNc se pueden analizar (36), permitiendo identificar las alteraciones genómicas de las células tumorales, la heterogeneidad tumoral y las mutaciones metastásicas (37).

En un estudio reciente realizado con pacientes con cáncer de mama precoz en tratamiento con quimioterapia adyuvante, se demostró que la detección de ADN circulante en sangre durante el seguimiento permitía pronosticar con bastante certeza recaídas, resistencia al tratamiento y predicción de respuesta (9).

Análisis de células tumorales circulantes

Las CTC son células tumorales que se liberan al sistema circulatorio tanto de los nichos tumorales primarios como de las metástasis (36). Aunque su abundancia en sangre es muy baja (alrededor de 1 célula por cada millón de células sanguíneas), se ha demostrado que el número de CTCs se correlaciona con la respuesta al tratamiento y la tasa de supervivencia total (37).

Las características fenotípicas y genotípicas de las CTC pueden cambiar durante el curso de cáncer debido a cambios microambientales y terapéuticos (18). Esta detección precoz de las características de las CTC permitiría una detección en tiempo real de metástasis o resistencias al tratamiento (38).

En cuanto al cáncer de mama, se ha demostrado que las células tumorales circulantes pueden ser un factor pronóstico significativo. La presencia de las CTC podría constituir un factor de riesgo de recaída de cáncer de mama no inferior a los factores pronósticos habituales (tamaño, grado, proliferación o estado ganglionar). Se está estudiando que la caracterización molecular de estas CTC puede ser un útil marcador predictivo de enfermedad precoz o metastásica (9).

Análisis de exosomas

Como se ha explicado anteriormente, los exosomas liberados por las células tumorales contienen en su interior microARN específicos del tumor, que se pueden relacionar con la fase y el grado de progresión de este. Por esta razón, los exosomas podrían ser importantes marcadores diagnósticos y pronósticos para determinados tumores (18).

El análisis del microARN contenido dentro de los exosomas puede indicar la procedencia del origen celular del tumor (36). A su vez, también la identificación de las diferentes proteínas de la membrana del exosoma, puede facilitar la identificación del origen celular del tumor (18). Además, siguiendo la línea del organotropismo metastásico, el análisis de la composición de las integrinas de los exosomas puede proporcionar detalles sobre posibles metástasis e invasión de tejidos y órganos (35).

Varios estudios demuestran que, a mayor tamaño del tumor mamario, mayor es la concentración de exosomas circulantes en sangre. De la misma manera, se ha demostrado una reducción de los niveles de exosomas circulantes cuando disminuye el tamaño tumoral. Este fenómeno también ha sido observado en otro tipo de tumores, como en el glioblastoma multiforme y en el cáncer de páncreas, en el que los niveles de exosomas disminuyeron tras haber llevado a cabo la resección quirúrgica del tumor (7).

Estudios recientes han demostrado que tanto la glucoproteína Del-1 (locus 1 de desarrollo endotelial) como la proteína fibronectina encontrados en los exosomas circulantes en plasma de pacientes con cáncer de mama podrían servir como biomarcadores muy prometedores de diagnóstico en etapas iniciales. Además, Del-1

también es un marcador prometedor para distinguir el adenocarcinoma de mama de otros tumores benignos de la mama (32).

Se ha observado que la expresión en los exosomas de Survivin-2B, que es una proteína proapoptótica, podría usarse como un marcador diagnóstico en pacientes con cáncer de mama en estadio temprano. En cuanto al cáncer en estadio avanzado metastásico, se ha demostrado que la Anexina A2 (Anx A2) en los exosomas derivados de células de cáncer de mama también puede ser un marcador prometedor de metástasis específicas en cerebro y pulmones (32).

En cuanto a los microARN presentes en los exosomas de cáncer de mama, su patrón de expresión se correlaciona con el tipo molecular de cáncer y por lo tanto con su malignidad, por lo que el microARN contenido podría servir como un nuevo biomarcador en el futuro (32). Eichelser et al (34) estudiaron que los microARN específicos de cáncer de mama se expresan en los exosomas séricos de las pacientes. Encontraron que el nivel de microARN-373 y microARN-101 exosómico fue más elevado en las pacientes con cáncer de mama que en las pacientes sanas. Además, como se ha explicado anteriormente, los niveles de microARN-373 se encontraron significativamente más elevados en las pacientes con cáncer triple negativo que en pacientes con cánceres luminales o controles sanos. Por lo tanto, estos dos microARN podrían utilizarse en el futuro como potenciales marcadores de cáncer de mama, y microARN-373 en concreto, como indicador específico de fenotipo triple negativo (34).

