

**UNIVERSITAT  
JAUME I**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA ENFERMERÍA**

**EVALUACIÓN DE UNA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA EL CÁNCER DE  
MAMA TRIPLE NEGATIVO BASADA EN EL SECRETOMA DE CÉLULAS  
MADRE MESENQUIMALES DEL CÉRVIX UTERINO**

**María Paloma Esparza del Valle**

**Dr. Francisco J. Vizoso Piñeiro  
Dra. Noemí Eiró Díaz**

**01/07/2021**



Programa de Doctorado en Ciencias de la Enfermería

Escuela de Doctorado de la Universitat Jaume I

Título de la tesis:

**Evaluación de una estrategia terapéutica para el cáncer de mama triple negativo basada en el secretoma de células madre mesenquimales del cérvix uterino**

Memoria presentada por **María Paloma Esparza del Valle** para optar al grado de doctor/a por la Universitat Jaume I

Doctoranda:  
María Paloma Esparza del Valle

Directores de la tesis:  
Noemí Eiró Díaz      Francisco J. Vizoso Piñeiro

Castelló de la Plana, Julio/2021

**Licencia CC Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (BY-NC-ND).**



**Esta investigación fue financiada por el instituto Carlos III (PI17/02236) y cofinanciada por la Unión Europea (FEDER / ESF, “Investing in your future”).”**

## **Agradecimientos**

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho posible esta Tesis Doctoral.

A mis directores de tesis, la Dra. Noemí Eiró y el Dr. Francisco J. Vizoso. Sin ellos, esta tesis no habría existido. Gracias por hacer realidad un sueño.

A mi tutora, la Dra. Loreto Maciá, al Dr. Víctor M. González y a todos los profesores y personal administrativo de la UJI por su orientación y ayuda. Muchas gracias por hacer fácil lo difícil.

A mi madre, por su amor, confianza y apoyo incondicional.

A mi padre y a mis hermanos: Clara, José y Lusi por estar a mi lado. Por quererme y ayudarme siempre.

A mi marido y a mi hija por ser mi vida y creer en mí

A toda mi familia: Nani, Felipe, Pedro, José, Samuel, Clarita, Jorge, José Manuel ... y a toda mi familia política, por su cariño y apoyo.

A mis compañeras matronas, especialmente a Belén Vega, por compartir conmigo esta aventura.

A Fernando, Kike, Rosi, Sofia, José Luis, José Antonio, Andrea, David, Amparo, Doni y Luisa por sus consejos y ánimos constantes.

A mis amigos y amigas, gracias por todos los momentos compartidos, especialmente a Ángel F. Vic, por su apoyo e inestimable ayuda durante todos estos años.

A los miembros de la Unidad de Investigación de la Fundación Hospital de Jove, especialmente a María, por su ayuda y colaboración.

A todos y todas... MUCHAS GRACIAS.

## Índice

## Índice

<b>Siglas y Acrónimos</b> .....	<b>1</b>
<b>Resumen y Palabras clave</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>9</b>
1.1 Anatomía y fisiología de la mama .....	9
1.2 Epidemiología del cáncer de mama .....	13
1.2.1 Epidemiología del cáncer de mama a nivel mundial.....	13
1.2.2 Epidemiología del cáncer de mama en Europa .....	16
1.2.3 Epidemiología del cáncer de mama en España .....	18
1.2.4 Consideraciones sobre el impacto de la pandemia de COVID-19 en la incidencia del cáncer .....	19
1.3 Etiología del cáncer de mama .....	20
1.4 Clasificación del cáncer de mama .....	22
1.4.1 Sistema TNM.....	22
1.4.1.1 Tamaño Tumoral .....	22
1.4.1.2 Afectación Ganglionar .....	25
1.4.1.3 Metástasis a distancia .....	28
1.4.1.4 Estadio Tumoral.....	28
1.4.2 Clasificación Molecular .....	30
1.5 Tratamientos para el cáncer de mama.....	33
1.6 Tratamientos para el cáncer de mama triple negativo (TNBC) .....	35
1.6.1 Cirugía .....	35
1.6.2 Adyuvantes .....	36
1.6.2.1 Radioterapia .....	36
1.6.2.2 Quimioterapia.....	36
1.6.2.3 Hormonoterapia .....	38
1.7 Células madre .....	38
1.7.1 Definición y tipos de células madre.....	38
1.7.2 Células madre mesenquimales.....	39
1.7.3 Secretoma de las células madre mesenquimales .....	42
1.7.4 Células madre mesenquimales de cuello uterino (hUCESCs).....	44
1.7.4.1 Anatomía del cérvix .....	44

1.7.4.2 hUCESCs .....	45
1.7.4.3 Potencialidad de las hUCESCs y de su secretoma .....	46
<b>2. Hipótesis y Objetivos .....</b>	<b>52</b>
2.1 Hipótesis .....	52
2.2 Objetivos.....	52
<b>3. Material y Método.....</b>	<b>54</b>
3.1 Cultivo celular .....	54
3.1.1 Principio del cultivo celular .....	54
3.1.2 Realización de un subcultivo .....	54
3.1.3 Congelación de células .....	55
3.2 Secretoma de las MC-hUCESCs .....	55
3.2.1 Obtención de la muestra .....	55
3.2.2 Aislamiento de las células.....	56
3.2.3 Caracterización de las células.....	56
3.2.4 Producción del medio condicionado .....	58
3.3 Ensayos .....	58
3.3.1 Ensayo de proliferación .....	58
3.3.2 Ensayo de invasión .....	60
3.4 Estadística .....	61
<b>4. Resultados.....</b>	<b>63</b>
4.1 Cultivo y caracterización de las hUCESCs .....	63
4.2 Ensayo de Proliferación .....	64
4.3 Ensayo de Invasión .....	65
<b>5. Discusión .....</b>	<b>68</b>
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>72</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>74</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1. Relaciones anatómicas musculares de la mama .....</b>	<b>9</b>
<b>Figura 2. Estructura de la mama.....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 3. Vascularización arterial de la mama.....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 4. Retorno linfático de la mama.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 5. Incidencia y mortalidad de tipos de cáncer en mujeres a nivel mundial .....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 6. Mapa mundial que representa el tipo de cáncer con mayor incidencia entre las mujeres según países .....</b>	<b>15</b>
<b>Figura7. Mapa mundial que representa la mortalidad por tipo de cáncer en mujeres según países.....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 8. Cánceres con mayor incidencia en ambos sexos a nivel mundial en el año 2020.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 9. Cánceres con mayor incidencia en ambos sexos en Europa en el año 2020</b>	<b>16</b>
<b>Figura 10. Tasa de incidencia de cáncer en mujeres europeas de todas las edades en el año 2020 .....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 11. Mortalidad en mujeres europeas según tipos de cáncer en el año 2020... 17</b>	<b>17</b>
<b>Figura 12. Número de casos nuevos de cáncer de mama en España en mujeres sin rango de edad, año 2018 .....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 13. Estimación de la incidencia de cáncer en España por tipo tumoral en mujeres en el año 2021 .....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 14. Modelo de crecimiento del cáncer de mama .....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 15. Carcinoma lobulillar in situ .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 16. Carcinoma ductal in situ .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 17. Evolución a carcinoma ductal invasivo .....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 18. Localización anatómica de la zona de transformación .....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 19. Imágenes representativas del mapa de intensidad de luminiscencia .....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 20. Volumen tumoral medida la luminiscencia.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 21. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier .....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 22. Proliferación celular de los fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) a las 12h, 48h y 72h en co-cultivo con hUCESCs .....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 23. Obtención de la muestra mediante citología.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 24. Fundamentos del citómetro de flujo .....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 25. Placas de cultivo celular, ensayo de proliferación celular-WST1.....</b>	<b>59</b>

<b>Figura 26. Lector de placas: BioRad, iMark™ .....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 27. Modelo de ensayo de invasión con BD BiocoatMatrigel™ .....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 28. Células en cultivo, hUCESCs .....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 29. Resultado de la caracterización por citometría de flujo .....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 30. Porcentajes de inhibición de la proliferación de la línea celular MDA-MB-231.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 31. Invasión de la línea celular tumoral MDA-MB-231.....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 32. Porcentajes de inhibición en la invasión de la línea celular MDA-MB-231</b>	<b>66</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1. Número de nuevos casos de cáncer en mujeres en España en el año 2020 (excluidos los tumores cutáneos no melanoma).....</b>	<b>18</b>
<b>Tabla 2. Tumor Primario (T) .....</b>	<b>24</b>
<b>Tabla 3. Ganglios Linfáticos Regionales (Cn) .....</b>	<b>26</b>
<b>Tabla 4. Ganglios Linfáticos Regionales (pN).....</b>	<b>27</b>
<b>Tabla 5. Metástasis a distancia .....</b>	<b>28</b>
<b>Tabla 6: Estadio tumoral .....</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 7. Anticuerpos utilizados para la caracterización de las hUCESCs mediante citometría de flujo.....</b>	<b>57</b>

## **Siglas y Acrónimos**

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AJCC:	American Joint Committee on Cancer
AR:	Artritis reumatoide
ARN:	Ácido ribonucleico
BRCA1:	Breast cancer 1
CAFs:	Fibroblastos asociados a cáncer
CAP:	Conjunto areola pezón
CD:	Cluster differentiation
COX2:	Cyclooxygenase 2
CMMS:	Células madre mesenquimales
Cox-2:	Ciclooxigenasa-2
CSF:	Factor estimulante de colonia
cTNM:	Clasificación TNM basada en datos clínicos
CXCL5:	Quimiocina CXCL5 o ENA-78
DMSO:	Dimetilsulfóxico, criopreservante
DM:	Diabetes mellitus
DMEM-F12:	Medio de cultivo comercial (Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico
EICH:	Enfermedad de injerto contra huésped
EMA:	Agencia Europea de medicamentos
ESO-ESMO:	European school of oncology- Directrices de la sociedad europea de oncología médica
FBS:	Suero fetal bovino
FDA:	Administración de alimentos y medicamentos en los Estados Unidos
FGF:	Factor de crecimiento de fibroblastos
FLT3:	Gen codificador de una quinasa de tirosina
FLT3-LG:	FLT3-ligando

GLAMs:	Ganglios linfáticos axilares metastásicos
GM CFS:	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor human recombinant / CSF-2
HER2:	Human epidermal growth factor Receptor 2 (Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano)
HLA:	Human leucocyte antigens (antígenos leucocitarios humanos)
hUCESCs:	Células madre mesenquimales de cuello uterino
IARC:	International agency for research on cancer
IL:	Interleuquina
IP-10:	Interferon - gamma
LAP:	Péptido asociado a la latencia
LES:	Lupus eritematoso sistémico
MATs:	Macrófagos asociados a tumores
MC:	Medio condicionado
MC-ASCs:	Medio condicionado de células madre del tejido adiposo
MC-hUCESCs:	Medio condicionado de células madre mesenquimales de cuello uterino
MCP:	Proteína quimioatrayente de monocitos
MEC:	Matrix extracelular o ECM
mm:	milímetro
MMP:	Metaloproteasa de la matriz
MSC:	Mesenchymal Stem Cells o Mesenchymal Stromal Cells
mTNBC:	Cáncer de mama triple negativo metastásico
NGF-3:	Neurotrofina-3
nm:	Nanómetro
NO:	Óxido nítrico
PAAF:	Punción Aspiración por Aguja Fina
PBS:	Phosphate-buffered saline, solución salina tamponada
PD-L1	Proteína, ligando 1 de muerte programada

pTNM:	Clasificación TNM basada en datos anatomo-patológicos
PARP:	Enzima poli ADP ribosa polimerasa
RE:	Receptor de estrógenos
REDECAN:	Red española de registros de cáncer
RP:	Receptor de progesterona
SCJ:	Unión escamocolumnar
TILs:	Infiltración linfocitaria del tumor
TGF:	Factor de crecimiento transformante
TNBC:	Triple Negative Breast Cancer (cáncer de mama triple negativo)
TNM:	Método de estadificación de neoplasias (T: tamaño del tumor primario/ N: presencia o ausencia del tumor en ganglios regionales/ M: presencia o ausencia de metástasis distantes)
UICC:	Unio Internationalis Contra Cancrum
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular

## **Resumen y Palabras clave**

El cáncer de mama es una proliferación clonal de células neoplásicas con origen en la mama. En el año 2020 el tumor de mama se convirtió en la principal causa de cáncer en todo el mundo, originando la mayor mortalidad, por cáncer, en las mujeres de los países desarrollados.

El cáncer de mama triple negativo, definido por la falta de expresión del receptor de estrógeno (RE) y progesterona (RP), así como del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), constituye un problema de salud pública debido a su alta morbilidad y mortalidad. Las pruebas indican que el desarrollo del tumor y la progresión hacia un fenotipo maligno dependen no sólo de las células cancerosas en sí mismas, sino que también están profundamente influenciadas por la reactividad del estroma tumoral. Debido a la ausencia de dianas terapéuticas, la quimioterapia tiene un papel clave en el tratamiento.

Las células madre mesenquimales (CMMs) son células madre adultas multipotenciales con propiedades inmuno-moduladoras y con potencial efecto antitumoral dependiendo de su origen tisular. En este estudio se han aislado y caracterizado células madre mesenquimales de cérvix uterino (hUCESCs) obtenidas de frotis citológicos, para estudiar el efecto combinado de su secretoma, también llamado medio condicionado (MC-hUCESCs) y de la quimioterapia (paclitaxel) sobre una línea celular de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231). El análisis del MC-hUCESCs sugiere que una red de señalización paracrina compleja podría estar implicada en el potencial antitumoral de las hUCESCs, así como su sitio de origen, la zona de transición cervical humana, ya que tiene características únicas que justifican biológicamente las diferentes acciones de las hUCESCs y del MC-hUCESCs.

El presente estudio demuestra, *in vitro*, que la administración del MC-hUCESCs combinado con quimioterapia (paclitaxel) a una línea celular de cáncer de mama altamente invasivo, tiene un efecto sinérgico inhibitorio de la proliferación celular, así como de la capacidad de invasión de la línea celular MDA-MB-231. A la luz de su potencial antitumoral, el método de aislamiento celular mínimamente invasivo, misma técnica que para el cribado rutinario de cáncer de cuello uterino, y el hecho de que la liofilización de su medio condicionado (MC) conserva las propiedades originales, hacen que las hUCESCs sean buenas candidatas para aplicaciones experimentales o clínicas. Este estudio proporciona conocimientos y perspectivas para el desarrollo futuro de terapias contra el cáncer, combinando MC-hUCESCs con otros tratamientos terapéuticos.

**Palabras clave:** cáncer de mama triple negativo, células madre, cérvix uterino, secretoma, medio condicionado, quimioterapia.

## **ABSTRACT**

Breast cancer is a clonal proliferation of neoplastic cells that starts in the breast. In 2020, the breast tumor has become the main cause of cancer worldwide and causes the highest mortality, due to cancer, in women in developed countries.

Triple-negative breast cancer, defined by a lack of expression of estrogen and progesterone receptor as well as human epidermal growth factor receptor 2, constitutes a public health issue due to its high morbidity and mortality. Evidence indicates that tumor development and progression towards a malignant phenotype depend, not only on cancer cells themselves, but are also deeply influenced by tumor stroma reactivity. Due to the absence of therapeutic targets, chemotherapy has a key role in treatment.

Mesenchymal stem cells are multipotential adult stem cells with immunomodulatory properties and a potential antitumour effect depending on their tissue origin. In this study, mesenchymal stem cells from the uterine cervix (hUCESCs) obtained from cytological smears, have been isolated and characterized to study the combined effect of their secretome, also called conditioned medium (hUCESCs - CM) and chemotherapy (paclitaxel) on a triple negative breast cancer cell line (MDA-MB-231). Analysis of hUCESCs-CM suggests that a complex paracrine signaling network could be involved in the antitumour potential of hUCESCs, as well as their site of origin, the human cervical transition zone, as it has unique characteristics that biologically justify the different actions of hUCESCs and hUCESCs - CM.

The present study shows that, the in vitro administration of hUCESCs - CM combined with chemotherapy (paclitaxel) to a highly invasive breast cancer cell line, has a synergistic inhibitory effect on cell proliferation, as well as on invasion capacity of the MDA-MB-231 cell line. Due to their antitumour potential, the minimally invasive cell isolation method, the same technique as for routine cervical cancer screening, and the fact that lyophilization of their conditioned medium (CM) conserves original properties, make hUCESCs as good candidates for experimental or clinical applications. The present study provides insights and perspectives for the future development of anticancer therapy combine hUCESCs- CM with others therapeutic treatments.

**Key words:** triple-negative breast cancer, stem cells, uterine cervix, secretoma, conditioned medium, chemotherapy.

## **Introducción**

## 1. Introducción

---

### 1.1 Anatomía y fisiología de la mama

En los humanos la diferenciación embrionaria de la glándula mamaria es igual en el hombre que en la mujer. Sin embargo, en la glándula mamaria femenina ocurren grandes modificaciones estructurales y funcionales relacionadas con el estado hormonal y la fisiología del sistema reproductor, convirtiéndola en un órgano complejo.

Las mamas son glándulas pares y simétricas situadas en la pared torácica anterior entre las costillas II-III a VI-VII, desde el esternón a la línea axilar media y una prolongación que, a modo de cola, se dirige al hueco axilar.

Las relaciones anatómicas más importantes de la mama en su conjunto son musculares. En estrecho contacto con su cara torácica o interna podemos distinguir cuatro músculos importantes (Figura 1):

- Pectoral mayor
- Serrato mayor
- Oblicuo externo del abdomen
- Recto anterior del abdomen

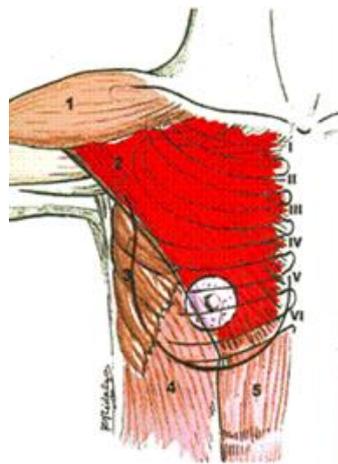


Figura 1. Relaciones anatómicas musculares de la mama: 1. Deltoides, 2. Pectoral Mayor, 3. Serrato Mayor, 4. Oblicuo Externo, 5. Recto Abdominal (Fuente: slideshare.net)

Las mamas se encuentran constituidas por (Figura 2):

1. Porción glandular: su unidad funcional es el lóbulo mamario. La mama en la mujer adulta está formada por un conjunto de 15 a 20 glándulas

exocrinas túbulo-alveolares, independientes entre sí y separadas por tejido conectivo denso y tejido adiposo (Bland I, Bland K. y Copeland, 2007). Cada lóbulo está integrado por los lobulillos, los conductos intralobulillares y el conducto terminal, que llega al conducto segmentario y finalmente se encuentran en el conducto galactóforo, que drena a través del pezón. En los conductos distinguimos dos capas celulares:

- Superficial: constituida por las células ductales o galactofóricas cuyo epitelio es más cilíndrico hacia el pezón y más cúbico hacia los acinos.
  - Profunda: dos tipos de células cúbicas y células mioepiteliares sobre la membrana basal.
2. Soporte conjuntivo: desdoblamiento de la fascia pectoral común, que constituye el ligamento de Cooper. Desde la porción posterior de la mama, con una pequeña banda grasa que le permite deslizarse sobre la aponeurosis pectoral superficial, manda unos tractos que separan los distintos lóbulos y que en ciertos puntos alcanzan la superficie dérmica (crestas de Ducret)
  3. Tejido adiposo: representa el relleno de la mama. La separa del plano profundo pectoral y dentro de la mama, separa a los distintos lóbulos entre sí.
  4. Cubierta cutánea: constituida por la piel. La desembocadura de los ductos principales se produce a nivel del pezón, que es una estructura cónica rodeada de un engrosamiento epidérmico discoidal y pigmentado llamado areola. En el pezón se encuentran los tubérculos de Montgomery.

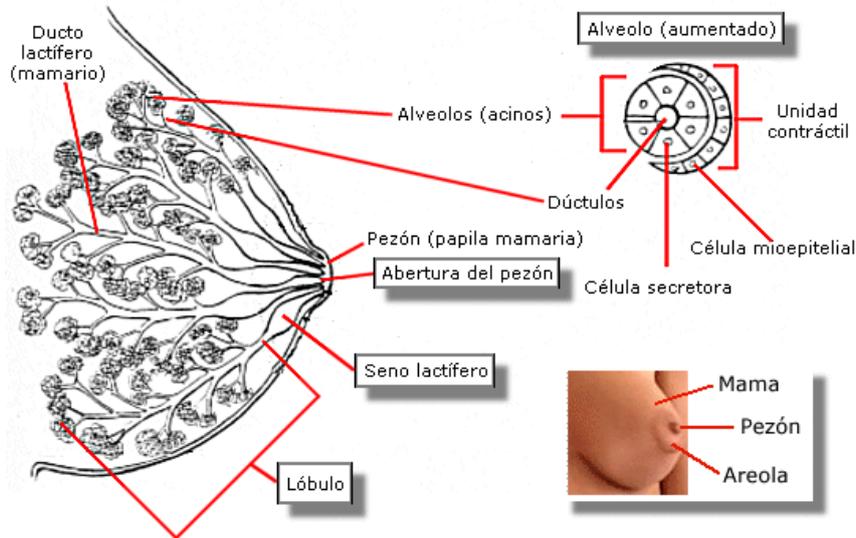


Figura 2. Estructura de la mama (Fuente: Fundamentos para la lactancia materna. Carlos González WordPress.com)

5. Sistema circulatorio (Figura 3): La irrigación arterial procede de la aorta descendente a través de tres ramas:

- Arterias intercostales posteriores.
- Arteria subclavia.- de la que nace la arteria mamaria interna.
- Arteria axilar.- de la que nace la arteria torácica lateral y que da lugar a la arteria mamaria externa.

Entre los tres sistemas se establece una red anastomótica, que se concentra en un plexo circular periareolar y en un plexo profundo.

