

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación en
Biomedicina y Bionanotecnología**

**Funcionalización de exosomas con las subunidades de
integrinas αv y $\beta 5$ mediante la modificación genética de
células 293T**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Arturo Hernández García

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por

Arturo Hernández García

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier

Director de tesis

Miembros del comité

Dra. Patricia Juárez Camacho

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez

Dr. Rubén Darío Cadena Nava

Dr. Benjamín Barón Sevilla



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez

Directora de Estudios de Posgrado

Arturo Hernández García © 2018

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis

Resumen de la tesis que presenta **Arturo Hernández García** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

Funcionalización de exosomas con las subunidades de integrinas α_v y β_5 mediante la modificación genética de células 293T

Resumen aprobado por:

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Director de tesis

El cáncer es la proliferación de células sin control, la invasión por parte de éstas al tejido y su posterior diseminación a otros tejidos. Es un problema nacional y mundial por la alta incidencia y mortalidad. El principal culpable de las muertes por cáncer es la metástasis, mecanismo de la célula para invadir y formar tumores en tejidos secundarios. El proceso para que se genere metástasis es muy complicado, es por eso que las células cancerígenas necesitan la producción de moléculas como citocinas, factores de crecimiento y exosomas, que generarán un microambiente favorable para la proliferación de las células cancerígenas, conocido como el nicho pre-metastático. Los exosomas son nano-vesículas con membrana bilipídicas con tamaños de 30 a 150 nm que funcionan como medio de comunicación entre las células, llevando en su interior distintos tipos de moléculas. Además, los exosomas ayudan en la generación del nicho pre-metastático al interactuar con el tejido secundario para colonizar, y las moléculas encargadas de darles el organotropismo son las integrinas. Se han realizado estudios con ingeniería en exosomas como tratamiento contra células cancerígenas. El objetivo del presente estudio es producir exosomas funcionalizados con sobre-expresión de las subunidades de las integrinas α_v y β_5 , al modificar genéticamente células 293T para la sobre-expresión de éstas integrinas. En el presente trabajo se estandarizó el método de aislamiento de exosomas a partir de células en cultivo y se generaron dos plásmidos lentivirales, cada uno con la secuencia codificante de las subunidades α_v y β_5 , para la transducción en las células 293T. Se realizó la modificación genética de las células 293T para la expresión de la integrina subunidad β_5 y se aislaron exosomas a partir de cultivos de éstas células. Los exosomas se caracterizaron respecto al diámetro y presencia de proteínas, con diámetros de 100 nm. Finalmente se confirmó la presencia de la integrina subunidad β_5 .

Palabras clave: cáncer, nicho pre-metastático, exosomas, integrinas.

Abstract of the thesis presented by **Arturo Hernández García** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology.

Exosomes functionalization with integrins α_v and β_5 subunits by genetic modification in 293T cells

Abstract approved by:

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Thesis Director

Cancer is the uncontrolled growth of cells, their complete tissue invasion and their spread to other tissues. It is a national and worldwide problem due to the high incidence and mortality. The principal cause of death by cancer is the metastasis, cell mechanism to invade and establish tumors in secondary tissues. It is very complicated to generate metastasis, that is why cancer cells need the emission of cytokines, growth factors and exosomes, this generate a favorable microenvironment to cancer cell proliferation known as pre-metastatic niche. The exosomes are membrane lipid bilayer nano-vesicles 30-150nm diameter. Exosomes function as cell communication carrying different kind of molecules. Exosomes interact with de secondary tissue to colonize helping in the pre-metastatic niche generation. Integrins are the molecules responsible to give the exosome's organotropism. It have been showed studies with engineered exosomes as a treatment against cancer cells. The project aim is to produce functionalized exosomes with the integrins subunit α_v β_5 , genetic modifying 293T to overexpress these integrins. The exosome's isolation method was standardized from cells in culture. Lentiviral expression plasmids were generated, one with the integrin α_v subunit coding sequence and one with the integrin β_5 subunit coding sequence. Genetic modification was made in 293T cells overexpressing the integrin β_5 subunit and exosomes were isolated from this culture cells. The exosomes were diameter and protein presence characterized, with 100nm diameters and integrin β_5 subunit presence in the exosomes.

Keywords: cancer, pre-metastatic niche, exosomes, integrins.

Dedicatoria

Para ti mamá

Para mi familia y amigos

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado, con número de registro 613816 del programa de becas del posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), al posgrado en Ciencias de la Vida y al departamento de Innovación Biomédica por darme los recursos para alcanzar mi maestría.

A mi tutor, Dr Pierrick Fournier. Muchas gracias por dedicarme tanto tiempo y esfuerzo, por darme la oportunidad de adquirir conocimientos y habilidades invaluableles. Gracias P.

A mi comité de tesis: Dra Patricia Juárez, gracias por buscar que dé siempre el máximo de mí; Dra Carmen Paniagua, gracias por su apoyo y comprensión; Dr Rubén Cadena, gracias por sus aportaciones al proyecto, además de su tiempo y lugar de trabajo para realizar parte de mis experimentos y Dr Benjamín, gracias por sus observaciones y dedicación a mi proyecto.

Al Dr Marco Ramos y la Dra Rosa Mares de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC campus Tijuana. Gracias por recibirme en su laboratorio, muchas gracias por compartirme sus reactivos, sus conocimientos y, sobre todo, su calidez humana.

Al Sr. Fransisco Ruiz del CNyN por su apoyo en la caracterización por medio de microscopía electrónica de transmisión.

A los P&P: Mitzuko, Brenda, Rodrigo, Manuel, Fernando, Florian, Danna, Juan, Gerardo, Erick, Alcira, Sharlin, Adriana, Marylu, Alicia, Paty y Pierrick. Ustedes propiciaron un ambiente agradable para trabajar.

Al equipo de laboratorio del Dr Rubén, Daniel, Erika y Alfredo, por su apoyo en el laboratorio.

Al personal administrativo del DIB por ayudarme con todo lo que estaban en sus manos y más, además gracias por pasar un tiempo muy divertido conmigo. Gracias Adriana, Gaby, Yoli, Lupita, Katy y Anabel.

Al personal técnico de laboratorio: Ricardo, Hanna y Sam. Gracias por siempre estar disponibles y contar con su apoyo en todo momento.

A los DIBinos por acompañarme en la generación de la ciencia y deporte. Kee, RAGS, Gordo, Itzae, Jorge Luis, Danna, Mitzu, Caro, Mateo, Marla, Alcira y todos los que alguna vez fueron DIBinos.

A mis camaradas: Mitzu, Gordo, Brenda, Tere, Kike, Julión, Danna, Itzae, Mateo, Gaby, Carmel, Joel, Manuel y Pablo.

A ti cobijita, gracias por todo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Antecedentes.....	1
1.1.1 Cáncer.....	1
1.1.2 Metástasis.....	2
1.1.3 Nicho pre-metastático.....	4
1.1.4 Exosomas.....	5
1.1.5 Integrinas.....	7
1.1.6 Organotropismo de exosomas.....	8
1.1.7 Funcionalización e ingeniería de exosomas como vehículo de fármacos.....	8
1.2 Justificación.....	9
1.3 Hipótesis.....	9
1.4 Objetivos.....	10
1.4.1 Objetivo general	10
1.4.2 Objetivos específico.....	10
Capítulo 2. Metodología	
2.1 Cultivo celular.....	11
2.1.1 Tiempo de proliferación celular.....	11
2.1.2 Formulación de medio condicionado.....	12
2.1.3 Curvas de mortalidad.....	12
2.2 Análisis de la expresión de las integrinas por citometría de flujo.....	13
2.2.1 Titulación de anticuerpos.....	13
2.2.2 Preparación de células y teñido con anticuerpos.....	13
2.2.3 Lectura de citómetro de flujo.....	13

2.3 PCR cuantitativo (qPCR).....	14
2.3.1 Extracción de RNA.....	14
2.3.2 Retrotranscripción de RNA.....	14
2.3.3 Reacción de qPCR.....	14
2.4 Subclonación para el desarrollo de vectores de expresión.....	14
2.4.1 Transformación de bacterias.....	15
2.4.2 Extracción de plásmidos Miniprep.....	15
2.4.3 Lisis alcalina para la extracción de plásmido.....	15
2.4.4 Amplificación de secuencia de interés mediante PCR.....	16
2.4.5 Purificación de productos de PCR.....	16
2.4.6 Linearización y ensamblaje de plásmido.....	16
2.4.7 Ensamblaje de plásmido.....	18
2.4.8 Transformación en <i>E. coli</i>	18
2.4.9 PCR de colonia.....	18
2.5 Transfección y transducción.....	19
2.5.1 Transfección.....	19
2.5.2 Producción de partículas lentivirales.....	19
2.5.3 Transducción.....	19
2.6 Aislamiento de exosomas.....	20
2.7 Caracterización de exosomas.....	20
2.7.1 Zetasizer nano.....	20
2.7.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	20
2.7.3 Análisis de concentración de proteínas en exosomas.....	21
2.7.4 Western blot.....	21

Capítulo 3. Resultados

3.1 Establecimiento de las condiciones para la producción de exosomas a partir de células en cultivo	22
3.1.1. Optimización de la metodología para el aislamiento de exosomas.....	22
3.1.2 Selección de línea celular para funcionalización.....	25
3.2 Clonación vector de expresión con la subunidad de la integrina αv y expresión ésta proteína en células 293T.....	28
3.2.1 Subclonación del vector.....	28
3.2.2 Modificación de células 293T con plásmido pLentiPuroITGAV.....	30

3.3 Clonar vector de expresión con la subunidad de la integrina $\beta 5$ y expresar ésta proteína en células 293T.....	33
3.3.1 Subclonación del vector.....	33
3.3.2 Modificación de las células 293T con plásmido pLentiPuroITGB5.....	35
3.4 Aislamiento exosomas de células 293T modificadas para la expresión de las subunidades de la integrina $\alpha \beta 5$ y caracterización de la expresión de integrinas en los exosomas aislados de éstas.....	37
Capítulo 4. Discusión	
4 Discusión.....	40
Capítulo 5. Conclusiones	
5 Conclusión.....	45
Literatura citada.....	46

Lista de figuras

Figura		Página
1	Pasos de la cascada de la metástasis.....	3
2	Estructura de un exosoma.....	6
3	Microscopías representativas de líneas celulares 293T, B16-F1 y HeLa.....	23
4	TEM de exosomas.....	24
5	Tamaño de exosomas.....	25
6	Titulación de anticuerpo anti-ITGAV.....	26
7	Expresión de integrinas AV y B5.....	27
8	Geles de subclonación de ITGAV.....	28
9	Geles de PCR de colonia de plásmido pLentiPuroITGAV.....	29
10	Análisis de expresión de ITGAV por citometría de flujo.....	30
11	Western blot de proteínas de células 293T con transfección con pLentiPuroITGAV...	31
12	Mapas de plásmidos visualizados con SnapGene viewer.....	32
13	Gel de plásmido pLentiHygro linearizado.....	33
14	Gel de PCR de colonia de pLentiHygroITGB5.....	34
15	Análisis de expresión de ITGB5 por citometría de flujo.....	35
16	Gráfica de expresión de mRNA de ITGB5.....	36
17	Western blot de proteínas de células 293T con expresión de ITGB5.....	36
18	Tamaño de exosomas funcionalizados.....	37
19	TEM de exosomas funcionalizados.....	38
20	Gráfica de comparación de diámetros entre exosomas aislados de células 293T wt y 293T-B5.....	39
21	Western blot para análisis de expresión de proteína ITGB5 en exosomas.....	39

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Distintas suplementaciones para la formulación del medio condicionado.....	12
2	Concentraciones de antibióticos utilizadas en la curva de muerte.....	12
3	Oligonucleótidos diseñados.....	17
4	Densidad de células sembradas para alcanzar confluencia en un tiempo determinado.....	22
5	Viabilidad del cultivo celular sometido a las diferentes suplementaciones.....	24
6	Características de concentración de proteína y tamaño de exosomas aislados.....	25
7	Concentraciones de antibiótico para matar a las células en un tiempo determinado..	27
8	Experimentos de ensamblaje de ITGAV con diversas variantes y resultados para cada experimento.....	29
9	Experimentos de ensamblaje de ITGB5 con diversas variantes y resultados para cada experimento.....	34

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

1.1.1 Cáncer

Los organismos metazoos contienen distintos tipos de tejidos, las células que componen a éstos tejidos provienen de un mismo genoma, pero expresan un fenotipo distinto que les brinda las características anatómicas y fisiológicas para que el individuo pueda funcionar (Weinberg, 2014). Estas células tienen la capacidad de proliferar y crear la morfología de los tejidos. Sin embargo, el hecho de que las células de un tejido sean capaces de dividirse y además contengan el genoma completo del organismo, puede generar problemas graves si se presentan errores en la secuencia genómica. Estos errores pueden afectar el ciclo celular y la célula podría comenzar a dividirse sin control, hasta la formación de un tumor (Weinberg, 2014).

Según el Instituto Nacional del Cáncer de los EE. UU., la formación de tumores no siempre afecta la salud del organismo. Existen tumores benignos los cuales no se extienden de un tejido a otro y en su mayoría no representan un peligro a la salud. A diferencia de estos existen tumores malignos los cuales invaden a el tejido por completo y pueden diseminarse a otros tejidos del organismo (National Institutes of Health, 2015).

El cáncer se define como la proliferación de células sin control, la invasión del tejido y su diseminación a distintos tejidos. Según la Organización Mundial de la Salud, en 2018, el cáncer afectó a nivel mundial más de 18 millones de personas y ocasionó más de 9.5 millones de muertes. Para el caso de México la incidencia fue de 147,000 casos para ese año con una mortalidad de más de 78,000 personas (GLOBOCAN, 2018).

Los tipos de cáncer con una mayor incidencia y mortalidad a nivel nacional y mundial son los de mama, próstata, pulmonar, colorrectal, estómago, hígado y pancreático; y comunmente son cánceres conocidos por ser metastásicos (GLOBOCAN, 2018; National Institutes of Health, 2015). La capacidad de las células para formar un tumor primario, de viajar a través del sistema circulatorio, invadir a otros tejidos y formar tumores secundarios, se conoce como metástasis.

La importancia de la metástasis en el cáncer se debe principalmente a que ocasiona alrededor del 90% de las muertes ocurridas por cáncer (Mehlen y Puisieux, 2006), por lo que el estudio de la metástasis es muy importante para el desarrollo de agentes terapéuticos y la detección temprana del cáncer.

1.1.2 Metástasis

El desarrollo de la metástasis se puede dividir en distintos pasos, como se muestra en la Figura 1 (Leber y Efferth, 2009).

- **Transición Epitelial-Mesenquimal e invasión:** Las células se separan del tumor primario e invaden tejido sano adyacente.
- **Intravasación:** Introducción de células tumorales al sistema circulatorio sanguíneo o linfático.
- **Circulación:** Transporte de las células cancerígenas a través del sistema circulatorio.
- **Extravasación:** Las células cancerosas atraviesan el endotelio de los capilares y penetran hacia un órgano, o son atraídas hacia un tejido específico gracias a las moléculas de la membrana extracelular.
- **Colonización, proliferación y angiogénesis:** Es llevada a cabo cuando la célula cancerosa invasora genera un tumor secundario distante del tumor primario.

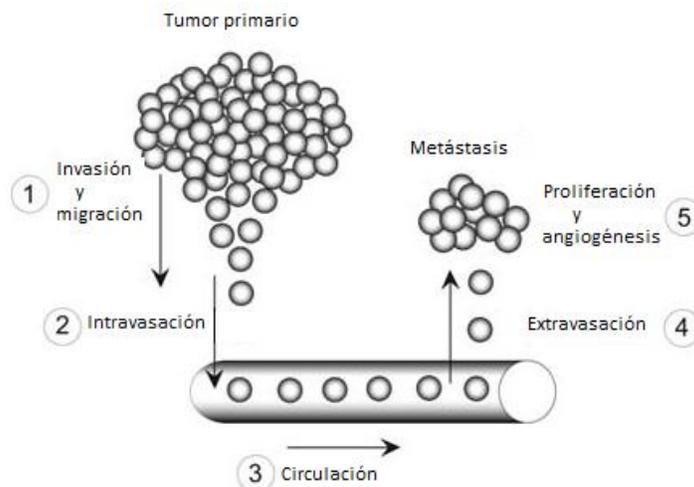


Figura 1. Pasos de la cascada de la metástasis. *Transición Epitelial-Mesenquimal e invasión:* Las células se separan del tumor primario e invaden tejido sano adyacente; *Intravasación:* Introducción de células tumorales al sistema circulatorio sanguíneo o linfático; *Circulación:* Transporte de las células cancerígenas a través del sistema circulatorio; *Extravasación:* Las células cancerosas atraviesan el endotelio de los capilares y penetran hacia un órgano, o son atraídas hacia un tejido específico gracias a las moléculas de la membrana extracelular; *Colonización, proliferación y angiogénesis:* Es llevada a cabo cuando la célula cancerosa invasora genera un tumor secundario distante del tumor primario. Imagen modificada de Leber y Efferth (2009).

