



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A. C.**

**PROPIEDADES BIOFÍSICAS DE LAS VESÍCULAS
EXTRACELULARES PLASMÁTICAS DE MUJERES CON
CÁNCER DE MAMA NO METASTÁSICO EN RELACIÓN CON
SU DENSIDAD MINERAL ÓSEA**

Por:

Carlos Daniel Coronado Alvarado

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Carlos Daniel Coronado Alvarado la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dr. Humberto Astiazarán García
Director de tesis



Dra. Rosa Olivia Méndez Estrada
Integrante del comité de tesis



Dra. Elizabeth Carvajal Millán
Integrante del comité de tesis



Dr. Humberto González Ríos
Integrante del comité de tesis

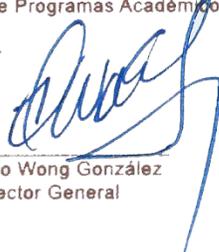
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Propiedades Biofísicas de las Vesículas Extracelulares Plasmáticas de Mujeres con Cáncer de Mama no Metastásico en Relación con su Densidad Mineral Ósea” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Carlos Daniel Coronado Alvarado, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo que me proporcionó durante el periodo en el cual cursé mis estudios de maestría. De igual forma, agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo por permitirme ser un egresado más de su programa de maestría en ciencias y brindarme las facilidades para conseguir dicha meta, incluso durante los tiempos de pandemia en los cuales tuvimos que adaptarnos a una nueva normalidad.

Quiero dirigir un agradecimiento muy especial para mi director de tesis, Dr. Humberto Astiazarán, que me apoyó en todo momento desde el día que le comenté mi interés por estudiar este posgrado y que me brindó grandes enseñanzas sobre el proceso científico, pero también sobre como ser una mejor persona. Gracias por todo, doctor.

Agradezco también a cada uno de mis asesores de tesis, Dra. Rosa Olivia Méndez, Dra. Elizabeth Carvajal y Dr. Humberto González, por todas sus contribuciones que enriquecieron este trabajo y por siempre mostrar su mejor disposición para ayudarme en lo que necesitara. Agradezco enormemente a todo el comité de tesis por apoyarme en cada uno de los distintos proyectos que les presenté y por siempre mostrarse comprensivos ante los cambios que se debieron realizar por la difícil situación sanitaria en la cual se desarrolló este proyecto.

A la Dra. Ana Teresa Limón, le doy las gracias por brindarnos acceso a la información que requerimos para la realización de este proyecto y mostrar un sincero entusiasmo por el mismo desde el inicio. Le ofrezco mi gratitud y reconocimiento a cada una de las voluntarias que aceptaron participar en este proyecto y que, a pesar de estar viviendo momentos de gran dificultad en su vida, decidieron contribuir desinteresadamente con el avance de la ciencia.

Quiero agradecer a todos los integrantes del laboratorio de Patología Experimental por recibirme con los brazos abiertos y hacerme sentir integrado desde el primer momento que crucé la puerta del laboratorio. A Berthita, Orlando, Zehiram, Jaime, Jessica y Cristina, por todos los consejos, sugerencias y enseñanzas que me brindaron cada vez que los necesité; y especialmente a Hermi quien me compartió muchas enseñanzas del laboratorio y de la vida, y con quien compartí muchas experiencias y aventuras a lo largo de mi posgrado, muchas gracias, los quiero y estimo mucho a todos. También extendo un profundo agradecimiento al grupo de investigación en biopolímeros

del CIAD, en especial al Dr. Jaime Mendoza Lizardi y a la M. en C. Yubia De Anda, por facilitarnos su equipo y apoyarnos durante la medición y análisis de nuestros resultados.

Agradezco a cada uno de los profesores que me dieron clases y que compartieron sus conocimientos conmigo y mis compañeros. Especialmente a las doctoras Ana María Calderón de la Barca, Gabriela Ramos Clamont Montfort y Graciela Caire Juvera, por sus enseñanzas y apoyo durante mi posgrado, muchas gracias. También agradezco a mis compañeros de clases con quienes viví uno de los momentos más extraños de toda mi formación académica al tener que migrar de un día para otro a las plataformas virtuales, y quienes contribuyeron a mi aprendizaje en las clases de seminario con sus preguntas y aportaciones. Particularmente les doy las gracias a Adriana, Arely, Dina, Paulina, Adelmo, Alex, Valeria, Esmeralda, Chema y Abraham, quienes entre reuniones de estudio, risas, llantos y favores me brindaron su amistad.

Le doy las gracias a mi familia, que siempre estaré agradecido por su apoyo y las porras que siempre me echan en cada meta que me propongo. Por siempre preocuparse y estar pendiente de mí incluso cuando ando absorto en mis proyectos. Los amo y siempre agradeceré a Dios por haberme destinado a ser uno de ustedes.

Agradezco enormemente a mis amigos que siempre me demuestran que también son mi familia y que puedo contar con ellos para lo que sea. A Ilse por empujarme primero que nadie al camino de la ciencia. A Giselle, Damaris, Cristina, Paulina, Esmeralda y Janet, por siempre creer en mí y demostrarme su afecto. A Nubia, Gabo, Cinthia y Marco por aportarme siempre su buen humor. Y sobre todo a Ángel y Hazel quienes fueron mis principales pilares durante este periodo de mi vida. Los quiero mucho a todos y nunca tendré palabras para demostrar toda la gratitud que siento por ustedes.

Finalmente, agradezco a Dios por poner a cada una de estas personas en mi camino, por siempre guiarme e indicarme el camino que debo seguir y por haberme dado la salud, la capacidad y la voluntad necesarias para concluir esta etapa. Gracias por todo.

DEDICATORIA

A todas las personas que de una u otra manera combaten al cáncer y a todos aquellos que perdieron su vida en la batalla, esperando que algún día logremos domar esta terrible enfermedad.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	17
2.1. Pronóstico Clínico en el Cáncer de Mama	17
2.2. Relación Entre el Tejido Óseo y el Cáncer de Mama	21
2.2.1. Histología Funcional del Hueso	21
2.2.2. Factores que Afectan a la Resistencia Ósea en el Cáncer de Mama	22
2.2.3. Metástasis Óseas en el Cáncer de Mama	24
2.3. Vesículas Extracelulares como Potenciales Biomarcadores	27
2.3.1. Vesículas Extracelulares como Potenciales Biomarcadores de Metástasis Óseas en el Cáncer de Mama	29
2.3.2. Importancia de las Propiedades Biofísicas de las Vesículas Extracelulares.....	31
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	36
4.1. Objetivo General.....	36
4.2. Objetivos Específicos.....	36
5. VOLUNTARIAS, MATERIALES Y MÉTODOS	37
5.1. Voluntarias.....	37
5.2. Obtención de Datos Clínicos	38
5.3. Análisis de Composición Corporal	39
5.4. Análisis de Vesículas Extracelulares	39
5.5. Análisis Estadísticos.....	41
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
6.1 Cambios en Composición Corporal tras la Intervención Nutricional Clínica.....	46
6.2 Resultados de Densitometría Ósea.....	50
6.3 Parámetros Biofísicos de Vesículas Extracelulares	54
6.4 Asociación entre Resultados de Densitometría Ósea y Parámetros Biofísicos de las Vesículas Extracelulares	56

CONTENIDO (continuación)

6.5 Asociación entre Parámetros Biofísicos de las Vesículas Extracelulares y Características de la Neoplasia	59
7. CONCLUSIONES	64
8. RECOMENDACIONES	65
9. BIBLIOGRAFÍA	66

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. El ciclo vicioso de las metástasis óseas	26
2. Clasificación y biogénesis de las vesículas extracelulares.....	28
3. Protocolo de aislamiento y análisis de vesículas extracelulares.....	40
4. Diagrama CONSORT del estudio	46
5. Cambios en los puntajes T de las tres regiones anatómicas de las voluntarias posmenopáusicas tras los primeros 6 meses de tratamiento	54

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificaciones de los carcinomas mamarios	19
2. Características clínicas y socioeconómicas de las voluntarias al inicio de la intervención	44
3. Comparación en los parámetros de composición corporal y hábitos saludables antes y después de la intervención (n=16).....	47
4. Comparación de los resultados de densitometría ósea antes y después de la intervención según el estado menopáusico.....	51
5. Parámetros biofísicos de las vesículas extracelulares aisladas de muestras de plasma obtenidas antes y después de la intervención	55
6. Modelos de regresión lineal de efectos mixtos para la predicción de resultados de densitometría.....	58
7. Modelos de regresión lineal de efectos mixtos para la predicción de parámetros biofísicos de vesículas extracelulares.....	61

RESUMEN

El hueso suele ser el sitio más afectado por las recurrencias metastásicas en el cáncer de mama. Actualmente, no existen biomarcadores para detectar estas lesiones de forma oportuna, en parte porque aún no se comprenden los mecanismos precisos por los cuales se desarrollan. Uno de los factores biológicos más prometedores para explicar este proceso son las vesículas extracelulares (VE), por su capacidad de transportar mensajes moleculares de un sitio anatómico a otro. Se ha propuesto que los parámetros biofísicos de las VE podrían afectar su captación, pero aun es necesario caracterizar estos parámetros en diferentes contextos clínicos, así como su relación con otras variables fisiológicas para comprenderlas mejor. En este trabajo se evaluó la asociación entre los resultados de densitometría ósea y el potencial zeta, tamaño y porcentaje de intensidad de las poblaciones de VE plasmáticas de mujeres con cáncer de mama no metastásico.

Para ello, se recuperaron muestras plasmáticas almacenadas de 16 pacientes con cáncer de mama que participaron en otro estudio donde recibieron una intervención nutricional durante los primeros seis meses de tratamiento antineoplásico. Dichas muestras fueron recolectadas al inicio y al final de la intervención. A partir de ellas se aislaron las VE empleando el kit de precipitación ExoQuick® y se caracterizaron sus parámetros biofísicos mediante dispersión dinámica de luz y dispersión de luz electroforética. Las asociaciones entre las variables de interés fueron evaluadas mediante modelos de regresión lineal de efectos mixtos.

Se encontró una asociación significativa entre las siguientes variables: el diámetro hidrodinámico medio de las poblaciones de VE grandes con el Contenido Mineral Óseo (CMO) del Cuello del Fémur y la Densidad Mineral Ósea (DMO) de la columna lumbar, el diámetro hidrodinámico medio de las VE con el CMO corporal total, el porcentaje de intensidad de las poblaciones de VE pequeñas con la DMO corporal total, y el porcentaje de intensidad de las poblaciones de VE grandes con la DMO total de la cadera. Por su parte, los marcadores moleculares del tumor se asociaron significativamente con el potencial zeta, los diámetros hidrodinámicos medios de las poblaciones de VE grandes y pequeñas, y con el porcentaje de intensidad de las VE pequeñas.

Los resultados evidenciaron que puede existir una asociación estadística entre los parámetros biofísicos de las VE y otras variables fisiológicas, por lo que se sugiere que en futuras investigaciones sobre estas partículas se incluyan estos parámetros para poder tener una mejor comprensión sobre las mismas.

Palabras clave: Vesículas Extracelulares, Dispersión Dinámica de Luz, Dispersión de Luz Electroforética, Cáncer de Mama Temprano, Densidad Mineral Ósea.

ABSTRACT

Bone is usually the most affected site by metastatic recurrences of breast cancer. Nowadays, there are no biomarkers to timely detect these lesions, and this is in part because the precise mechanisms by which they develop are not yet understood. Extracellular vesicles (EV) are one of the most promising biological factors to explain this process, due to their ability to transport molecular messages from one anatomical site to another. It has been proposed that the biophysical parameters of EV may affect their uptake, but more research is needed for characterizing these parameters in different clinical context as well as in relation with other physiological variables to better understand their role. In this project we assess the association between the results of bone densitometry and zeta potential, size, and intensity percentage of plasmatic EV populations from women with non-metastatic breast cancer.

To do so, was recovered stored blood plasma samples from 16 patients with breast cancer that participated in another study where they received a nutritional intervention along with their first six months of antineoplastic treatment. Those samples were collected at the beginning and the ending of the intervention. From them were isolated the EV by using precipitation kit ExoQuick® and characterized their biophysical parameters through dynamic light scattering and electrophoretic light scattering. The associations between the variables of interest were evaluated through mixed effect linear regression models.

An association between the next set of variables were found: average hydrodynamic diameter of large EV population with Bone Mineral Content (BMC) of the neck of the femur and Bone Mineral Density (BMD) of lumbar spine, average hydrodynamic diameter of all EV with BMC of full body, intensity percentage of small EV population with BMD of full body, intensity percentage of large EV with BMD of total hip. On their side, molecular markers of tumors were meaningful associated with zeta potential, average hydrodynamic diameter of both large and small EV populations, and intensity percentage of small EV populations.

These results evidenced that there could be statistical associations between biophysical parameters of EV and other physiological variables, therefore we suggest that future research about these particles include those parameters to gain better understanding of them.

Key words: Extracellular Vesicles, Dynamic Light Scattering, Electrophoretic Light Scattering, Early Breast Cancer, Bone Mineral Density.

1. INTRODUCCIÓN

Las recurrencias metastásicas en el cáncer de mama representan un problema por su impacto en la calidad de vida de las pacientes que ya han enfrentado a la enfermedad (Mejri *et al.*, 2018; Tsaras *et al.*, 2018). Además implican una alta mortalidad y un gran costo económico a los servicios de salud; en México la tasa de defunciones por cáncer de mama es de 17.19 por cada 100 mil mujeres de 20 años o más y los costos de su atención por paciente pueden llegar a superar el millón de pesos (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, 2020; Luis Miguel *et al.*, 2019). Las metástasis son difíciles de detectar, pues pueden aparecer hasta 20 años después de descubrir el tumor primario, y suelen presentar resistencia a antineoplásicos (Pan *et al.*, 2018).

El sitio más afectado en el cáncer de mama metastásico es el hueso (Brook *et al.*, 2018; Mejri *et al.*, 2018). Esta condición se presenta con lesiones predominantemente osteolíticas, es decir con una disminución de la DMO (Taverna *et al.*, 2020). La disminución en la DMO se ha considerado como un posible factor de riesgo para el desarrollo de metástasis, pero también como un efecto secundario del mismo (Brook *et al.*, 2018; Mathis *et al.*, 2018). Esta ambigüedad genera un ciclo vicioso dado por la comunicación entre las células tumorales y las células del hueso (Shemanko *et al.*, 2016).

La comunicación entre las células cancerosas y las células óseas puede estar mediada en parte por la actividad de las VE (Taverna *et al.*, 2020). Éstas son estructuras esféricas con bicapa lipídica, liberadas por casi todas las células y encontradas en diversos fluidos corporales (Van Niel *et al.*, 2018). Juegan un papel importante en la comunicación celular, reflejando distintos estados fisiopatológicos, incluyendo los del hueso y los del cáncer (Merchant *et al.*, 2017; Momen-Heravi *et al.*, 2018). Esto se debe a que pueden contener distintas moléculas, como proteínas o microRNAs (miRNAs), capaces de interferir con diferentes vías de señalización del metabolismo celular (Kalluri, 2016).

Si bien, existe un creciente interés en la búsqueda de moléculas contenidas en VE que puedan servir como biomarcadores en el cáncer de mama, incluyendo a aquellos para la detección temprana de metástasis óseas, aún se desconocen los mecanismos que participan en su captación (Mathieu *et al.*, 2019; Taverna *et al.*, 2020). Algunos autores sostienen que las características biofísicas de las VE, como su carga eléctrica o su tamaño, podrían estar implicadas en este proceso (Mathieu *et al.*,

2019; Nakase and Futaki, 2015; Rupert *et al.*, 2017). No obstante, son pocos los estudios sobre estas propiedades de las VE. Particularmente se requieren estudios que analicen el comportamiento de estos parámetros ante diversos escenarios clínicos y patológicos, lo cual contribuiría a comprender la forma en que actúan las VE, ayudando a su implementación como biomarcadores o agentes terapéuticos (Rupert *et al.*, 2017). Hasta donde se tiene conocimientos, este es el primer proyecto de investigación enfocado en buscar una asociación entre los resultados de densitometría ósea de mujeres con cáncer de mama no metastásico y los parámetros biofísicos de sus VE plasmáticas caracterizados mediante dispersión dinámica de luz y dispersión de luz electroforética.

2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un proceso patológico complejo que involucra múltiples alteraciones en las funciones biológicas de un grupo de células. Dichos cambios desembocan en una transformación fenotípica que implica un crecimiento acelerado y descontrolado de éstas, hasta formar un bulto denominado neoplasia. Según sus características histológicas, las neoplasias se clasifican como benignas o malignas, siendo éstas últimas las consideradas como tumores cancerígenos, particularmente por su capacidad de invadir a otros tejidos (Kumar *et al.*, 2013; Longo, 2015).

El carcinoma mamario es la principal neoplasia maligna asociada a los senos. Tiene su origen en las células epiteliales de los conductos o de los lobulillos mamarios. Este cáncer es el más letal en mujeres, representando un problema de salud pública cuyas repercusiones van más allá de la concepción biológica de la enfermedad (Lippman, 2015; Mota González *et al.*, 2018).

Las pacientes con cáncer de mama tienen una disminución importante en su calidad de vida. A pesar de su importancia, los enfoques en la calidad de vida de pacientes con cáncer de mama han pasado desapercibidos tanto en la clínica como en la investigación (Montazeri, 2008). Estas mujeres tienen una mayor incidencia de trastornos afectivos y de ansiedad (Tsaras *et al.*, 2018). En parte esto se asocia al hecho de tener un pronóstico incierto, particularmente sobre el desarrollo de recurrencias, incluso al haber terminado sus tratamientos (Puglisi *et al.*, 2014). De ahí la importancia, y el desafío, de buscar marcadores que permitan elaborar un pronóstico más certero en momentos tempranos de la enfermedad.

2.1. Pronóstico Clínico en el Cáncer de Mama

Establecer un pronóstico preciso en las personas con cáncer no es una tarea sencilla. Por un lado, se deben considerar las características propias de cada paciente. Por otra parte, las neoplasias presentan una gran variedad fenotípica por lo que cada cáncer puede tener un grado de agresividad único que, en ocasiones, es difícil de predecir, y el de mama no es la excepción (Lippman, 2015; Longo, 2015). En la actualidad, para establecer un pronóstico es necesario considerar la reserva

fisiológica de cada paciente, así como las características clínicas, histológicas y moleculares de cada tumor (Longo, 2015).

La reserva fisiológica de una persona es la capacidad que tiene su cuerpo para compensar la homeostasis ante la presencia de agentes estresores. Factores como la senectud, un mal estado nutricional o la presencia de lesiones y comorbilidades pueden disminuir la reserva fisiológica, afectando el pronóstico de pacientes con cáncer (Bagshaw and McDermid, 2013). Considerando que los carcinomas de mama tienen su pico de incidencia en los años cercanos a la menopausia y que ésta es un proceso que involucra muchos cambios que alteran la reserva fisiológica, no es de extrañar que se suela dividir a las pacientes con cáncer de mama como pre o postmenopáusicas (Lippman, 2015).

Tras la menopausia, hay una disminución en la cantidad de estrógenos producidos, lo cual afecta a diversas funciones como la musculoesquelética, cardíaca o cerebral (Merz and Cheng, 2016; Russell *et al.*, 2019; Sanchez-Siles *et al.*, 2020). Igualmente, en esta etapa de la vida suelen haber alteraciones en la composición corporal, como una mayor ganancia de grasa y una disminución en la cantidad de músculo y hueso (Greendale *et al.*, 2019), los cuales se asocian a un mayor riesgo y a un peor pronóstico durante la enfermedad (Agurs-Collins *et al.*, 2019; Aleixo *et al.*, 2019, Aleixo *et al.*, 2020). Todos estos cambios tras la menopausia implican distintas estrategias terapéuticas en las mujeres pre o posmenopáusicas según las características fenotípicas del tumor.

Debido a la gran variedad de transformaciones fenotípicas que pueden sufrir las células del epitelio mamario durante la carcinogénesis, se ha optado por agrupar a los tumores según algunos criterios. Esto permite dar cierta uniformidad a las investigaciones y a las intervenciones sobre el cáncer de mama, pero también hace que el establecimientos de pronósticos no sea preciso para cada caso, ya que se pueden llegar a obviar otras características del tumor que podrían influir sobre el mismo (Eusebi, 2010). Históricamente, los carcinomas de mama se han clasificado según criterios clínicos. En la actualidad, beneficiándonos de los avances científicos, para establecer pronósticos también se consideran la tipificación molecular y la gradación histológica del tumor (Cuadro 1) (Eliyatkin *et al.*, 2015; Lippman, 2015).

La tipificación molecular del tumor tiene gran importancia en la elección del tratamiento. Según las moléculas que expresan en su superficie, las células del carcinoma mamario pueden tener, o no, una mayor variedad de opciones terapéuticas (Cardoso *et al.*, 2019). Con este fin, son de particular interés los receptores de estrógenos (ER), los receptores de progestágenos (PR) y los receptores

para el factor de crecimiento de tipo epidérmico humano (HER2) (Eliyatkin *et al.*, 2015). Los primeros dos, son receptores hormonales que no están presentes en todos los carcinomas de mama e implican que el tumor tiene una dependencia hormonal para su crecimiento. Por su parte, el receptor HER2 puede verse sobre expresado en algunos tumores, induciendo una progresión más acelerada de la enfermedad (Eliyatkin *et al.*, 2015). Tanto los receptores hormonales como los receptores HER2 proveen blancos terapéuticos con los cuales se puede complementar la terapia adyuvante, por lo que aquellos tumores que carecen de éstos tienen un peor pronóstico al contar con menos opciones de tratamiento (Eliyatkin *et al.*, 2015; Lippman, 2015).

Cuadro 1.- Clasificaciones de los carcinomas mamarios

Clasificaciones	Criterios		
Clasificación molecular	ER/PR	HER2	
Luminal A	Presente	Normal	
Luminal B	Presente	Sobreexpresado	
HER2/neu positivo	Ausente	Sobreexpresado	
Triple negativo	Ausente	Normal	
Gradación histológica	Diferenciación celular	Pleomorfismo nuclear	Conteo mitótico
Grado 1	>75%	Uniformes	<7 x10 HPF
Grado 2	10-75%	Moderado	8-15 x10 HPF
Grado 3	<10%	Intenso	>16x10 HPF
Estadificación clínica	Tumor primario (T)	Nódulos linfáticos (N)	Metástasis (M)
0	In situ	Sin afección	Ausente
IA	2 cm	Sin afección	Ausente
IB	<2 cm	Invasión <2 mm	Ausente
IIA	<2 cm	Invasión 1 a 3 nodulos	Ausente
IIB	2-5 cm	Invasión <2 mm o 1 a 3 nódulos	Ausente
IIIA	>5 cm	Invasión <2 mm o 4 a 9 nódulos	Ausente
IIIB	Cualquier tamaño con invasión a pared	Invasión <9 nódulos o nódulos esternales	Ausente
IIIC	Cualquier tamaño con invasión a pared	Invasión >9 nódulos o nódulos subclavios	Ausente
IV	Cualquier tamaño	Cualquier afección	Presente

ER: Receptores de estrógenos. HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano. HPF: Campos de alto poder. PR: Receptores de progestágenos.