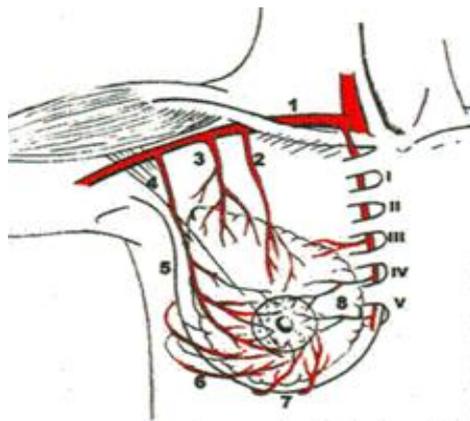


Figura 3. Vascularización arterial de la mama: 1.arteria subclavia, 2.arteria torácica superior, 3.arteria acromio torácica, 4. arteria mamaria externa, 5.arteria torácico lateral, 6.ramas intercostales, perforantes laterales, 7. perforantes intercostales medias, 8. perforantes de la arteria mamaria interna. (Fuente: es.slideshare.net)

El sistema venoso sigue un trayecto paralelo inverso. Por debajo de la areola las anastomosis venosas forman un plexo circunferencial llamado de Haller (Sierra, 2006).

6. Sistema linfático (Figura 4): Los vasos linfáticos de la mama adquieren un interés especial por el hecho de que son invadidos por las neoplasias mamarias y en ocasiones, deben ser resecaados junto con el tejido a extirpar. Se encuentran tres grupos ganglionares a los cuales drenan los principales plexos:

- Grupo mamario externo
- Grupo retropectoral y subclavio
- Grupo mamario interno:
  - Plexo superficial dérmico
  - Plexo glandular extralobular
  - Plexo perigalactóforo.

Así mismo son de gran relevancia las conexiones linfáticas existentes entre las cadenas ganglionares mamarias internas de ambos hemitórax que favorecen la extensión a la mama contralateral de determinadas neoplasias.

Desde el punto de vista oncológico, actualmente los ganglios axilares se consideran divididos en tres grupos de utilidad clínica, los niveles de Berg:

- Nivel I: ganglios desde el borde externo de la glándula hasta el borde externo del pectoral menor.
- Nivel II: ganglios situados por detrás del pectoral menor.
- Nivel III: ganglios entre el borde interno del pectoral menor y la entrada en el mediastino.

Los ganglios o nódulos linfáticos de la axila son de suma importancia en el cáncer de mama. El vaciamiento ganglionar axilar radical implica la extirpación de los tres niveles.

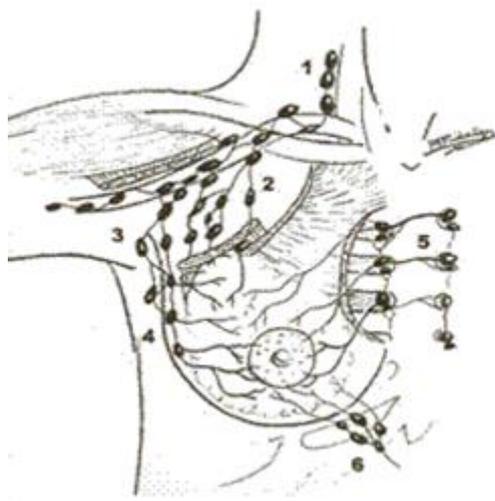


Figura 4. Retorno linfático de la mama: 1.territorio supraclavicular, 2.territorio intraclavicular, 3.territorio axilar, 4.territorio mamario externo, 5.territorio mamario interno, 6.Vía de Gerota. (Fuente: Aspectos anatómicos de interés en cirugía plástica de la mama- clinicaplanas.com)

7. Inervación: La mama está inervada por fibras nerviosas sensitivas y simpáticas localizadas en las ramas cutáneas externa y anterior de los nervios intercostales que discurren a través de los espacios intercostales segundo a sexto (Canby, 2007). Distinguimos tres grupos de nervios que convergen hacia la placa areolomamilar: grupo anterior, lateral y superior.

El cuarto nervio intercostal lateral es el más importante para el conjunto areola pezón (CAP) inervando a los músculos areolar y mamilar que ejercen la función eréctil del pezón, indispensables para una buena lactancia, además interviene en la sensibilidad del mismo.

## **1.2 Epidemiología del cáncer de mama**

### **1.2.1 Epidemiología del cáncer de mama a nivel mundial**

El estudio GLOBOCAN, llevado a cabo por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (International Agency for Research in Cancer) (Bray et al., 2018) realiza una estimación a nivel mundial de la incidencia, prevalencia y mortalidad del cáncer (Figura 5).

En el año 2018 se diagnosticaron en todo el mundo, alrededor de 2,1 millones de nuevos casos, lo que representa aproximadamente que uno de cada 4 nuevos casos de cáncer diagnosticados en mujeres, son cáncer de mama.

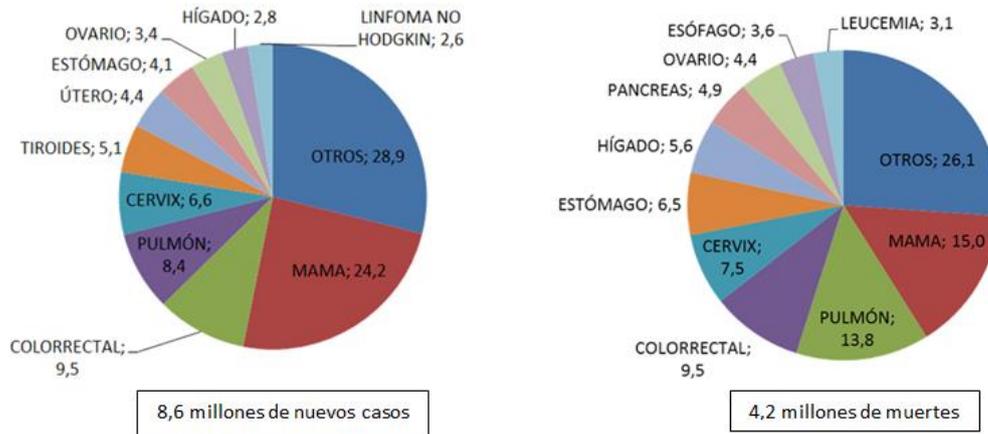


Figura 5. Incidencia y mortalidad de tipos de cáncer en mujeres a nivel mundial (Fuente: gráficas traducidas del estudio GLOBOCAN 2018. Global Cancer Observatory. IARC 2018)

El cáncer de mama en mujeres es el cáncer diagnosticado con más frecuencia en 154 países (Figura 6), siendo su incidencia a nivel mundial del 24,2%. También es la principal causa de muerte por cáncer en más de 100 países; las principales excepciones son Australia/Nueva Zelanda, Europa del Norte, América del Norte, donde está precedida por cáncer de pulmón, y muchos países del África subsahariana, debido a las elevadas tasas de cáncer de cuello uterino (Figura 6). Las tasas de incidencia de cáncer de mama en mujeres son más altas en Australia/Nueva Zelanda, Europa del Norte (Reino Unido, Suecia, Finlandia y Dinamarca), Europa Occidental (Países Bajos, Francia y Bélgica, que tiene las tasas mundiales más altas), Sur de Europa (Italia) y América del Norte.

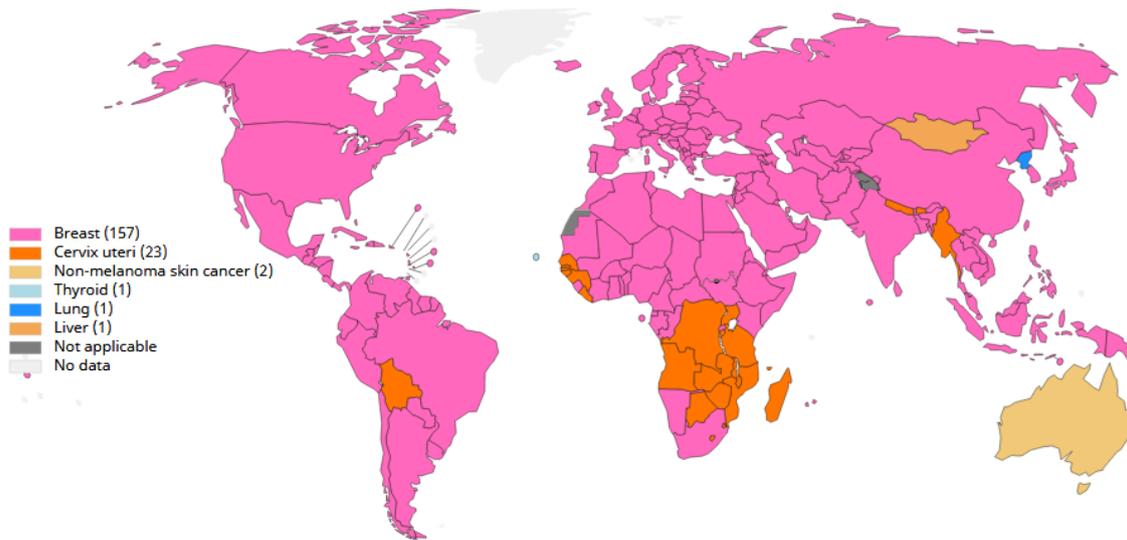


Figura 6. Mapa mundial que representa el tipo de cáncer con mayor incidencia entre las mujeres según países (Fuente: estudio GLOBOCAN 2020. Global Cancer Observatory. IARC 2020).

En términos de mortalidad, el cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres (Figura 7) y origina una de cada 6 muertes por cáncer. La enfermedad ocupa el primer lugar en términos de incidencia y mortalidad en la mayoría de los países del mundo (en 157 y 113 países, respectivamente). La mortalidad más alta estimada está en Melanesia, donde Fiji tiene las tasas más altas del mundo.

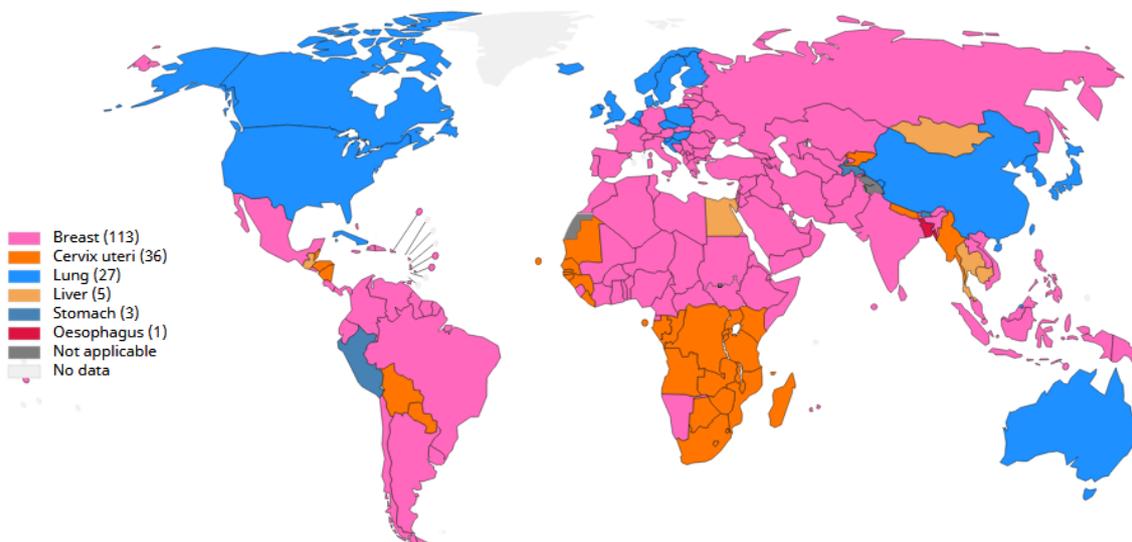


Figura7. Mapa mundial que representa la mortalidad por tipo de cáncer en mujeres según países. (Fuente: estudio GLOBOCAN 2020. Global Cancer Observatory. IARC 2020)

Según el estudio GLOBOCAN del año 2020 el tumor de mama se ha convertido en la principal causa de cáncer en todo el mundo, superando al de pulmón en cuanto a número de casos diagnosticados (Figura 8). El cáncer de mama en mujeres sigue siendo

el tumor más común en todo el mundo (11,7% del total de casos nuevos), seguido del cáncer de pulmón (11,4%), el colorrectal (10,0%), el de próstata (7,3%) y el de estómago (5,6%).

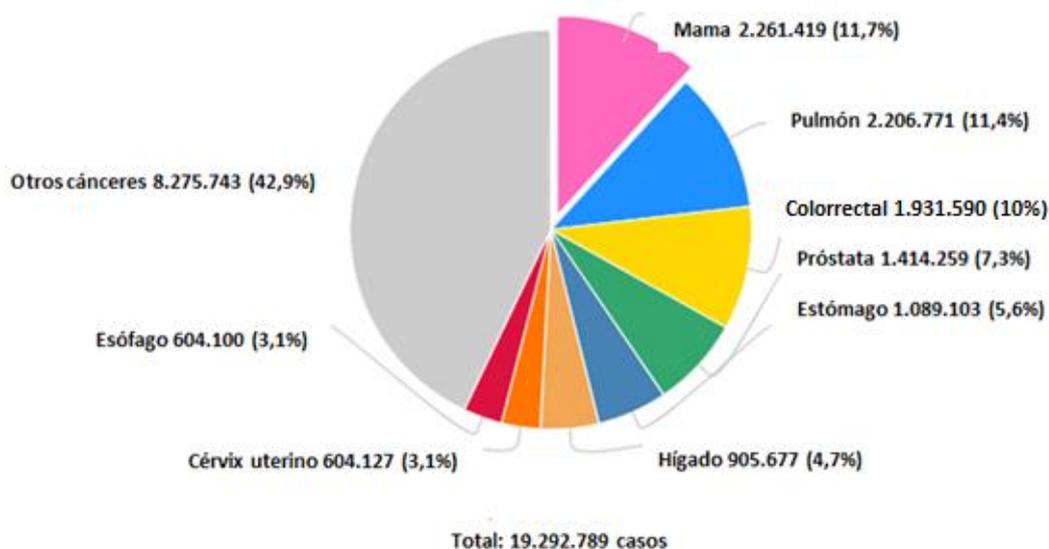


Figura 8. Cánceres con mayor incidencia en ambos sexos a nivel mundial en el año 2020 (Fuente: gráfica traducida del estudio GLOBOCAN 2020. Global Cancer Observatory IARC 2020).

### 1.2.2 Epidemiología del cáncer de mama en Europa

El cáncer de mama es el cáncer con mayor incidencia en Europa en el año 2020 en ambos sexos, seguido de los cánceres colorrectal y pulmón (Figura 9)

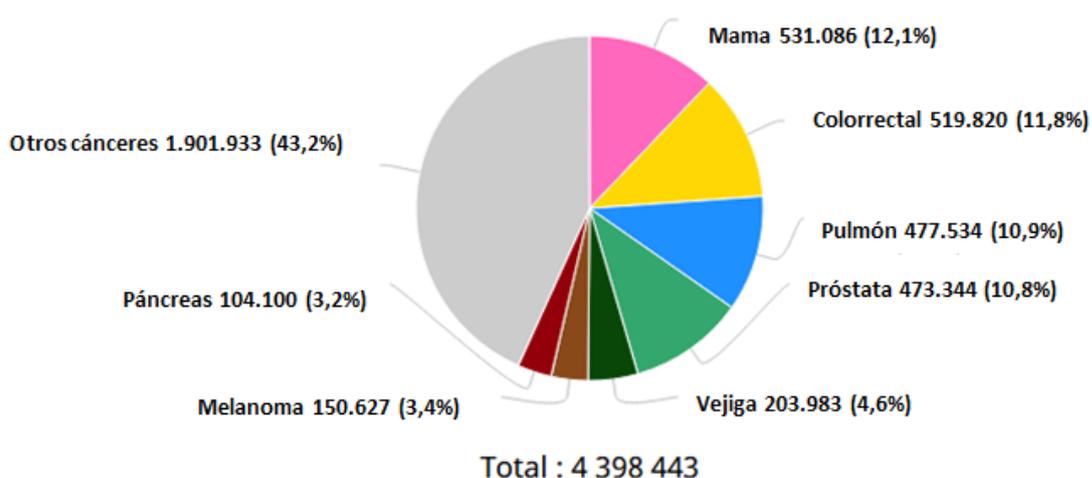


Figura 9. Cánceres con mayor incidencia en ambos sexos en Europa en el año 2020 (Fuente: gráfica traducida del estudio GLOBOCAN 2020. Global Cancer Observatory. IARC 2020).

En Europa, la incidencia del cáncer de mama varía según la región. En el año 2018 en el Norte de Europa la incidencia fue de 84.272 frente a los 169.640 nuevos casos del Oeste de Europa. En el Centro y Este de Europa se registraron 149.024 y en el Sur la incidencia fue de 119.577 mujeres. A pesar de esa diferenciación por zonas, el cáncer de mama sigue siendo el tipo de cáncer con mayor incidencia en mujeres europeas (Figura 10)

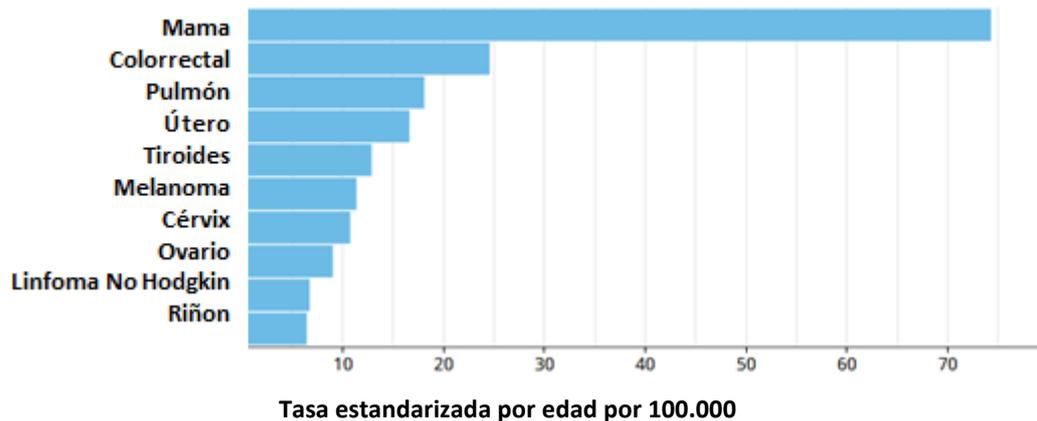


Figura 10. Tasa de incidencia de cáncer en mujeres europeas de todas las edades en el año 2020 (Fuente: gráfica traducida del estudio GLOBOCAN 2020. Global Cancer Observatory. IARC 2020)

En 2018 la incidencia del cáncer de mama en Europa fue del 26,4% con 522.513 nuevos casos diagnosticados y la mortalidad de 137.577 mujeres. En el año 2020 la incidencia se incremento ligeramente a 531.086 mujeres con una mortalidad de 141.765 mujeres (Figura 11).

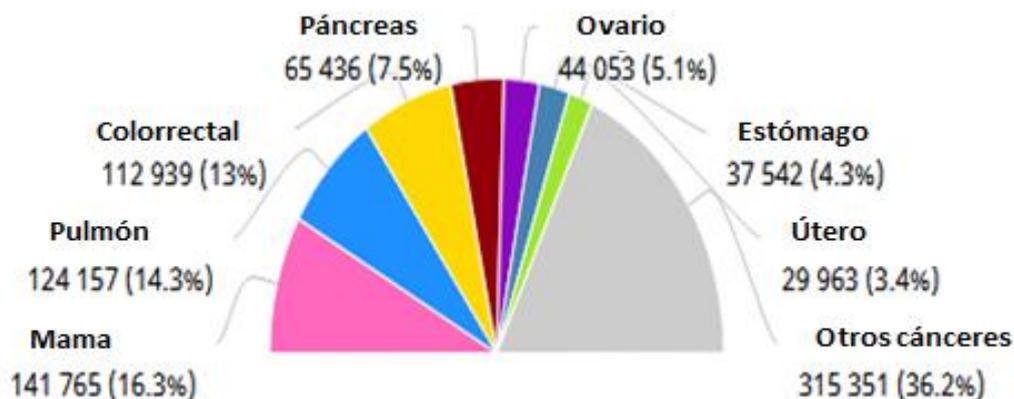


Figura 11. Mortalidad en mujeres europeas según tipos de cáncer en el año 2020 (Fuente: Gráfica traducida del estudio GLOBOCAN 2020. Global Cancer Observatory. IARC 2020)

### 1.2.3 Epidemiología del cáncer de mama en España

En España, en el año 2018 se registraron 32.825 nuevos casos de cáncer de mama, situándose como el tipo de cáncer de mayor incidencia en mujeres (Figura 12), además es el cáncer de mayor prevalencia en los últimos 5 años (Figura 13), con un total de casos de 129.928. El número de defunciones registradas por cáncer de mama fue de 6421, con una tasa de mortalidad del 5.7 %.

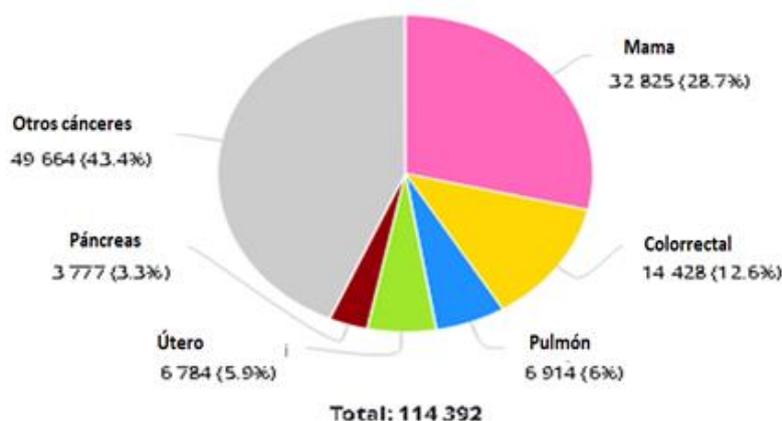


Figura 12. Número de casos nuevos de cáncer de mama en España en mujeres sin rango de edad, año 2018 (Fuente: Gráfica traducida del estudio GLOBOCAN 2018. Global Cancer Observatory. IARC 2018)

Los cánceres más frecuentemente diagnosticados en mujeres en España en 2020 fueron los de mama y colon y recto.

Tabla 1. Número de nuevos casos de cáncer en mujeres en España en el año 2020 (excluidos los tumores cutáneos no melanoma). Fuente: REDECAN.

TIPO TUMORAL	N
Cavidad Oral y Faringe	2.555
Esófago	475
Estómago	2.874
Colon y recto	18.187
Colon	12.635
Recto	5.552
Hígado	1.624
Vesícula biliar	1.454
Páncreas	3.954
Laringe	386
Pulmón	7.791
Melanoma de piel	3.672
Mama	32.953
Cérvix Uterino	1.972
Cuerpo Uterino	6.804
Ovario	3.645
Riñón (sin pelvis)	2.191
Vejiga urinaria	4.279
Encéfalo y sistema nervioso	2.152
Tiroides	4.180
Linfoma de Hodgkin	652
Linfomas no hodgkinianos	4.256
Mieloma	1.337
Leucemias	2.667
Otros	7.136
<b>Todos excepto piel no melanoma</b>	<b>117.196</b>

Las estimaciones de la incidencia de cáncer en mujeres para el año 2021 reflejan resultados equiparables a los del año anterior, aunque se desconoce el efecto que pueda tener la pandemia.

