

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



**Maestría en Ciencias
en Ciencia de la vida
con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología**

**Inhibición del TGF-Beta por medio de exosomas cargados con
mRNA de betaglicano soluble**

Tesis

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

Presenta:

Oscar Colunga Flores

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Oscar Colunga Flores

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Patricia Juárez Camacho
Codirectora de tesis

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Codirector de tesis

Miembros del comité

Dra. Patricia Juárez Camacho

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Dra. Paulina Segovia Olvera

Dr. Fernando López Casillas



Dra. Denisse Re Araujo
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Copyright ©2022

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 **Oscar Colunga Flores** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

Inhibición del TGF-Beta por medio de exosomas cargados con mRNA de betaglicano soluble

Resumen aprobado por:

Dra. Patricia Juárez Camacho

Codirectora de tesis

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier

Codirector de tesis

El cáncer pancreático es la novena causa de muerte debida a cáncer a nivel mundial. Su alta mortalidad se atribuye al diagnóstico tardío, resistencia al tratamiento y baja reseccabilidad. Sin embargo, la mayoría de las muertes por cáncer pancreático se deben a la metástasis, un proceso donde las células cancerosas se diseminan a otros tejidos, formando un nuevo tumor. El tumor primario induce la formación a distancia de un microambiente que le permite sobrevivir y crecer en el nuevo tejido, que se denomina nicho pre-metastásico. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), es una citocina multifuncional que, junto con otros factores, participa en la regulación de la metástasis. Los exosomas del tumor primario inducen la producción local de TGF- β , conduciendo a un proceso de fibrosis que favorece la colonización hepática por células metastásicas. El betaglicano, uno de los co-receptores del TGF- β , tiene afinidad y en su forma soluble, tiene capacidad para neutralizar al TGF- β . Este proyecto tiene como objetivo producir exosomas dirigidos al hígado, cargados con ARNm de betaglicano soluble para inhibir la formación del nicho pre-metastásico. Para esto, se transdujeron células 293T- $\alpha\beta 5$ para producir el ARNm del betaglicano soluble unido a una etiqueta c-myc. Se seleccionaron las células transducidas con puromicina y se confirmó la expresión del BGs-Myc en los medios condicionados por Western-Blot. La citometría de flujo mostró un 26% de células que expresaban BGs-Myc, por lo que se realizó una dilución límite para obtener sub-clonas, de las que se seleccionaron dos con la mayor expresión de la molécula. Se confirmó la capacidad del BGs-Myc en los medios condicionados para unirse al TGF- $\beta 2$ con un ensayo de marcado por afinidad, así como su capacidad para inhibir la cascada de señalización del TGF- β en células HepG2 de hepatocarcinoma humano. Por último, se aislaron exosomas secretados por las células transducidas, pero no hubo detección del ARN mensajero del betaglicano soluble en los exosomas, por lo que se sigue trabajando en la optimización del método de obtención de vesículas extracelulares. Sin embargo, los resultados sugieren que la molécula obtenida puede utilizarse para neutralizar al TGF- β e inhibir su cascada de señalización.

Palabras clave: Cáncer, páncreas, nicho pre-metastásico, exosomas, TGF- β , betaglicano.

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

Inhibition of TGF-Beta by exosomes containing soluble betaglycan mRNA.

Abstract approved by:

Dra. Patricia Juárez Camacho

Thesis co-director

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier

Thesis co-director

Pancreatic cancer is the 9th cause of cancer-related deaths worldwide. The high mortality of this disease is due to late diagnosis, resistance to therapy and low resectability. Nevertheless, most of the pancreatic cancer-related deaths are caused by metastasis, a process where tumor cells disseminate to other tissues, with the formation of a new tumor. The primary tumor induces the distant formation of a permissive environment that allows it to survive and grow in a new tissue, known as the pre-metastatic niche. Transforming growth factor beta (TGF- β) is a multifunctional cytokine that, along with other factors, participates in the regulation of metastasis. The exosomes of the primary tumor induce the local upregulation of TGF- β in the liver, leading to fibrosis that increases the colonization by metastatic cells. Betaglycan, one of the TGF- β co-receptors, has a high affinity, and, in its soluble form, the potential to neutralize TGF- β . The aim of this study is to produce liver-directed exosomes, that carry mRNA of soluble betaglycan to inhibit the formation of the hepatic pre-metastatic niche. For this, 293T- $\alpha\text{v}\beta 5$ cells were transduced to produce mRNA of soluble betaglycan containing a c-myc epitope. Transduced cells were selected in puromycin and secretion of soluble betaglycan in conditioned media was confirmed by Western-blot. Flow cytometry showed that 26% cells were expressing BGs-Myc, therefore, a limit dilution assay was performed to obtain sub-clones, of which two of them had the highest expression of the molecule. The binding of BGs-Myc in conditioned media for TGF- $\beta 2$ was confirmed through an affinity labeling assay, as well as its capacity to inhibit the TGF- β signaling pathway in HepG2 human hepatocarcinoma cells. Finally, exosomes from the transduced cells were isolated, but no soluble betaglycan mRNA was detected. Therefore, ongoing work is focused on optimizing the isolation of extracellular vesicles. Nevertheless, the results suggest that the obtained molecule can be used to neutralize TGF- β and inhibit its signaling pathway.

Keywords: Cancer, pancreas, pre-metastatic niche, exosomes, TGF- β , betaglycan.

Dedicatoria

A mi familia y amigos.

Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca que me fue otorgada y sin la cual no hubiese podido terminar mis estudios de posgrado, con número de registro 752713 del programa de becas del posgrado. Así como por el apoyo de proyecto CONACYT-SEP, Investigación Científica Básica, con número A1-S-15911.

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada**, al **Posgrado en Ciencias de la Vida** y al **Departamento de Innovación Biomédica**, por haberme permitido ser parte de su comunidad estudiantil, así como de utilizar sus instalaciones para concluir mi formación.

A mis co-directores, el **Dr. Pierrick Fournier**, por haberme aceptado en su grupo de trabajo, por la paciencia, dedicación y todo el asesoramiento en el trabajo académico y experimental. A la **Dra. Patricia Juárez Camacho**, por la motivación y exigirme cuando sabía que podía dar más de mí. Les agradezco enormemente todo lo que compartieron conmigo, los admiro desde que estudiaba la licenciatura y este tiempo no hizo más que incrementar eso.

A mi comité de tesis: **Dra. Meritxell Riquelme Pérez**, **Dra. Paulina Segovia Olvera** y **Dr. Fernando López-Casillas**. Muchas gracias por su apoyo en la formación de este proyecto y su comprensión en nuestras primeras reuniones. Sus aportes desde cada una de sus líneas de investigación ayudaron a tener una visión más amplia de este proyecto.

Un agradecimiento especial al **Dr. Fernando López-Casillas** y al técnico académico **Valentin Mendoza Rodríguez**, del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo con los ensayos de marcado por afinidad realizado en su laboratorio.

A la **Dra. Rosa Mouriño**, por ayudarme a recordar porque quería estudiar un posgrado.

A la **Dra. Edna Sánchez**, por su apoyo y disposición con el trabajo en el foto-documentador.

A mis profesores del posgrado, por compartir con nosotros su pasión por el conocimiento científico.

Un especial agradecimiento a la **Dra. Zoila Mora**, por el apoyo y paciencia en mis primeros meses de experimentos, a **Paloma Acosta**, que siempre tuvo disposición para resolver mis dudas. Así como a los

demás integrantes del **P&P Lab**, del cual me siento muy afortunado de haber formado parte, compartir y aprender de cada uno. **Paloma Almeida, Verónica, Tonantzin, Eduardo, Eréndira, Brenda, Carlos, Alcira, Danna, Florian, Paty y Pierrick**. Gracias por hacerme sentir parte de este equipo.

A mis compañeros de generación de CICESE y UNAM, pues a pesar de que soy alguien de pocas palabras, compartir con tantas personas con interés a diversas ramas de la ciencia, fue una de las experiencias más enriquecedoras de mi vida.

Al personal técnico del DIB: **Ricardo y Samanta**, por su disposición. A la **Dra. Johanna**, por su enseñanza en el cuarto de cultivo. Así como al personal administrativo y a **Epifanio**.

A **Isaí y Monse**, por las risas, así como su apoyo técnico y emocional en el laboratorio.

A la **psicóloga Yahaira Castañeda**, por su disposición y ayuda en los momentos de estrés.

A mi querida amiga **Wenhui Wu**, por siempre cuidar de mi salud física y emocional. Gracias por ayudarme a hacer las paces conmigo.

A **Jaqueline y Alessa**, a quienes llevo siempre conmigo.

A **mi familia**, por apoyarme durante toda mi formación.

A la familia **Flores Cantor**, por el gran apoyo e inspiración que han sido siempre para mi familia.

Y a **Robin**, por recibirme al final de un día de trabajo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	i
Resumen en inglés.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xii
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Cáncer pancreático.....	2
1.1.2 Metástasis.....	3
1.1.3 El nicho pre-metastásico.....	5
1.1.4 Los exosomas y la metástasis al hígado.....	6
1.1.5 La vía de señalización del TGF- β	9
1.1.6 El betaglicano.....	11
1.1.7 Tratamientos para inhibir la vía del TGF- β	13
1.2 Justificación.....	15
1.3 Hipótesis.....	15
1.4 Objetivos.....	15
1.4.1 Objetivo general	15
1.4.2 Objetivos específicos.....	15
Capítulo 2. Metodología	17
2.1 Cultivo celular.....	17
2.2 Preparación de plásmidos para transfección y transducción.....	18
2.2.1 Transformación bacteriana de E. coli DH5 α	18
2.2.2 Extracción de ADN plasmídico con kit Miniprep GeneJET	18
2.3 Expresión de ARNm para betaglicano soluble	18
2.3.1 Transfección por método del fosfato de calcio	19
2.3.2 Producción de partículas lentivirales y tansducción lentiviral.....	19
2.3.3 Selección de las células.....	20

2.3.3.3.1	Curva de muerte de células MC3T3-E1.....	20
2.3.3.3.2	Selección de células con antibiótico.....	20
2.3.3.3.3	Citometría para detección de GFP.....	21
2.3.3.3.4	Tinción intracelular para detección de BGs-Myc.....	21
2.3.3.3.5	Análisis en el citómetro de flujo.....	22
2.3.3.3.6	Selección clonal por dilución límite.....	22
2.3.4	Western Blot.....	23
2.3.4.1	Medios condicionados.....	23
2.3.4.2	Obtención de lisados celulares y cuantificación de proteínas.....	23
2.3.4.3	Electroforesis y transferencia de proteínas.....	24
2.4	Caracterización de los exosomas exo-BGs	25
2.4.1	Obtención de medios condicionados.....	25
2.4.2	Aislamiento de exosomas.....	25
2.4.3	Purificación y cuantificación de ARN.....	25
2.4.4	Retrotranscripción y RT-qPCR.....	26
2.5	Caracterización del betaglicano soluble.....	26
2.5.1	Marcado por afinidad del TGF- β	26
2.5.2	Neutralización de TGF- β con BGs-Myc.....	27
Capítulo 3. Resultados		28
3.1	Producción de células que expresen BGs-Myc.....	28
3.1.1	Transfección y transducción lentiviral.....	28
3.1.2	Detección de BGs-Myc en medios condicionados.....	31
3.1.3	Selección clonal de células 293T- $\alpha\beta$ 5-BGs-Myc	33
3.2	Neutralización del TGF- β por el betaglicano soluble.....	38
3.2.1	Unión del BGs-Myc al TGF- β	38
3.2.2	Estandarización de concentración de TGF- β 1.....	39
3.2.3	Ensayo de neutralización del TGF- β	40
3.3	Caracterización de los exosomas exo-BGs.....	42
3.3.1	Aislamiento y caracterización de los exosomas.....	42
3.4	Modificación de células B16-F1 y MC3T3-E1 para expresar BGs-Myc.....	43
3.4.1.	Curva de muerte de células MC3T3-E1 con puromicina.....	43
3.4.2.	Transducción lentiviral	44
3.4.3.	Detección de BGs-Myc.....	45

Capítulo 4. Discusión.....	47
Capítulo 5. Conclusiones.....	51
Literatura citada.....	52
Anexos.....	59

Lista de figuras

Figura		Página
1	Cascada metastásica.....	4
2	Biosíntesis, y tipos de vesículas extracelulares.....	7
3	Exosomas en la formación del nicho pre-metastásico hepático.....	8
4	Cascada de señalización canónica del TGF- β	10
5	Estructura del betaglicano	12
6	Expresión de GFP en células 293T- α v β 5 modificadas.....	28
7	Selección en puromicina incrementa el número de células GFP ⁺	29
8	Las células transducidas expresan BGs-Myc.....	30
9	Segundo experimento de transducción con BGs-Myc.....	31
10	Las células transducidas secretan BGs-Myc al medio extracelular.....	32
11	La dilución límite permite obtener sub-clonas a partir de una sola célula.....	34
12	Las sub-clonas secretan BGs-Myc al medio extracelular.....	35
13	Cuantificación de BGs-Myc en medios condicionados.....	36
14	El anticuerpo anti-Myc parece no ser adecuado para citometría.....	37
15	Interacción del BGs-Myc con el TGF- β 2.....	38
16	Estandarización de TGF- β 1 en ensayos de neutralización.....	39
17	Ensayo de neutralización del TGF- β con BGs-Myc.....	40
18	El BGs-Myc inhibe la cascada de señalización del TGF- β	41
19	Detección de ARNm para GFP en células B16-F1 GFP.....	43
20	Curva de muerte de células MC3T3-E1 en cultivo con puromicina.....	44
21	Las células B16-F1 y MC3T3-E1 no expresan GFP pero sobreviven en puromicina.....	45
22	Las células B16-F1 y MC3T3-E1 no expresan BGs-Myc.....	46
23	Membranas sin cortar de Western-blot correspondientes a Figuras 10A, 10B, 12A, 13A, y 22.....	59

24 Membranas sin cortar de Western-blot correspondientes a Figuras 17A, 18A y 19A..... 60

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Concentración de puromicina utilizada en la selección de células.....	21
2	Anticuerpos utilizados para citometría de flujo.....	22
3	Anticuerpos utilizados para Western Blot.....	24
4	Secuencias de cebadores utilizados.	26
5	Resultados de la dilución límite.....	33
6	Cuantificación de ARN total de lisados celulares y medios condicionados.....	42
8	ARN total en células y exosomas B16-F1 parentales y transfectadas con GFP.....	42

Lista de abreviaturas

Abreviatura

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BGs-Myc	Betaglicano soluble unido a la etiqueta Myc
CCS	Cadenas de condroitin sulfato
CHS	Cadenas de heparan sulfato
CMO	Células de médula ósea
CMV	Citomegalovirus
C.P.	Cáncer pancreático
C.P.H.	Células progenitoras hematopoyéticas
Exo-BGs	Exosomas con ARN mensajero para el betaglicano soluble unido a la etiqueta Myc
GAG	Glicosaminoglicanos
GFP	Proteína verde fluorescente
GS	Sitio de reconocimiento glicina-serina
LAP	Iniciales en inglés del “péptido asociado de latencia”
LLC	Iniciales en inglés del “complejo mayor latente”
LTBP	Proteína de unión latente al TGF- β
MEC	Matriz extracelular
MIF	Factor de inhibición de migración de macrófagos
nM	Nanomolar
NPM	Nicho pre-metastásico
PTX	Paclitaxel
SARA	Iniciales en inglés para “smad anchor for receptor activation”
SFB	Suero fetal bovino
TEM	Transición epitelio-mesenquimal
TGFBRI	Receptor I del TGF- β
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta

VE	Vesículas extracelulares
μM	Micromolar
pM	Picomolar

Capítulo 1. Introducción

Se define al cáncer como el crecimiento anormal y no regulado de las células de algún tejido, dando pie al crecimiento de un tumor, el cual tiende a interferir con las funciones fisiológicas del tejido originario y finalmente, invadiendo a otros tejidos. Esta patología puede presentarse en cualquier tejido, razón por la que, a la fecha, existen más de 100 tipos diferentes de cáncer, los cuales desarrollan la capacidad de diseminarse a otros tejidos conforme evoluciona la enfermedad (National Cancer Institute, 2021). Este es el caso del cáncer pancreático (C.P.), uno muy difícil de diagnosticar en una etapa temprana, debido a la inconveniente ubicación del páncreas dentro del cuerpo, así como a la falta de especificidad de sus síntomas, como náuseas, dolor abdominal, de cabeza o pérdida de apetito. Debido a esto, en el 89% de los casos, el diagnóstico se hace cuando tumor ha alcanzado un tamaño que no permite la cirugía y se vuelve poco responsivo a los tratamientos. Aunado a esto, las células cancerosas han invadido tejidos cercanos e incluso órganos distantes, formando una metástasis (Rawla et al., 2019).

Se entiende por metástasis a la diseminación de las células cancerosas desde el tumor primario a un tejido diferente al que se originó, lo que culmina en la formación de un tumor secundario. Los tumores metastásicos consisten en las células del tumor primario, instaladas en el nuevo tejido (Fares et al., 2020). Las muertes asociadas a cáncer pueden darse por diversas causas; la formación del tumor en órganos vitales, efectos secundarios debidos al tratamiento, complicaciones durante procedimientos quirúrgicos e incluso el suicidio puede considerarse. Sin embargo, la mayoría de las muertes en diversos tipos de cáncer se atribuyen a la metástasis (Dillekås et al., 2019). En el cáncer pancreático, las células migran a pulmones, hueso, cerebro, pero principalmente al hígado. Para esto, las células cancerosas adquieren capacidad migratoria e invasiva, desprendiéndose del tumor primario, adentrarse en la periferia sanguínea y viajar a través de la circulación hasta llegar al sitio del tejido donde se instalará el tumor secundario. Sin embargo, la llegada de las células cancerosas al sitio del nuevo tejido no asegura la metástasis, para esto, se requieren condiciones favorables que permitan la supervivencia y crecimiento del tumor, algo que se conoce como el nicho pre-metastásico (Fares et al., 2020).

Para que estas condiciones existan, las células del tumor primario inducen cambios celulares en el tejido a colonizar, lo que lleva a una modificación molecular del mismo mediante un proceso de comunicación a distancia. Las células cancerosas secretan exosomas, vesículas extracelulares de 30 a 150 nm, cargadas con biomoléculas, como factores solubles, proteínas o ácidos nucleicos (Zhang et al., 2019a). Proteínas de membrana presentes en los exosomas determinan el tipo de células por el cual éstos serán internalizados,

modificando así el órgano a colonizar para que se establezcan las células metastásicas, un efecto conocido como organotropismo. Los exosomas secretados por células de cáncer pancreático cuentan con dímeros de integrinas $\alpha\beta 5$ en sus membranas, por lo que estos son dirigidos mayormente a tejido hepático (Hoshino et al., 2015). La internalización de los exosomas de cáncer pancreático por las células de Kupffer desencadena una sobreexpresión del TGF- β (factor de crecimiento transformante β , por sus siglas en inglés), activando su cascada de señalización en las células estrelladas hepáticas. Esto provoca una sobreproducción de fibronectina y un microambiente fibrótico, que favorece la llegada de células de médula ósea y, por último, de las células cancerosas (Peinado et al., 2017). La activación de la cascada de señalización del TGF- β representa un punto de importancia en los inicios de la metástasis (Costa-Silva et al., 2015).

Uno de los componentes de esta cascada de señalización, el betaglicano, tiene la función de unirse al TGF- β en su porción extracelular y presentarlo a los receptores señalizantes con su dominio de unión a membrana (Lopez-Casillas et al., 1993). Cuando el betaglicano es escindido, sigue uniéndose al TGF- β , pero ya no participa en la activación de la cascada de señalización. Esto llevó a identificar su estructura, los sitios de unión a ligando y a expresar de manera recombinante el dominio extracelular, el cual conserva su afinidad y capacidad neutralizante por el TGF- β (López-Casillas et al., 1991). Su potencial terapéutico ha sido probado en células de cáncer mamario, renal y de próstata (Bandyopadhyay et al., 1999, 2005). Utilizar la capacidad neutralizante del betaglicano soluble, así como la capacidad de entrega específica que otorgan los exosomas, representa un punto de oportunidad para inhibir la formación del nicho pre-metastásico y reducir las muertes asociadas a la metástasis.

1.1 Antecedentes

1.1.1. Cáncer pancreático

Identificado como el doceavo tipo de cáncer de mayor incidencia, así como la novena causa de muerte relacionada a cáncer a nivel mundial, el cáncer pancreático (C.P.) representa una amenaza para la salud de la población en las décadas venideras (McGuigan et al., 2018; Rawla et al., 2019). Se estima que, en 2020, existieron alrededor de 495,773 nuevos casos, con un número de 466,003 muertes a nivel mundial, mientras que la incidencia en México fue de 4,985 casos y 4,720 muertes (GLOBOCAN, 2020). Se proyectan por lo menos 557,688 nuevos casos a nivel mundial para el 2025, posicionando al C.P. en escalas

superiores de mortalidad (Ferlay J et al., 2020). La casi nula diferencia entre la tasa de incidencia y fatalidad del cáncer pancreático no hace más que evidenciar la importancia de combatir a esta enfermedad.

La supervivencia tan baja en los pacientes de C.P. se atribuye a que se diagnostica en un estadio avanzado, la resistencia que presenta a la terapia sistémica y a su propiedad de diseminarse a tejidos distantes, incluso antes de ser diagnosticado. La progresión del C.P. ocurre de manera muy rápida en comparación a otros tipos de cáncer, en parte gracias a la acumulación de mutaciones genéticas (Hruban et al., 2001). Aunado a esto, la alta irrigación sanguínea que recibe el páncreas se convierte en un factor de riesgo para la vida del paciente en estos procedimientos, por lo que solo el 20% de éstos tiene tumores extirpables (McGuigan et al., 2018). Cuando el diagnóstico es temprano y la cirugía es exitosa, la supervivencia mayor a 5 años es del 39%, la cual es muy baja, si se compara con la de otros tipos de cáncer como cáncer mamario o de próstata (Ferlay J et al., 2020; Hawkes, 2019). Sin embargo, solo el 11% de los pacientes entran en esta categoría, pues la mayoría de los diagnósticos se dan cuando el tumor es muy grande o se ha diseminado a otros tejidos. Desafortunadamente, el cáncer pancreático tiene una sintomatología poco específica, que incluye dolor abdominal, de espalda, pérdida de apetito, mareos, entre otros que son compartidos con otras enfermedades. Aunado a esto, la ubicación del páncreas dentro del cuerpo no permite detectar un tumor palpable, por lo que la mayoría de los diagnósticos se dan en estadios avanzados, algo que influye en las estadísticas de esta enfermedad (McGuigan et al., 2018). Se estima que la supervivencia mayor a 5 años se reduce a 13% cuando el tumor se disemina a zonas cercanas al páncreas y a 3% cuando es a tejidos distantes (American Cancer Society, 2021; American Society of Medical Oncology, 2021). La metástasis es el factor determinante en la alta mortalidad de esta enfermedad.