Aunque todavía hay poca información al respecto, la posible implicación clínica de estos datos está ya siendo valorada en diferentes ensayos clínicos. En Estados Unidos se comenzó un ensayo clínico en 2014, en curso durante 6 años, en el que participaron pacientes con cáncer de mama a las que se les realizaron determinaciones de exosomas basales mensuales durante el tratamiento quimioterápico y tras la resección quirúrgica del tumor. Su objetivo principal es correlacionar los niveles de exosomas con la respuesta tumoral (este ensayo clínico se ha documentado en <https://clinicaltrials.gov>, con el identificador NCT01344109) (7).

Existen otros ensayos clínicos que también están estudiando el papel patogénico y metastásico del cáncer de páncreas, cáncer de pulmón o cáncer de próstata, mediante el uso de los exosomas como biomarcadores de cáncer (estos ensayos clínicos han sido documentados en el sitio <https://clinicaltrials.gov>, con el identificador NCT03108677 para cáncer de pulmón; NCT02702856 para cáncer de próstata; NCT02393703 para cáncer de páncreas) (32).

La detección temprana del cáncer y sus metástasis mediante biomarcadores analizados por biopsia líquida representa un campo de investigación en amplio crecimiento, ya que la cantidad de biomarcadores circulantes identificados en los últimos años está creciendo exponencialmente. Además, una gran cantidad de posibles marcadores de cáncer circulantes proporciona una nueva perspectiva para la

caracterización del cáncer sin necesidad de biopsia quirúrgica (32). En la actualidad se continúan estudiando estos nuevos biomarcadores y el siguiente paso será comparar el seguimiento del tratamiento guiado por biopsia líquida con el estándar actual mediante estudios prospectivos aleatorizados (39). Aunque todavía quedan muchas preguntas abiertas, se espera que la secuenciación de estas moléculas mediante biopsia líquida pueda entrar en uso como método diagnóstico para el cáncer en un futuro próximo (37).

3.7 POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LOS EXOSOMAS

En los últimos años, numerosos grupos de científicos han comenzado a desarrollar nuevas terapias antitumorales basadas en los exosomas. Entre estas estrategias, se encuentra la eliminación de los exosomas de la circulación sanguínea y el uso de los exosomas como vehículos portadores de fármacos (18).

1. Eliminación de los exosomas de la circulación sanguínea

Como se ha explicado anteriormente, los exosomas liberados por las células tumorales de mama positivas para HER2 tienen la capacidad de unirse a trastuzumab y secuestrarlo, provocando la supresión de los efectos antiproliferativos del fármaco. Siguiendo esta línea, han surgido diferentes estudios que proponen como nueva estrategia de tratamiento la eliminación de estos exosomas para aumentar la eficacia del tratamiento. El laboratorio Aethlon Medical (California, Estados Unidos), ha introducido HER2osome™ como nueva estrategia terapéutica para inhibir la progresión del cáncer de mama HER2 positivo (26). Este nuevo fármaco, tiene como objetivo la eliminación selectiva de exosomas del volumen sanguíneo dentro de plazos clínicamente relevantes. HER2osome™, utilizado como complemento al tratamiento con trastuzumab, permitiría aumentar los efectos de este, disminuyendo la toxicidad del fármaco y sus riesgos de interacción (40).

Otra de las estrategias de tratamiento más prometedoras en el cáncer de mama podría ser la eliminación de estos exosomas de la circulación sanguínea mediante hemofiltración. En otro estudio realizado por Aethlon Medical que comenzó en 2011, se planteó un enfoque terapéutico basado en la hemofiltración, en la que la sangre de los pacientes pasaba a través del dispositivo y los componentes del plasma con tamaño inferior a 200nm (exosomas y viriones) eran absorbidos selectivamente por los poros de la membrana. De esta manera, en el cáncer de mama con sobreexpresión de HER2, mediante esta hemofiltración, podrían eliminarse exosomas portadores de HER2 y HER2 soluble escindido por proteólisis de la superficie celular tumoral, el cual participa en la resistencia a la terapia con trastuzumab (7).

La hemofiltración de pequeños componentes del plasma también permite capturar exosomas liberados por otros cánceres, incluidos el cáncer colorrectal, el de ovario y el melanoma. Anteriormente ya se habían realizado estudios en humanos en los que se demostró que la hemofiltración proporcionaba reducciones de la carga viral en individuos

infectados con hepatitis C (VHC) y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Mediante la hemofiltración se consiguieron unas reducciones medias de la carga viral de más del 50% en individuos infectados sin la administración de medicamentos antivirales. Actualmente, este dispositivo es objeto de un ensayo clínico en humanos para evaluar su capacidad de acelerar la reducción de la carga viral de VHC cuando se utiliza en combinación con la terapia farmacológica estándar del VHC. Tras estos resultados tan prometedores, se está estudiando en la actualidad si esta hemofiltración también podría ser eficaz en pacientes con cánceres de diferentes tipos en estadio avanzado (40).