El desarrollo de la metástasis es un proceso difícil de llevar a cabo por células cancerígenas. Solo menos del 0.01% de células cancerígenas que ingresan al sistema circulatorio pueden generar metástasis (Luzzi et al., 1998). Mediante un modelo de metástasis al hígado en ratones, se estudiaron la supervivencia y la proliferación de células de melanoma inyectadas en la vena mesentérica superior, solo una de cada 40 células que extravasaron logró generar micrometástasis y de las cuales solo 1 de cada 100 proliferaron para formar macrometástasis. Lo que indica que el proceso de la metástasis es un proceso ineficiente, principalmente cuando las células cancerígenas intentan proliferar en un tejido secundario (Luzzi et al., 1998).

Se han estudiado los mecanismos utilizados por células cancerígenas para contrarrestar la dificultad para el desarrollo de la metástasis en distintos tipos de cáncer, incluyendo el establecimiento del nicho pre-metastático.

1.1.3 Nicho pre-metastático

El tumor primario puede promover la migración de células derivadas de la médula ósea a distintos tejidos mediante la secreción de factores de crecimiento y citocinas, creando de ésta forma un ambiente favorable en el tejido secundario, lo que se conoce como la formación de un nicho pre-metastático (Sceneay et al., 2013). La migración de las células provenientes de médula ósea y su capacidad para formar el nicho pre-metastático, fue observada al irradiar ratones para eliminar las células de médula ósea y posteriormente trasplantar células de médula ósea con fluorescencia a los ratones. De esta manera se pudo observar el posicionamiento de las células de médula ósea en distintos tejidos por medio de microscopía óptica (Kaplan et al., 2005).

La formación del nicho pre-metastático es realizada por dos actores principales, factores secretados derivados de tumores (TDSFs por sus siglas en inglés) y células derivadas de la médula ósea (BMDCs). Los TDSFs interaccionarán con las células y la matriz extracelular del tejido a invadir, reclutando y promoviendo la movilidad de las BMDCs al órgano secundario, creando el ambiente favorable para las células metastáticas (Sceneay et al., 2013).

Oskarsson y colaboradores (2011) demostraron que la tenascina C (TNC) funciona como un TDSF, en este estudio se observó que en pacientes con cáncer de mama que tenían una alta expresión de TNC se les diagnosticaba metástasis al pulmón después de 24 meses y una vez que se haya llevado a cabo la metástasis a los pulmones la sobrevida fue de 7 meses. En forma comparativa, a los pacientes con bajas concentraciones de TNC se les diagnosticaba metástasis hasta los 56 meses, con una sobrevida de 34 meses posterior al haberse completado la metástasis. Para confirmar sus observaciones, inocularon células de cáncer de mama metastáticas a ratones y mediante shRNA realizaron un knockdown de TNC. El knockdown no modificó la capacidad de células tumorales para crecer como un tumor primario, pero en cambio sí disminuía el desarrollo de metástasis de las células cancerígenas. Estos resultados demostraron la importancia de la TNC para el desarrollo de la metástasis, corroborando a ésta molécula como una TDSF capaz de iniciar el nicho premetastático.

Otro ejemplo de TDSF producido por las células cancerígenas de mama con metástasis a hueso es la Lisil oxidasa (LOX). Se ha observado que las células cancerígenas de mama que sobreexpresan la LOX forman lesiones osteolíticas, donde las células cancerígenas podían alojarse y colonizar, dando lugar a una formación pre-metastática en el hueso. Este proceso fue corroborado al utilizar células de cáncer colorrectal, las cuales no son metastáticas y además contienen una expresión baja de LOX, y se observó

en un modelo murino, que la capacidad metastática de las células y las lesiones osteolíticas aumentaban cuando se realizó el aumento de LOX en las células de cáncer colorrectal (Cox et al., 2015).

Además de las TDSFs se ha descrito la participación de pequeñas vesículas llamadas exosomas, producidas por las células tumorales como parte del proceso de formación del nicho pre-metastático (Zhang y Wang, 2015).

1.1.4 Exosomas

Los exosomas son vesículas endocíticas de capa bilipídica, con un diámetro aproximado de 30 a 150 nm. Los exosomas pueden contener en su interior distintos tipos de proteínas, RNAs (i.e., mRNA, miRNA) y DNA. La variedad del contenido en los exosomas depende del tipo de célula y tejido que los emita los (Figura 2) (Hegmans et al., 2008; Théry et al., 2002).

Se sugiere que los exosomas provienen de los cuerpos microvesiculares que, se fusionan con la membrana plasmática y posteriormente se excretan al medio (Asfar et al., 2014). Se ha encontrado que la superfamilia de proteínas Rab y SNARE (Soluble NSF Attachment Protein Receptor, receptores de proteínas de fijación soluble de NSF) son reguladoras de las rutas de secreción de exosomas. Los estímulos por los cuales se liberan los exosomas son los cambios de pH, presencia de cerámidas y cambios en las concentraciones intracelulares de calcio (Asfar et al., 2014; Théry et al., 2002).

Los exosomas tienen distintas funciones en las células. Son capaces de actuar como señalizadores para el desarrollo de un cambio de morfología (Keller et al., 2006).

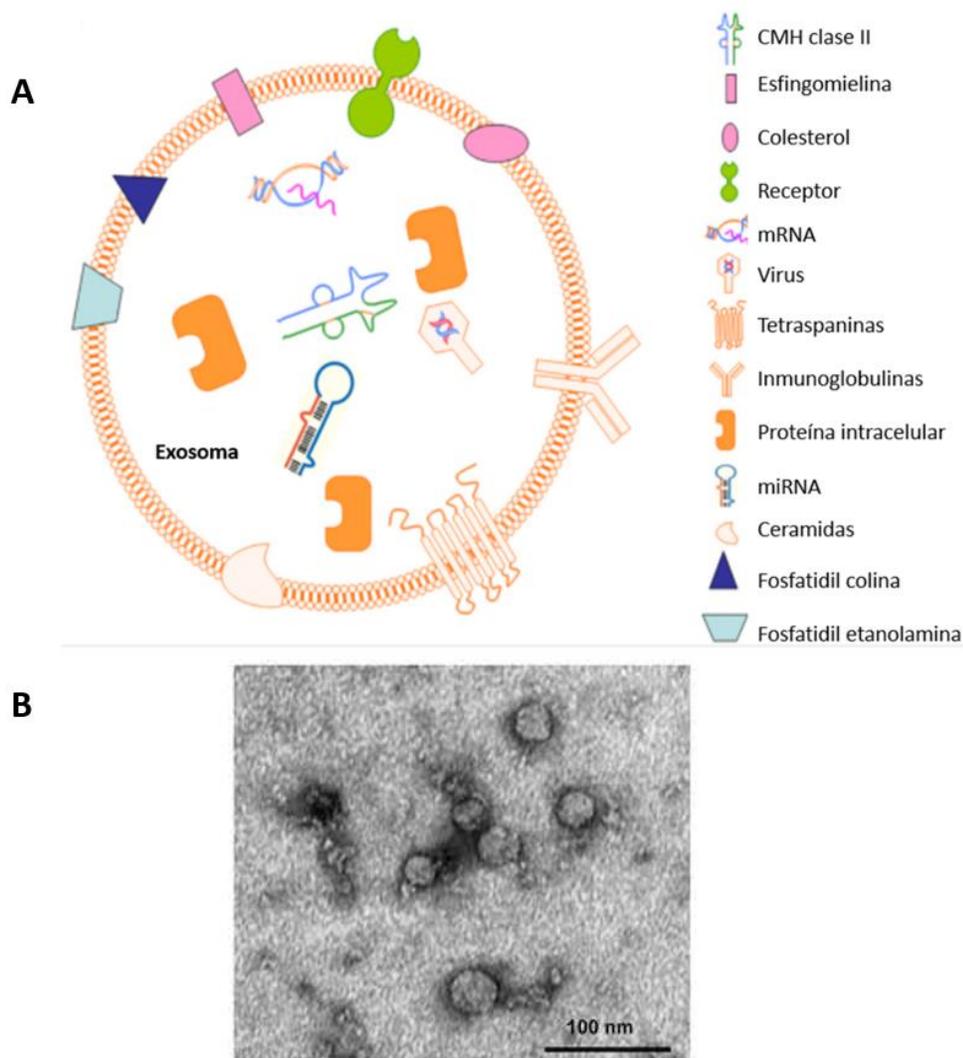


Figura 2. Estructura de un exosoma. A) Los exosomas pueden contener distintos tipos de proteínas, así como de ácidos nucleicos, dependerá su estructura principalmente por el origen de la célula que emite al exosoma. Imagen modificada de Azmi et al. 2014. B) Microscopía electrónica de transmisión de exosomas aislados de línea celular PCI-13. Imagen tomada de Muller et al. 2016

Las funciones de los exosomas son propias de las células normales y tumorales. En base a descubrimientos de la relación de los exosomas con la metástasis se ha comenzado a estudiar la participación de los exosomas en la actividad metastática y su importancia en la formación del nicho pre-metastático.

Para demostrar la importancia de los exosomas en la metástasis, experimentalmente se agregaron exosomas provenientes de cáncer pancreático a modelos murinos que posteriormente fueron inyectados con células cancerígenas de páncreas y se analizó la metástasis. En ratones inyectados con células de

cáncer pancreático, el tratamiento con exosomas provenientes de células cancerígenas aumentó la metástasis al hígado, en comparación con ratones que recibieron exosomas provenientes de células pancreáticas normales (Costa-Silva et al., 2015).

En un estudio realizado por Hoshino et al. (2015), se identificaron los mecanismos reguladores de la afinidad que tienen los exosomas por un órgano en específico. Se inocularon exosomas provenientes de células de cáncer de mama y de cáncer pancreático en ratones y se analizó su distribución en los tejidos. Los exosomas de cáncer de mama se dirigieron principalmente al pulmón interactuando con los fibroblastos y los de origen pancreático se alojaron principalmente en el hígado y se internalizaban en las células de Kupffer. Se realizó un experimento similar, en donde utilizaron exosomas provenientes de variantes de una línea celular de cáncer de mama, en la que éstas variantes tenían una afinidad por distintos órganos para generar metástasis (a pulmón, hueso y cerebro), se encontró que los exosomas se dirigían a los órganos blancos de cada variante. Por ejemplo, los exosomas aislados de una variante que desarrolla metástasis a los pulmones llegan a los pulmones, recapitulando la especificidad de órganos (Hoshino et al., 2015). Los exosomas tenían un comportamiento similar a las células de donde provenían, colonizando los órganos donde las células generaban metástasis.

En el mismo estudio se buscaron las moléculas responsables de la especificidad para los órganos blancos. Mediante un análisis de espectrometría cuantitativa de masas y posterior confirmación por Western blot se encontraron perfiles de integrinas asociadas a la diseminación de los exosomas a tejidos específicos. La integrina con una mayor expresión en exosomas que tenían un organotropismo hacia el hígado era la integrina $\alpha_v\beta_5$ y la integrina con mayor expresión en exosomas con organotropismo hacia el pulmón se trataba de la $\alpha_6\beta_4$ (Hoshino et al., 2015).

1.1.5 Integrinas

Las integrinas son heterodímeros de glucoproteínas transmembranales formadas por dos subunidades α y β . Son receptores para las proteínas de la matriz extracelular o para las moléculas de adhesión celular (CAM) y son utilizados por células animales como sensores de adhesión celular (Alberts et al., 2002).

Para que una integrina tenga la unión en su ligando se requiere de cationes divalentes, como el Ca^{2+} o el Mg^{2+} . En humanos, al tener 9 tipos de subunidades β y 24 tipos de subunidades α , es posible obtener distintos tipos de heterodímeros de integrinas. Las distintas permutas formadas por la variabilidad de

subunidades, resultan en distintas afinidades a distintos ligandos, con los que pueden interaccionar las integrinas (Alberts et al., 2002).

El funcionamiento de las integrinas puede ser regulado por la célula misma, al inhibir o aumentar la capacidad de las integrinas mediante la fosforilación de su dominio citoplasmático, a ésta regulación se le conoce como señalamiento adentro-afuera. También es posible que las integrinas sean las iniciadoras de las regulaciones celulares al poder activar vías de señalización intracelular, éstos señalamientos son específicos para cada línea celular, al interaccionar con la matriz extracelular generando el señalamiento afuera-adentro (Barczyk et al., 2010).

1.1.6 Organotropismo de exosomas

Hoshino (2015) también experimentó con las integrinas expresadas en los exosomas provenientes de células cancerígenas al realizar un knockdown mediante el uso de shRNA. Los exosomas con un knockdown en las integrinas tuvieron hasta tres veces menos presencia en el órgano blanco, respecto al control realizado con exosomas provenientes de células cancerígenas, pero sin el knockdown. Se realizó un experimento similar con el objetivo de evaluar si la metástasis también disminuía al usar un tratamiento con exosomas con el knockdown de integrinas, se realizó éste tratamiento antes de inocular las células cancerígenas en ratones. Comparado con un tratamiento de exosomas sin el knockdown, se encontró que la capacidad metastática fue reducida (Hoshino et al., 2015).

1.1.7 Funcionalización e ingeniería de exosomas como vehículos de fármacos

Se han utilizado exosomas aislados de células que fueron funcionalizados agregándoles un cargo, y dado su estabilidad, es posible que migren a través del cuerpo para entregar el tratamiento.

Un ejemplo del uso de exosomas como vehículo de fármacos, es su aplicación para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Con éste propósito, cargaron exosomas provenientes de monocitos y macrófagos con la enzima catalasa. Los exosomas fueron recibidos por células neuronales liberando la catalasa, funcionando como antioxidante disminuyendo el estrés degenerativo y la neurodegeneración en modelos *in vitro* e *in vivo* (Haney et al., 2015).

El uso de exosomas con agentes terapéuticos para el tratamiento de cáncer ya ha sido utilizado. Mediante ingeniería en exosomas, éstos fueron funcionalizados al generar un cargo de shRNA con una interferencia a KRAS^{G12D}, que es una mutación común en células de cáncer pancreático. El tratamiento con éstos exosomas en modelos murinos con cáncer pancreático disminuyó el tamaño del tumor y limitó de gran forma la metástasis, aumentando la supervivencia en todos los ratones tratados (Kamerkar et al., 2017).

1.2 Justificación

Debido al problema que representa la metástasis en la mortalidad por cáncer, y la importancia del nicho pre-metastático para el desarrollo de la metástasis, es importante buscar terapias que tengan como objetivo al nicho pre-metastático. Se propone la funcionalización de exosomas con la integrina $\alpha_v\beta_5$, como un potencial vehículo de fármacos dirigido al nicho pre-metastático.

1.3 Hipótesis

La sobre-expresión de la integrina $\alpha_v\beta_5$ en células en cultivo llevará a la presencia de éstas integrinas en sus exosomas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Producir exosomas funcionalizados con la integrina $\alpha_v \beta_5$ a partir de células en cultivo.

1.4.2. Objetivos específicos

- Establecer las condiciones para la producción de exosomas a partir de células en cultivo.
- Clonar el vector de expresión con la subunidad de la integrina α_v y expresar esta proteína en células 293T
- Clonar el vector de expresión con la subunidad de la integrina β_5 y expresar esta proteína en células 293T
- Aislar exosomas de células 293T modificadas para la expresión de las subunidades de la integrina $\alpha_v \beta_5$ y caracterizar la expresión de integrinas en los exosomas aislados de éstas.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cultivo celular

Las células utilizadas en este proyecto fueron las líneas celulares 293T (células de riñón fetal humano), HeLa (provenientes de cáncer cervicouterino humano), células B16-F1 (melanoma de ratón), células A549 (cáncer de pulmón humano) MCF-7, MDA-MB-231 y T47D, éstas últimas tres son células de cáncer de mama humano. Todas las líneas celulares fueron obtenidas del repositorio ATCC. El cultivo de las células fue llevado a cabo utilizando indicaciones del ATCC. Para las líneas celulares 293T, A549, MCF-7, MDA-MB-231 y T47D Medio DMEM (Dulbecco modified Eagles minimal essential médium, Cellgro); medio EMEM (Eagles minimal essential médium, Cellgro) para la línea celular HeLa; medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute médium, Cellgro) para las células B16-F1. Todos los medios fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Biowest) + 1% de mezcla de antibiótico/antimicótico (Cellgro).

Se tomaron viales de las líneas celulares a -81°C . Se descongelaron y fueron lavadas en 12 ml de PBS, posteriormente se centrifugaron a 800 g por 5 minutos a 22°C . Las células sedimentadas se homogenizaron con 8 ml de medio correspondiente a cada célula y se colocaron en una caja Petri de 10 cm para incubarse a 37°C con una atmósfera enriquecida con 5% de CO_2 .

Las células utilizadas tienen la característica de adherirse al fondo de la caja Petri, una vez que las células comienzan a crecer y alcanzan una monocapa confluyente, es necesario separarlas para evitar que mueran. Para esto, las células se lavan con PBS y se agrega una solución de tripsina (0.05% - EDTA 0.53 mM), para posteriormente suspender la reacción de la tripsina con medio completo (medio con las suplementaciones requeridas para cada línea celular). Una vez con las células libres en una solución con tripsina y medio completo se pueden volver a resembrar con las concentraciones indicadas según el experimento.