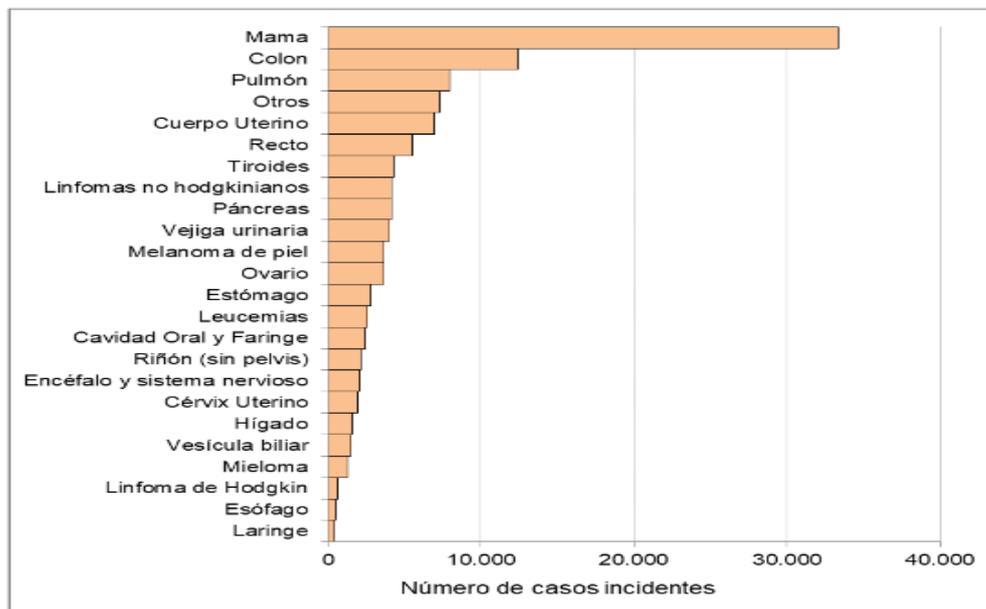


Figura 13. Estimación de la incidencia de cáncer en España por tipo tumoral en mujeres en el año 2021 (Fuente: REDECAN)

### 1.2.4 Consideraciones sobre el impacto de la pandemia de COVID-19 en la incidencia del cáncer

La pandemia de Covid-19 probablemente ha afectado de manera significativa el número de diagnósticos de cáncer en muchos países durante el año 2020. España fue en 2020 uno de los países más afectados por la pandemia de Covid-19 durante la primera ola. Los programas de cribado de cáncer se vieron afectados en mayor o menor grado por lo que, con toda probabilidad, el número de cánceres colorrectales, de mama y de cuello uterino finalmente diagnosticados en 2020 fue menor que el esperado. No solo los programas de cribado se vieron afectados. Todo el sistema sanitario se vio colapsado por la pandemia y esto también influyó negativamente en la capacidad diagnóstica del sistema. Otros factores relacionados con la pandemia como el miedo a entrar en los centros sanitarios, ya fuesen de atención primaria o de atención hospitalaria, o las dificultades en el acceso al sistema sanitario debido al estado de alarma, también han podido influir (Zadnik et al., 2020).

Las estimaciones de la incidencia de cáncer se realizan a partir de proyecciones realizadas con datos de los registros de cáncer de población de años anteriores, y utilizando métodos estadísticos que son válidos si no se producen fenómenos que alteren significativamente la capacidad diagnóstica. La pandemia ha sido un fenómeno

de este tipo, por todo ello, se deduce que el número real de cánceres diagnosticados en 2020, aunque no se sabe en qué magnitud, es menor al que se había estimado sin la pandemia, tanto en España como a nivel mundial.

### **1.3 Etiología del cáncer de mama**

La acumulación de cambios genéticos y epigenéticos influyen en la progresión del tejido normal hacia el cáncer de mama, induciendo a una célula a adquirir características cancerosas. Las alteraciones genéticas hacen referencia a cambios en la secuencia de pares de bases del ácido desoxirribonucleico (ADN) o a la delección de un gen en su totalidad, mientras que las alteraciones epigenéticas van vinculadas a cambios en la expresión de genes estructurales normales. Así pues, el cáncer es impulsado por alteraciones del ADN que incluyen reordenamientos cromosómicos, mutaciones y cambios epigenéticos, como la hipermetilación del promotor, dando como resultado la activación de genes promotores del crecimiento (oncogenes) o la supresión de genes inhibidores del crecimiento (genes supresores de tumores).

Hanahan y Weeinberg (2000) describieron que las células tumorales presentan seis alteraciones esenciales en su fisiología:

- Autosuficiencia en el crecimiento; las células tumorales pueden generar muchas de sus propias señales de crecimiento, reduciendo así su dependencia de la estimulación exógena.
- Resistencia a estímulos antiproliferativos; las células tumorales deben eludir las señales antiproliferativas para poder reproducirse.
- Invasión de tejidos y metástasis; esta capacidad permite a las células tumorales escapar de la masa del tumor primario y colonizar nuevos terrenos en el cuerpo, donde los nutrientes y el espacio son limitantes, al menos inicialmente.
- Potencial de replicación ilimitado; el conjunto de las propiedades que afectan al ciclo celular de las células (autosuficiencia en el crecimiento, resistencia a estímulos antiproliferativos y evasión de la apoptosis) permite una desvinculación del programa de crecimiento normal de las células.
- Estimulación de la angiogénesis; esta capacidad parece ser adquirida durante el desarrollo del tumor, a través de un cambio en el equilibrio de inductores e inhibidores de la angiogénesis.
- Evasión de la apoptosis; las células tumorales pueden adquirir esta capacidad a través de una variedad de estrategias.

Sin embargo, la inestabilidad genómica y la inflamación mediada por las células inmunes atraídas al nicho tumoral son causas subyacentes que fomentan estas funciones distintivas. Además, la reprogramación de la energía metabólica y la evasión de la destrucción por el sistema inmune son dos nuevos conceptos que fueron posteriormente añadidos a la lista de características de las células tumorales (Hanahan y Weinberg, 2011).

Por otra parte, aunque no está plenamente conocido el papel de las células madre tumorales, parecen tener un papel en el desarrollo del tumor. Las células madre tumorales tienen una capacidad de autorrenovación constante, han perdido la capacidad de regulación del crecimiento, pero conservan la capacidad de diferenciación. Así, estas células se convierten en las proveedoras de nuevas células tumorales.

El modelo aceptado del desarrollo del cáncer de mama describe las fases reversibles de hiperplasia (excesivo crecimiento de células) e hiperplasia atípica (excesivo crecimiento de células anormales). Si la hiperplasia atípica se convierte en carcinoma *in situ*, limitado a la estructura que afecta, es probablemente irreversible y pasado un tiempo la lesión progresa a cáncer infiltrante en el que ya hay invasión de los tejidos circundantes (Kopans, 1994). Es imposible demostrar que todos los tumores evolucionan siguiendo el mismo esquema (Figura 14) pero se considera que no existe transformación directa desde la célula normal hasta la célula cancerosa y que el tiempo que transcurre entre un episodio y otro es muy variable.

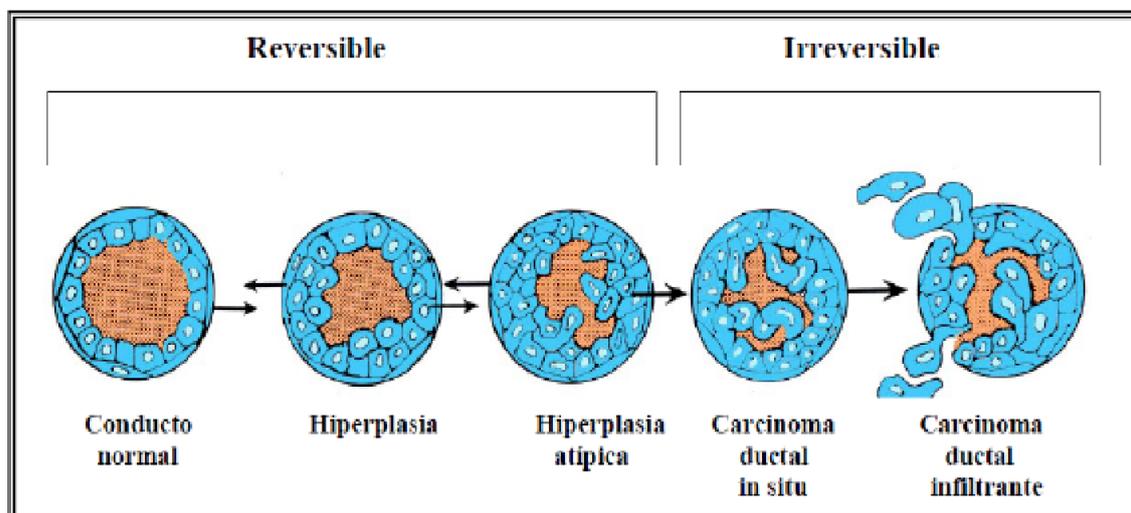


Figura 14. Modelo de crecimiento del cáncer de mama (Fuente: Kopans DB,1994)

## **1.4 Clasificación del cáncer de mama**

### **1.4.1 Sistema TNM**

El sistema de clasificación TNM es el método de estadificación de neoplasias desarrollado por la AJCC (American Joint Committee on Cancer) en colaboración con la UICC (Unio Internationalis Contra Cancrum), basado en la extensión/tamaño del tumor primario (T), la presencia o ausencia del tumor en ganglios regionales (N) y la presencia o ausencia de metástasis distantes (M). El sistema TNM de los tumores malignos fue desarrollado por Pierre Denoix entre los años 1943 y 1952. Desde su primera edición en 1954, el sistema TNM para el cáncer de mama se ha actualizado en diferentes ocasiones hasta la actual octava edición, publicada en 2017. El panel de expertos en mama de la AJCC ha recomendado proporcionar dos tablas de Etapa de pronóstico de cáncer de mama, por lo que incluye una estadificación basada en datos clínicos cTNM y patológicos pTNM. Así encontramos:

- Tabla de estadio de condición anatómica: se basa únicamente en la extensión anatómica del cáncer según lo definido por las categorías T, N y M. Se ha diseñado para su uso en entornos de todo el mundo donde el análisis de biomarcadores no está disponible. Cuando hay biomarcadores disponibles, los cánceres se deben estadiar mediante las tablas de etapa de pronóstico clínico y patológico.
- Tabla de estadio de pronóstico clínico: se debe utilizar para asignar la etapa para todos los pacientes en función de los antecedentes, el examen físico, los estudios de imagen realizados (no necesarios) y las biopsias relevantes. La etapa de pronóstico clínico se determina por T, N, M, grado tumoral, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), receptor de estrógenos (ER) y estado del receptor de progesterona (PR).
- Tabla de estadio de pronóstico patológico: se debe utilizar para asignar la etapa a los pacientes que tienen resección quirúrgica como tratamiento inicial de su cáncer antes de recibir cualquier terapia sistémica o de radioterapia. Se basa en toda la información clínica, los datos de biomarcadores y los hallazgos de la cirugía y el tejido resecado.

#### **1.4.1.1 Tamaño Tumoral**

El tamaño macroscópico (diámetro máximo que se obtiene de la medición en al menos dos dimensiones) se considera uno de los más importantes factores pronósticos independientemente de la afectación ganglionar (Rosen et al., 1991).

Se ha demostrado que los tumores de mayor tamaño se acompañan de periodos más breves hasta la recurrencia de la enfermedad y conllevan una menor supervivencia. Así, en base a los numerosos estudios realizados, se puede afirmar que el tamaño tumoral constituye el marcador pronóstico más importante en pacientes con cáncer de mama y ganglios axilares negativos, correlacionándose con la supervivencia libre de enfermedad y con la supervivencia total (Carter et al., 1989).

La definición de Carcinoma Inflamatorio es fundamentalmente clínica. Implica la presencia de eritema y edema (piel de naranja) difuso de la mama, asociado o no a una masa palpable subyacente. Estos cambios deben afectar a la mayor parte de la piel de la mama (la presencia de estos cambios asociados de forma limitada a un tumor localmente avanzado no implica el diagnóstico de carcinoma inflamatorio). La presencia de linfáticos dérmicos infiltrados sin los cambios clínicos descritos no implica por sí solo el diagnóstico de carcinoma inflamatorio.

### Definición Clínica y Patológica

Tabla 2. Tumor Primario (T)

TX	El tumor primario no se puede evaluar
T0	No evidencia de tumor primario
Tis (DCIS)	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
Tis (Paget)	Enfermedad de Paget del pezón sin tumor La enfermedad de Paget asociada a tumor se clasifica de acuerdo al tamaño del tumor
T1	Tumor < 20mm en su mayor dimensión
T1mi	Tumor < 1mm en su mayor dimensión
T1a	Tumor > 1mm, pero < o = 5mm en su mayor dimensión
T1b	Tumor > 5mm, pero < o = 10mm en su mayor dimensión
T1c	Tumor > 10mm, pero < o = 20mm en su mayor dimensión
T2	Tumor > 20mm, pero < o = 50mm en su mayor dimensión
T3	Tumor > 50mm en su mayor dimensión
T4	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a pared torácica y/o a piel. La invasión sólo de la dermis no clasifica al tumor como T4
T4a	Extensión a pared torácica sin incluir el músculo pectoral mayor
T4b	Edema (incluyendo piel de naranja) o ulceración de la piel de la mama o nódulos cutáneos satélites, que no cumple los criterios de carcinoma inflamatorio
T4c	Ambos T4a y T4b están presentes
T4d	Carcinoma Inflamatorio
Tis (LCIS)	El Carcinoma Lobulillar <i>in situ</i> es una entidad benigna y ha sido retirada del sistema TNM en la octava clasificación

#### **1.4.1.2 Afectación Ganglionar**

La afectación ganglionar es, aún en la actualidad, el factor pronóstico independiente más importante en el cáncer de mama. El 30% de los pacientes con ganglios negativos recidivan a los 10 años, mientras que la tasa de recurrencia de pacientes con ganglios positivos supera el 70% (Lønning et al., 2007).

La disección de los ganglios axilares en el cáncer de mama es un procedimiento originalmente diseñado para maximizar la supervivencia y el control regional, y para determinar la clasificación de los ganglios. La disección de los ganglios linfáticos axilares con eliminación y examen histopatológico de al menos 10 ganglios, fue una parte inherente del tratamiento quirúrgico durante un largo período, hasta que se sustituyó por la biopsia del ganglio linfático centinela. La resección del ganglio centinela fue diseñada para minimizar los efectos secundarios de la cirugía de los ganglios linfáticos, pero en el caso de que sea positivo, se completa la disección de los ganglios linfáticos axilares de forma rutinaria debido a la posibilidad de que también están afectados. Sin embargo, en el 50-68% de los pacientes con ganglio centinela positivo, este es el único ganglio de la axila afectado por células tumorales (Hung et al., 2005; Domenech et al., 2009).

La detección clínica de los ganglios es realizada por estudios de imagen (excluyendo la linfogammagrafía) o por exploración física con características de alta sospecha o posible macrometástasis basado en la punción aspiración con aguja fina (PAAF).

### Definición Clínica

Tabla 3. Ganglios Linfáticos Regionales (Cn)

cNX	No se pueden evaluar (por ejemplo; cirugía previa)
cN0	No metástasis en los ganglios linfáticos regionales
cN1	Metástasis en ganglios homolaterales móviles
cN1mi*	Micrometástasis (mayores de 0.2 pero no superiores a 2.0 mm)
cN2	Metástasis en ganglios axilares homolaterales fijos o agrupados, o en ganglios de la cadena mamaria interna
cN2a	Metástasis en ganglios axilares homolaterales fijos entre sí o a otras estructuras
cN2b	Metástasis sólo en ganglios homolaterales de la cadena mamaria interna clínicamente aparentes y en ausencia de afectación clínica evidente axilar
cN3	Metástasis en ganglios infraclaviculares homolaterales, o en cadena mamaria interna homolateral clínicamente aparentes en presencia de afectación axilar clínicamente evidente; o metástasis en ganglios supraclaviculares homolaterales con o sin afectación axilar o de la mamaria interna
cN3a	Metástasis en ganglios infraclaviculares homolaterales
cN3b	Metástasis en cadena mamaria interna y axilar homolateral
cN3c	Metástasis en ganglios supraclaviculares homolaterales

Los sufijos (sn) y (f) deberían ser añadidos a la categorización N para referirse a la confirmación de metástasis por biopsia del ganglio centinela o por punción aspiración con aguja fina respectivamente.

\*cN1mi se emplea raramente, pero es apropiada en los casos en los que la biopsia del ganglio centinela se realiza antes de la resección del tumor y más probable ocurre en los casos tratados con terapia neoadyuvante.

### Definición Patológica

Tabla 4. Ganglios Linfáticos Regionales (pN)

pNx	Los ganglios no son evaluables (no extirpados o por cirugía previa).
pN0	No afectación histológica, sin estudios adicionales para células tumorales aisladas.
pN0(i+)	Presencia de células tumorales aisladas por hematoxilina e inmunohistoquímica, ninguna agrupación > 0,2 mm.
pN0(mol+)	No afectación ganglionar histológica, estudio molecular positivo (RT-PCR).
pN1	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares y/o en la mamaria interna con afectación microscópica detectada por biopsia de ganglio centinela, pero no clínicamente aparente.
pN1mi	Micrometástasis (>0,2 mm, < 2mm)
pN1a	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares, al menos una metástasis mayor de 2.0 mm
pN1b	Metástasis en la mamaria interna con afectación microscópica detectada por biopsia de ganglio centinela, pero no clínicamente aparente.
pN1c	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares y en la mamaria interna con afectación microscópica detectada por biopsia de ganglio centinela, pero no clínicamente aparente.
pN2	Metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares, o afectación clínicamente aparente de la mamaria interna en ausencia de afectación axilar.
pN2a	Metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares (al menos un depósito tumoral > 2 mm)
pN2b	Metástasis clínicamente aparente en ganglios de la mamaria interna en ausencia de afectación axilar
pN3	Metástasis en > 10 ganglios axilares, o en ganglios infraclaviculares, o en ganglios de la mamaria interna ipsilaterales clínicamente aparentes en presencia de 1 o más ganglios axilares positivos; o en más de 3 ganglios

	axilares con metástasis microscópicas clínicamente negativas de la mamaria interna; o en ganglios supraclaviculares ipsilaterales.
pN3a	Metástasis en > 10 ganglios axilares (al menos un depósito tumoral > 2 mm), o metástasis en ganglios linfáticos infraclaviculares
pN3b	Metástasis en ganglios de la mamaria interna ipsilaterales clínicamente aparentes en presencia de 1 o más ganglios axilares positivos; o en más de 3 ganglios axilares con metástasis microscópicas de la mamaria interna detectadas por biopsia del ganglio centinela, pero no clínicamente aparentes.
pN3c	Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales.

Los sufijos (sn) y (f) deberían ser añadidos a la categorización N para referirse a la confirmación de metástasis por biopsia del ganglio centinela o por punción aspiración con aguja fina respectivamente, sin resección adicional de nódulos.

#### 1.4.1.3 Metástasis a distancia

En el sistema de clasificación TNM la presencia de metástasis se clasifica según el siguiente cuadro:

Tabla 5. Metástasis a distancia

MX	No se pueden evaluar.
M0	No metástasis a distancia.
cMo(i+)	No evidencia clínica ni radiológica de metástasis, pero presencia de depósito de células tumorales detectadas en sangre circulante, médula ósea u otro tejido ganglionar no regional que es < 0,2 mm en un paciente sin signos ni síntomas de metástasis.
M1	Metástasis a distancia presentes.

#### 1.4.1.4 Estadio Tumoral

Las diversas combinaciones de las subcategorías de T, N y M definen los siguientes cuatro estadios designados como I, II, III y IV en orden ascendente de gravedad.

Tabla 6: Estadio tumoral

ESTADIO	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1b	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1b	N1mi	M0
IIA	T0	N1c	M0
	T1b	N1c	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1b	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

### 1.4.2 Clasificación Molecular

El cáncer de mama puede clasificarse desde un punto de vista anatomopatológico, en función de si hay o no afección de la membrana basal. También puede clasificarse mediante la utilización de la inmunohistoquímica, que permite detectar proteínas en las células, categorizando a los tumores según la expresión de determinados receptores (Espinosa, 2018).

- **Cáncer no invasivo o in situ:** Este tipo de tumor tiene como origen el epitelio lobulillar o ductal; existiendo dos grupos:
  - **Carcinoma lobulillar in situ (Figura 15).** Se denomina lobulillar porque las células tumorales comienzan a desarrollarse en los lobulillos (glándulas productoras de leche).

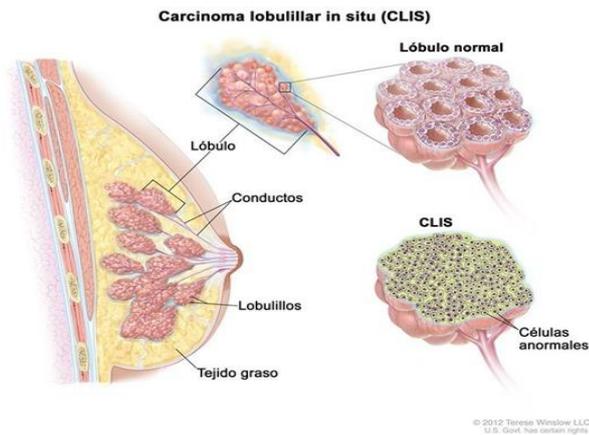


Figura 15. Carcinoma lobulillar in situ (Fuente: [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov))

- **Carcinoma ductal in situ (Figura 16).** En el carcinoma ductal in situ las células anormales se encuentran en el revestimiento de un conducto del seno.