1.1.2. Metástasis

Se define a la metástasis como el crecimiento focal de células tumorales en un sitio anatómicamente distinto al del tumor primario (Fares et al., 2020). Esta es una de las características principales del cáncer y el C.P. no es la excepción, el 50% de los pacientes con esta enfermedad tienen un tumor metastásico al momento del diagnóstico, principalmente en tejido hepático (Keleg et al., 2003). Para que esto ocurra, las células deben pasar por un conjunto de 5 pasos denominados como “cascada metastásica” (Figura 1).

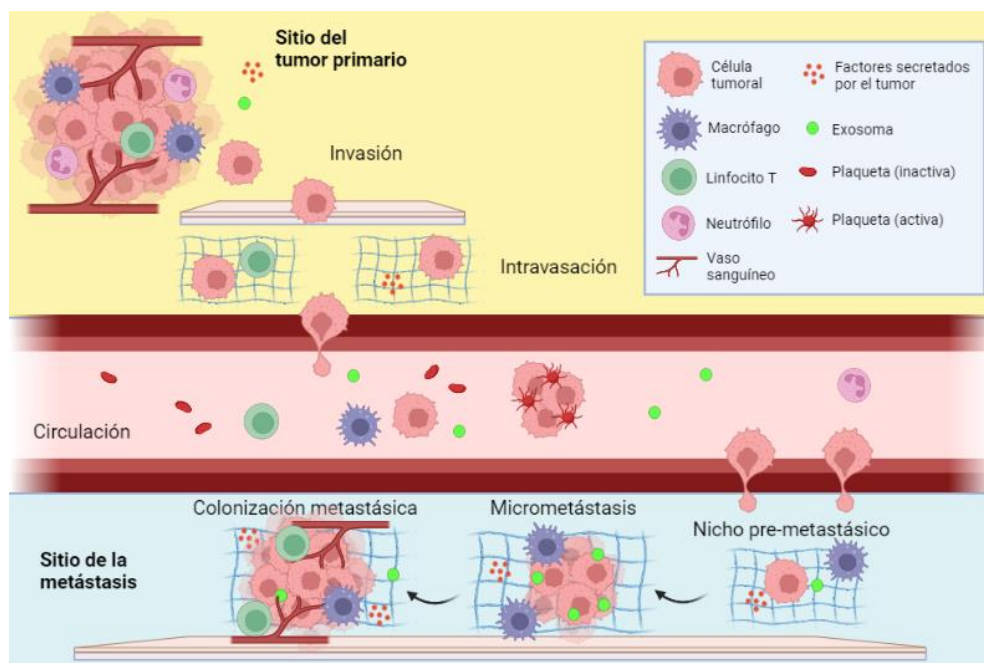


Figura 1. Cascada metastásica. El proceso de metástasis ocurre en 5 pasos; (1) diseminación e invasión, (2) intravasación a la periferia sanguínea, (3) supervivencia en la circulación, (4) extravasación al sitio de la metástasis y (5) colonización metastásica. Los exosomas del tumor primario inducen la formación del nicho pre-metastásico, el cual ofrece las condiciones favorables para que las células cancerosas proliferen y formen un tumor secundario. Modificado de Fares et. al. (2020).

El primer paso es la diseminación de las células del tumor primario e invasión a tejidos cercanos y surge por la señalización de las células con el microambiente tumoral, factores solubles o mutaciones, lo que ocasiona una serie de cambios reversibles en las células cancerosas. Estos cambios dan a las células cancerosas capacidad migratoria e invasiva, perdiendo adhesión al tumor primario y ganando movilidad, algo que se conoce como transición epitelio-mesenquimal (TEM) (Fares et al., 2020). Posteriormente, las células tumorales se adhieren al vaso sanguíneo o linfático más cercano y atraviesan el endotelio vascular, logrando intravasarse a la circulación. Una vez dentro, deben sobrevivir a los componentes del sistema inmunológico dentro de la circulación. Algunas células tumorales se intravasen en forma de agregados con neutrófilos o células estromales del microambiente del tumor primario, lo que les ayuda a evitar una respuesta inmune, mientras que la unión de plaquetas a estos cúmulos les brinda soporte. Las células que lograron sobrevivir se adhieren a los capilares sanguíneos y logran extravasarse al nuevo tejido para colonizarlo y finalmente, establecer la metástasis. Sin embargo, llegar al nuevo tejido no asegura que se formará un tumor secundario, para completar exitosamente la metástasis. Las células tumorales necesitan un microambiente que les permita proliferar (Fares et al., 2020; Keleg et al., 2003).

1.1.3. El nicho pre-metastásico

Para que las células tumorales puedan completar la metástasis, deben existir condiciones favorables que les permitan sobrevivir, proliferar y colonizar el nuevo tejido. A este microambiente se le denomina nicho pre-metastásico (NPM) (Figura 1) (Keleg et al. 2003). Para esto, las células cancerosas inducen un proceso de modificación del sitio de la metástasis antes de su llegada, en el cual se degradan y sintetizan moléculas de matriz extracelular que servirán como soporte estructural. Asimismo, se compone de distintos tipos celulares que fungen a crear y mantener este microambiente.

Para dilucidar esto, Kaplan et al. (2010) transplantaron ratones con células de médula ósea (CMO) que fueron modificadas para expresar la proteína verde fluorescente (GFP), seguido de una inoculación con células de cáncer de pulmón o melanoma murino 4 semanas después. Dos semanas después de inocular las células tumorales, se observaron células fluorescentes en hígado y pulmón, sitios característicos de la metástasis de las células cancerosas inoculadas. Sin embargo, se observaban pequeños asentamientos de células cancerosas hasta el día 16 y un establecimiento hasta el 18. Encontraron que las CMO en los sitios de metástasis eran células progenitoras hematopoyéticas (CPH) VEGFR1⁺ y que la neutralización de este receptor con anticuerpos contra este receptor inhibía la llegada de las células tumorales *in vivo*. Sus resultados indicaban que las células progenitoras hematopoyéticas influían en la llegada de las células cancerosas a los sitios de metástasis (Kaplan et al., 2005).

Para explicar esta influencia, se volteó a ver a las vesículas extracelulares, dada su importancia en procesos de comunicación intercelular. Peinado et al. (2013) inocularon células B16-F10 mCherry⁺ en ratones a los que 7 días después se les inyectaron exosomas de células B16-F10. Los investigadores observaron que los ratones que recibieron exosomas desarrollaban micrometástasis en pulmón al día 19 de la inoculación, a diferencia de aquellos que solo fueron inyectados con PBS. Se observó el mismo efecto cuando transplantaron células de médula ósea GFP⁺ en ratones tratados con exosomas e inoculados con las células B16-F10 mCherry⁺, donde el tratamiento con exosomas resultaba en un mayor reclutamiento de CMO y tamaño de tumor. Juntos, sus resultados indicaban que los exosomas eran imprescindibles en los inicios de la metástasis (Peinado, 2013).

1.1.4. Los exosomas y la metástasis al hígado

Los exosomas pertenecen al grupo de las vesículas extracelulares (VE), junto con los ectosomas y los cuerpos apoptóticos. Con un tamaño relativamente grande, los cuerpos apoptóticos son VE de hasta 5 μm de diámetro que originan durante la apoptosis en un proceso no bien muy caracterizado mediante protrusión de membrana plasmática (Caruso y Poon, 2018). Los ectosomas se originan también por protrusión, aunque en condiciones celulares normales, generando vesículas que abarcan de los 50 a los 1000 nm de diámetro. Por otro lado, los exosomas tienen un origen endocítico (Figura 2), que inicia con una invaginación de la membrana plasmática que encapsula proteínas de membrana, así como moléculas solubles del medio extracelular, formando un endosoma temprano. Este va madurando conforme interactúa con otros endosomas, la red trans-Golgi o incluso con el retículo endoplásmico, modificando su composición. Posteriormente, ocurre una segunda invaginación de membrana, lo que genera pequeñas vesículas con contenido citosólico, formando así, un cuerpo multivesicular (CMV). Finalmente, los CMV se fusionan con la membrana plasmática, liberando exosomas, vesículas de 30 a 150 nm al medio extracelular (Kalluri & LeBleu, 2020).

Una de las características de los exosomas, relacionada a su biogénesis, es que sus proteínas de membrana están determinadas por la célula en la que se generan, influyendo también en el tipo de tejidos con los que pueden interactuar (Figura 2). Por otro lado, los exosomas adquieren las biomoléculas citosólicas y membranales de su célula de origen, entre las que se pueden encontrar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Antimisariis et al., 2018; Kibria et al., 2018). La transferencia de moléculas por exosomas puede inducir respuestas en las células que los internalicen, estimulando señalización con sus ligandos de superficie, transfiriéndoles receptores ya activados, o bien, liberando su carga molecular. Este último puede suceder por fusión de membrana o endocitosis (Y. Zhang et al., 2019). Con estas propiedades, los exosomas son secretados por diversos tipos celulares, se encuentran en todos los fluidos fisiológicos humanos y tienen diferentes funciones, en el sistema inmunológico, en la reparación de heridas, e incluso en el embarazo (Kalluri & LeBleu, 2020; Zhang et al., 2019).

Este transporte de biomoléculas también está involucrado en la progresión de diferentes tipos de cáncer, incluido el C.P., ya sea mediante exosomas secretados por células cancerosas o ajenas al tumor. Un ejemplo es el de pacientes con C.P. tratados con gemcitabina, donde el quimioterapéutico induce la secreción de exosomas cargados con miR-146a y el factor de transcripción Snail por parte de los fibroblastos asociados al tumor, promoviendo la proliferación del tumor (Richards et al., 2017). En condiciones hipóxicas, las células del C.P. secretan exosomas ricos en miR-301a-3p, que activan la

polarización de macrófagos estromales al genotipo M2 y promueven la TEM en las células tumorales, resultando en la ganancia de capacidad metastásica (Wang et al. 2018).

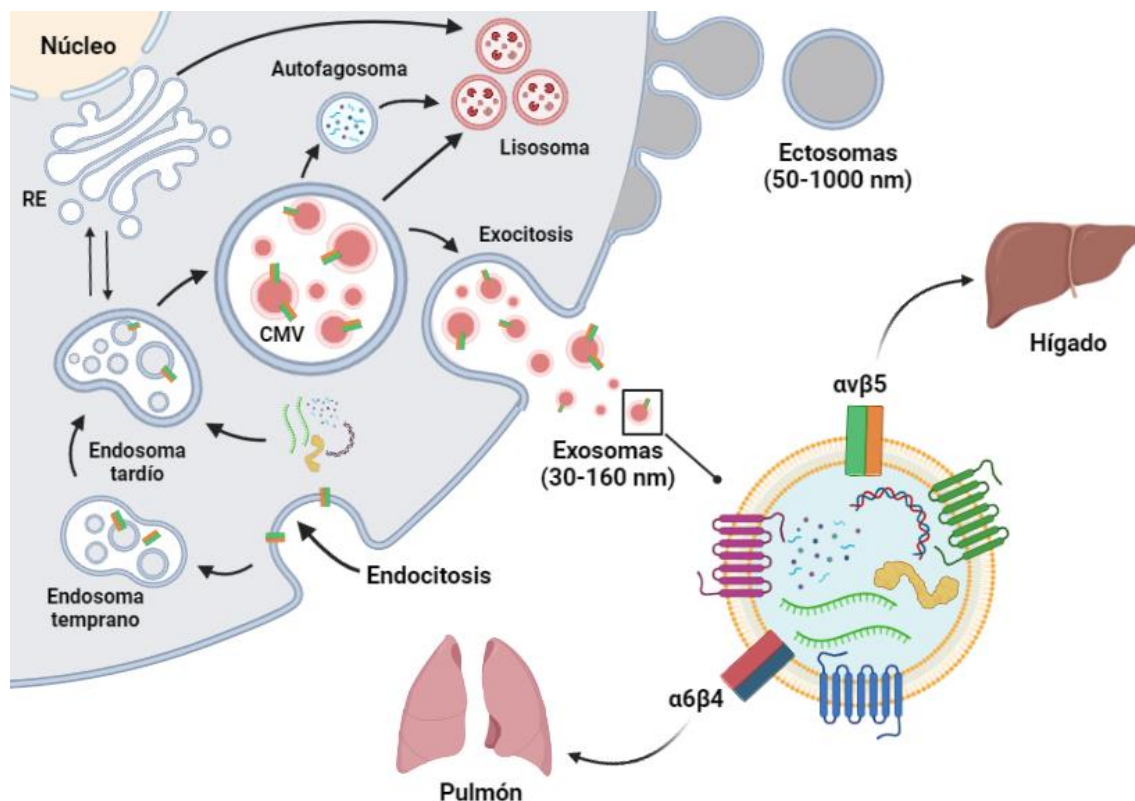


Figura 2. Biogénesis, y tipos de vesículas extracelulares. Los exosomas surgen de una doble invaginación de membrana, lo que origina un endosoma temprano, que madura en un endosoma tardío, hasta tornarse un cuerpo multivesicular (CMV). La heterogeneidad de su carga se debe a la integración de biomoléculas del citosol, así como del intercambio con vesículas del retículo endoplásmico. Finalmente, el CMV vuelve a fusionarse con la membrana plasmática por exocitosis, liberando exosomas de entre 30 a 160 nm al medio extracelular. Las integrinas en la membrana de los exosomas determinan el tejido por el cual serán internalizados. Modificado de Kalluri et. al. (2020) y Hoshino et. al. (2015).

Por otro lado, la comunicación y composición de los exosomas cumple también un papel importante en el organotropismo de la metástasis. Es sabido que las integrinas, glucoproteínas de membrana encontradas como complejos heterodiméricos de una subunidad α y una β , determinan el tejido por el que serán captados. Diferentes tipos de tumores tienen diferentes patrones de expresión de integrinas en sus exosomas; aquellos con las integrinas $\alpha6\beta4$ y $\alpha6\beta1$ son captados por células de pulmón, mientras que aquellos con integrinas $\alpha v\beta5$ los internalizan células hepáticas (Hoshino et al., 2015). Silenciar la expresión de las integrinas o neutralizarlas con anticuerpos revierte la internalización de los exosomas, así como la metástasis en pulmón e hígado. Sin embargo, se puede inducir el organotropismo de los exosomas hacia

tejidos específicos al funcionalizarlos con estas proteínas, otorgándoles una característica que puede ser aprovechada para modelos de terapia dirigida (Hoshino et al., 2015).

Costa Silva et. al. (2015) describieron la formación secuencial del NPM hepático debida a los exosomas (Figura 3). Para esto, inyectaron ratones con exosomas secretados por células de C.P. durante 21 días, los inocularon células cancerosas mCherry⁺ y recuperaron los hígados para evaluar los cambios asociados al NPM. El trabajo reporta que los exosomas secretados por las células de C.P. están cargados con el factor de inhibición de migración de macrófagos (MIF), y son neutralizados por las células de Kupffer, liberando este factor e induciendo la sobreexpresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Esto lleva a la activación de las células estrelladas hepáticas, que aumentan su síntesis de fibronectina, así como el reclutamiento de macrófagos de médula ósea y, finalmente, de las células cancerosas. Sin embargo, estos efectos se perdían al utilizar inhibidores de la vía de señalización del TGF- β , mostrando la importancia de esta molécula en la formación del NPM (Costa-Silva et al., 2015).

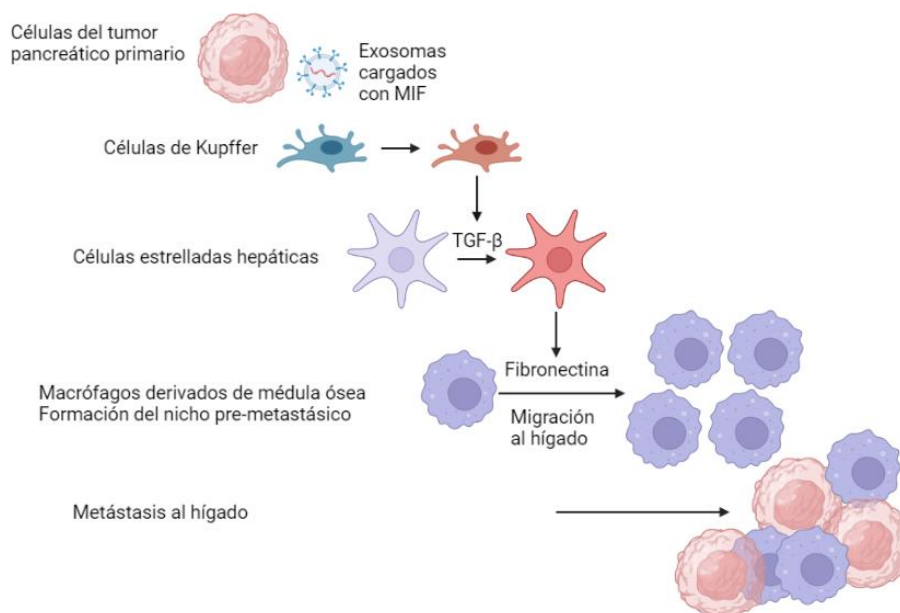


Figura 3. Exosomas en la formación del nicho pre-metastásico hepático. Las células de Kupffer hepáticas son activadas por el MIF en los exosomas secretados por el tumor pancreático, lo que conduce a una sobreexpresión del TGF- β . La activación de la cascada de señalización del TGF- β en las células estrelladas tiene una respuesta fibrótica, que favorece la llegada de macrófagos de médula ósea y la colonización por las células cancerosas en sitios ricos en fibronectina. Modificada de Costa-Silva et. al. (2015).

1.1.5. La vía de señalización del TGF- β

El TGF- β pertenece a la familia de los factores de crecimiento, moléculas de naturaleza proteica, que actúan como mediadores celulares, activando la señalización intracelular a nivel de membrana. El TGF- β es producido por diversos tipos celulares, incluso plaquetas (Heldin, et. al. 2008). Existen tres isoformas de esta molécula, TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, cada una con funciones complementarias más no redundantes, siendo el TGF- β 1 la más común en el cuerpo humano (Dewidar et al., 2019; Principe et al., 2016). El TGF- β es secretado como un homodímero, unido en su extremo C-terminal al péptido asociado de latencia (LAP, por sus siglas en inglés) y en el N-terminal a una proteína de unión latente a TGF- β (LTBP, en inglés) formando el complejo mayor latente (LLC, por sus siglas en inglés). Este complejo es considerado una forma precursora y se encuentra depositado en la MEC en espera de ser activado (Robertson & Rifkin, 2016). La forma funcional o activada del TGF- β puede ser liberada del LLC mediante estímulos bioquímicos como un ambiente ácido o escisión proteolítica (Kubiczkova et al., 2012); sin embargo, el principal mecanismo de activación de este complejo es mediante la interacción con integrinas (Huynh et al., 2019). En este proceso, las integrinas con subunidades α v son importantes para la liberación del TGF- β de la MEC en tejido hepático de pacientes con enfermedades hepáticas crónicas.

La señalización mediada por el TGF- β activo inicia una vez que éste se une a su receptor de membrana (Figura 4), un complejo heterodimérico que puede ser clasificado según su función en: receptores señalizadores (tipo I/TGFBRI y II/TGFBRII) y no señalizadores (receptores de tipo III/TGFBRIII). En el grupo de los receptores señalizadores, se encuentran glicoproteínas transmembranales, que cuentan con un dominio extracelular rico en cisteína y N-glucósido, mientras que la región citosólica tiene un dominio serina-treonina cinasa (Prieto M, 2002). Las diferentes isoformas del TGF- β tienen una afinidad diferencial por el TGFBRII, formando así el primer punto de modulación de la vía de señalización del TGF- β . En ausencia del ligando, los receptores se encuentran como homodímeros separados uno del otro, pero cuando hay TGF- β presente, éste se une al TGFBRII, que posteriormente se une al TGFBRI. El receptor de tipo I cuenta con un sitio glicina-serina (GS) altamente conservado, que funge como autorregulación negativa, pues presenta un sitio de unión para su regulador citosólico FKBP1A, que bloquea su fosforilación e inhibe la cascada de señalización del TGF- β en ausencia de ligando. Sin embargo, si el TGF- β se une al receptor de membrana, FKBP1A es desplazado del complejo TGFBRI/TGFBRII y el dominio cinasa constitutivamente activo del TGFBRII fosforila al sitio GS del TGFBRI, activando la vía canónica de las Smads (Prieto M, 2002).

El TGFBR1 sufre un cambio conformacional que le brinda mayor afinidad por sus sustratos, las R-Smads (del inglés, *receptor regulated Smads*), proteínas citoplasmáticas que son fosforiladas por un receptor de membrana activado. Estas proteínas regulan la transducción de señal en la cascada del TGF- β , como es el caso de Smad2 y Smad3, proteínas de 60 y 52 kDa respectivamente. El complejo Smad2/3 es fosforilado en sus dominios serina C-terminal (Figura 4). Normalmente, estas proteínas se encuentran unidas a la proteína SARA (*smad anchor for receptor activation*) que las mantiene cautivas a nivel de membrana. Pero una vez fosforilado, el complejo Smad2/3 se disocia de SARA y forma un heterocomplejo con Smad4, que puede traslocarse al núcleo, unirse al ADN o formar otros complejos transcripcionales para genes regulados por el TGF- β (Dewidar et al., 2019; Huynh et al., 2019; Prieto M, 2002).