2.1.1 Tiempo de proliferación celular

Se realizó este ensayo para conocer el tiempo necesario para que un cultivo celular alcance una monocapa confluyente. Se utilizó tripsina para separar las células de la caja y se realizó un conteo. Posteriormente se colocaron de 125,000 a 1,000,000 de células en cada pozo de una placa de 6 pozos con un área de 9.5 cm^2 cada uno. Una vez sembradas las placas se tomaron fotos cada 24 horas de cada pozo.

2.1.2 Formulación de medio condicionado

Para seleccionar la formulación óptima del medio que permita mantener las células en buenas condiciones, se cultivó en placa de 6 pozos 500,000 células para cada línea celular 293T, B16-F1 y HeLa. Transcurridas 48 horas (las células se encontraban en monocapas celulares con una 70-80% de confluencia) se realizaron dos lavados con PBS y se agregó medio con distintas suplementaciones (Tabla 1). Se tomaron fotos cada 24 horas durante 72 horas.

Tabla 1. Distintas suplementaciones para la formulación del medio condicionado. Suplementado con albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés), suero fetal bovino (SFB) y HEPES (solución amortiguadora).

Suplementación al Medio EMEM, DMEM o RPMI
Basal (sin suplementación)
+BSA 0.25%+ HEPES
+BSA 0.125%+ HEPES
+SFB 0.25%+ HEPES
+SFB 0.125%+ HEPES
+ HEPES

2.1.3 Curvas de mortalidad

La realización de las curvas de mortalidad fue llevada a cabo con el objetivo de conocer la concentración de los antibióticos a las cuales deberán estar sometidas las líneas celulares sin resistencia a estos antibióticos y posteriormente mueran. Para esto se sembraron 50,000 células 293T en cada pozo de una placa de 24 pozos y 72 horas después se resuspendieron las células con una solución de tripsina para colocarlas de un pozo de 1.9 cm² a uno de 9.5 cm² (placa de 6 pozos). Se agregó medio a cada pozo con diferentes concentraciones de diferentes antibióticos (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones de antibióticos higromicina (Higro) y puromicina (Puro), utilizadas en la curva de muerte.

Antibióticos	Concentraciones de antibiótico (µg/ml)								
Higro	400	350	300	250	200	150	100	50	0.00
Puro	2	1.75	1.5	1.25	1.00	0.75	0.50	0.25	0.00

2.2. Análisis de la expresión de las integrinas por citometría de flujo

2.2.1 Titulación de anticuerpos

Con el fin de tener un rendimiento óptimo en la cantidad de anticuerpos se realizó una titulación con los anticuerpos anti- α_v /CD51 conjugado con ficoeritrina (PE, pos sus siglas en inglés) (clone NKI-M9, BioLegend). Utilizando las cantidades de 16, 31, 62, 125 y 250 ng por millón de células. Posteriormente se realizó un teñido de las células con éstos anticuerpos.

2.2.2 Preparación de células y teñido con anticuerpos

Se desprendieron las células de la caja Petri con una solución de tripsina y se prepararon alícuotas de 250,000 células, se centrifugaron 800 g por 5 minutos a 4°C y las células sedimentadas se resuspendieron en una solución amortiguadora de citometría de flujo (PBS 1X + 5% FBS, ThermoScientific). Se centrifugaron para ser resuspendidas nuevamente en la misma solución amortiguadora y se incubó por 30 minutos a 4°C. Posteriormente se agregaron los anticuerpos y se incubó por 40 minutos a 4°C en oscuridad. Terminada la incubación se lavaron los anticuerpos con la solución amortiguadora de citometría de flujo y se resuspendió en la misma solución, para ser analizados en el citómetro de flujo.

2.2.3 Lectura en el citómetro de flujo

Se analizaron las células teñidas en el citómetro de flujo identificando como eventos a todos aquellos que cumplieran con el tamaño y morfología característico para cada célula, seleccionando a células individuales determinado por la dispersión frontal o Forward Scatter (FSC) y la morfología siendo determinada por la dispersión lateral o Side Scatter (SSC). Así como la comparación de células teñidas, utilizando un control negativo de la misma célula, pero sin tinción con anticuerpos.

2.3 PCR cuantitativo (qPCR)

2.3.1 Extracción de RNA

La extracción del RNA fue a partir de sedimentos por centrifugación de líneas celulares eucariontes que fueron tratadas con tripsina y directamente congeladas a -80°C . Este procedimiento se realizó utilizando el kit GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) el cual aísla el RNA mediante una columna de afinidad. Posteriormente se realizó una cuantificación de la concentración del RNA total obtenido mediante el uso de espectrofotometría Nanodrop Lite (ThermoFisher Scientific). Para observar su integridad se hizo una electroforesis del RNA en gel de agarosa 1% a 100V.

2.3.2 Retrotranscripción de RNA

Se realizaron reacciones de retrotranscripción al RNA total extraído utilizando los oligonucleótidos dT, con la enzima reversa transcriptasa SuperScript II y su solución amortiguadora (Invitrogen), obteniendo como productos cDNA.

2.3.3 Reacción de qPCR

Se realizó la qPCR a partir del cDNA obtenido utilizando oligonucleótidos para el gen de referencia RPL32 y para el gen de interés ITGB5. Para la reacción de qPCR se utilizó el master mix QuantiTec SYBR Green (QIAGEN).

2.4 Subclonación para el desarrollo de vectores de expresión

Se obtuvieron plásmidos de Addgene para utilizarlos como andamio en la creación del vector de expresión. El plásmido pLenti CMV GFP Hygro (656-4) (Addgene plasmid # 17446) y el plásmido pLenti CMV GFP Puro (658-5) (Addgene plasmid # 17448) fueron donados por Eric Campeau & Paul Kaufman. El plásmido pLJM1-EGFP fue donado por David Sabatini (Addgene plasmid # 19319). Las secuencias codificantes de las

subunidades de las integrinas también fueron obtenidas a partir de plásmidos provenientes del repositorio de Addgene. El plásmido pEF1-alpha-V fue donado por Timothy Springer (Addgene plasmid # 27290), y el plásmido pCX-EGFP beta5 integrin receptor fue donado por Raymond Birge (Addgene plasmid # 14996).

2.4.1 Transformación de bacterias

Se transformaron bacterias *E. coli* NEB5-alpha (New England Biolabs) con los plásmidos obtenidos del repositorio de Addgene utilizando la estrategia de choque térmico y las bacterias transformadas fueron sembradas en una placa Petri con medio Luria Bertani (LB) + Agar y una concentración de 0.1µg/ml de carbenicilina. Se incubaron por 16 horas a 37°C y se almacenaron las colonias positivas a 4°C.

2.4.2 Extracción de plásmido Miniprep

La extracción del plásmido de las colonias transformadas se realizó utilizando el kit de extracción de plásmido Miniprep GeneJET (ThermoFisher Scientific), a partir de un cultivo bacteriano de 12 horas en 5 ml de medio LB. El kit aísla el plásmido de la bacteria mediante una columna de afinidad. Posteriormente se cuantificó la concentración del plásmido obtenido con un espectrofotómetro Nanodrop Lite (ThermoFisher Scientific).

2.4.3 Lisis alcalina para la extracción de plásmido

Esta extracción de plásmido nos permite utilizar un sedimento celular proveniente de un cultivo mayor (50 ml) y de ésta forma obtener una mayor concentración de plásmido extraído. Se prepararon tres soluciones (solución 1 Tris 5 mM + EDTA 10 mM; solución 2 NaOH 0.2 M + SDS 1%; solución 3 Acetato de potasio 1.32 M) y se agregaron a un sedimento bacteriano, posteriormente se precipitó con un volumen de isopropanol y se lavó con etanol al 70%. Para incrementar el grado de pureza, ésta extracción puede ser acoplada a la columna de afinidad del Kit Miniprep.

2.4.4 Amplificación de secuencia de interés mediante PCR punto final

Se sintetizaron los oligonucleótidos que flanquean la secuencia codificante de las integrinas (Tabla 3), para su uso en la amplificación de las secuencias. Se realizaron reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos correspondientes con la DNA polimerasa Q5 y la solución amortiguadora Q5 5x (New England Biolabs). Los fragmentos obtenidos fueron confirmados a través de una electroforesis en un gel de agarosa.

2.4.5 Purificación de productos de PCR

La purificación de los productos de PCR fue realizada utilizando el kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific). Los productos de PCR fueron pasados por una columna de afinidad para purificarlos de posibles nucleótidos o plásmidos utilizados de andamio.

2.4.6 Linearización y ensamblaje de plásmido

Para la linearización de los plásmidos pLenti CMV GFP Hygro y pLenti CMV GFP Puro fue realizada una digestión enzimática con las enzimas de restricción XbaI y Sall (New England Biolabs) por un tiempo de 120 minutos a 37°C. Para el caso del plásmido pLJM1Tie2 se utilizaron las enzimas de restricción NheI y EcoRI. El plásmido fue analizado en un gel de electroforesis y posteriormente se cortó la banda correspondiente al plásmido linearizado para su purificación utilizando el GenElute kit de extracción de plásmido de gel (Sigma-Aldrich).

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados

#	Nombre	Secuencia
1	cloItgav(f or)	CTCCATAGAAGACACCGACTCTAGACACCATGCTCCTAGGCACCCTC
2	cloItgav(r ev)	TGTAATCCAGAGGTTGATTGTTACGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTTACCGT CGACAGTTTCTGAGTTTCCTCACC
5	cloItgb5(f or)	CTCCATAGAAGACACCGACTCTAGACACCATGCCGCGGGCCCCGG
6	cloItgb5(r ev)	TGTAATCCAGAGGTTGATTGTTAGCCCATCTGCTGGCCGCGGTCATTGAAGCCATGTCGACGTCCACA GTGCCATTGTAGGATTTGTTGAACCTGTTGAAGGTG
9	checkItgav(rev)	GTCCTTGCTGCTCTTGAAC
10	checkItgb5(rev)	GAAGTTGCTGGTGAGCTTCC
11	cloITGAVv1(for)	CTCCATAGAAGACACCGACTCTAGACACCATGGCTTTTCCGCCGCGG
12	cloITGAV-for2	TTAGTGAACCGTCAGATCCGCACCATGGCTTTTCCGCCGCG
13	cloITGAV-rev2	CCATTTGTCTCGAGGTCGAGGGTTAATGCCAATTAGCACTATCAGC
16	cloITGAV-rev3	TGTAATCCAGAGGTTGATTGGGTTAATGCCAATTAGCACTATCAGC
18	cloITGB5-for2	CTCCATAGAAGACACCGACTGGATCCCACCATGCCGCGGGCCCCGG
19	cloITGB5-rev2	TGTAATCCAGAGGTTGATTGTAAGGATCCTCAGTCCACAGTGCCATTGTAGGATTTGTTGAACCTGTTG AAGGTG
22	ITGB5-rev(int)	CAAATTTTGAATCCAGAGGTTGATTGTCGACCATCTTGGCAGGTAGCAGT
23	ITGB5-for(int)	ACTGCTACCTGCCAAGATGG
24	ITGAV-rev(int1)	CCATTTGTCTCGAGGTCGAGAATTCTGTAGAGACTGAGACCTGCC
25	ITGAV-for(int1)	AGGTCTCAGTGTCTCTACAG
26	ITGAV-rev(int2)	CCATTTGTCTCGAGGTCGAGAATTCATCTCTGACTGCTGGT
27	ITGAV-for(int2)	GCACCAGCAGTCAGAGATGG
28	ITGAVrev(intA)	CCATTTGTCTCGAGGTCGAGAATTCTCGTGAATTGCTCCCTTT
29	ITGAV-for(intA)	AAAGGGAGCAATTCGACGAG
32	CMV for	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
33	WPRE rev	CATAGCGTAAAAGGAGCAACA

2.4.7 Ensamblaje de plásmido

Se realizó un ensamblaje de la secuencia codificante para las subunidades de las integrinas (inserto) al plásmido linearizado, con el Gibson assembly master mix (Gibson Assemble cloning kit, New England Biolabs) utilizando distintas relaciones entre fragmento de interés y plásmido linearizado de andamio.

También se realizó una ligación con la enzima DNA T4 polimerasa (Thermo Scientific) del inserto con el plásmido linearizado, no sin antes darles un tratamiento a los productos. Los productos de PCR fueron fosforilados con la enzima T4 PNK (Polinucleótido 5'-Hidroxil-Quinasa) y rellenados de sus extremos 5' con una enzima T4 polimerasa. Posteriormente digeridos con la enzima de restricción XbaI y de ésta forma darle un extremo rasurado y otro cohesivo. El plásmido fue tratado con la enzima DNA T4 polimerasa para rellenar los extremos y posteriormente digerido con XbaI para también darle un extremo rasurado y el otro cohesivo.

2.4.8 Transformación en *E.coli*

Se transformaron las bacterias *E. coli* NEB5-alpha con los plásmidos obtenidos, junto con el plásmido pUC19 como control positivo y para conocer la eficiencia de transformación de las bacterias. Para el caso de las transformaciones con las reacciones de ligación se utilizaron las bacterias *E. coli* ER2738. Una vez con los plásmidos subclonados la transformación se realizó con la estrategia de choque térmico, para ser sembrados en cajas Petri con medio LB-Agar y una concentración de 0.1µg/ml de carbenicilina.

2.4.9 PCR de colonia

Con las colonias obtenidas de la transformación se realizó un PCR de colonia de múltiples colonias al azar que crecieron después de la transformación. Se utilizó la DNA polimerasa GoTaq Flexi (Promega), tomando como oligonucleótido delantero a un forward CMV que se encuentra dentro de la secuencia del promotor CMV y como reverso a una secuencia que se encuentra a la mitad de la secuencia de la integrina. Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa y se purificaron los plásmidos de las colonias con mejores resultados. Los plásmidos fueron secuenciados por la compañía GENEWIZ, por el método de Sanger.

2.5 Transfección y transducción

2.5.1 Transfección

Para la realización de la transfección se sembraron 100,000 células 293T por cada 1.9 cm² de superficie. Transcurridas 24 horas se agregaron 1000 ng del plásmido con la secuencia de interés a 50 µl de DMEM basal y 2 µl de lipofectamina a 50 µl de DMEM basal. Se mezclaron las soluciones con el plásmido y la lipofectamina y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla fue añadida al pozo con las células 293T y se mantuvo el cultivo celular.

Para la transfección de células 293T también se utilizó la técnica con fosfato de calcio, sembrando 100,000 células por cada 1.9 cm² y 24 horas después se agregó una solución que corresponde a la mezcla de 20 µl de solución A (50 mM de HEPES, 280 mM de NaCl y 1.5 mM de Na₂HPO₄) con 20 µl de la solución B (250 ng del DNA a transfectar y 220 mM de CaCl₂).

2.5.2 Producción de partículas lentivirales

Para la producción de partículas lentivirales se realizó una transfección, pero con la diferencia de que se agregaron junto con el plásmido que contenía la secuencia de interés otros tres plásmidos pLP1, pLP2 (ThermoScientific) y pMD2G donado por Didier Trono (Addgene plasmid # 12259), donde se encuentra la información para la formación de las partículas lentivirales. Después de 24 horas se recolectó el medio donde se encontraban las células con la transfección, se almacenó a 4°C y se agregó otra cantidad de medio fresco a las células. Transcurridas 24 horas se volvió a recolectar el medio, donde se encuentran las partículas lentivirales sintetizadas por la célula.

2.5.3 Transducción

Para la realización de la transducción se sembraron 50,000 células 293T en cada pozo en una placa de 24 pozos. Después de 24 horas se tomaron las partículas lentivirales formadas en la transfección y se agregó una solución de polybrene a una concentración final de 8 µg/ml. Se cambió el medio donde se encontraban las células 293T cultivadas por el medio donde se encontraba la solución de las partículas lentivirales y el

polybrene. Se regresó la placa a la incubadora para seguir cultivando las células 293T, para posteriormente realizar los análisis a éstas células y almacenarlas en crio viales.

2.6 Aislamiento de exosomas

Se cultivaron células en cajas Petri de 151 cm² hasta alcanzar su confluencia. Una vez alcanzada la confluencia se removió el medio y se agregaron 16 ml de medio condicionado y se incubaron por 48 horas. Transcurridas las 48 horas se recolectaron los medios condicionados y se sometieron a una serie de centrifugaciones: 10 minutos a 300 g, 20 minutos a 2000 g y 30 minutos a 10,000 g, a una temperatura de 4°C. Se recolectó el sobrenadante en las centrifugaciones anteriores. Se le realizó una ultracentrifugación a 100,000 g por 70 minutos a 4°C (Ultracentrifugadora BeckmanColuter Optima XPN), se resuspendió el sedimento generado en 20 ml de PBS y fueron filtrados con una membrana de 220 nm. Se realizó una última ultracentrifugación a 100,000 g por 70 minutos a 4°C y el sedimento generado se resuspendió en 100 – 400 µl de PBS.