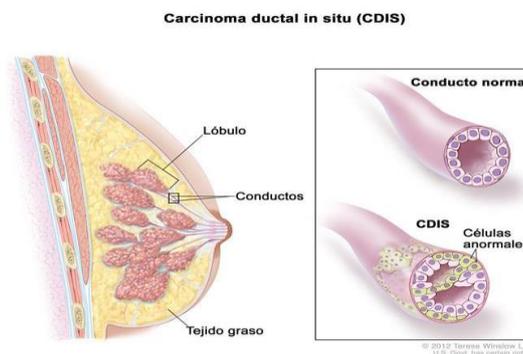


Figura 16. Carcinoma ductal in situ (Fuente: [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov))

- **Cáncer invasivo o infiltrante:** El origen de estos tumores es el mismo que el de los carcinomas in situ, pero en este caso las células cancerosas invaden el tejido circundante, pudiendo llegar a otros órganos. Los más frecuentes son:
  - **Carcinoma lobulillar infiltrante.** Se origina en las glándulas productoras de leche (lóbulos) y es capaz de extenderse hasta otros tejidos. Representa entre el 10 % de los tumores de mama invasivos.
  - **Carcinoma ductal infiltrante (Figura 17).** Se origina en los conductos galactóforos e invade el tejido adiposo de la mama, llegando a producir metástasis. Representa el 80% de los tumores de la mama.

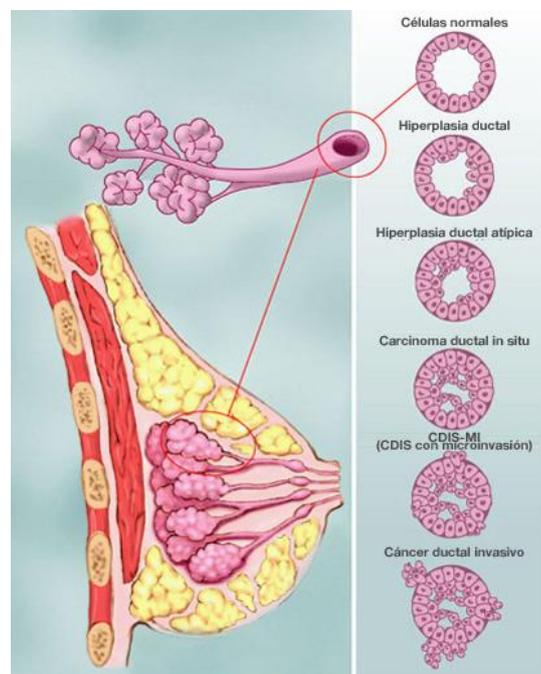


Figura 17. Evolución a carcinoma ductal invasivo (Fuente. [www.breastcancer.org](http://www.breastcancer.org))

Analizado desde el punto de vista molecular, el cáncer de mama se puede clasificar en función de si las células cancerosas presentan receptores de estrógeno y progesterona. Los receptores son proteínas, que se encuentran en el interior de las células o en su superficie a los cuales se unen estas hormonas. Un tumor es receptor de hormonas positivo si al menos el 1% de las células examinadas tienen receptores de estrógeno y/o progesterona. De lo contrario, indicará que el tumor es receptor de hormonas negativo.

Las células tumorales pueden expresar uno, ambos o ninguno de estos receptores y depender de ello su crecimiento. Así identificaremos:

- RE-positivo: células tumorales que presentan receptores de estrógeno. Esos tumores se denominan positivos para receptores de estrógeno (o RE+).
- RP-positivo: células tumorales que presentan receptores de progesterona y se les llama cánceres positivos para receptores de progesterona (o PR+).

También podemos clasificar los tumores de mama en función de la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2), que favorece el crecimiento de las células cancerosas.

Así pues, según las características descritas, el cáncer de mama se ha clasificado en cuatro grupos fundamentales, donde la presencia o no de receptores hormonales y del HER2 son definitivos para la categorización (Uribe et al., 2010):

- Tumores con receptores de estrógenos positivos
  - LUMINAL A: receptor de estrógeno positivo, receptor de progesterona positivo o negativo, HER2 negativo.
  - LUMINAL B: receptor de estrógeno positivo, receptor de progesterona positivo, HER2 positivo.
- Tumores con receptores de estrógeno negativos
  - HER2: receptor de estrógeno negativo, receptor de progesterona negativo, HER2 positivo.
  - TRIPLE NEGATIVO (TNBC) y/o BASAL LIKE: receptor de estrógeno negativo, receptor de progesterona negativo, HER2 negativo.

El origen de los términos luminal y basal se refiere a la ubicación de los tipos de células epiteliales secretoras (lumen interno) o basales (lumen externo), que tienen distintos patrones de respuesta hormonal y expresión génica (Creighton, 2012).

La clasificación molecular de los carcinomas de mama nos sirve, no solo como factor predictivo de la respuesta al tratamiento hormonal y a la quimioterapia, sino que también nos capacita para un mejor pronóstico. Se ha demostrado que los carcinomas de tipo HER2 y Triple negativo presentan características patológicas más desfavorables y menor supervivencia, mientras que los carcinomas de tipo luminal tienen mayor respuesta terapéutica y por lo tanto, mejor pronóstico (Bueno, 2017).

Las principales dificultades que presenta el cáncer de mama triple negativo son su curso agresivo, su naturaleza refractaria al tratamiento y su compleja biología, todo lo cual

plantea verdaderos desafíos para el manejo clínico y para la educación de la paciente. Las enfermeras de oncología deben comprender la complejidad de este subtipo de cáncer de mama porque desempeñan un papel fundamental en la prestación de atención integral y apoyo a la paciente. El cáncer de mama triple negativo representa aproximadamente el 10-15% de todos los cánceres de mama, predomina en las mujeres jóvenes, afroamericanas y en el 80% de las pacientes portadoras de mutaciones en la línea germinal del BRCA1 (cáncer de mama tipo 1, por sus siglas en inglés), el cual es un gen supresor de tumores. Comparado con los subgrupos luminales (que expresan receptores hormonales), existe mayor tasa de recaída con metástasis viscerales y en el Sistema Nervioso Central, en detrimento de metástasis óseas y de partes blandas (cutáneo y ganglionar). También a diferencia de los subgrupos luminales, las recaídas suelen ser tempranas, a los 2-3 años de la cirugía (Korbenfeld, 2009).

### **1.5 Tratamientos para el cáncer de mama**

La heterogeneidad clínica y molecular inherente del cáncer de mama plantea un desafío para los investigadores y los médicos. Como se ha descrito en el apartado anterior(1.4.2) los tumores de mama consisten en varios subtipos patológicos con diferentes presentaciones y resultados clínicos, y las pacientes muestran una amplia gama de respuestas a un tratamiento determinado (Sørli, 2004).

Lo que define a cualquier tejido son los genes que se expresan de manera diferente. La expresión génica se refiere al proceso en el que el ADN se transcribe a ARN y finalmente se traduce a su producto proteico final. La tecnología de microarrays permite la identificación y categorización de cánceres de mama basados en la expresión de genes diferenciales. Se espera que un análisis cuidadoso de estas firmas de expresión génica revele nuevos objetivos para la terapia, permita una mayor personalización de las estrategias de tratamiento y mejore los resultados para pacientes individuales.

Para el tratamiento del cáncer de mama disponemos:

**Biopsia de ganglio centinela.** Si no hay adenopatías la opción recomendada es la biopsia del ganglio centinela, técnica que permite conocer si hay afectación de los ganglios de la axila al identificar el o los primeros ganglios que se afectarían. Su realización evita la cirugía de la axila con lo que se reduce la morbilidad postoperatoria (Cruickshank y Barber, 2019).

**Cirugía.** La opción elegida será individualizada en cada caso. Antes de la intervención la paciente estará informada de las opciones quirúrgicas disponibles, de la posibilidad de precisar radioterapia o nueva cirugía en el caso de que los bordes quirúrgicos no estén libres de tumor. En general en estadios precoces del cáncer la cirugía consiste en la eliminación del tumor mediante lumpectomía (mastectomía parcial para eliminación del tumor) o mastectomía y exéresis de las adenopatías axilares con o sin radioterapia. A continuación, se aplica tratamiento adyuvante sistémico.

**Tratamiento adyuvante.** La quimioterapia adyuvante combinada se recomienda siempre que los beneficios sean superiores a los riesgos. La extensión metastásica a los ganglios axilares constituye un indicador pronóstico determinante para establecer tratamiento sistémico adyuvante. La cirugía y análisis del contenido axilar ayudan a definir el estadio del tumor y a tratar la enfermedad metastásica al eliminarla de la axila. Si existe HER2 positivo el anticuerpo monoclonal trastuzumab debe formar parte del tratamiento adyuvante (Cruickshank y Barber, 2019).

**Radioterapia.** Se recomienda a todas las pacientes tras la cirugía conservadora de un cáncer de mama de presentación reciente y tras una mastectomía, si existen adenopatías y riesgo de recurrencia. En todos los casos de carcinoma ductal tras la cirugía conservadora de mama. Tras la mastectomía y el vaciamiento axilar, la radioterapia reduce la recurrencia y la mortalidad en las mujeres con uno o dos nódulos afectados. La radioterapia tras la cirugía conservadora de la mama reduce y retrasa de manera significativa la recurrencia del cáncer de mama (Bland et al., 2007). La radioterapia implica un ligero incremento del riesgo de linfedema y de limitación para la movilidad del hombro expuesto, esta limitación no tiene efectos tan negativos si se excluye la exposición de la axila. La limpieza axilar se asocia con linfedema significativo del brazo del mismo lado (Cruickshank y Barber, 2019).

**Tratamiento endocrino adyuvante.** Los estrógenos son los encargados de estimular el crecimiento y la diferenciación celular del tejido mamario, los cuales al unirse al receptor de estrógenos activan la transcripción de genes que participan en el control del crecimiento y la proliferación celular. Por ello, la presencia de estos receptores aumenta la probabilidad de desarrollar este tipo de cáncer de mama. Sin embargo, se convierten en el blanco terapéutico y así las mujeres con receptores estrogénicos positivos y cáncer invasivo, en edad de premenopausia, según la Guía para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama en el Principado de Asturias, deben recibir tratamiento con tamoxifeno durante un período mínimo de 5 años o un total de 10 años si no hay contraindicaciones o efectos secundarios. Tras la menopausia en mujeres con receptores estrogénicos

positivos y cáncer de mama precoz se considera el tratamiento con inhibidores de la aromatasas durante 5 años, o bien, un inhibidor de la aromatasas tras dos o tres años de tamoxifeno, hasta un total de 5 años.

### **1.6 Tratamientos para el cáncer de mama triple negativo (TNBC)**

Como se ha descrito anteriormente el cáncer de mama triple negativo es frecuente en las mujeres con pérdida de la función BRCA1. Así mismo, sobreexpresa una proteína llamada ligando 1 de muerte programada (PD-L1, por sus siglas en inglés), la cual es mutagénica y está asociada con un alto nivel de infiltración de linfocitos, implicando alta respuesta inmune, supervivencia de las células cancerosas y metástasis. La presencia de PD-L1 puede favorecer el pronóstico, ya que inhibe los puntos de control inmunológicos, siendo una opción de blanco terapéutico. La infiltración de linfocitos en el tumor (TILs, por sus siglas en inglés) ha sido asociada a los tipos de cáncer más agresivos, pero también con una mejora en la respuesta a la quimioterapia.

El tratamiento no quirúrgico del TNBC se ha limitado a quimioterapia convencional. El único medicamento biológico existente para su tratamiento es el recién aprobado olaparib, inhibidor de la enzima poli (ADP ribosa) polimerasa (PARP, por sus siglas en inglés), encargada de reparar el ADN cuando sufre daños y es útil para portadores de la mutación BRCA1 (Salinas et al., 2018)

#### **1.6.1 Cirugía**

Existen dos opciones de tratamiento quirúrgico: cirugía conservadora (se preserva la mama y generalmente se asocia radioterapia) y cirugía radical (implica la amputación completa de la mama, con o sin radioterapia asociada).

- **Cirugía conservadora**

1.-Tumorectomía amplia: extirpación de una zona de la mama que incluye el tumor con márgenes más o menos amplios, pero siempre libres de tumor. Puede extirparse o no piel.

2.-Cuadrantectomía: extirpación de un cuadrante de la mama incluyendo la piel y la fascia del pectoral mayor.

Ambas opciones anteriores pueden acompañarse de linfadenectomía axilar. En el carcinoma infiltrante es la técnica estándar.

- **Cirugía radical**

1.-Mastectomía Radical Clásica: mastectomía + extirpación de ambos pectorales + linfadenectomía axilar.

2.-Mastectomía Radical Modificada: mastectomía total + linfadenectomía axilar con extirpación del pectoral menor (tipo Patey) o preservando ambos pectorales (tipo Madden). Ambas opciones son válidas y constituyen la técnica quirúrgica de elección cuando se opta por el tratamiento radical.

3.-Mastectomía simple: no incluye linfadenectomía axilar. Opción válida para algunos tumores que no son candidatos a cirugía conservadora, en tumores invasivos en pacientes de edad muy avanzada o con mal estado general y en aquellos casos de alto riesgo en los que se plantea mastectomía profiláctica.

4.-Mastectomía subcutánea o Glandulectomía: extirpación de la mama conservando la piel y el complejo areola-pezones. Según la Guía para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama en el Principado de Asturias (2004), actualmente no es una opción terapéutica.

## **1.6.2 Adyuvantes**

### **1.6.2.1 Radioterapia**

Es un tratamiento considerado eficaz, de baja morbilidad y bien tolerado, cuyo principal objetivo es disminuir la tasa de recurrencia locoregional, por lo que está indicada en las siguientes situaciones (Sánchez et al., 2008)

- Como terapia neoadyuvante facilitando la cirugía conservadora en tumores operables, pero de gran tamaño.
- Como terapia adyuvante post mastectomía cuando existe riesgo elevado de recidiva loco-regional (tumores >5 cm, extensión histológica a piel y músculo), post cirugía conservadora y cuando los ganglios axilares están comprometidos.

### **1.6.2.2 Quimioterapia**

Lo que hace que cualquier cáncer sea agresivo es su incapacidad para reparar mutaciones del ADN y su posterior fracaso para sufrir apoptosis (muerte celular programada). En ese escenario, las células mutadas crecen y se dividen continuamente de manera no regulada, lo que finalmente da como resultado la formación de un tumor. Los agentes que dañan el ADN están diseñados para aprovechar esta característica porque muchos tipos de células cancerosas agresivas carecen por completo de la capacidad de reparación del ADN. Por lo tanto, al inducir daños masivos al ADN, las quimioterapias basadas en platino y antraciclina pueden inducir la muerte generalizada de las células cancerosas que las células normales con mecanismos de reparación del ADN en funcionamiento serían capaces de combatir.

El estándar actual de atención para el manejo del cáncer de mama triple negativo metastásico (mTNBC) es la quimioterapia, aunque ningún agente de quimioterapia está específicamente aprobado para TNBC. En general, el número de ensayos clínicos realizados solo en pacientes con mTNBC es limitado (Li et al., 2019).

En pacientes con enfermedad metastásica o inoperable las opciones de tratamiento han sido principalmente quimioterapias basadas en los enfoques terapéuticos recomendados para el cáncer de mama metastásico (European School of Oncology - Directrices de la Sociedad Europea de Oncología Médica [ESO-ESMO] 2018) (Cardoso et al., 2018). En particular, las antraciclinas, los taxanos, la capecitabina y, más recientemente, la eribulina se usan comúnmente como monoterapia o en combinación con otros agentes. Las antraciclinas y los taxanos se recomiendan, a menos que estén contraindicados, como tratamientos de primera línea para pacientes que no hayan recibido previamente estos agentes como tratamiento neoadyuvante o adyuvante (Cardoso et al., 2018). En los últimos años, hemos asistido a avances significativos en el tratamiento del cáncer de mama, tanto en la enfermedad localizada como en la metastásica. En el tratamiento antineoplásico las antraciclinas fueron el quimioterápico de elección en el cáncer de mama metastásico (A'hern et al., 1993; Fossati et al., 1998), pero su uso se encuentra limitado por su administración en adyuvancia y su potencial toxicidad acumulativa. En la búsqueda de nuevos agentes efectivos y con mejor perfil de tolerancia la aparición de los taxanos supuso un gran avance. La eficacia en monoterapia ha convertido a este grupo de fármacos en uno de los regímenes más efectivos. En general, los tratamientos que incluyen taxanos son superiores a los que no los contemplan, al menos con relación a la tasa de respuesta, y en algunos estudios con relación al tiempo hasta progresión (Gherzi et al., 2005).

Excepto por la aprobación acelerada del uso del atezolizumab más nab-paclitaxel (Schmid et al., 2018) por la Administración de drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) el enfoque recomendado por las pautas ESO-ESMO 2018 (Cardoso et al., 2018) para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo, sigue siendo el uso secuencial de la quimioterapia de agente único, debido a que los regímenes combinados no han prolongado la supervivencia general libre de progresión en comparación con las monoterapias.

Los taxanos son terpenos producidos por plantas del género *Taxus*, como el tejo. El taxano utilizado para la realización de este estudio es el paclitaxel, un fármaco que actúan en los microtúbulos del huso mitótico impidiendo su adecuado funcionamiento, por lo que detienen la mitosis celular (Rowinsky et al., 1992). El paclitaxel fue el primer taxano en demostrar actividad en cáncer de mama. Se identificó en el año 1976 y no se utilizó hasta 1983 en ensayos clínicos. Como agente único, el paclitaxel está indicado en

el tratamiento del TNBC en pacientes que han fracasado, o no son candidatos a la terapia estándar con derivados de antraciclina. Los efectos secundarios de paclitaxel incluyen reacciones de hipersensibilidad, mielosupresión, neuropatía periférica, trastornos del ritmo cardiaco, dolor articular y muscular, náuseas, vómitos y alopecia.

### **1.6.2.3 Hormonoterapia**

Aproximadamente el 10-20% de los cánceres de mama no expresan receptores de estrógeno y progesterona y carecen de amplificación / sobreexpresión del receptor del HER2 (Bauer et al., 2007; Carey et al., 2006; Dent et al., 2007); por lo tanto, se conocen como tumores de mama triple negativo y constituyen un subtipo histológico agresivo. No se espera que los tumores triple negativos (ER-, PR- y HER2-) se beneficien de las terapias dirigidas a receptores como el tamoxifeno o la herceptina (Cheang et al., 2008).

## **1.7 Células madre**

El término célula madre nos remontan al inicio de la vida. Entender el origen, los mecanismos de diferenciación y especialización celular nos ayudan a vislumbrar nuevas posibilidades en el tratamiento de las enfermedades. Joseph Murray, premio Nobel de medicina en 1990 dijo que el desarrollo de la medicina en relación con las estructuras orgánicas se podía sintetizar en las cuatro “R”: retirar, reparar, reemplazar y regenera.

### **1.7.1 Definición y tipos de células madre**

Se define como célula madre aquella célula que es capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse a distintos tipos de células especializadas (Prósper y Verfaillie, 2003). Las células especializadas, como su nombre indica, están destinadas al cumplimiento de una función específica dentro de un sistema celular o tejido.

Las células madre se pueden clasificar según su potencial de diferenciación en:

- Células totipotenciales: son células embrionarias que conforman el blastómero hasta su fase de mórula (8 a 16 células), al tercer y cuarto día después de la fecundación. En esta fase pueden generar cualquier tipo de célula y nuevos organismos.
- Células pluripotenciales: son las células embrionarias que se encuentran en la masa celular interna del blastocisto (60 a 100 células) hasta el día 14 después de la fecundación. En esta fase pueden generar cualquier tipo de células, pero han perdido la capacidad de producir nuevos organismos.

- Células multipotenciales: son células troncales del organismo adulto que, en ciertas circunstancias y condiciones, pueden generar algunos tipos celulares, procedentes de la misma capa embrionaria (Weissman et al., 2001).

También se clasifican de acuerdo a su origen en embrionarias y somáticas o adultas.

- Las células madre embrionarias proceden de un grupo de células, denominado masa celular interna, en un estadio temprano del embrión (fase de blastocisto) y respecto a su potencial son pluripotenciales.
- Las células madre somáticas o adultas son células no diferenciadas que se encuentran en un tejido y cuyo potencial de diferenciación está limitado exclusivamente a uno o varios linajes celulares.

Entre las principales células madre con potencialidad terapéutica se encuentran las embrionarias, las fetales, las amnióticas, las de la sangre del cordón umbilical y las adultas.

Las células madre utilizadas actualmente en terapia celular son las somáticas y se han identificado en la mayoría de los tejidos. Distinguimos:

- Las células madre hematopoyéticas, que proceden de la sangre o de la médula ósea y dan origen a todas las células sanguíneas.
- Las células madre pluripotenciales inducidas, que son células con características embrionarias que se han obtenido mediante la reprogramación de células adultas.
- Las células madre mesenquimales, que son las células madre adultas más ampliamente utilizadas en terapia celular.

### **1.7.2 Células madre mesenquimales**

Las células madre mesenquimales (CMMs) fueron descritas por primera vez en 1968 por A.J. Friedenstein y colaboradores. Se las conoce también como células madre estromales o MSC (por sus siglas en inglés Mesenchymal Stem Cells o Mesenchymal Stromal Cells) y son células con morfología fibroblastoide, originadas a partir de la capa germinal mesodermal, con la capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células.

En el año 2006, en el Congreso de la Sociedad internacional de Terapia Celular, se definieron las características mínimas necesarias para que una célula fuera considerada CMM. Así deben tener capacidad de adherencia al plástico en cultivo, expresar los antígenos de superficie CD73, CD90 y CD105 en ausencia de otros antígenos hematopoyéticos del tipo CD34, CD45, y marcadores típicos de linfocitos B, monocitos y macrófagos. Además deben ser multipotenciales y presentar una alta plasticidad para

diferenciarse *in vitro* bajo condiciones estándares de cultivo a osteoblastos, adipocitos y condrocitos (Dominici et al., 2006). En resumen, las características de las células mesenquimales son: su origen mesodérmico y su morfología similar a los fibroblastos, su capacidad de autorrenovarse, su inmunidad baja y su capacidad de diferenciarse bajo determinadas condiciones hacia células de diferentes linajes.

Las principales fuentes de obtención de células madre mesenquimales son: la médula ósea, el tejido adiposo, el líquido amniótico, la piel, la pulpa dental, el tejido del cordón umbilical y la placenta, el endometrio y la membrana sinovial. De todas ellas, las más relevantes, a pesar de la dificultad para su obtención, son la médula ósea, el tejido adiposo y el tejido del cordón umbilical (Guadix et al., 2017).