En otro estudio realizado por Lentz (41), se estudió la posibilidad de eliminar los exosomas circulantes mediante la utilización de hemofiltración extracorpórea. En este estudio, se eliminaron de la sangre proteínas de peso molecular inferior a 120.000 Da, mediante la técnica de ultraaféresis continua de sangre en 16 pacientes con cáncer. Los resultados fueron prometedores, ya que, de las 16 pacientes, 6 de ellas presentaron una reducción de al menos un 50% del tamaño del tumor tras eliminar de la sangre los exosomas circulantes. Las bases para este tratamiento son similares a los utilizados en la terapia de inmunoadsorción de proteínas plasmáticas en pacientes con artritis reumatoide o púrpura trombótica trombocitopénica idiopática, ya aprobados por la FDA (7).

2. Exosomas como medio de transporte de fármacos quimioterápicos

Debido a su función en la comunicación intercelular y a su capacidad de transferir material con contenido biológicamente activo a otras células, se está estudiando la posibilidad de utilizar los exosomas como vehículo de fármacos en el tratamiento del cáncer (18). Se ha demostrado que es posible, mediante la administración por nanotecnología, cargar los exosomas con fármacos para que posteriormente sean transportados y administrados específicamente a los tejidos tumorales. Siguiendo esta línea, se está estudiando que los exosomas pueden transportar quimioterápicos empleados en el cáncer de mama, como doxorrubicina, (26) que actúa inhibiendo la biosíntesis de ácidos nucleicos. Para estudiar su eficacia potencial como sistema de administración terapéutica, se aislaron exosomas de ratón que se diseñaron para expresar péptidos específicos de integrinas. Estos exosomas se purificaron y se cargaron con el fármaco doxorrubicina. Se demostró que las células cancerosas de mama de determinadas líneas celulares inhibieron significativamente su proliferación con el tratamiento exosoma-doxorrubicina, en comparación con las líneas celulares que no fueron sometidas a este tratamiento (14).

Estas aplicaciones podrían elevar el valor terapéutico de ciertos quimioterápicos y, además disminuir su toxicidad farmacológica sistémica al administrarse contenidos dentro de exosomas (26). Aunque todavía no se han informado estudios de ensayos clínicos en humanos mediante el uso de exosomas en el cáncer de mama, existen ya ensayos clínicos precedentes para este enfoque en los cánceres de colon, pulmón y

melanoma (estos ensayos clínicos han sido documentados en <https://clinicaltrials.gov>, con los identificadores NCT01294072, NCT02310451 y NCT01159288) (14).

Aunque son necesarios todavía más estudios *in vivo* y un análisis más extenso de muestras de pacientes para investigar su efecto terapéutico, estos estudios respaldan una amplia gama de roles importantes que desempeñan los exosomas en el cáncer y resaltan su papel potencial en el entorno terapéutico, lo que permite pensar que sea oportuno el uso de los exosomas en la práctica clínica del cáncer de mama así como en otros tipos de cánceres, en un futuro no muy lejano (14, 26).

CONCLUSIONES

Tras haber realizado una revisión sobre la biología del cáncer de mama, la implicación de los exosomas en su patogénesis y las posibles oportunidades diagnósticas y terapéuticas que estos nos ofrecen, los puntos más importantes a destacar de esta revisión son:

1. Aunque la tasa de mortalidad por cáncer de mama ha disminuido de manera notable en los últimos años, este continúa siendo la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en España, por lo que todavía son necesarios el desarrollo de técnicas de diagnóstico más precoces y de tratamientos más eficaces.
2. El estudio de la biología tumoral y el conocimiento profundo del comportamiento biológico del cáncer de mama pueden ayudarnos a desarrollar un abordaje diagnóstico y terapéutico más específico de la enfermedad.
3. Los exosomas desempeñan un papel fundamental en las funciones de comunicación intercelular, ya que son capaces de transferir información biológicamente activa de unas células a otras.
4. Cuando los exosomas son secretados por células tumorales, interfieren en la comunicación celular, promoviendo el desarrollo de tumores, la angiogénesis, la metástasis y la disminución de respuesta al tratamiento antineoplásico en determinados cánceres.
5. Las células cancerosas son grandes productoras de exosomas, que están presentes en el medio tumoral y en los fluidos corporales de los pacientes con cáncer. La detección los exosomas tumorales en sangre, analizados mediante biopsia líquida, puede permitir un diagnóstico más precoz del cáncer, de sus metástasis y de sus recidivas.
6. Desde un punto de vista terapéutico, la eliminación de los exosomas de la circulación mediante hemofiltración sanguínea o mediante fármacos inhibidores de exosomas, puede mejorar el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama.
7. El uso de exosomas como vehículos de fármacos antineoplásicos puede permitir un aumento de la eficacia terapéutica de los quimioterápicos convencionales y la disminución de su toxicidad sistémica.