2.7 Caracterización de exosomas

2.7.1 Zetasizer nano

Los exosomas resuspendidos en PBS fueron analizados por medio de dispersión de luz dinámica para medir el tamaño de las partículas y el potencial zeta utilizando un Zetasizer nano (Malvern).

2.7.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía TEM se realizó utilizando el equipo JEM-2100F (JEOL) del Centro de nanociencias y nanotecnología (CNyN) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las muestras de exosomas se montaron en una rejilla de cobre cubierta con una película ultra-delgada de carbón y posteriormente fueron teñidas con acetato de uranilo, se colocaron dentro del microscopio y se observaron las imágenes.

2.7.3 Análisis de concentración de proteínas en exosomas

Para conocer la concentración total de proteínas en los exosomas se realizó un ensayo, utilizando el Kit Micro BCA Protein Assay (Thermo Scientific Pierce). Este kit utiliza la colorimetría generada por el ácido bicinconínico (BCA por sus siglas en inglés) al detectar el Cu^{+1} que es reducido por la presencia de proteínas en un ambiente alcalino. Posteriormente para determinar la concentración de proteínas, se analizó la absorbancia a una longitud de onda de 562 nm mediante espectrofotometría.

2.7.4 Western blot

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10% y se cargaron con las muestras de proteína para realizar la electroforesis. Se realizó posteriormente la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida hacia una membrana de transferencia de Polifluoruro de vinilideno para blot (Immobilon). Las proteínas de la membrana fueron bloqueadas con solución de leche al 5% en TBST (TRIS Base, NaCl y H₂O) por una hora y posteriormente se lavó la membrana con solución amortiguadora de lavado y se agregaron los anticuerpos primarios para ser incubados por la noche a temperatura ambiente. Se realizó una serie de 3 lavados de la membrana en TBST y se agregaron los anticuerpos secundarios conjugados a una peroxidasa por una hora a temperatura ambiente. Se lavó con TBST y finalmente se analizaron las membranas en un foto-documentador (Bio-Rad ChemiDoc XRS) utilizando la solución de sustrato para quimioluminiscencia (Millipore).

Cuando fue requerido remover los anticuerpos unidos a la membrana y poder reutilizarla, se colocó en una solución conocida como “stripping buffer” (Glicina, SDS, Tween y H₂O) durante 40 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se realizaron los lavados de la membrana con TBST.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Establecimiento de las condiciones para la producción de exosomas a partir de células en cultivo

3.1.1 Optimización de la metodología para el aislamiento de exosomas

Para conocer el tiempo que les toma a las distintas líneas celulares en alcanzar una monocapa confluyente y posteriormente comenzar con el medio condicionado que contendrán a los exosomas, se sembraron diferentes densidades de células y se registraron los tiempos necesarios para alcanzar una monocapa confluyente (Figura 3A). Se utilizaron 3 tipos de líneas celulares: 293T y HeLa como candidatos potenciales para la producción de exosomas funcionalizados y B16-F1 como control positivo, como se puede mostrar en la tabla 4. La cantidad de células mínima para alcanzar una monocapa 100% confluyente en 72 horas para las células 293T y HeLa fueron de 25,000 por cm^2 y para las B16-F1 fueron de 12,500 células por cm^2 . Debido a las diferencias en la tasa de proliferación entre las distintas líneas celulares, fue necesario sembrar diferentes densidades para alcanzar la confluencia en el mismo tiempo para las 3 líneas celulares. Se confirmó también que para llegar a una confluencia más rápido, es necesario sembrar una densidad de células más alta. Después de haber determinado éstas condiciones, se puede comenzar a cultivar una determinada densidad de células dependiendo de cuando necesitemos de su confluencia para experimentos posteriores.

Tabla 4. Densidad de células sembradas para alcanzar confluencia en un tiempo determinado.

	24 h	48 h	72 h
293T	75,000/ cm^2	50,000/ cm^2	25,000/ cm^2
HeLa	75,000/ cm^2	50,000/ cm^2	25,000/ cm^2
B16-F1	50,000/ cm^2	25,000/ cm^2	12,500/ cm^2

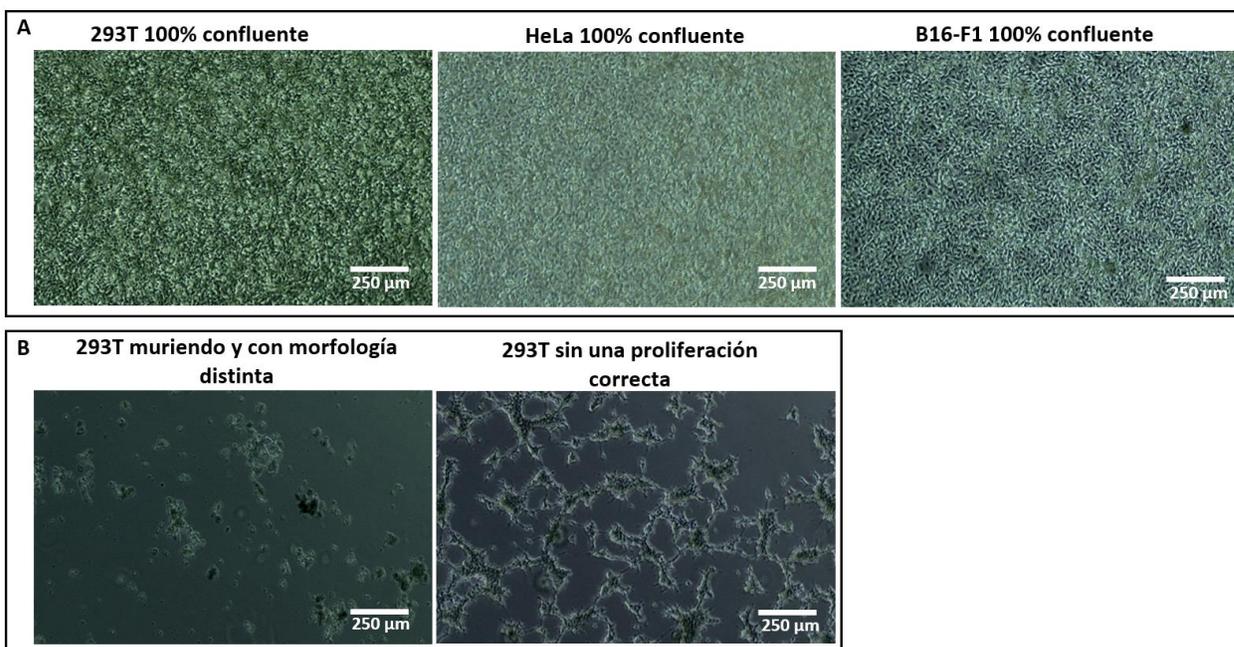


Figura 3. Micrografías representativas de los cultivos de las líneas celulares 293T, B16-F1 y HeLa. Imágenes tomadas con microscopio de cultivos celulares. A) Representación de monocapas confluentes de las distintas líneas celulares. B) Diferentes situaciones encontradas por células dependiente de la suplementación al medio.

Los exosomas son extraídos a partir de un medio condicionado por las células durante 48h. Cultivar las células en un medio suplementado con SFB mantiene a las células en buenas condiciones, sin embargo, el SFB contiene exosomas. Evitar la suplementación con SFB evitaría la contaminación por exosomas exógenos, pero es posible que las células no puedan sobrevivir en ausencia de SFB durante 48h. Razón por la cual se requiere la formulación del medio condicionado y así evitar lo más posible el SFB. Para sustituir el SFB, se puede suplementar el medio de cultivo con BSA y con HEPES (para mantener el pH). Se analizaron las fotografías tomadas con el microscopio óptico para analizar los cambios en la morfología celular y su proliferación, al ser sometidas a un medio distinto al que normalmente se cultivan (Figura 3B). En la tabla 5 se muestran los distintos suplementos en el medio para que las células sean viables. Para las células 293T se eligió usar para el medio condicionado DMEM sin suplementación (Basal), para las células B16-F1 el medio RPMI Basal y para la línea celular HeLa el medio EMEM Basal. Por lo tanto, para el aislamiento de exosomas se decidió utilizar éstos medios.

Tabla 5. Viabilidad del cultivo celular sometido a las diferentes suplementaciones. (+) viabilidad y proliferación celular, (-) cambios morfológicos o con muerte celular.

	Basal	+BSA 0.25% + HEPES	+BSA 0.125% + HEPES	+SFB 0.25% + HEPES	+SFB 0.125% + HEPES	+ HEPES
293T	+	+	+	-	-	-
HeLa	+	+	+	+	+	+
B16-F1	+	-	-	+	+	+

Una vez establecidas las condiciones para el medio condicionado, se realizaron los aislamientos de exosomas. Se realizaron aislamientos de exosomas a partir de cultivos de células 293T, HeLa y B16-F1 en medio condicionado. Para corroborar que la metodología de aislamiento fue exitosa y efectivamente obtuvimos exosomas se realizó una microscopía electrónica de transmisión (Figura 4), donde se pueden observar vesículas esféricas alrededor de los 90 nm, características de los exosomas. Los exosomas fueron caracterizados en su tamaño mediante dispersión dinámica de luz utilizando un zetasizer, donde podemos observar picos indicando diámetros más grandes de los señalados en la bibliografía, partículas con diámetros de 1000 a 4000 nm (Figura 5A). Por lo que fue necesario implementar en el método de aislamiento, filtraciones con membrana de 0.22 μm del PBS y en la solución de exosomas después de la primera ultracentrifugación. Una vez implementado estas modificaciones, los picos no relacionados a los exosomas desaparecieron (Figura 5B). Posteriormente se midió la concentración de proteínas en los exosomas (Tabla 6), proporcionando un dato útil para la caracterización por Western blot.

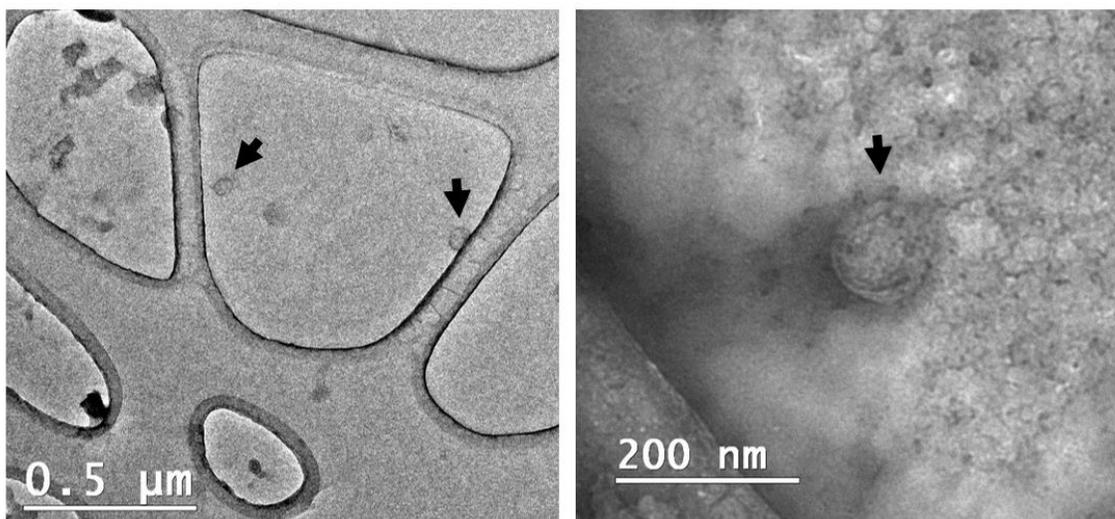


Figura 4. TEM de exosomas. Microscopía electrónica de transmisión de exosomas aislados de células 293. Los exosomas son señalados por flechas negras.

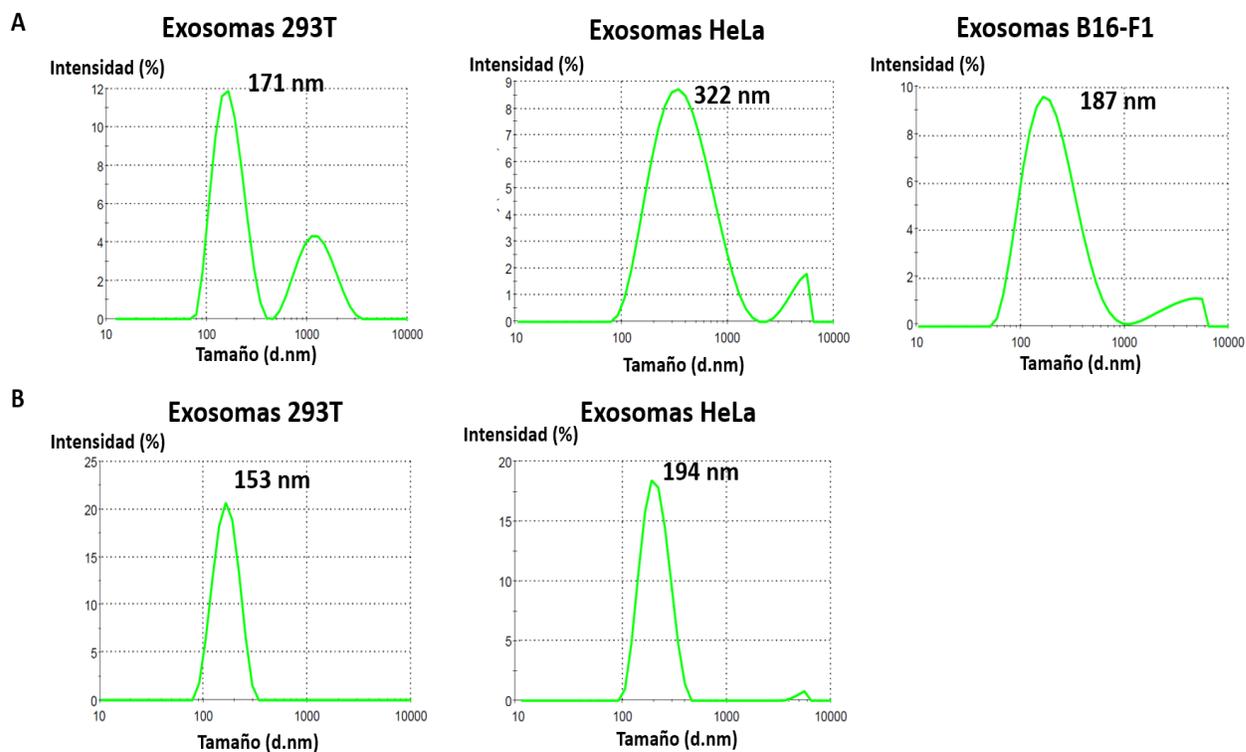


Figura 5. Tamaño de exosomas analizado por medio de dispersión de luz dinámica. Histogramas de Zetasizer nano de exosomas provenientes de líneas celulares 293T, HeLa y B16-F1. A) Histogramas de exosomas aislados antes de las modificaciones a la metodología de aislamiento. B) Histograma de exosomas aislados después de las modificaciones a la metodología de aislamiento. Diámetro expresado en nanómetros (d.nm)

Tabla 6. Concentración de proteína y tamaño de exosomas aislados de diferentes líneas celulares. Concentración de proteínas en los exosomas cuantificada por ensayo microBCA, diámetro de los exosomas obtenido mediante dispersión de luz dinámica.

	Experimento 1		Experimento 2			Experimento 3		Experimento 4	
Línea celular	293T	B16-F1	293T	B16-F1	HeLa	293T	HeLa	293T	HeLa
Concentración total de proteínas ($\mu\text{g}/100\mu\text{L}$)	-	-	0	2.507	4.134	0.763	6.020	2.725	1.71
Diámetro (Zetasizer) en nm	180	191	26.7	220.2	51.36	165	109	154	195

3.1.2 Selección de línea celular para funcionalización

El criterio de selección para la línea celular con la cual se trabajó, fue la expresión endógena de integrinas. Si las células expresan las integrinas αv y β5 no serán consideradas para trabajar con ellas. Primero se realizó una titulación de anticuerpos por citometría de flujo, haciendo una tinción de células con diferentes

cantidades de anticuerpos fluorescentes para analizarlas por citometría de flujo. Durante la titulación de anticuerpos se observó que para el caso de las integrinas subunidad α_v (ITGAV) se necesitó una cantidad mínima de 62 ng de anticuerpo por cada 1,000,000 de células a teñir (Figura 6). A partir de éstas cantidades fue posible diferenciar por citometría de flujo entre una célula positiva de una negativa.