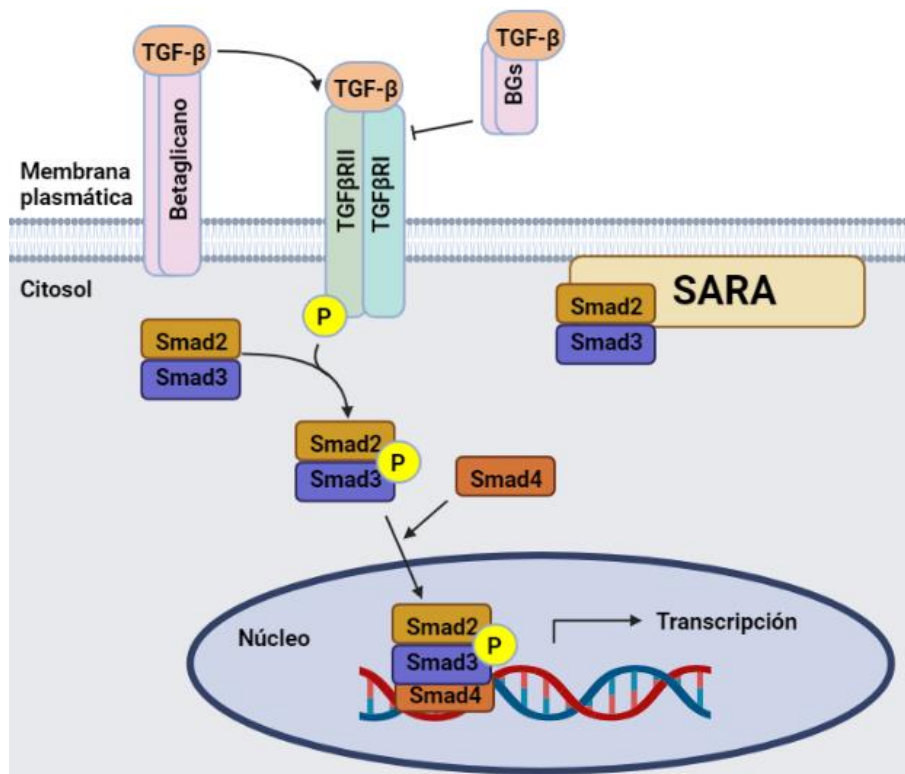


Figura 4. Cascada de señalización canónica del TGF- β . La activación del TGF- β latente por las integrinas en el tejido hepático aumenta su afinidad al betaglicano o con menor intensidad, al TGFBR2, que fosforila al TGFBR1 y transduce la señal al citosol. El TGFBR1 activado fosforila a las proteínas efectoras Smad2/3, que se separan del complejo señalizante y forman un heterocomplejo con Smad4, con el que pueden traslocarse al núcleo para regularla expresión genética. La escisión proteolítica del betaglicano forma el betaglicano soluble, que neutraliza al TGF- β e inhibe su unión a los receptores señalizantes, por otro lado, la expresión de Smad7 provoca la proteólisis del TGFBR1 mediante ubiquitinación. Modificada de Huynh, et. al. (2019).

1.1.6. El betaglicano

Los receptores no señaladores o de tipo III, incluyen al betaglicano y la endogлина, ambas proteínas transmembranales con reconocimiento y unión al TGF- β . El BG es un proteoglicano de 851 aminoácidos, se localiza como co-receptor de membrana en distintos tipos celulares y con afinidad por las diferentes isoformas del TGF- β , para unirse y transferirlo a los receptores señalizantes (Mendoza et al., 2010). Al igual que los receptores de tipo I y II, el BG tiene en su región citosólica residuos de serina y treonina que son susceptibles a fosforilarse (Figura 5) (López-Casillas et al., 1991). Al TGFBRIII se le considera un receptor accesorio, teniendo más importancia en la afinidad hacia los receptores señalizantes (Prieto M, 2002). Por otro lado, cuenta con dos regiones que forman el dominio extracelular que funcionan como el sitio de unión al TGF- β , siendo el dominio de tipo endogлина en el extremo amino terminal y el dominio de tipo uromodulina en el extremo carboxilo terminal, unidos por una región de unión de 50 aminoácidos (Bilandzic & Stenvers, 2011).

El ectodominio contiene residuos de serinas Ser435 y Ser456 que sirven como sitios de unión para glicosaminoglicanos (GAGs), entre los que se encuentran cadenas de condroitin sulfato (CCS) y heparan sulfato (HS) (Figura 6). Los GAGs no son necesarios para la unión al TGF- β , pero si para otros tipos de factores solubles, como el factor de crecimiento de fibroblastos (Bilandzic & Stenvers, 2011; López-Casillas et al., 1994; Vilchis-landeros et al., 2001). Sin embargo, en condiciones fisiológicas, el ectodominio de este receptor puede ser escindido por proteólisis, liberando al segmento de la molécula que tiene afinidad por el TGF- β , formando así al betaglicano soluble (BGs), una molécula de 120 kDa, aunque se obtienen fragmentos de diferentes tamaños según la enzima que lo escinda (López-Casillas et al., 1991).

Esta forma soluble del betaglicano puede encontrarse de forma natural en leche, suero y MEC, con capacidad de neutralizar al TGF- β gracias a su naturaleza como co-receptor. Sin embargo, no presenta el TGF- β a los receptores señalizantes, inhibiendo así a la cascada de señalización (Heldin, 2008; López-Casillas et al., 1991). Se sabe que la formación del BGs está correlacionada a la expresión de su forma membranal, insinuando que forma parte de un sistema de autorregulación. También se ha demostrado que los tumores de cáncer mamario pierden progresivamente la expresión del TGFBRIII en su forma membranal y se relaciona esta pérdida a un pronóstico negativo del paciente. Dong et. al. (2007) restauraron la expresión del BG membranal en células MDA-MB-231 de cáncer mamario. Los investigadores observaron que las células modificadas no solo sobreexpresaban el BG, sino que secretaban BGs al medio extracelular, a la par que reducían su capacidad invasiva mediada por TGF- β 1. Los resultados mostraban un potencial efecto antitumoral ejercido por el betaglicano soluble (Dong et al., 2007).

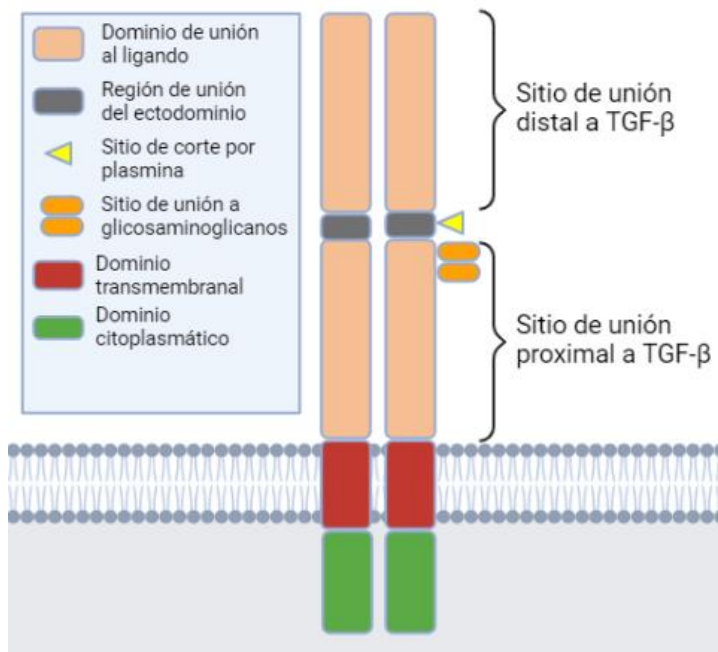


Figura 5. Estructura del betaglicano. El dominio extracelular cuenta con dos sitios unión al TGF- β , así como con sitios susceptibles a la glicosilación y escisión proteolítica. El dominio citosólico tiene afinidad por los receptores señalizantes de la cascada. La escisión con plasmina genera dos fragmentos de 45 y 55 kDa, cada uno con capacidad de unión al TGF- β . Modificada de Bilandzic & Stenvers. (2011).

Debido a esto, en diferentes trabajos se ha explorado la capacidad del BGs como agente neutralizante o terapéutico para el tratamiento de enfermedades que dependen del TGF- β . López Casillas et al. (2001), lograron expresar una molécula que comprende el ectodominio del BG, unido a una etiqueta c-Myc para su detección y purificación. Los receptores obtenidos han demostrado mantener la capacidad de unión al TGF- β (López-Casillas et al., 1991). En otro estudio, células MDA-MB-231 de cáncer mamario transfectadas para expresar BGs, secretaron receptores de 200 kDa al medio extracelular. Mediante un ensayo ELISA, se encontró que los medios condicionados de las células transfectadas reducían la cantidad de TGF- β activo en sus tres isoformas, y además las células con BGs generaban menos tumores cuando eran inoculadas en ratones (Bandyopadhyay et al., 1999). Bandyopadhyay et al. (2002) demostraron el efecto de esta molécula cuando era inyectada en ratones con tumores establecidos de cáncer mamario. El tratamiento con BGs inhibió la angiogénesis mediada por el TGF- β , lo que redujo el tamaño de los tumores, así como la ocurrencia de metástasis a pulmón (Bandyopadhyay et al., 2002). Los resultados de estos estudios demostraron el potencial antitumoral que tiene el BGs, sin embargo, el desarrollo de tratamientos que antagonicen al TGF- β es un trabajo que aún tiene muchos obstáculos.

1.1.7. Tratamientos para inhibir la vía de señalización del TGF- β

Al ser la cascada de señalización del TGF- β tan importante en diferentes patologías, entre las que se encuentran diferentes tipos de cáncer, se ha hecho un esfuerzo por desarrollar modelos para inhibir esta vía en 3 posibles niveles: inhibiendo la expresión del TGF- β , la interacción con su receptor de membrana o de la transducción de la señal (Heldin, 2008; Wei Shen, Guo-qing Tao, Yu Zhang, Bing Cai, 2017). En el primer grupo, se encuentra el Trabedersen (AP12009), un oligonucleótido antisentido dirigido al ARN mensajero del TGF- β 2. Se ha demostrado la capacidad de esta molécula para inhibir la secreción del TGF- β 2 en cultivos primarios de células de glioma (Jaschinski et al., 2011) y cáncer pancreático (Schlingensiepen et al., 2011). En estas últimas, el fármaco también redujo la proliferación y migración *in vitro*, así como el tamaño de los tumores, metástasis y angiogénesis en ratones que recibieron el tratamiento *in vivo*, vía intraperitoneal (Schlingensiepen et al., 2011).

Para inhibir la unión del TGF- β con sus receptores, se utilizan anticuerpos específicos para atrapar el TGF- β , así como péptidos que actúan por impedimento estérico. El Lerdelimumab es un anticuerpo específico contra el TGF- β 2, redujo la proliferación mediada por TGF- β en eritroblastos humanos, mostrando su potencial terapéutico (Thompson et al., 1999). Muraoka, et. al. (2002) crearon dos moléculas neutralizantes, fusionando el fragmento Fc de las inmunoglobulinas al dominio extracelular del TGFBR2 o el BG. La administración sistémica de estos inhibidores en ratones con tumores mamarios incrementó la apoptosis en los tumores y redujo la intravasación y metástasis a pulmón (Muraoka et al., 2002).

Por otro lado, para inhibir la cascada de señalización intracelular, la estrategia es inhibir la función de las regiones cinasas citosólicas del receptor del TGF- β , impidiendo así las fosforilaciones posteriores en la cascada de señalización. Para esto, se ha propuesto inhibir la expresión del TGFBR1, o bien, impedir su función señalizante. La utilización de ARN de silenciamiento contra el TGFBR1 redujo la expresión del receptor *in vitro* en fibroblastos de cicatriz hipertrófica humana, suprimiendo la proliferación celular y expresión de fibronectina y colágeno tipo III. El tratamiento también redujo la formación de cicatrices hipertróficas en conejos, mostrando su potencial para la regeneración de heridas (Y. W. Wang et al., 2014). Por otro lado, están las moléculas inhibidoras del TGFBR1 como el SD-208, que reduce la metástasis *in vivo*, el SD-093, que reduce invasión *in vitro*, ambos en modelos murinos o el galunisertib (LY2157299) que mostró resultados positivos en pacientes de un estudio realizado en Japón (Wei Shen, et. al. 2017). El SB-431542 es una pequeña molécula inhibidora del TGFBR1, la cual reduce la fosforilación de las proteínas Smad2/3 mediada por TGF- β en células de cáncer mamario (Inman et al., 2002).

Sin embargo, el papel del TGF- β en diversos tipos de células sanas y cancerosas, dificulta el uso de tratamientos anti-TGF- β de forma generalizada, ya que puede ocasionar efectos secundarios que no son detectados en las pruebas *in vitro* y que necesitan ser caracterizados (Connolly et al., 2012). LY3022859, es un anticuerpo monoclonal dirigido al TGFBR2, con capacidad de inhibir la cascada de señalización del TGF- β . La aplicación del anticuerpo en una dosis superior a 25 mg/kg mostró toxicidad en pacientes con tumores sólidos en un estudio clínico de fase I, por lo que se catalogó al anticuerpo como no seguro (Tolcher et al., 2017). El Fresolimumab, un anticuerpo neutralizante del TGF- β 1 y TGF- β 2, mostró complicaciones en un ensayo clínico de fase I en 28 pacientes con melanoma y 1 con carcinoma renal. De estos, cuatro desarrollaron lesiones de células escamosas, mientras que se presentó uno con hiperqueratosis (Morris et al., 2014). El galunisertib es una pequeña molécula que inhibe la actividad cinasa del TGFBR1 y que ha sido probada en estudios clínicos de fase II con pacientes de cáncer pancreático y de riñón. En combinación con la gemcitabina, un quimioterapéutico, incrementó 3 meses la supervivencia de los pacientes, en comparación con aquellos que recibieron el tratamiento placebo, reportando efectos adversos como anemia, neutropenia y trombocitopenia. Sin embargo, se ha reportado citotoxicidad cardíaca en el uso de esta molécula en ensayos preclínicos en ratas, algo que fue solucionado mediante ciclos de tratamiento intermitente, sin efectos secundarios en pacientes con glioma (Kovacs et al., 2015).

La neutralización generalizada del TGF- β puede llevar a desarrollar efectos adversos mínimos, hasta la falla sistémica de otros tipos celulares que dependan de su activación. La importancia del TGF- β en la metástasis, así como su utilización en muchos contextos celulares, solo realza la necesidad de un modelo terapéutico dirigido que pueda inhibir esta vía de señalización (Connolly et al., 2012a). Bajo este contexto, es que se puede aprovechar la capacidad de los exosomas para transporte de moléculas con función antitumoral. Una estrategia, es la de transportar agentes quimioterapéuticos o moléculas de silenciamiento en los exosomas (Lan et al., 2019). Exosomas cargados con paclitaxel (PTX), un fármaco que inhibe la formación de los microtúbulos de las células cancerosas, redujeron la proliferación de células CFPAC-1 de C.P. humano (Antimisari et al., 2018). La transferencia de miR-126-3p en exosomas de células troncales de médula ósea, inhibe la expresión de ADAM9 en células de C.P., induciendo apoptosis y reducción en la invasión y metástasis de las células cancerosas (Wu et al., 2019). Se puede aprovechar la ventaja del organotropismo de los exosomas, junto con su capacidad para el transporte de biomoléculas, para inhibir la cascada de señalización del TGF- β y, por ende, la formación del nicho pre-metastásico en el hígado.

1.2 Justificación

Los pacientes con C.P. tienen una de las tasas de supervivencia más bajas a nivel mundial. La metástasis causa la mayoría de las muertes por C.P. y se da mayormente en el hígado. Su establecimiento depende de un nicho pre-metastásico que provea condiciones favorables para la colonización por células cancerosas. Mediante exosomas, el tumor primario reprograma a distancia las células hepáticas, estimula la expresión de TGF- β y activa su vía de señalización, promoviendo la síntesis de tejido fibrótico y el NPM. El betaglicano, en su forma soluble, tiene un fuerte potencial neutralizante del TGF- β . Sin embargo, esta citosina es importante para muchos tipos celulares y tiene efectos pleiotrópicos en el tumor y su microambiente. Debido a esto, se propone utilizar exosomas dirigidos a células hepáticas, como medio de transporte de ARNm para la forma soluble del betaglicano y neutralizar al TGF- β como un modelo terapéutico para inhibir la formación del nicho pre-metastásico.

1.3 Hipótesis

Exosomas con ARNm de betaglicano soluble pueden inducir su expresión en macrófagos y neutralizar al TGF- β , inhibiendo así su vía de señalización.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Desarrollar exosomas modificados para inducir la expresión de betaglicano soluble para neutralizar al TGF- β .

1.4.2. Objetivos específicos

1. Producir células 293T- $\alpha\beta 5$ que expresen ARNm de betaglicano soluble.

2. Caracterizar los exosomas exo-BGs.
3. Confirmar la expresión del betaglicano soluble en los macrófagos RAW264.7 tratados con los exosomas exo-BGS.
4. Confirmar la neutralización del TGF- β por el betaglicano soluble expresado en macrófagos tratados con exosomas.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cultivo celular

Para los experimentos *in vitro*, se utilizaron las líneas celulares de riñón embrionario humano 293T y 293T- $\alpha\beta 5$, estas últimas con expresión de integrina $\alpha\beta 5$ en sus exosomas con organotropismo hacia hígado (Castro Flores, 2020). Se cultivaron también pre-osteoblastos MC3T3-E1 de calvaria de ratón, células B16-F1 de melanoma murino, así como células HepG2 de hepatocarcinoma humano.

Todas las células fueron obtenidas del repositorio ATCC. Se llevó a cabo el cultivo en una incubadora a 37° C y 5% de CO₂, según las indicaciones del proveedor. Para las líneas celulares 293T y 293T- $\alpha\beta 5$, se utilizó medio DMEM (Dulbecco Modified Eagles Minimal Essential Medium, Corning); para las células MC3T3-E1 se utilizó medio α -MEM (Alpha Minimum Essential Medium, Corning), mientras que se utilizó medio RPMI 1640 (Rosswell Park Memorial Institute, Corning) para las células B16-F1 y MEM (Corning) para las células HepG2. Los medios fueron suplementados con 10% y 5% de suero fetal bovino (SFB, Biowest), así como con 1% de una solución de antibiótico y antimicótico (Corning). Para las células 293T- $\alpha\beta 5$, se añadió higromicina (Invivogen, 50 $\mu\text{g/ml}$) para mantenimiento y puromicina (Corning, 250 ng/ml) al medio de cultivo para el proceso de selección.

Para sembrar las líneas celulares criopreservadas a -80° C, se descongeló el contenido de los crioviales, se lavaron con PBS (Dulbecco Phosphate Buffer Saline, 1x) y se centrifugaron a 800 rcf por 5 minutos. Se resuspendió el pellet celular en el medio de cultivo correspondiente a la línea celular y se sembraron en placa de 10 cm (56.7 cm²), para incubarse a 37° C, en 5% de CO₂, con cambio de medio cada 2 días.

Para el mantenimiento de las células en cultivo, es necesario separarlas periódicamente, ya que se adhieren al fondo de la placa y al proliferar se crea una monocapa y entran en apoptosis si se agota el espacio en la placa o se agotan los nutrientes del medio. Para esto, se lavan las células con PBS (1x) y se incuban las células con una solución de tripsina (0.05% - EDTA 0.53 mM) a 37° C. Se resuspenden las células en solución con tripsina y medio suplementado para resembrarse según la dilución para mantenimiento o experimento a realizar.

2.2 Preparación de los plásmidos para transfección y transducción

Para obtener los plásmidos necesarios para la producción de partículas lentivirales en células 293T y transducción en células 293T- $\alpha\beta 5$, se transformaron bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH5 α y se extrajo el ADN plasmídico.

2.2.1 Transformación bacteriana de *E. coli* DH5 α

Se añadió un máximo de 1 ng de plásmidos a las bacterias y se realizó el choque térmico poniendo las mezclas en hielo por 30 minutos, después 90 segundos a 42° C en baño maría y de nuevo en hielo por 2 minutos. Se incubaron las bacterias en medio SOC a 37° C en agitación constante (200 rpm) por 60 minutos. Se hicieron cultivos de las bacterias transformadas en medio LB/agar con carbenicilina (100 pg/mL) y se incubaron a 37° C por una noche (18 horas). Se verificó la OD₆₀₀ de 1 mL de cada cultivo en el espectrofotómetro, usando medio LB/carbenicilina como blanco.

2.2.2 Extracción de ADN plasmídico con kit Miniprep GeneJET

Se obtuvieron pellets celulares por centrifugación a 1000 rpm y se extrajo el ADN plasmídico de las bacterias con el kit Miniprep GeneJET (ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el ADN obtenido en un equipo NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific). Se guardó el ADN obtenido en una concentración de 250 ng/mL a -20° C.

2.3 Expresión de ARNm para betaglicano soluble

Para obtener células que produzcan exosomas que contengan el ARNm para betaglicano soluble, se compararon dos métodos para integrar el ADN plasmídico a las células. Se realizó una transfección por el método de fosfato de calcio con los plásmidos pLJM1-GFP y pLJM1-BGs simultáneamente, se utilizó un sistema de transducción lentiviral de tercera generación o de multi componentes. Este sistema es utilizado

para aumentar la seguridad al trabajar en la creación de partículas lentivirales, reduciendo el riesgo de infección al tener 4 plásmidos diferentes para producir la partícula lentiviral. Los plásmidos pLP1 y pLP2 se utilizaron como plásmidos de empaquetamiento, adquiridos de ThermoFisher Scientific. pMD2.G como plásmido de recubrimiento, obtenido el cual fue un obsequio de Didier Trono (Addgene #12259) (Dull et al., 1998). Se utilizó el plásmido de transferencia pLJM1-GFP proporcionado por David Sabatini (Addgene #19319) para contener la secuencia para la expresión de GFP en el grupo control (Sancak et al., 2008), así como pLJM1-BGs proporcionado por la M.C. Elva Alejandra Gárate Carrillo, para la expresión del betaglicano soluble, el cual tiene una secuencia c-myc en el extremo amino-terminal de la proteína (Gárate et al., 2016). Ambos genes están regulados bajo el promotor CMV (citomegalovirus), el plásmido incluye un gen de resistencia a puromicina para la selección de las células transducidas.