Las CMMs actúan como centinelas y reguladores activos en la homeostasis tisular. De hecho, las CMMs tienen un papel regulador en los procesos biológicos básicos, como efectos antimicrobianos, potentes propiedades antiinflamatorias, control de la proliferación celular, apoptosis, angiogénesis o estrés oxidativo. Estas acciones son posibles mediante la secreción de moléculas bioactivas solubles y/o exosomas. Además, se ha informado que en muchas enfermedades degenerativas o autoinmunes (como artritis reumatoide, lupus, diabetes o psoriasis) y en procesos asociados con el envejecimiento, podría haber un agotamiento o mal funcionamiento de estas células. En consecuencia, el concepto de restaurar la función fisiológica normal mediante el uso de CMMs alogénicas ha originado muchas investigaciones en todo el mundo (Vizoso et al., 2019).

Las CMMs son las más utilizadas en terapia celular. A pesar de tener menor potencial proliferativo y menor plasticidad en comparación con las células madre embrionarias, son más fáciles de obtener, no crean problemas éticos para su manipulación y presentan un bajo potencial para la formación de teratomas. Se ha informado que la terapia con CMMs no tiene efectos secundarios desfavorables en el paciente. Su seguridad queda reflejada en una revisión sistemática de varios ensayos clínicos en los que participaron más de 1000 pacientes trasplantados con CMMs intravasculares, en diferentes enfermedades, con un seguimiento de 2 semanas a 30 meses (Lalu et al., 2010; Thompsom et al., 2018).

Por otra parte, este incremento de las aplicaciones clínicas de las CMMs es paralelo a las evidencias crecientes que indican una disfunción o depleción de CMMs en enfermedades sistémicas, como lupus eritematoso sistémico (LES), diabetes mellitus (DM), artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, psoriasis, síndromes mielodisplásicos y envejecimiento (Vizoso et al., 2019)

En la actualidad, la terapia con CMMs ha sido aprobada en diferentes países. Prochymal

fue aprobado en Canadá para tratar la EICH (enfermedad de injerto contra huésped) aguda en niños. En Japón, se aprobó el uso de CMMs después de que se introdujeran la Ley sobre la seguridad de la medicina regenerativa y la Ley de productos farmacéuticos, dispositivos médicos y otros productos terapéuticos (Sipp, 2015). En 2018, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) recomendó el Alofisel aprobado para tratar la enfermedad de Crohn (Sheridan, 2018). En general, parece que el uso de CMMs para la terapia celular se está convirtiendo en una realidad. No obstante, esta terapia ha sido aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en los Estados Unidos, solo en casos excepcionales.

En cuanto a sus posibles indicaciones terapéuticas, tenemos que afrontar el hecho de que las características funcionales de las CMMs dependen de su origen en el organismo humano y de las características del individuo, tales como la edad o las enfermedades asociadas (Chen et al., 2015; Elahi et al., 2016). Esto sugiere que la heterogeneidad de las CMMs refleja la diversidad de entornos presentes en sus nichos naturales del organismo humano. De hecho, los datos existentes sugieren que el efecto de las CMMs sobre el tumor depende del origen de esas células y del tipo de tumor. Así, por ejemplo, por un lado, se ha informado que las CMMs de la médula ósea promueven el crecimiento tumoral de las células de cáncer de páncreas (Saito et al., 2018), osteosarcoma y cáncer gástrico (Qi et al., 2017) y también inducen a las células tumorales mamarias a incrementar su motilidad, capacidad invasiva y metastásica (Karnoub et al., 2007; Ma et al., 2012) ); o que las CMMs derivadas del tejido adiposo inducen metástasis de cáncer de mama (Gonzalez et al., 2017) Sin embargo, se ha demostrado que otras CMMs, como las derivadas de los tejidos reproductivos, tienen efectos antitumorales genuinos. Las CMMs del cordón umbilical muestran una alta tendencia a migrar hacia el tumor e inhibir el crecimiento de tumores sólidos como el de mama (Mirabdollahi et al. 2019; Ma et al. 2012), ovario (Kalamegam et al., 2018) o cérvix uterino (Han et al., 2019). Las CMMs de origen endometrial mostraron efectos antitumorales sobre células de cáncer de ovario (Bu et al., 2016) y en esta línea resultan muy relevantes los hallazgos realizados por el grupo de investigación del Hospital de Jove sobre el efecto antitumoral de las CMMs del cérvix uterino (Eiro et al., 2014).

Inicialmente, se atribuyeron los efectos terapéuticos de las CMMs a su capacidad de injertarse y diferenciarse en los tejidos diana. Sin embargo, varios estudios han revelado que el tiempo de implantación de las CMMs suele ser demasiado corto para tener efecto. En este sentido, se ha demostrado que menos del 1% de las CMMs sobreviven más de una semana después de su administración sistémica, lo que sugiere que los principales efectos de las CMMs son, probablemente, mediados por mecanismos paracrinos. Estudios recientes destacan que la amplia gama de factores bioactivos producidos por las CMMs, pueden jugar un papel importante en la regulación de

numerosos procesos fisiológicos (Eiro et al. 2018).

### **I.7.3 Secretoma de las células madre mesenquimales**

Muchos estudios preclínicos demostraron que las CMMs tienen efectos potencialmente terapéuticos que se deben a los productos secretados por esas células con diversos efectos, principalmente antiinflamatorios (cyclooxygenase 2 (COX2),IDO, óxido nítrico (NO), TGF- $\beta$ 1, PGE2,IDO, o HLA-G5) (Aggarwal y Pittenger, 2005; Selmani et al., 2008) y regenerativos (proteínas inflamatorias (IL-1, 6, 8-11, 13; PGE2/MCP-1), factores de crecimiento (EGF, KGF, TGF- $\beta$ s, HGF, FGF, VEGF, GF-1, PDGF, BDNF, NGF-3, I G-CSF GM-CSF, GM-CSF and PGE2), proteínas ECM (MMP-1, 2, 3, 7, TIPM-1 y 2, ICAM, colágenos, laminina, elastina and decorina)) y angiogénicos VEGF, PDGF, ANG-1 y 2, EGF, FGF, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\alpha$ , MCP-1, CXCL5 and MMPs) (Ahangar et al., 2020; Vizoso et al., 2017). En base a esos datos, además de las aplicaciones clásicas en investigación con CMMs , como la osteogénesis imperfecta (Horwitz et al., 1999), enfermedad de Crohn (Forbes, 2017), accidente cerebro vascular (Lalu et al., 2020), osteoartritis (Migliorini et al., 2020), esclerosis múltiple (Uccelli et al., 2019), fibrosis hepática o enfermedad cardiovascular (Yun y Lee, 2019), están aumentando continuamente las posibles aplicaciones de CMMs y/o su secretoma. El amplio rango de posibles aplicaciones, basado en resultados positivos de estudios preclínicos, incluye alrededor de 1000 ensayos clínicos sobre 10.000 pacientes, en indicaciones tan diversas como defectos músculo-esqueléticos, trastornos del sistema inmunológico incluyendo enfermedades autoinmunes, trastornos óseos, cardíacos, hepáticos, pulmonares, renales o neurodegenerativos (Caplan, 2017; Nery et al., 2013).

Dentro de los componentes del secretoma destacan las vesículas extracelulares, que pueden ser clasificadas como:

- Exosomas (40–150 nm de diámetro), que se originan dentro de la célula en compartimentos endosomales llamados cuerpos multivesiculares.
- Micropartículas (50–1000 nm de diámetro), originadas por la formación de ampollas hacia afuera de la membrana plasmática y la posterior liberación después de la escisión proteolítica del citoesqueleto.
- Cuerpos apoptóticos (500-2000 nm de diámetro), que se liberan durante el proceso de muerte celular programada.

El proceso de biogénesis de los exosomas consta de cuatro fases: iniciación, endocitosis, cuerpos multivesiculares y liberación (Wu et al., 2016).

Los exosomas son partículas de fosfolípidos unidas a la membrana, secretadas por las células que contienen biomoléculas, incluidos factores de crecimiento, citoquinas, lípidos, ADN y diversas formas de ARN. Su conocimiento en general, y especialmente de

los derivados de las CMMs, surge de investigaciones realizadas en los últimos años (Mendt et al., 2019). Los exosomas representan una vía de comunicación intercelular que juega un papel importante en las células de los mamíferos en mecanismos como el intercambio de material genético y la transferencia de moléculas biológicamente activas, así como en la defensa contra el ataque viral (Rosca et al., 2017). De hecho, los exosomas interactúan con las células receptoras por mecanismos que se parecen a los involucrados en la entrada viral. Estos incluyen la unión a los receptores de la superficie para activar las cascadas de señal, la internalización de los exosomas unidos a la superficie y la fusión con la célula para entregar material directamente a la membrana citoplasmática y al citosol (Pitt et al., 2016). Hasta la actualidad, se han identificado en los exosomas de las CMMs más de 850 productos génicos únicos y 150 microRNAs, si bien existe una gran heterogeneidad de su contenido en función del origen de las CMMs (Lai et al., 2016). Los estudios experimentales demuestran el beneficio terapéutico de estos productos en una amplia gama de afecciones o enfermedades (cicatrización de heridas cutáneas, formación de queloides, ojo seco y herida epitelial corneal, uveítis, esclerosis múltiple, insuficiencia hepática aguda, diabetes, neumonía por *E. coli*, lesión renal aguda, infarto de miocardio o lesión muscular) (Vizoso et al., 2017). Además, los exosomas muestran importantes ventajas para su aplicación en terapias. Son más pequeños, menos complejos y menos inmunogénicos que sus células progenitoras, ya que tienen un menor contenido de proteínas unidas a la membrana (Lou et al., 2017). La producción y el almacenamiento de los exosomas son más fáciles que para sus células parentales. Además, otras ventajas de los exosomas incluyen una vida media más prolongada en circulación sanguínea (Kooijmans et al., 2012) y la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (Zhuang et al., 2011). Por todo esto, los exosomas pueden manipularse fácilmente y pueden modificarse con ciertos ligandos o proteínas en su superficie para mejorar su capacidad de focalización. A todo ello tenemos que añadir que las CMMs son el único tipo de célula humana que se sabe que tiene una capacidad escalable para la producción en masa de exosomas para el suministro de fármacos (Yeo et al., 2013). En la actualidad, se ha puesto ya en marcha 92 ensayos clínicos basados en la aplicación terapéutica de exosomas. Estudios preclínicos demostraron la seguridad de los exosomas derivados de las CMMs, siendo posible su producción escalable masiva a dosis clínicamente relevantes (Bagno et al., 2018). Distintos estudios demuestran el interés de los exosomas como terapia potencial en cáncer. Así, por ejemplo, se encontró

que los exosomas derivados de CMMs pueden tener un efecto antiproliferativo e, incluso, inducir un estado de latencia en algunos tumores como el de mama u ovario (Bliss et al., 2016; Ueda et al., 1989).

Por otra parte, los exosomas de las CMMs tienen un interés adicional para terapia oncológica por su trofismo hacia los tumores, comportándose potencialmente como “caballos de Troya”. Se demostró que las células cancerosas internalizan un mayor porcentaje de exosomas en comparación con las células normales (Greco et al., 2016; Smyth et al., 2014). También se comprobó que la internalización de los exosomas por las células cancerosas es 10 veces superior a la de los liposomas de tamaño comparable (Smyth et al., 2014). Además, aunque aún no se conoce bien del todo el mecanismo de trofismo de los exosomas hacia los tumores, es sabido que la condición de poseer un pH ácido incrementa la internalización de los exosomas, y los tumores abrigan un ambiente especialmente ácido (Yang et al., 2019). Esa propiedad de los exosomas ha motivado que se plantee su utilización incluso como vehículos transportadores de factores antitumorales.

#### **I.7.4 Células madre mesenquimales de cuello uterino (hUCESCs)**

El tejido del cuello del útero puede ser utilizado también como fuente de células madre.

##### **I.7.4.1 Anatomía del cérvix**

Histológicamente se ha observado que el cuello del útero o cérvix posee dos partes, el exocérvix y el endocérvix. El exocérvix es la parte externa, más fácilmente visible a través de la vagina y posee un epitelio escamoso estratificado de múltiples capas celulares. El endocérvix no es visible en gran parte porque se encuentra formando el canal endocervical que une el orificio cervical externo con la cavidad uterina y su epitelio es cilíndrico de una única capa celular. Entre ambos existe una zona de unión de los dos epitelios, la unión escamocolumnar (SCJ), también conocida como zona de transformación (de Jesús, 2002). En la zona de transformación (Figura 18) se producen continuos procesos metaplásicos, con el fin de mantener el equilibrio y para protegerse de las agresiones que implica, en el caso del cérvix, la exposición de un epitelio glandular a un medio vaginal hostil.

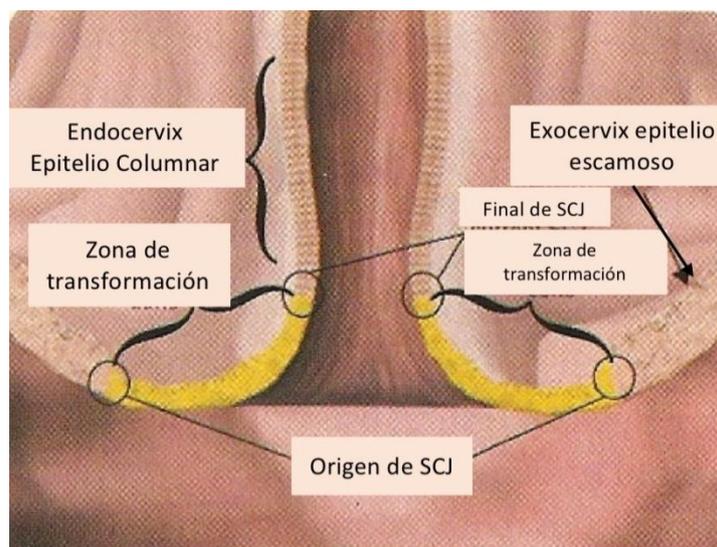


Figura 18. Localización anatómica de la zona de transformación (Fuente: aego.es)

#### 1.7.4.2 hUCESCs

Debido a las características de su nicho anatómico no resulta sorprendente que el cuello de útero humano sea un reservorio de CMMs.

El grupo de investigación de la Fundación Hospital de Jove obtuvo por exfoliación del cérvix uterino, mediante frotis de Papanicolaou, células que caracterizó mediante inmunocitoquímica y citometría de flujo como CMMs y las llamó células madre del cuello uterino humano (hUCESCs, por sus siglas en inglés).

Mediante inmunocitoquímica se comprobó que las hUCESCs expresan vimentina y  $\beta$ -catenina y, en menor medida citoqueratina (clon AE1/AE3), mientras que no expresan actina HHF35, actina de músculo liso, desmina ni E-cadherina. Además, las hUCESCs muestran una intensa expresión de tres factores de transcripción característicos de las células madre embrionarias: KLF4, OCT4 y Sox2. Mediante citometría de flujo, el grupo de investigación del Dr. Vizoso, determinó que las hUCESCs expresan CD29, CD44, CD73, CD90 y CD105, mientras que no expresan el marcador endotelial CD31 ni los marcadores hematopoyéticos CD34, CD45, CD133, ni los marcadores de superficie de células madre embrionarias CD117, HLA-DR ni TRA-1-81. Este fenotipo se observó en diferentes países. El índice de duplicación fue de 1,76 cada 24 horas y además se indujo la diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica, de las hUCESCs, cumpliéndose las características necesarias, determinadas por la Sociedad internacional de Terapia Celular, para que una célula sea considerada CMM (Eiro et al. 2018).

Las hUCESCs presentan dos grandes ventajas respecto a otras CMMs y son: el método de obtención, mínimamente doloroso e invasivo, mediante la exfoliación del cérvix

durante un examen ginecológico de rutina (Eiro et al. 2018) y el gran potencial terapéutico de su secretoma.

#### **1.7.4.3 Potencialidad de las hUCESCs y de su secretoma**

Las hUCESCs son CMMs con capacidad regenerativa y tasa de crecimiento mayor que otras CMMs aisladas de otros tejidos, como el adiposo, y son capaces de mantener su funcionalidad y cariotipo estable al menos diez pases (Eiro et al., 2014). Se ha demostrado que poseen funciones antitumorales, actividad antiinflamatoria y actividad antimicrobiana.

Durante su cultivo, las hUCESCs secretan en el medio de cultivo una gran cantidad de factores (Eiro et al., 2014) y los medios condicionados (MC) originados a partir de cultivos con CMMs tienen un efecto reparador similar al de la implantación de las propias células (Guadix et al., 2017). Esa estrategia evita los problemas derivados de utilizar las propias células madre: se resuelven los problemas de seguridad derivados de la transplatación de células vivas proliferantes, incluyendo la incompatibilidad inmunológica, tumorigenicidad, formación de émbolos, la transmisión de infecciones asociadas con las terapias celulares, y la entrada potencial de las CMMs en senescencia; a diferencia de las terapias celulares, los secretomas pueden ser mejor evaluados en cuanto a su seguridad, dosis y potencia, de forma análoga a los agentes terapéuticos convencionales; los secretomas pueden ser almacenados sin necesidad de la aplicación de agentes criopreservativos potencialmente tóxicos; y la utilización de productos derivados del secretoma, tal como el medio condicionado o los exosomas, es más económica y más práctica para el uso clínico, debido a que el uso del secretoma podría evitar el tiempo y los costes asociados con la expansión y mantenimiento de las líneas celulares clonales, ya que los secretomas para terapias podrían ser preparados anticipadamente en grandes cantidades, y estar disponibles para los tratamientos cuando fuera necesario.

En este sentido el secretoma de las hUCESCs ha mostrado tener diferentes potencialidades:

##### **EFFECTO INMUNOREGULADOR.**

La capacidad antiinflamatoria del medio condicionado de las hUCESCs (MC-hUCESCs) se demostró mediante estudios sobre un modelo *in vivo* de uveítis (Bermudez et al., 2016). El MC-hUCESCs redujo la infiltración de leucocitos y la producción de citoquinas proinflamatorias en un modelo *in vivo* de uveítis. La administración tópica de MC-hUCESCs en ratas con uveítis muestra una baja infiltración leucocitaria similar al

tratamiento con dexametasona, tanto en la retina como en los procesos ciliares, comparado con los ratones no tratados o tratados sólo con el medio de cultivo.

Por otra parte se ha demostrado la capacidad del MC-hUCESCs de inhibir y revertir la diferenciación de monocitos a macrófago (Eiro et al., 2014).

#### EFECTO REGENERATIVO.

El MC-hUCESCs favorece el proceso de regeneración tisular de la córnea en un modelo animal de ojo seco en rata y conejo (Bermudez et al., 2015), permitiendo el cierre de la úlcera de manera más rápida que el tratamiento con gotas oftálmicas usadas actualmente en clínica.

#### EFECTO ANTIMICROBIANO.

El MC-hUCESCs favorece la inhibición del crecimiento bacteriano. Se evidenció *in vitro* el efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* y sobre *Staphylococcus epidermidis*. El análisis del secretoma de la hUCESCs mostró elevados niveles de proteínas que podrían estar involucradas en su efecto antibacteriano (Bermudez et al., 2015).

Por otra parte, el Mc-hUCESCs inhibe el crecimiento de varias cepas sensibles de *Cándida* e inhibe en casi el 80% el crecimiento de *Cándida albicans* en pacientes con candidiasis vaginal crónica resistente al tratamiento (Schneider et al., 2018).

#### EFECTO ANTITUMORAL.

Las hUCESCs tienen potentes efectos antitumorales, que son más pronunciados en tumores altamente proliferantes (Eiro et al., 2014).

Eiro et al. (2014) demostraron que el tratamiento *in vitro* a una línea celular de cáncer de mama altamente invasivo (MDA-MB-231) con MC-hUCESCs disminuye la proliferación celular, modificando el ciclo celular induciendo apoptosis y reduciendo la capacidad de invasión. Así mismo, en un modelo de xenoinjerto de tumor en ratón con inmunodeficiencia combinada, el tratamiento intratumoral con MC-hUCESCs redujo de forma significativa el crecimiento tumoral (Figuras 19 - 20) y se demostró una mayor supervivencia global (Figura 21) (Eiró et al. 2014).

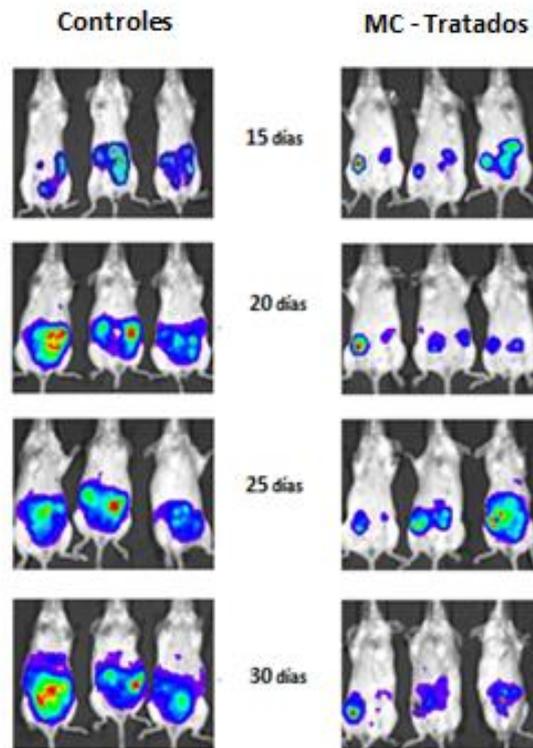


Figura 19. Imágenes representativas del mapa de intensidad de luminiscencia de los ratones tratados intratumoralmente con medio de cultivo (Controles) y con MC-hUCESCs (MC-Tratados) a los 15, 20, 25 y 30 días después de la inyección de células MDA-MB-231 (Fuente: Eiro et al., 2014)

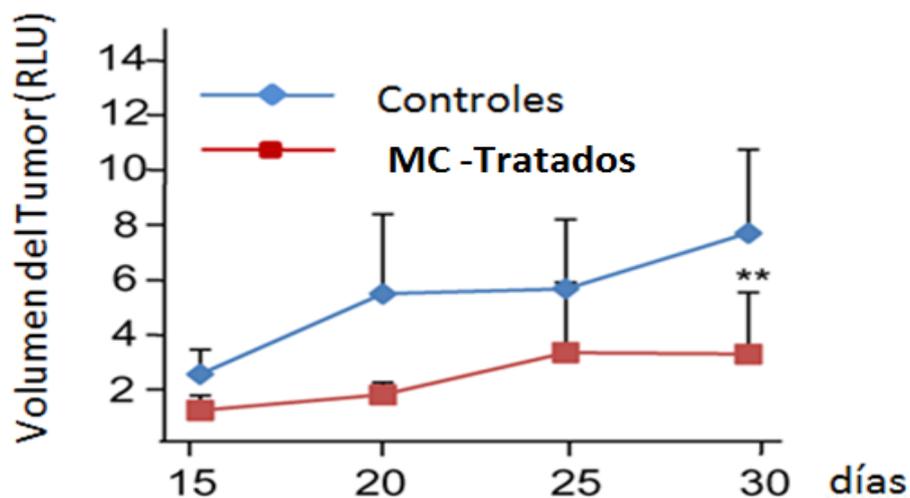


Figura 20. Volumen tumoral medida la luminiscencia después de 15,20,25 y 30 días de tratamiento con MC-hUCESCs (Fuente: Eiro et al., 2014)

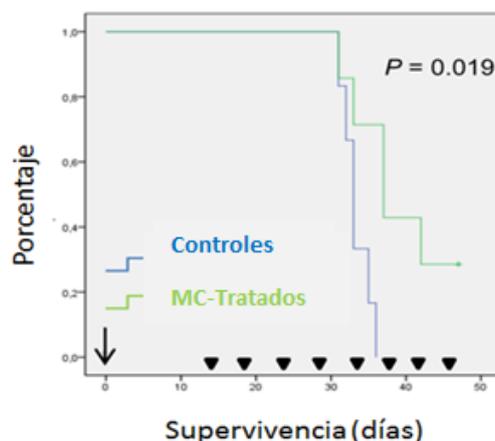


Figura 21. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (Fuente: Eiro et al., 2014)

Además, es sabido que el desarrollo de un tumor maligno está íntimamente relacionado con complejas interacciones entre las células tumorales y el estroma tumoral (Eiro et al., 2014), siendo los dos tipos celulares mejor estudiados los fibroblastos y los macrófagos.