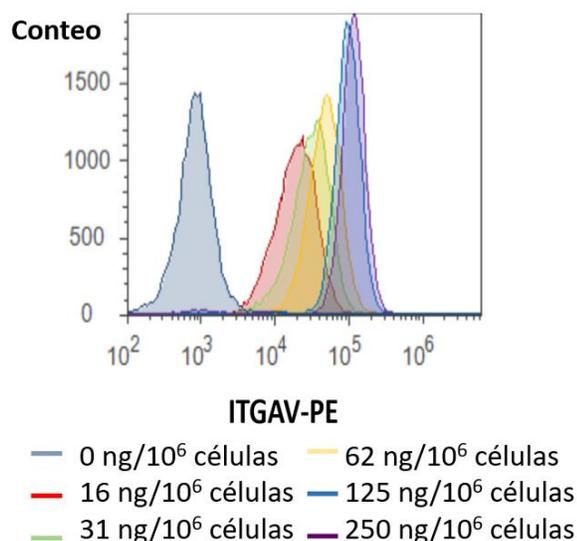


Figura 6. Titulación de anticuerpo anti-ITGAV. Citometría de flujo con distintas cantidades de anti-ITGAV en las células 293T. Histogramas de citometría de flujo. El conteo de células corresponde al eje de las ordenadas y la intensidad de fluorescencia relativa corresponde al eje de las abscisas.

Finalmente, se realizó mediante citometría de flujo la elección de células entre 293T y HeLa, para la modificación genética mediante transducción y posterior aislamiento de exosomas, tomando en cuenta la expresión de integrinas. Dado el interés por funcionalizar exosomas para que contengan la integrina $\alpha_v\beta_5$, a partir de la transducción de células, si las células ya expresan naturalmente alguna de éstas integrinas o sus subunidades no será conveniente su uso para cumplir nuestros objetivos. Se utilizó como control positivo a la línea celular A549, células humanas de cáncer de pulmón, porque se encontró en la literatura que expresan ésta integrina. Las células HeLa mostraron una expresión alta de ITGAV, similar al control positivo A549 (Figura 7). Las células 293T expresaron una expresión baja de ésta subunidad. Ninguna línea celular mostró una expresión alta de la integrina subunidad β_5 (ITGB5) (Figura 7). Por esta razón, se decidió trabajar con las células 293T.

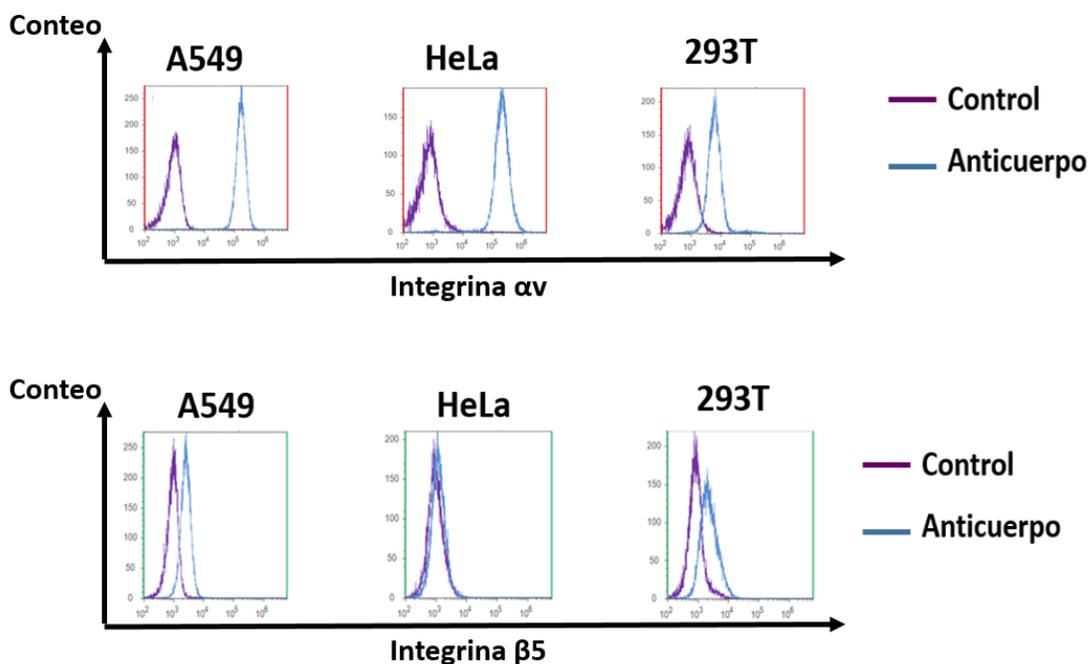


Figura 7. Expresión de integrinas AV y B5. Citometría de flujo de líneas celulares A549, HeLa y 293T teñidas con anti-ITAV o anti-ITGB5. Histogramas de citometría de flujo de líneas celulares A549, HeLa y 293T donde se muestra expresión de ITGAV e ITGB5. El conteo de células corresponde al eje de las ordenadas y la intensidad de fluorescencia relativa corresponde al eje de las abscisas.

Después de determinar la utilización de las células 293T, se realizó la curva de muerte de éstas células en presencia de los antibióticos higromicina y puromicina. Las curvas de muerte fueron realizadas analizando las células cada 24 horas con las distintas concentraciones de antibióticos y se evaluó el tiempo que tardan las células en morir. De esta forma podemos ver cuál concentración mata a las células en los días 3, 5 y 7 (Tabla 7). Con éstos resultados podemos realizar una selección con antibiótico a células modificadas resistentes a higromicina (con 50 $\mu\text{g/ml}$) o resistentes a puromicina (con 1 $\mu\text{g/ml}$) en 5 días de cultivo.

Tabla 7. Concentraciones de antibiótico para matar a las células en un tiempo determinado.

Antibiótico	3 días	5 días	7 días
Higromicina	150 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$
Puromicina	1.75 $\mu\text{g/ml}$	1.00 $\mu\text{g/ml}$	0.50 $\mu\text{g/ml}$

3.2 Clonación del vector de expresión con la subunidad de la integrina α v y expresión de ésta proteína en células 293T

3.2.1 Subclonación del vector

Para la subclonación del vector de expresión de la integrina subunidad α v se obtuvieron secuencias amplificadas a partir de un PCR (Figura 8 A), utilizando los oligonucleótidos 2 y 11 (enlistados en la tabla 3). La linearización del plásmido pLentiPuroGFP (Figura 8 B) resultó de forma exitosa, mostrándose dos bandas en un gel de agarosa, bandas con una longitud de 8 kb y de 0.7 kb.

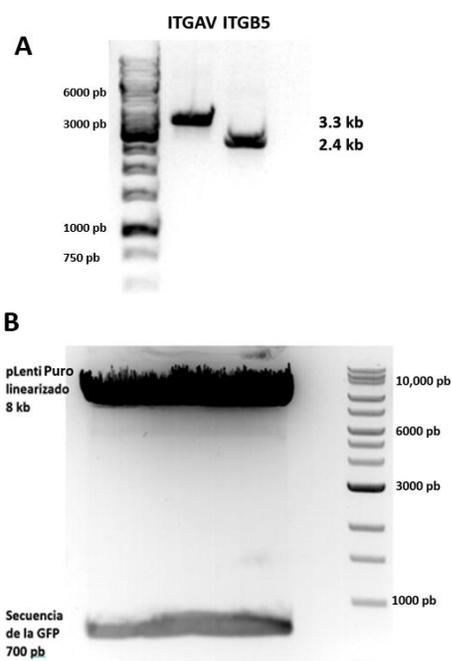


Figura 8. Geles de subclonación de ITGAV. A) Gel de electroforesis de agarosa al 1% con productos de PCR correspondientes a los fragmentos de la ITGAV con una longitud de 3.3 kilobases (kb) e ITGB5 con una longitud de 2.4 kb. B) Gel de electroforesis de agarosa al 1% con plásmido pLentiPuro linearizado con enzimas de digestión XbaI y Sall. La banda superior pertenece al plásmido pLentiPuro linearizado y la inferior pertenece a la secuencia de GFP.

Se desarrollaron experimentos de subclonaciones con diferentes condiciones mostradas en la tabla 8 funcionando de manera exitosa las del experimento 9, con la cual posteriormente se realizó un PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos 9 y 32 y los oligonucleótidos 2 y 33. Dando positivo en ambos PCR (bandas esperadas de 0.95 kb y 3.1 kb respectivamente) (Figura 9). De ésta forma se obtuvieron tres colonias con el plásmido pLentiPuroITGAV.

Tabla 8. Experimentos de ensamblaje de ITGAV con diversas variantes y resultados para cada experimento.

ITGAV									
Experimento	Plásmido andamio	Método de ensamblaje	Tasa de vector inserto	cantidad de vector	cantidad de inserto	colonias	eficiencia de transformación	PCR de colonia positivo	Secuenciación
1	pLentiHygro	Gibson assembly	1:3	12.2 fmol	36.6 fmol	0	58.6 M cfu/μg	no	no
2	pLentiHygro	Gibson assembly	1:4	14 fmol	56.72 fmol	9	620 M cfu/μg	no	no
3	pLentiPuro	Gibson assembly	1:4	15 fmol	59 fmol	--	1,017 M cfu/μg	no	no
4	pLentiPuro	Gibson assembly	1:1.33	15 fmol	19.7 fmol	--	1,017 M cfu/μg	no	no
5	pLentiPuro	Gibson assembly	1:3	12.21 fmol	37 fmol	612	36 M cfu/μg	no	no
6	pLJM1	Gibson assembly	1:3	14.25 fmol	42.5 fmol	0	36 M cfu/μg	no	no
7	pLJM1	Gibson assembly	1:3	7.6 fmol	22.8 fmol	0	2,293.3 M cfu/μg	no	no
8	pLentiHygro	T4 ligasa	1:11	2.65 fmol	29.1 fmol	--	--	no	no
9	pLentiPuro	T4 ligasa	1:7	5.1 fmol	36.67 fmol	26	17.35 M cfu/μg	si	si, raro

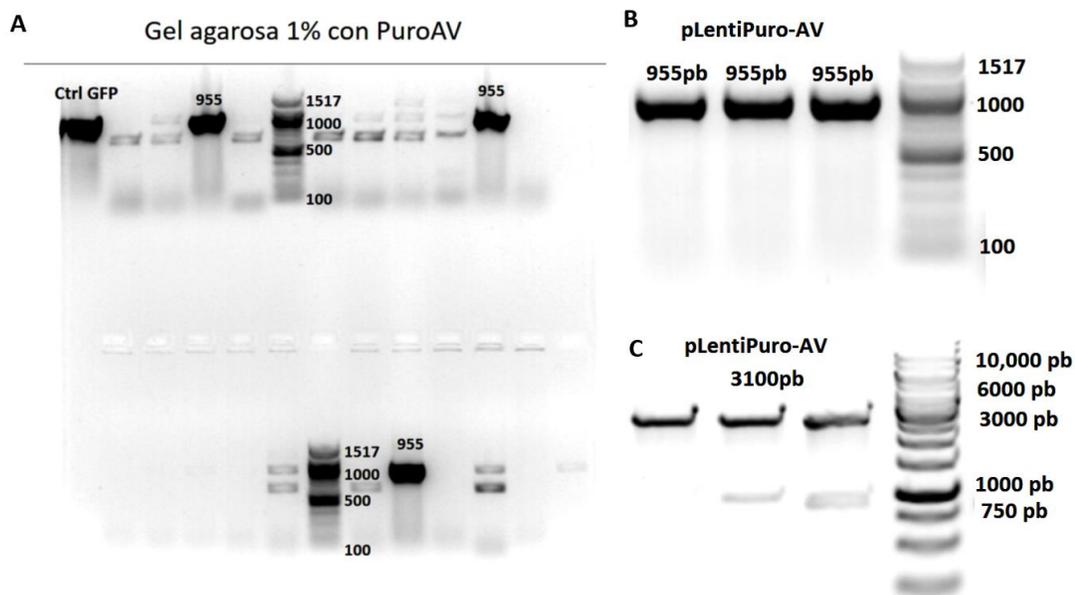


Figura 9. Geles de PCR de colonia de plásmido pLentiPuroITGAV. A) electroforesis en gel agarosa al 1% de los productos de PCR de colonia de la transformación del ensamblaje ITGAV-pLentiPuro, usando como control en el primer carril producto de PCR de pLentiPuroGFP. Tamaños de las bandas esperados 955 pb B) electroforesis en gel de agarosa al 1% con colonias positivas del ensamble ITGAV-pLentiPuro usando los oligonucleótidos 9 y 32. C) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de colonias positivas de ensamble ITGAV-pLentiPuro usando oligonucleótidos 2 y 33. Tamaño de la banda esperado de 3100 pb.

3.2.2 Modificación de células 293T con plásmido pLentiPuroITGAV

Se realizaron modificaciones con el plásmido ensamblado pLentiPuroITGAV mediante los procesos de transfección y transducción en las células 293T, utilizando pLentiPuroGFP como control de transfección y transducción. El análisis de la presencia de la integrina subunidad α_v se realizó mediante citometría de flujo (Figura 10) identificando un 6.8% de células positivas a ITGAV en la transfección y un 0% en la transducción. El control positivo mostró un 66.78% en la transducción y un 67.14% en la transfección.

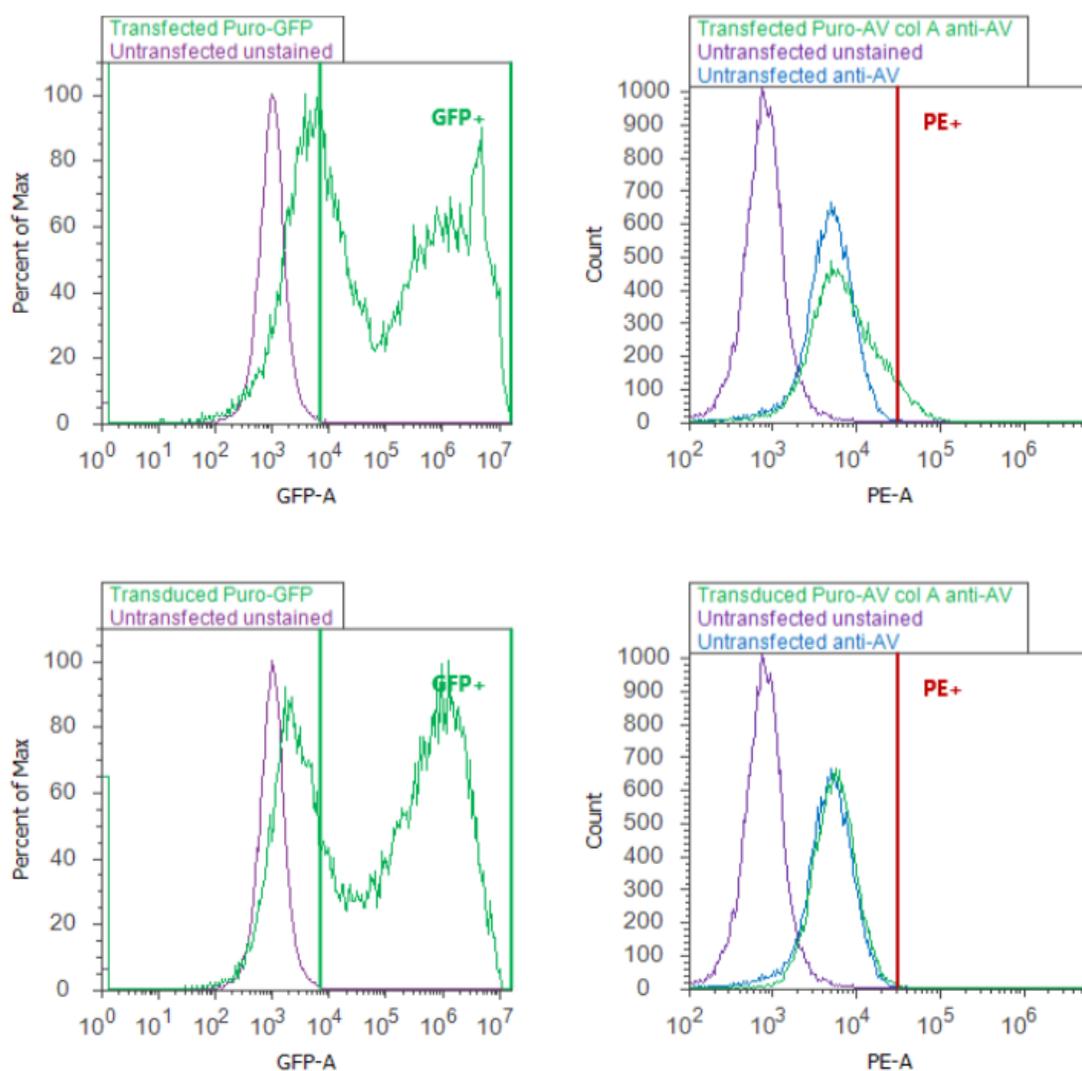


Figura 10. Análisis de expresión de ITGAV por citometría de flujo. Histogramas de citometría de flujo de células 293T con transducción y transfección con plásmidos pLentiPuroGFP y pLentiPuroITGAV. Células con modificación de pLentiPuroGFP tienen la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés), señal fluorescente recibida por el sensor del citómetro de flujo. Células con modificación de pLentiPuroITGAV teñidas con anticuerpo anti-ITGAV acoplados al pigmento ficoeritrina (PE, por sus siglas en inglés), que es recibido su emisión de longitud de onda por el sensor del citómetro de flujo.