Otras clasificaciones se basan en características estructurales del tumor. Histológicamente, los tumores se catalogan en grados uno, dos y tres, siendo éstos últimos los de peor pronóstico. Para ello se emplean criterios como el porcentaje de diferenciación celular, el pleomorfismo de los núcleos celulares y la actividad mitótica de las células (Kumar *et al.*, 2013; Lippman, 2015). A nivel macroscópico, se usa una estadificación clínica que sigue los criterios TNM, considerando el tamaño del tumor y su invasión hacia otras estructuras. El cáncer de mama puede ir desde la etapa 0, cuando no ha invadido otras estructuras, hasta la etapa IV, donde se detectan metástasis en otros órganos. Las etapas I, II y III son consideradas como invasivas, pero no metastásicas (Lippman, 2015).

Los cánceres de mama en etapa IV tienen el peor pronóstico. De las muertes ocasionadas por cáncer de mama, 3 de cada 4 es metastásico. De éstas, 3 de cada 4 son casos recurrentes, es decir, que ya habían concluido un primer tratamiento contra la enfermedad (Brook *et al.*, 2018). Cuando el tumor primario es invasivo, hay un mayor riesgo de presentar una recurrencia metastásica en los próximos 20 años. Dicho riesgo aumenta según la etapa del tumor inicial, llegando hasta el 49% en los tumores en etapa III (Pan *et al.*, 2018). Por ello, las mujeres con cáncer de mama tienen un seguimiento por periodos de tiempo prolongados, incluso cuando se piensa que los tratamientos curativos fueron eficaces (Cardoso *et al.*, 2019).

Es importante señalar que el sitio más afectado por metástasis en el cáncer de mama son los huesos. Se ha reportado que hasta en un tercio de los casos, el primer sitio de recurrencia metastásica es hacia este órgano, y que de los cánceres de mama en etapa IV hasta el 75% tiene algún grado de compromiso óseo (Brook *et al.*, 2018; Mejri *et al.*, 2018). Las metástasis óseas atentan no solo contra la esperanza de vida, pues las probabilidades de tener tratamientos curativos exitosos son muy bajas, sino también contra la calidad de vida. Los pacientes con metástasis en hueso tienen un alto riesgo de desarrollar fracturas por fragilidad, dolor óseo, compresión medular, hipercalcemia, entre otros eventos adversos (Brook *et al.*, 2018; Onishi *et al.*, 2010). Debido al amplio margen de tiempo que puede transcurrir entre la conclusión del tratamiento primario y el desarrollo de recurrencias metastásicas, es necesario aclarar los mecanismos involucrados en el desarrollo temprano de dichas metástasis y cómo es que se relacionan los tejidos óseos con las células del cáncer de mama (Clements and Johnson, 2019).

2.2. Relación Entre el Tejido Óseo y el Cáncer de Mama

Aunque en primera instancia se podría pensar que hay poca relación entre el hueso y el cáncer de mama, la realidad es que hay múltiples conexiones entre ambos. Por una parte, la función normal del hueso puede verse alterada por factores de riesgo compartidos con el cáncer de mama. Además, una vez presentes, tanto la propia enfermedad como los tratamientos, pueden interferir en la función normal del hueso (Brook *et al.*, 2018). Por otro lado, el hueso contiene factores que pueden propiciar el establecimiento y desarrollo de ciertos tipos moleculares del cáncer de mama (Cardoso and Curigliano, 2018; Clements and Johnson, 2019). También, la pérdida de reserva fisiológica en el cáncer, contribuye a disminuir la resistencia ósea y aumenta el riesgo de fracturas, lo cual podría ensombrecer más el pronóstico (Bagshaw and McDermid, 2013). No obstante, la relación entre estos tejidos no está del todo clara y aún se requieren investigaciones que ayuden a comprender mejor la comunicación que mantienen las células del carcinoma de mama y los elementos tisulares del hueso.

2.2.1. Histología Funcional del Hueso

El hueso es un tejido con un contenido celular diverso. Sus células se encargan de formar, mantener, remodelar o degradar al osteoide, es decir a la matriz extracelular especializada del hueso que es capaz de captar minerales, principalmente en forma de cristales de hidroxapatita, que le confieren la rigidez que requiere para sus funciones (Ross and Pawlina, 2012). Un hueso saludable es capaz de hacer frente al estrés mecánico sin romperse. Dicha capacidad se denomina resistencia ósea y, para mantenerse, requiere de una actividad adecuada y coordinada por parte de las células óseas (Kasper *et al.*, 2015; Larráinzar-Garijo *et al.*, 2018).

Las células del hueso nacen de dos linajes diferentes. Uno de ellos, los osteoclastos, provienen de las células madre hematopoyéticas (Muñoz-Torres *et al.*, 2004; Ross and Pawlina, 2012). El otro, surge de las células madre mesenquimales, que se diferencian a osteoblastos, células encargadas de producir osteoide y favorecer su calcificación. Una vez que consiguen su objetivo y quedan

rodeados por hueso, los osteoblastos se denominan osteocitos. Estas células son las más abundantes del hueso y se encargan de coordinar el remodelado óseo, proceso por el cual se mantiene la resistencia ósea (Sims and Martin, 2020; Teufel and Hartmann, 2019).

El remodelado óseo comienza con los osteocitos. Al estar inmersas en el hueso, estas células pueden censar las cargas mecánicas y detectar microfracturas. Ante estos estímulos, activan a los osteoclastos para que degraden el hueso dañado (Brook *et al.*, 2018; Sims and Martin, 2014). De la matriz ósea degradada, se libera el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), junto a otras citocinas, que contribuye a reclutar a los osteoblastos quienes comienzan a producir osteoide en direcciones apropiadas para hacer frente al estrés mecánico (Brook *et al.*, 2018). El osteoide recién producido se calcifica en dos fases: la mineralización primaria, que involucra la calcificación intrafibrilar del colágeno y dura entre 5 y 10 días, y la mineralización secundaria, que es un proceso lento y gradual de la calcificación extrafibrilar que puede prolongarse hasta 30 meses (Boivin *et al.*, 2009). De esta manera, la resistencia ósea se determina por un proceso de comunicación complejo entre las células del hueso. Este proceso se ve afectado por diversos factores y algunos de ellos se relacionan de forma estrecha con el cáncer de mama.

2.2.2. Factores que Afectan a la Resistencia Ósea en el Cáncer de Mama

La resistencia ósea está determinada por dos elementos. Uno de ellos es la DMO, que es un indicador de la cantidad de hidroxapatita depositada en los huesos. Ésta sólo explica alrededor del 70% de la resistencia ósea. El 30% restante le corresponde a la calidad ósea, la cual nos habla de la adecuada organización estructural del hueso frente al estrés mecánico recibido (Caeiro Rey *et al.*, 2005; Huo *et al.*, 2019; Larraínzar-Garijo *et al.*, 2018).

Normalmente, la edad es el factor determinante más importante de la DMO. En la juventud hay una tendencia a ganar masa ósea. Después de las primeras dos décadas de vida, esta ganancia se desacelera, llegando al pico de masa ósea alrededor de los 35 años, para posteriormente disminuir de forma progresiva (Papastavrou *et al.*, 2020). En la población femenina, dicha disminución se ve acelerada tras la menopausia por los cambios hormonales implicados en este proceso (Finkelstein *et al.*, 2008; Lippman, 2015).

La DMO se ve influenciada por diversos mecanismos hormonales, que pueden verse comprometidos en el cáncer de mama. La relación entre la hormona paratiroidea (PTH) y la calcitonina ayuda a regular el metabolismo del calcio mediante la estimulación e inhibición, respectivamente, de la resorción ósea (Kasper *et al.*, 2015). Algunas células del cáncer de mama producen la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) que actúa de forma similar a la PTH (Shemanko *et al.*, 2016). El cortisol disminuye la síntesis de osteoide y puede interferir con la diferenciación tanto de osteoclastos como de osteoblastos (Bedatsova and Drake, 2019; Hall, 2016). En ocasiones, fármacos análogos del cortisol se emplean de forma profiláctica en ciertos escenarios, previo a la administración de algunos agentes antineoplásicos con efectos adversos severos, como el paclitaxel (Bedatsova y Drake, 2019; De Castro Baccarin *et al.*, 2019). Otro grupo de hormonas importantes en el mantenimiento de la DMO son los estrógenos, cuya función en este tejido es evitar la resorción del hueso (Muñoz-Torres *et al.*, 2004). En los tumores luminales de la mama, el tratamiento incluye medidas que bloquean la actividad estrogénica o su síntesis, como los inhibidores de la aromatasas, contribuyendo a una mayor pérdida de hueso (Cardoso *et al.*, 2019).

No sólo los tratamientos hormonales en el cáncer de mama pueden afectar nocivamente al hueso. Algunos agentes antineoplásicos que son empleados contra el cáncer de mama, como las antraciclinas o los agentes alquilantes, pueden tener dicho efecto. De éstos, la doxorubicina parece favorecer la formación de osteoclastos sobre la de osteoblastos, mientras que la ciclofosfamida puede entorpecer la función ovárica y la producción estrogénica (Handforth *et al.*, 2018).

La resistencia ósea también puede verse afectada por las alteraciones en los estilos de vida, secundarias a los efectos adversos de los tratamientos antineoplásicos. La actividad física es primordial para mantener un hueso sano, sobre todo si involucra levantamiento de cargas que estimulen la producción ósea (Compston *et al.*, 2017). En sedentarismo e inmovilización, se ve un incremento en la resorción ósea (Kasper *et al.*, 2015). La fatiga en pacientes en quimioterapia puede disminuir el nivel de actividad física incluso después de terminar los tratamientos antineoplásicos (Ramírez *et al.*, 2017). En cuanto a la dieta, se requiere un aporte adecuado de proteínas, minerales y de vitaminas —principalmente C y D— para la síntesis de hueso (Chapman-Novakofski, 2017). Las náuseas y parageusias son efectos adversos comunes en los tratamientos antineoplásicos y pueden contribuir a una mala alimentación en las personas con cáncer (Longo, 2015; Pugnaroni *et al.*, 2020).

En el contexto del paciente oncológico, la inflamación crónica puede inducir un estado de desnutrición conocido como caquexia, donde se ve disminuida la DMO junto a otras alteraciones de la composición corporal (Argilés *et al.*, 2018; FAO *et al.*, 2017). Se ha observado que en mujeres con carcinoma mamario, hay cambios deletéreos en la DMO tras los primeros seis meses de tratamiento antineoplásico (Monroy-Cisneros *et al.*, 2016). En un grupo de mujeres con esta enfermedad, que recibieron una intervención nutricional junto a los primeros seis meses de tratamiento antineoplásico, se encontró una mejoría al tener una reducción en su masa grasa y una ganancia en su masa muscular, aunque la pérdida de la DMO no consiguió evitarse (Limon-Miro *et al.*, 2021).

Todos estos factores contribuyen con múltiples alteraciones del metabolismo óseo en las mujeres con cáncer de mama. Por ello es comprensible que en el caso de la invasión metastásica a tejidos óseos existan cambios en la DMO, en parte causadas por estas afecciones. Sin embargo, se ha indicado que las propias células tumorales tienen un papel fundamental en el desarrollo de estas lesiones (Brook *et al.*, 2018).

2.2.3. Metástasis Óseas en el Cáncer de Mama

El hueso es un sitio ideal para el desarrollo de metástasis, las cuales dan lugar a lesiones que pueden cursar con un aumento o un descenso en la DMO. Este órgano presenta una alta vascularidad, imprescindible para el aporte de nutrientes necesarios para el crecimiento tumoral, pero paradójicamente cuenta con sitios de hipoxia intramedular que podrían favorecer la latencia de las células cancerosas (Yang *et al.*, 2019). Además, en caso de haber una actividad osteoclástica elevada, se genera un microambiente con un bajo pH o altas concentraciones de calcio, similares al microambiente tumoral (Yang *et al.*, 2019). El 80% de las lesiones metastásicas del cáncer de mama son osteolíticas, es decir con un predominio de actividad osteoclástica y una DMO disminuida (Taverna *et al.*, 2020). Las lesiones restantes, osteoblásticas, tienen una DMO aumentada. No obstante, lo más común es que ambas alteraciones coexistan en diferentes puntos del hueso (Taverna *et al.*, 2020).

La formación de las metástasis óseas es un proceso complejo. Primero, las células tumorales deben invadir la matriz extracelular del tumor primario hasta llegar a circulación sistémica. Para ello, deben migrar a través del endotelio de los vasos sanguíneos o linfáticos (Brook *et al.*, 2018). Una vez en circulación, deben evadir al sistema inmune hasta llegar al sitio donde se implantarán. Este lugar se denomina nicho metastásico y debe contener condiciones propicias para que el tumor se establezca y entre en una fase de latencia, la cual le permite a las células tumorales escapar del sistema inmune y de los agentes antineoplásicos (Clements and Johnson, 2019). Finalmente un nuevo desbalance en el microambiente del nicho metastásico debe inducir la proliferación de las células malignas, la angiogénesis y la evasión de la apoptosis, entre otros procesos protumorales (Brook *et al.*, 2018).

Las células del cáncer de mama pueden producir factores osteomiméticos. Dichos factores contribuyen a que las células tumorales en circulación sean captadas por el hueso y consigan introducirse en éste tejido, pasando desapercibidas (Brook *et al.*, 2018). También pueden producir y/o activar metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular y les confieren mayor invasividad y, a nivel óseo, una mayor inducción de lesiones osteolíticas (Brook *et al.*, 2018). Una vez en el hueso, las células cancerosas coordinan la adecuación del nicho metastásico y modifican el metabolismo óseo a su favor. Estas células aprovechan los factores que inducen la quiescencia en los nichos perivasculares de las células madre hematopoyéticas para entrar en fase latente (Clements and Johnson, 2019). Los osteoblastos en presencia de las células de cáncer de mama dejan de realizar sus actividades habituales para producir citocinas que favorezcan la supervivencia de las células invasoras (Taverna *et al.*, 2020). Además, algunas de estas citocinas, inducen la activación de osteoclastos (Kelly *et al.*, 2019). Ciertos factores liberados durante la degradación de la matriz ósea, como el TGF- β 1, inducen la proliferación y supervivencia de las células tumorales, particularmente dentro del nicho metastásico (Mathis *et al.*, 2018). Una DMO disminuida al momento del diagnóstico se relaciona con un peor estadio clínico y con tumores más agresivos, y se ha propuesto que podría asociarse a un mayor riesgo de metástasis (Altundag *et al.*, 2006; Mathis *et al.*, 2018). En resumen, la comunicación entre las células cancerosas y las células del hueso genera un ciclo vicioso que establece la aparición de las metástasis óseas (Figura 1).

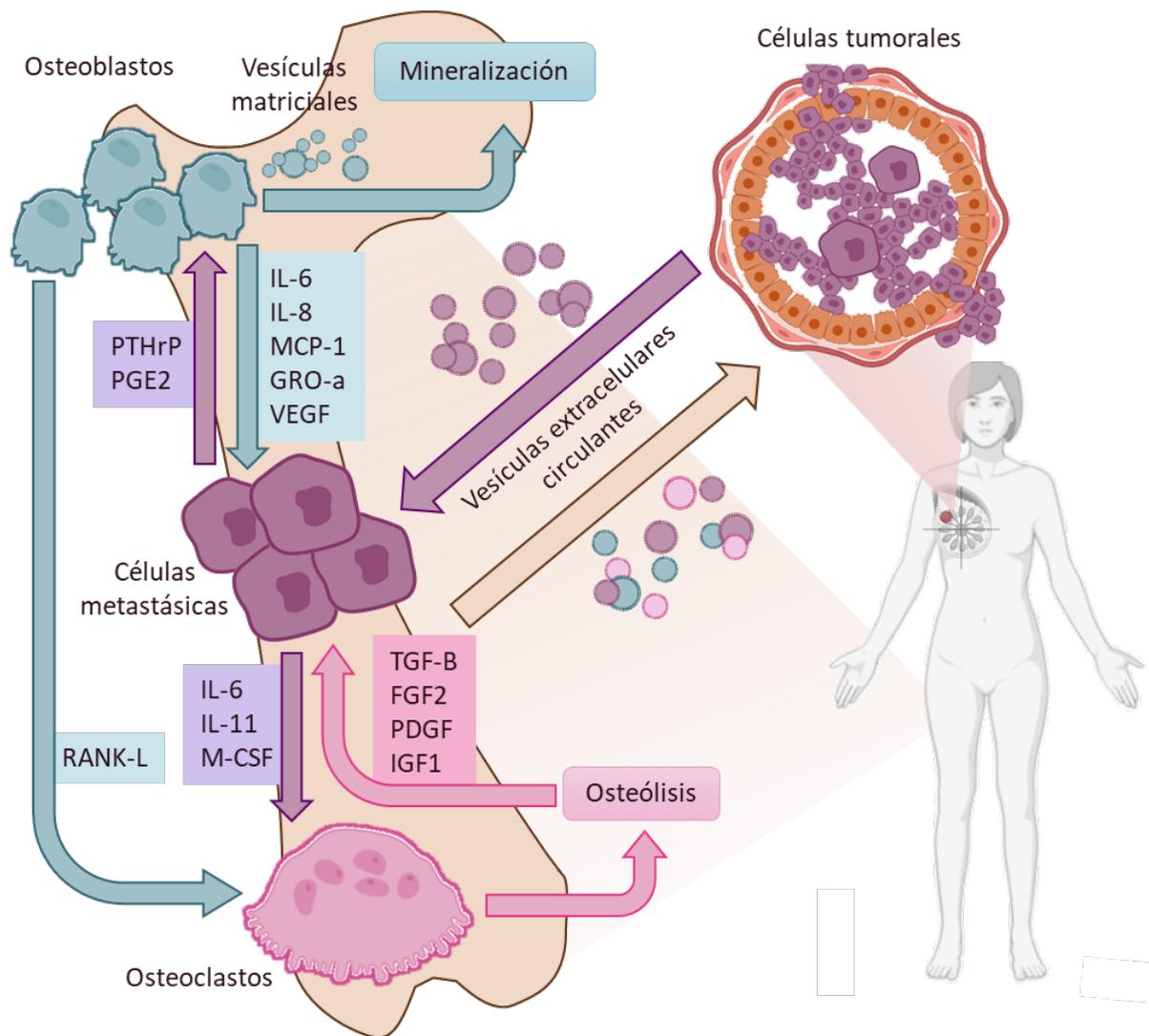


Figura 1.- El ciclo vicioso de las metástasis óseas. Las células metastásicas producen factores —como PTHrP, PGE2, IL-6, IL-11, M-CSF, etc.— que alteran el metabolismo normal de los osteoblastos y osteoclastos. Dentro de sus funciones habituales, los osteoblastos producen vesículas matriciales para la mineralización de la matriz ósea y a RANK-L para la activación de los osteoclastos. En presencia de células metastásicas, los osteoblastos producen citocinas —IL-6, IL-8, MCP-1, GRO-a, VEGF, etc.— que favorecen su supervivencia. Por su parte, los osteoclastos degradan la matriz ósea, de la cual se liberan citocinas —TGF-β, FGF2, PDGF, IGF1, etc.— que favorecen la proliferación de las células metastásicas. Se ha hipotetizado que las células tumorales se pueden comunicar bilateralmente con las células en el hueso a través de las vesículas extracelulares, preparando así al nicho metastásico para permitir la implantación de las células metastásicas. **FGF2:** Factor 2 de crecimiento de fibroblastos; **GRO-a:** Oncogén alfa regulado por el crecimiento; **IGF1:** Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1; **IL-6:** Interleucina 6; **IL-8:** Interleucina 8; **IL-11:** Interleucina 11; **MCP-1:** Proteína quimiotáctica de monocitos 1; **M-CSF:** Factor estimulante de colonias de macrófagos; **PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas; **PGE2:** Prostaglandina E2; **PTHrP:** Proteína relacionada con la hormona paratiroidea; **RANK-L:** Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa beta; **TGF-β:** Factor de crecimiento transformante beta; **VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular. Modificado de Taverna *et al.*, 2020.

Estudios recientes evalúan la factibilidad de que exista una comunicación entre el tumor primario y el hueso (Figura 1). Se piensa que esto podría favorecer la adecuación del nicho metastásico y la activación temprana del ciclo vicioso incluso antes de la colonización por las células metastásicas (Liu y Cao, 2016). Un grupo de partículas que en los últimos años ha cobrado gran importancia en el estudio de los procesos de comunicación celular, por su capacidad de transportar moléculas a sitios anatómicamente distantes y protegidas del medio, son las VE (Théry *et al.*, 2018). Por ello, actualmente se investiga el papel que las VE pueden jugar en el desarrollo temprano de las metástasis óseas en el cáncer de mama (Liu y Cao, 2016).

2.3. Vesículas Extracelulares como Potenciales Biomarcadores

La Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) define a estas últimas como: “el término genérico para las partículas naturalmente liberadas por las células, delimitadas por una bicapa lipídica y que no pueden replicarse” (Théry *et al.*, 2018). Las VE son estructuras derivadas de las membranas celulares, originadas por distintos procesos que se utilizan para clasificarlas en subtipos (Figura 2). Los ectosomas, también conocidos como microvesículas, son un subtipo de VE que surgen como una evaginación de la membrana celular y miden de entre 50 nm hasta un micrómetro de diámetro. Otro subtipo son los exosomas. Estos miden entre 20 y 200 nm y cuentan con un proceso de síntesis más complejo y regulado, donde primero se forma un endosoma denominado cuerpo multivesicular, ya que dentro lleva otras vesículas de menor tamaño llamadas intraluminales. Cuando el endosoma se une a la membrana celular, las vesículas intraluminales son liberadas por exocitosis y es entonces cuando toman el nombre de exosomas (Van Niel *et al.*, 2018). No obstante, existe una dificultad práctica para distinguir a los exosomas de los ectosomas solo por su tamaño. Por ello, se ha propuesto que cuando no se pueda determinar su origen, las poblaciones de VE sean clasificadas como pequeñas, cuando son menores a 200 nm, o medianas/grandes cuando van de 200 a 1000 nm (Théry *et al.*, 2018).