Aunque todavía son necesarios más ensayos clínicos en pacientes para verificar la eficacia de los exosomas en la práctica clínica real, estas microvesículas apuntan a ser muy prometedoras tanto en el entorno diagnóstico como en el entorno terapéutico del cáncer de mama, así como en otros tipos de cánceres, en un futuro no muy lejano.

BIBLIOGRAFÍA

1. Las cifras del cáncer en España [Internet]. Sociedad Española de Oncología Médica. 2020 [Consultado el 11 de febrero de 2020] Disponible en: https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Cifras_del_cancer_2020.pdf
2. Merino Bonilla JA, Torres Tabanera M, Ros Mendoza LH. Breast Cancer in the 21st Century: From Early Detection to New Therapies. *Radiologia*. 2017; 59(5):368–79.
3. Santillán-Benítez JG, Quiroz-Ordoñez Á, Mendieta-Zerón H, Gómez-Oliván LM. Expresión génica y receptores hormonales en cáncer mamario. “El camino hacia la búsqueda de terapias preventivas.” *Rev Med e Investig*. 2013; 1(1):17–24.
4. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res*. 2017; 50(1):33–57.
5. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*. 2017; 13(11):1387–97.
6. Zapardiel Gutiérrez I, Schneider Fontán J. ¿Sabemos qué causa el cáncer de mama? Influencia actual de los diferentes factores de riesgo. *Prog Obs Ginecol*. 2009; 52(10):595–608.
7. García Garre E, Luengo-Gil G, De la Morena Barrios P, Ayala de la Peña F. Microvesículas en cáncer de mama. *Rev Senol Patol Mamar*. 2016; 29(3):125–31.
8. González-Merlo J, González Bosquet E, González Bosquet J. Cáncer de mama. En: Vernet Tomás M., Sabadell Mercadal M., Carreras Collado R, editores. *Ginecología*. Barcelona: Elsevier España; 2014. p. 598–634.
9. Palacios Calvo J, Albanell J, Rojo F, Ciruelos E, Aranda-López I, Cortés J, et al. Consensus statement on biomarkers in breast cancer by the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Rev Esp Patol*. 2018; 51(2):97–109.
10. Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J, Ramakrishna M, Glodzik D, Zou X, et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole genome sequences. *Nature*. 2016; 534(7605):47–54.
11. Eiro N, Cid S, Fraile M, Vizoso FJ. Importancia de la investigación sobre el estroma tumoral en el cáncer de mama. *Rev Senol Patol Mamar*. 2019; 32(1):17–25.
12. Shang S, Ji X, Zhang L, Chen J, Li C, Shi R, et al. Macrophage ABHD5 suppresses NFκB-dependent matrix metalloproteinase expression and cancer metastasis. *Cancer Res*. 2019; 79(21):5513–26.
13. Piñero A. Aliquid novum sub sole (Something new under the sun). *Rev Senol Patol Mamar*. 2016; 29(3):95–6.
14. Lowry MC, Gallagher WM, O’Driscoll L. The role of exosomes in breast cancer. *Clin Chem*. 2015; 61(12):1457–65.
15. Théry C. Exosomes: Secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol Rep*. 2011; 3:15–23.
16. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol*. 1983; 97(2):329–39.
17. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol*. 1985; 101(3):942–8.