2.3.1 Transfección por método del fosfato de calcio

Se sembraron 50,000 células 293T- $\alpha\beta 5$ por cada cm^2 de superficie y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se prepararon las soluciones A (HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, Na_2HPO_4 1.5 mM; pH 7) y B (solución equimolar del ADN a transfectar 12.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$, CaCl_2 0.24 mM y dH_2O). Se mezclaron volúmenes iguales de cada solución para formar la mezcla de transfección y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. Se realizó un cambio de medio de cultivo a las células y se añadieron 250 ng de ADN plasmídico por cm^2 . Se realizó un cambio de medio de cultivo 18 horas después para eliminar el ADN plasmídico no transfectado. Después de 48 horas se analizaron las células en el citómetro de flujo Attune-Acoustic (ThermoFisher Scientific) y se inició la selección con puromicina (500 ng/ml) reduciendo la concentración (250 ng/mL) pasado un periodo de selección de 7 a 10 días.

2.3.2 Producción de partículas lentivirales y transducción lentiviral

Para producir partículas lentivirales, se realizó una transfección con fosfato de calcio en células 293T con las condiciones mencionadas anteriormente, con una mezcla equimolar de los plásmidos pLP1, pLP2, pMD2.G y pLJM1-GFP o pLJM1-BGs. Después de retirar el material no transfectado, se añadieron 125 μL de medio DMEM completo por cm^2 . Después de 24 horas, se recolectó el medio condicionado, almacenó a 4°C y se añadió un volumen igual de medio fresco a las células. Se volvió a recolectar el medio 24 horas

después con la colecta anterior, obteniendo las partículas lentivirales producidas por las células transfectadas.

Para la transducción, se sembraron 50,000 células 293T- $\alpha\beta 5$ o B16-F1 y 30,000 células MC3T3-E1 por cada cm^2 de superficie en medio de cultivo correspondiente a la línea celular. Transcurridas 24 horas, se centrifugaron las partículas lentivirales a 1000 g, temperatura ambiente por 8 minutos para eliminar debris celulares y se les añadió una solución de polibreno en una concentración final de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, obteniendo la solución de transducción. Se cambió el medio de las células 293T- $\alpha\beta 5$ por la solución de transducción en un volumen de 250 μL por cm^2 y se incubaron a 37° C por 24 horas. Se realizó un cambio de medio para eliminar las partículas lentivirales no transducidas y se observaron las células al microscopio de fluorescencia para evaluar la presencia de células transducidas con GFP.

2.3.3 Selección de las células

2.3.3.1 Curva de muerte de células MC3T3-E1

Como no se conocía la concentración necesaria de puromicina para eliminar las células MC3T3-E1, se realizó una curva de muerte. Se sembraron 30,000 células MC3T3-E1 en pozo de 2 cm^2 , en medio MEM, 10% SFB, 1% Ab/Am y se incubaron hasta que alcanzaron el 80% de confluencia. Se hizo cambio de medio, añadiendo concentraciones de 0, 2, 4, 6 y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puromicina. Se revisó la confluencia y se realizó cambio de medio cada 48 horas por un periodo de 9 días.

2.3.3.2 Selección de células con antibiótico

Transcurridas 72 horas de la transfección/transducción, se despegaron las células con tripsina-EDTA y se cultivaron en medio DMEM, 10% SFB suplementado con puromicina a una concentración para seleccionar las células que adquirieron el gen de resistencia al antibiótico (Castro Flores, 2020). De 7 a 10 días después, se redujo la concentración a la de mantenimiento (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración de puromicina utilizada en la selección de células.

Línea celular	Puromicina (selección)	Puromicina (mantenimiento)
293T	500 ng/mL	250 ng/mL
293T- $\alpha\beta 5$	500 ng/mL	250 ng/mL
B16-F1	2 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$
MC3T3-E1	4 $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$

2.3.3.3 Citometría para detección de GFP

Para determinar la eficiencia de transfección y transducción, se evaluó la expresión de la GFP en las células transfectadas o transducidas y parentales (sin transducción) en un citómetro de flujo Attune-Acoustic (ThermoFisher Scientific). Para esto se despegaron las células con tripsina-EDTA, se obtuvieron pellets centrifugando a 800g por 5 minutos y se resuspendieron en PBS (1x).

2.3.3.4 Tinción intracelular para detección de BGs-Myc

Se sembró un millón de células 293T- $\alpha\beta 5$ sin modificación, transfectadas y transducidas con BGs-Myc en placa de 6 pozos (10 cm²). Después de 24 horas se retiró el medio de cultivo y se añadió una solución de Brefeldina A (BioLegend, 5 $\mu\text{g/mL}$), un inhibidor de los procesos de transporte intracelular de retículo endoplasmático a Golgi para inhibir la secreción de proteínas (BioLegend, 2012). Se incubaron las células por 5 horas, se despegaron con tripsina-EDTA, se contaron con hematocitómetro, se hicieron alícuotas de 250,000 células y se centrifugaron las células a 800 g y a temperatura ambiente por 5 minutos. Se resuspendieron las células sedimentadas en solución de bloqueo (10% SFB, PBS 1x, BSA 0.1%, EDTA 2 mM), y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Se lavaron las células con solución tampón FACS (PBS 1x, BSA 0.1%, EDTA 2 mM), se centrifugaron y se descartó el sobrenadante. Se incubaron las células en solución de fijación (1x, BioLegend) por 20 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad. Se añadió solución de permeabilización (1x, BioLegend), se centrifugaron y se descartó el sobrenadante.

Se incubó con el anticuerpo primario (Tabla 2) durante 20 minutos a temperatura ambiente, se hicieron 2 lavados con solución de permeabilización (1x) y se centrifugó a 350 g, 4° C durante 5 minutos. Se

resuspendió el pellet en la solución con el anticuerpo secundario (Tabla 2) y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se hicieron dos lavados con solución de permeabilización (1x), se retiró el sobrenadante y se resuspendieron los pellets en solución tampón FACS (1x). Para un segundo experimento de tinción intracelular, se prepararon las soluciones de anticuerpos en solución de permeabilización (1x) y 10% de SFB para evitar la interacción no específica de los anticuerpos con proteínas intracelulares.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para citometría de flujo.

Anticuerpo	Fabricante	ID.	Tipo	Organismo
Anti-BG	Abcam	ab78421	Monoclonal	Ratón
Anti-Myc	Abcam	ab32	Monoclonal	Ratón
Anti-IgG de ratón APC	BioLegend	405308	Policlonal	Cabra

2.3.3.5 Análisis en el citómetro de flujo

Se analizaron las células resuspendidas en solución tampón FACS (1x) en el citómetro de flujo Attune Acoustic Focusing y el software Attune, identificando los eventos individuales según los parámetros de tamaño (Forward Scatter, FSC) y granularidad (Side Scatter, SSC) similares a las células analizadas. Para establecer las poblaciones de interés, se analizaron células 293T- $\alpha\beta 5$ sin tinción en cada análisis.

2.3.3.6 Selección clonal por dilución límite

Se tomaron las células 293T- $\alpha\beta 5$ transducidas con BGs-Myc, se despegaron con tripsina-EDTA y se realizaron diluciones de 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 células en 200 μ L de medio de cultivo DMEM 10% SFB, 1% Ab/Am, higromicina (50 μ g/mL) y puromicina (250 ng/mL). Se sembraron las diluciones en placa de 96 pozos (0.32 cm²) y se cambió el medio de cultivo cada 48 horas. Se analizaron los pozos al microscopio y se mantuvo aquellos con solo una sola célula. Se resuspendieron las células usando tripsina-EDTA cuando llegaron al 85% de confluencia para transferirlas a placa de 24 pozos y de 6 pozos posteriormente. Se realizó un Western-Blot con 25 μ L de los medios condicionados como un ensayo preliminar para

seleccionar aquellas clonas con expresión de BGs-Myc y se analizaron en el citómetro de flujo para determinar el porcentaje de células positivas al término de la selección.

2.3.4 Western Blot

2.3.4.1 Medios condicionados

Se sembraron de 4×10^5 a 1×10^6 de células en placa de 6 pozos (10 cm^2). Al llegar a un 80% de confluencia en los pozos, se lavó con 2 mL de PBS (1x) y se añadieron 2 mL de medio de cultivo según la línea celular. Después de 48 horas se recuperó el medio condicionado, se centrifugó a $12,000 \text{ g}$, 4° C por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se conservó a -20° C .

2.3.4.2 Obtención de lisados celulares y cuantificación de proteínas

Se sembraron un millón de células 293T- $\alpha\text{v}\beta 5$ parentales y transducidas, así como células MDA-MB-231 transducidas con BGs-Myc en placa de 6 pozos (10 cm^2). Pasadas 24 horas, se verificó un 80% de confluencia en los pozos, se tomó la placa para lisados celulares, se lavó con 2 mL de PBS (1x) y se guardó a -80° C hasta obtener los lisados. Se lisaron las células con solución amortiguadora de lisis SDS (Tris-HCl 50 mM, NaCl_2 150 mM, EDTA 5 mM, NP-40 1%, SDS 0.1%, pH 8.0), se incubaron en hielo por 10 minutos y se centrifugaron a $14,000 \text{ g}$ y 4° C por 10 minutos para recuperar el sobrenadante.

Se determinó la concentración de proteína total en los lisados celulares con el Kit μBCA (Thermo Fisher Scientific). La formación de complejos entre el ácido bicinconínico (BCA) e iones Cu^{1+} liberados por las proteínas con Cu^{2+} en un medio alcalino, provoca una reacción colorimétrica púrpura que puede ser medida en el espectrofotómetro a 562 nm (EPOCH BioTek Instruments, Thermo Fisher Scientific).

2.3.4.3 Electroforesis y transferencia de proteínas

Se prepararon muestras de lisados celulares (25 µg de proteína) y medios condicionados con tampón de carga (Thermo Fisher Scientific) adicionado con β-mercaptoetanol (dilución tampón-muestra 1:4), seguido de una desnaturalización de las proteínas con una incubación a 95° C por 5 minutos y 5 minutos en hielo. Se separaron las proteínas mediante una electroforesis en gel desnaturalizante de SDS-PAGE al 6% (75 volts por 30 minutos y 100 volts por 2 horas).

Se realizó una transferencia semi-seca de proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) a 15 volts constantes. Se bloquearon las membranas con una solución amortiguadora TBST (1x) (0.1 M Tris-HCl₂, pH 7.6; 0.15 M NaCl; 0.1% v/v Tween-20) con 5% de BSA o leche semi-descremada. Se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios (Tabla 3) por una noche. Se lavaron las membranas con TBST (1x) y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Tabla 3), por una hora. Se utilizó una solución de sustrato quimioluminiscente de peroxidasa (Milipore) y se analizaron las membranas en el foto-documentador (Bio-Rad ChemiDoc XRS). Se muestran las membranas sin cortar en el Anexo 1.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para Western-blot.

Anticuerpo	Fabricante	ID.	Tipo	Origen	Bloqueo	Dilución
Anti-BG	Abcam	ab78421	Monoclonal	Ratón	Leche	1:500
Anti-Myc	Abcam	ab32	Monoclonal	Ratón	Leche	1:500 1:1000
Anti-Tubulina	Sigma Aldrich		Monoclonal	Ratón	Leche	1:8000
Anti-pSmad2/3	Cell Signaling	8828s	Monoclonal	Conejo	Leche	1:1000
Anti-Smad2/3	Cell Signaling	5678s	Policlonal	Conejo	BSA	1:1000
Anti-IgG de ratón / Peroxidasa	Sigma Aldrich	A0168	Policlonal	Cabra	Leche	1:40000
Anti-IgG de conejo / Peroxidasa	Sigma	A0545	G21234	Cabra	Leche	1:80000

2.4 Caracterización de los exosomas

2.4.1 Obtención de medios condicionados

Se sembraron de 10,000 a 15,0000 células por cm^2 en placas de 15 cm (152 cm^2) en el medio de cultivo correspondiente a cada línea celular. Una vez que llegaron al 80% de confluencia, se lavó con de PBS (1x), se adicionó medio de cultivo con 2% y 1% de SFB libre de exosomas (para las células 293T- $\alpha\text{v}\beta 5$ y B16-F1 respectivamente) y se incubaron por a 37° C por 48 horas. Se colectó el medio condicionado y se despegaron las células con tripsina-EDTA, se centrifugaron a 800g y a temperatura ambiente por 5 minutos y se guardó el pellet celular a -80° C .

2.4.2 Aislamiento de exosomas

Se centrifugó el medio condicionado a 300 g (10 minutos), 2000 g (20 minutos) y 10,000 g (30 minutos) y a 4° C , recuperando el sobrenadante tras cada centrifugación. Se filtró el sobrenadante usando un filtro de $0.22 \mu\text{m}$ después de la última centrifugación. Se añadió una solución de PEG/NaCl (8%/0.5 M) y se incubó a 4° C durante una noche. Se centrifugó a 4,500 g y a 4° C por 60 minutos y se retiró el sobrenadante por decantación. Se añadió una solución 50/50 de PBS (1x) y PEG/NaCl (5%/0.5 M) y se centrifugó a 4500 g por una hora. Se retiró el sobrenadante por inversión y se guardó el pellet con los exosomas a -80° C hasta la purificación de ARN total.

2.4.3 Purificación y cuantificación de ARN

Se utilizó el Kit GENE JET de purificación de ARN total (Thermo Scientific), así como el kit RNeasy Plus (QIAGEN), cuyo tampón de lisis contiene tiocianato de guanidina, un agente desnaturizante que degrada las proteínas incluyendo a las ARNasas, protegiendo al ARN, el cual se adhiere a una columna de purificación debido a la adición de etanol y centrifugación a 12,000 g (1 min). El ARN es purificado por centrifugación con soluciones de lavado y eludido con agua libre de nucleasas. Se cuantificó el ARN obtenido en NanoDrop Lite y se guardó a -20° C .

2.4.4 Retrotranscripción y RT-qPCR

Se realizó una retrotranscripción de ARN de exosomas y lisado celular utilizando la enzima retrotranscriptasa SuperScript II (Invitrogen). Se añadieron 250 ng de ARN de lisado celular, de 30 a 100 ng de ARN de exosomas, dinucleótidos (dNTPs) y un cebador de oligo(dT). Se incubaron las mezclas a 65 °C por 5 minutos y se transfirieron en hielo. Se añadió una mezcla de solución tampón de primera hebra (5x), DTT y la enzima, se hicieron ciclos de reacción a 42 °C, 75 minutos y a 70 °C por 15 minutos antes de transferir en hielo. Se diluyó el ADNc en agua libre de ADNasas.

Se prepararon las mezclas de PCR con el ADNc obtenido de la retrotranscripción, oligonucleótidos cebadores sentido y antisentido (10 µM) para el gen de referencia Rpl32 y la región 3'UTR del plásmido pLJM1 (Tabla 4) y solución HotSTART-IT SYBR Green (ThermoFisher) para la cuantificación de los productos. Se corrieron las mezclas en termociclador según las instrucciones del fabricante.

Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados.

Gen	Secuencia cebador sentido	Secuencia cebador antisentido
Rpl32	gagggtgcggagaaggttcaaggg	cttagaggacacattggagcaatc
pLJM1	ggtacagtgcaggggcaaga	gacgtgaagaatgtgcgaga

2.5 Caracterización del betaglicano soluble

2.5.1 Marcado por afinidad del TGF-β

Se obtuvieron medios condicionados de células 293T parentales y transducidas con BGs-Myc, para enviarlos al Dr. Fernando López Casillas, del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde se realizó el ensayo. Se incubaron 200 µL de los medios condicionados con TGF-β2 iodinado por un tiempo de 3 horas, se inmunoprecipitaron las muestras con anticuerpo 822 (anti-BGs de rata, producido en conejo) y se realizó un entrecruzamiento con DSS (disuccinimidil suberato). Posteriormente se hizo una electroforesis para separar los complejos de BGs-Myc unido al TGF-β2 radiactivo por su tamaño y se detectó la señal por autoradiografía.

2.5.2 Neutralización de TGF- β con BGs-Myc

Se sembraron células HepG2 en medio MEM con 10% de SFB y 1% de Ab/Am y se incubaron a 37°C hasta alcanzar el 80% de confluencia. Se lavaron los pozos con PBS (1x) y se añadió medio MEM sin SFB para hacer pasar las células por un periodo de ayuno de TGF- β por una noche. Se cambió el medio en los pozos con medio de cultivo DMEM, 2% SFB, 1% Ab/Am, o los medios condicionados de las células transducidas con BGs-Myc, con o sin TGF- β 1 y se incubaron las células por 1 hora a 37° C. Se lavaron los pozos con PBS (1x) y se lisaron las monocapas con tampón de lisis SDS/NP-40, dejando actuar la lisis por 15 minutos en hielo, se recuperaron los lisados y se realizó disrupción mecánica del ADN con jeringa y aguja de 20 G. Se centrifugaron los lisados a 14,000 g a 4°C para eliminar debris celulares y se cuantificó la proteína total utilizando el kit μ BCA. Se realizó Western-Blot con 28 a 30 μ g de proteína en la electroforesis para detectar la fosforilación de Smad2/3 (Tabla 3). Se realizó una estandarización con TGF- β 1 en concentraciones de 0 a 40 pM para activar las células en los tratamientos.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Producción de células que expresen BGs-Myc

3.1.1 Transfección y transducción lentiviral

Para obtener células que expresen BGs-Myc, se compararon dos métodos; transfección por fosfato de calcio y transducción lentiviral. Se analizaron las células modificadas con GFP por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo 3 días después de la modificación. Se observó fluorescencia en las células transfectadas, indicando que expresaron GFP; esto no ocurrió en las células transducidas (Figura 6A). La citometría de flujo mostró un 58% de células positivas para GFP en las células transfectadas, mientras que de la transducción se obtuvo un 26% (Figura 6B). Comparados con las células parentales, los porcentajes indican que tanto la transfección como la transducción lentiviral fueron exitosas para producir GFP en las células.

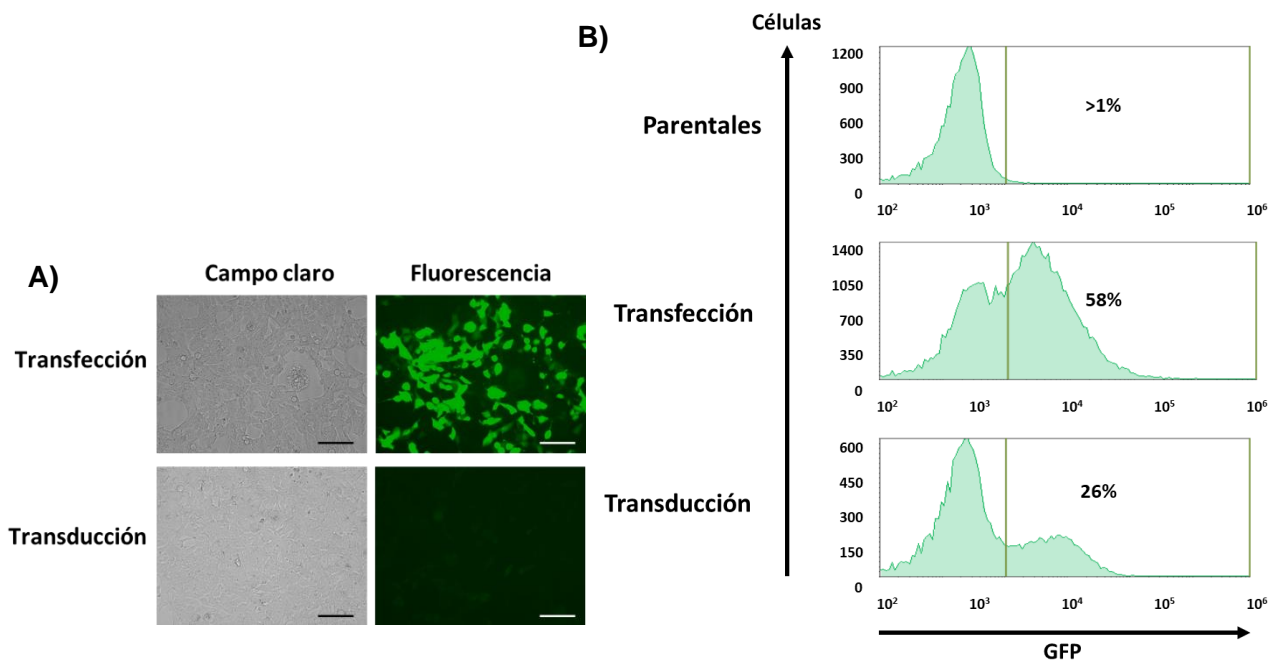


Figura 6. Expresión de GFP en células 293T- α v β 5 modificadas. Se modificaron las células con transducción lentiviral y transfección con plásmido pLJM1-GFP para expresar la proteína verde fluorescente. Tres días después, se observaron las células en el microscopio de fluorescencia (A) y se analizaron en el citómetro de flujo (B). Los histogramas muestran la intensidad de fluorescencia (eje horizontal), número de eventos (eje vertical) y el porcentaje de células que expresan GFP. Barra de escala: 100 μ m.

Para seleccionar las células que fueron transfectadas o transducidas, se cultivaron las células en presencia de puromicina (500 ng/mL), eliminando aquellas que no adquirieron el gen de resistencia al antibiótico producto de la modificación. Se mantuvieron estas condiciones por un periodo de 7 días, hasta que alcanzaron la confluencia necesaria para evaluarlas por citometría de flujo. Tanto las células transfectadas como transducidas para expresar GFP proliferaron en los pozos, mientras que las del grupo control sin modificación fueron eliminadas por completo (Figura 8A). Se observó un 94% de células positivas para GFP (Figura 7B), comparado con el 26% obtenido antes del cultivo con antibiótico (Figura 6B). Los resultados indican una mayor sobreexpresión de GFP debido a la selección en puromicina.