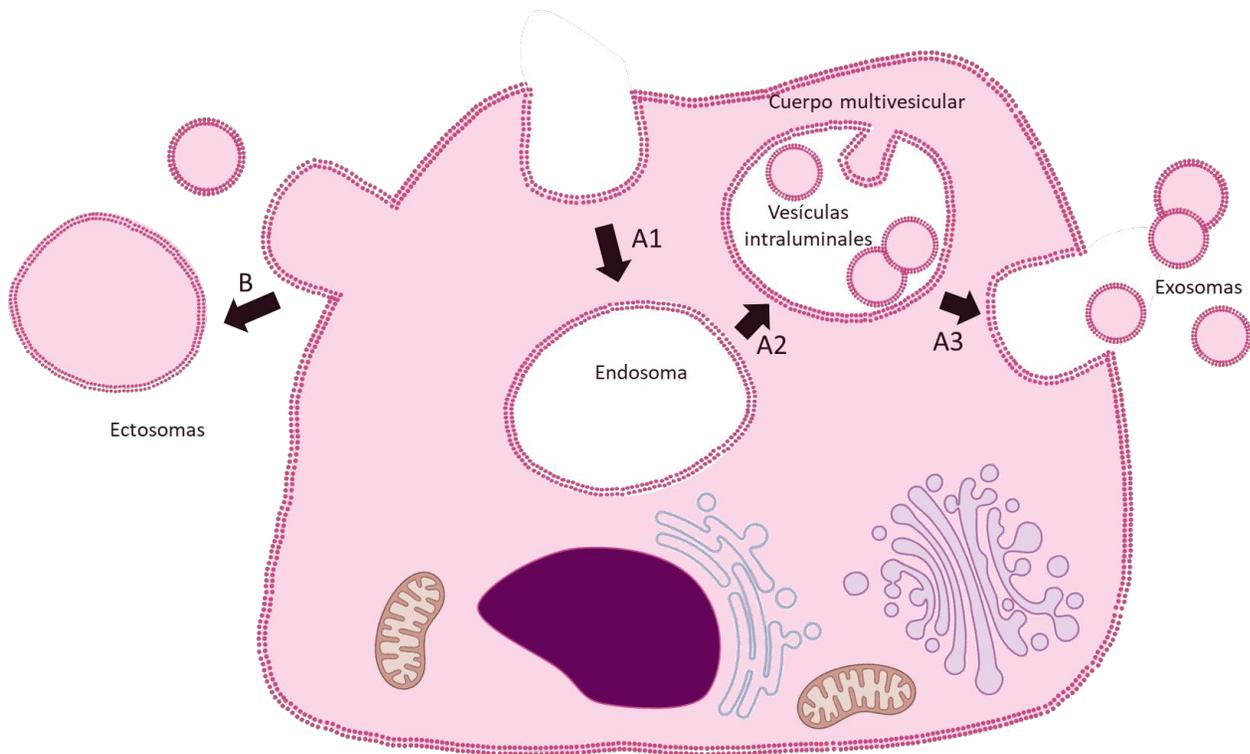


Figura 2.- Clasificación y biogénesis de las vesículas extracelulares. Dos de las clasificaciones de vesículas extracelulares según sus procesos de biogénesis son los exosomas y los ectosomas. Los exosomas inician con la formación de un endosoma (A1), el cual va llenándose de vesículas más pequeñas denominadas vesículas intraluminales y pasando a llamarse cuerpo multivesicular (A2). Posteriormente, el cuerpo multivesicular se fusiona con la membrana plasmática liberando a las vesículas intraluminales que pasan a denominarse exosomas (A3). Los ectosomas, surgen como una evaginación de la membrana plasmática (B). Figura original.

Las VE se caracterizan por contener, ya sea en su interior o en su membrana, distintas moléculas denominadas cargamento. Los cargamentos pueden ser lípidos, proteínas o ácidos nucleicos, y son capaces de producir efectos en los tejidos receptores (Samuelson and Vidal-Puig, 2018). Al estar contenidas dentro de una bicapa lipídica, se encuentran protegidos de la acción de proteasas, nucleasas y otras enzimas que, de no ser así, los degradarían fácilmente. De esta manera, las VE sirven como un sistema de mensajería entre células que favorece la llegada íntegra de una señal molecular (Samuelson and Vidal-Puig, 2018).

La gran variedad de contenidos en las VE ha contribuido a que se propongan como indicadores de distintas condiciones del organismo. Los linajes celulares de los cuales proceden y los biofluidos donde se han detectado son muy diversos, así como los estímulos que desencadenan su producción y los efectos que inducen (Picó *et al.*, 2019). En este sentido son de particular interés los fragmentos

de miRNA contenidos en las VE. Éstos son capaces de interferir en el metabolismo de la célula receptora regulando la expresión de genes, principalmente por interferencia con los RNA mensajeros (mRNA) (Behera and Tyagi, 2018). Se ha descrito que el contenido de RNA en las VE no es aleatorio, por lo que han sido investigados en distintos procesos fisiopatológicos (Abramowicz and Story, 2020).

Uno de los campos donde se ha investigado el papel fisiopatológico de las VE es en el desarrollo de marcadores del metabolismo óseo (Tao and Guo, 2019). Se ha encontrado que existen proteínas y miRNAs provenientes de osteoblastos y osteoclastos, que pueden tener un papel modulador en la actividad de ambas. Además, las células mesenquimales pueden ver favorecida o inhibida su conversión a osteoblastos, según la presencia de VE (Murphy *et al.*, 2018). Debido a esto, se ha hipotetizado que las VE pueden tener un papel importante en el remodelado óseo y en el mantenimiento de la resistencia ósea (Huo *et al.*, 2019; Marques de Menezes *et al.*, 2020). También se está investigando el efecto que tienen sobre el hueso las VE provenientes de células cancerosas, ya que se ha propuesto que las VE pueden tener gran relevancia para el entendimiento de las metástasis óseas (Abramowicz and Story, 2020; Kalluri, 2016; Loftus *et al.*, 2020; Taverna *et al.*, 2020).

2.3.1. Vesículas Extracelulares como Potenciales Biomarcadores de Metástasis Óseas en el Cáncer de Mama

Las VE son uno de los potenciales marcadores que se estudian en la actualidad para formar parte de las biopsias líquidas. Este tipo de biopsias consiste en la detección de partículas plasmáticas relacionadas con el cáncer (Poggiana *et al.*, 2020). Al asociarse con muchos procesos celulares, los contenidos de las VE se han propuesto como posibles marcadores diagnósticos, pronósticos y terapéuticos en el cáncer (Hofmann *et al.*, 2020; Kalluri, 2016). Este tipo de detección puede llegar a ser muy útil en enfermedades donde la biopsia del tumor es complicada (Poggiana *et al.*, 2020). Actualmente se evalúa la viabilidad de emplear VE encontradas en saliva u orina para el uso de biopsias líquidas no invasivas (Kaczor-Urbanowicz *et al.*, 2019; Merchant *et al.*, 2017). De esta forma, la utilidad de VE como biomarcadores en el cáncer es muy prometedora.

Algunos contenidos de VE se han relacionado con momentos tempranos del desarrollo del cáncer, sugiriendo su uso como marcadores de detección temprana o diagnósticos. Un estudio concluyó que el enriquecimiento de VE con glipicano 1 (GPC1) permitió distinguir a pacientes con cáncer de páncreas de personas sanas con óptima sensibilidad y especificidad, incluso en etapas iniciales de la enfermedad (Melo *et al.*, 2015). Se ha reportado que ciertas cadenas de RNA largo no codificante en VE tienen alta sensibilidad para la detección de cáncer gástrico (Wang *et al.*, 2018). En otros estudios, se ha visto utilidad en el uso conjunto de múltiples contenidos de VE como método diagnóstico de cáncer de pulmón (Sandfeld-Paulsen *et al.*, 2016).

Además de su potencial uso diagnóstico, se ha estudiado a las VE como posibles marcadores para evaluar la respuesta a tratamientos. Los exosomas pueden desempeñar un papel importante en la carcinogénesis y la respuesta inmune antitumoral en los cánceres de cabeza y cuello (Hofmann *et al.*, 2020). Se ha visto una reducción en la concentración de VE posterior a la remoción quirúrgica de la neoplasia en pacientes con glioblastoma (Osti *et al.*, 2019). Algo similar ocurre con lo reportado para las VE enriquecidas con GPC1 en pacientes con cáncer de páncreas (Melo *et al.*, 2015). También se han reportado marcadores en VE cuyo aumento se relaciona con la respuesta al tratamiento (Stevic *et al.*, 2020).

Otros estudios se han enfocado en analizar el papel de las VE en la progresión del cáncer. Existe evidencia de que las VE producidas por distintos tipos de tumores pueden interferir con la respuesta inmune, evitando la activación de linfocitos, suprimiendo la respuesta de macrófagos, entre otros mecanismos que podrían favorecer la supervivencia de las células tumorales (Mathew *et al.*, 2020; Mittal *et al.*, 2020). Diversos miRNAs contenidos en VE han sido estudiados por su relación con la composición corporal en el contexto de pacientes con cáncer que desarrollan caquexia (Chitti *et al.*, 2018). Los cargamentos de algunas VE se han asociado con alteraciones en vías de señalización que favorecen la transformación endotelial-mesenquimal, un proceso que en el parénquima tumoral otorga propiedades invasivas y metastásicas (Kim *et al.*, 2020). También se ha visto un efecto de las VE para inducir resistencia farmacológica en el tumor y en el mantenimiento de las alteraciones del microambiente tumoral tanto primario como metastásico (Jena and Mandal, 2021). Se han propuesto mecanismos por los cuales los exosomas contribuyen al establecimiento de metástasis en melanoma y cáncer de ovario, entre otros tipos de cáncer (Gowda *et al.*, 2020; Hergueta-Redondo and Peinado, 2020). Las VE inducen la preparación del nicho metastásico promoviendo la expresión de genes proinflamatorios y la secreción de citocinas, coordinando la diferenciación

de ciertos fenotipos o reclutando ciertos grupos de células, entre otros mecanismos (Mo *et al.*, 2021). Por ello se considera que las VE pueden jugar un papel fundamental en el desarrollo de metástasis organotrópicas.

Algunos estudios implican que ciertos miRNAs contenidos en VE podrían favorecer el desarrollo de metástasis óseas en cáncer de mama (Taverna *et al.*, 2020). Por ejemplo, se ha reportado que el miR-214 en VE interfiere con la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos y favorece la actividad osteoclástica a la vez que, al verse disminuido este miRNA en células del cáncer de mama, éstas presentan una mayor proliferación y evasión de la apoptosis. (Han *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2018; Yi *et al.*, 2016). Los miR-21 y miR-1246 en VE se han propuesto como potenciales marcadores de detección de cáncer de mama y se les han atribuido acciones que interfieren con la regulación de la diferenciación de células mesenquimales, osteoblastos y osteoclastos. (Hannafon *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2017; Smieszek *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020).

Sin embargo, aun cuando los miRNAs encontrados en VE parecen ser biomarcadores prometedores para las metástasis óseas en el cáncer de mama, existen algunas limitantes que deben resolverse antes de poder implementar su uso. Una de las más importantes, es que aún no se comprende por completo cómo es que son captadas las VE por las células receptoras (Mathieu *et al.*, 2019). Algunos autores proponen que en dicho fenómeno pueden verse implicadas las propiedades biofísicas de las vesículas extracelulares como: su potencial zeta, su tamaño o sus propiedades ópticas (Mathieu *et al.*, 2019; Nakase and Futaki, 2015; Rupert *et al.*, 2017). Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre VE ponen su atención en el contenido de éstas y no hacen mención de sus propiedades biofísicas, lo cual dificulta la comprensión de su importancia a nivel fisiológico y/o fisiopatológico (Rupert *et al.*, 2017).

2.3.2. Importancia de las Propiedades Biofísicas de las Vesículas Extracelulares

Hasta ahora, las investigaciones sobre VE se han basado fundamentalmente en comprender su papel biológico mediante técnicas bioquímicas y de biología molecular para evaluar su contenido y composición. No obstante, la caracterización de sus propiedades físicas tiene cada vez mayor

importancia, particularmente en la industria farmacéutica donde se busca emplear a las VE como vehículos para la entrega de fármacos; aunque otras áreas, como el desarrollo de biomarcadores, también podrían beneficiarse de dichas investigaciones (Rupert *et al.*, 2017). El estudio de las propiedades físicas de las VE no es ajeno al de sus propiedades bioquímicas y moleculares, ya que su contenido y composición pueden estar estrechamente relacionados con sus propiedades físicas, un ejemplo es su potencial zeta (Nakase and Futaki, 2015; Rupert *et al.*, 2017).

El potencial zeta es una propiedad física de las nanopartículas en suspensión, que mide la magnitud de la atracción o repulsión entre éstas, siendo un indicador de la estabilidad coloidal (Marimpietri *et al.*, 2013). En general, mientras más se acerque al punto isoeléctrico —potencial zeta de 0— menos estabilidad tendrá la suspensión, habiendo una mayor aglomeración de sus partículas (Ostolska and Wiśniewska, 2014). En cuanto a las VE, al igual que las células, tienen un potencial zeta negativo debido a los componentes de sus membranas, particularmente sus proteínas, polisacáridos y ciertos fosfolípidos (Bondar *et al.*, 2012; Kato *et al.*, 2013). El potencial zeta se ha relacionado con la captación de nanopartículas por parte de las células, teniendo mejor captación las nanopartículas con carga positiva (Fröhlich, 2012). En el caso de las VE, Nakase y Futaki en 2015 encontraron que al tratarlas con fosfolípidos catiónicos, se disminuyó su potencial zeta y se favoreció su captación celular. En otro estudio de ese año, Akagi y colaboradores compararon el potencial zeta VE provenientes de cultivos de células de cáncer de mama tratadas con anticuerpos IgG inespecíficos, con el de muestras tratadas con anticuerpos específicos contra marcadores de membrana tanto de VE como de cáncer de mama. Al encontrar diferencias, concluyeron que éstas podrían deberse al reconocimiento antígeno-anticuerpo, infiriendo que las VE presentaban dichos marcadores en sus membranas. Este tipo de hallazgos apoyan la idea de que un mayor conocimiento sobre las propiedades biofísicas de las VE, en conjunto a su estudio bioquímico y molecular, puede ser provechoso para el entendimiento de su funcionamiento.

Además del potencial zeta, otras propiedades biofísicas que se han descrito de las VE son: su tamaño, su morfología, su densidad y sus propiedades mecánicas (Rupert *et al.*, 2017). De éstas, se cree que su tamaño también podría relacionarse con los mecanismos en que son captadas (Mathieu *et al.*, 2019). Se ha sugerido que las VE pequeñas tienen una mayor facilidad para ser captadas que las VE grandes y que esto podría disminuir su aclaramiento, aunque existen pocos estudios sobre los mecanismos de captación de VE de mayor tamaño (Ciardiello *et al.*, 2020).

Se han encontrado diferencias en los tamaños de VE circulantes en plasma según la presencia de ciertas condiciones clínicas, por lo que las implicaciones biológicas y fisiológicas del tamaño de las VE podrían ser importantes. Por ejemplo, las VE de pacientes con demencias o con mieloma múltiple se han encontrado de mayor tamaño y mayor heterogeneidad al compararlas con aquellas de controles sanos (Laurenzana *et al.*, 2021; Longobardi *et al.*, 2021). En cuanto a composición corporal, se ha reportado que los individuos con obesidad tienen mayor tamaño de VE al compararlas con las de sujetos con normopeso (Mendivil Alvarado, 2018), aunque también se ha indicado lo contrario (Santamaria-Martos *et al.*, 2020).

Tanto el tamaño como el potencial zeta de las VE pueden ser medidos mediante técnicas de dispersión de luz, como la dispersión dinámica de luz (DLS) o la dispersión de luz electroforética (ELS), respectivamente (Rupert *et al.*, 2017). DLS y ELS pueden ser realizadas por el mismo equipo y, aunque no son las técnicas con mayor precisión para realizar estas mediciones, ofrecen ciertas ventajas al compararlas con otros métodos, principalmente su menor costo, su alta sensibilidad ante partículas muy pequeñas y el hecho de que requiere poca cantidad de muestra para realizar sus mediciones (Lyu *et al.*, 2021).

La técnica de DLS basa su fundamento en que las partículas en suspensión presentan movimientos Brownianos cuyo desplazamiento varía en el tiempo en relación con su tamaño, así como la temperatura y la viscosidad del solvente (Rupert *et al.*, 2017). Al incidir un haz de luz sobre dichas partículas, su dispersión no es constante debido a los cambios de posición de éstas, haciendo que, al detectar las ondas de luz dispersadas, en un ángulo fijo, se cancelen o aumenten entre sí alternadamente en función del tiempo. Esto genera una fluctuación en la intensidad de la luz detectada, la cual depende del movimiento Browniano de las partículas (Hassan *et al.*, 2015). Si bien, no es posible medir el comportamiento individual de cada partícula con éste método, sí es posible obtener una distribución de medidas ponderada según la intensidad de luz captada, ya que el movimiento Browniano es un proceso Gaussiano (Stetefeld *et al.*, 2016). Dicha distribución se puede expresar de forma relativa como el porcentaje de intensidad de luz captada por cada rango, implicando que mientras mayor sea este porcentaje en cada rango, mayor es la polidispersión y por tanto la heterogeneidad del mismo (Stetefeld *et al.*, 2016). Aunque, otras inferencias pueden hacerse a partir de la intensidad relativa en cada rango de dicha distribución, como el volumen o el número de partículas, estas conversiones no son fiables con las VE, ya que por su heterogeneidad suelen presentar una distribución polidispersa. Sin embargo, se ha reportado que la intensidad

relativa en cada rango de la distribución puede usarse como un marcador comparable con otras, siempre y cuando empleen la misma técnica y condiciones similares (Hassan *et al.*, 2015; Jakubec *et al.*, 2020; Kesimer and Gupta, 2015). Además, conociendo las características del solvente, es posible determinar los tamaños de las VE a partir de los cambios en la fluctuación de la intensidad de la luz a través del tiempo (Hassan *et al.*, 2015; Stetefeld *et al.*, 2016).

Una consideración importante al medir tamaños de VE mediante DLS es que éstos serán mayores que los reportados por microscopía electrónica. Esto se debe en parte a que el diámetro medido por DLS es el hidrodinámico, el cual aumenta según las cargas que rodean la superficie de las VE (Kesimer and Gupta, 2015). Dichas cargas pueden ser estimadas al aplicar un campo eléctrico oscilatorio y evaluar la migración de las partículas en suspensión hacia un polo u otro, siendo éste el principio del ELS que permite medir al potencial zeta (Rupert *et al.*, 2017). Por lo tanto, ambas técnicas pueden ser empleadas en conjunto para estudiar los parámetros biofísicos de VE en distintas condiciones clínicas.

Existen pocos estudios sobre los parámetros biofísicos de VE relacionadas con cáncer y metabolismo óseo. En el caso del cáncer, se ha reportado que las células cancerosas generalmente liberan una mayor cantidad de VE, las cuales suelen tener mayor tamaño y ser más heterogéneas (Ciardiello *et al.*, 2020; Taverna *et al.*, 2020). En cuanto al potencial zeta, según algunos estudios que lo han reportado (Akagi *et al.*, 2015; Jing *et al.*, 2021; Sadegh-nejadi *et al.*, 2020), parece no distar mucho de los potenciales zeta típicamente reportados para VE y, probablemente las diferencias que se pudieran encontrar se deban a las distintas metodologías empleadas (Midekessa *et al.*, 2020; Y. Wang *et al.*, 2015). En cuanto al metabolismo óseo, una de las primeras funciones descritas de las VE es en la calcificación del hueso, ya que desde los años 70 se conoce la importancia de las vesículas de la matriz (VMt) ósea en este proceso (Sela *et al.*, 1983). Se atribuye a las VMt de mayor tamaño un papel predominante en la mineralización secundaria, mientras que las pequeñas participan en ambas fases (Ansari *et al.*, 2021). Sin embargo, otro tipos de VE también pueden interferir con el metabolismo óseo (Taverna *et al.*, 2020). En el caso del desarrollo de metástasis a hueso, muchos estudios se han enfocado en el contenido de las VE, pero poco se sabe sobre sus parámetros biofísicos. En este proyecto de tesis se busca conocer si existe o no una asociación entre los parámetros biofísicos de las VE y la DMO en pacientes con cáncer de mama sin indicios de metástasis.

3. HIPÓTESIS

La densidad mineral ósea de mujeres con cáncer de mama se asocia:

- Positivamente con el potencial zeta y el diámetro de vesículas extracelulares grandes provenientes del plasma.
- Negativamente con el diámetro y porcentaje de intensidad de vesículas extracelulares pequeñas, así como el porcentaje de intensidad de vesículas extracelulares grandes.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es evaluar si existe una asociación entre los resultados de densitometría ósea de mujeres con cáncer de mama no metastásico y los parámetros biofísicos (potencial zeta, porcentaje de intensidad y el tamaño) de sus poblaciones de vesículas extracelulares plasmáticas.

4.2. Objetivos Específicos

1. Aislar las vesículas extracelulares plasmáticas de mujeres con cáncer de mama no metastásico.
2. Medir el porcentaje de intensidad y el tamaño de las poblaciones de vesículas extracelulares plasmáticas de mujeres con cáncer de mama no metastásico, así como su potencial zeta.
3. Analizar la asociación entre cada parámetro de la densitometría ósea y los distintos parámetros biofísicos de las poblaciones de vesículas extracelulares plasmáticas de mujeres con cáncer de mama no metastático, ajustando por posibles variables de confusión.
4. Explorar la asociación entre los distintos parámetros biofísicos de las poblaciones de vesículas extracelulares plasmáticas de mujeres con cáncer de mama no metastático y las características clínicas e histopatológicas de sus neoplasias, ajustando por posibles variables de confusión.

5. VOLUNTARIAS, MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo deriva de un proyecto primario titulado “Efecto de una intervención nutricional clínica en la composición corporal, metabolismo y actividad antioxidante asociada con micronutrientes en pacientes con cáncer de mama durante el tratamiento antineoplásico” (Registro en *Clinical Trials*: NCT03625635). Dicho proyecto contó con la aprobación del comité de bioética del Centro Estatal Oncológico en Hermosillo, Sonora; así como del comité de ética del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CE/005/2015) (Limon-Miro *et al.*, 2021).

5.1. Voluntarias

Para el proyecto primario, los criterios de inclusión eran ser mujeres mayores de edad, con diagnóstico reciente de cáncer de mama no metastásico y atendidas en Hermosillo, Sonora. Los criterios de exclusión eran tener alguna comorbilidad o desarrollarla durante el período de seguimiento, desarrollar enfermedad metastásica durante el seguimiento, haber recibido un tratamiento antineoplásico con anterioridad o abandonar el tratamiento (Limon-Miro *et al.*, 2021). Para participar en dicho proyecto las mujeres firmaron un consentimiento informado donde se solicitó su autorización para almacenar en nuestro laboratorio los remanentes de plasma o suero obtenidos durante el mismo.

Las voluntarias del proyecto primario fueron 36 mujeres, de las cuales sólo 22 permanecieron al final del estudio. Su reclutamiento se llevó a cabo de septiembre de 2015 a julio de 2018. Recibieron una valoración inicial al momento del diagnóstico que consistió en análisis sanguíneos, evaluación nutricional y de composición corporal. A estas voluntarias se les brindó una intervención nutricional clínica que consistió en una evaluación bisemanal siguiendo el método de menú dinámico de comidas equivalentes en macronutrientes, donde los requerimientos calóricos se adecuaron a las necesidades de cada paciente y se les brindó un menú con 7 opciones distintas de platillos para cada comida del día. Las voluntarias tenían la libertad de elegir sus alimentos diarios a partir de dichas opciones (Limon-Miro *et al.*, 2019). Las alternativas dietarias

proporcionadas en cada sesión fueron acordadas en base a una revisión crítica de las guías alimentarias para pacientes con cáncer de mama (Limon-Miro *et al.*, 2017), los gustos de las pacientes y los alimentos disponibles según su contexto socioeconómico. La intervención nutricional se proporcionó durante los primeros seis meses de tratamiento antineoplásico, el cual fue prescrito para cada voluntaria por su médico tratante. Al concluir la intervención se reevaluaron los mismos parámetros que al inicio (Limon-Miro *et al.*, 2021). Es importante mencionar que a petición del comité de ética, a todas las participantes se les proporcionó la intervención nutricional clínica, por lo que no fue posible contar con un grupo control, ajustando el diseño a una investigación cuasiexperimental (Limon-Miro *et al.*, 2021).