Estudios previos informan de que los fibroblastos y macrófagos promueven el inicio del tumor, la invasión y la aparición de metástasis (Eiro et al., 2014). Respecto al cáncer de mama los fibroblastos no sólo promueven la progresión del tumor, sino que también inducen resistencia terapéutica. En esta línea, la Dra. Eiro y su equipo de investigación estudiaron si el MC-hUCESCs podría actuar sobre el microambiente tumoral, demostrando que el co-cultivo de fibroblastos de tumores con hUCESCs redujo significativamente la proliferación e invasión celular de los fibroblastos, induciendo una apoptosis temprana (Figura 22) (Eiro et al., 2014).

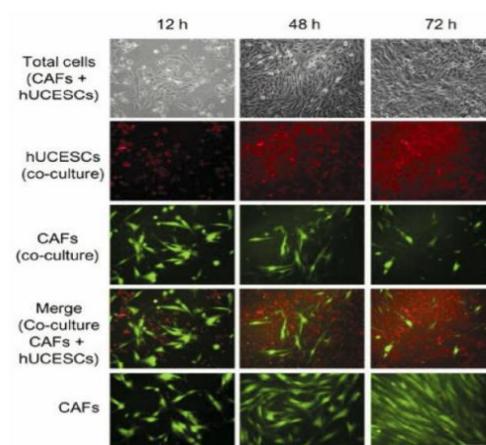


Figura 22. Proliferación celular de los fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) a las 12h, 48h y 72h en co-cultivo con hUCESCs. (Fuente: Eiro et al., 2014)

Además, se demostró que la diferenciación de monocitos a macrófagos se inhibió significativamente con el tratamiento con MC- hUCESCs (Eiro et al. 2014).

En consonancia con todos esos efectos del MC-hUCESCs, se observó que este producto biológico tiene una elevada concentración de factores antitumorales en comparación con el medio control o con el medio condicionado de las células madre del tejido adiposo (MC-ASCs), tales como la proteína LIGHT (o TNFSF14), el FLT3-ligando (FLT3-LG), la proteína 10 inducible por el interferón-gamma (IP-10) y el péptido asociado a la latencia (LAP) (Noemí Eiro et al., 2014). Esos factores han sido asociados con la inducción de apoptosis, inhibición del crecimiento celular o reducción de la invasión tumoral. Por el contrario, los datos indican que, en comparación con el MC-ASC, el MC-hUCESCs contiene muy bajos niveles de factores conocidos como estimuladores del crecimiento tumoral, tales como EGFR, FGF 4 y 9, ICAM3, IL6, IL6R, MCP3, CCL7, MIF, sgp130 y VEGF. Esas diferencias en la composición de ambos medios condicionados, parecen indicar que las propiedades de las CMMs y de sus secretomas varían dependiendo del origen de las mismas. Así pues, parece que los efectos antitumorales de las hUCESCs tienen que ver con su nicho biológico en el organismo humano.

En base a todo lo expuesto anteriormente podemos concluir que el medio condicionado obtenido de las hUCESCs puede constituir una nueva modalidad en la terapia biológica antitumoral (Eiro et al., 2014).

## Hipótesis y Objetivos

## 2. Hipótesis y Objetivos

---

### 2.1 Hipótesis

El cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea desde el punto de vista biológico. Debido a que su pronóstico se encuentra condicionado a la agresividad de las células cancerosas y a las características fenotípicas de las células del estroma tumoral con las que interacciona, debemos plantearnos nuevos enfoques terapéuticos. En este sentido hemos identificado y caracterizado un nuevo tipo de células madre mesenquimales del cérvix uterino (hUCESCs), cuyo producto biológico (medio condicionado/secretoma) (MC-hUCESCs) tiene efectos antitumorales en el cáncer de mama triple negativo, afectando a aspectos básicos como la capacidad proliferativa, el ciclo celular y la capacidad invasiva de las células tumorales.

Una vez demostrado el efecto antitumoral del MC-hUCESCs sobre líneas celulares tumorales de los carcinomas más agresivos de mama (triple negativo), se planteó la posibilidad de un efecto sinérgico entre el MC-hUCESCs y el tratamiento actual de quimioterapia en este tipo de tumores; paclitaxel.

### 2.2 Objetivos

#### Objetivo principal

Investigar *in vitro* el efecto de la combinación de MC-hUCESCs con quimioterapia sobre una línea celular de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231).

#### Objetivos específicos:

- Evaluar *in vitro* el efecto de la combinación de MC-hUCESCs con quimioterapia sobre la **capacidad proliferativa** de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.
- Estudiar *in vitro* el efecto de la combinación de MC-hUCESCs sobre la **capacidad invasiva** de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.

## Material y Método

## 3. Material y Método

---

### 3.1 Cultivo celular

#### 3.1.1 Principio del cultivo celular

El cultivo celular en condiciones controladas es una de las principales técnicas empleadas en los estudios de investigación con células madre, mediante la creación de un ambiente artificial que permite su supervivencia y proliferación. Los requerimientos básicos para que las células crezcan óptimamente son: una temperatura adecuada, un substrato para la adhesión celular, un medio de cultivo apropiado y un incubador que mantenga un pH y una osmolaridad correctas. Es fundamental la selección del medio para el cultivo *in vitro*. En este estudio se ha empleado el DMEM-F12 con glutamina, penicilina y estreptomycin, con 10% de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés), factores de crecimiento epidérmico (EGF, Gibco, LifeTechnologies, Paisley, UK), hidrocortisona (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) e insulina (Gibco, LifeTechnologies).

El DMEM-F12 es un medio de cultivo comercial que ha mostrado ser óptimo para el cultivo de una gran variedad de células. Es un medio basal que no contiene proteínas o agentes que promuevan el crecimiento. Comúnmente, se suplementa con 5 a 10 % de FBS. El FBS provee portadores o quelantes de nutrientes lábiles o insolubles en agua, hormonas, factores de crecimiento e inhibidores de proteasas, además se une y neutraliza sustancias tóxicas.

Durante el cultivo celular utilizamos una campana de flujo laminar vertical para asegurar la esterilidad del proceso, un incubador a 37°C, 90 % de humedad y en ambiente de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Para disgregar el moco cervical de la muestra y posteriormente en cada subcultivo, para romper la unión celular, usamos tripsina 1X (LONZA BEO2-007E).

#### 3.1.2 Realización de un subcultivo

El subcultivo o pase es el trasplante de células de un envase de cultivo a otro. Nos referimos a un nuevo subcultivo o pase cada vez que se tripsinizan las células. La tripsina consigue despegar las células adheridas al plástico, que se van a observar, con forma redondeada, flotando en el líquido de cultivo. En cada pase, se retira el medio de cultivo mediante aspiración y se lava con una solución salina tamponada llamada PBS (phosphate-bufferedsaline), para retirar los restos de FBS, que bloquea la actividad de la tripsina. A continuación, se retira también el PBS, se añade la tripsina y se incuba entre 5 y 7 minutos a 37°C. Posteriormente, se recoge la tripsina con las células ya despegadas y se introduce en un tubo que contiene DMEM-F12 con FBS y se centrifuga 5 min a 400g para conseguir el pellet o botón celular. Después de la centrifugación se obtienen 2

fases, en el fondo del tubo se encuentran las células (botón celular) y el líquido en la superficie. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el botón celular. Una parte (1 ml) se congela y el resto se siembra para seguir con el cultivo.

### **3.1.3 Congelación de células**

Para la congelación se usa de criopreservante el dimetilsulfóxico (DMSO). Las células al congelarse aumentan su densidad con lo que podrían romper su membrana. El DMSO extrae osmóticamente un poco del agua intracelular y mediante un proceso de congelación constante de un grado por minuto se consigue mantener la integridad celular. Así pues, se introduce en un criovial el DMEM-F12 con antibióticos y suero fetal bovino (sin añadir los factores de crecimiento), las células y un 10% de DMSO. El criovial se mete en un enfriador de espuma (que permite la congelación progresiva con descenso de 1°C por minuto) y rápidamente se introduce en el congelador a - 80 °C. Una vez añadido el DMSO hay que actuar con rapidez porque puede ser tóxico y dañar a la célula si no se introduce en el congelador con prontitud.

## **3.2 Secretoma de las MC-hUCESCs**

### **3.2.1 Obtención de la muestra**

La toma de la muestra se realiza mediante el procedimiento habitual de una citología en medio líquido (Figura 23), poniendo especial atención en recoger la muestra de la zona de transformación. El cepillo endocervical (Cervibrush – Jiangsu Yada technology Group Co, LTD) es recto y cilíndrico, se introduce tres cuartas partes en el canal endocervical y se gira no más de 15°. Con este pequeño giro es suficiente ya que tiene cerdas en los 360°, si se gira más, puede provocar sangrado y diluir la muestra.

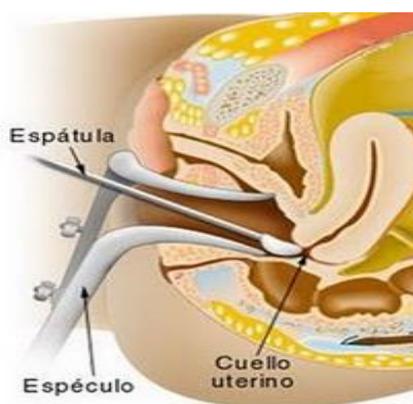


Figura 23. Obtención de la muestra mediante citología (Fuente: <http://histologia-horario2.blogspot.com>)

### **3.2.2 Aislamiento de las células**

Tras la obtención de la muestra se realiza una digestión enzimática de la misma y se centrifuga 5 min a 400 g, el pellet celular es entonces sembrado y cultivado en medio DMEM-F12 con glutamina, suplementado con 10% de FBS 1% de penicilina y estreptomycinina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), hidrocortisona e insulina.

Una vez realizado el aislamiento de las células, se requiere la identificación inequívoca de las mismas. En esta investigación las hUCESCs se caracterizaron mediante citometría de flujo.

### **3.2.3 Caracterización de las células**

Las células pueden caracterizarse en función de su morfología, la expresión de genes o la presencia y/o ausencia de determinadas proteínas en la membrana celular. Las proteínas que se expresan en la membrana celular pueden evaluarse mediante el uso de anticuerpos específicos marcados con un fluoróforo, de tal manera que la presencia e intensidad del marcaje se puede medir con un citómetro de flujo, indicando la presencia y abundancia de dicha molécula en cada una de las células de la población testada.

La citometría de flujo utiliza luz láser para el recuento y clasificación de células en suspensión dentro de una población heterogénea según sus características morfológicas o la presencia de determinados biomarcadores. Las células suspendidas en un fluido atraviesan un tubo transparente de un calibre muy pequeño y sobre este incide un rayo de luz láser. Al pasar este por el pasaje de las células a través del tubo, se dispersará una luz que se recoge mediante unos detectores (Figura 24). A partir de esta información, el sistema informático genera una serie de histogramas y gráficos de dispersión que permiten hacer inferencias en cuanto al tamaño y la complejidad de las células. Para ello, se resuspenden 100.000 células en un volumen de 100 µl de PBS al cual se añade el volumen correspondiente de anticuerpo y se incuba. Posteriormente, las células son lavadas con 300µl de PBS, centrifugadas a 400g durante 5min. Finalmente, se resuspende el botón celular en 300µl de PBS y se analiza en el citómetro de flujo Cytomics FC500 de BeckmanCoulter.

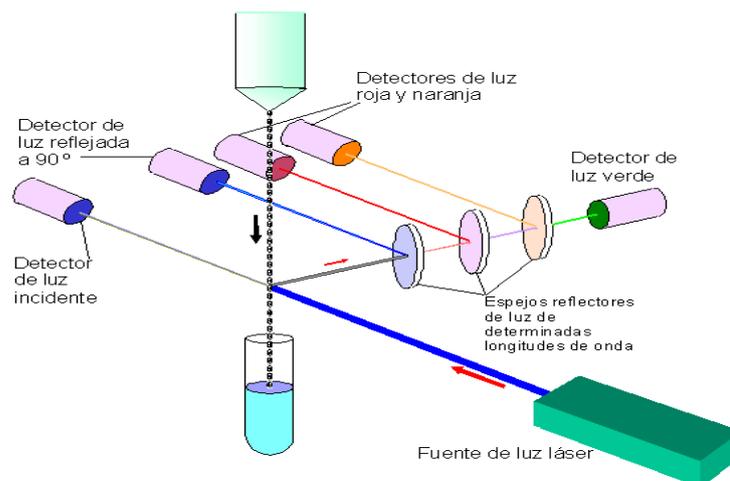


Figura 24. Fundamentos del citómetro de flujo (Fuente: Universidad de Madrid)

En el control negativo no se utiliza ningún anticuerpo y por eso no expresa ningún marcador.

Las células son caracterizadas por citometría de flujo para comprobar la expresión de los marcadores CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105 y CD117 (Tabla 7).

Tabla 7. Anticuerpos utilizados para la caracterización de las hUCESCs mediante citometría de flujo.

Anticuerpo	Casa Comercial	Referencia	Volumen (µL)	Tiempo Incubación (min)	Temperatura (°C)
CD31	BD Biosciencias	555446	10	30	4
CD34	BD Biosciencias	555822	10	30	4
CD44	BD Biosciencias	555479	10	30	4
CD45	BD Biosciencias	555482	10	30	4
CD73	BD Biosciencias	550257	10	30	4
CD90	MACS MiltenyiBiotec	130-114-859	4	30	hielo
CD105	MACS MiltenyiBiotec	130-112-169	4	30	hielo
CD117	BD Biosciencias	332785	10	30	RT

### **3.2.4 Producción del medio condicionado**

El medio condicionado de las hUCESCs (MC-hUCESCs) se obtiene a partir de un cultivo con un 70% de confluencia. Una vez que la confluencia es del 70% en el fondo de la botella de cultivo, se retira por aspiración el medio de cultivo completo y se realizan 3 lavados con PBS (se debe retirar perfectamente todos los restos de suero fetal bovino, antibióticos y factores de crecimiento sin dañar a las células). Se añade medio DMEM-F12 sin FBS durante 48 horas en el incubador a 37°C. Durante ese tiempo las hUCESCs adheridas al fondo de la botella, se multiplican y se relacionan con el medio extracelular secretando sustancias. Transcurridos esos dos días, el medio es recogido y centrifugado 5 min a 400g. El sobrenadante (medio condicionado) es recogido (constituido por el DMEM-F12, cuya composición conocemos, más las sustancias que en él han liberado las hUCESCs) y es utilizado inmediatamente o introducido en tubos de liofilización para su conservación, haciendo dosis de 1 a 5 ml. Las dosis elaboradas se guardan en el congelador a - 80 °C (para liofilizarlas las muestras deben estar previamente congeladas). El liofilizado se puede resuspender en un volumen 1X de agua (igual volumen que el anterior a liofilizar) y/o 2X (2 veces menos volumen, pero 2 veces más concentrado).

## **3.3 Ensayos**

### **3.3.1 Ensayo de proliferación**

Los ensayos de proliferación consisten en ensayos colorimétricos en los que se utiliza un reactivo (WST-1), que permite analizar la actividad de las hidrogenasas mitocondriales mediante la lisis de cloruro de tetrazolio en formazán. Puesto que este proceso únicamente se lleva a cabo en células viables, la cantidad de formazán se relaciona directamente con el número de células metabólicamente activas. Se mide la absorbancia.

Para determinar el efecto del MC-hUCESCs sobre la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231 se realizaron ensayos colorimétricos de proliferación con el reactivo WST-1 (Roche, 05015944001).

Se sembraron en placas de 96 pocillos (Figura 25) la línea celular MDA-MB-231:  $3,5 \times 10^3$  células/pocillo, y se cultivaron 24 horas en medio DMEM-F12 suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina-estreptomina. Posteriormente, se retiró el medio con FBS y se trataron de acuerdo a las siguientes condiciones:

- Control: medio DMEM-F12 sin FBS

- Quimioterapia: paclitaxel (667713.1OH Kabi) a  $1\mu\text{M}$ ,  $3\mu\text{M}$  y  $5\mu\text{M}$
- MC: MC-hUCESCs 1X
- Quimioterapia + MC: paclitaxel a  $1\mu\text{M}$ ,  $3\mu\text{M}$  y  $5\mu\text{M}$  en combinación con MC-hUCESCs 1X.

Los tratamientos fueron realizados por triplicado, en  $100\mu\text{l}$ , y se cultivaron durante 48 horas. Posteriormente, se añadieron  $10\mu\text{L}$  del reactivo de proliferación WST-1 y se incubó durante 4 horas a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . La proliferación se cuantificó mediante la lectura de la placa en un lector de placas: Biorad, iMark™ (Figura 26), midiendo la absorbancia a  $450\text{ nm}$  y sustrayendo el valor de la absorbancia a  $655\text{ nm}$ .

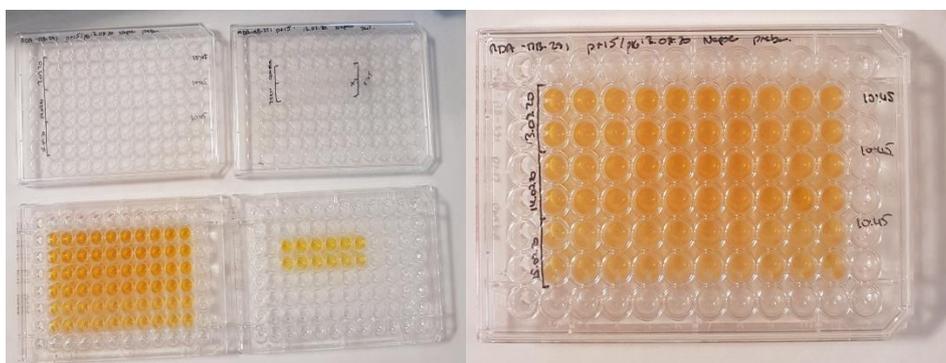


Figura 25. Placas de cultivo celular, ensayo de proliferación celular-WST1 (Fuente: Laboratorio de investigación Hospital de Jove)



Figura 26. Lector de placas: BioRad, iMark™ (Fuente: Laboratorio de investigación del Hospital de Jove)

### 3.3.2 Ensayo de invasión

Para determinar la capacidad invasiva de una línea celular se analiza el número de células que son capaces de atravesar una fina capa de Matrigel (mezcla gelatinosa proteica de membrana basal que polimeriza a temperatura ambiente y se asemeja a la matriz extracelular). Las cámaras de invasión constan de dos compartimentos separados por una membrana de polietileno que permite el paso de células a través de ella.

Para determinar el efecto del MC-hUCESCs sobre la capacidad invasiva de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 se utilizaron cámaras de invasión para placas de 24 pocillos (Corning, BiocoatMatrigel™, 354480) que constan de dos compartimentos separados por una membrana de polietileno tereftalato con poros de 8 μm (Figura 27).

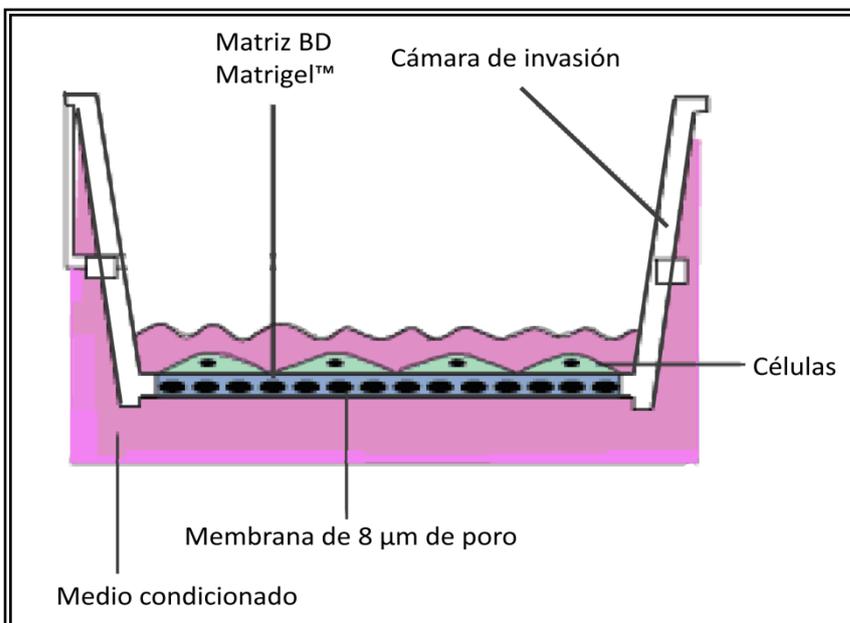


Figura 27. Modelo de ensayo de invasión con BD BiocoatMatrigel™ (Fuente: Adaptación de imagen de docplayer.es Universidad Nacional de Colombia)

En la cámara superior, sobre el Matrigel, se sembró la línea celular MDA-MB-231: 40.000 células en 500μL, en presencia del tratamiento correspondiente y en el compartimento inferior el medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina-estreptomicina.