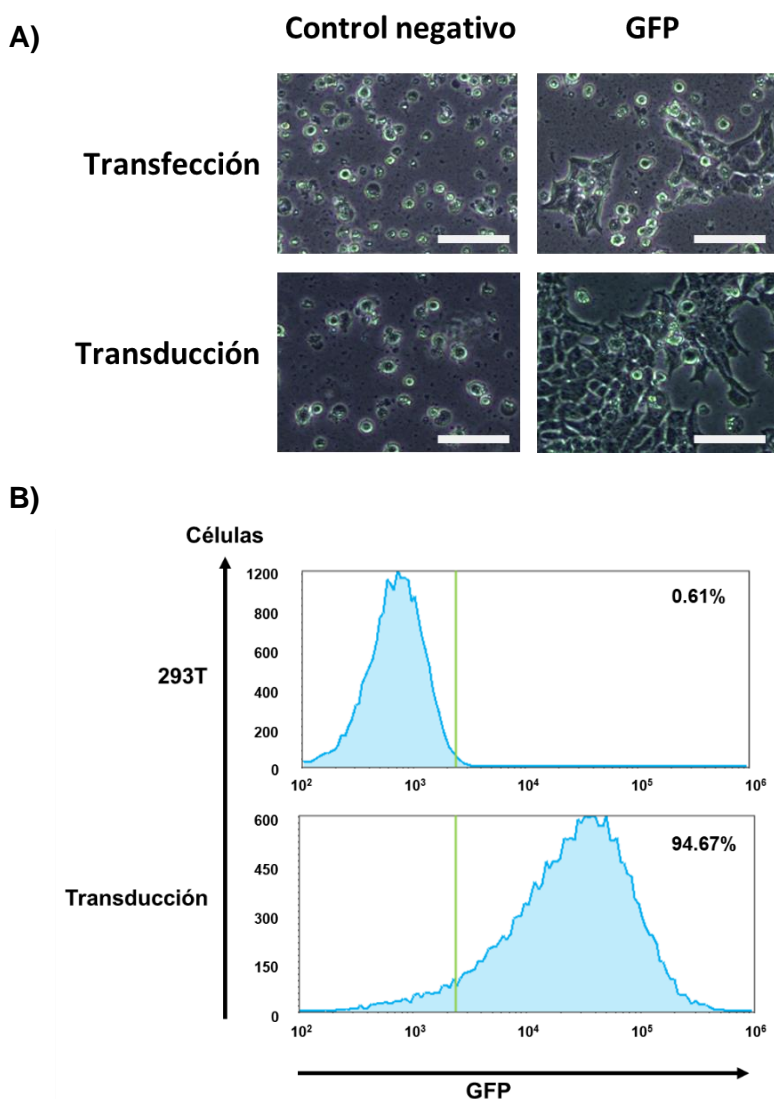


Figura 7. La selección en puromicina incrementa el número de células GFP⁺. Se sembraron las células en medio de cultivo adicionado con puromicina (500 ng/mL) y se tomaron fotografías para comparar la proliferación y muerte en los pozos (A). Se analizaron las células en el citómetro de flujo (B). Los histogramas muestran la intensidad de fluorescencia (eje horizontal), número de eventos (eje vertical) y el porcentaje de células que expresan GFP. Barra de escala: 100 μ m.

Para determinar el porcentaje de células 293T- $\alpha\beta 5$ transfectadas y transducidas que expresan BGs-Myc, se realizó una tinción intracelular con los anticuerpos anti-BG o anti-Myc para detectar la molécula y se analizaron las células en el citómetro de flujo. Como se observa en la Figura 8, la tinción con el anticuerpo anti-BG mostró porcentajes muy bajos de células BGs-Myc⁺, similares a los de las células sin modificación, lo que nos hizo pensar que había un problema con el anticuerpo. Sin embargo, el anticuerpo anti-Myc mostró un 8.68% y 21.95% de células BGs-Myc⁺ para las células transfectadas y transducidas respectivamente. Con estos resultados, se optó por utilizar el anticuerpo anti-Myc para los experimentos posteriores y se confirmó una mayor cantidad de células 293T- $\alpha\beta 5$ BGs-Myc⁺, producto de la transducción (Figura 9).

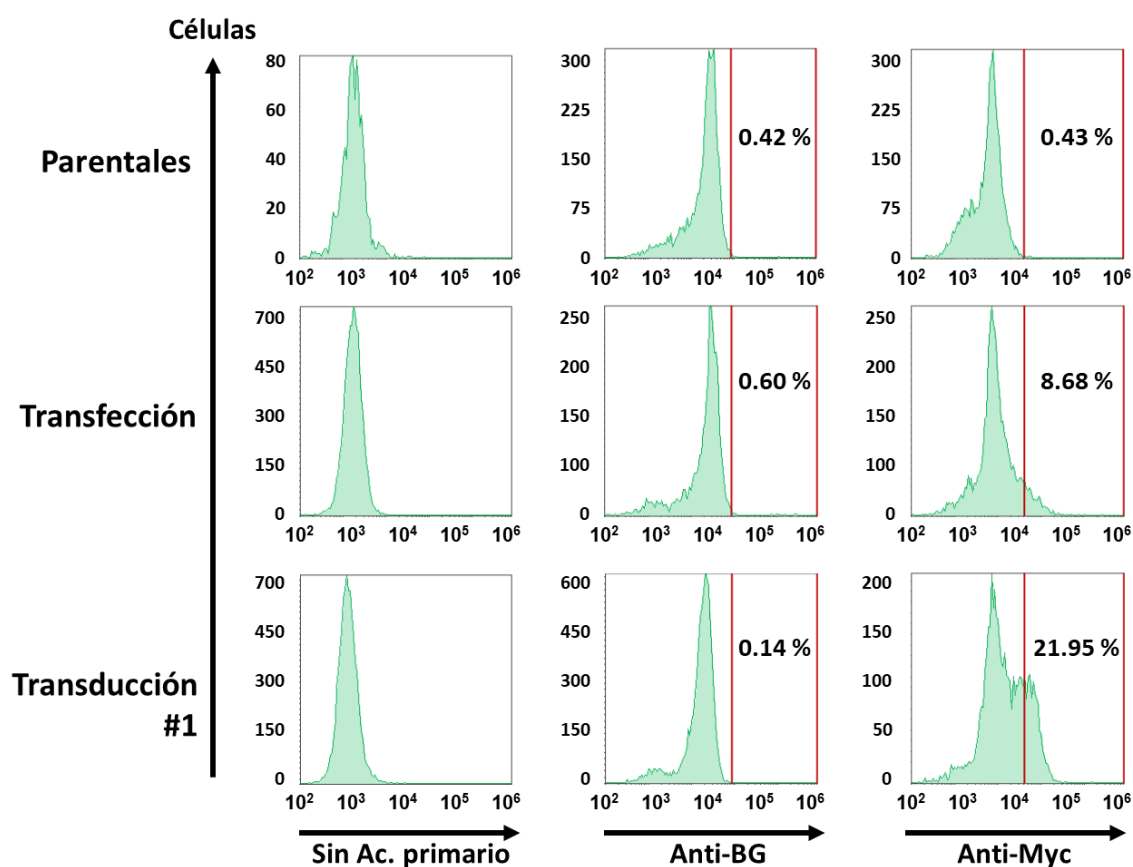


Figura 8. Las células modificadas expresan BGs-Myc. Se realizó una tinción intracelular para detectar el BGs-Myc y se analizaron las células en el citómetro de flujo. (Panel izquierdo) células sin tinción con anticuerpo primario. (Panel intermedio) células teñidas con anticuerpo anti-BG. (Panel derecho) células teñidas con anticuerpo anti-Myc. Se utilizó un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con APC para generar la señal fluorescente. Los histogramas muestran la intensidad de fluorescencia (eje horizontal), número de eventos (eje vertical) y el porcentaje de células que expresan BGs-Myc.

Sin embargo, como el porcentaje de células positivas para BGs-Myc obtenido muy bajo (<30%) en comparación con el obtenido en la modificación con GFP (>90%), se realizó una segunda transducción lentiviral de células 293T- $\alpha\beta 5$ y 72 horas después se analizaron en el citómetro de flujo. La citometría mostró porcentajes de 34% y 39% de células positivas para la etiqueta Myc obtenidas de la primera y segunda transducción respectivamente (Figura 9). Aunque la diferencia es relativamente pequeña, se obtuvieron más células positivas para BGs-Myc en la segunda transducción y por ende se optó por utilizarlas para los experimentos posteriores.

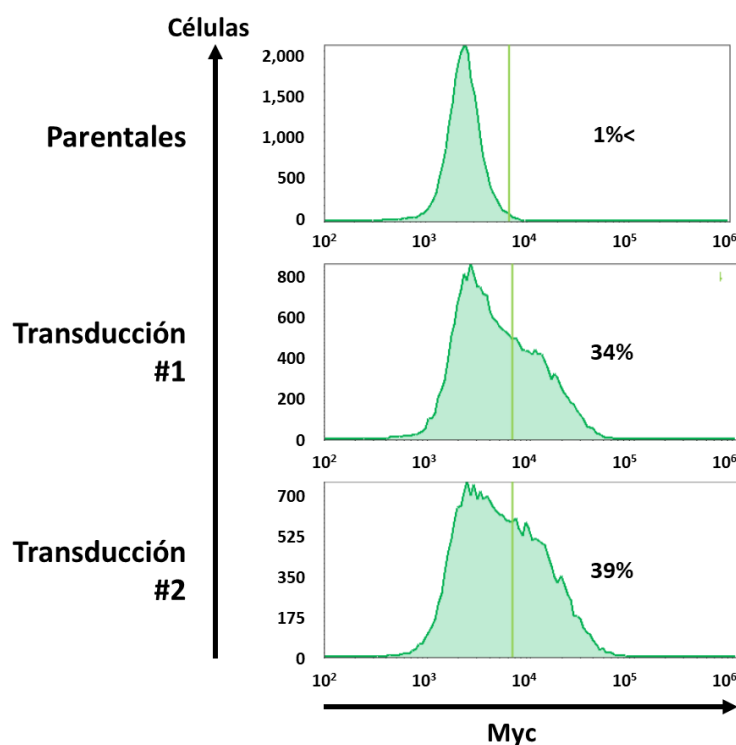


Figura 9. Segundo experimento de transducción con BGs-Myc. Se realizó una tinción intracelular para detectar al BGs-Myc en las células obtenidas de ambas transducciones y se analizaron en el citómetro de flujo. (Panel superior) células sin modificación. (Panel intermedio) células de la primera transducción). (Panel inferior) células de la segunda transducción. Los histogramas muestran la intensidad de fluorescencia (eje horizontal), número de eventos (eje vertical) y el porcentaje de células que expresan BGs-Myc.

3.1.2 Detección de BGs-Myc en medios condicionados

Para verificar que las células transducidas secretan el BGs-Myc al medio extracelular, se realizó un Western-Blot con muestras de lisados y medios condicionados de células 293T- $\alpha\beta 5$ parentales, transducidas y MDA-MB-231 BGs-Myc (control positivo). Se utilizaron los anticuerpos anti-BG y anti-Myc

para la detección. Como se observa en la Figura 10A, el anticuerpo anti-BG no mostró bandas de proteínas en las muestras de lisados celulares ni en las de medios condicionados. Sin embargo, con el anticuerpo anti-Myc se observan bandas de aproximadamente 120 kDa, el peso molecular esperado de la proteína central, así como otras arriba de los 250 kDa. Esto indica que el BGs-Myc producido contiene las cadenas de GAGs, dándole un peso aproximado de 280 kDa, algo que no ocurre en las células MDA-MB-231 (Figura 10B). Con estos resultados, se determinó no utilizar el anticuerpo anti-BG para experimentos posteriores, por otro lado, se confirmó que las células transducidas secretan BGs-Myc en su forma de proteína central y con glicosaminoglicanos al medio condicionado.

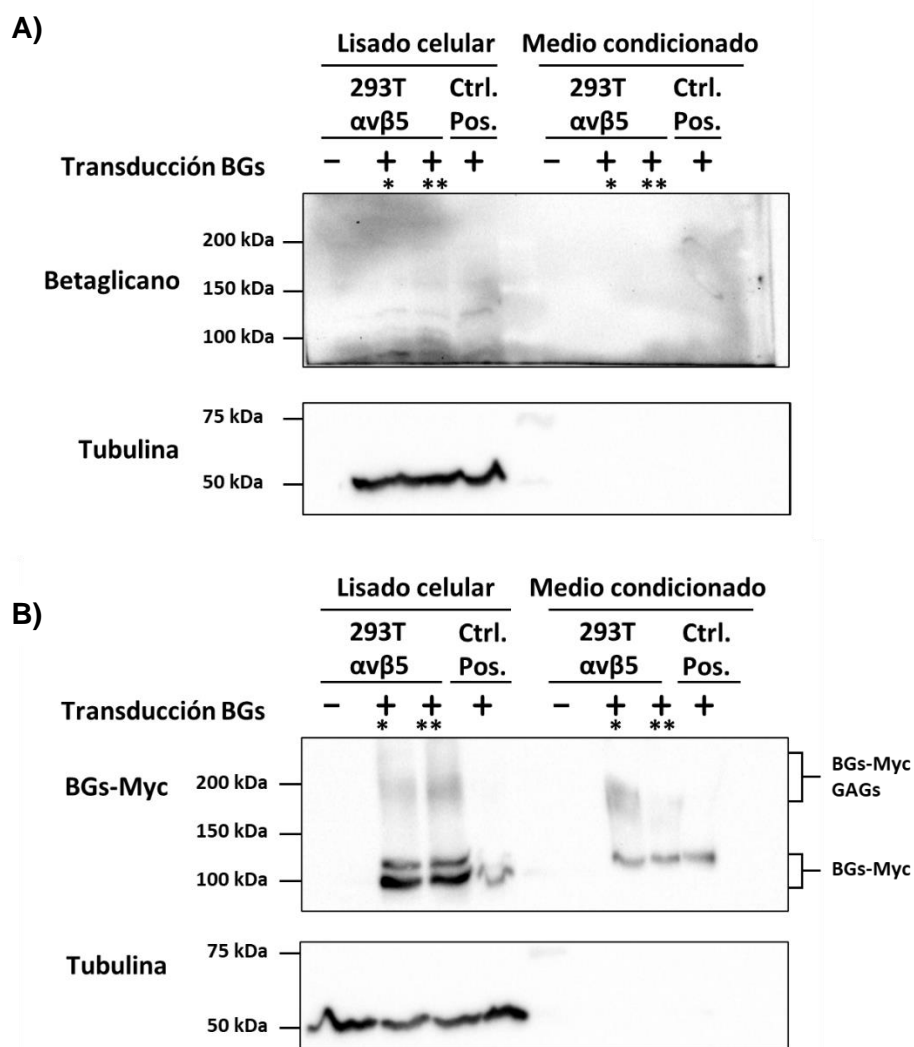


Figura 10. Las células transducidas secretan BGs-Myc al medio extracelular. Se utilizaron los anticuerpos anti-BG (arriba) y anti-Myc (abajo) para detectar el BGs-Myc. Se muestran las bandas de proteínas del BGs-Myc como proteína central (120 kDa) y con glicosaminoglicanos (280 kDa) detectadas en las muestras. *, ** indican las muestras del primer y segundo experimento de transducción respectivamente.

A pesar de que las células transducidas expresan y secretan el BGs-Myc, aún existía el problema de que el porcentaje de células BGs-Myc⁺ seguía siendo menor a lo esperado (80%). Debido a esto, se realizó un experimento de dilución límite, con el fin de obtener sub-clonas con una expresión mayor de la molécula.

3.1.3 Selección clonal de células 293T- $\alpha\beta$ 5 BGs-Myc

En placa de 96 pozos, se sembraron diluciones que permitieran obtener 1 célula al fondo del pozo y obtener sub-clonas que produjeran BGs-Myc. De una primera placa (Tabla 5, placa I), se determinó que las diluciones favorables para tener pozos con 1 sola célula eran de 2, 4, 6 y 8 células/200 μ L, por lo que se sembraron 48 pozos con cada una de estas concentraciones (Tabla 5, placa II). De los 288 pozos que fueron sembrados, solo 7 sub-clonas proliferaron y lograron expandirse hasta tener la confluencia para poder evaluar su producción de BGs-Myc (Figura 11).

Tabla 5. Resultados de la dilución límite. Se siguió el cultivo de los pozos con 1 clona obtenidos de la dilución límite, se expandieron las células una vez llegaron a confluencia dentro del pozo.

Placa	Células	96 pozos		24 pozos		6 pozos		150 mm		Clones obtenidos
		1 célula	Proliferación	Sembradas	Proliferación	Sembradas	Proliferación	Sembradas	Proliferación	
I	14 células/200 μ L	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	12 células/200 μ L	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 células/200 μ L	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	8 células/200 μ L	6	1	1	1	1	1	1	1	D10
	6 células/200 μ L	6	2	2	-	-	-	-	-	-
	4 células/200 μ L	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	2 células/200 μ L	3	-	-	-	-	-	-	-	-
1 célula/200 μ L	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
II-A	8 células/200 μ L	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	6 células/200 μ L	3	-	-	-	-	-	-	-	-
II-B	4 células/200 μ L	7	5	5	3	3	3	3	3	A3, B6, B9
	2 células/200 μ L	9	4	4	3	3	3	3	3	E10, F10, H4

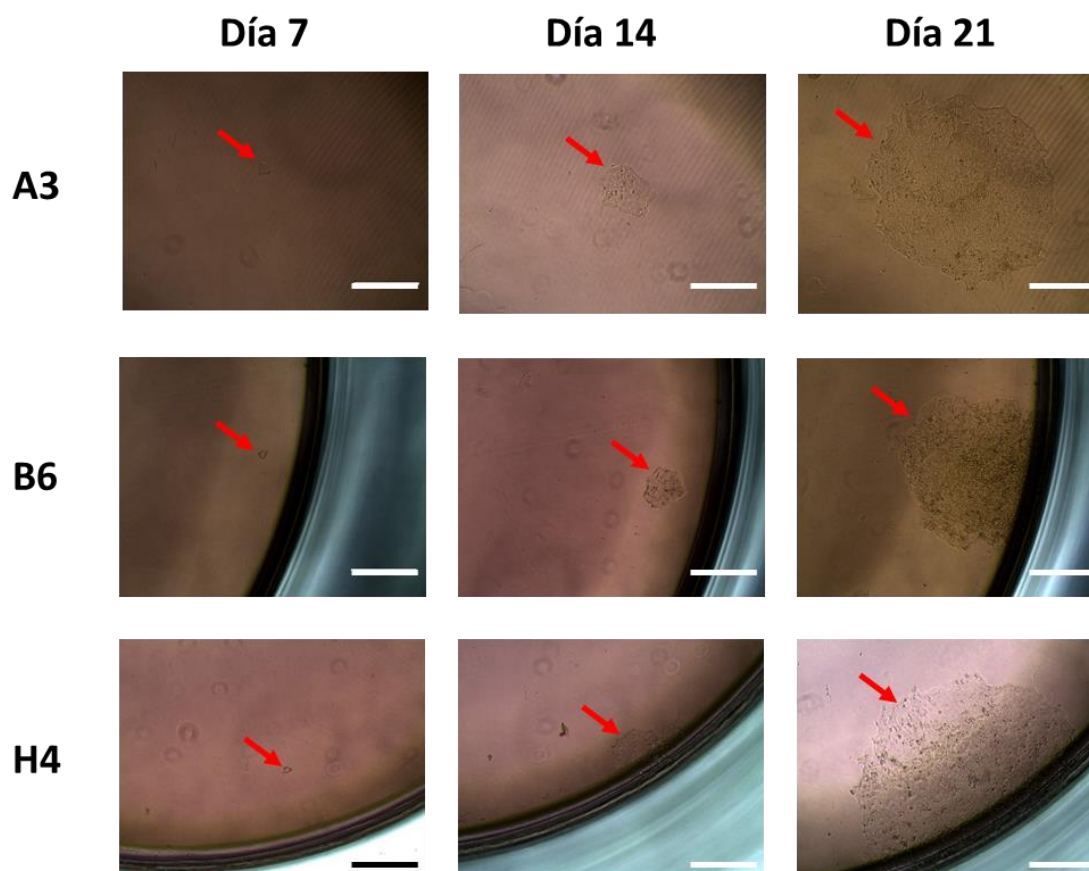


Figura 11. La dilución límite permite obtener sub-clonas a partir de una sola célula. Se sembraron diluciones para obtener una célula en placa de 96 pozos y se expandieron para analizar la expresión del BGs-Myc. Las fotografías muestran la proliferación de las sub-clonas en los pozos de 2 cm². Barra de escala: 400 μ m.

Para saber si las sub-clonas obtenidas secretaban BGs-Myc, se hizo un Western-Blot con el medio condicionado producido por 45,000 células, utilizando el anticuerpo anti-Myc y se cuantificó la intensidad de señal con el software ImageJ. De manera similar a lo obtenido antes de la dilución límite (Figura 10), se obtuvieron bandas de proteínas de alrededor de 120 y 280 kDa en los medios condicionados de todas las sub-clonas (Figura 12A) mas no en los producidos por las células sin transducir. Se observaron bandas más intensas en los pozos de las sub-clonas B6 y B9, lo que se confirmó al cuantificar la señal del BGs-Myc de manera global (Figura 12B), así como en su forma central (Figura 12C) y con glicosaminoglicanos (Figura 12D). Con esto, se confirmó que todas las sub-clonas secretan BGs-Myc y se identificó a las sub-clonas B6 y B9 como las de mayor producción de BGs-Myc en el medio condicionado.