18. Ródenas Ú, Junquera C (dir). Exosomas, mucho más que basureros celulares [Trabajo de Fin de Grado en Internet]. [Zaragoza]: Universidad de Zaragoza; 2016. [Consultado el 17 de febrero de 2020] Disponible en: <https://deposita.unizar.es/record/27056>
19. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Leijendekker R, Harding C V, Melief CJ, et al. B Lymphocytes Secrete Antigen-presenting Vesicles. *J Exp Med*. 1996; 183(3):1161–72.
20. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014; 30(1):255–89.
21. Steinbichler TB, Dudás J, Riechelmann H, Skvortsova II. The role of exosomes in cancer metastasis. *Semin Cancer Biol*. 2017; 44:170–81.
22. Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, Ahadi AM, Molaei F, Alahari SK. Exosomes: Composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol Cancer*. 2019; 18(1):75–89.
23. 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*. 2012; 1820(7):940–8.
24. Tai YL, Chen KC, Hsieh JT, Shen TL. Exosomes in cancer development and clinical applications. *Cancer Sci*. 2018; 109(8):2364–74.
25. Junquera C, Castiella T, Muñoz G, Fernández-Pacheco R, Luesma MJ, Monzón M. Biogenesis of a new type of extracellular vesicles in gastrointestinal stromal tumors: ultrastructural profiles of spherosomes. *Histochem Cell Biol*. 2016; 146(5):557–67.
26. Zha QB, Yao YF, Ren ZJ, Li XJ, Tang JH. Extracellular vesicles: An overview of biogenesis, function, and role in breast cancer. *Tumor Biol*. 2017; 39(2):1–7.
27. Vader P, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: Emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol Med*. 2014; 20(7):385–93.
28. Sempere LF, Keto J, Fabbri M. Exosomal microRNAs in breast cancer towards diagnostic and therapeutic applications. *Cancers (Basel)*. 2017; 9(7):71–86.
29. Kalluri R. The Biology and Function of Urine Exosomes in Bladder Cancer. *J Clin Invest*. 2016; 126(4):1208–15.
30. Cusá E. Exosomas tumorales: pequeñas vesículas, grandes vehículos [Internet]. Rafer Laboratorio Clínico. 2019 [Consultado el 22 de febrero de 2020] Disponible en: <http://www.rafer.es/innovacion-laboratorio-clinico/exosomas-tumorales-pequenas-vesiculas-grandes-vehiculos/>
31. O’Driscoll L. Expanding on Exosomes and Ectosomes in Cancer. *N Engl J Med*. 2015; 372(24):2359–62.
32. Meng Y, Sun J, Wang X, Hu T, Ma Y, Kong C, et al. Exosomes: A promising avenue for the diagnosis of breast cancer. *Technol Cancer Res Treat*. 2019; 18(44):1–14.
33. Salido-Guadarrama I, Romero-Cordoba S, Peralta-Zaragoza O, Hidalgo-Miranda A, Rodríguez-Dorantes M. MicroRNAs transported by exosomes in body fluids as mediators of intercellular communication in cancer. *Onco Targets Ther*. 2014; 7(1):1327–38.
34. Eichelsner C, Stückrath I, Müller V, Milde-Langosch K, Wikman H, Pantel K, et al. Increased serum levels of circulating exosomal microRNA-373 in receptor-negative breast cancer patients. *Oncotarget*. 2014; 5(20):9650–63.

35. Peinado H. Microambiente y exosomas tumorales, aliados en los procesos de metástasis [Internet]. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. 2016. [Consultado el 24 de febrero de 2020] Disponible en: https://www.institutoroche.es/biotecnologia/106/microambiente_y_exosomas_tumorales_aliados_en_los_procesos_de_metastasis
36. Mathai R, Vidya R, Reddy B, Thomas L, Udupa K, Kolesar J, et al. Potential Utility of Liquid Biopsy as a Diagnostic and Prognostic Tool for the Assessment of Solid Tumors: Implications in the Precision Oncology. *J Clin Med*. 2019; 8(3):373–390.
37. Aza A. Qué es biopsia líquida: células tumorales circulantes (CTCs), DNA circulante tumoral (ctDNA) en cáncer de pulmón y colon [Internet]. Labclinics. 2017 [Consultado el 2 de marzo de 2020] Disponible en: <https://www.labclinics.com/biopsia-liquida-cancer-pulmon-colon/>
38. Di Meo A, Bartlett J, Cheng Y, Pasic MD, Yousef GM. Liquid biopsy: A step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Mol Cancer*. 2017; 16(1):80–97.
39. Von Bubnoff N. Liquid biopsy: Approaches to dynamic genotyping in cancer. *Oncol Res Treat*. 2017; 40(7–8):409–16.
40. Joyce JA. Aethlon Medical introduces HER2osome™, a novel therapeutic device strategy to address breast cancer [Internet]. 2011 [Consultado el 6 de marzo de 2020] Disponible en: <https://www.prnewswire.com/news-releases/aethlon-medical-introduces-her2osome-a-novel-therapeutic-device-strategy-to-address-breast-cancer-130258733.html>
41. Lentz MR. Continuous whole blood ultrapheresis procedure in patients with metastatic cancer. *J Biol Response Mod*. 1989; 8(5):511–27.