Los diferentes tratamientos fueron los siguientes:

- Control: medio DMEM-F12 sin FBS
- Quimioterapia: Paclitaxel (667713.1OH Kabi) a 1μM
- MC: MC-hUCESCs 1X

- Quimioterapia + MC: Paclitaxel a  $1\mu\text{M}$  en combinación con MC-hUCESCs 1X  
Los tratamientos fueron realizados por duplicado y se cultivaron durante 48 horas.

Tras la incubación, las células que no habían invadido la membrana se retiraron frotando suavemente con un bastoncillo de algodón, mientras que las células que habían alcanzado la superficie inferior de la membrana se fijaron con metanol absoluto frío durante 20 minutos y posteriormente, se tiñeron con una solución de cristal violeta 0,5% y metanol al 20% durante 30 minutos en oscuridad. Finalmente, se lavaron los insertos en agua destilada y se dejaron secar al aire. Para el recuento celular se utilizó un microscopio invertido a 40x aumentos, en 10 áreas y se contó el número de células con el software *ImageJ* en cada campo.

### **3.4 Estadística**

Para el estudio estadístico de los datos obtenidos se ha utilizado el programa PASW®Statistics 18. En primer lugar, se ha determinado si las poblaciones siguen una distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para valorar los datos obtenidos entre los diferentes grupos en los ensayos de proliferación e invasión, que muestran una distribución normal, se utilizó el test ANOVA (prueba post-hoc de Bonferroni). Todos los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Se establecieron diferencias significativas cuando el p-valor es inferior o igual a 0,05.

## Resultados

## 4. Resultados

### 4.1 Cultivo y caracterización de las hUCESCs

En torno a un millón de células fue caracterizado por citometría de flujo, el resto se mantuvo en subcultivos para la producción del MC-hUCESCs. En la figura 28 se muestra la fotografía de un cultivo de hUCESCs, en la que se observa que las células son adherentes y con morfología fibroblastoide.

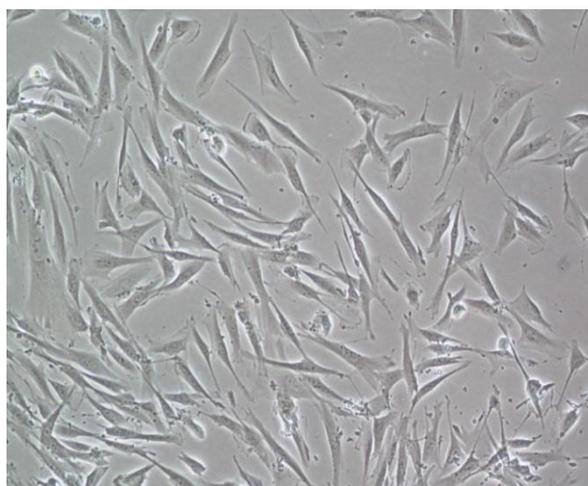


Figura 28. Células en cultivo, hUCESCs (Fuente: Laboratorio de investigación del Hospital de Jove)

Las células caracterizadas expresaron en su superficie los anticuerpos CD44, CD73, CD90, CD105 y no expresaron los marcadores asociados a las células de origen endotelial y hematopoyético: CD31, CD34, CD45, CD117 (Figura 29). Así, se demostró que las células aisladas son células madre mesenquimales de cérvix uterino (hUCESCs).

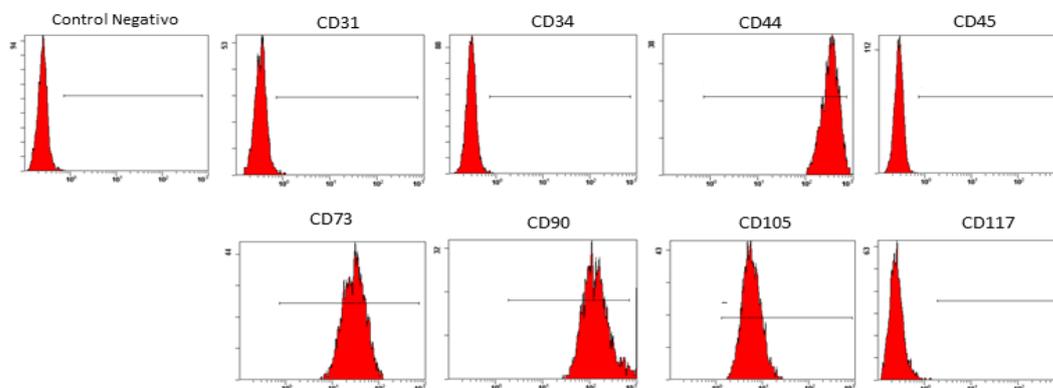
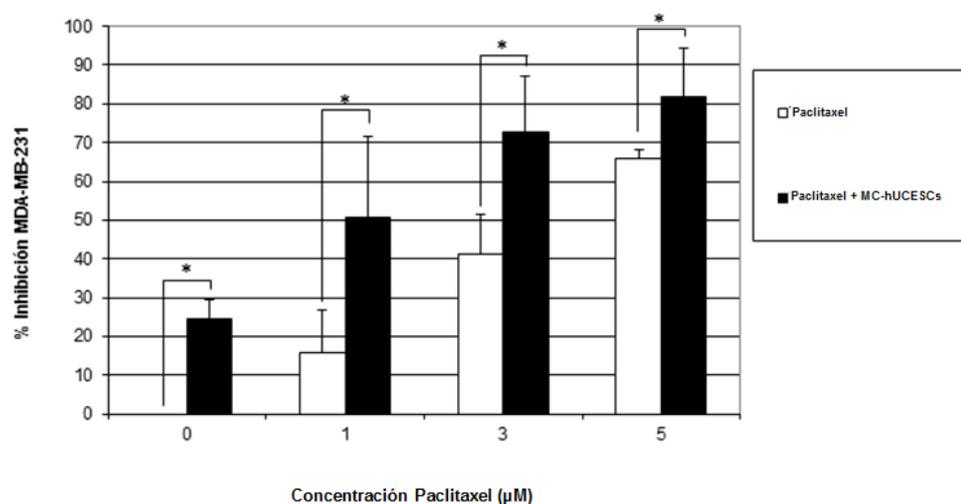


Figura 29. Resultado de la caracterización por citometría de flujo (Fuente: Laboratorio de investigación del Hospital de Jove)

## 4.2 Ensayo de Proliferación

Para determinar el efecto de la quimioterapia (paclitaxel), del medio condicionado (MC-hUCESCs) y de la combinación de ambos sobre la capacidad de proliferación de la línea celular MDA-MB-231, se realizó el análisis de la actividad mitocondrial mediante ensayos colorimétricos de proliferación con el reactivo WST-1.

Los resultados del ensayo de proliferación evidenciaron que el paclitaxel (1 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 5 $\mu$ M) inhibe de forma significativa la proliferación de las células MDA-MB-231, siendo mayor la inhibición a mayor concentración (Figura 30). De la misma manera, el MC-hUCESCs muestra la capacidad de reducir la proliferación de las células MDA-MB-231, pero menor a la mostrada por el Paclitaxel a 3 $\mu$ M y 5 $\mu$ M. Sin embargo, la combinación de ambos tratamientos inhibe la proliferación de las células tumorales, de forma más significativa que sólo con el tratamiento de quimioterapia. Así, el MC-hUCESCs potencia el efecto inhibitorio/citotóxico de la quimioterapia sobre las células tumorales agresivas de cáncer de mama.



**\*P<0,01**

Figura 30. Porcentajes de inhibición de la proliferación de la línea celular MDA-MB-231 expuesta a concentraciones de 0, 1, 3 y 5  $\mu$ M de paclitaxel y paclitaxel +MC-hUCESCs.

### 4.3 Ensayo de Invasión

Para analizar el efecto de la combinación de paclitaxel y MC-hUCESCs sobre la capacidad de invasión de la línea celular tumoral MDA-MB-231 se realizaron ensayos en cámara con Matrigel *in vitro*.

En aquellos casos en los que la línea MDA-MB-231 fue tratada con Paclitaxel o MC-hUCESCs se observó una disminución en el número de células capaces de invadir la matriz, pero esta capacidad invasiva fue aún menor cuando el tratamiento aplicado consistió en la combinación de ambos (Figura 31).

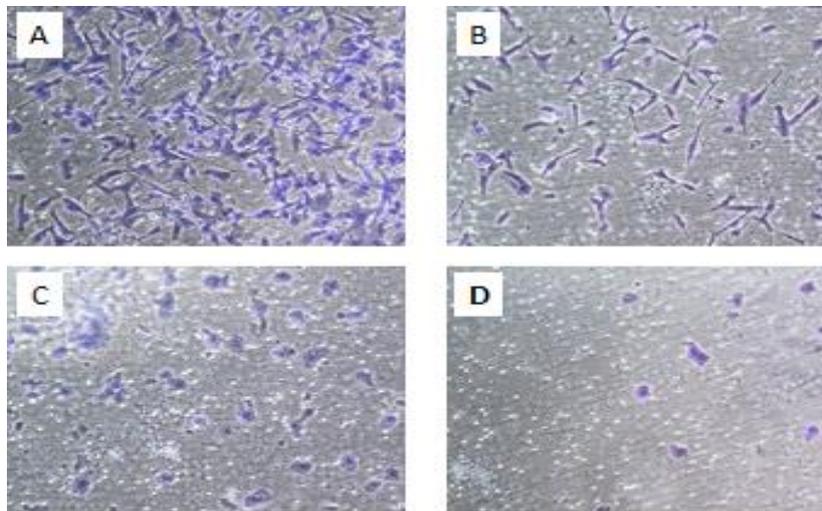
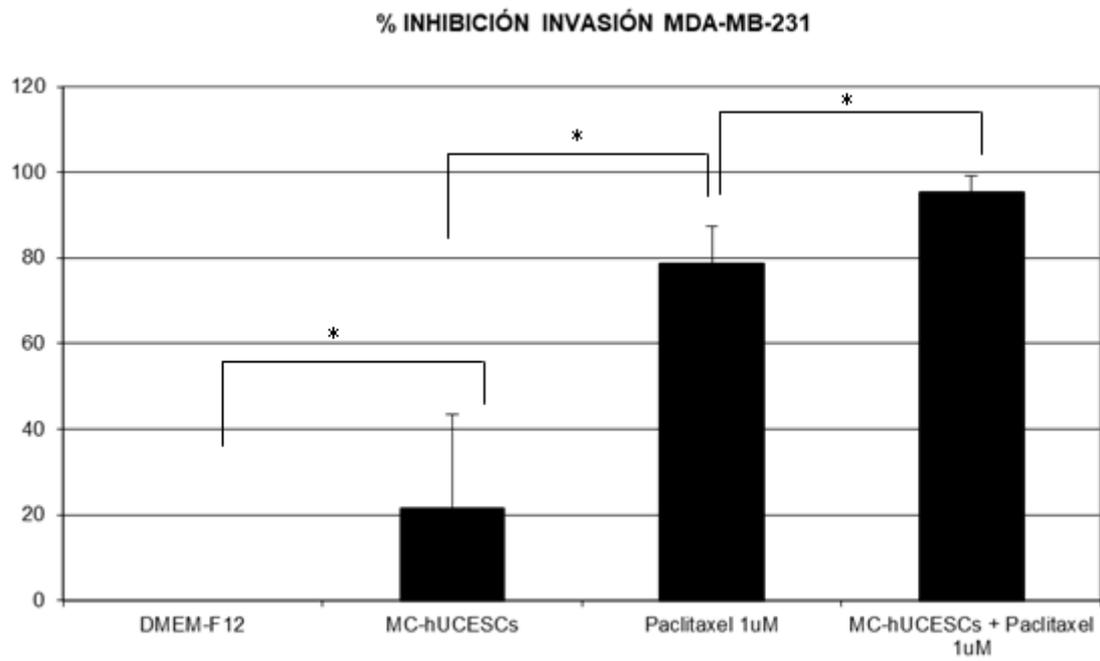


Figura 31. Invasión de la línea celular tumoral MDA-MB-231:  
A: DMEM-F12 (control); B: MC-hUCESCs 1X; C: DMEM-F12 + Paclitaxel a 1  $\mu$ M; D: MC-hUCESCs 1X + Paclitaxel a 1  $\mu$ M.

El posterior análisis estadístico de la capacidad invasiva de la línea tumoral MDA-MB-231 indicó que existen diferencias significativas en la capacidad invasiva dependiendo de si esta línea tumoral es tratada con Paclitaxel, con MC-hUCESCs o con la combinación de ambos ( $p < 0,005$ ) (Figura 32).



**\*p<0.005**

Figura 32. Porcentajes de inhibición en la invasión de la línea celular MDA-MB-231 expuesta a DMEM-F12, al MC-hUCESCs y a concentraciones de 1 µM de Paclitaxel y 1 µM de paclitaxel +MC-hUCESCs.

## Discusión

## 5. Discusión

---

El presente estudio *in vitro* demuestra que el medio condicionado de un tipo especial de CMM obtenidas del cérvix uterino (hUCESCs) muestran un potente efecto antitumoral, que resulta aditivo al efecto del agente quimioterápico Paclitaxel, en la línea celular de cáncer de mama altamente agresiva MDA-MB-231. Esos efectos antitumorales los hemos confirmado en dos procesos básicos de la progresión tumoral, tales como la proliferación y la capacidad invasiva de las células cancerosas. Esos resultados confirman, en parte, observaciones previas sobre el efecto antitumoral del medio condicionado de las hUCESCs (Eiro et al., 2014). Pero, además, extienden el conocimiento sobre la potencialidad anticancerosa de estas células al comprobar que potencian el efecto de la quimioterapia. Ello resulta muy interesante desde dos puntos de vista. Por una parte, los datos *in vitro*, si se extienden a estudios experimentales *in vivo* y ensayos clínicos, pueden contribuir a mejorar las perspectivas de la resistencia a agentes quimioterápicos en cáncer de mama agresivo. Por otra parte, tal como sugieren los resultados, podría ser posible conseguir los mismos efectos anticancerosos utilizando menores dosis de quimioterapia. Esto último supone una gran ventaja, ya que son conocidos los efectos adversos de este tipo de terapias. La quimioterapia es un tratamiento sistémico que destruye las células cancerosas al detener su capacidad de crecer y dividirse. Debido a que, por lo general, las células cancerosas crecen y se dividen más rápidamente que las células normales, son más susceptibles a la acción de estos fármacos. Sin embargo, el daño a las células normales es inevitable y explica los efectos secundarios, tales como: la propensión a tener infecciones, cansancio, dolor, malestar, inapetencia y pérdida de peso.

Las limitaciones del presente estudio derivan de su naturaleza experimental *in vitro*. Pero este tipo de estudios resulta imprescindible para luego abordar los estudios *in vivo* de experimentación animal y poder dar el gran paso a los ensayos clínicos en humanos. Por otra parte, no es suficiente para definir de forma precisa los mecanismos por los que el secretoma de las hUCESCs ejerce sus mecanismos de inhibición de la proliferación y de la capacidad invasiva de las células cancerosas.

Las hUCESCs tienen todas las características que definen a las CMMs, de acuerdo a los criterios universales establecidos por la Sociedad internacional de Terapia Celular en 2006. Así, poseen capacidad de adherencia al plástico en cultivo, simultáneamente expresan marcadores estromales (CD29, CD44, CD73, CD90, y CD105), en ausencia de otros antígenos hematopoyéticos (CD45 y CD14) o endoteliales (CD31 and CD34), y moléculas de superficie HLA-DR. Además, presentan una alta plasticidad para diferenciarse *in vitro*, bajo condiciones estándares de cultivo, a osteoblastos, adipocitos y condrocitos (Dominici et al., 2006).

Las células madres, aunque en cantidades mínimas, están presentes en numerosos tejidos del organismo y participan y controlan la renovación tisular. Así pues, el cérvix uterino representa una nueva fuente de este tipo de células. Clásicamente las más consideradas en estudios de investigación son las CMMs de la médula ósea, del tejido adiposo y del cordón umbilical. Pero en los últimos años han ido incorporándose CMMs de más orígenes, tales como de útero, placenta, líquido amniótico, pulmón, líquido sinovial del cartílago o membrana, amígdala, dermis, músculo esquelético, periostio, pulpa dental del ligamento periodontal o sangre periférica (Vizoso et al., 2017).

Este nuevo tipo de CMM de cérvix uterino (hUCESCs) se obtiene de modo no invasivo y son fáciles de cultivar en grandes cantidades. Más recientemente también han podido obtenerse de piezas de histerectomía de pacientes que se sometieron a cirugía por patologías benignas y no infecciosas. En años recientes, se ha comprobado que el producto biológico derivado de su medio de cultivo, llamado secretoma o medio condicionado (MC-hUCESCs), tiene potentes propiedades antiinflamatorias, regenerativas, antimicrobianas y antitumorales (Eiro et al. 2014; Bermudez et al. 2016; Bermudez et al. 2015; Schneider et al. 2016; 2018; 2019). En relación con este último aspecto, se demostró la eficacia antitumoral del MC-hUCESCs sobre la línea celular de adenocarcinoma de mama humana altamente agresiva MDA-MB-231 y sobre cultivos primarios de cáncer de mama con alta tasa proliferativa. Estos efectos antitumorales incluyen la inhibición de la proliferación celular, la invasión tumoral y la estimulación de la apoptosis (Eiro et al., 2014). Además, la administración intratumoral de MC-hUCESCs indujo una inhibición significativa del crecimiento tumoral *in vivo* en ratones inmunodeficientes transplantados con células MDA-MB-231, aumentando su supervivencia. Por otra parte, estos estudios *in vitro* demostraron importantes efectos potencialmente antitumorales sobre el estroma. El MC-hUCESCs inhibe, e incluso revierte, la transformación de monocitos a macrófagos, limitando así la adquisición de una capacidad fagocítica, la producción de enzimas líticas y secreción de factores protumorales. Así mismo, el MC-hUCESCs inhibe potentemente la proliferación y capacidad invasiva de los fibroblastos asociados a cáncer (Noemí Eiro et al., 2014). En esta línea, resultan también relevantes los datos del presente estudio demostrando que el MC-hUCESCs potencia el efecto antitumoral del paclitaxel en líneas celulares de cáncer de mama, que representa el tratamiento estándar para los carcinomas de mama triple negativos, que son los más agresivos.

La zona de transformación del cuello uterino, de donde son obtenidas las hUCESCs, es una zona crítica, donde se llevan a cabo eventos biológicos cruciales para el bienestar del huésped. En dicha zona, el epitelio endocervical (monocapa) se transforma constantemente en otro de múltiples capas, el epitelio exocervical estratificado, que es más resistente frente a agentes externos. Este proceso constante, llamado metaplasia

escamosa, favorece especialmente la acumulación de mutaciones y el eventual desarrollo de un fenotipo maligno. Por otra parte, la regeneración y la inflamación están estrechamente vinculados en este entorno y constituyen un modelo estándar de la carcinogénesis. Por lo tanto, es razonable considerar que las células madre de esta localización anatómica están en posesión de algunos mecanismos de defensa intrínsecos frente a la vulnerabilidad inherente de la transformación maligna. Podría ser que las hUCESCs actuaran como "guardianes de su entorno" impidiendo que las células adultas adquieran un fenotipo maligno, a través de la modulación de su tasa de proliferación y la inducción de la apoptosis, si llegan a ser peligrosas para el huésped (Schneider et al., 2016). Estos efectos pueden ser mediados por factores liberados al medio por las hUCESCs. En este sentido, es sabido que hasta el 80% del efecto terapéutico de las CMMs se debe a que secretan una amplia gama de factores paracrinos, denominados colectivamente como secretoma. Este término genérico incluye diferentes factores bioactivos, como las moléculas solubles (citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento), pero también vesículas unidas a la membrana que contienen biomoléculas. Además, cabe destacar que tras su liofilización, el MC-hUCESCs mantiene sus propiedades antitumorales, antiinflamatorias y regenerativas, así como las citoquinas y microvesículas relacionadas con esas propiedades (Eiro et al., 2014; Bermudez et al., 2015; Bermudez et al., 2016) lo cual facilita su utilización potencial en el ámbito clínico. Partiendo de la idea de que el efecto pro- o antitumoral de las CMMs depende del origen de las CMMs y del tipo del tumor, los datos existentes parecen converger en que las CMMs de origen uterino y tejidos relacionados con el embarazo tienen un amplio efecto antitumoral, por lo que podrían ser buenas candidatas para terapias oncológicas. De igual manera, los productos derivados del secretoma de las CMMs, tales como los exosomas, pueden representar una buena estrategia terapéutica al evitar los inconvenientes relacionados con las terapias directamente celulares. Una ventaja adicional de esta propuesta es, que esos nuevos productos biológicos pueden tener tropismo hacia los tumores y ser manipulados con objeto de aumentar su efectividad y potencia.

Este estudio está en línea con las nuevas tendencias en medicina regenerativa de utilizar el secretoma de las CMMs en lugar de las propias células.

## Conclusiones

## 6. Conclusiones

---

Las conclusiones de este estudio son:

1. La combinación de la quimioterapia y el MC-hUCESCs muestra un efecto sinérgico inhibitorio de la proliferación de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.
2. El tratamiento combinado de la quimioterapia y el MC-hUCESCs muestra un efecto sinérgico inhibitorio de la capacidad de invasión de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.
3. En base a los resultados obtenidos *in vitro*, podría valorarse el tratamiento combinado de la quimioterapia y el MC-hUCESCs, gracias a su efecto sinérgico, en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas antitumorales.