Para la realización de nuestro estudio, los criterios de inclusión fueron: haber concluido su participación en el proyecto primario con todas sus mediciones, contar por lo menos con 1 ml de plasma congelado recolectado al inicio y otro al final de la intervención del proyecto primario, y otorgar su consentimiento informado explícitamente para los usos indicados en el numeral 5.5 de esta tesis. Se solicitó al comité de ética del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. su autorización para el uso de las muestras almacenadas de las voluntarias que no se consiguieron contactar para este estudio, según lo estipulado en la pauta número 11 de las pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud con seres humanos (Organización Panamericana de la Salud y Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas, 2016). La relocalización de las voluntarias para obtener su consentimiento informado para este proyecto se llevó a cabo durante el periodo de marzo a mayo de 2021.

5.2. Obtención de Datos Clínicos

Durante el proyecto primario, para conocer los antecedentes de las pacientes se llevó a cabo una entrevista clínica dirigida por parte de los investigadores y una revisión de sus expedientes médicos. También se aplicó el cuestionario *International Physical Activity Questionnaire* (IPAQ) para conocer sus niveles de actividad física, el *Malnutrition Screening Tool* (MST) como tamizaje nutricional y el de valoración global subjetiva (VGS) para la evaluación de pacientes con desnutrición (Bauer *et al.*, 2002; Ferguson *et al.*, 1999; Hagströmer *et al.*, 2006).

5.3. Análisis de Composición Corporal

La composición corporal de las participantes fue evaluada por absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA) al inicio y tras los primeros seis meses de intervención. Se realizaron mediciones de cuerpo completo con la finalidad de determinar la masa grasa y la masa apendicular libre de grasa —las cuales se emplearon para determinar el índice de masa grasa y de masa muscular apendicular—, la masa grasa visceral y el contenido mineral óseo corporal total. También se hicieron mediciones dirigidas a columna lumbar y cadera, para determinar la densidad mineral ósea de L1 a L4, cuello de fémur y total de cadera (Jain and Vokes, 2017; Yip *et al.*, 2015). Las mediciones fueron llevadas a cabo por personal capacitado en el equipo QDR Hologic Discovery A (Hologic, Inc. Bedford, Ma, EUA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Antes de realizar esta medición, se excluyó que se encontraran gestando mediante determinación de gonadotropina coriónica humana en orina.

5.4. Análisis de Vesículas Extracelulares

Durante el proyecto primario se obtuvieron muestras sanguíneas de cada voluntaria, al inicio y a los seis meses de la intervención. Dicho proceso fue llevado a cabo por personal capacitado con las medidas de seguridad adecuadas. Se solicitó a las voluntarias acudir con un periodo de ayuno de 8 h. Las muestras de plasma fueron obtenidas con EDTA y centrifugadas al momento de la extracción para la exclusión de los elementos celulares. Además, fueron debidamente rotuladas con fecha de la extracción y códigos numéricos para su identificación. Una vez realizadas las determinaciones plasmáticas del proyecto primario las muestras remanentes de las voluntarias que dieron su consentimiento fueron almacenadas a -80° C.

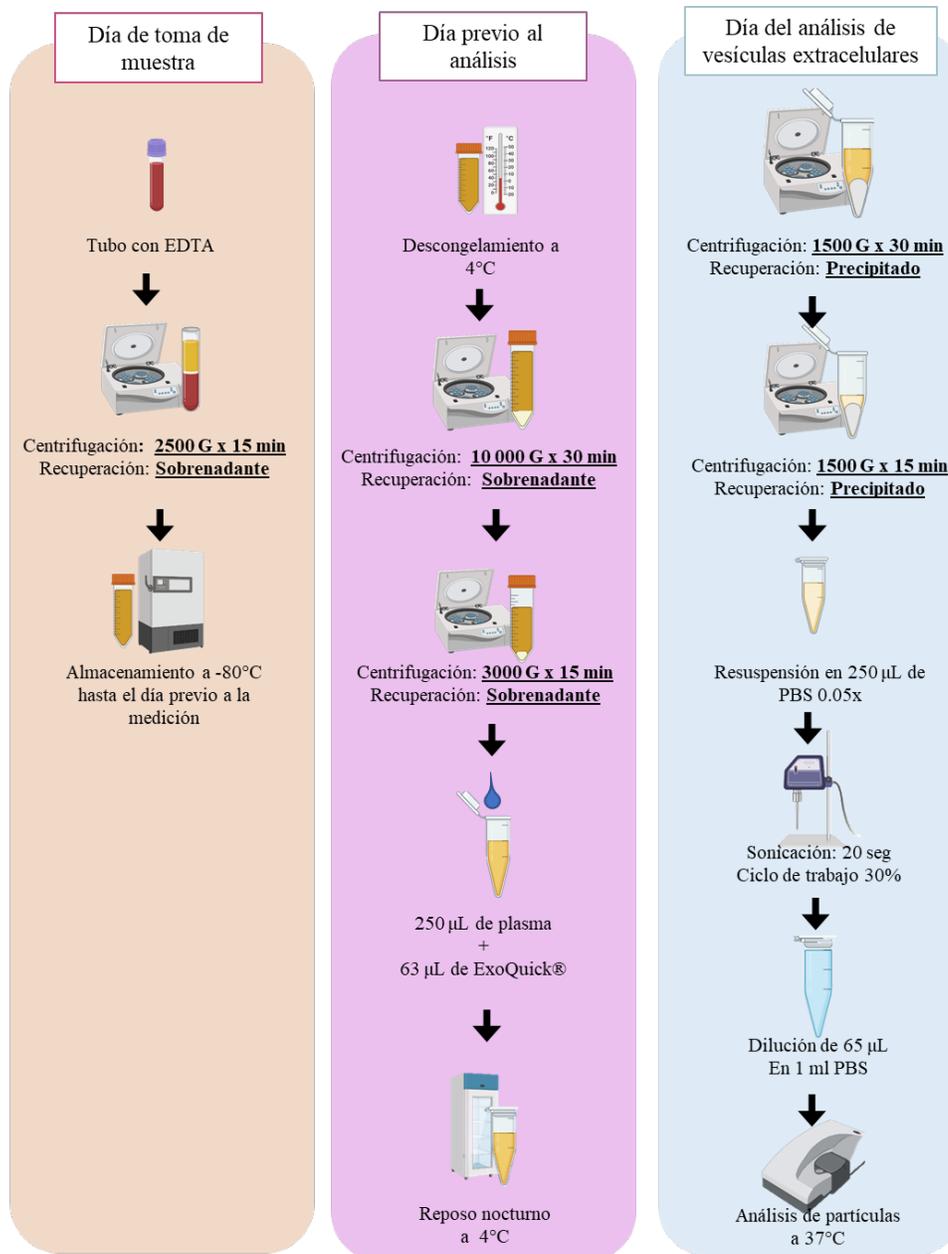


Figura 3.- Protocolo de aislamiento y análisis de vesículas extracelulares

Para el aislamiento de las VE se empleó el kit comercial ExoQuick®, siguiendo las instrucciones del fabricante (Helwa *et al.*, 2017). Una vez aisladas, las VE fueron resuspendidas en PBS 0.05X y sonicadas por 20 segundos con un ciclo de trabajo de 30%. Las mediciones de los parámetros biofísicos se llevaron a cabo en el equipo Möbius® (Wyatt Technology) a 37 °C, empleando las técnicas de DLS, para su tamaño y porcentaje de intensidad, y ELS, para su potencial zeta. Los resultados fueron analizados con el software DYNAMICS® (Wyatt Technology), donde se

definieron los criterios para las poblaciones VE como: vesículas extracelulares pequeñas (VEp), a las nanopartículas identificadas en un rango de 10 a 100 nm de radio hidrodinámico, y vesículas extracelulares grandes (VEg), a las nanopartículas identificadas en un rango de 100 a 500 nm de radio hidrodinámico. En la Figura 3 se puede observar un esquema del protocolo empleado para el aislamiento de las VE y su preparación para la medición de sus parámetros biofísicos.

5.5. Análisis Estadísticos

Para los análisis estadísticos se empleó el software STATA® en su versión 15.1 (StataCorp). En los análisis descriptivos, los datos numéricos se reportaron como medias \pm desviaciones estándar y los datos categóricos como frecuencias (n). En los análisis comparativos se reportaron medianas y rangos intercuartílicos (RIQ). Para comparar los cambios en la composición corporal y los parámetros biofísicos al inicio y tras seis meses de intervención, se realizaron pruebas de hipótesis de Wilcoxon para datos pareados no paramétricos (Gaddis and Gaddis, 1990). En el caso de los resultados de densitometría ósea, se estratificó según el estado fértil de las mujeres como pre o posmenopáusicas y posteriormente se compararon los cambios antes y después de la intervención dentro de cada grupo con la prueba de Wilcoxon para datos pareados no paramétricos. Se consideró significativo un valor de p de dos colas menor o igual a 0.05.

Para la búsqueda de asociación entre las variables de interés y posibles predictoras, se realizaron modelos de regresión lineal de efectos mixtos (Cnaan *et al.*, 2005). Las variables independientes y las posibles variables de confusión fueron analizadas mediante regresión lineal bivariada de efectos mixtos y sus resultados fueron evaluados mediante un criterio estadístico ($p < 0.2$) y de plausibilidad biológica. Las variables seleccionadas por dichos criterios fueron ajustadas al modelo mediante el método de selección por pasos con valores de entrada ($p \leq 0.05$) y de salida ($p > 0.05$). Los modelos preliminares fueron evaluados para buscar correlación o interacción entre sus variables predictoras, mediante una matriz de correlación considerando una asociación fuerte a aquellas con $r > 0.6$. A los modelos resultantes se les evaluaron los supuestos de linealidad, homocedasticidad y normalidad a través de gráficas de residuales. Para los modelos donde se encontró una asociación entre las variables dependientes y las variables predictoras de interés, pero no de variables descritas como

importantes en la literatura, se generaron segundos modelos forzando la inclusión de éstas últimas como predictoras para valorar cambios en la significancia estadística de la asociación entre las variables de interés.

Los parámetros de densitometría ósea empleados como variables dependientes en cada modelo fueron: CMO corporal total, DMO corporal total; CMO, DMO y puntaje Z de columna lumbar (vértebras L1 a L4); CMO, DMO y puntaje Z del cuello del fémur; CMO, DMO y puntaje Z total de la cadera. En el caso de las posmenopáusicas también se emplearon los puntajes T de columna lumbar (vértebras L1 a L4), cuello de fémur y cadera total. Los parámetros biofísicos empleados como variables independientes fueron el potencial zeta de las VE, el diámetro hidrodinámico medio total, así como para las poblaciones de VE_p y VE_g, y los porcentajes de intensidad para las población de VE_p y VE_g. Las posibles variables de confusión evaluadas fueron: el tiempo de medición (0 y 6 meses posteriores al diagnóstico), la edad de las voluntarias, los minutos de actividad física realizados a la semana, el peso, el índice de masa grasa, la masa grasa visceral, el índice de masa muscular apendicular, la ingesta diaria de café, el estado pre o postmenopáusico, el tiempo de uso de anticonceptivos hormonales, los marcadores tumorales —ER, PR, HER2 y el ki67 (éste último reportado como menor o mayor a 14% según lo encontrado en los expedientes clínicos)— del tumor, el grado tumoral, las clasificaciones clínica y molecular del tumor, y su puntuación BI-RADS al momento de la detección. Las variables de ajuste cuya inclusión se forzó en el segundo modelo por su importancia biológica fueron la edad, el estado fértil y el peso (Howe *et al.*, 2004; Papastavrou *et al.*, 2020; Qiao *et al.*, 2020).

Para explorar la asociación entre los parámetros biofísicos y las características clínicas e histopatológicas de las neoplasias, se realizaron modelos de regresión lineal de efectos mixtos empleando el mismo protocolo descrito en el párrafo anterior. Las variables dependientes fueron: potencial zeta de VE, diámetro hidrodinámico de las VE, diámetro hidrodinámico de las VE_p, diámetro hidrodinámico de las VE_g, porcentaje de intensidad de las VE_p y porcentaje de intensidad de las VE_g. Las variables independientes fueron: los marcadores tumorales, el grado tumoral, la clasificaciones clínica y molecular del tumor, y su puntuación BI-RADS al momento de la detección. Las posibles variables de confusión evaluadas fueron: el tiempo de medición (0 y 6 meses posteriores al diagnóstico), el tiempo de congelamiento de las muestras en meses, la temperatura al momento de la medición, la edad de las voluntarias, los minutos de actividad física realizados a la semana, el peso, el índice de masa grasa, la masa grasa visceral, el índice de masa

muscular apendicular y el estado pre o postmenopáusico. Las variables de ajuste cuya inclusión se forzó en el segundo modelo por su importancia biológica fueron la temperatura de la suspensión al momento de la medición de los parámetros biofísicos y el tiempo de congelación de las muestras plasmáticas (Qin *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2015).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características clínicas y socioeconómicas de las voluntarias al momento de su reclutamiento para el proyecto primario se encuentran en el Cuadro 2. De las 36 voluntarias reclutadas, 16 contaron con los criterios de inclusión para participar en este estudio (Figura 4). Todas se sometieron a algún procedimiento quirúrgico: 5 a cuadrantectomía, 10 a mastectomía y 1 de ellas a mastectomía bilateral; 12 tuvieron su cirugía previa a la intervención nutricional y 4 tuvieron su cirugía durante la misma.

Cuadro 2.- Características clínicas y socioeconómicas de las voluntarias al inicio de la intervención

	Premenopausia (n=9)		Posmenopausia (n=7)	
	Media	D.E.	Media	D.E.
Edad (años cumplidos)	39.66	4.52	61	4.61
Peso (kg)	75.54	16.27	68.72	14.29
Índice de masa corporal (kg/m ²)	29.35	5.85	26.72	4.42
Índice cintura-cadera	0.81	0.063	0.86	0.065
Ingresos familiares a la semana (pesos MXN)	1927.7	1143.7	4278.5	3004.4
Escolaridad (n)				
Primaria	2		1	
Secundaria	4		1	
Preparatoria	0		2	
Licenciatura/Carrera técnica	3		3	
Ocupación (n)				
Ama de casa	5		2	
Empleada	3		3	
Empresaria	0		2	
Jornalera	1		0	
MST (n)				
Con riesgo de desnutrición	2		1	
Sin riesgo de desnutrición	7		6	
VGS (n)				
Estado nutricional adecuado	3		4	
Desnutrición leve	6		3	

D.E.: Desviación estándar. MST: *Malnutrition screening tool*. VSG: Valoración global subjetiva

Cuadro 2.- Características clínicas y socioeconómicas de las voluntarias al inicio de la intervención (Continuación)

	Premenopausia (n=9)	Posmenopausia (n=7)
IPAQ (n)		
Bajo nivel de actividad física	5	5
Nivel moderado de actividad física	4	2
Lado de la neoplasia (n)		
Seno derecho	4	2
Seno izquierdo	4	5
Bilateral	1	0
Clasificación clínica (n)		
Adenocarcinoma ductal in situ	1	0
Adenocarcinoma ductal infiltrante	7	6
Carcinoma lobulillar infiltrante	1	1
Gradación del tumor (n)		
Grado 1	1	1
Grado 2	6	6
Grado 3	2	0
Clasificación molecular del tumor (n)		
Luminal A	3	4
Luminal B	4	2
Her2/Neu positivo	1	1
Triple negativo	1	0
Sesiones de radioterapia* (n)		
0	2	1
15	1	1
25	6	5
Ciclos de quimioterapia* (n)		
0	0	2
4	0	1
6	4	1
7	0	1
8	5	2

*Durante los primeros seis meses de tratamiento antineoplásico junto a los cuales se administró la intervención nutricional clínica. IPAQ: *International Physical Activity Questionnaire*.

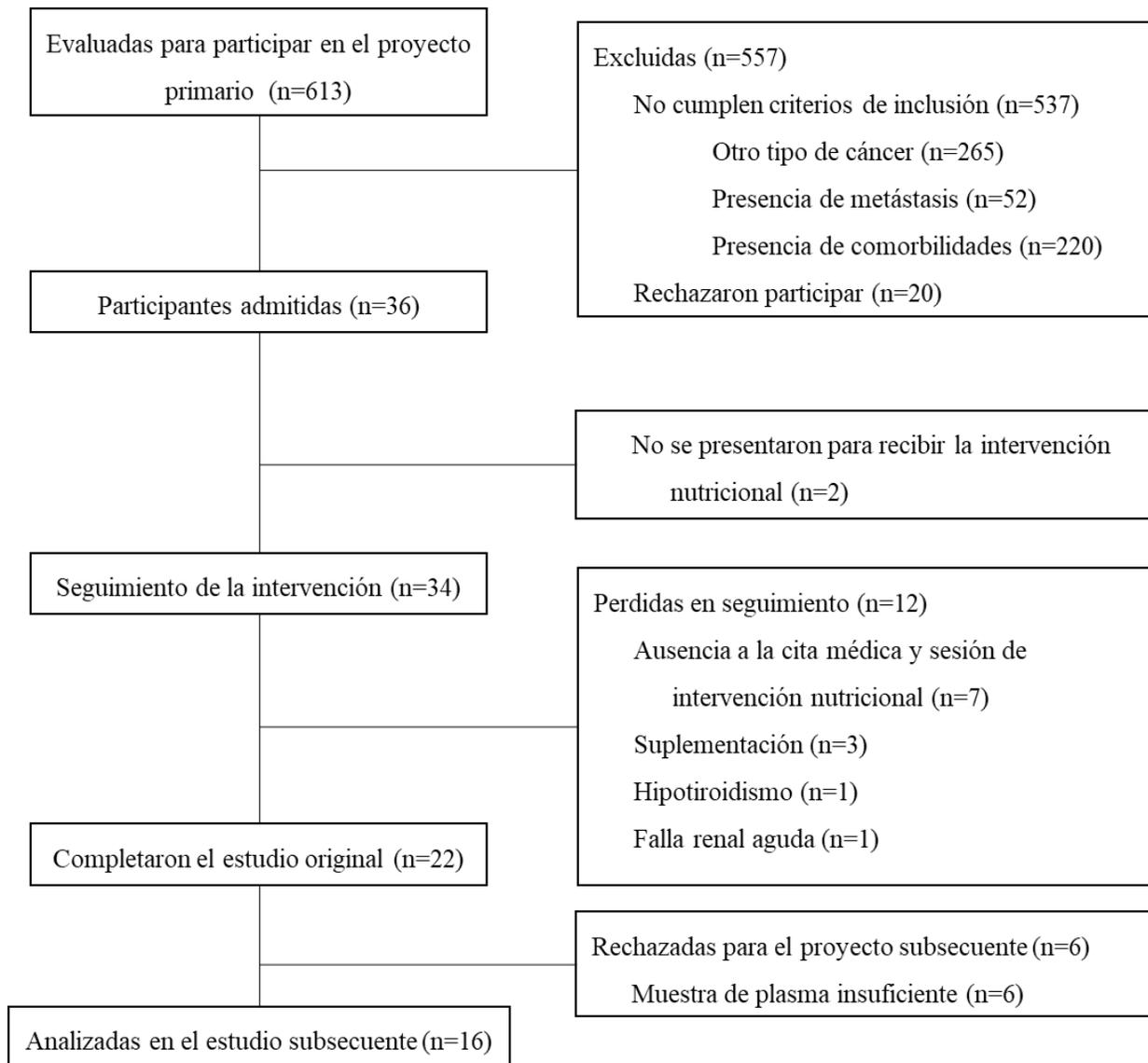


Figura 4.- Diagrama CONSORT del estudio.

6.1 Cambios en Composición Corporal tras la Intervención Nutricional Clínica

Las voluntarias presentaron una mejoría significativa ($P < 0.05$) en todos los parámetros de composición corporal y de hábitos saludables después de la intervención nutricional clínica durante seis meses y el acompañamiento de tratamiento antineoplásico, respecto a su condición inicial; excepto para los parámetros de índice de masa muscular apendicular e índice de cintura cadera, que permanecieron sin cambio ($P > 0.05$) (Cuadro 3). Con base en su IMC y empleando los criterios

de la OMS, al iniciar el tratamiento antineoplásico y la intervención nutricional, siete mujeres presentaban obesidad (43.7%), tres clasificaban con sobrepeso (18.7%) y las seis restantes con normopeso (37.6%). Al concluir la intervención, todas las pacientes con obesidad habían reducido su peso corporal y todas las pacientes con normopeso se mantuvieron en dicha clasificación, encontrando a cuatro con obesidad (25%), cinco con sobrepeso (31.2%) y siete con normopeso (43.8%).

Cuadro 3.- Comparación en los parámetros de composición corporal y hábitos saludables antes y después de la intervención (n=16)

	0 meses de tratamiento		6 meses de tratamiento		p*
	Mediana	(IQR)	Mediana	(IQR)	
Peso (kg)	72.55	20.8	69.65	17.75	0.002
Índice de masa corporal (kg/m ²)	26.48	7.94	26.28	7.12	0.002
Masa grasa (%)	41.6	6.8	39.35	7.25	0.030
Masa grasa visceral (kg)	2.61	2.14	2.47	1.6	0.001
Índice de masa grasa (kg/m ²)	11.11	5	10.18	5.56	0.002
Índice de masa muscular apendicular (kg/m ²)	5.16	1.62	5.07	1.31	0.062
Índice de cintura cadera	0.82	0.1	0.81	0.075	0.600
Minutos de actividad física a la semana	0	150	250	255	<0.001
Ingesta diaria de agua (l)	1	0.75	2	0.5	<0.001
Horas de sueño diarias	7	1.5	7.5	1	0.010

*Valores de P obtenidos en la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas no paramétricas.
IQR: rangos intercuartílicos.

En México, la prevalencia de obesidad en mujeres mayores a 20 años es de 40.2% y la de sobrepeso de 36% (Shama-Levy *et al.*, 2020). Porcentajes similares se han reportado para pacientes con cáncer de mama (Reyes Barreto *et al.*, 2016). Al inicio de la intervención, en nuestra muestra se encontró una prevalencia similar a la reportada de obesidad, aunque había más mujeres con normopeso que con sobrepeso. Esto puede deberse al tamaño de muestra reducido, pues en el proyecto primario se encontró un 27.7% con sobrepeso (Limon-Miro *et al.*, 2021).