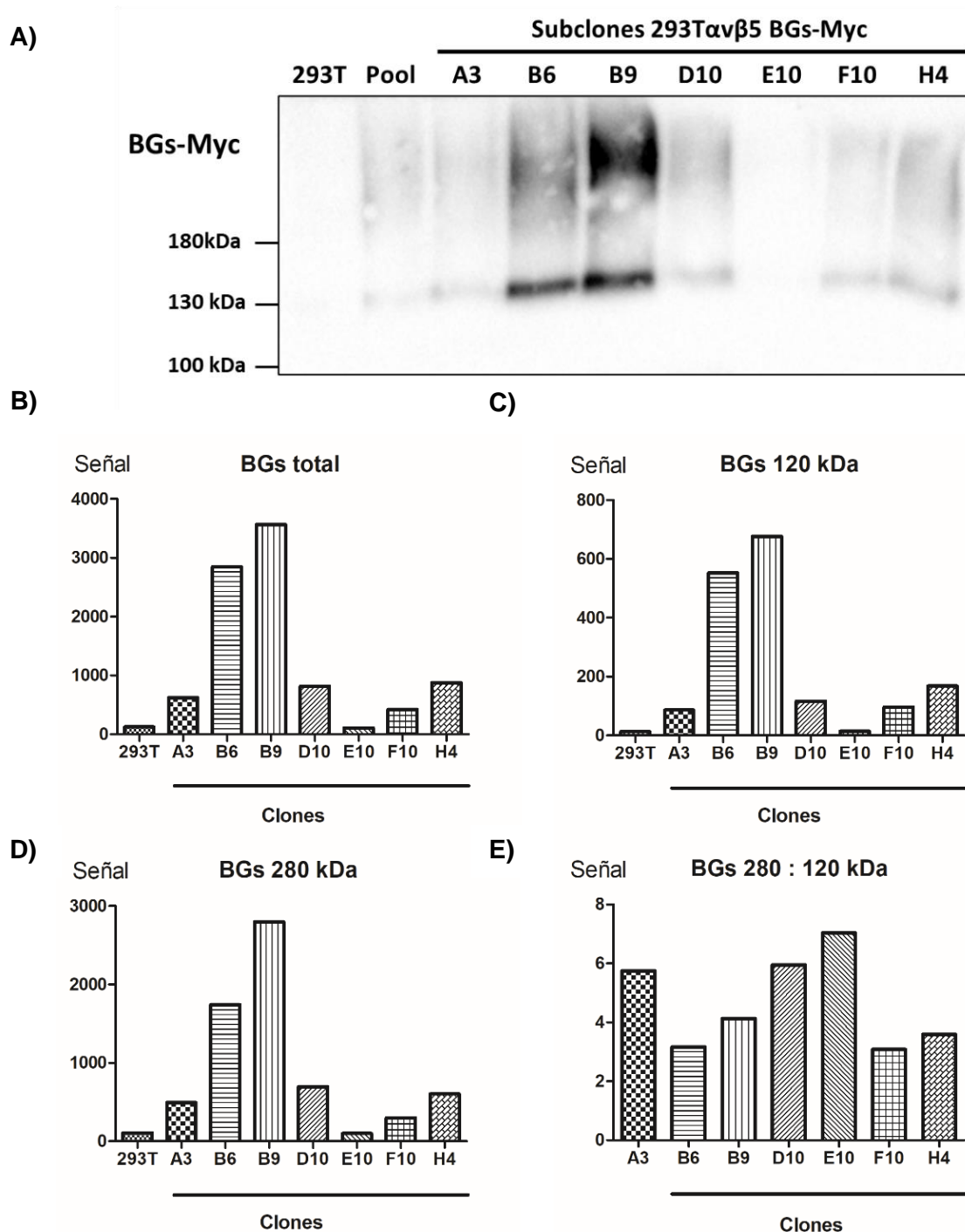


Figura 12. Las sub-clonas secretan BGs-Myc al medio extracelular. Se realizó un Western-blot con los medios condicionados producido por 45,000 células de cada sub-clona y el anticuerpo anti-Myc (A). Histogramas muestran la cuantificación de señal del BGs-Myc en su forma total(B), como proteína central (C), con glicosaminoglicanos (D) y de las sub-clonas que presentan una mayor tasa de adición de GAG a la molécula (E).

Para caracterizar el BGs-Myc producido por las sub-clonas B6 y B9, se realizó un Western-blot con los medios condicionados y se cuantificó la señal del BGs total con una curva estándar de BGs-Myc recombinante (Figura 13A). Como se observa en la Figura 13B, se detectaron concentraciones de 62 y 125 nM de BGs-Myc en los medios condicionados de las sub-clonas B6 y B9 respectivamente. Con Esto, se confirmó que la sub-clona B9 es la que tiene la mayor expresión de BGs-Myc.

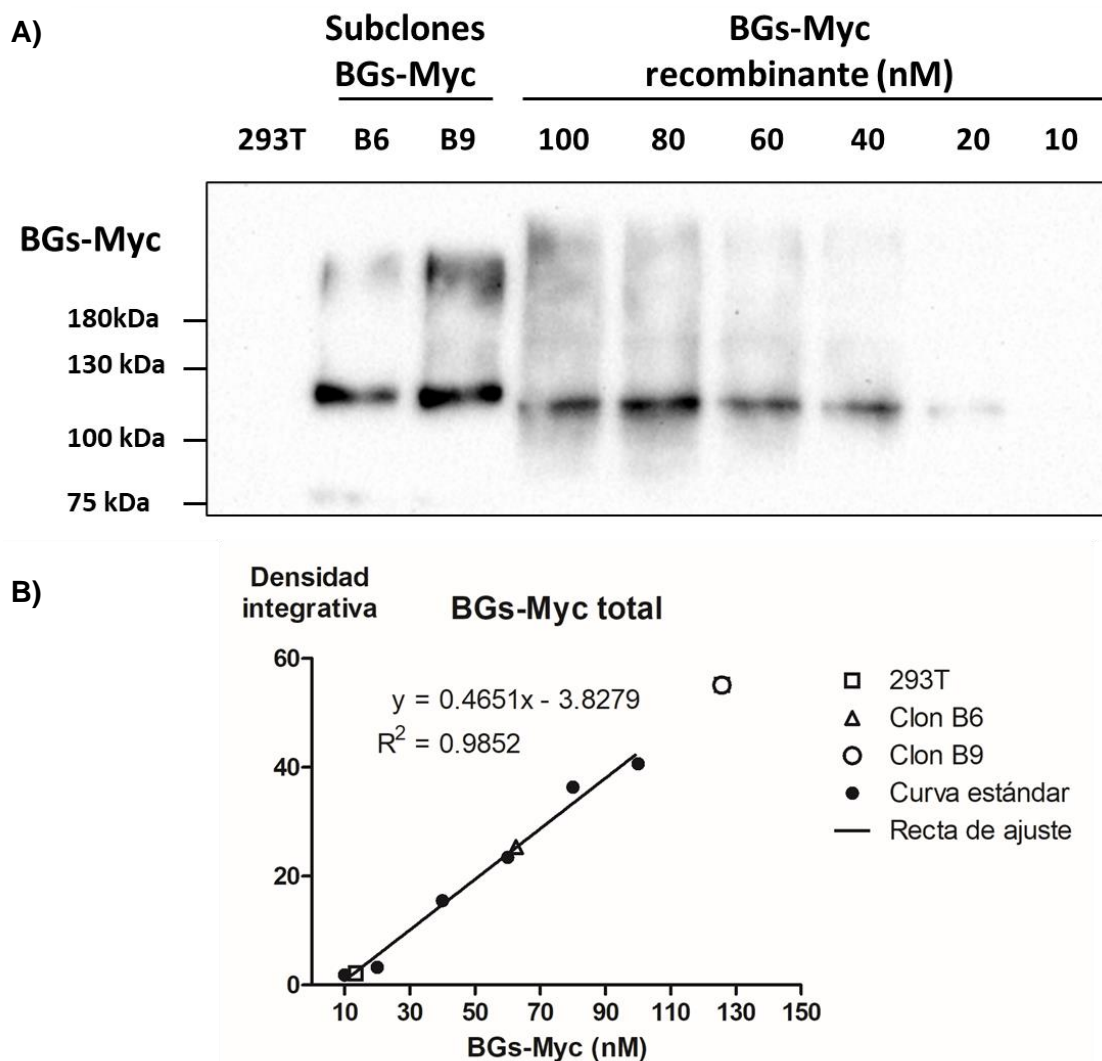


Figura 13. Cuantificación de BGs-Myc en los medios condicionados. Se realizó un Western-blot con el anticuerpo anti-Myc y 20 μ L de medios condicionados. Se realizó una curva estándar con BGs-Myc recombinante (10 a 100 nM) (A), se cuantificó la señal obtenida y se calculó la concentración de BGs-Myc con la ecuación de regresión lineal (B). Se muestra la ecuación de regresión lineal, la recta de ajuste, el coeficiente de correlación y los puntos donde se encuentran los valores de las muestras.

Para confirmar lo anterior, se realizó una tinción intracelular con el anticuerpo anti-Myc en células 293T parentales, así como las sub-clonas obtenidas y se analizaron en el citómetro de flujo. Comparadas con las células sin transducir, se obtuvieron porcentajes de 15% y 25% para los clones B6 y B9 respectivamente. Sin embargo, estos valores son menores al obtenido antes de realizar la selección clonal (Figura 14), siendo que al tratarse de sub-clonas, todas las células deberían expresar el BGs-Myc, por lo que debería observarse un único pico. Estos resultados indican que hubo un problema en la citometría con anti-Myc de las Figuras 8 y 9, indicando que tal vez había más células BGs-Myc⁺ que las que arrojó la citometría. Debido a esto, se optó por no realizar más citometría de flujo con este anticuerpo. Tomando en cuenta los resultados del Western-Blot (Figuras 12 y 13) se eligieron los clones B6 y B9 como los indicados para producir el BGs-Myc para los ensayos de unión y neutralización del TGF- β .

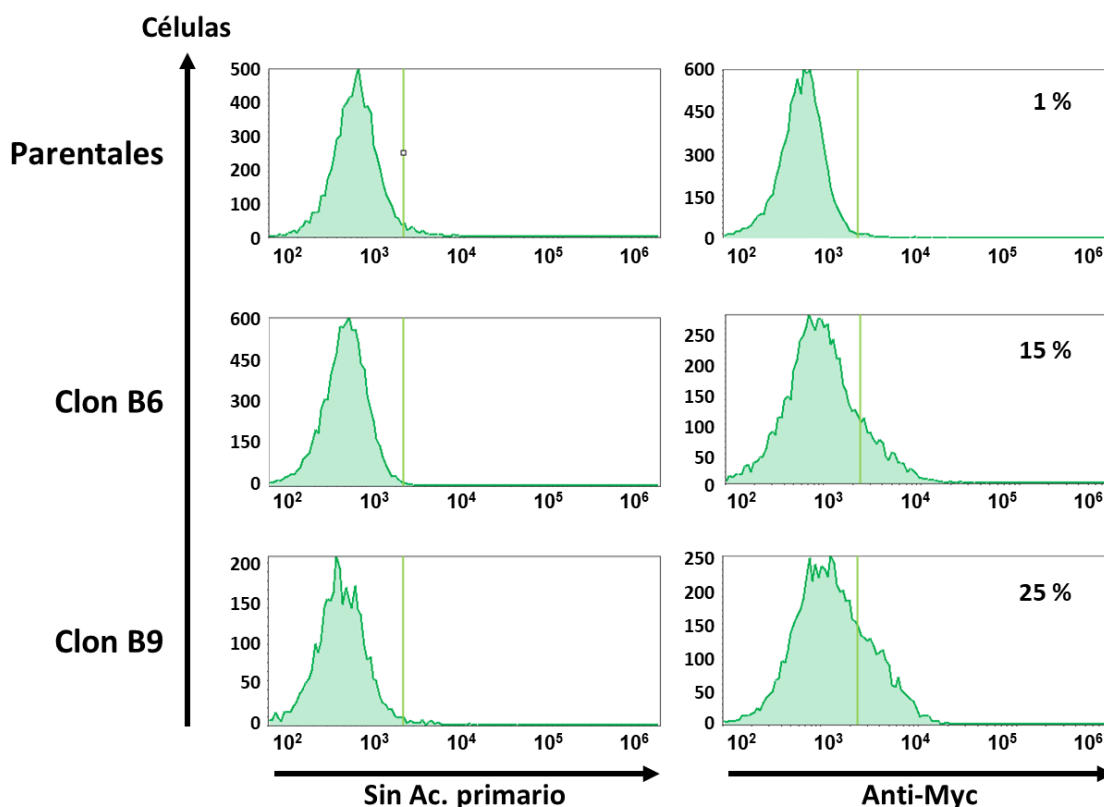


Figura 14. El anticuerpo anti-Myc parece no ser adecuado para citometría. Se tiñeron células 293T parentales, así como las sub-clonas B6 y B9 obtenidas de la dilución límite y se analizaron en el citómetro de flujo. Los histogramas muestran la intensidad de fluorescencia (eje horizontal), número de eventos (eje vertical) y el porcentaje de células que expresan BGs-Myc. Células sin tinción (panel izquierdo) y teñidas con el anticuerpo anti-Myc (panel derecho).

3.2 Neutralización del TGF- β por el betaglicano soluble

3.2.1 Unión del BGs-Myc al TGF- β

Para saber si el BGs-Myc producido tiene capacidad de unirse al TGF- β , se realizó un ensayo de marcado por afinidad. Se enviaron los medios condicionados de células 293T parentales, así como las sub-clonas B6 y B9, al Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se incubaron los medios con ^{125}I -TGF- β 2 humano, se detectaron los complejos formados con anti-SBG de rata y se cuantificaron por autoradiografía. Como se muestra en la Figura 15, el medio condicionado de la sub-clona B9 se une mejor al TGF- β 2 que el de la sub-clona B6, mientras que la señal producida por las células parentales es apenas detectable. Estos datos son consistentes con la mayor producción de BGs-Myc en la clona B9 (Figura 12) y sugiere que la unión con el TGF- β 2 se debe al BGs-Myc producto de la transducción. Como control positivo, se utilizó BGs purificado, mostrando una unión similar a la de las células transducidas. Con estos resultados, se confirmó que el BGs-Myc producido por las sub-clonas B6 y B9 puede unirse al TGF- β 2 en niveles competitivos con BGs-Myc purificado.

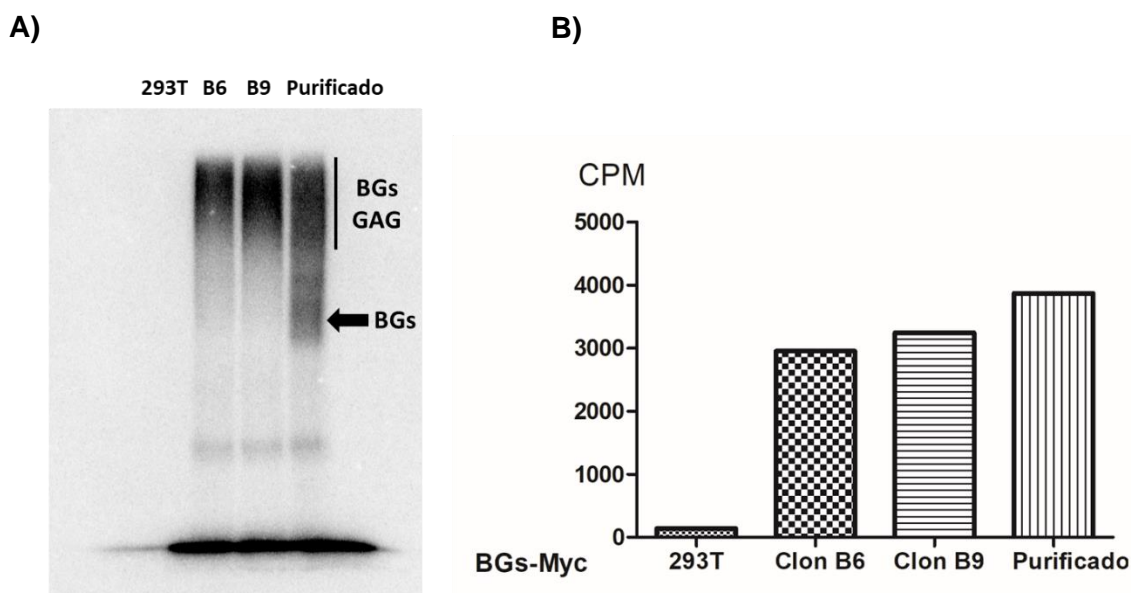


Figura 15. Interacción del BGs-Myc con el TGF- β 2. Se incubaron los medios condicionados con ^{125}I -TGF- β 2 (100 pM), se inmunoprecipitaron con anti-BGs de rata, se separaron los complejos gel de SDS y se analizaron por autoradiografía. Los histogramas muestran la cuantificación en conteos por minuto (cpm).

3.2.2 Estandarización de concentración de TGF- β 1

Para determinar la concentración mínima de TGF- β 1 para activar la cascada de señalización y obtener una señal cuantificable en el Western-blot, se sembraron las células HepG2 y se activaron con diferentes concentraciones de TGF- β 1 humano. Se utilizaron anticuerpos para detectar la forma total y fosforilada de las proteínas Smad2/3 y se cuantificaron las bandas de proteínas. Se detectaron bandas de Smad2/3 total en todas las muestras, mientras que se observan las bandas más intensas de pSmad2/3 con 20 y 40 pM de TGF- β 1 (Figura 16A), lo que se observó también al cuantificar la fosforilación de Smad2/3 (Figura 16B). Sin embargo, se buscaba una concentración que permitiera obtener una señal nítida en la membrana, sin saturar la activación de la cascada de señalización, por lo que se determinó trabajar con la concentración de 10 pM de TGF- β 1 para los ensayos de neutralización.

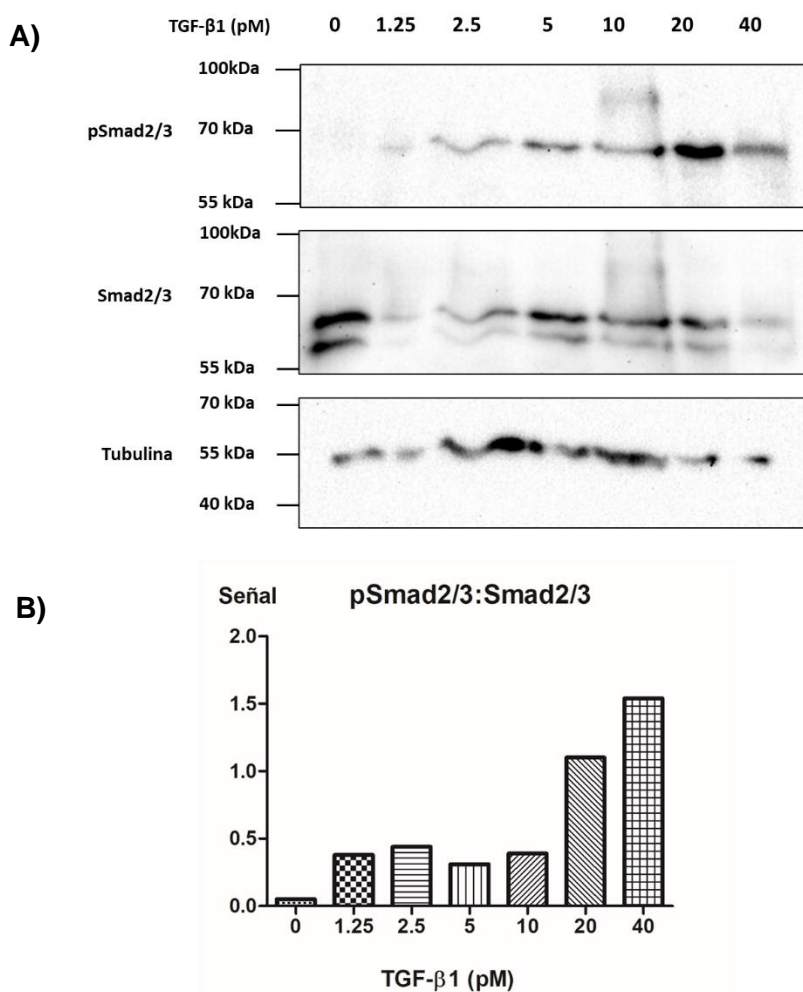


Figura 16. Estandarización de TGF- β 1 en ensayos de neutralización. Se pasaron células HepG2 por un periodo de ayuno de SFB, se trataron con diferentes concentraciones de TGF- β 1 humano por una hora y se realizó el Western-blot para detectar las proteínas Smad2/3 en su forma total y fosforilada (A). Histogramas muestran la activación relativa de la cascada de señalización (tasa pSmad2/3:Smad2/3).

3.2.3 Ensayo de neutralización del TGF- β

Se prepararon soluciones con los medios condicionados de las sub-clonas B6 y B9 adicionados con TGF- β 1 (10 pM) y se incubaron por una hora para dejar actuar la neutralización. Se trataron las células HepG2 con estas mezclas para activar la señalización con el TGF- β 1 no neutralizado y se realizó el Western-Blot. Como control negativo, se usó el medio de cultivo en el que se preparan los medios condicionados, mostrando que solo hay fosforilación una vez que se añade el TGF- β 1 (Figura 17). Los medios condicionados de las sub-clonas B6 y B9 redujeron la actividad del TGF- β 1, que alcanzó su punto mínimo con el BGs-Myc recombinante (Figura 17B).

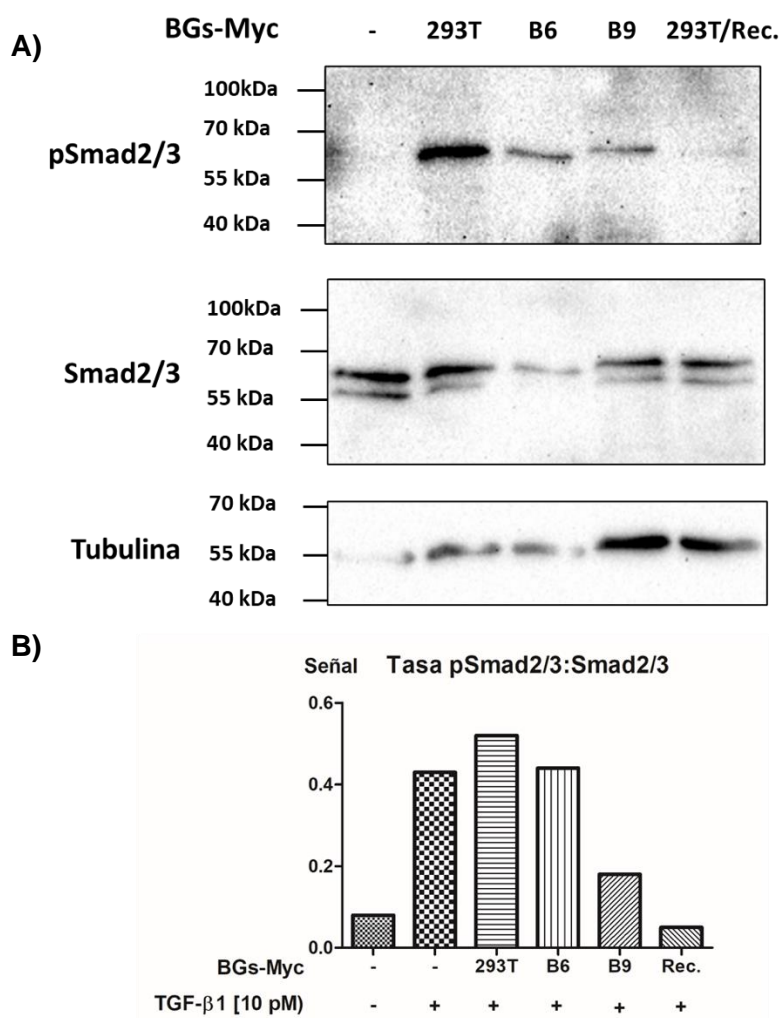


Figura 17. Neutralización del TGF- β 1 con BGs-Myc. Se hicieron soluciones de TGF- β 1 [10 pM] y se dejó actuar la neutralización con los medios condicionados con BGs-Myc por una hora. Se realizó un Western-blot con los lisados celulares para detectar la fosforilación de las proteínas Smad2/3. Se muestran las bandas de proteínas (A) y cuantificación de la señal (B).