Para el análisis de Western blot para células transfectadas con el plásmido pLentiPuroITGAV se usaron células silvestres 293T (wt) como control negativo y células 293T con transfección de pPEMPA1-V5 como control positivo del anticuerpo anti-V5. El anticuerpo utilizado en el Western blot fue un anti-V5, debido a que se le agregó esta etiqueta (V5) al final de la ITGAV, y el anticuerpo secundario fue un anticuerpo anti-conejo. Se obtuvieron bandas del tamaño esperado, de 150 kDa (la ITGAV tiene un peso aproximado de 150 kDa), una banda con un peso menor de 37 kDa (la PMPEA-1 tiene un peso de 32 kDa) y sin bandas en el carril correspondiente a las proteínas de 293T wt (Figura 11).

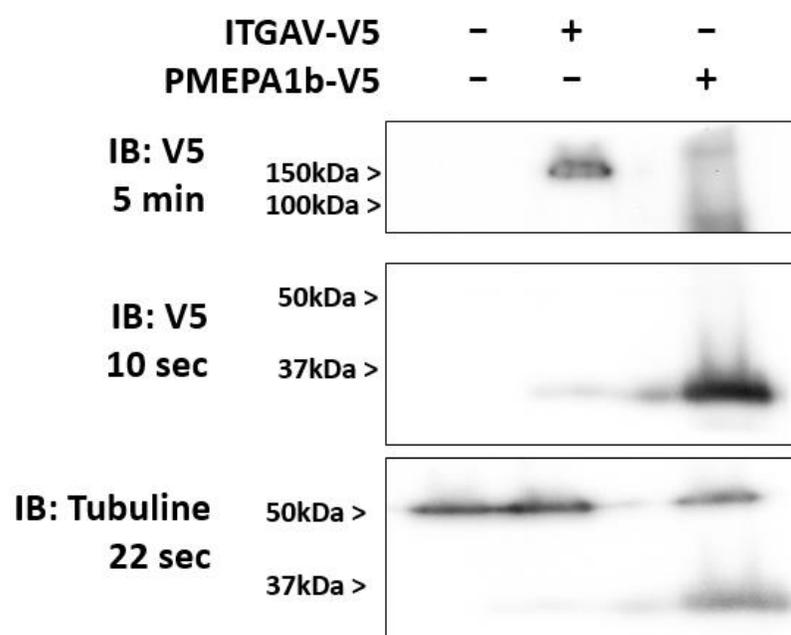


Figura 11. Western blot de proteínas de células 293T con transfección con pLentiPuroITGAV y pPEMPA1b-V5. Se utilizó anti-V5, bandera que se encuentra unida a la ITGAV y PMEPA1b.

Las células transfectadas y transducidas con pLentiPuroITGAV fueron cultivadas en medio DMEM completo suplementado con el antibiótico Puromicina a 0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las células no lograron proliferar y murieron. Para analizar la situación se secuenciaron los plásmidos pLentiPuroITGAV de las colonias positivas obtenidas. Los resultados fueron alineados con la secuencia virtual del plásmido pLentiPuroITGAV y se observa que en los tres casos faltó una gran parte de la secuencia del plásmido la cual está involucrada con la resistencia a la puromicina (Figura 12).

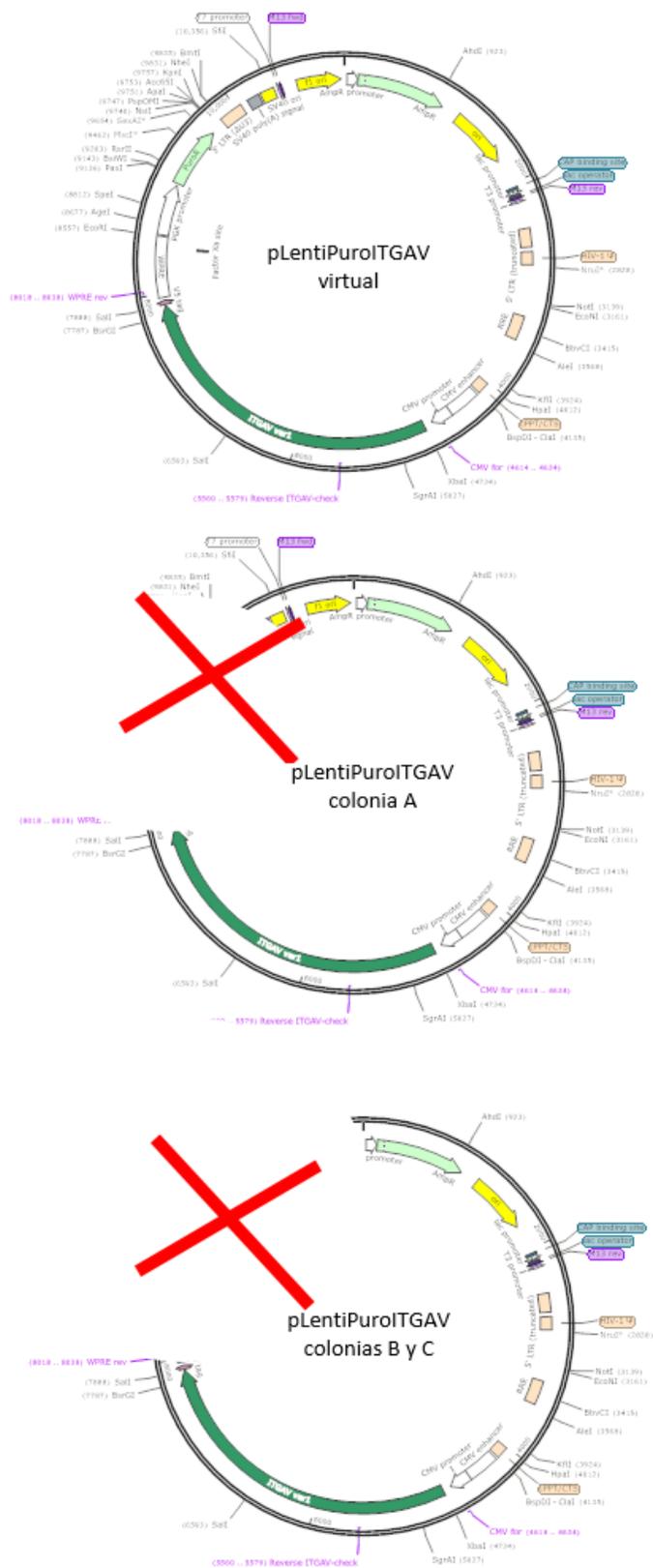


Figura 12. Mapas de plásmidos visualizados con SnapGene viewer, Esquema gráfico del plásmido virtual correcto comparado con los plásmidos obtenidos durante el ensamblaje y sus secuencias faltantes.

3.3 Clonación del vector de expresión con la subunidad de la integrina $\beta 5$ y expresión de ésta proteína en células 293T

3.3.1 Subclonación del vector

Se obtuvo la secuencia amplificada a partir de un PCR para la subclonación del vector de expresión de la integrina subunidad $\beta 5$ (Figura 8 A). Se utilizaron los oligonucleótidos 5 y 6 mostrados en la tabla 3. La linearización del plásmido pLentiHygroGFP (Figura 13) resultó de forma exitosa, se obtuvieron dos bandas en un gel de agarosa al 1%, bandas con una longitud de 8.6 kb y de 0.7 kb.

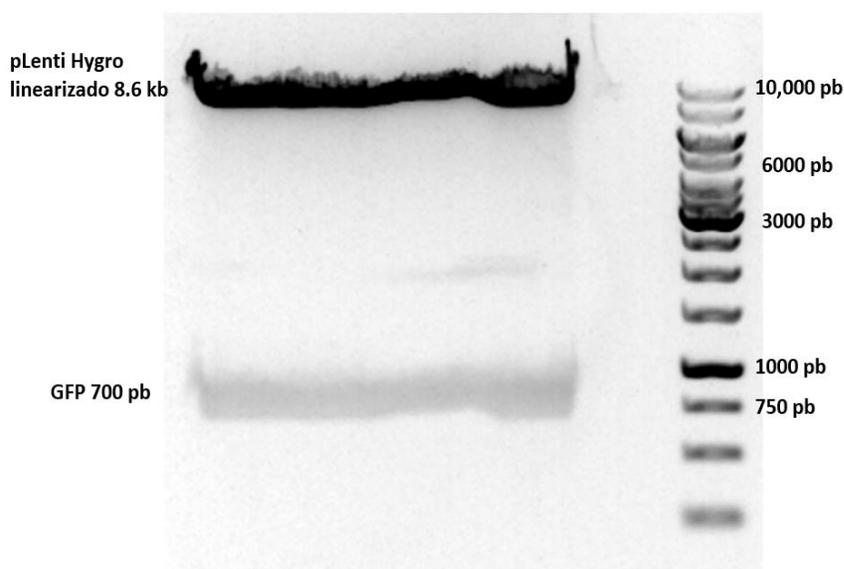


Figura 13. Gel de plásmido pLentiHygro linearizado. Electroforesis de gel de agarosa al 1% con plásmido pLentiHygroGFP linearizado con enzimas de digestión XbaI y Sall. La banda superior pertenece al plásmido pLentiHygro linearizado y la inferior pertenece a la secuencia de GFP.

Las subclonaciones se realizaron con diferentes variantes mostradas en la tabla 9 y se tuvo éxito con las condiciones del experimento 9. Posteriormente se realizó un PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos 10 y 32 (Figura 14), y como control positivo de la reacción de PCR se utilizó al plásmido pLentiHygroGFP. Se obtuvieron bandas de 655 pb y de 954 pb, resultado positivo en ambos PCR.

Tabla 9. Experimentos de ensamblaje de ITGB5 con diversas variantes y resultados para cada experimento

ITGB5									
Experimento	Plásmido andamio	Método de ensamblaje	Tasa de vector inserto	cantidad de vector	cantidad de inserto	colonias	eficiencia de transformación	PCR de colonia positivo	Secuenciación
1	pLentiHygro	Gibson assembly	1:4'	9.53 fmol	39 fmol	17	23 M cfu/μg	no	no
2	pLentiHygro	Gibson assembly	1:3'	8.3 fmol	25 fmol	115	75.7 M cfu/μg	no	no
3	pLentiPuro	Gibson assembly	1:6'	11.26 fmol	68.75 fmol	1	620 M cfu/μg	no	no
4	pLentiHygro	Gibson assembly	1:3'	17.55 fmol	52.65 fmol	0	36 M cfu/μg	no	no
5	pLentiPuro	Gibson assembly	1:3'	11.46 fmol	34.4 fmol	0	2,293.3 M cfu/μg	no	no
6	pLentiHygro	Gibson assembly	1:3'	11.73 fmol	35 fmol	0	2,293.3 M cfu/μg	no	no
7	pLentiHygro	T4 ligasa	1:3.75'	9.46 fmol	33.5 fmol	--	18,181.18 M cfu/μg	no	no
8	pLentiPuro	T4 ligasa	1:3.75'	8.4 fmol	33.5 fmol	--	18,181.18 M cfu/μg	no	no
9	pLentiHygro	T4 ligasa	1:18'	2.65 fmol	48.5 fmol	36	--	si	si, exitosa

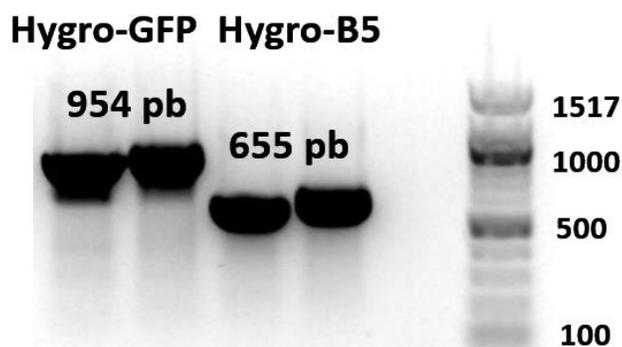


Figura 14. Gel de PCR de colonia de pLentiHygroITGB5. Electroforesis de gel de agarosa al 1% con colonias positivas del ensamble ITGB5-pLentiHygro usando los oligonucleótidos 9 y 32. Longitud de las bandas esperados para PCR de colonia con pLentiHygroGFP y pLentiHygroITGB5, 954 y 655 pb respectivamente.

3.3.2 Modificación de las células 293T con plásmido pLentiPuroITGB5

Se realizaron modificaciones con éste plásmido ensamblado (pLentiHygroITGB5) mediante transfección y transducción en células 293T, utilizando pLentiHygroGFP como control de transducción. El análisis de la expresión de la integrina subunidad $\beta 5$ se realizó mediante citometría de flujo (Figura 15) y resultó un 0% de células positivas para ITGB5 en la transducción. El control positivo tuvo un 36.42% en la transducción. Se utilizaron las líneas celulares HeLa, MDA-MB-231, MCF7 y T47D (éstas tres últimas células de cáncer de mama) como controles positivos de expresión de ITGB5, con un 0% en los histogramas de la citometría de flujo. Estos resultados indicaron un posible problema con el anticuerpo anti-ITGB5.

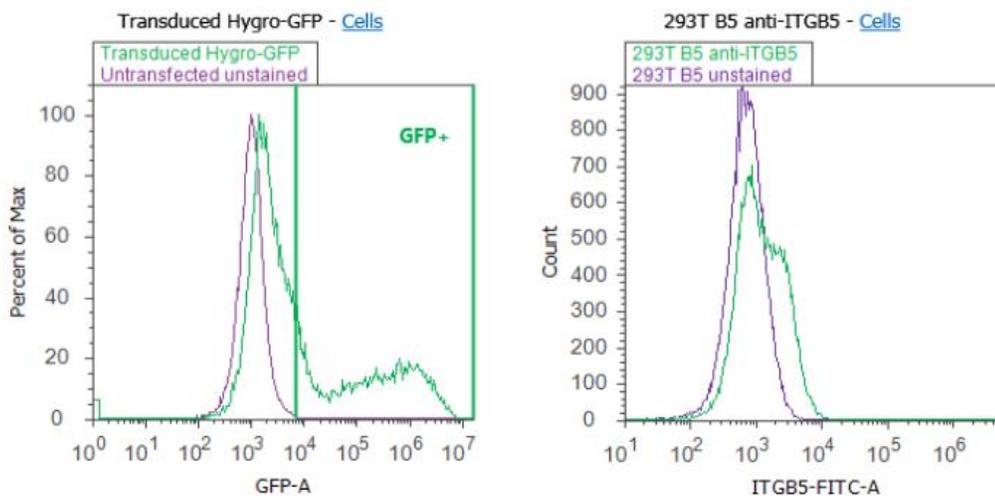


Figura 15. Análisis de expresión de ITGB5 por citometría de flujo. Histogramas de citometría de flujo de células 293T con transducción y transfección con plásmidos pLentiHygroGFP y pLentiPuroITGB5.

Debido al problema con el anticuerpo anti-ITGB5, se realizó un RT-qPCR de las líneas celulares mencionadas anteriormente para analizar la expresión de mRNA de ITGB5. La mayor expresión ($p < 0.001$) de mRNA de ITGB5 fue en las células 293T con transducción con ITGB5 (293T-B5). Expresaron 200 veces más mRNA respecto a las células 293T wt (figura 16). También se observó una mayor expresión de ITGB5 por parte de las células 293T-B5 respecto al resto de las líneas celulares.

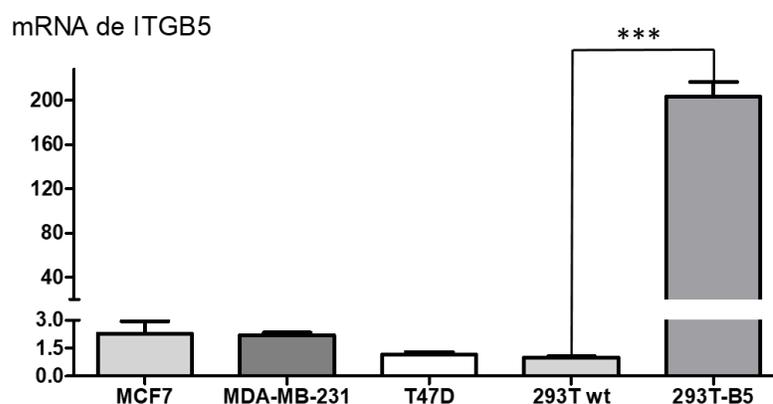


Figura 16. Gráfica de expresión de mRNA de ITGB5 en diferentes líneas celulares normalizada con la línea celular 293T. Se utilizó el gen de referencia Rpl32. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía y prueba de Tukey para múltiples comparaciones. (Datos significativos *** $p < 0.001$)

Para el análisis de expresión de la proteína ITGB5 se realizó un Western blot de las células transfectadas y células transducidas con el plásmido pLentiHygroITGB5, usando como control negativo células silvestre 293T (wt), células 293T con transfección con el plásmido pLentiHygroGFP como control positivo de transfección. El anticuerpo utilizado en el Western blot fue un anti-T7, debido a que se le agregó esta bandera (T7) al final de la ITGB5, y el anticuerpo secundario fue un anticuerpo anti-ratón. Se obtuvieron bandas exitosas con las proteínas de las células 293T-B5, teniendo una banda en un peso alrededor de 100 kDa (la ITGB5 tiene un peso aproximado de 100 kDa) y sin bandas en los carriles correspondientes a las proteínas de 293T wt y 293T-GFP (Figura 17), que corresponden a los controles negativos.