El hecho de que nuestras voluntarias con normopeso se mantuvieran en este rango y que todas aquellas con obesidad bajaran de peso es un beneficio que podría deberse a la intervención nutricional que se les brindó durante el tratamiento antineoplásico (Limon-Miro *et al.*, 2021). Un estudio previo de nuestro grupo de trabajo encontró que en los primeros seis meses de tratamiento antineoplásico, sin ningún tipo de intervención nutricional, las mujeres premenopáusicas tuvieron un aumento de peso (Monroy-Cisneros *et al.*, 2014). Otras investigaciones también han reportado que existe una ganancia de peso durante el tratamiento antineoplásico (Fang *et al.*, 2019; Gandhi *et al.*, 2019). La obesidad se considera un factor de riesgo tanto para la aparición de cáncer de mama como para una peor evolución de éste, incluyendo un aumento en el riesgo de desarrollar metástasis (Crozier *et al.*, 2013; Iwase *et al.*, 2021; Trestini *et al.*, 2018).

En los últimos años, los análisis de composición corporal han cobrado mayor importancia en las investigaciones nutricionales con la introducción del concepto de obesidad metabólicamente saludable (Chait and den Hartigh, 2020). Éste es un tipo de obesidad donde no se detectan desbalances metabólicos, a diferencia de otros donde existe un proceso inflamatorio crónico que puede empobrecer los pronósticos de comorbilidades como la diabetes, enfermedades cardiovasculares o el cáncer (Chait and den Hartigh, 2020; Dong *et al.*, 2021). La distinción entre los obesos metabólicamente saludables y los que no lo son, radica principalmente en su adiposidad y sobre todo en los depósitos ectópicos de grasa, como el visceral o intramedular, que producen un perfil proinflamatorio (Chait and den Hartigh, 2020; Iwase *et al.*, 2021).

Nuestras voluntarias vieron una reducción en indicadores de adiposidad, como el porcentaje de grasa corporal, su índice de masa grasa y su masa grasa visceral. Se ha reportado que en las mujeres con cáncer de mama existen distintos factores, como las alteraciones metabólicas debidas al tumor o las ocasionadas por los tratamientos hormonales, que pueden aumentar la adiposidad (Iwase *et al.*, 2021). Por lo tanto, la disminución de estos indicadores podría ser otra ventaja del acompañar el tratamiento antineoplásico de una intervención nutricional (Limon-Miro *et al.*, 2021). A pesar de ello, aún se tendría que evaluar si dichos cambios se asociaron a un descenso en las citocinas proinflamatorias de las voluntarias.

La inflamación producida por el tejido adiposo tiene una estrecha relación con células del sistema inmune, particularmente los macrófagos que habitan en él (Chait and den Hartigh, 2020). Los macrófagos en el tejido adiposo proinflamatorio forman estructuras similares a coronas, donde rodean a adipocitos que cursan con algún proceso de muerte celular debido a estrés metabólico

(Maliniak *et al.*, 2021). Se ha evidenciado que en el tejido adiposo mamario de las pacientes obesas con cáncer de mama existe una mayor cantidad de macrófagos en forma de estructuras similares a coronas que en aquellas sin obesidad, aunque las implicaciones de estos hallazgos aún continúan investigándose (Maliniak *et al.*, 2021). Otro tipo de afección asociado al perfil proinflamatorio inducido por el exceso de tejido adiposo es a nivel la resistencia ósea, con el desarrollo de patologías como la obesidad osteosarcopénica donde hay una comunicación desbalanceada entre hueso, músculo y grasa (Kelly *et al.*, 2019). Incluso, debido a la estrecha relación entre la adiposidad y el cáncer de mama, se han sugerido diversos mecanismos moleculares que podrían relacionar al tejido adiposo con el ciclo vicioso de las metástasis óseas (Soni *et al.*, 2021). No obstante, se requieren de más estudios para probar estas hipótesis.

A pesar de que el diseño de la intervención del proyecto primario no incluía la modificación de otros estilos de vida además de la dieta, durante las citas de control constantemente se hicieron recomendaciones a las mujeres sobre el desarrollo de hábitos saludables. Al final de la intervención, se encontró un aumento en las horas de sueño diarias reportadas por las voluntarias. Se ha reportado que las pacientes con cáncer de mama que reciben algún tratamiento adyuvante, tienen mayor riesgo de presentar trastornos del sueño (Grayson *et al.*, 2021). Un estudio longitudinal encontró que las pacientes jóvenes con cáncer de mama presentan peores hábitos de sueño que aquellas de mayor edad, y que ambos grupos presentan peores hábitos que las mujeres de su edad sin la enfermedad. Dichos hallazgos persistieron incluso 10 años después del diagnóstico (Roine *et al.*, 2021).

Las alteraciones en los horarios del sueño y en su duración tienen implicaciones importantes para la salud, particularmente por su función en la regulación del ciclo circadiano que impacta a diversas funciones corporales, incluyendo al remodelado óseo (Swanson *et al.*, 2019). La falta de sueño se ha asociado con un mayor riesgo de presentar una baja densidad mineral ósea, sobre todo en mujeres posmenopáusicas, además de que aumenta el riesgo de caídas y de fracturas en adultos mayores (Cauley *et al.*, 2019; Swanson *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2014). Esta evidencia indica que las pacientes con cáncer de mama podrían beneficiarse de intervenciones con la intención de mejorar su higiene del sueño, aunque se requieren investigación para comprobar este supuesto.

Otro hábito saludable que presentó mejoría en las voluntarias tras la intervención fue el aumento de horas de ejercicio realizado a la semana. Habitualmente, los niveles de actividad física se reducen tras el diagnóstico de cáncer de mama (Irwin *et al.*, 2003). Además, se ha indicado que el

desempeño físico de las mujeres con cáncer de mama que recibieron tratamiento adyuvante es menor que el de la población general (Penttinen *et al.*, 2011). Los programas de actividad física en pacientes con cáncer de mama tienen múltiples beneficios, entre ellos destacan una mejora en su salud cardiovascular, en su autopercepción, en su salud sexual y en reducción de la fatiga (Effa *et al.*, 2020; Sopfe *et al.*, 2021; Wagoner *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). Se ha indicado que los programas de actividad física en pacientes sobrevivientes de cáncer pueden ayudar a mantener la masa ósea en comparación con controles (Winters-Stone *et al.*, 2010). En el caso del cáncer de mama no metastásico, una revisión sistemática concluyó que la actividad física resulta en una preservación clínica importante de la masa ósea en mujeres premenopáusicas; no así en las posmenopáusicas, población en la que hacen falta más estudios para comprender los efectos de la actividad física sobre su metabolismo óseo (Fornusek and Kilbreath, 2017). No obstante, la Sociedad Internacional de Geriátrica Oncológica recomienda la actividad física de resistencia para aumentar la funcionalidad y la densidad mineral ósea en este grupo (Body *et al.*, 2016). Por ello, creemos que las mujeres con cáncer de mama deben ser aconsejadas para combatir el sedentarismo desde los primeros meses tras el diagnóstico y contribuir a preservar su masa ósea.

6.2 Resultados de Densitometría Ósea

En general, las voluntarias vieron una disminución en su masa ósea después de seis meses de tratamiento antineoplásico, a pesar de estar recibiendo una intervención nutricional clínica (Cuadro 4). En el caso de las mujeres premenopáusicas, se observó una disminución de la DMO de columna lumbar y cadera total, mientras que en las postmenopáusicas disminuyó la DMO del cuello del fémur y en la medición de cadera total ($P < 0.05$). Diversos autores coinciden en que existe una pérdida en la DMO de las pacientes con cáncer de mama tras recibir tratamientos adyuvantes y neoadyuvantes, aunque existe evidencia contrastante sobre quiénes son los grupos más afectados (Bruning *et al.*, 1990; Christensen *et al.*, 2016; Greep *et al.*, 2003; Shapiro *et al.*, 2001).

Cuadro 4.- Comparación de los resultados de densitometría ósea antes y después de la intervención según el estado menopáusico

	Premenopáusicas (n=9)					Posmenopáusicas (n=7)				
	0 meses de tratamiento		6 meses de tratamiento		p*	0 meses de tratamiento		6 meses de tratamiento		p*
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ		Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
Corporal total										
CMO	2078.72	487.5	2119.22	457.88	0.952	2001.23	631.27	1989.44	810.6	0.310
DMO	1.177	0.109	1.173	0.114	0.678	1.18	0.389	1.17	0.275	1.000
Columna lumbar										
CMO	54.8	9.91	57.92	1.9	0.952	48.7	11.57	51.13	10.97	1.000
DMO	1.028	0.115	0.989	0.093	0.020	0.965	0.2932	0.914	0.259	0.062
Puntaje Z	0.1	1.2	-0.2	1	0.020	0.7	1.6	0.6	1.9	0.124
Puntaje T	-	-	-	-	-	-0.7	1.9	-1.2	2.4	0.148
Cuello del fémur										
CMO	3.5	0.94	3.95	0.54	0.285	2.83	1.06	2.7	0.86	0.128
DMO	0.881	0.258	0.864	0.168	0.285	0.699	0.132	0.695	0.13	0.026
Puntaje Z	0.2	1.5	0	1.5	0.331	0	1.1	-0.3	0.8	0.040
Puntaje T	-	-	-	-	-	-1.5	1.2	-1.5	0.8	0.348
Cadera total										
CMO	34.42	4.24	33.74	5.98	0.767	26.63	7.97	26.95	6.45	0.865
DMO	1.02	0.085	1.001	0.057	0.010	0.824	0.1507	0.809	0.125	0.042
Puntaje Z	0.5	0.6	0.6	0.5	0.149	0.1	2.1	0	1	0.047
Puntaje T	-	-	-	-	-	-1	1.2	-1.1	0.9	0.047

*Valores de P obtenidos en la prueba de Wilcoxon para datos pareados no paramétricos.

CMO: Contenido mineral óseo. DMO: Densidad mineral ósea. RIQ: Rangos intercuartílicos.

Shapiro y colaboradores (2001) encontraron que el decremento mediano de DMO lumbar fue del 4% tras seis meses de iniciar el tratamiento con quimioterapia, pero sólo en aquellas premenopáusicas que desarrollaron falla ovárica inducida por fármacos. Similar a ello, en nuestras voluntarias se encontró un decremento mediano del 3.7% en premenopáusicas y del 3.83% en ambos grupos, para la DMO lumbar. En un estudio publicado por Christensen *et al.* (2020) se indica que las mujeres premenopáusicas son quienes presentan una mayor pérdida de DMO, también adjudicando dichos hallazgos al desarrollo de falla ovárica, similar a lo mencionado por Bruning y colaboradores (1990), y siendo ésta la principal causa de afecciones óseas en este grupo. Se debe mencionar que una limitación importante en nuestro estudio es que no fue posible contar

con la aparición de falla ovárica en el grupo de premenopáusicas como una variable de ajuste, ni tampoco un desglose de los medicamentos que emplearon durante su tratamiento y que podrían afectar la función del ovario y/o el hueso.

En cuanto a las posmenopáusicas de nuestro proyecto, tuvieron un descenso en la DMO y en el puntaje Z del cuello de fémur a diferencia de las premenopáusicas, quienes mantuvieron sin cambios dichos valores. Ambos grupos tuvieron afecciones en la DMO total de la cadera, pero solo las posmenopáusicas vieron una disminución en su puntaje Z de esta región. Greep y colaboradores (2003) encontraron una menor DMO en mujeres posmenopáusicas que recibieron tratamiento con quimioterapéuticos en comparación que aquellas que no lo recibieron. Dos de nuestras voluntarias posmenopáusicas no recibieron quimioterapia y a pesar de eso, presentaron una disminución de DMO de cuello de fémur mayor a la mediana para su grupo, por lo que es necesario hacer más investigaciones que permitan conocer qué otros factores podrían verse involucrados. Otro estudio reportó que hubo un aumento en la DMO de las posmenopáusicas que se suplementaban con calcio y vitamina D (Christensen *et al.*, 2016). Por el diseño del proyecto primario, se solicitó a las voluntarias no emplear ninguna clase de suplementos durante la intervención. No obstante, otra limitante del estudio es que no se contó con indicadores dietarios del consumo habitual de calcio o vitamina D por parte de las voluntarias antes de comenzar la intervención. Es necesario realizar investigaciones cuyos objetivos sean analizar la efectividad de intervenciones nutricionales enfocadas al mantenimiento de la masa ósea en mujeres con cáncer de mama.

La OMS sugiere el uso del puntaje T para el diagnóstico de osteopenia y osteoporosis en mujeres postmenopáusicas. Dichos criterios no difieren en pacientes con cáncer de mama (Shapiro, 2020). El uso de inhibidores de la aromatasa (IA) induce una pérdida de masa ósea en mujeres posmenopáusicas; la pérdida de DMO en columna se desacelera tras dos años de su uso, aunque persiste en cadera total (Bouvard *et al.*, 2019; Ramchand *et al.*, 2019). Nuestras voluntarias postmenopáusicas tuvieron un descenso significativo en su puntaje T total de la cadera. Si bien, no se recabó información sobre los distintos medicamentos empleados en nuestras voluntarias como adyuvantes y lo reconocemos como una limitante del estudio, todas presentaban tumores positivos a receptores de estrógenos, por lo que es probable que emplearan IA como tratamiento hormonal.

Basándonos en las mediciones al inicio del tratamiento, solamente tres de las voluntarias postmenopáusicas se encontraban sin afecciones de la DMO, tres estaban en rango de osteopenia

y una más en rangos de osteoporosis, aunque no se conocía previamente con dicho diagnóstico. Existe poca uniformidad en las guías para la detección y tratamiento de osteoporosis y osteopenia en pacientes con cáncer de mama (Tremblay *et al.*, 2017). Además, se ha reportado que en algunos casos no hay un buen apego a dichas guías por parte de los médicos tratantes y también que puede existir un subdiagnóstico de dicha comorbilidad (Chen *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2017). Es importante hacer énfasis y divulgación de las buenas prácticas clínicas sobre el tamizaje óseo en pacientes con cáncer de mama, tanto al momento del diagnóstico como a largo plazo, ya que se ha descrito que la osteoporosis podría ser un factor de mala progresión de la enfermedad o incluso para el desarrollo de metástasis o recurrencias metastásicas (Altundag *et al.*, 2006; Mathis *et al.*, 2018). Más aún, actualmente se evalúa la utilidad de los bifosfonatos —fármacos indicados en la osteoporosis— como posibles protectores frente a la aparición de metástasis óseas en cáncer de mama (Brufsky and Mathew, 2019).

En general, todas las pacientes posmenopáusicas presentaron una disminución en el puntaje T de alguna de las tres regiones anatómicas durante la intervención (Figura 5). Al final de ésta, dos pacientes presentaban un puntaje T compatible con osteoporosis, cuatro con osteopenia y una en rango adecuado. Se ha mencionado que en las pacientes en tratamiento con IA que contaban con un puntaje T > -1 al iniciarlo, no hay un descenso hasta -2.5 tras los primeros cinco años de su uso (Bouvard *et al.*, 2019). Cabe mencionar que, aunque no se contó con nuevas densitometrías al momento de relocalizar a las pacientes, tanto la que pasó del rango de osteopenia al de osteoporosis, como una de las que pasó del rango normal al de osteopenia, se encontraban en tratamiento con bifosfonatos y seguimiento por su baja DMO. Es necesario evaluar si existen diferencias en la pérdida de DMO a largo plazo en aquellas que presentan una disminución más acelerada en los primeros meses de tratamiento y qué otras variables metabólicas, como las VE, podrían influir en dicho proceso. Hasta donde es de nuestros conocimientos, ninguna de las voluntarias ha sido detectada con recurrencia metastásica al momento de escribir esta tesis.

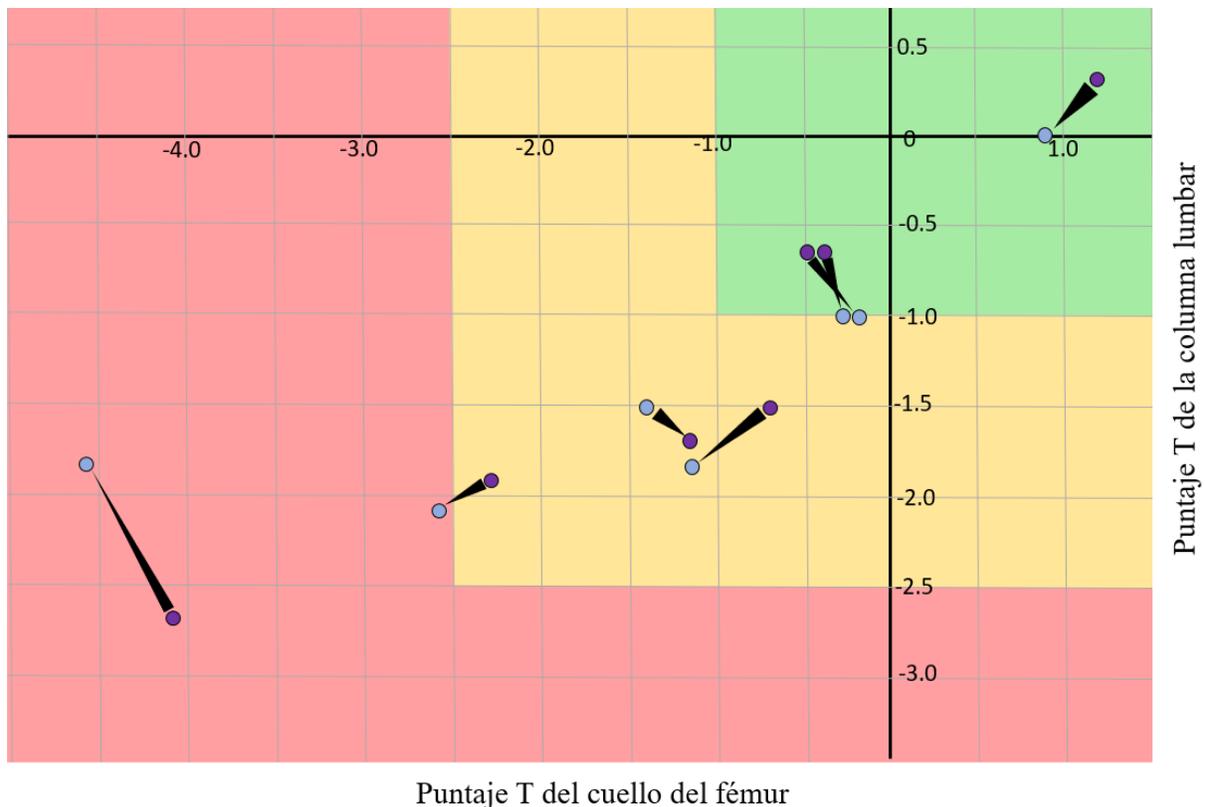


Figura 5.- Cambios en los puntajes T de las tres regiones anatómicas de las voluntarias posmenopáusicas tras los primeros 6 meses de tratamiento. En morado se indican las mediciones iniciales y en celeste las mediciones a los 6 meses. Las flechas unen las mediciones correspondientes a cada voluntaria y sus puntas indican a la medición con el menor puntaje T total de cadera. En rojo se sitúan las mediciones con un puntaje compatible con osteoporosis, en amarillo con osteopenia y en verde con densidad mineral ósea adecuada, según los criterios de la Organización Mundial de la Salud.

6.3 Parámetros Biofísicos de Vesículas Extracelulares

Los parámetros biofísicos de las vesículas extracelulares provenientes del plasma no se vieron afectados ($P > 0.05$) después de la intervención (Cuadro 5). El potencial zeta encontrado fue en promedio de -8.82 ± 1.71 mV, con un valor mínimo de -12.35 mV y máximo de -5.25 mV. Se ha reportado que el potencial zeta de las VE puede verse disminuido en muestras almacenadas con el paso del tiempo, disminuyendo su estabilidad coloidal (Qin *et al.*, 2020). En promedio, las muestras de plasma estuvieron almacenadas a -80 °C durante 50.03 ± 6.7 meses (mínimo: 36 meses y máximo: 69 meses) antes de aislar las VE. A pesar de ello, nuestros resultados son similares a los

reportados por otros estudios tanto en VE aisladas en plasma, como en cultivos celulares (Akagi *et al.*, 2015; Kato *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2020).

Cuadro 5.- Parámetros biofísicos de las vesículas extracelulares aisladas de muestras de plasma obtenidas antes y después de la intervención

	0 meses de tratamiento			6 meses de tratamiento			p*
	n	Mediana	RIQ	n	Mediana	RIQ	
Potencial zeta (mV)	16	-8.6	2.0	16	-8.6	1.6	0.37
Diametro hidrodinámico (nm) ⁺	15	141.7	77.8	16	174.1	107.5	0.33
Diametro hidrodinámico de VE _p (nm)	16	90.7	50.5	15	100.0	38.9	0.57
Diametro hidrodinámico de VE _g (nm)	10	500.5	374.9	14	500.1	273.9	0.67
Intensidad de VE _p (%)	16	36.8	37.9	16	31.3	40.7	0.83
Intensidad de VE _g (%)	16	29.4	57.0	16	31.1	53.3	0.45

*Valores de P obtenidos en la prueba de Wilcoxon para datos pareados no paramétricos.

⁺Se eliminó un dato extremo de 1790 nm.

RIQ: Rangos intercuartílicos. VE_p: poblaciones de vesículas extracelulares pequeñas. VE_g: poblaciones de vesículas extracelulares grandes

Las mediciones de potencial zeta de las VE pueden tener variaciones según los cambios en el pH, la fuerza iónica y la temperatura del solvente si no se sigue un protocolo estandarizado y reproducible (Midekessa *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2015). En nuestro caso, todas las muestras fueron analizadas con el mismo solvente y hubo muy poca variación en la temperatura al momento de las mediciones (36.7 ± 0.08 °C, mínimo: 36.6°C y máximo: 37.0°C), por lo que es válido asumir que pueden ser comparables entre sí. No obstante, el tener un consenso sobre los protocolos empleados para medir los parámetros biofísicos de las VE, podría permitir una mejor contrastación de la información, sobre todo ante distintos escenarios clínicos, como el del desarrollo de metástasis óseas.

En el caso del diámetro hidrodinámico global (n=31), se encontró una media de 187 ± 80 nm, con un mínimo de 111 nm y máximo de 428 nm. Es necesario especificar que una observación de las mediciones iniciales fue eliminada por presentar un valor extremo de 1790 nm, mayor a lo reportado para vesículas extracelulares. La técnica que se empleó para aislar las VE es reconocida por tener un alto porcentaje de recuperación, aunque una baja especificidad en su aislamiento

(Théry *et al.*, 2018). Esto se debe a que las soluciones de precipitación de VE también pueden precipitar otras partículas como lipoproteínas o agregados proteicos (Liangsupree *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2020). Algunos autores recomiendan emplear cromatografía de exclusión por tamaño, o fraccionamiento de flujo de campo, para tener una muestra más pura (Rupert *et al.*, 2017). Sin embargo, en nuestro proyecto no fue posible realizar dichas técnicas.