Se observó una activación adicional en las muestras tratadas con el medio condicionado de las células sin transducción, debida al TGF- β producido por las células 293T, por lo que se realizó otro ensayo. Se preparó el BGs recombinante en este medio y sin adicionar TGF- β 1. El medio condicionado del clon B9, redujo la activación en un 50% comparado con el de las células sin transducir (Figura 18B), confirmando lo obtenido anteriormente. Sin embargo, hubo una sobreactivación en el tratamiento del clon B6, posiblemente debida a un problema de transferencia en el Western-blot. Con estos resultados, se confirmó que el BGs-Myc producido por las sub-clonas B6 y B9, puede neutralizar al TGF- β e inhibir su cascada de señalización.

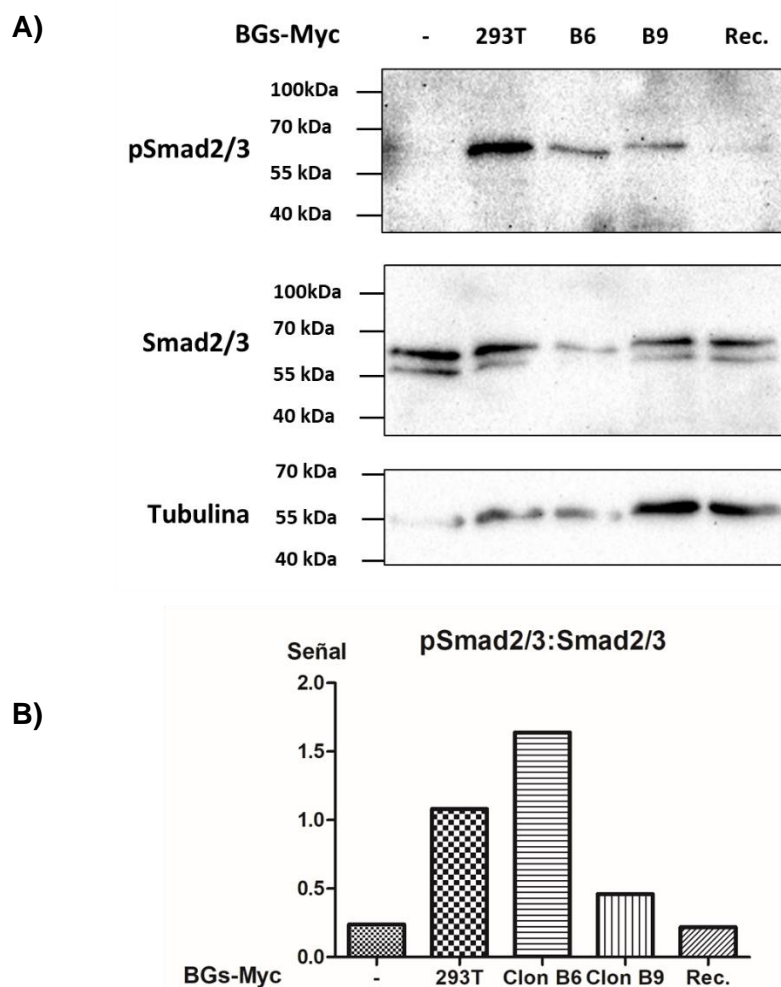


Figura 18. El BGs-Myc inhibe la activación de la cascada de señalización del TGF- β . Se incubaron los medios condicionados de las células a 37° C por una hora para permitir la neutralización. Se trataron las células HepG2 con estos medios por una hora para activar la cascada de señalización con el TGF- β endógeno remanente y se realizó Western-blot. Se muestran las bandas de proteínas Smad2/3 total y fosforiladas (A). Histogramas muestran la cuantificación de la señal (B).

3.3 Caracterización de los exosomas exo-BGs

3.3.1 Aislamiento y caracterización de los exosomas

Para determinar si las células transducidas transfieren ARN mensajero para BGs-Myc a sus exosomas, se obtuvo el medio condicionado de las células parentales y transducidas y se aislaron los exosomas por una serie de ultracentrifugaciones. Se extrajo el ARN total y se cuantificó para analizarse por RT-qPCR. Como se observa en la Tabla 6, el ARN total obtenido en los exosomas fue muy bajo en comparación con el de los lisados, por lo que se evaluó la posibilidad de que hubiera un problema protocolo de aislamiento o que las células utilizadas no estuvieran secretando exosomas.

Tabla 6. Cuantificación de ARN total de lisados celulares y medios condicionados. Se muestra el ARN total producido por 1×10^6 células. Se cuantificó el medio condicionado y las células que lo produjeron para determinar los ng de ARN en los exosomas.

Muestra	Células	ng ARN/ 1×10^6 células
Células	293T- $\alpha\beta 5$	438.00
	293T- $\alpha\beta 5$ BGs-Myc	365.50
Exosomas	293T- $\alpha\beta 5$ 9B	0.04
	293T- $\alpha\beta 5$ 9B BGs	0.02

Para saber si el problema se debía a la línea celular utilizada o a un problema metodológico, se obtuvieron medios condicionados de células de melanoma murino B16-F1 transfectadas para expresar GFP y se extrajo el ARN en sus exosomas. Como se muestra en la Tabla 7, la cantidad de ARN exosomal obtenida de estas células no fue mucho mayor al obtenido con las células 293T $\alpha\beta 5$, sin embargo, se consideró suficiente para obtener ADN complementario.

Tabla 7. ARN total en células y vesículas extracelulares B16-F1 parentales y transfectadas con GFP. Se muestra el ARN total producido por 1×10^6 células.

Muestra	Células	ng ARN/ 1×10^6 células
Células	B16-F1	179.00
	B16-F1 GFP	126.30
Exosomas	B16-F1	1.06
	B16-F1 GFP	0.34

Se realizó una retrotranscripción utilizando la enzima SuperScript II (ThermoFisher) y oligonucleótidos (dT) para obtener ADN complementario a partir del ARNm. Se hizo una PCR cuantitativa con cebadores para la región 3'UTR del gen para la GFP y el gen de referencia Rpl32 (Tabla 4), para cuantificar la expresión relativa de GFP. Como se observa en la Figura 19, se amplificaron productos de ARN mensajero para GFP en las muestras de exosomas de células B16-F1 GFP, pero no en los de las células parentales, indicando que hay transferencia de ARNm a las vesículas extracelulares. Con esto se confirmó que los exosomas pueden ser usados como vehículo de transporte de ARNm para genes de interés, y, por otro lado, que la ausencia de ARNm en los resultados de la Tabla 7, se debe a que las células 293T utilizadas no secretaban exosomas. Debido a esto, se consideró la idea de utilizar otras líneas celulares para obtener los exosomas con ARNm para BGs-Myc.

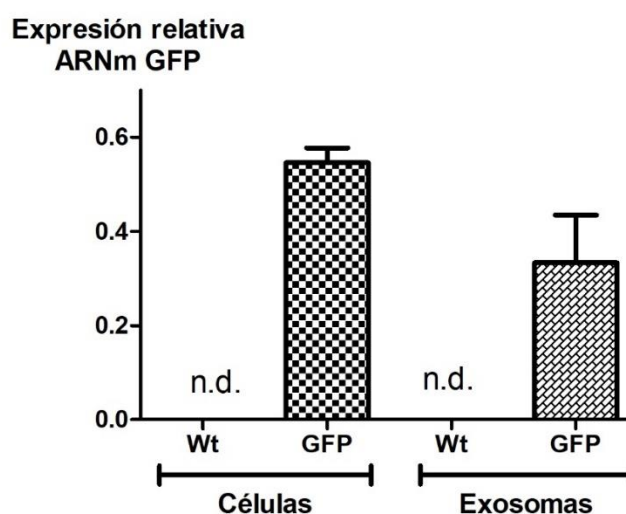


Figura 19. Detección de ARNm para GFP en exosomas de células B16-F1 GFP. Se extrajo el ARN total de exosomas de células B16-F1 parentales y transfectadas para expresar GFP. Se realizó una retrotranscripción y se evaluó la expresión de los genes GFP y Rpl32 por PCR en tiempo real. Las barras muestran la expresión relativa del gen para GFP (tasa GFP:Rpl32).

3.4 Modificación de células B16-F1 y MC3T3-E1 para expresar BGs-Myc

3.4.1 Curva de muerte de células MC3T3-E1

Antes de poder trabajar con las células MC3T3-E1, era necesario saber la concentración de antibiótico adecuada para eliminar las células que no fueron transducidas, por lo que se realizó una curva de muerte. Se sembraron las células y se cultivaron en diferentes concentraciones de puromicina, se tomaron

fotografías y se estimó la confluencia en los pozos. Se buscaba una concentración permitiera que las eliminara a las demás en un periodo de 7 a 10 días. El cultivo con 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puromicina eliminó a todas las células del pozo después de 8 días, sin embargo, se optó por la concentración de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para permitir a las células expresar el gen de resistencia al antibiótico sin eliminarlas prematuramente (Figura 20B).

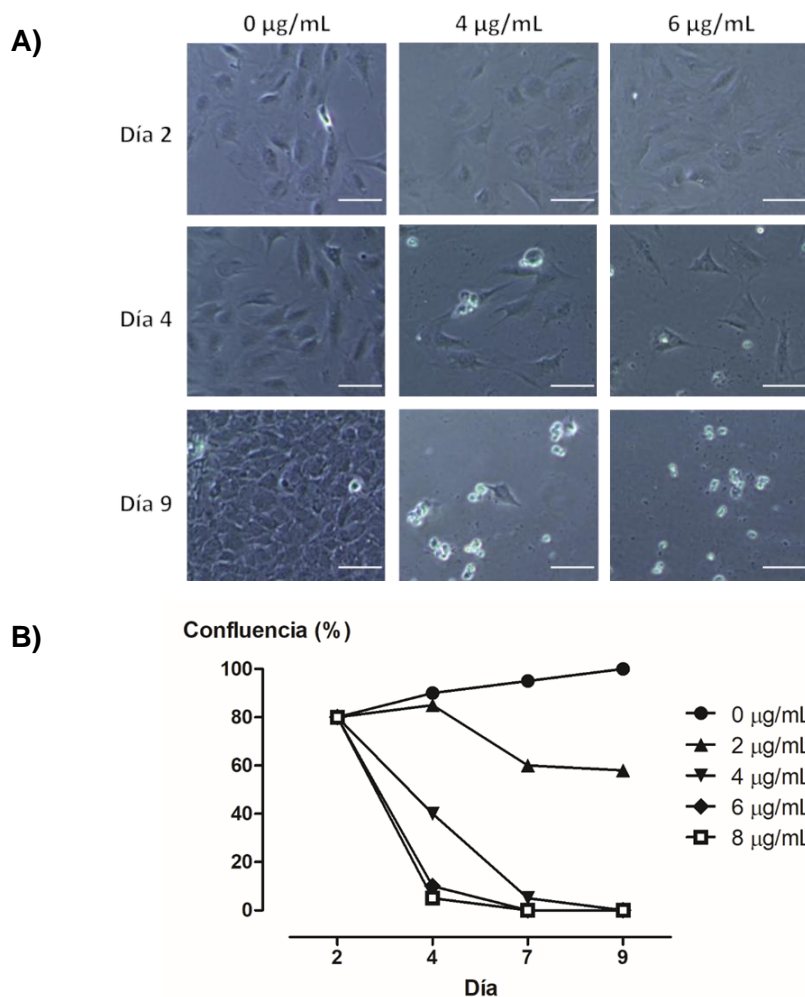


Figura 20. Curva de muerte de células MC3T3-E1 en cultivo con puromicina. Se cultivaron las células en medio de cultivo con diferentes concentraciones de puromicina (de 0 a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se observaron las células al microscopio (A) y se estimó la confluencia en los pozos (B). Barra de escala: 100 μm .

3.4.2 Transducción lentiviral

Se obtuvieron partículas lentivirales con la información para expresar GFP o BGs-Myc y se transdujeron células B16-F1, MC3T3-E1, así como 293T como control de transducción, pues se había tenido éxito con estas anteriormente. Dos días después de la transducción, se observaron las células al microscopio, donde se observó fluorescencia en el grupo control, pero no en las células B16-F1 ni MC3T3-E1, por lo que se

decidió no analizarlas por citometría de flujo y comenzar la selección en puromicina. Tras 4 días en cultivo con antibiótico, las células modificadas con GFP seguían sin presentar fluorescencia (Figura 21A). Sin embargo, éstas, como las células transducidas con BGs-Myc, proliferaban en el pozo (Figura 21A), lo que nos hizo pensar que tal vez estaban expresando el plásmido de resistencia a la puromicina, por lo que se determinó evaluar la expresión del BGs-Myc por Western-Blot.

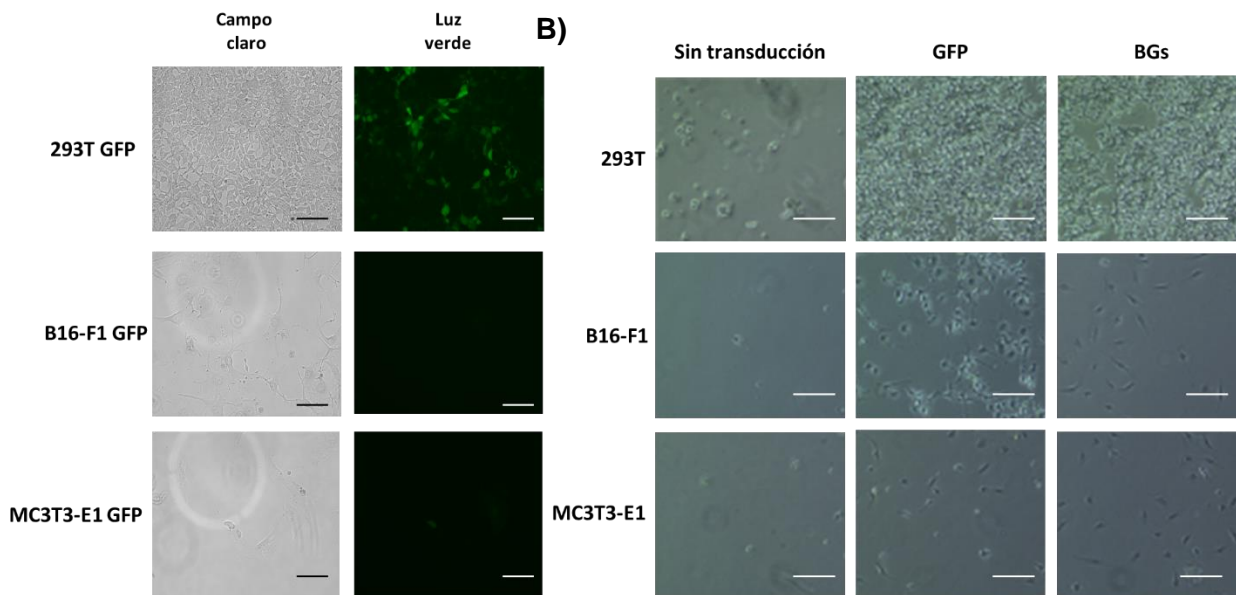


Figura 21. Las células B16-F1 y MC3T3-E1 no expresan GFP pero sobreviven en puromicina. Dos días después de la transducción lentiviral, se inició el cultivo en puromicina (Tabla 1). Al cuarto día del cultivo, se observaron las células para observar la expresión de GFP (A) y se observó la proliferación en los pozos (D). Barra de escala: 100 μm (A) y 400 μm (B).

3.4.3 Detección del BGs-Myc

Se obtuvieron los medios condicionados generados por las células en selección y se realizó un Western-Blot para saber si producían BGs-Myc. Se observaron bandas correspondientes al BGs-Myc en su forma de proteína central y con GAG's en el grupo control, pero no en las células B16-F1 ni MCET3-E1 (Figura 22), indicando que a pesar de que las células adquirieron resistencia a la puromicina, no expresaron el gen de interés. Con estos resultados, se determinó no seguir trabajando con estas líneas celulares.

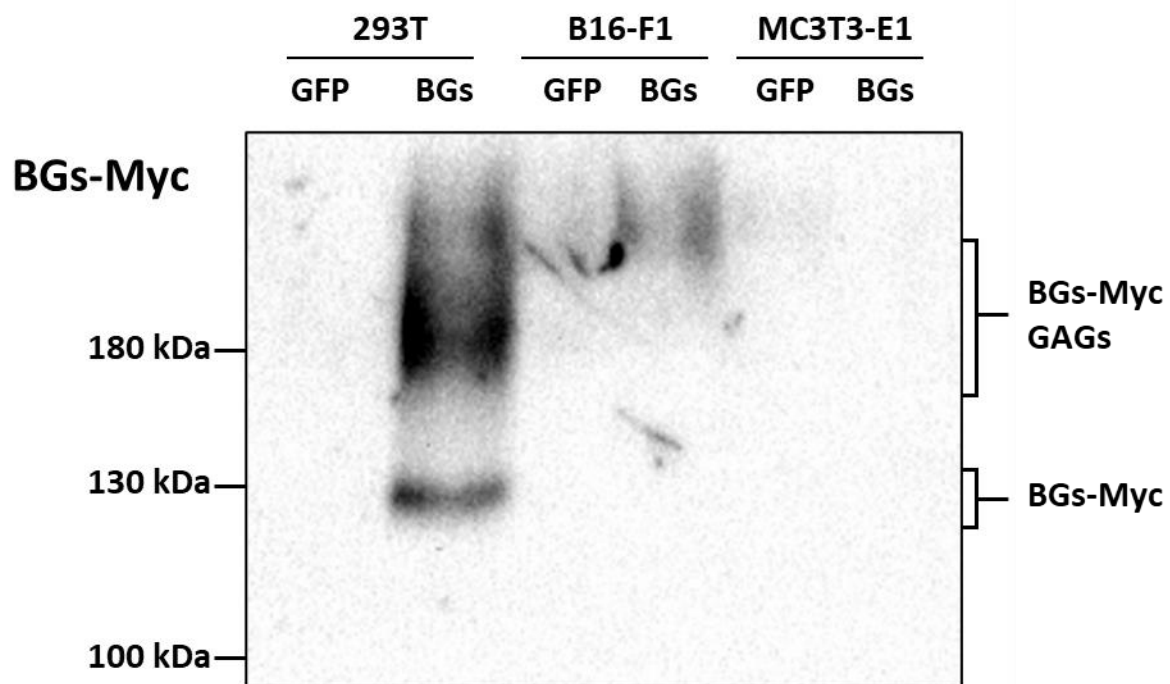


Figura 22. Las células B16-F1 y MC3T3-E1 no expresan BGs-Myc. Se generaron medios condicionados de 48 horas de las células 293T, B16-F1 y MC3T3-E1 transducidas. Se realizó un Western-blot con el anticuerpo anti-Myc para la inmunodetección. Se muestran con corchetes los pesos moleculares donde se espera encontrar el BGs-Myc.

Capítulo 4. Discusión

El cáncer pancreático se considera de importancia médica a nivel mundial, su rápida progresión, diagnóstico tardío y alta capacidad metastásica, repercuten en su bajo nivel de supervivencia. De ahí la importancia del desarrollo de tratamientos enfocados en prevenir la metástasis. En este contexto, la llegada de los exosomas del tumor pancreático a las células de Kupffer supone el primer paso en la metástasis hepática, induciendo la sobreexpresión del TGF- β y activando su cascada de señalización en las células estrelladas hepáticas (Costa-Silva et al., 2015). Por otro lado, uno de los co-receptores de esta cascada, el betaglicano, en su forma soluble, mantiene su capacidad de unión al TGF- β , sin la transducción de señal consecuente, lo que lo convierte en una molécula con potencial para tratamientos de enfermedades mediadas por el TGF- β .

En este trabajo, se propuso aprovechar el potencial de los exosomas como vehículos de transporte de material genético, así como el uso del betaglicano soluble como una estrategia de terapia dirigida para inhibir la metástasis hepática. Para esto, se comparó la transfección y la transducción lentiviral para expresar el BGs-Myc en células 293T que expresan las integrinas $\alpha\beta 5$ en sus membranas, para obtener exosomas dirigidos al hígado. La transfección ofrece una expresión del gen de interés más intensa, aunque transitoria, ya que los plásmidos se van perdiendo con la división celular (Recillas-Targa, 2006). Por otro lado, la transducción con un sistema lentiviral permite integrar la información genética al genoma de una célula hospedera, obteniendo estabilidad de expresión (Gouvarchin Ghaleh et al., 2020).

Se puede observar este efecto en el nivel de expresión de GFP de la Figura 1A, donde aparentemente las células transfectadas son más fluorescentes que las transducidas, donde apenas se aprecia fluorescencia. Para conocer la eficiencia de transducción, se analizaron las células modificadas con GFP en el citómetro de flujo, obteniendo un 29% de células GFP⁺, algo similar a lo reportado en células 293T (Denning et al., 2013). Para aumentar la eficiencia de transducción, se pueden optimizar parámetros como cuantificar las partículas lentivirales o reducir las fuerzas de repulsión entre las partículas lentivirales y las células diana mediante la adición de polímeros catiónicos, como el polibreno. Sin embargo, en este trabajo, se realizó una selección con cultivo en presencia de puomicina para eliminar las células que no fueron la transfección o la transducción. Esto incrementó el porcentaje de células GFP⁺ (Figura 7), como se ha reportado en células de cáncer mamario con esta modificación (Gárate Carrillo et al., 2016).