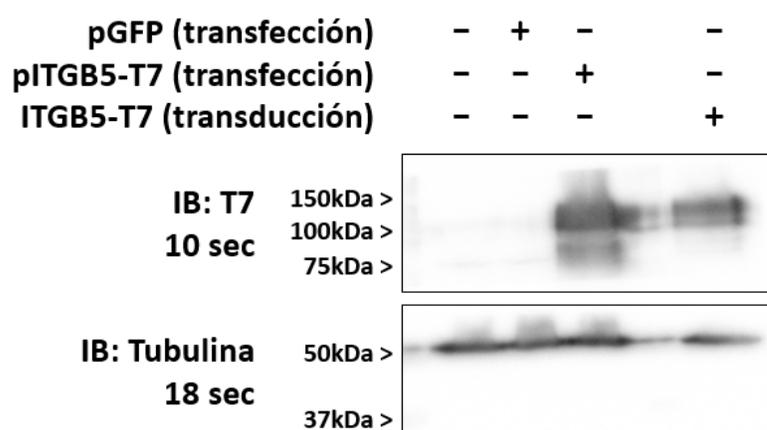


Figura 17. Western blot de proteínas de células 293T con expresión de ITGB5. Western blot de proteínas de células 293T con transfección de pLentiHygroITGB5 y pLentiHygroGFP y con transducción pLentiHygroITGB5. Se utilizó anti-T7, bandera que se encuentra unida a la ITGB5. Se muestran bandas con anti-tubulina como control positivo del Western blot.

Las células con transfección y transducción con pLentiHygroB5 fueron cultivadas en medio DMEM completo suplementado con el antibiótico higromicina a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las células proliferaron y se expandieron para ser almacenadas en crio viales y seguir utilizando éstas células. Para confirmar los resultados se secuenciaron los plásmidos pLentiHygroITGB5 de las colonias positivas obtenidas. Los resultados se alinearon con la secuencia virtual del plásmido pLentiHygroITGB5 y se observó un alineamiento exitoso con ambas colonias.

3.4 Aislamiento de exosomas de células 293T modificadas para la expresión de las subunidades de la integrina $\alpha_v \beta_5$ y caracterización de la expresión de las integrinas en los exosomas aislados

Se realizó el aislamiento de los exosomas de las células 293T wt y 293T-B5. El tamaño se analizó mediante zetasizer, observando una distribución monodispersa a 103 nm para los exosomas de las células 293T wt y un pico de 117 nm en los exosomas de las células 293T-B5 (Figura 18). Se observaron mediante TEM, partículas esféricas (Figura 19). Se realizó la medición de los exosomas mediante las imágenes de microscopía electrónica de transmisión a través del software ImageJ (1.8.0_112), dónde se observa un cambio significativo del tamaño de los exosomas de células 293T wt ($p < 0.05$) en comparación a los exosomas de las células 293T-B5, que representa un 9% de mayor tamaño para los 293T wt (Figura 20).

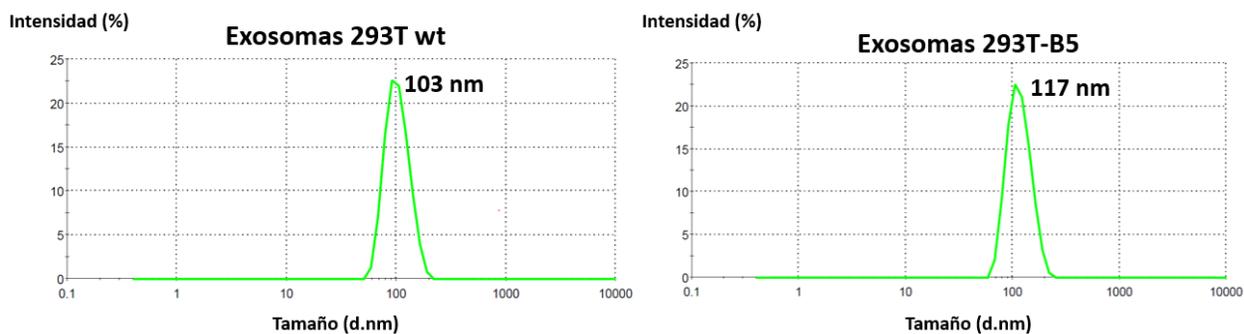
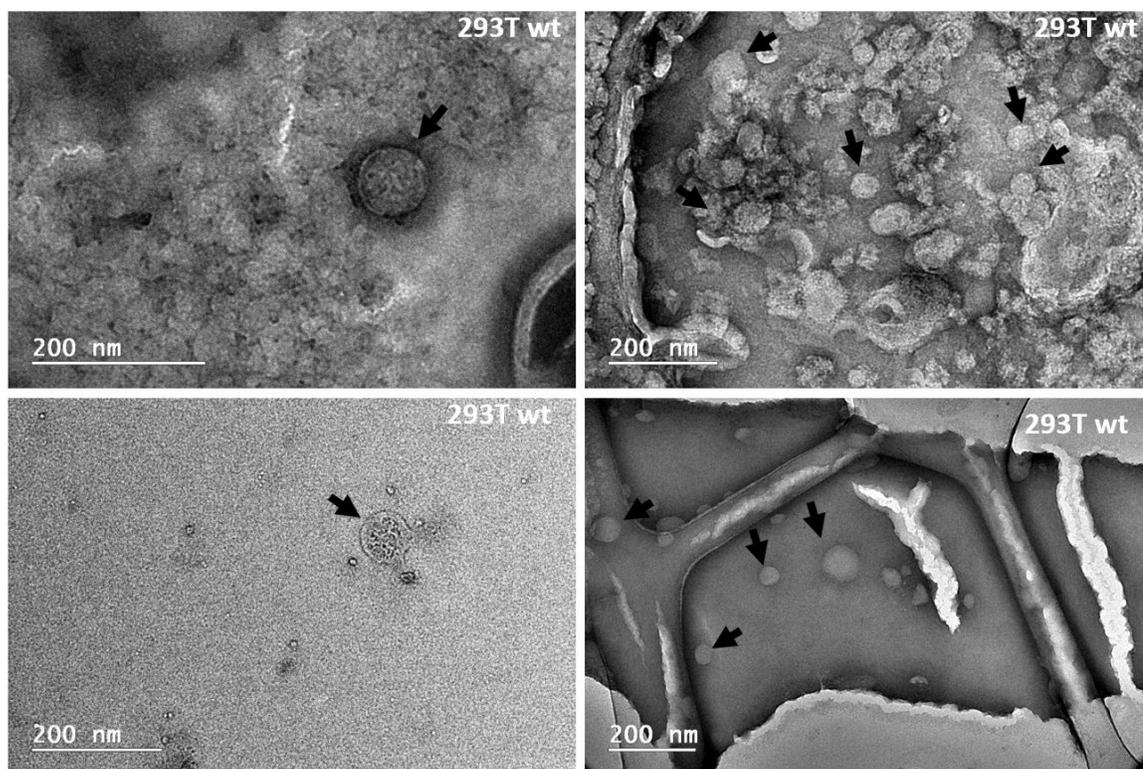


Figura 18. Tamaño de exosomas funcionalizados. Histogramas de Zetasizer nano de exosomas provenientes de líneas celulares 293T wt y 293T-B5. Diámetro expresado en nanómetros (d.nm).

A



B

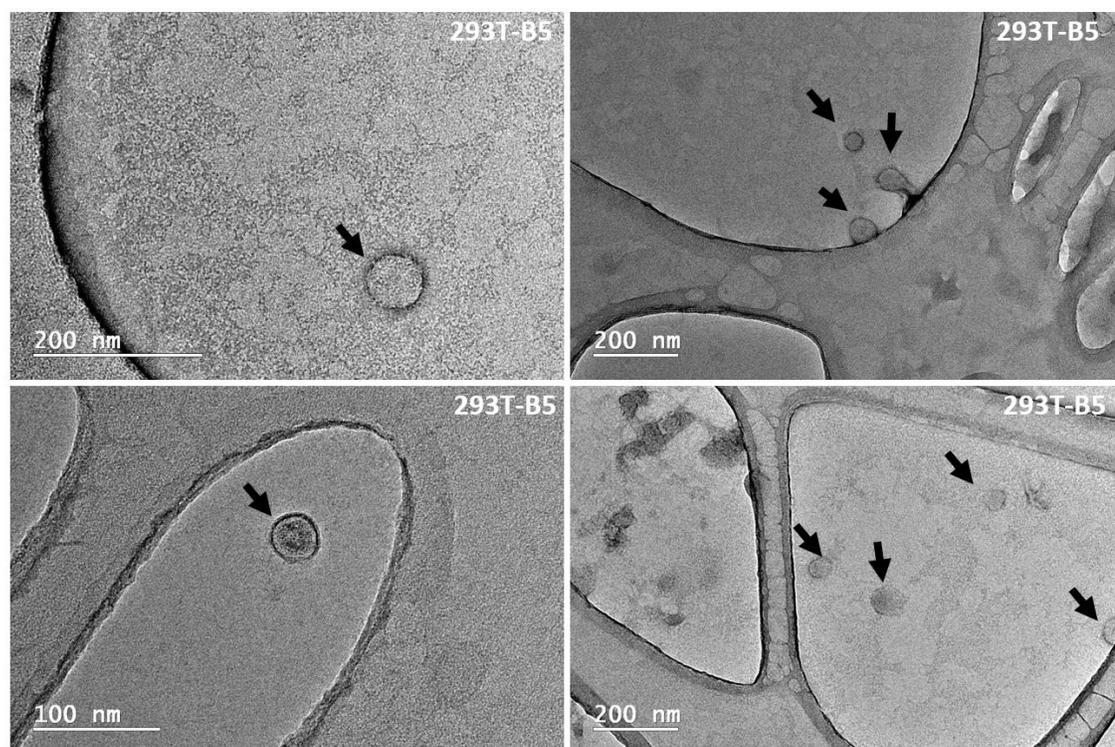


Figura 19. Micrografías mediante TEM de exomas funcionalizados. Microscopía electrónica de transmisión de exomas provenientes de A) células 293T wt y B) 293T-B5. Las flechas indican a los exomas.

Diámetro de los exosomas (nm)

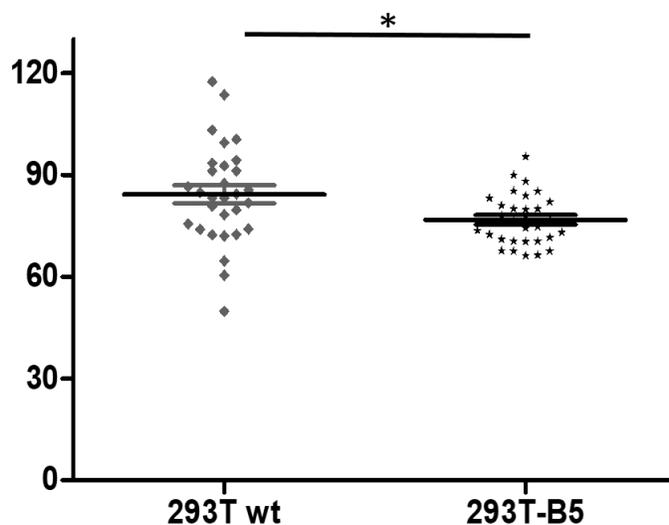


Figura 20. Gráfica de comparación de diámetros entre exosomas aislados de células 293T wt y 293T-B5. Se analizaron los diámetros de los exosomas a partir de imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión utilizando el software ImageJ (1.8.0_112). Análisis estadístico utilizando prueba t de student de dos colas. (Datos significativos * $p < 0.05$).

Se analizaron 7 μ g de proteína en un Western blot donde se observó una banda en el control positivo de proteínas de células 293T-B5 y una banda en la muestra de proteínas de exosomas provenientes de células 293T-B5. No se observaron bandas en los controles negativos, representados por proteínas de células 293T wt y proteínas de exosomas de células 293T wt (Figura 21).

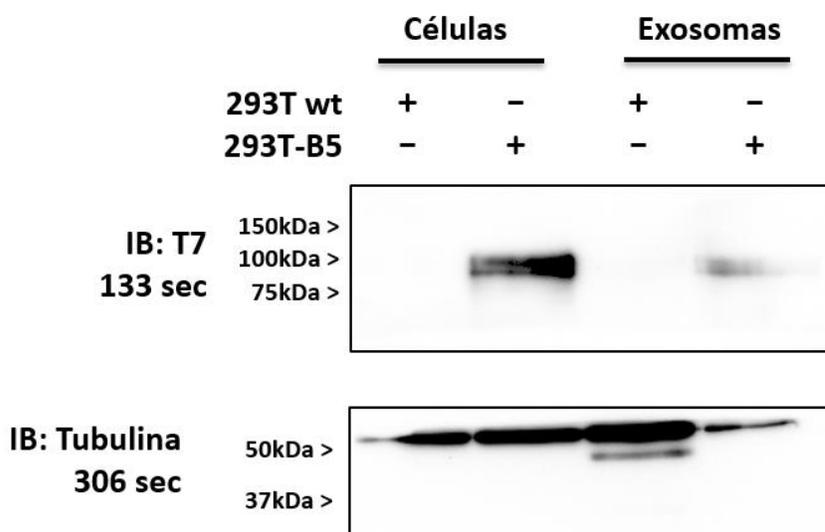


Figura 21. Western blot para análisis de expresión de proteína ITGB5 en exosomas. Western blot de proteínas de células 293T wt, con transducción pLentiHygroITGB5, proteínas de exosomas provenientes de células 293T wt y 293T-B5. Se utilizó anti-T7, bandera que se encuentra unida a la ITGB5. Se muestran bandas con anti-tubulina como control positivo.

Capítulo 4. Discusión

La formación de la metástasis es altamente favorecida por el nicho premetastático. El nicho premetastático es formado por la interacción de exosomas al nuevo tejido a colonizar, lo que conllevará al reclutamiento de células derivadas de médula ósea que a su vez generarán las condiciones en el tejido secundario, para una mejor proliferación por parte de las células cancerígenas.

Los exosomas son nano-vesículas de capa bilipídica de 50 a 150 nm, pueden contener proteínas, lípidos y material genético, además de tener en sus membranas proteínas y lípidos que les confieren estabilidad y especificidad. La función de los exosomas es brindar comunicación de célula-célula y célula-ambiente.

Se ha demostrado que las integrinas son las que ocasionan el organotropismo por parte de los exosomas hacia el nuevo tejido a colonizar. Un ejemplo de esto son los exosomas provenientes de células cancerígenas pancreáticas que tienen en sus membranas integrinas $\alpha_v\beta_5$ y por lo tanto se dirigirán al hígado, desencadenando el nicho premetastático y eventualmente la metástasis.

Emulando ésta estrategia por parte de las células cancerígenas, es posible utilizar los exosomas como caballo de Troya, cargándolos con algún fármaco y darles un organotropismo con el fin evitar la formación del nicho premetastático lo que eventualmente inhibirá la metástasis.

En esta tesis se modificaron células con el fin de funcionalizar exosomas con la subunidad de la integrina β_5 , se estandarizó el método de aislamiento de exosomas y posteriormente se caracterizaron para observar la inclusión de la subunidad de la integrina en los exosomas.

Se estandarizó el método de aislamiento de exosomas analizando el tiempo de proliferación por parte de las células HeLa, B16F1 y 293T, la capacidad de proliferar y mantenerse en diferentes medios condicionados, así como la purificación de exosomas mediante ultracentrifugaciones y filtraciones.

Las ultracentrifugación como método de aislamiento de los exosomas ha sido utilizado por numerosos grupos de investigación, entre los que destacan el grupo de la universidad de Ithaca College en Nueva York, E.U.A liderados por el Dr David Lyden (Kaplan et al., 2005; Costa-Silva et al., 2015; Hoshino et al., 2015), autores de diversas publicaciones científicas en las cuales está basado este proyecto.

Durante la estandarización del método de aislamiento de exosomas por ultracentrifugación, los primeros experimentos mostraban en los análisis de tamaño de partículas más de una población. Además de tener en el histograma de la distribución de tamaños por medio del zetasizer un pico cercano a los 100 nm, se observaban otros picos que iban desde los 500 hasta los 4000 nm. Razón por la cual estandarizamos y modificamos el método, incluyendo la filtración en el PBS donde se resuspendieron los exosomas y además las soluciones con exosomas se filtraron en un paso intermedio entre las ultracentrifugaciones. Las filtraciones se llevaron a cabo con un filtro de membrana de tereftalato de polietileno con una porosidad de 0.22 μm . De esta manera se redujo el número de picos en el análisis de tamaño de partículas, logrando obtener una distribución monodispersa alrededor de los 100 nm.