## Bibliografía

## Bibliografía

---

- Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), 1815-1822. doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559
- Ahangar, P., Mills, S. J., & Cowin, A. J. (2020). Mesenchymal Stem Cell Secretome as an Emerging Cell-Free Alternative for Improving Wound Repair. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7038. doi:10.3390/ijms21197038
- A'Hern, R., Smith, I., & Ebbs, S. (1993). Chemotherapy and survival in advanced breast cancer: the inclusion of doxorubicin in Cooper type regimens. *British Journal of Cancer*, 67(4), 801–805. doi:10.1038/bjc.1993.146
- Bagno, L., Hatzistergos, K. E., Balkan, W., & Hare, J. M. (2018). Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Cardiovascular Disease: Progress and Challenges. *Molecular Therapy*, 26(7), 1610–1623. doi:10.1016/j.ymthe.2018.05.009
- Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. A., & Caggiano, V. (2007). Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype. *Cancer*, 109(9), 1721–1728. doi:10.1002/cncr.22618
- Bermudez, M. A., Sendon-Lago, J., Eiro, N., Trevino, M., Gonzalez, F., Yebra-Pimentel, E., Giraldez, M. J., Macia, M., Lamelas, M. L., Saa, J., Vizoso, F., & Perez-Fernandez, R. (2015). Corneal epithelial wound healing and bactericidal effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56(2), 983-992. doi.org/10.1167/iovs.14-15859
- Bermudez, M. A., Sendon-Lago, J., Seoane, S., Eiro, N., Gonzalez, F., Saa, J., Vizoso, F., & Perez-Fernandez, R. (2016). Anti-inflammatory effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells in uveitis. *Experimental Eye Research*, 149, 84–92. doi:10.1016/j.exer.2016.06.022
- Bermudez MA, Sendon-Lago J, Seoane S, Eiro N, Gonzalez F, Saa J, Vizoso F, Perez-Fernandez R.
- Bland, I. K., Bland, K. I., & Copeland, E. M. (2007). *La Mama/ the Mother: Manejo Multidisciplinario De Las Enfermedades Benignas Y Malignas*. Ed. Médica Panamericana.
- Bliss, S. A., Sinha, G., Sandiford, O. A., Williams, L. M., Engelberth, D. J., Guiro, K., Isenlumhe, L. L., Greco, S. J., Ayer, S., & Bryan, M. (2016). Mesenchymal stem

- cell-derived exosomes stimulate cycling quiescence and early breast cancer dormancy in bone marrow. *Cancer research*, 76(19), 5832-5844. doi:10.1158/0008-5472.can-16-1092
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. doi.org/10.3322/caac.21492
- Bu, S., Wang, Q., Zhang, Q., Sun, J., He, B., Xiang, C., Liu, Z., & Lai, D. (2016). Human endometrial mesenchymal stem cells exhibit intrinsic anti-tumor properties on human epithelial ovarian cancer cells. *Scientific reports*, 6(1), 1-14. doi:10.1038/srep37019
- Bueno, G. A. M. (2017). Características clínicas y pronósticas de los subtipos moleculares de cáncer de mama determinados por inmunohistoquímica. Arequipa, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34, 472-477. doi.org/10.17843/rpmesp.2017.343.2530
- Canby, C. A. (2007). *Anatomía basada en la resolución de problemas* ©2007. Elsevier España.
- Caplan, A. I. (2017). Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem cells translational medicine*, 6(6), 1445-1451. doi:10.1002/sctm.17-0051
- Cardoso, F., Senkus, E., Costa, A., Papadopoulos, E., Aapro, M., André, F., Harbeck, N., Aguilar Lopez, B., Barrios, C. H., Bergh, J., Biganzoli, L., Boers-Doets, C. B., Cardoso, M. J., Carey, L. A., Cortés, J., Curigliano, G., Diéras, V., El Saghir, N. S., Eniu, A., ... Winer, E. P. (2018). 4th ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4)†. *Annals of Oncology*, 29(8), 1634-1657. doi:10.1093/annonc/mdy192
- Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M. A., Tse, C. K., Edmiston, S., Deming, S. L., Geradts, J., Cheang, M. C. U., Nielsen, T. O., Moorman, P. G., Earp, H. S., & Millikan, R. C. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 295(21), 2492-2502. doi:10.1001/jama.295.21.2492
- Carter, C.L., Allen, C. & Henson, D.E. (1989). Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 63(1):181-7. doi: 10.1002/1097-0142(19890101)63:1<181::aid-cnrcr2820630129>3.0.co;2-h.
- Cheang, M. C., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S., McKinney, S., Chia, S. K., Perou, C. M., & Nielsen, T. O. (2008). Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has

- superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clinical cancer research*, 14(5), 1368-1376. doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-1658
- Chen, J.-Y., Mou, X.-Z., Du, X.-C., & Xiang, C. (2015). Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 8(9), 739-746. doi:10.1016/j.apjtm.2015.07.022
- Creighton, C. J. (2012). The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics: targets & therapy*, 6, 289. doi:10.2147/btt.s29923
- Cruickshank, S., & Barber, M. (2019). Breast cancer follow-up after a primary diagnosis: A confused picture. *The Breast*, 46, 97-100. doi:10.1016/j.breast.2019.05.010
- de Jesús Curiel-Valdés, J. (2002). Citología vaginal: La importancia de la zona de transformación y cómo obtener una muestra adecuada. *Gac Méd Méx*, 138(3), 259-265
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., & Narod, S. A. (2007). Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(1), 4429-4434. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-3045.
- Domenech, A., Benitez, A., Bajen, M.T, Ricart, Y., Rodriguez-Gasen, A., Palacin, J.A., Catala, I., Gil, M., Pernas, S., Garcia, A., Martin-Comin, J. (2009)What are the preoperative factors that can determine the presence of metastases in other axillary nodes in breast cancer when the sentinel node is positive?. *Q J NuclMed Mol Imaging*,53(4):422-427.
- Dominici, M., Blanc, K. L., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. doi:10.1080/14653240600855905
- Eiro, N., Saa, J., Sendon-Lago, J., & Bermudez, M. A. (s. f.). *Secretoma de las células madre mesenquimales del cérvix uterino: Propiedades anti-tumorales, antiinflamatorias y regenerativas* « e-notas de Evaluación - Consejería de Sanidad del Principado de Asturias - Revista digital de divulgación y discusión científica. Recuperado 26 de enero de 2020, de <https://www.enotas.es/?resena-investigacion=secretoma-de-las-celulas-madre-mesenquimales-del-cervix-uterino-propiedades-anti-tumorales-antiinflamatorias-y-regenerativas>

- Eiro, N., Fraile, M., Schneider, J., & Vizoso, F. J. (2018). *Non Pregnant Human Uterus as Source of Mesenchymal Stem Cells. Current Stem Cell Research & Therapy*, 13 (6), 423 - 431. doi:10.2174/1381612824666180426120459
- Eiro, N., Sendon-Lago, J., Seoane, S., Bermúdez, M. A., Lamelas, M. L., Garcia-Caballero, T., Schneider, J., Perez-Fernandez, R., & Vizoso, F. J. (2014). Potential therapeutic effect of the secretome from human uterine cervical stem cells against both cancer and stromal cells compared with adipose tissue stem cells. *Oncotarget*, 5(21), 10692-10708. doi:10.18632/oncotarget.2530
- Elahi, K. C., Klein, G., Avci-Adali, M., Sievert, K. D., MacNeil, S., & Aicher, W. K. (2016). Human mesenchymal stromal cells from different sources diverge in their expression of cell surface proteins and display distinct differentiation patterns. *Stem cells international*, 2016, 1–9. doi:10.1155/2016/5646384
- Espinosa Ramírez, M. (2018). Cáncer de mama. *Revista Médica Sinergia*, 2(01), 8-12.
- Forbes, G. M. (2017). Mesenchymal stromal cell therapy in Crohn's disease. *Digestive Diseases*, 35(1-2), 115-122. doi:10.1159/000449091
- Fossati, R., Confalonieri, C., Torri, V., Ghislandi, E., Penna, A., Pistotti, V., Tinazzi, A., & Liberati, A. (1998). Cytotoxic and hormonal treatment for metastatic breast cancer: a systematic review of published randomized trials involving 31,510 women. *Journal of clinical oncology*, 16(10), 3439-3460. doi:10.1200/jco.1998.16.10.3439
- Gherzi, D., Wilcken, N., & Simes, R. J. (2005). A systematic review of taxane-containing regimens for metastatic breast cancer. *British journal of cancer*, 93(3), 293-301. doi:10.1038/sj.bjc.6602680
- Gherzi, D., Wilcken, N., Simes, J., & Donoghue, E. (2005). Taxane containing regimens for metastatic breast cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.cd003366.pub2
- Gonzalez, M. E., Martin, E. E., Anwar, T., Arellano-Garcia, C., Medhora, N., Lama, A., Chen, Y.-C., Tanager, K. S., Yoon, E., & Kidwell, K. M. (2017). Mesenchymal stem cell-induced DDR2 mediates stromal-breast cancer interactions and metastasis growth. *Cell reports*, 18(5), 1215-1228. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.079
- Greco, K. A., Franzen, C. A., Foreman, K. E., Flanigan, R. C., Kuo, P. C., & Gupta, G. N. (2016). PLK-1 silencing in bladder cancer by siRNA delivered with exosomes. *Urology*, 91, 241-e1–241.e7. doi:10.1016/j.urology.2016.01.028

- Guadix, J. A., Zugaza, J. L., & Gálvez-Martín, P. (2017). Características, aplicaciones y perspectivas de las células madre mesenquimales en terapia celular. *Medicina Clínica*, 148(9), 408-414. doi:10.1016/j.medcli.2016.11.033
- Guía para diagnóstico y tratamiento del Cáncer de Mama en el Principado de Asturias. 2004.* Recuperado 4 de febrero de 2020, de <https://www.astursalud.es/noticias>
- Han, K.H., Kim, A.K., Jeong, G.J., Jeon, H. R., Bhang, S. H., & Kim, D. (2019). Enhanced Anti-Cancer Effects of Conditioned Medium from Hypoxic Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells. *International journal of stem cells*, 12(2), 291–303. doi:10.15283/ijsc19002
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Horwitz, E. M., Prockop, D. J., Fitzpatrick, L. A., Koo, W. W., Gordon, P. L., Neel, M., Sussman, M., Orchard, P., Marx, J. C., & Pyritz, R. E. (1999). Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature medicine*, 5(3), 309-313. doi:10.1038/6529
- Hung, W.-K., Chan, M. C.-M., Mak, K.-L., Chong, S.-F., Lau, Y., Ho, C.-M., & Yip, A. W.-C. (2005). Non-sentinel lymph node metastases in breast cancer patients with metastatic sentinel nodes. *ANZ Journal of Surgery*, 75(1-2), 27–31. doi:10.1111/j.1445-2197.2005.03283.x
- Kalamegam, G., Sait, K. H. W., Ahmed, F., Kadam, R., Pushparaj, P. N., Anfinan, N., Rasool, M., Jamal, M. S., Abu-Elmagd, M., & Al-Qahtani, M. (2018). Human Wharton's Jelly Stem Cell (hWJSC) Extracts Inhibit Ovarian Cancer Cell Lines OVCAR3 and SKOV3 in vitro by Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Frontiers in oncology*, 8, 592. doi: 10.3389/fonc.2018.00592
- Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W., Richardson, A. L., Polyak, K., Tubo, R., & Weinberg, R. A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 449(7162), 557-563. doi:10.1038/nature06188
- Kooijmans, S. A., Vader, P., van Dommelen, S. M., van Solinge, W. W., & Schiffelers, R. M. (2012). Exosome mimetics: A novel class of drug delivery systems. *International journal of nanomedicine*, 7, 1525-1541. doi:10.2147/IJN.S29661
- Kopans, D. B. (1994). Caution on core. *Radiology*, 193(2), 325-326; discussion 326-328. doi:10.1148/radiology.193.2.7972737

- Korbenfeld, E. (2009). Características clínicas y tratamiento actual del cáncer de mama subgrupo triple negativo. *Revista Argentina de Mastología*, 28(99), 144-151.
- Lai, R. C., Tan, S. S., Yeo, R. W. Y., Choo, A. B. H., Reiner, A. T., Su, Y., Shen, Y., Fu, Z., Alexander, L., & Sze, S. K. (2016). MSC secretes at least 3 EV types each with a unique permutation of membrane lipid, protein and RNA. *Journal of extracellular vesicles*, 5(1), 29828. doi:10.3402/jev.v5.29828
- Lalu, M. M., McIntyre, L., Pugliese, C., & Stewart, D. J. (2010). Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (MSCs): A systematic review. *D49. CLINICAL TRIALS IN CRITICAL CARE*. doi:10.1164/ajrccm-conference.2010.181.1\_MeetingAbstracts.A6043
- Lalu, M. M., Montroy, J., Dowlathahi, D., Hutton, B., Juneau, P., Wesch, N., Zhang, S. Y., McGinn, R., Corbett, D., & Stewart, D. J. (2020). From the lab to patients: A systematic review and meta-analysis of mesenchymal stem cell therapy for stroke. *Translational stroke research*, 11(3), 345-364. doi:10.1007/s12975-019-00736-5
- Li, C. H., Karantz, V., Aktan, G., & Lala, M. (2019). Current treatment landscape for patients with locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer: A systematic literature review. *Breast Cancer Research : BCR*, 21. doi:10.1186/s13058-019-1210-4
- Lønning, P. E. (2007). Breast cancer prognostication and prediction: are we making progress? *Annals of Oncology*, 18, viii3–viii7. doi:10.1093/annonc/mdm260
- Lou, G., Chen, Z., Zheng, M., & Liu, Y. (2017). Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. *Experimental & molecular medicine*, 49(6), e346-e346. doi:10.1038/emm.2017.63
- Ma, Y., Hao, X., Zhang, S., & Zhang, J. (2012). The in vitro and in vivo effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on the growth of breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*, 133(2), 473-485. doi:10.1007/s10549-011-1774-x
- Martín Gómez, M. T. (2008). *Estudio del flujo de información sobre taxanos en el tratamiento sistémico del cáncer de mama* [Universidad de Salamanca]. doi:10.14201/gredos.22488
- Mejía Rivera, O. (2007). Research with embryo and adult stem cells: Birth of regenerative medicine Scientific perspectives, epistemological perspectives and bioethical dilemma. *Acta Medica Colombiana*, 32(4), 231-244.

- Mendt, M., Rezvani, K., & Shpall, E. (2019). Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use. *Bone marrow transplantation*, 54(2), 789-792. doi:10.1038/s41409-019-0616-z
- Migliorini, F., Rath, B., Colarossi, G., Driessen, A., Tingart, M., Niewiera, M., & Eschweiler, J. (2020). Improved outcomes after mesenchymal stem cells injections for knee osteoarthritis: Results at 12-months follow-up: a systematic review of the literature. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 140(7), 853-868. doi:10.1007/s00402-019-03267-8
- Mirabdollahi, M., Haghjooyjavanmard, S., & Sadeghi-Aliabadi, H. (2019). An anticancer effect of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell secretome on the breast cancer cell line. *Cell and tissue banking*, 20(3), 423-434. doi:10.1007/s10561-019-09781-8
- Nery, A. A., Nascimento, I. C., Glaser, T., Bassaneze, V., Krieger, J. E., & Ulrich, H. (2013). Human mesenchymal stem cells: From immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytometry Part A*, 83(1), 48-61. doi:10.1002/cyto.a.22205
- Pitt, J. M., Kroemer, G., & Zitvogel, L. (2016). Extracellular vesicles: Masters of intercellular communication and potential clinical interventions. *The Journal of clinical investigation*, 126(4), 1139-1143. doi:10.1172/jci87316
- Prósper, F., & Verfaillie, C. M. (2003). Células madre adultas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26(3), 345-356. doi:10.4321/s1137-66272003000500002
- Qi, J., Zhou, Y., Jiao, Z., Wang, X., Zhao, Y., Li, Y., Chen, H., Yang, L., Zhu, H., & Li, Y. (2017). Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth through hedgehog signaling pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 42(6), 2242-2254. doi:10.1159/000479998
- Rosca, A.-M., Moustafa, D., & Tutuianu, R. (2017). Emerging role of stem cells-derived exosomes as valuable tools for cardiovascular therapy. *Current stem cell research & therapy*, 12(2), 134-138. doi:10.2174/1574888x10666151026115320
- Rosen, P. P., Groshen, S., & Kinne, D. W. (1991). Prognosis in T2N0M0 stage I breast carcinoma: a 20-year follow-up study. *Journal of Clinical Oncology*, 9(9), 1650-1661. doi:10.1200/jco.1991.9.9.1650
- Rowinsky, E. K., Onetto, N., Canetta, R. M., & Arbusk, S. G. (1992). Taxol: The first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. *Seminars in oncology*, 19, 646-662.

- Saito, K., Sakaguchi, M., Maruyama, S., Iioka, H., Putranto, E. W., Sumardika, I. W., Tomonobu, N., Kawasaki, T., Homma, K., & Kondo, E. (2018). Stromal mesenchymal stem cells facilitate pancreatic cancer progression by regulating specific secretory molecules through mutual cellular interaction. *Journal of Cancer*, 9(16), 2916–2929. doi:10.7150/jca.24415
- Salinas, A., Serrano, B., Soto, A. G., Valenciano, S., & Mora, Juan José. (2018). Cáncer de mama triple negativo: Generalidades, situación en Costa Rica y nuevas tendencias para su tratamiento. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica*, 12(2). doi:10.15517/rmucr.v12i2.36232
- Sanchez, R., Schneider, E., Martinez, G., Fonfach, C., (2008). Cáncer de mama Modalidades terapéuticas y marcadores tumorales. *Cuadernos de Cirugía*, 22 (1), 55-63. doi:10.4206/cuad.cir.2008.v22n1-09
- Schmid, P., Adams, S., Rugo, H. S., Schneeweiss, A., Barrios, C. H., Iwata, H., Diéras, V., Hegg, R., Im, S.-A., Shaw Wright, G., Henschel, V., Molinero, L., Chui, S. Y., Funke, R., Husain, A., Winer, E. P., Loi, S., Emens, L. A., & IMpassion130 Trial Investigators. (2018). Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 379(22), 2108-2121. doi:10.1056/NEJMoa1809615
- Schneider, J., Eiro, N., Perez-Fernandez, R., Martinez-Ordonez, A., & Vizoso, F. (2016). Human Uterine Cervical Stromal Stem Cells (hUCESCs): Why and How they Exert their Antitumor Activity. *Cancer Genomics-Proteomics*, 13(5), 331-337.
- Schneider, J., Mateo, E., Marcos-Arias, C., Eiro, N., Vizoso, F., Pérez-Fernández, R., Eraso, E., & Quindós, G. (2018). Antifungal Activity of the Human Uterine Cervical Stem Cells Conditioned Medium (hUCESC-CM) Against *Candida albicans* and Other Medically Relevant Species of *Candida*. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.02818
- Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., Borg, C., Saas, P., Tiberghien, P., & Rouas-Freiss, N. (2008). Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Stem cells*, 26(1), 212-222. doi:10.1634/stemcells.2007-0554
- Sheridan, C. (2018). *First off-the-shelf mesenchymal stem cell therapy nears European approval*. *Nature Biotechnology*, 36(3), 212–214. doi:10.1038/nbt0318-212<sup>a</sup>
- Sierra, G. (2006). *Cirugía de La Mama*. Arán Ediciones.

- Sipp, D. (2015). Conditional approval: Japan lowers the bar for regenerative medicine products. *Cell Stem Cell*, 16(4), 353-356. doi:10.1016/j.stem.2015.03.013
- Smyth, T. J., Redzic, J. S., Graner, M. W., & Anchordoquy, T. J. (2014). Examination of the specificity of tumor cell derived exosomes with tumor cells in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(11), 2954-2965. doi:10.1016/j.bbamem.2014.07.026
- Sørli, T. (2004). Molecular portraits of breast cancer: Tumour subtypes as distinct disease entities. *European journal of cancer*, 40(18), 2667-2675. doi:10.1016/j.ejca.2004.08.021
- Thomson, M., Wolfe, D., Champagne, J., Mei, S. H., Lalu, M., Fergusson, D., Winston, B., Marshall, J., Walley, K., & English, S. (2018). Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells): An updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials (safecell update). *Cytotherapy*, 20(5), S53-S54. doi:10.1016/j.jcyt.2018.02.146
- Uccelli, A., Laroni, A., Brundin, L., Clanet, M., Fernandez, O., Nabavi, S. M., Muraro, P. A., Oliveri, R. S., Radue, E. W., & Sellner, J. (2019). MEsenchymal StEm cells for Multiple Sclerosis (MESEMS): A randomized, double blind, cross-over phase I/II clinical trial with autologous mesenchymal stem cells for the therapy of multiple sclerosis. *Trials*, 20(1), 1-13. doi:10.1186/s13063-019-3346-z
- Ueda, G., Shimizu, C., Saito, J., Tanaka, Y., Inoue, M., & Tanizawa, O. (1989). An immunohistochemical study of colon-ovarian tumor antigen and colon-specific antigen in gynecologic tumors. *Gynecologic oncology*, 35(1), 90-92. doi:10.1016/0090-8258(89)90019-x
- Uribe, J. R., Hernández, C. A., Menolascino, F., Rodríguez, J. E., Istúriz, L. M., Márquez, M. E., Rodríguez, R. E., & Uribe, J. L. (2010). Clasificación molecular del cáncer de mama y su correlación clínica. *Revista Venezolana de Oncología*, 22(2), 109-116.
- Vizoso, F., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. (2017). Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International journal of molecular sciences*, 18(9), 1852. doi:10.3390/ijms18091852
- Vizoso, F., Eiro, N., Costa, L., Esparza, P., Landin, M., Diaz-Rodriguez, P., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. (2019). Mesenchymal Stem Cells in Homeostasis and Systemic Diseases: Hypothesis, Evidences, and Therapeutic Opportunities. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3738. doi:10.3390/ijms20153738

- Weissman, I. L., Anderson, D. J., & Gage, F. (2001). Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17(1), 387-403. doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.387
- Wu, L., Zhang, X., Zhang, B., Shi, H., Yuan, X., Sun, Y., Pan, Z., Qian, H., & Xu, W. (2016). Exosomes derived from gastric cancer cells activate NF-κB pathway in macrophages to promote cancer progression. *Tumor Biology*, 37(9), 12169-12180. doi:10.1007/s13277-016-5071-5
- Yang, Q., Yao, Y., Li, K., Jiao, L., Zhu, J., Ni, C., Li, M., Dou, Q. P., & Yang, H. (2019). An Updated Review of Disulfiram: Molecular targets and strategies for cancer treatment. *Current pharmaceutical design*, 25(30), 3248-3256. doi:10.2174/1381612825666190816233755
- Yeo, R. W. Y., Lai, R. C., Zhang, B., Tan, S. S., Yin, Y., Teh, B. J., & Lim, S. K. (2013). Mesenchymal stem cell: An efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 65(3), 336-341. doi:10.1016/j.addr.2012.07.001
- Yun, C. W., & Lee, S. H. (2019). Enhancement of functionality and therapeutic efficacy of cell-based therapy using mesenchymal stem cells for cardiovascular disease. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 982. doi:10.3390/ijms20040982
- Zadnik, V., Mihor, A., Tomsic, S., Zagar, T., Bric, N., Lokar, K., & Oblak, I. (2020). Impact of COVID-19 on cancer diagnosis and management in Slovenia—Preliminary results. *Radiology and Oncology*, 54(3), 329-334. doi:10.2478/raon-2020-0048
- Zhuang, X., Xiang, X., Grizzle, W., Sun, D., Zhang, S., Axtell, R. C., Ju, S., Mu, J., Zhang, L., & Steinman, L. (2011). Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Molecular Therapy*, 19(10), 1769-1779. doi:10.1038/mt.2011.164