Las poblaciones de VEp se detectaron en 31 de las 32 muestras analizadas, no encontrándose este tipo de población en una de las muestras postintervención. El valor medio del diámetro hidrodinámico para esta población fue de 95.4 ± 45.18 nm (mínimo: 21.9 nm y máximo: 187.9 nm), mientras que su porcentaje de intensidad fue de $34.2 \pm 23\%$ (mínimo: 0% y máximo: 86.8%). Las poblaciones de VEg, por su parte, fueron detectadas en 10 muestras preintervención y en 14 muestras postintervención. Tuvieron un diámetro hidrodinámico medio de 517.4 ± 206.3 nm (mínimo: 220.6 nm y máximo: 930.4 nm) y un porcentaje de intensidad de 34.3% (mínimo: 0% y máximo: 99.4%). Las suspensiones de VE aisladas de fluidos biológicos suelen ser polidispersas (Rupert *et al.*, 2017). Es esperado que se encuentren poblaciones de diversos tamaños con un grado de homogeneidad variables en cada uno, particularmente en muestras plasmáticas donde pueden confluir VE provenientes de diversos orígenes (Kim *et al.*, 2020). Además, la disminución del potencial zeta en VE almacenadas conlleva a que éstas formen conglomerados e incluso lleguen a fusionarse, lo cual puede aumentar de forma ficticia las poblaciones de VEg y la heterogeneidad de todas las poblaciones (Qin *et al.*, 2020). Otra razón que podría explicar la heterogeneidad en nuestras muestras, es el hecho de que las células tumorales pueden liberar más poblaciones de VEg y una mayor cantidad de VE en general (Ciardiello *et al.*, 2020). No obstante, aun hacen falta estudios que permitan asegurar si la falta de homogeneidad entre las distintas poblaciones puede por sí misma tener implicaciones clínicas sobre distintos tejidos, como el óseo.

6.4 Asociación entre Resultados de Densitometría Ósea y Parámetros Biofísicos de las Vesículas Extracelulares

Los modelos de regresión lineal de efectos mixtos que asocian los parámetros biofísicos de las VE con los resultados de densitometría ósea se muestran en el Cuadro 6. De los 14 modelos generados

mediante la técnica de selección por pasos para predecir cada parámetro de densitometría ósea, seis se asociaron significativamente a algún parámetro biofísico de las VE. De éstos, sólo uno dejó de ser significativo tras forzar la inclusión de variables de importancia biológica. Ningún parámetro biofísico se asoció con el CMO de columna lumbar ni total de cadera, ni con la DMO del cuello del fémur, tampoco con el puntaje zeta de cuello de fémur o total de cadera, ni con el puntaje T de ninguna región anatómica. Por su parte, ni el potencial zeta ni el tamaño de las VE_p se asociaron a algún parámetro de la densitometría ósea.

El diámetro hidrodinámico global se asoció (β : 0.379, $p < 0.01$) al contenido mineral óseo. Dicha asociación persistió siendo significativa incluso tras ajustar por edad, peso y estado menopáusico. Las VMt son el tipo de VE más relacionadas con el CMO, ya que éstas son las responsables de la mineralización de los tejidos (Ansari *et al.*, 2021; Ross y Pawlina, 2012; Shapiro *et al.*, 2016). Se localizan en cartílagos, huesos, dientes e incluso en tejidos con calcificación patológica como las placas ateromatosas, siendo liberadas principalmente por los osteoblastos, pero también por otras células (Martin, 1992; Ross and Pawlina, 2012). Se piensa que al igual que el resto de VE, las VMt pueden tener distintas poblaciones según su biogénesis —similares a los exosomas o ectosomas— y que cada población puede tener una función predominante (Ansari *et al.*, 2021). No obstante, aún se debate hasta qué punto las VMt se relacionan con otras VE y se desconoce, si al igual que éstas, pueden ser encontradas en fluidos corporales (Ansari *et al.*, 2021; Shapiro *et al.*, 2016). Hacen falta estudios que prueben la detección de VMt como un grupo más de las VE circulantes. En caso de que se logren detectar en plasma, será necesario evaluar su relación con distintos escenarios clínicos y las afecciones en la DMO.

Debido a que las VMt pequeñas se relacionan principalmente con el proceso de mineralización primaria (Ansari *et al.*, 2021), hipotetizamos que si pudieran detectarse de forma circulante implicarían un remodelado óseo activo y se asociarían a una disminución en la DMO. En cambio a las VMt grandes se adjudican el proceso de mineralización secundaria (Ansari *et al.*, 2021), por lo que hipotetizamos que si pudieran detectarse de forma circulante implicarían un mantenimiento de la DMO. En cuanto a las subpoblaciones detectadas en nuestras voluntarias, el diámetro hidrodinámico de VE_g se asoció positivamente a la DMO de la columna lumbar (β : 0.00007, $p = 0.018$), lo cual podría reforzar esta idea. No obstante, de forma ambigua, tuvo una asociación negativa con el CMO del cuello del fémur (β : -0.0007, $p < 0.01$). Ambas asociaciones persistieron tras ajustar por peso, edad y estado menopáusico, por lo que se requieren de estudios con mayor tamaño muestral que ayuden a aclarar sus efectos sobre el hueso.

Cuadro 6.- Modelos de regresión lineal de efectos mixtos para la predicción de resultados de densitometría

	Modelo 1*		Modelo 2**	
	coef.	p	coef.	p
CMO corporal total (g)				
Diámetro hidrodinámico (nm)	0.379	<0.01	0.410	<0.01
Edad (años cumplidos)	-		-7.923	0.59
Peso (kg)	-		1.840	0.59
Estado menopáusico				
Premenopausia	-		Ref.	
Posmenopausia	-		30.806	0.93
DMO corporal total (g/cm²)				
Intensidad de las VE _p (%)	-0.0005	0.046	0.0004	0.056
Peso (kg)	0.0042	<0.01	0.004	<0.01
Edad (años cumplidos)	-		-0.001	0.78
Estado menopáusico				
Premenopausia	-		Ref.	
Posmenopausia	-		-0.003	0.98
DMO de columna lumbar (L1-L4) (g/cm²)				
Diámetro hidrodinámico de VE _g (nm)	0.00007	0.018	0.0001	<0.01
Peso (kg)	0.00637	<0.01	0.006	<0.01
Edad (años cumplidos)	-		-0.003	0.63
Estado menopáusico				
Premenopausia	-		Ref.	
Posmenopausia	-		0.035	0.78
Puntaje Z de columna lumbar (L1-L4)				
Intensidad de VE _g (%)	-0.0044	<0.01	-0.004	<0.01
Índice de masa grasa (kg/m ²)	0.1564	<0.01	0.105	0.1
Edad (años cumplidos)	-		-0.020	0.65
Peso (kg)	-		1.194	0.24
Estado menopáusico				
Premenopausia	-		Ref.	
Posmenopausia	-		0.021	0.24
CMO del cuello del fémur (g)				
Diámetro hidrodinámico de VE _g (nm)	-0.0007	<0.01	-0.001	<0.01
Edad (años cumplidos)	-0.057	<0.01	-0.080	0.01
Café (tazas diarias)	0.157	<0.01	0.077	0.056
Peso (kg)	-		0.927	0.24
Estado menopáusico				
Premenopausia	-		Ref.	
Posmenopausia	-		0.034	<0.01
DMO total de cadera (g/cm²)				
Intensidad de VE _g (%)	-0.0002	<0.01	-0.0002	0.013
Tiempo de tratamiento				
0 meses	Ref.		Ref.	
6 meses	-0.0175	<0.01	-0.015	<0.01
Estado menopáusico				
Premenopausia	Ref.		Ref.	
Posmenopausia	-0.159	<0.01	-0.201	0.03
Edad (años cumplidos)	-		0.002	0.56
Peso (kg)	-		0.001	0.21

*Modelo obtenido mediante la técnica de selección por pasos. **Modelo 1 ajustando además por variables de importancia biológica. CMO: contenido mineral óseo. DMO: Densidad mineral ósea. VE_p: poblaciones de vesículas extracelulares pequeñas. VE_g: poblaciones de vesículas extracelulares grandes. β: Coeficiente de regresión. Ref.: Variable de referencia.

En el caso del porcentaje de intensidad de las poblaciones de VEG, se asoció negativamente al puntaje zeta de la columna lumbar (β : -0.0044, $p < 0.01$) y también a la DMO total de la cadera (β : -0.0002, $p < 0.01$). Ambas asociaciones continuaron siendo significativas incluso tras ajustar por peso, edad y estado menopáusico. El porcentaje de intensidad de las poblaciones de VEP se asoció (β : -0.0005, $p < 0.046$) con la DMO corporal total ajustada por peso, pero al forzar la entrada de la edad y el estado menopáusico al modelo de regresión, esta asociación dejó de ser significativa ($p = 0.06$)

Un mayor porcentaje de intensidad refleja una mayor heterogeneidad en las poblaciones de VE (Hassan *et al.*, 2015; Jakubec *et al.*, 2020; Stetefeld *et al.*, 2016). A su vez, una mayor heterogeneidad en las poblaciones de VE implicaría que una mayor cantidad de procesos celulares están ocurriendo en ese momento (Yokoi and Ochiya, 2021). La amplia diversidad en las poblaciones de VE es uno de los principales obstáculos en su estudio, pues aún no existe un método eficaz para abordar dicho problema (Kato *et al.*, 2013; Rupert *et al.*, 2017; Théry *et al.*, 2018). Esto se vuelve particularmente difícil en estudios oncológicos, ya que el cáncer por sí mismo es un proceso celular complejo que tiene un gran impacto en la homeostasis, lo cual podría explicar el aumento en la diversidad de VE en pacientes con dicha enfermedad (Ciardiello *et al.*, 2020; Yokoi and Ochiya, 2021). A pesar de los numerosos estudios sobre VE en cáncer, pocos han abordado su heterogeneidad, por lo que se requieren más análisis cualitativos robustos para comprender este fenómeno y sus implicaciones (Yokoi and Ochiya, 2021). Todo ello dificulta conocer los mecanismos precisos por los que el aumento en este parámetro biofísico se haya asociado a una menor DMO. No obstante, suponemos que la heterogeneidad de las VE refleja un desajuste más pronunciado en el metabolismo que podría estar impactando en el hueso a través de los diversos mecanismos ya señalados a lo largo de este texto, o incluso por otros que aún se desconocen.

6.5 Asociación entre Parámetros Biofísicos de las Vesículas Extracelulares y Características de la Neoplasia

Los modelos predictivos, obtenidos mediante selección por pasos, que asocian las características de la neoplasia y los parámetros biofísicos de las VE se muestran en el Cuadro 7. Dos de estos

parámetros —el diámetro hidrodinámico medio de las VEG y el porcentaje de intensidad de las VEP— contribuyeron a predecir algunos resultados de densitometría ósea, como se discutió en la sección anterior.

El diámetro hidrodinámico medio de las VEG de pacientes con tumor triple negativo fue mayor que el de los otros tipos. Dicha diferencia fue mayor entre las VEG de mujeres con tumor Luminal A (β : -417, $p < 0.01$) que las Luminal B (β : -336.9, $p = 0.02$), e incluso más para aquellas de mujeres con tipo HER2/Neu (β : -485.9, $p < 0.01$). Dichas asociaciones persistieron significativas tras ajustar por el tiempo de congelación de las muestras y la temperatura al momento de las mediciones, salvo en los tumores Luminal B, aunque se mantuvo dicha tendencia (β : -248, $p = 0.07$).

Contrario a nuestros hallazgos, Li y colaboradores (2019) probaron un método para inferir tamaños de exosomas a partir de su viscosidad, encontrando que los exosomas de una paciente con cáncer triple negativo fueron de menor tamaño que los de una paciente con cáncer HER2/Neu positivo. Si bien, se han detectado cambios en los contenidos de las VE circulantes en plasma de pacientes con este tipo de tumores al comparar con otros, poco se ha dicho sobre diferencias en sus parámetros biofísicos (Stevic *et al.*, 2018). Es necesario realizar más estudios con tamaños de muestra mayores que permitan comprender las diferencias en los tamaños de las VE circulantes en plasma de pacientes con cáncer de mama de distintos tipos moleculares y las implicaciones clínicas que dichos hallazgos conlleven.

Se cree que la relación entre el tamaño de las VE y su contenido podría ser menos arbitraria de lo que hasta ahora se pensaba (Kim *et al.*, 2020). Kim y colaboradores (2020), al diseñar un sistema de purificación de poblaciones de VE según su tamaño, detectaron que hubo un mayor contenido de ácidos nucleicos en las VEG al comparar con otras poblaciones. Este es un dato interesante, ya que los miRNA son los tipos de cargamentos en VE circulantes que cuentan con más evidencia de intervenir en el ciclo de metástasis óseas (Taverna *et al.*, 2020). Se encontraron resultados ambiguos sobre el tamaño de las VEG como protector o perjudicial para la masa ósea, así como diferencias en dicho parámetro biofísico según el tipo molecular del tumor. Es necesario evaluar los contenidos moleculares de esta subpoblación, así como los efectos que pueden tener sobre el tamaño de las VE y cómo esto puede influir en su captación por las células óseas, pues se ha descrito que el tamaño de las VE puede modificar la cinética de su captación (Caponnetto *et al.*, 2016).

Cuadro 7.- Modelos de regresión lineal de efectos mixtos para la predicción de parámetros biofísicos de vesículas extracelulares

	Modelo 1*		Modelo 2**	
	β	p	β	p
Potencial zeta (mV)				
Sobreexpresión de HER2				
Presente	Ref.		Ref.	
Ausente	1.5906	<0.01	1.682	<0.01
Ki67				
<14%	Ref.		Ref.	
$\geq 14\%$	-0.932	0.02	-1.151	0.02
Masa grasa visceral (kg)	0.426	0.01	0.426	0.01
Tiempo de almacenamiento (meses)	-		0.0348	0.39
Temperatura en la medición ($^{\circ}\text{C}$)	-		-2.19	0.43
Diámetro hidrodinámico de VE_p (nm)				
Clasificación molecular del tumor				
HER2//Neu positivo	-44.555	0.04	-46.079	0.04
Triple negativo	Ref.		Ref.	
Tiempo de almacenamiento (meses)	-		-0.63692	0.57
Temperatura en la medición ($^{\circ}\text{C}$)	-		2.25	0.97
Diámetro hidrodinámico de VE_g (nm)				
Clasificación molecular del tumor				
Luminal A	-417	<0.01	-375.44	<0.01
Luminal B	-336.86	0.02	-248.49	0.07
HER2/Neu positivo	-485.905	<0.01	-423.64	<0.01
Triple negativo	Ref.		Ref.	
Tiempo de almacenamiento (meses)	-		-3.65	0.5
Temperatura en la medición ($^{\circ}\text{C}$)	-		417.802	0.42
Intensidad de VE_p (%)				
Clasificación molecular del tumor				
Luminal B	-15.8344	0.04	-11.56	0.19
Triple negativo	Ref.		Ref.	
Tiempo de almacenamiento (meses)	-		-0.5107	0.41
Temperatura en la medición ($^{\circ}\text{C}$)	-		44.43	0.35

*Modelo obtenido mediante la técnica de selección por pasos.

**Modelo 1 ajustando además por variables de importancia biológica.

VE_p: poblaciones de vesículas extracelulares pequeñas. VE_g: poblaciones de vesículas extracelulares grandes.

β : coeficiente de regresión. Ref.: variable de referencia.

Otros parámetros biofísicos de las VE que se asociaron al tipo molecular del tumor fueron tanto el tamaño como el porcentaje de intensidad de las VEp. Similar a las VEg, el diámetro hidrodinámico de las VEp fue menor en las voluntarias con tumores HER2/Neu que en aquellas con tumor triple negativo (β : -44.56, $p=0.04$). Kim y colaboradores (2020) reportaron que, tanto en cultivos como en muestras de plasma, las poblaciones de VEp fueron las más relacionadas al subtipo molecular HER2/Neu positivo al comparar con otros tipos moleculares. No obstante, aún se requieren estudios en muestras de mayor tamaño que permitan validar dichos hallazgos. La disminución en la homogeneidad de las VEp se infiere por un aumento en su porcentaje de intensidad en VE aisladas de pacientes con tumor triple negativo al comparar con las de tumor Luminal B (β : -15.8, $p=0.04$). Como se mencionó en la sección anterior, el porcentaje de intensidad de las VEp tuvo una asociación negativa con la DMO corporal total. Sin embargo, la asociación entre la intensidad de las VEp y el tipo molecular del tumor dejó de ser significativa al forzar la entrada de covariables al modelo (β : -11.6, $p<0.19$). Se requieren de estudios con mayor muestra que permitan la formación de modelos de regresión más robustos y permitan comprender mejor la asociación de dichos parámetros y sus implicaciones clínicas.

El potencial zeta también se asoció a la sobreexpresión del receptor HER2, así como a los cambios en el porcentaje de Ki-67, siendo ligeramente más positivo en los tumores sin sobreexpresión de HER2 (β : 1.59, $p<0.01$) y en aquellos con Ki-67 <14% (β : -0.932, $p=0.02$). Ambas asociaciones persistieron tras ajustar por la temperatura de medición y el tiempo de congelamiento de las muestras. El potencial zeta en las membranas biológicas, está dado principalmente por su composición (Bondar *et al.*, 2012). Tanto en las células cancerosas como en sus VE, se ve afectado por cambios malignos como las modificaciones en sus glúcidos de membrana (Kato *et al.*, 2013). También se ha visto que existen alteraciones en el perfil de fosfolípidos de las membranas de células cancerosas (Mukerjee *et al.*, 2021). Hartsuiker y colaboradores (2010) encontraron diferencias en la composición lipídica de células SK-BR3, un linaje con sobreexpresión HER2, y la de células MDA-MB-231, sin dicha sobreexpresión. Por su parte, Kim y colaboradores (2013) reportaron que existen diferencias en los perfiles de lípidos de células HER2/Neu positivas con un Ki-67>15% y aquellas con un Ki-67<15%. Resulta interesante que los autores mencionan no haber encontrado diferencias en la composición lipídica según la presencia o ausencia de receptores hormonales, ya que en nuestras muestras no se encontró asociación entre el potencial zeta y dicha variable. Las principales diferencias que estos autores describen entre el perfil de lípidos de una

célula a otra está en la cantidad de ácidos grasos insaturados (Hartsuiker *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013). Se ha detallado que la cantidad de ácidos grasos omega 3 puede cambiar la expresión de proteínas de membrana en células cancerosas, lo cual suponemos podría afectar a su potencial zeta (Mukerjee *et al.*, 2021). No obstante, se requieren de más estudios que prueben si dichos cambios en los perfiles lipídicos alteran significativamente al potencial zeta.

Si bien, se ha identificado que existe una relación entre el potencial zeta de las VE y el de las células de las que proceden, esta medición no es un criterio suficiente para determinar el origen tisular de las VE en plasma (Kato *et al.*, 2013). En la actualidad no hay forma de saber con precisión el origen celular de las VE circulantes, por ello se recomienda la detección de marcadores específicos en VE, como el Erb2 para el cáncer de mama, según los intereses de la investigación (Théry *et al.*, 2018). Una limitación de este estudio es que no fue posible realizar la identificación de marcadores específicos en las VE. Otra cuestión importante de señalar es que el analizador de partículas empleado no permite conocer el potencial zeta de cada VE (Kato *et al.*, 2013). Por lo tanto, no fue posible saber si todas las VE encontraron afectado su potencial zeta según la sobreexpresión de HER2 y el nivel de Ki-67 del tumor, o si dicha alteración solo ocurrió en alguna subpoblación.

Es importante señalar que ninguna de las variables independientes empleadas en este estudio se asoció con el diámetro hidrodinámico global ni con el porcentaje de intensidad de las VEg. Se requiere la búsqueda de predictores para estas variables pues, como se discutió en la sección anterior, el aumento en el porcentaje de intensidad de las VEg afectó de forma negativa a la DMO total de la cadera y al puntaje Z de la columna lumbar; y el aumento en el diámetro hidrodinámico global fue el único predictor que se encontró para el CMO, incluso ajustando por variables como el peso, la edad o el estado menopáusico. Por esta razón se expresa la necesidad de realizar otros estudios con un tamaño de muestra más grande para poder generar modelos con mayor cantidad de variables que nos permitan identificar predictores para estos parámetros biofísicos y entender mejor sus implicaciones clínicas sobre el metabolismo óseo.

7. CONCLUSIONES

Los parámetros biofísicos de las VE plasmáticas de nuestras voluntarias sí presentaron una asociación estadísticamente significativa a los resultados de sus densitometrías óseas. Más aún, las características moleculares de sus tumores impactaron a los resultados de algunos de estos parámetros biofísicos. Se destaca la asociación del tipo molecular del tumor con el diámetro hidrodinámico de las VEg y con el porcentaje de intensidad de las VEp, pues estos parámetros biofísicos presentaron asociación con los resultados de densitometría ósea. Se requieren estudios con una mayor cantidad de voluntarias, que permitan validar y caracterizar mejor estas asociaciones, así como comprender el impacto a nivel clínico y fisiológico de los parámetros biofísicos de las VE en metabolismo óseo de pacientes con cáncer de mama.

Es necesario aclarar que, aunado a las limitaciones ya mencionadas de este trabajo, durante la elaboración de este proyecto de tesis se presentaron diversas dificultades técnicas debido a las restricciones sanitarias por la pandemia de COVID-19. Por ello no fue posible realizar todas las mediciones que se tenían contempladas para cumplir con la información mínimamente requerida en publicaciones científicas sobre VE según las guías de la ISEV, principalmente la caracterización por microscopía electrónica y la detección de marcadores de membrana para identificación de VE (Théry *et al.*, 2018). No obstante, las muestras aún son conservadas en nuestro laboratorio con la intención de realizar dichas mediciones cuando la situación sanitaria lo permita.

8. RECOMENDACIONES

Consideramos importante que en futuras investigaciones sobre VE sean considerados los parámetros biofísicos de las misma, pues aún no conocemos a ciencia cierta como es que éstos afectan su función. Se debe buscar la estandarización de métodos para las mediciones de dichos parámetros. Hasta ese momento, recomendamos que se publiquen con detalle los protocolos empleados para poder garantizar su reproducción.