Abramowicz et al. (2018) reportaron diámetros de 90 nm en exosomas aislados a partir de cultivos celulares, aunque no son los mismos diámetros reportados en ésta tesis, son muy similares. Realizaron el aislamiento por el método de ultracentrifugación y la caracterización del tamaño se realizó por medio de dispersión de luz a través de un Zetasizer Nano, utilizando las mismas técnicas para aislamiento y caracterización que éste proyecto. Sin embargo, no utilizaron la misma línea celular, utilizando células Detroit 562 (células epiteliales de la faringe de un sitio metastático), motivo por el cual los exosomas aislados por nosotros no tienen el mismo diámetro.

Existen métodos de aislamiento de exosomas diferentes al empleado en este proyecto. Uno de ellos desarrollado por la empresa ThermoFisher Scientific e Invitrogen llamado Total Exosome Isolation Reagent (from cell culture media), el cual consiste en un sencillo reactivo polimérico que paraliza las moléculas de agua y expulsa las partículas con menos solubilidad, en éste caso los exosomas. El reactivo se agrega al medio recolectado del cultivo celular y se incuba durante la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifuga a 10,000 g por una hora y se toman los exosomas resuspendiendo en PBS el sedimento generado. Este método de aislamiento parece ser muy ventajoso, al ser relativamente más rápido, se requiere de menos equipo especializado y costoso (como una ultracentrifugadora) y con menos pasos que el usado por este proyecto. Sin embargo, este procedimiento tiene una desventaja, los exosomas aislados por éste método al ser expuestos a este reactivo no pueden ser usados en experimentos posteriores *in vivo*, lo que representa un problema para las perspectivas de este proyecto y el análisis del organotropismo que las integrinas brindarían a los exosomas. Además de éste producto reactivo de aislamiento existen otros muy similares como el ExoQuick presentado por System Biosciences, pero presentan la misma desventaja.

El método de aislamiento de exosomas por ultracentrifugación, previamente, ha sido modificado para tener un mejor rendimiento, Gheinani et al. (2018) acoplaron éste método a una cromatografía de

exclusión por tamaños. Compararon el rendimiento de aislamiento entre el método de ultracentrifugación, el de ultracentrifugación-cromatografía de exclusión por tamaños y el método que utiliza un tipo de reactivo polimérico. El método con el reactivo polimérico mostró la menor pureza y una menor consistencia en la caracterización de los exosomas. Por otro lado, el método con una mayor consistencia y que presentó más estabilidad en la concentración de proteínas fue el de ultracentrifugación acoplado a cromatografía de exclusión por tamaños. Utilizar éste tipo de metodología para nuestro proyecto supondría una mejora en la calidad de los exosomas obtenidos, debido a nuestro interés de la funcionalización de éstos con integrinas.

Se realizaron los experimentos necesarios para el diseño y clonación de dos nuevos plásmidos, el pLentiHygroITGB5 y el pLentiPuroITGAV. Las clonaciones resultaron muy complicadas, aun cuando no se esperaba esta clase de problemas.

Se lograron obtener las secuencias codificantes para las subunidades de las integrinas, además de la linearización del plásmido lentiviral andamio. El problema surgió durante el proceso de ensamblaje de la secuencia de la integrina en el plásmido linearizado lentiviral, la cual se hizo con el kit de subclonación Gibson assembly cloning kit de New England Biolabs. El kit de ensamblaje ya ha sido utilizado en el laboratorio por el grupo del Dr Fournier para ensamblar las secuencias de las proteínas Tie2 y Beta-galactosidasa en el vector linearizado pLJM1.

Se pensó que los problemas se debieron al extenso tamaño de las secuencias de las integrinas (aproximadamente de 2400 y 3000 pares de bases) aunque la secuencia de Beta-galactosidasa también tiene una longitud similar a éstas (3072 par de bases), además que el kit de ensamblaje menciona que no debe haber problema con estas longitudes. Se decidió cambiar de método de ensamblaje por uno más tradicional como lo es el uso de ligasa, utilizando el kit de ligación con ligasa T4 de ThermoFisher Scientific. Este método de ensamblaje al final resultó positivo obteniendo ensamblajes con PCR de colonia exitosos.

Sin embargo, cuando los plásmidos de colonias positivas fueron secuenciados, observamos que les hacían falta secuencias relacionadas principalmente con la resistencia al antibiótico puromicina, siendo nula la posterior selección con antibiótico de las células positivas a la transducción. Por lo que no se generó de forma exitosa la subclonación con el pLentiPuroITGAV.

Se tiene la conjetura de que este resultado se relaciona a un problema con el plásmido andamio pLentiPuroGFP y a una linearización incorrecta. Y que en el momento de su linearización con las enzimas

de restricción XbaI y Sall (enzimas de New England Biolabs) se perdieron las secuencias relacionadas a la resistencia a la puromicina. Aun así, se realizó una transfección transitoria en células 293T y se caracterizó la expresión de la ITGAV utilizando citometría de flujo y posteriormente Western blot. Se identificó la expresión de ésta integrina por ambos métodos, mostrando así que se tiene un plásmido con la secuencia correspondiente a la ITGAV, aunque con un plásmido incompleto con el cual no es posible realizar una selección con antibiótico para las células positivas a una transducción con éste plásmido. Al no tener un cultivo celular compuesto exclusivamente de células positivas con ITGAV, no es conveniente realizar el aislamiento de exosomas.

El ensamblaje del plásmido pLentiHygroITGB5 fue exitoso, teniendo resultados positivos en el PCR de colonia y en la secuenciación. Con éstos resultados, se realizó la modificación genética en las células 293T mediante la transducción con el plásmido pLentiHygroITGB5, obteniendo células 293T-B5. Las células transducidas se seleccionaron con el antibiótico higromicina y posteriormente se caracterizó la expresión de la ITGB5 mediante un RT-qPCR y por Western blot.

Se intentó la caracterización mediante citometría de flujo, pero nunca se obtuvieron muestras positivas. Se tienen dos hipótesis al respecto, la primera implica en que por alguna razón la ITGB5 no se va a la membrana de la célula y es por eso que no se puede observar mediante el método de citometría de flujo, pero si es posible ver una mayor expresión de mRNA de la ITGB5 comparando con células 293T silvestres y además es posible observar la expresión de la proteína mediante Western blot. Una forma de probar la primera hipótesis sería con un experimento de biotilación, etiquetando las proteínas de la superficie de la célula con biotina y posteriormente analizar la ITGB5 esperando que se encuentre unida a la biotina, confirmando que ésta integrina se encuentre en la membrana extracelular. La segunda hipótesis es que el anticuerpo fluorescente anti-ITGB5 para citometría de flujo no funcione adecuadamente, se utilizaron distintas células como lo son la línea celular A549 y las HeLa de acuerdo a la literatura tienen la expresión de la ITGB5, sin embargo, no mostraron presencia de ésta integrina en la citometría de flujo.

Una vez con las células ya modificadas obteniendo células 293T-B5, fueron aislados exosomas de éstas células y también de 293T silvestres para posteriormente caracterizar su tamaño por zetasizer, morfología con TEM, concentración de proteínas y contenido de ITGB5 mediante Western blot.

Los exosomas aislados de las células 293T-B5 tenían un tamaño similar comparado con los exosomas aislados de células 293T silvestres. Por Western blot fue posible encontrar presencia de ITGB5 en los

exosomas que provenían de células 293T-B5 y no así en los exosomas provenientes de células 293T silvestres. Con éste resultado podemos decir que obtuvimos exosomas funcionalizados con la ITGB5.

Ya ha sido reportado el funcionalizar exosomas para agregarles un tropismo, Tian et al. (2017) para generar un tratamiento dirigido a enfermedades cerebrovasculares, conjugaron ligantes funcionales a superficies de exosomas. Utilizando el método de la química de clic libre de cobre se conjugó el péptido RGDyK cíclico (Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys), el cual tiene una afinidad a las células endoteliales vasculares del cerebro, con exosomas. A diferencia de nuestro método de funcionalización, por modificación genética de las células productoras de los exosomas, el método de la química de clic libre en los exosoma solo ha permitido conjugar péptidos pequeños.

Ohno et al., (2013) agregaron un péptido en la membrana de los exosomas, funcionalizándolos mediante la modificación genética de las células productoras de los exosomas, método de funcionalización que se utilizó en éste proyecto. Realizaron una transfección en las células HEK293 para la expresión del péptido Ge11 (secuencia de aminoácidos YHWYGYTPQNVI), el cual tiene una especificidad con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés). El EGFR es sobreexpresado por distintas células tumorales, por lo que funciona como blanco terapéutico. Consistentemente con nuestros resultados, la transducción lentiviral en células en cultivo logró funcionalizar a los exosomas aislados de estas.

El siguiente paso es el estudio de éstos exosomas funcionalizados de forma *in vivo* en un organismo modelo. Las perspectivas de éste proyecto es realizar en un modelo murino el análisis del organotropismo por parte de éstos exosomas previamente etiquetados por fluorescencia y observarlos en los órganos mediante histología y microscopía.

El hecho de contar con exosomas funcionalizados con un organotropismo específico supone una gran ventaja contra el cáncer y las metástasis, teniendo un avance en terapias dirigidas. Una terapia dirigida conlleva el uso de menos fármacos, por lo tanto, se disminuirán considerablemente los efectos secundarios y redundará en una reducción económica de los tratamientos al requerir una menor cantidad de fármaco.

Capítulo 5. Conclusiones

En esta tesis se realizó la modificación genética de la línea celular 293T para la producción de exosomas funcionalizados con la integrina subunidad β_5 . Cumpliendo positivamente con la hipótesis planteada al inicio del proyecto, la cual postulaba que mediante la modificación de las células 293T con la secuencia que codifica para la integrina subunidad β_5 los exosomas provenientes de éstas células tendrán consigo ésta integrina.

Se estandarizó un protocolo de aislamiento de exosomas por medio de filtrado y ciclos de ultracentrifugación, así como la caracterización de éstos por medio de dispersión de luz dinámica y TEM. Métodos y técnicas que serán de utilidad en el laboratorio y equipo de trabajo para continuar con el desarrollo del proyecto y prospectivas de éste.

Los exosomas como vehículo de fármacos supone una gran ventaja en el tratamiento del cáncer, disminuyendo la cantidad de fármacos utilizados. La metástasis es la principal responsable de las muertes por cáncer, con exosomas funcionalizados que tengan como blanco al nicho pre-metastático se brindaría una novedosa estrategia terapéutica.

Literatura citada

- Abramowicz, A., Marczak, L., Wojakowska, A., Zapotoczny, S., Whiteside, T., Widlak, P., Pietrowska, M. (2018). Harmonization of exosomes isolation from culture supernatants for optimized proteomics analysis. *PLoS ONE* 13(10): e0205496.
- Albert, M.L., Kim, J.I., Birge R.B. (2000). Alphavbeta5 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nature Cell Biology* 2(12), 899-905.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., et al. *Molecular Biology of the Cell*. (4th ed.) New York: Garland Science; 2002. Integrins..
- Azmi, A., Bao, B., Sarkar, F. (2014). *Cancer Metastasis Reviews*, 32(0), 1–33.
- Barczyk, M., Carracedo, S., Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and tissue research*, 339(1), 269.
- Campeau, E., Ruhl, V.E., Rodier, F., Smith, C.L., Rahmberg, B.L., Fuss, J.O., Campisi, J., Yaswen, P., Cooper, P.K., Kaufman, P.D. (2009). A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS ONE* 4(8): e6529.
- Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B. K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M.T., Molina, H., Xiang, J., Zhang, T., Theilen, T.M., García-Santos, G., Williams, C., Ararso, Y., Huang, Y., Rodrigues, G., Shen, T.L., Labori, K.J., Lothe, I.M.B., Kure, E.H., Hernandez, J., Doussot, A., Ebbesen, S.H., Grandgennett, P.M., Hollingsworth, M.A., Jain, M., Mallya, K., Batra, S.K., Jarnagin, W.J., Schwartz, R.E., Matei, I., Peinado, H., Stanger, B.Z., Bromberg, J., Lyden D. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature Cell Biology*, 17(6), 816–826.
- Cox, T. R., Rumney, R. M., Schoof, E. M., Perryman, L., Høye, A. M., Agrawal, A., Bird, D., Latif, N.A., Forrest, H., Evans, H.R., Huggins, I.D., Lang, G., Linding, R., Gartland, A., Erler, J.T. (2015). The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature*, 522(7554), 106-110.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman D., Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Recuperado el 21 de junio de 2017 de: <http://globocan.iarc.fr>
- Gheinani, A., Vögeli, M., Baumgartner, U., Vassella, E., Draeger, A., Burkhard, F., Monstyrskaya, K. (2018). Improved isolation strategies to increase the yield and purity of human urinary exosomes for biomarker Discovery. *Scientific Reports* 8, 3945.
- Haney, M., Natalia, L., Klyachko, Yuling, Zhao, Richa, Gupta, Evgeniya G., Plotnikova, Zhijian, He, Tejash Patel, Aleksandr Piroyan, Marina Sokolsky, Alexander V. Kabanov, Elena V. Batrakova (2015).

Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *Journal of Controlled Release*, 207 (2015) 18–30

- Hegmans, J. P., Gerber, P. J., Lambrecht, B. N. (2008). Exosomes. *Functional Proteomics: Methods and Protocols*, 97-109.
- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Mark, M.T., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplod, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A.F., Ararso, Y., Zhang, T., Zhang, H., Hernandez, J., Weiss, J.M., Dumont-Cole, V.D., Kramer, K., Wexler, L.H., Narendran, A., Schwartz, G.K., Healey, J.H., Sandstrom, P., Labori, K.J., Kure, E.H., Grandgenett, P.M., Hollingsworth, M.A., de Sousa, M., Kaur, S., Jain, M., Pantel, K., Batra, S.K., Jarnagin, W.R., Brady, M.S., Fodstad, O., Muller, V., Pantel, K., Minn, A.J., Bisell, M.J., Garcia, B.A., Kang, Y., Rajasekhar, V.K., Ghajar, C.M., Irina, M., Peinado, H., Bromberg, J., Lyden, D. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527(7578), 329–335.
- Kamerkar, S., LeBleu, V. S., Sugimoto, H., Yang, S., Ruivo, C. F., Melo, S. A., Lee, J.J., Kalluri, R. (2017). Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature* 546, 498-503.
- Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Anna, H., Vincent, L., Costa, C., MacDonlad, D.D., Jin, D.K., Shido, K., Kerns, S.A., Zhu, Z., Hicklin, D., Wu, Y., Port, J.L., Altorki, N., Port, E.R., Ruggero, D., Shmelkov, S.V., Jensen. K.K., Rafii, S., Lyden, D. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438(7069), 820–827.
- Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A., Altevogt, P. (2006). Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunology Letters*, 107(2), 102–108.
- Leber, M. F., Efferth, T. (2009). Molecular principles of cancer invasion and metastasis (Review). *International Journal of Oncology*, 34(4), 414–420.
- Luzzi, K. J., MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Morris, V. L., Chambers, F., Groom, C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *The American Journal of Pathology*, 153(3), 865–873.
- Mehlen, P., Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nature Reviews. Cancer*, 6(6), 449–58.
- National Institutes of Health (2015). What Is Cancer? Tomado del sitio web del National Cancer Institute Recuperado el 21 de junio de 2017 de: <https://www.cancer.gov>

- Ohno, S., Takanashi, M., Sudo, K., Ueda, S., Ishikawa, A., Matsuyama, N., Fujita, K., Mizutani, T., Ohgi, T., Ochiya, T., Gotoh, N., Kuroda, M. (2013). Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Molecular Therapy*, 21 (1), 185-191.
- Oskarsson, T., Acharyya, S., Zhang, X. H., Vanharanta, S., Tavazoie, S. F., Morris, P. G., Downey, R.J., Manova-Todorova, K., Brogi, E., Massagué, J. (2011). Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nature medicine*, 17(7), 867-874.
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C.M., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman C., Badal, K., Garcia, B.A., Callahan, M.K., Yuan, J., Martins, V.R, Skog, J., Kaplan, R.N., Brady, M.S, Wolchok, J.D., Chapman, P.B., Kang, Y., Bromberg, J., Lyden, D. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine*, 18(6), 883-891.
- Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, 320(5882): 1496-501.
- Sceneay, J., Smyth, M. J., y Möller, A. (2013). The pre-metastatic niche: Finding common ground. *Cancer and Metastasis Reviews*, 32(3-4), 449-464.
- Takagi, J., Petre, B.M., Walz, T., Springer, T.A. (2002). Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*, 110(5): 599-11.
- Théry, C., Zitvogel, L., Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews. Immunology*, 2(8), 569-579.
- Tian, T., Zhang, H.X., He, C.P., Fan, S., Zhu, Y.L., Qi, C., Huang, N.P., Xiao, Z.D., Lu, Z.H., Tannous, B.A., Gao, J. (2017). Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy. *Biomaterials*, 150, 137-149.
- Weinberg, R. (2014). *Biology of cancer* (2nd. ed). New York: Garland Science.
- Zhang, Y., Wang, X.-F. (2015). A niche role for cancer exosomes in metastasis. *Nature Cell Biology*, 17(6), 709-711.