Otro objetivo que debería ser prioritario en las investigaciones sobre VE es encontrar la mejor manera de abordar la heterogeneidad de las VE, particularmente en contextos oncológicos. Esto sería de gran utilidad para el establecimiento de biomarcadores. Aunado a ello, sugerimos el integrar las mediciones de parámetros biofísicos, bioquímicos y moleculares en el estudio de VE como posibles biomarcadores tempranos de las metástasis óseas en pacientes con cáncer de mama. Hasta tener un mejor entendimiento y control sobre el ciclo vicioso de las metástasis óseas, en el caso de la práctica clínica, se propone que la salud del hueso debe ser tratada como algo prioritario en las evaluaciones de mujeres con cáncer de mama. También recomendamos que se aborde de forma rutinaria la adquisición de hábitos saludables por parte de las pacientes, el diseño de intervenciones nutricionales individualizadas, así como de actividad física, cuyo objetivo sea la protección contra la pérdida de masa ósea.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abramowicz, A. y Story, M. D. 2020. The long and short of it: The emerging roles of non-coding RNA in small extracellular vesicles. *Cancers*. 12(6): 1–17.
- Agurs-Collins, T., Ross, S. A. y Dunn, B. K. 2019. The Many Faces of Obesity and Its Influence on Breast Cancer Risk. *Frontiers in Oncology*. 9: 1–14.
- Akagi, T., Kato, K., Kobayashi, M., Kosaka, N., Ochiya, T. y Ichiki, T. 2015. On-chip immunoelectrophoresis of extracellular vesicles released from human breast cancer cells. *PLoS ONE*. 10(4): 1–13.
- Aleixo, G. F. P., Deal, A. M., Nyrop, K. A., Muss, H. B., Damone, E. M., Williams, G. R., Yu, H. y Shachar, S. S. 2020. Association of body composition with function in women with early breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 181(2): 411–421.
- Aleixo, G. F. P., Williams, G. R., Nyrop, K. A., Muss, H. B. y Shachar, S. S. 2019. Muscle composition and outcomes in patients with breast cancer: meta-analysis and systematic review. *Breast Cancer Research and Treatment*. 177(3): 569–579.
- Altundag, K., Harputluoglu, H. y Bulut, N. 2006. Low bone mineral density value at the time of diagnosis of primary tumor in postmenopausal patients with operable breast cancer may increase bone metastasis risk. *Medical Hypotheses*. 67 (6): 1465.
- Ansari, S., de Wildt, B. W. M., Vis, M. A. M., de Korte, C. E., Ito, K., Hofmann, S. y Yuana, Y. 2021. Matrix vesicles: Role in bone mineralization and potential use as therapeutics. *Pharmaceuticals*. 14(4): 1–27.
- Argilés, J. M., Stemmler, B., López-Soriano, F. J. y Busquets, S. 2018. Inter-tissue communication in cancer cachexia. *Nature Reviews Endocrinology*. 15(1): 9–20.
- Bagshaw, S. M. y McDermid, R. C. 2013. The role of frailty in outcomes from critical illness. *Current Opinion in Critical Care*. 19 (5): 496–503.
- Bauer, J., Capra, S. y Ferguson, M. 2002. Use of the scored Patient-Generated Subjective Global Assessment (PG-SGA) as a nutrition assessment tool in patients with cancer. *European Journal of Clinical Nutrition*. 56(8): 779–785.
- Bedatsova, L. y Drake, M. T. 2019. The skeletal impact of cancer therapies. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 85(6): 1161–1168.
- Behera, J. y Tyagi, N. 2018. Exosomes: mediators of bone diseases, protection, and therapeutics potential. *Oncoscience*. 5: 181–195.
- Body, J. J., Terpos, E., Tombal, B., Hadji, P., Arif, A., Young, A., Aapro, M. y Coleman, R. 2016. Bone health in the elderly cancer patient: A SIOG position paper. *Cancer Treatment Reviews*. 51: 46–53.
- Boivin, G., Farlay, D., Bala, Y., Doublier, A., Meunier, P. J. y Delmas, P. D. 2009. Influence of remodeling on the mineralization of bone tissue. *Osteoporosis International*. 20(6): 1023–1026.

- Bondar, O. V., Saifullina, D. V., Shakhmaeva, I. I., Mavlyutova, I. I. y Abdullin, T. I. 2012. Monitoring of the Zeta Potential of Human Cells upon Reduction in Their Viability and Interaction with Polymers. *Acta Naturae*. 4(1): 78–81.
- Bouvard, B., Confavreux, C. B., Briot, K., Bonnetterre, J., Cormier, C., Cortet, B., Hannoun-lévi, J., Hennequin, C., Javier, R., Kerbrat, P., Lespessailles, E., Lesur, A., Mayeur, D., Paccou, J. y Trémollières, F. 2019. French recommendations on strategies for preventing and treating osteoporosis induced by adjuvant breast cancer therapies. *Joint Bone Spine*. 86: 542–553.
- Brook, N., Brook, E., Dharmarajan, A., Dass, C. R. y Chan, A. 2018. Breast cancer bone metastases: pathogenesis and therapeutic targets. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 96: 63–78.
- Brufsky, A. y Mathew, A. 2019. Adjuvant bisphosphonate therapy in early-stage breast cancer — Treating the soil to kill the seed. *The Breast Journal*. 1–4.
- Bruning, P., Pit, M., de Jong-Bakker, M., van den Ende, A., Hart, A. y van Enk, A. 1990. Bone mineral density after adjuvant chemotherapy for premenopausal breast cancer. *British Journal of Cancer*. 61(2): 308–310.
- Caeiro Rey, J. R., Dapía Robleda, S., Vaquero Cervino, E., Roca Ruiz, L. y Blanco Ramos, M. A. 2005. Factores determinantes de la resistencia ósea. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Oseas*. 14(4): 67–74.
- Caponnetto, F., Manini, I., Skrap, M., Palmari-pallag, T., Loreto, C. Di, Beltrami, A. P., Cesselli, D. y Ferrari, E. 2016. Size-dependent cellular uptake of exosomes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 13(3): 1011–1020.
- Cardoso, F. y Curigliano, G. 2018. A rude awakening from tumour cells. *Nature*. 554 (7690): 35–36.
- Cardoso, F., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Rubio, I. T., Zackrisson, S. y Senkus, E. 2019. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 30(8): 1194–1220.
- Cauley, J. A., Hovey, K. M., Stone, K. L., Andrews, C. A., Barbour, K. E., Hale, L., Jackson, R. D., Johnson, K. C., Leblanc, E. S., Li, W., Zaslavsky, O., Ochs-balcom, H., Wactawski-wende, J. y Crandall, C. J. 2019. Characteristics of Self-Reported Sleep and the Risk of Falls and Fractures: The Women’s Health Initiative (WHI). *Journal of Bone and Mineral Research*. 34(3): 464–474.
- Chait, A. y den Hartigh, L. J. 2020. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 7: 1–41.
- Chapman-Novakofski, K. 2017. Nutrición y Salud Ósea. En: Mahan, L. K. y Raymond, J. L. (Editores), *Krause Dietoterapia (14a edición en español)*. Elsevier. Barcelona.
- Chen, Z., Maricic, M., Pettinger, M., Ritenbaugh, C., Lopez, A. M., Barad, D. H., Gass, M., Leboff, M. S. y Bassford, T. L. 2005. Osteoporosis and Rate of Bone Loss among Postmenopausal Survivors of Breast Cancer Results from a Subgroup in the Women’s Health Initiative Observational Study. *Cancer*. 104(7): 1520–1530.
- Chitti, S. V., Fonseka, P. y Mathivanan, S. 2018. Emerging role of extracellular vesicles in

- mediating cancer cachexia. *Biochemical Society Transactions*. 46(5): 1129–1136.
- Christensen, C. Ø., Cronin-Fenton, D., Frøslev, T., Hermann, A. P. y Ewertz, M. 2016. Change in bone mineral density during adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer. *Supportive Care in Cancer*. 24 (10): 4229–4236.
- Christensen, C. Ø., Jensen, M. B., Hermann, A. P. y Ewertz, M. 2020. Osteoporosis after adjuvant treatment for early-stage breast cancer. *Danish Medical Journal*. 67(11): 1–9.
- Ciardiello, C., Migliorino, R., Leone, A. y Budillon, A. 2020. Large extracellular vesicles: Size matters in tumor progression. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 51: 69–74.
- Clements, M. E. y Johnson, R. W. 2019. Breast Cancer Dormancy in Bone. *Current Osteoporosis Reports*. 17(5): 353–361.
- Cnaan, A., Laird, N. M. y Slasor, P. 2005. Mixed Models: Using the General Linear Mixed Model to Analyse Unbalanced Repeated Measures and Longitudinal Data. *Tutorials in Biostatistics*. 2: 127–158.
- Compston, J., Cooper, A., Cooper, C., Gittoes, N., Gregson, C., Harvey, N., Hope, S., Kanis, J. A., McCloskey, E. V., Poole, K. E. S., Reid, D. M., Selby, P., Thompson, F., Thurston, A. y Vine, N. 2017. UK clinical guideline for the prevention and treatment of osteoporosis. *Archives of Osteoporosis*. 12 (1): 43.
- Crozier, J., Moreno-Aspitia, A., Ballman, K., Dueck, A., Pockaj, B. y Perez, E. 2013. Effect of Body Mass Index (BMI) on Tumor Characteristics and Disease-Free Survival in Patients from the HER2-Positive Adjuvant Trastuzumab Trial N9831. *Cancer*. 119 (13): 2447–2454.
- De Castro Baccarin, A. L., Irene, M. N., de Iracema Gomes Cubero, D., Luz, A. S., Castro, S. N., Sordi, R., Móz, L. E. S. y Del Giglio, A. 2019. The feasibility of dexamethasone omission in weekly paclitaxel treatment for breast cancer patients. *Supportive Care in Cancer*. 27 (3): 927–931.
- Dong, S., Wang, Z., Shen, K. y Chen, X. 2021. Metabolic Syndrome and Breast Cancer: Prevalence, Treatment Response, and Prognosis. *Frontiers in Oncology*. 11: 1–21.
- Effa, C. J., Dolgoy, N. D. y Mcneely, M. L. 2020. Resistance Exercise and Art Therapy on Body Image in Breast Cancer: A Scoping Review. *Women's Health Reports*. 1: 424–435.
- Eliyatkin, N., Yalcin, E., Zengel, B., Aktaş, S. y Vardar, E. 2015. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *Journal of Breast Health*. 11 (2): 59–66.
- Eusebi, V. 2010. Classifications and Prognosis of Breast Cancer: from Morphology to Molecular Taxonomy. *The Breast Journal*. 16 (S1): S15-16.
- Fang, Q., Huang, J., Gan, L., Shen, K., Chen, X. y Wu, B. 2019. Weight Gain during Neoadjuvant Chemotherapy is Associated with Worse Outcome among the Patients with Operable Breast Cancer. *Journal of Breast Cancer*. 22 (3): 399–411.
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP y WHO. 2017. *The State of Food Security and Nutrition in the World. En: Building resilience for peace and food security.*
- Ferguson, M., Bauer, J., Gallagher, B., Capra, S., Christie, D. y Mason, B. 1999. Validation of a malnutrition screening tool for patients receiving radiotherapy. *Australasian Radiology*, 43:

325-327.

- Finkelstein, J. S., Brockwell, S. E., Mehta, V., Greendale, G. A., Sowers, M. R., Ettinger, B., Lo, J. C., Johnston, J. M., Cauley, J. A., Danielson, M. E. y Neer, R. M. 2008. Bone mineral density changes during the menopause transition in a multiethnic cohort of women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 93 (3): 861–868.
- Fornusek, C. y Kilbreath, S. 2017. Exercise for improving bone health in women treated for stages I-III breast cancer: a systematic review and meta-analyses. *J Cancer Surviv*. 11(5): 525–541.
- Fröhlich, E. 2012. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 7: 5577–5591.
- Gaddis, G. M. y Gaddis, M. L. 1990. Introduction to biostatistics: Part 5, statistical inference techniques in hypothesis testing with Nonparametric Data. *Annals of Emergency Medicine*. 19(7): 820–825.
- Gandhi, A., Copson, E., Eccles, D., Durcan, L., Howell, A., Morris, J., Howell, S., Mcdiarmid, S., Sellers, K., Evans, D. G. y Harvie, M. 2019. Predictors of weight gain in a cohort of premenopausal early breast cancer patients receiving chemotherapy. *The Breast*. 45: 1–6.
- Gowda, R., Robertson, B. M., Iyer, S., Barry, J., Dinavahi, S. S. y Robertson, G. P. 2020. The role of exosomes in metastasis and progression of melanoma. *Cancer Treatment Reviews*. 85: 101975.
- Grayson, S., Sereika, S., Harpel, C., Diego, E., Steiman, J. G., Mcauliffe, P. F. y Wesmiller, S. 2021. Factors associated with sleep disturbances in women undergoing treatment for early-stage breast cancer. *Supportive Care in Cancer*. 1–10.
- Greendale, G. A., Sternfeld, B., Huang, M. H., Han, W., Karvonen-Gutierrez, C., Ruppert, K., Cauley, J. A., Finkelstein, J. S., Jiang, S. F. y Karlamangla, A. S. 2019. Changes in body composition and weight during the menopause transition. *JCI Insight*. 4 (5): 1–14.
- Greep, N. C., Giuliano, A. E., Hansen, N. M., Taketani, T., Wang, H. J. y Singer, F. R. 2003. The effects of adjuvant chemotherapy on bone density in postmenopausal women with early breast cancer. *American Journal of Medicine*. 114(8): 653–659.
- Hagströmer, M., Oja, P. y Sjöström, M. 2006. The International Physical Activity Questionnaire (IPAQ): a study of concurrent and construct validity. *Public Health Nutrition*. 9 (6): 755–762.
- Hall, J. E. 2016. *Guyton Tratado de Fisiología Médica*. 13a edición. Elsevier.
- Han, L. C., Wang, H., Niu, F. L., Yan, J. Y. y Cai, H. F. 2019. Effect miR-214-3p on proliferation and apoptosis of breast cancer cells by targeting survivin protein. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 23 (17): 7469–7474.
- Handforth, C., D'Oronzo, S., Coleman, R. y Brown, J. 2018. *Cancer Treatment and Bone Health*. *Calcified Tissue International*. 102 (2): 251–264.
- Hannafon, B. N., Trigos, Y. D., Calloway, C. L., Zhao, Y. D., Lum, D. H., Welm, A. L., Zhao, Z. J., Blick, K. E., Dooley, W. C. y Ding, W. Q. 2016. Plasma exosome microRNAs are indicative of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 18 (1): 1–14.
- Hartsuiker, L., Zeijen, N. J. L., Terstappen, L. W. M. M. y Otto, C. 2010. A comparison of breast

- cancer tumor cells with varying expression of the Her2 / neu receptor by Raman microspectroscopic imaging. *The Analyst*. 135 (12): 3220–3226.
- Hassan, P. A., Rana, S. y Verma, G. 2015. Making sense of Brownian motion: Colloid characterization by dynamic light scattering. *Langmuir*. 31 (1): 3–12.
- Helwa, I., Cai, J., Drewry, M. D., Zimmerman, A., Dinkins, M. B., Khaled, M. L., Seremwe, M., Dismuke, W. M., Bieberich, E., Stamer, W. D., Hamrick, M. W. y Liu, Y. 2017. A comparative study of serum exosome isolation using differential ultracentrifugation and three commercial reagents. *PLoS ONE*. 12 (1): 1–22.
- Hergueta-Redondo, M. y Peinado, H. 2020. The influence of secreted factors and extracellular vesicles in ovarian cancer metastasis. *European Journal of Cancer, Supplement*. 15: 38–48.
- Hofmann, L., Ludwig, S., Vahl, J. M., Brunner, C., Hoffmann, T. K. y Theodoraki, M. N. 2020. The emerging role of exosomes in diagnosis, prognosis, and therapy in head and neck cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 21 (11): 1–22.
- Howe, T., Shea, B., Dawson, L., Downie, F., Murray, A., Ross, C., Harbpur, R., Caldwell, L. y Creed, G. 2004. Cochrane review on exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. *Europa Medicophysica*. 40 (3): 199–209.
- Hu, C. H., Sui, B. D., Du, F. Y., Shuai, Y., Zheng, C. X., Zhao, P., Yu, X. R. y Jin, Y. 2017. MIR-21 deficiency inhibits osteoclast function and prevents bone loss in mice. *Scientific Reports*. 7: 1–14.
- Huo, C., Li, Y., Qiao, Z., Shang, Z., Cao, C., Hong, Y. y Xiao, H. 2019. Comparative proteomics analysis of microvesicles in human serum for the evaluation of osteoporosis. *Electrophoresis*. 40 (14): 1839–1847.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 2020. Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre). Ciudad de México. Recuperado de: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2020/Cancermama20.pdf>
- Irwin, M. L., Crumley, D., Mctiernan, A., Baumgartner, R., Gilliland, F. D. y Ballard-barbash, R. 2003. Physical activity levels before and after a diagnosis of breast cancer: The Health, Eating, Activity, and Lifestyle (HEAL) Study. *Cancer*. 97 (7): 1746–1757.
- Iwase, T., Wang, X., Shrimanker, T. V., Kolonin, M. G. y Ueno, N. T. 2021. Body composition and breast cancer risk and treatment: mechanisms and impact. *Breast Cancer Research and Treatment*. 186 (2): 273–283.
- Jain, R. K. y Vokes, T. 2017. Dual-energy X-ray Absorptiometry. *Journal of Clinical Densitometry*. 20 (3): 291–303.
- Jakubec, M., Maple-Grødem, J., Akbari, S., Nesse, S., Halskau, Ø. y Mork-Jansson, A. E. 2020. Plasma-derived exosome-like vesicles are enriched in lyso-phospholipids and pass the blood-brain barrier. *PLoS ONE*. 15: 1–11.
- Jena, B. C. y Mandal, M. 2021. The emerging roles of exosomes in anti-cancer drug resistance and tumor progression: An insight towards tumor-microenvironment interaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1875 (1): 188488.
- Jing, B., Gai, Y., Qian, R., Liu, Z., Zhu, Z., Gao, Y., Lan, X. y An, R. 2021. Hydrophobic

- insertion - based engineering of tumor cell - derived exosomes for SPECT / NIRF imaging of colon cancer. *Journal of Nanobiotechnology*. 1–13.
- Kaczor-Urbanowicz, K. E., Wei, F., Rao, S. L., Kim, J., Shin, H., Cheng, J., Tu, M., Wong, D. T.W. y Kim, Y. 2019. Clinical validity of saliva and novel technology for cancer detection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1872 (1): 49–59.
- Kalluri, R. 2016. The biology and function of exosomes in cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 126 (4): 1208–1215.
- Kasper, D. L., Hauser, S. L., Jameson, J. L., Fauci, A. S., Longo, D. L. y Loscalzo, J. 2015. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill Education. 19a edición. Nueva York. 2454-426e – 8 pp.
- Kato, K., Kobayashi, M., Hanamura, N. y A, T. A. 2013. Electrokinetic Evaluation of Individual Exosomes by On-Chip Microcapillary Electrophoresis with Laser Dark-Field Microscopy. *Japanese Journal of Applied Physics*. 10: 1–4.
- Kelly, O. J., Gilman, J. C., Boschiero, D. y Ilich, J. Z. 2019. Osteosarcopenic obesity: Current knowledge, revised identification criteria and treatment principles. *Nutrients*. 11(4): 747.
- Kesimer, M. y Gupta, R. 2015. Physical characterization and profiling of airway epithelial derived exosomes using light scattering. *Methods*. 87: 59–63.
- Kim, D., Woo, H., Lee, C., Min, Y., Kumar, S., Sunkara, V., Jo, H., Lee, Y. J., Kim, J., Ha, H. K. y Cho, Y. 2020. EV-Ident: Identifying Tumor-Specific Extracellular Vesicles by Size Fractionation and Single-Vesicle Analysis. *Analytical Chemistry*. 92: 6010–6018.
- Kim, H., Lee, S., Shin, E., Seong, K. M., Jin, Y. W., Youn, H. y Youn, B. 2020. The Emerging Roles of Exosomes as EMT Regulators in Cancer. *Cells*. 9 (4): 861.
- Kim, I. L. C., Lee, J. H. W. A., Bang, G., Choi, S. H. O., Kim, Y. H., Kim, K. P. Y. O., Kim, H. K. y Ro, J. 2013. Lipid Profiles for HER2-positive Breast Cancer. *Anticancer research*. 33: 2467–2472.
- Kumar, V., Abbas, A. K. y Aster, J. C. 2013. *Robbins Basic Pathology*. Elsevier Sanders. Novena edición. Philadelphia.
- Larraínzar Garijo, R., Moro Álvarez, M. J., Brañas Baztán, F., Lojo Oliveira, L., De Dios Álvarez, R. M., Corella Montoya, F., Martínez Gómiz, J. M., Igualada Blázquez, C., Marín Peña, O., Murillo Vizueté, A. D., Oñorbe San Francisco, F. y Bau González, F. B. 2018. *Fracturas por fragilidad Abordaje médico-quirúrgico*. Ediciones Díaz de Santos. Primera edición. Madrid. 1-13 pp.
- Laurenzana, I., Trino, S., Lamorte, D., Girasole, M., Dinarelli, S., De Stradis, A., Grieco, V., Maietti, M., Traficante, A., Statuto, T., Villani, O., Musto, P., Sgambato, A., De Luca, L. y Caivano, A. 2021. Analysis of amount, size, protein phenotype and molecular content of circulating extracellular vesicles identifies new biomarkers in multiple myeloma. *International Journal of Nanomedicine*. 16: 3141–3160.
- Li, J. P., Zhuang, H. T., Xin, M. Y. y Zhou, Y. L. 2017. MiR-214 inhibits human mesenchymal stem cells differentiating into osteoblasts through targeting β -catenin. *European review for medical and pharmacological sciences*. 21 (21): 4777–4783.
- Li, N., Huang, Z., Zhang, X., Song, X. y Xiao, Y. 2019. Reflecting Size Differences of Exosomes

- by Using the Combination of Membrane-Targeting Viscosity Probe and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Analytical Chemistry*. 91: 15308–15316.
- Liangsupree, T., Multia, E. y Riekkola, M. 2021. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. *Journal of Chromatography A*. 1636: 461773.
- Limon-Miro, A. T., Lopez-Teros, V. y Astiazaran-Garcia, H. 2017. Dietary guidelines for breast cancer patients: A critical review. *Advances in Nutrition*. 8 (4): 613–623.
- Limon-Miro, A. T., Lopez-Teros, V. y Astiazaran-Garcia, H. 2019. Dynamic macronutrient meal-equivalent menu method: Towards individual nutrition intervention programs. *Methods and Protocols*. 2 (3): 1–11.
- Limon-Miro, A. T., Valencia, M. E., Lopez-Teros, V., Alemán-Mateo, H., Méndez-Estrada, R. O., Pacheco-Moreno, B. I. y Astiazaran-Garcia, H. 2021. An individualized food-based nutrition intervention reduces visceral and total body fat while preserving skeletal muscle mass in breast cancer patients under antineoplastic treatment. *Clinical Nutrition*. 40 (6): 4394–4403.
- Lippman, M. E. 2015. Breast Cancer. En: D. L. Kasper, A. S. Fauci, S. L. Hauser, D. L. Longo, J. L. Jameson, & J. Loscalzo (Editores), *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGrawHill Education. 19a edición. Nueva York. 523–532 pp.
- Liu, B., Tian, Y., Li, F., Zhao, Z., Jiang, X., Zhai, C., Han, X. y Zhang, L. 2016. Tumorsuppressing roles of miR-214 and miR-218 in breast cancer. *Oncology Reports*. 35 (6): 3178-3184.
- Liu, Y. y Cao, X. 2016. Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell*. 30 (5): 668–681.
- Loftus, A., Cappariello, A., George, C., Ucci, A., Shefferd, K., Green, A., Paone, R., Ponzetti, M., Delle Monache, S., Muraca, M., Teti, A. y Rucci, N. 2020. Extracellular Vesicles From Osteotropic Breast Cancer Cells Affect Bone Resident Cells. *Journal of Bone and Mineral Research*. 35 (2): 396–412.
- Longo, D. L. 2015. Approach to the patient with cancer. En D. L. Kasper, A. S. Fauci, S. L. Hauser, D. L. Longo, J. L. Jameson, & J. Loscalzo (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill Education. 19a edición. Nueva York. 467–475 pp.
- Longobardi, A., Benussi, L., Nicsanu, R., Bellini, S., Ferrari, C., Saraceno, C., Zanardini, R., Catania, M., Di Fede, G., Squitti, R., Binetti, G. y Ghidoni, R. 2021. Plasma Extracellular Vesicle Size and Concentration Are Altered in Alzheimer's Disease, Dementia With Lewy Bodies, and Frontotemporal Dementia. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9: 1–7.
- Luis Miguel, C., Alva, M. E., López-Alvarado, V. y Rojowska, A. 2019. Impacto económico de las complicaciones óseas en pacientes con cáncer de mama metastático (CAMM) en México. *Value in Health Regional Issues*. 19: S15.
- Lyu, T. S., Ahn, Y., Im, Y. J., Kim, S. S., Lee, K. H., Kim, J., Choi, Y., Lee, D., Kang, E. S., Jin, G., Hwang, J., Lee, S. I. y Cho, J. A. 2021. The characterization of exosomes from fibrosarcoma cell and the useful usage of Dynamic Light Scattering (DLS) for their evaluation. *PLoS ONE*. 16(1 1): 1–8.
- Maliniak, M. L., Miller-kleinhenz, J., Cronin-fenton, D. P., Lash, T. L., Gogineni, K., Janssen, E. A. M. y Mccullough, L. E. 2021. Crown-Like Structures in Breast Adipose Tissue: Early

- Evidence and Current Issues in Breast Cancer. *Cancers*. 13: 2222.
- Marimpietri, D., Petretto, A., Raffaghello, L., Pezzolo, A., Gagliani, C., Tacchetti, C., Mauri, P., Melioli, G. y Pistoia, V. 2013. Proteome Profiling of Neuroblastoma-Derived Exosomes Reveal the Expression of Proteins Potentially Involved in Tumor Progression. *PLoS ONE*. 8 (9): e75054.
- Marques de Menezes, E. G., Ramalho, J., Bucovsky, M., Shane, E., Yin, M. T. y Norris, P. J. 2020. Serum extracellular vesicles expressing bone activity markers associate with bone loss after HIV antiretroviral therapy. *AIDS*. 34(3): 351–361.
- Martin, B. J. 1992. Isolation and Purification of Extracellular Matrix Vesicles from Blood Vessels. *Preparative biochemistry*. 22(2): 87–103.
- Mathew, M., Zade, M., Mezghani, N., Patel, R., Wang, Y. y Momen-Heravi, F. 2020. Extracellular vesicles as biomarkers in cancer immunotherapy. *Cancers*. 12(10): 1–21.
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G. y Théry, C. 2019. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*. 21 (1): 9–17.
- Mathis, K. M., Sturgeon, K. M., Winkels, R. M., Wiskemann, J., De Souza, M. J. y Schmitz, K. H. 2018. Bone resorption and bone metastasis risk. *Medical Hypotheses*. 118: 36–41.
- Mejri, N., Benna, M., El Benna, H., Soumaya, L., Afrit, M., Zouari, B. y Boussen, H. 2018. First site of recurrence after breast cancer adjuvant treatment in the era of multimodality therapy: Which imaging for which patient during follow-up? *Breast Disease*. 37 (3): 123–132.
- Melo, S. A., Luecke, L. B., Kahlert, C., Fernandez, A. F., Gammon, S. T., Kaye, J., LeBleu, V. S., Mittendorf, E. A., Weitz, J., Rahbari, N., Reissfelder, C., Pilarsky, C., Fraga, M. F., Piwnicka-Worms, D. y Kalluri, R. 2015. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 523 (7559): 177–182.
- Mendivil Alvarado, H. 2018. Caracterización morfométrica y contenido de miRNAs en vesículas extracelulares en adultos con obesidad: una nueva generación de biomarcadores (Tesis de Maestría). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, México.
- Merchant, M. L., Rood, I. M., Deegens, J. K. J. y Klein, J. B. 2017. Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: Implications for biomarker discovery. *Nature Reviews Nephrology*. 13 (12): 731–749.
- Merz, A. A. y Cheng, S. 2016. Sex differences in cardiovascular ageing. *Heart*. 102 (11): 825–831.
- Midekessa, G., Godakumara, K., Ord, J., Viil, J., Lättekivi, F., Dissanayake, K., Kopanchuk, S., Rinken, A., Andronowska, A., Bhattacharjee, S., Rinken, T. y Fazeli, A. 2020. Zeta Potential of Extracellular Vesicles: Toward Understanding the Attributes that Determine Colloidal Stability. *ACS Omega*. 5 (27): 16701–16710.
- Mittal, S., Gupta, P., Chaluvally-Raghavan, P. y Pradeep, S. 2020. Emerging role of extracellular vesicles in immune regulation and cancer progression. *Cancers*. 12 (12): 1–16.
- Mo, Z., Cheong, J. Y. A., Xiang, L., Le, M. T. N., Grimson, A. y Zhang, D. X. 2021. Extracellular vesicle-associated organotropic metastasis. *Cell Proliferation*. 54 (1): 1–17.
- Momen-Heravi, F., Getting, S. J. y Moschos, S. A. 2018. Extracellular vesicles and their nucleic

- acids for biomarker discovery. *Pharmacology and Therapeutics*. 192: 170–187.
- Monroy-Cisneros, K., Esparza-Romero, J., Guevara-Torres, A. G., Valencia, M. E., MéndezEstrada, R. O., Tortoledo Ortiz, O., Pacheco Moreno, B. I. y Astiazarán-García, H. 2014. Impacto del tratamiento antineoplásico en el estado nutricional en pacientes con cáncer de mama. *Nutricion Hospitalaria*. 30 (4): 876–882.
- Monroy-Cisneros, K., Esparza-Romero, J., Valencia, M. E., Guevara-Torres, A. G., MéndezEstrada, R. O., Anduro-Corona, I. y Astiazarán-García, H. 2016. Antineoplastic treatment effect on bone mineral density in Mexican breast cancer patients. *BMC Cancer*. 16 (1): 1–7.
- Montazeri, A. 2008. Health-related quality of life in breast cancer patients: A bibliographic review of the literature from 1974 to 2007. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 27 (1): 1–31.
- Mota González, C., Aldana Calva, E., Bohórquez Zambrano, L. M., Martínez Medina, S. y Peralta López, J. R. 2018. Ansiedad y calidad de vida en mujeres con cáncer de mama: una revisión teórica. *Psicología y Salud*. 28 (2): 155–165.
- Mukerjee, S., Saeedan, A. S. y Ansari, M. N. 2021. Polyunsaturated Fatty Acids Mediated Regulation of Membrane Biochemistry and Tumor Cell Membrane Integrity. *Membranes*. 11 (479): 1–15.
- Muñoz-Torres, M., De La Higuera Lopez-Frias, M. y Fernández García, D. 2004. Avances en el conocimiento de la biología del osteoclasto: El sistema osteoprotegerina-ligando del RANK. *Medicina Clinica*. 122 (2): 75–77.
- Murphy, C., Withrow, J., Hunter, M., Liu, Y., Tang, Y. L., Fulzele, S. y Hamrick, M. W. 2018. Emerging role of extracellular vesicles in musculoskeletal diseases. *Molecular Aspects of Medicine*. 60: 123–128.
- Nakase, I. y Futaki, S. 2015. Combined treatment with a pH-sensitive fusogenic peptide and cationic lipids achieves enhanced cytosolic delivery of exosomes. *Scientific Reports*. 5 (1): 10112.
- Onishi, T., Hayashi, N., Theriault, R. L., Hortobagyi, G. N. y Ueno, N. T. 2010. Future directions of bone-targeted therapy for metastatic breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 7 (11): 641–651.
- Organización Panamericana de la Salud y Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médica. Pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud con seres humanos, Cuarta Edición. Ginebra: Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS); 2016.
- Osti, D., Bene, M. Del, Rappa, G., Santos, M., Matafora, V., Richichi, C., Faletti, S., Beznoussenko, G. V., Mironov, A., Bachi, A., Fornasari, L., Bongetta, D., Gaetani, P., DiMeco, F., Lorico, A. y Pelicci, G. 2019. Clinical significance of extracellular vesicles in plasma from glioblastoma patients. *Clinical Cancer Research*. 25 (1): 266–276.
- Ostolska, I. y Wiśniewska, M. 2014. Application of the zeta potential measurements to explanation of colloidal Cr₂O₃ stability mechanism in the presence of the ionic polyamino acids. *Colloid and Polymer Science*. 292 (10): 2453–2464.

- Pan, H., Gray, R., Braybrooke, J., Davies, C., Taylor, C., McGale, P. y Peto, R. 2018. 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years. *New England Journal of Medicine*. 377 (19): 1836–1846.
- Papastavrou, A., Schmidt, I., Deng, K. y Steinmann, P. 2020. On age-dependent bone remodeling. *Journal of Biomechanics*. 109701.
- Penttinen, H., Saarto, T., Kellokumpu-Lehtinen, P., Blomqvist, C., Huovinen, R., Kautiainen, H., Järvenpää, S., Nikander, R., Idman, I., Luoto, R., Sievänen, H., Utriainen, M., Vehmanen, L., Jääskeläinen, A., Elme, A., Ruohola, J., Luoma, M. y Hakamies-Blomqvist, L. 2011. Quality of life and physical performance and activity of breast cancer patients after adjuvant treatments. *Psycho-Oncology*. 1220: 1211–1220.
- Picó, C., Serra, F., Rodríguez, A. M., Keijer, J. y Palou, A. 2019. Biomarkers of Nutrition and Health: New Tools for New Approaches. *Nutrients*. 1–30.
- Poggiana, C., Rossi, E. y Zamarchi, R. 2020. Possible role of circulating tumor cells in early detection of lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*. 12 (7): 3821–3835.
- Puglisi, F., Fontanella, C., Numico, G., Sini, V., Evangelista, L., Monetti, F., Gori, S. y Del Mastro, L. 2014. Follow-up of patients with early breast cancer: Is it time to rewrite the story? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 91 (2): 130–141.
- Pugnaroni, S., Vignini, A., Borroni, F., Sabbatinelli, J., Alia, S., Fabri, M., Taus, M., Mazzanti, L. y Berardi, R. 2020. Modifications of taste sensitivity in cancer patients: a method for the evaluations of dysgeusia. *Supportive Care in Cancer*. 28 (3): 1173–1181.
- Qiao, D., Li, Y., Liu, X., Zhang, X., Qian, X., Zhang, H., Zhang, G. y Wang, C. 2020. Association of obesity with bone mineral density and osteoporosis in adults: a systematic review and meta-analysis. *Public Health*. 180: 22–28.
- Qin, B., Zhang, Q., Tuo, H., Bin, L., Mu, Z., Ju, T. y Xiong, K. 2020. How does temperature play a role in the storage of extracellular vesicles?. *Journal of Cellular Physiology*. 1–18.
- Ramchand, S. K., Cheung, Y. M. y Grossmann, M. 2019. Bone health in women with breast cancer. *Climacteric*. 22 (6): 589–595.
- Ramírez, K., Acevedo, F., Herrera, M. E., Ibáñez, C. y Sánchez, C. 2017. Actividad física y cáncer de mama: un tratamiento dirigido. *Revista Médica de Chile*. 145 (1): 75–84.
- Reyes Barreto, D., Cruz Castillo, A., Jaimez Alpízar, E., Carmona Vilcis, J., Cabrera Galeana, P., Sánchez Flores, D. y Barrera Franco, J. 2016. Prevalencia de sobrepeso y obesidad de acuerdo al Índice de Masa Corporal y el porcentaje de grasa en pacientes con cáncer de mama. *Nutr clín diet hosp*. 36 (3): 10–13.
- Roine, E., Sintonen, H., Kellokumpu-lehtinen, P., Penttinen, H., Utriainen, M., Vehmanen, L., Huovinen, R., Kautiainen, H., Nikander, R., Blomqvist, C., Hakamies-blomqvist, L. y Saarto, T. 2021. Long-term health-related quality of life of breast cancer survivors remains impaired compared to the age-matched general population especially in young women. Results from the prospective controlled BREX exercise study. *The Breast*. 59: 110–116.
- Ross, M. H. y Pawlina, W. 2012. Tejido óseo. En *Histología: Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. Medica Panamericana. 6a edición. Buenos Aires. 218–243 pp.
- Rupert, D. L. M., Claudio, V., Lässer, C. y Bally, M. 2017. Methods for the physical

- characterization and quantification of extracellular vesicles in biological samples. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1861 (1): 3164–3179.
- Russell, J. K., Jones, C. K. y Newhouse, P. A. 2019. The Role of Estrogen in Brain and Cognitive Aging. *Neurotherapeutics*. 16(3): 649–665.
- Sadegh-nejadi, S., Afrisham, R., Emamgholipour, S., Izadi, P., Eivazi, N., Tahbazlahafi, B. y Paknejad, M. 2020. Influence of plasma circulating exosomes obtained from obese women on tumorigenesis and tamoxifen resistance in MCF-7 cells. *IUBMB Life*. 1–11.
- Samuelson, I. y Vidal-Puig, A. J. 2018. Fed-EXosome: extracellular vesicles and cell–cell communication in metabolic regulation. *Essays in Biochemistry*. 62 (2): 165–175.
- Sanchez-Siles, J. M., Tamimi-Mariño, I., Cortes, A. R. G., Ackerman, J. L., González-Quevedo, D., Guerado, E., García, A., Yaghoubi, F., Abdallah, M. N., Eimar, H., Laurenti, M., AlSubaie, A. y Tamimi, F. 2020. Age related changes in the bone microstructure in patients with femoral neck fractures. *Injury*. 51 (S1): S12–18.
- Sandfeld-Paulsen, B., Jakobsen, K. R., Bæk, R., Folkersen, B. H., Rasmussen, T. R., Meldgaard, P., Varming, K., Jørgensen, M. M. y Sorensen, B. S. 2016. Exosomal proteins as diagnostic biomarkers in lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 11 (10): 1701–1710.
- Santamaria-Martos, F., Benitez, I. D., Latorre, J., Lluch, A., Moreno-Navarrete, J. M., Sabater, M., Ricart, W., Sanchez de la Torre, M., Mora, S., Fernández-Real, J. M. y Ortega, F. J. 2020. Comparative and functional analysis of plasma membrane-derived extracellular vesicles from obese vs. nonobese women. *Clinical Nutrition*. 39 (4): 1067–1076.
- Sela, J., Bab, I., Muhlrud, A., Liberman, U. A. y Deutsch, D. 1983. Extracellular matrix vesicles in rat bone after parathyroidectomy. *Cell and Tissue Research*. 228 (3): 451–457.
- Shama-Levy, T., Velma-Orozco, E., Heredia-Hernández, Q., Romero-Martínez, M., MojicaCuevas, J., Cuevas-Nasu, L., Santela-Castell, J. y Rivera-Dommarco, J. 2020. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales. Cuernavaca, México.
- Shapiro, C. L., Manola, J. y Leboff, M. 2001. Ovarian failure after adjuvant chemotherapy is associated with rapid bone loss in women with early-stage breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 19 (14): 3306–3311.
- Shapiro, C. L. 2020. Osteoporosis: A Long-Term and Late-Effect of Breast Cancer Treatments. *cancers*. 12 (3094): 1–18.
- Shapiro, I. M., Landis, W. J., Risbud, M. V, Jefferson, T. y Engineering, P. 2016. Matrix Vesicles: Are they anchored exosomes? *Bone*. 79: 29–36.
- Shemanko, C., Cong, Y. y Forsyth, A. 2016. What Is Breast in the Bone?. *International Journal of Molecular Sciences*. 17 (10): 1764.
- Sims, N. A. y Martin, T. J. 2014. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *BoneKEY Reports*. 3 (481): 1–10.
- Sims, N. A. y Martin, T. J. 2020. Osteoclasts Provide Coupling Signals to Osteoblast Lineage Cells Through Multiple Mechanisms. *Annual Review of Physiology*. 82 (1): 1–23.
- Smieszek, A., Marcinkowska, K., Pielok, A. y Sikora, M. 2020. The Role of miR-21 in Osteoblasts

- Osteoclasts. *Cells*. 9 (479): 1–21.
- Soni, S., Torvund, M. y Mandal, C. C. 2021. Molecular insights into the interplay between adiposity, breast cancer and bone metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*. 38 (2): 119–138.
- Sopfe, J., Pettigrew, J., Afghahi, A., Appiah, L. C. y Coons, H. L. 2021. Interventions to Improve Sexual Health in Women Living with and Surviving Cancer: Review and Recommendations. *Cancers*. 13 (3153): 1–25.
- Stetefeld, J., McKenna, S. A. y Patel, T. R. 2016. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*. 8 (4): 409–427.
- Stevic, I., Buescher, G. y Ricklefs, F. L. 2020. Monitoring Therapy Efficiency in Cancer through Extracellular Vesicles. *Cells*. 9 (1): 1–11.
- Stevic, I., Müller, V., Weber, K., Fasching, P. A., Karn, T., Marmé, F., Schem, C., Stickeler, E., Denkert, C., Mackelenbergh, M. Van y Salat, C. 2018. Specific microRNA signatures in exosomes of triple-negative and HER2-positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant therapy within the GeparSixto trial. *BMC Medicine*. 16: 179.
- Sun, Y., Kuek, V., Liu, Y., Tickner, J., Yuan, Y., Chen, L., Zeng, Z., Shao, M., He, W. y Xu, J. 2018. MiR-214 is an important regulator of the musculoskeletal metabolism and disease. *Journal of Cellular Physiology*. 234 (1): 231–245.
- Swanson, C., Kohrt, W., Buxton, O., Everson, C., Wright, K. J., Orwoll, E. y Shea, S. 2019. The importance of the Circadian System & Sleep for Bone Health. *Metabolism*. 84: 28–43.
- Tao, S. C. y Guo, S. C. 2019. Extracellular vesicles in bone: “dogrobbers” in the “eternal battlefield”. *Cell Communication and Signaling*. 17 (1): 1–13.
- Taverna, S., Giusti, I., D’ascenzo, S., Pizzorno, L. y Dolo, V. 2020. Breast cancer derived extracellular vesicles in bone metastasis induction and their clinical implications as biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*. 21 (10): 1–21.
- Teufel, S. y Hartmann, C. 2019. Wnt-signaling in skeletal development. En: Olsen, B. R. (Editor), *Current Topics in Developmental Biology*. Academy Press. Primera edición. Londres. 235–279.
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. 2018. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*. 7 (1): 1535750.
- Tremblay, D., Patel, V., Fifer, K. M., Caro, J., Kolodka, O., Mandelli, J. y Shapiro, C. L. 2017. Management of bone health in postmenopausal women on aromatase inhibitors (AIs): a single health care system experience. *Support Care Cancer*. 26 (1): 197–202.
- Trestini, I., Carbognin, L., Monteverdi, S., Zanelli, S., Toma, A. De, Bonaiuto, C., Nortilli, R., Fiorio, E., Pilotto, S., Di, M., Gasbarrini, A., Scambia, G., Tortora, G. y Bria, E. 2018. Clinical implication of changes in body composition and weight in patients with early-stage and metastatic breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 129: 54–66.

- Tsaras, K., Papathanasiou, I. V., Mitsi, D., Veneti, A., Kelesi, M., Zyga, S. y Fradelos, E. C. 2018. Assessment of depression and anxiety in breast cancer patients: Prevalence and associated factors. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 19 (6): 1661–1669.
- Van Niel, G., D'Angelo, G. y Raposo, G. 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 19 (4): 213–228.
- Wagoner, C., Lee, J. y Battaglini, C. 2021. Community-based exercise programs and cancer-related fatigue: a systematic review and meta-analysis. *Support Care Cancer*. 29(9): 4921–4929.
- Wang, J., Liu, Y., Sun, W., Zhang, Q., Gu, T. y Li, G. 2018. Plasma exosomes as novel biomarker for the early diagnosis of gastric cancer. *Cancer Biomarkers*. 21 (4): 805–812.
- Wang, K., Wu, Y., Yang, Y., Chen, J., Zhang, D., Hu, Y., Liu, Z., Xu, J., Shen, Q., Zhang, N., Mao, X. y Liu, C. 2014. The associations of bedtime, nocturnal, and daytime sleep duration with bone mineral density in pre- and post-menopausal women. *Endocrine*. 49(2): 538–548.
- Wang, S., Yang, T., Qiang, W., Shen, A., Zhao, Z., Chen, X., Xi, C., Liu, H. y Guo, F. 2021. Effectiveness of physical exercise on the cardiovascular system in breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Complement Ther Clin Pract*. 9 (44): 101426.
- Wang, Y., Zhang, L., Li, Y., Chen, L., Wang, X., Guo, W., Zhang, X., Qin, G., He, S., Zimmerman, A., Liu, Y., Kim, I., Weintraub, N. L. y Tang, Y. 2015. Exosomes/microvesicles from induced pluripotent stem cells deliver cardioprotective miRNAs and prevent cardiomyocyte apoptosis in the ischemic myocardium. *International Journal of Cardiology*. 192: 61–69.
- Winters-Stone, K., Schwartz, A. y Nail, L. 2010. A review of exercise interventions to improve bone health in adult cancer survivors. *J Cancer Surviv*. 4 (3): 187–201.
- Yang, M., Liu, C. y Yu, X. 2019. Skeletal-related adverse events during bone metastasis of breast cancer: current status. *Discovery medicine*. 27 (149): 211–220.
- Yi, S. J., Li, L. L. y Tu, W. B. 2016. MiR-214 negatively regulates proliferation and WNT/ β -catenin signaling in breast cancer. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 20 (24): 5148–5154.
- Yip, C., Dinkel, C., Mahajan, A., Siddique, M., Cook, G. J. R. y Goh, V. 2015. Imaging body composition in cancer patients: visceral obesity, sarcopenia and sarcopenic obesity may impact on clinical outcome. *Insights into Imaging*. 6 (4): 489–497.
- Yokoi, A. y Ochiya, T. 2021. Exosomes and extracellular vesicles: Rethinking the essential values in cancer biology. *Seminars in Cancer Biology*. 1–13.
- Zhang, Y., Deng, Z., Lou, D., Wang, Y., Wang, R., Hu, R., Zhang, X., Zhu, Q., Chen, Y. y Liu, F. 2020. High-Efficiency Separation of Extracellular Vesicles from Lipoproteins in Plasma by Agarose Gel Electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 92: 7493–7499.
- Zhou, Q., Xie, F., Zhou, B., Li, C., Kang, Y., Wu, B., Li, L. y Dai, R. 2020. Fetal bovine serum derived exosomes regulate the adipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells in a cross-species manner. *Differentiation*. 115: 11–21.