Se evaluó el porcentaje de células positivas para BGs-Myc mediante citometría de flujo utilizando dos anticuerpos, para detectar el betaglicano o la etiqueta c-myc de nuestra molécula. Se ha reportado que las células 293T expresan betaglicano de forma endógena (Wiater et al., 2009), por lo que se analizaron las células sin modificar para conocer este porcentaje, el cual resultó ser menor al 1% con ambos anticuerpos, por lo que se consideró despreciable. Sin embargo, el anticuerpo anti-BG no demostró tampoco ser útil para detectar al BGs-Myc en las células modificadas. Se obtuvo un 29% de células positivas con la transducción, sin embargo, resultó ser muy bajo en comparación los porcentajes obtenidos en células 293T (Denning et al., 2013), por lo que se realizó una segunda transducción, con un resultado ligeramente mayor. Las bandas para BGs-Myc obtenidas del Western-blot demostraron que se producía como proteína central de 120 kDa, similar a lo obtenido en células MDA-MB-231 (Gárate Carrillo et al., 2016; Gómez, 2018) y células de insecto (Vilchis-Landeros et al., 2001). Se observó, además, que la proteína cuenta con los glicosaminoglicanos, dándole un peso de 250 a 280 kDa. Esto indica que las células 293T confieren estas modificaciones post-traduccionales, aunque esta adición no interfiere en su capacidad de unirse al TGF- β (Mendoza et al., 2010).

Respecto a la dilución límite, de los 192 pozos sembrados, solo 7 pudieron expandirse para analizar su expresión de BGs-Myc, algo similar a lo obtenido anteriormente en el laboratorio, cuando se obtuvieron 10 clonas a partir de 384 pozos con células 293T (Castro Flores, 2020). Las 7 sub-clonas obtenidas secretan las dos formas del BGs-Myc. Además, se estimó la concentración del BGs-Myc en los medios condicionados mediante una titulación por Western-Blot, tal y como se describe en la Figura 13B, con 60 a 120 nM en los medios condicionados de las sub-clonas B6 y B9 respectivamente. Se analizaron estas sub-clonas en el citómetro de flujo, esperando obtener un mayor resultado que antes de la dilución límite, pues al ser sub-clonas obtenidas a partir de una sola célula al fondo del pozo, se espera que todas las células expresen BGs-Myc. Sin embargo, ya que los porcentajes resultaron menores al obtenido antes de la selección clonal, es posible que la citometría realizada con el anticuerpo anti-Myc no refleje el resultado real y que el experimento de selección clonal no haya sido necesario.

El BGs-Myc secretado por las células 293T- $\alpha\text{v}\beta 5$ modificadas en este trabajo mostró afinidad por el TGF- $\beta 2$, lo cual concuerda con lo reportado anteriormente (Bandyopadhyay et al., 2002; Vilchis-Landeros et al., 2001). Para medir su capacidad para neutralizar TGF- β , se evaluó la fosforilación de las proteínas efectoras de la cascada Smad2/3, en células HepG2, las cuales son sensibles a esta molécula. Los medios condicionados de las sub-clonas transducidas con BGs-Myc redujeron la fosforilación de estas proteínas, indicando una inhibición de la cascada de señalización. Esto es consistente con lo obtenido por

Bandyopadhyay, y colaboradores (2002), donde el tratamiento con BGs de rata, redujo la actividad de luciferasa regulada por TGF- β 1, así como la metástasis de tumores de cáncer mamario en ratones.

Se eligieron las células 293T para producir los exosomas, debido a su robustez, facilidad de manejo y a su ya caracterizada secreción de exosomas. Se sabe que éstos tienen una baja citotoxicidad, su carga endógena tiene poco potencial fisiopatológico y son aptos para una amplia gama de tejidos receptores. Aunado a esto, su facilidad de modificación genética permite modificar tanto su carga como sus proteínas de membrana, para brindarles especificidad. Se ha reportado que hay casi 1 μ g de RNA por cada μ g de proteína en muestras de exosomas 293T (Li et al., 2016). Si bien no se cuantificó la proteína en las fracciones de exosomas 293T- $\alpha\beta$ 5 BGs-Myc, los niveles de RNA total obtenidos fueron de apenas 2 ng/ μ L, por lo que se asumió que no hubo éxito en el aislamiento. Esto concuerda con lo obtenido por Paloma Acosta, quien no pudo detectar marcadores de exosomas en muestras obtenidas por las células 293T utilizadas en este proyecto. La ultracentrifugación diferencial es uno de los métodos más ampliamente utilizados para el aislamiento de exosomas debido a su asequibilidad en el laboratorio. Sin embargo, la eficiencia en la obtención de vesículas extracelulares no siempre corresponde a la de ARN exosómico, el cual puede incrementarse mediante kits comerciales que implementan columnas de afinidad (Gutiérrez García et al., 2020). El aislamiento de exosomas B16-F1 GFP mostró niveles que, aunque ligeramente mayores de ARN total, permitieron demostrar la transferencia del ARNm para GFP a los exosomas por RT-qPCR.

Al no poder obtener exosomas de las células 293T- $\alpha\beta$ 5, se contempló transducir otras líneas celulares para producir el BGs-Myc, optando por las células B16-F1 y MC3T3-E1. Las células transducidas con GFP, proliferaron en el cultivo de selección con puromicina, sin emitir fluorescencia (Figura 12B), mientras que no se detectó BGs-Myc en el medio condicionado de las células transducidas con dicho vector (Figura 13). Esto se puede deber al silenciamiento del promotor CMV, bajo el cual se regula la expresión de GFP o BGs-Myc en el plásmido de transferencia pLJM1 utilizado para formar las partículas lentivirales, lo cual se ha reportado en algunos tipos de células de ratón, hamster y humano (Grassi et al., 2003; Herbst et al., 2012; Zúñiga et al., 2019).

Como lo indica el título de la tesis, el propósito de este trabajo era utilizar la capacidad de transferencia de material genético de los exosomas, con la capacidad del BGs-Myc para neutralizar el TGF- β en la formación del nicho pre-metastásico hepático. Sin embargo, no fue posible cumplir con los objetivos específicos relacionados a la caracterización y uso de los exosomas, por lo que es necesario seguir con el trabajo en el aislamiento de vesículas extracelulares en el laboratorio.

Entre las perspectivas a futuro se incluye buscar otro anticuerpo para realizar la detección del BGs-Myc por citometría de flujo, para conocer con veracidad la eficiencia de la esta modificación, así como la expresión endógena de betaglicano membranal por estas células. Esto podría explicar su aporte en la activación de la cascada de señalización. Sin embargo, el más importante sería expresar el BGs-Myc en alguna línea celular cuya secreción de exosomas haya sido probada, tal vez células 293T recién adquiridas, dada su facilidad de modificación genética. Así mismo, deben identificarse los factores a optimizar para el aislamiento de exosomas. De poder obtener los exosomas con las integrinas $\alpha\beta 5$ que contengan el ARNm para el BGs-Myc, supondría un modelo terapéutico de terapia dirigida para el nicho pre-metastásico hepático.

Capítulo 5. Conclusiones

En este trabajo, se modificaron genéticamente células 293T- $\alpha\beta 5$ para expresar de forma estable BGs-Myc y secretarlo al medio extracelular. Se obtuvieron siete sub-clonas, de las cuales dos expresan de 60 a 120 nM de BGs-Myc. Además, se demostró la capacidad del BGs-Myc en los medios condicionados de estas células, para neutralizar al TGF- β e inhibir su cascada de señalización en células de hepatocarcinoma humano.

Se intentó utilizar un método de aislamiento exosomas por ultracentrifugaciones y sedimentación con PEG, aunque no se detectó ARN en la fracción obtenida. Sin embargo, se logró aislar exosomas de células B16-F1 GFP con este método, demostrando que no se debía a un problema técnico sino a la línea celular utilizada. Por otro lado, se logró comprobar la transferencia de ARN mensajero para GFP a los exosomas secretados por las células B16-F1 GFP, reafirmando su capacidad como vehículos de transporte de información genética y uno de los objetivos de esta tesis.

La vía de señalización del TGF- β representa un área de oportunidad en el tratamiento del cáncer pancreático, ya que tiene un papel fundamental en la formación del nicho pre-metastásico hepático, siendo la metástasis la causante de la mayoría de las muertes por esta enfermedad. El betaglicano soluble como agente terapéutico, sumado a la entrega específica que permiten los exosomas, supone una potencial estrategia terapéutica para la metástasis hepática.

Literatura citada

American Cancer Society. 2021. Survival Rates for Pancreatic Cancer. Consultado el febrero 12 de 2021 de: <https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>

American Society of Medical Oncology. 2021. Pancreatic Cancer: Statistics. Consultado el septiembre 12 de 2021 de: <https://www.cancer.net/cancer-types/pancreatic-cancer/statistics#:~:text=If%20the%20cancer%20is%20detected,year%20survival%20rate%20is%2013%25>

Antimisiaris, S. G., Mourtas, S., & Marazioti, A. 2018. Exosomes and exosome-inspired vesicles for targeted drug delivery. *Pharmaceutics*, 10(4), 218. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040218>

Bandyopadhyay, A., López-Casillas, F., Malik, S. N., Montiel, J. L., Mendoza, V., Yang, J., & Sun, L. Z. 2002. Antitumor activity of a recombinant soluble betaglycan in human breast cancer xenograft. *Cancer Research*, 62(16), 4690–4695.

Bandyopadhyay, A., Wang, L., López-Casillas, F., Mendoza, V., Yeh, I. T., & Sun, L. 2005. Systemic administration of a soluble betaglycan suppresses tumor growth, angiogenesis, and matrix metalloproteinase-9 expression in a human xenograft model of prostate cancer. *The Prostate*, 63(1), 81–90. <https://doi.org/10.1002/pros.20166>

Bandyopadhyay, A., Zhu, Y., Cibull, M. L., Bao, L., Chen, C., & Sun, L. 1999. A Soluble Transforming Growth Factor Type III Receptor Suppresses Tumorigenicity and Metastasis of Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells. *Cancer Research* 59(19), 5041-5046

Bilandzic, M., & Stenvers, K. L. 2011. Betaglycan: A multifunctional accessory. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 339(1–2), 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.04.014>

Caruso, S., & Poon, I. K. H. 2018. Apoptotic cell-derived extracellular vesicles: More than just debris. *Frontiers in Immunology* Vol. 9, 1486. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01486>

Castro Flores, V. 2020. Desarrollo de exosomas funcionalizados para entrega de ARNm en el nicho pre-metastásico de tejido hepático. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C., 63 pp.

Chen, Y. G., Liu, F., & Massagué, J. 1997. Mechanism of TGF β receptor inhibition by FKBP12. *The EMBO journal*, 16(13), 3866-3876. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3866>

Connolly, E. C., Freimuth, J., & Akhurst, R. J. 2012. Complexities of TGF- β targeted cancer therapy. *International Journal of Biological Sciences*, 8(7), 964-978. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4564>

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., ... Lyden, D. 2015. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature Cell Biology*, 17(6), 816–826. <https://doi.org/10.1038/ncb3169>
- Denning, W., Das, S., Guo, S., Xu, J., Kappes, J. C., & Hel, Z. 2013. Optimization of the transductional efficiency of lentiviral vectors: Effect of sera and polycations. *Molecular Biotechnology*, 53(3), 308–314. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9528-5>
- Dewidar, B., Meyer, C., Dooley, S., & Meindl-Beinker, A. N. 2019. TGF- β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis: Updated-2019. *Cells*, 8(11), 1419. <https://doi.org/10.3390/cells8111419>
- Dillekås, H., Rogers, M. S., & Straume, O. 2019. Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Medicine*, 8(12), 5574–5576. <https://doi.org/10.1002/cam4.2474>
- Dong, M., How, T., Kirkbride, K. C., Gordon, K. J., Lee, J. D., Hempel, N., Kelly, P., Moeller, B. J., Marks, J. R., & Blobe, G. C. 2007. The type III TGF- β receptor suppresses breast cancer progression. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 206–217. <https://doi.org/10.1172/JCI29293>
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., y Naldini, L. 1998. A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. *Journal of virology*, 72(11), 8463–8471. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.11.8463-8471.1998>
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. 2020. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5(1), 28. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, & Bray F. 2020. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. Consultado el marzo 2 de 2022, de <https://gco.iarc.fr/today>, accessed
- Gárate Carrillo, E. A. 2016. Ingeniería de células cancerosas de mama para la sobreproducción de la proteína Smad7, un inhibidor del TGF-beta. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C., 71 pp.
- Gómez, M. A. 2018. Ingeniería de células cancerosas de mama para la sobreproducción del receptor III del TGF-Beta. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Ensenada, B.C., 61 pp.
- Gouvarchin Ghaleh, H. E., Bolandian, M., Dorostkar, R., Jafari, A., & Pour, M. F. 2020. Concise review on optimized methods in production and transduction of lentiviral vectors in order to facilitate immunotherapy and gene therapy. *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 128). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110276>
- Grassi, G., Maccaroni, P., Meyer, R., Kaiser, H., D'Ambrosio, E., Pascale, E., Grassi, M., Kuhn, A., di Nardo, P., Kandolf, R., & Küpper, J. H. 2003. Inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation activate cytomegalovirus promoter-controlled reporter gene expression in human glioblastoma cell line U87. *Carcinogenesis*, 24(10), 1625–1635. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg118>

- Gutiérrez García, G., Galicia García, G., Zalapa Soto, J., Izquierdo Medina, A., Rotzinger-Rodríguez, M., Casas Aguilar, G. A., López Pacheco, C. P., Aguayo, Á., & Aguilar-Hernandez, M. M. 2020. Analysis of RNA yield in extracellular vesicles isolated by membrane affinity column and differential ultracentrifugation. *PLoS One*, 15(11), e0238545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238545>
- Hawkes, N. (2019). Cancer survival data emphasise importance of early diagnosis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 364, l408. <https://doi.org/10.1136/bmj.l408>
- Heldin, C.-H. 2008. Transforming Growth Factor-B in Cancer Therapy. M. Cancer Training Branch, Office of Centers, Training and Resources, National Cancer Institute, Bethesda (Ed.), Transforming Growth Factor-B in Cancer Therapy (Jakowlew, p. 723). Humana Press.
- Herbst, F., Ball, C. R., Tuorto, F., Nowrouzi, A., Wang, W., Zavidij, O., Dieter, S. M., Fessler, S., van der Hoeven, F., Kloz, U., Lyko, F., Schmidt, M., von Kalle, C., & Glimm, H. 2012. Extensive methylation of promoter sequences silences lentiviral transgene expression during stem cell differentiation in vivo. *Molecular Therapy*, 20(5), 1014–1021. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.46>
- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T. L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Slop, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., ... Lyden, D. 2015. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527(7578), 329–335. <https://doi.org/10.1038/nature15756>
- Hruban, R. H., Iacobuzio-Donahue, C., Wilentz, R. E., Goggins, M., & Kern, S. E. 2001. Molecular Pathology of Pancreatic Cancer. *Cancer Journal*, 7(4), 251–258. <https://doi.org/10.1097/00006676-200404000-00007>
- Huynh, L. K., Hipolito, C. J., & Dijke, P. ten. 2019. A perspective on the development of TGF- β inhibitors for cancer treatment. *Biomolecules*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/biom9110743>
- Inman, G. J., Nicolás, F. J., Nicolás, N., Callahan, J. F., Harling, J. D., Gaster, L. M., Reith, A. D., Laping, N. J., & Hill, C. S. 2002. SB-431542 Is a Potent and Specific Inhibitor of Transforming Growth Factor-Superfamily Type I Activin Receptor-Like Kinase (ALK) Receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular pharmacology*, 62(1), 65–74. <https://doi.org/10.1124/mol.62.1.65>
- Jaschinski, F., Rothhammer, T., Jachimczak, P., Seitz, C., Schneider, A., & Schlingensiepen, K.-H. 2011. The Antisense Oligonucleotide Trabedersen (AP 12009) for the Targeted Inhibition of TGF- β 2. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(12), 2203–2213. <https://doi.org/10.2174/138920111798808266>
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. 2020. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478). <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Anna, H., Vincent, L., Costa, C., Macdonald, D. D., Jin, D. K., Kerns, S. A., Zhu, Z., Hicklin, D., Wu, Y., Port, J. L., 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. <https://doi.org/10.1038/nature04186>. VEGFR1-positive

- Keleg, S., Büchler, P., Ludwig, R., Büchler, M. W., & Friess, H. 2003. Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Molecular Cancer*, 2(14), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-2-14>
- Kibria, G., Ramos, E. K., Wan, Y., Gius, D. R., & Liu, H. 2018. Exosomes as a Drug Delivery System in Cancer Therapy: Potential and Challenges. *Molecular Pharmaceutics*, 15(9), 3625–3633. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00277>
- Kovacs, R. J., Maldonado, G., Azaro, A., Fernández, M. S., Romero, F. L., Sepulveda-Sánchez, J. M., Corretti, M., Carducci, M., Dolan, M., Gueorguieva, I., Cleverly, A. L., Pillay, N. S., Baselga, J., & Lahn, M. M. 2015. Cardiac Safety of TGF- β Receptor I Kinase Inhibitor LY2157299 Monohydrate in Cancer Patients in a First-in-Human Dose Study. *Cardiovascular Toxicology*, 15(4), 309–323. <https://doi.org/10.1007/s12012-014-9297-4>
- Kubiczkova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., & Sevcikova, S. 2012. TGF- β -an excellent servant but a bad master. *Journal of translational medicine*, 10, 183. <http://www.translational-medicine.com/content/10/1/183>
- Lan, B., Zeng, S., Grützmann, R., & Pilarsky, C. 2019. The role of exosomes in pancreatic cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184332>
- Li, J., Chen, X., Yi, J., Liu, Y., Li, D., Wang, J., Hou, D., Jiang, X., Zhang, J., Wang, J., Zen, K., Yang, F., Zhang, C. Y., & Zhang, Y. 2016. Identification and characterization of 293t cell-derived exosomes by profiling the protein, mRNA and microrna components. *PLoS ONE*, 11(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163043>
- López-Casillas, F., Cheifetz, S., Doody, J., Andres, J. L., Lane, W. S., & Massague, J. 1991. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. *Cell*, 67(4), 785–795. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90073-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90073-8)
- López-Casillas, F., Payne, H. M., Andres, J. L., & Massagué, J. 1994. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF- β access to signaling receptors: Mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *Journal of Cell Biology*, 124(4), 557–568. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.4.557>
- Lopez-Casillas, F., Wrana, J. L., & Massague, J. 1993. Betaglycan Presents Ligand to the TGFP Signaling Receptor. *Cell*, 73(7), 1435–1444. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90368-z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90368-z)
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. 2018. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology*, 24(43), 4846–4861. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i43.4846>
- Mendoza, V., Vilchis-landeros, M. M., Mendoza-hernández, G., Villarreal, M. M., Hinck, A. P., & López-casillas, F. 2010. Betaglycan has two independent domains required for high affinity TGF- β binding: proteolytic cleavage separates the domains and inactivates the neutralizing activity of the soluble receptor. 48(49), 11755–11765. <https://doi.org/10.1021/bi901528w.Betaglycan>

- Morris, J. C., Tan, A. R., Olencki, T. E., Shapiro, G. I., Dezube, B. J., Reiss, M., Hsu, F. J., Berzofsky, J. A., & Lawrence, D. P. 2014. Phase I study of GC1008 (Fresolimumab): A human anti-transforming growth factor-beta (TGF β) monoclonal antibody in patients with advanced malignant melanoma or renal cell carcinoma. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090353>
- Muraoka, R. S., Dumont, N., Ritter, C. A., Dugger, T. C., Brantley, D. M., Chen, J., Easterly, E., Roebuck, L. R., Ryan, S., Gotwals, P. J., Koteliansky, V., & Arteaga, C. L. 2002. Blockade of TGF- β inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *Journal of Clinical Investigation*, 109(12), 1551–1559. <https://doi.org/10.1172/jci15234>
- National Cancer Institute. 2021. What Is Cancer?. Consultado el 5 de abril de 2021, de: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#:~:text=Pittsburgh%20Cancer%20Institute-,The%20Definition%20of%20Cancer,up%20of%20trillions%20of%20cells.>
- Peinado, H., Aleckovic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., García, B. A., Callagan, M. K., Yuan, J., Martins, V. R., Skog, J., Kaplan, R. N., Brady, M. S., ... Lyden, D. 2013. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells. *Nature Medicine*, 18(6), 883–891. <https://doi.org/10.1038/nm.2753.Melanoma>
- Peinado, H., Zhang, H., Matei, I. R., Costa-Silva, B., Hoshino, A., Rodrigues, G., Psaila, B., Kaplan, R. N., Bromberg, J. F., Kang, Y., Bissell, M. J., Cox, T. R., Giaccia, A. J., Eler, J. T., Hiratsuka, S., Ghajar, C. M., & Lyden, D. 2017. Pre-metastatic niches: Organ-specific homes for metastases. *Nature Reviews Cancer* (Vol. 17, Issue 5, pp. 302–317). <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.6>
- Prieto M., Rivas J.V., López Novoa J. M. y Pérez-Barriocanal F. 2002. El TGF- β , síntesis y mecanismo de acción. *Nefrología*, Volumen 22(2).
- Principe, D. R., DeCant, B., Mascariñas, E., Wayne, E. A., Diaz, A. M., Akagi, N., Hwang, R., Pasche, B., Dawson, D. W., Fang, D., Bentrem, D. J., Munshi, H. G., Jung, B., & Grippo, P. J. 2016. TGF β signaling in the pancreatic tumor microenvironment promotes fibrosis and immune evasion to facilitate tumorigenesis. *Cancer Research*, 76(9), 2525–2539. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1293>
- Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. 2019. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology*, 10(1), 10–27. <https://doi.org/10.14740/wjon1166>
- Recillas-Targa, F. 2006. Mammalian Gene Transfer and Expression 337 *Molecular Biotechnology Abstract Multiple Strategies for Gene Transfer, Expression, Knockdown, and Chromatin Influence in Mammalian Cell Lines and Transgenic Animals. Molecular Biotechnology*, 34(3), 337–354. <https://doi.org/10.1385/MB:34:3:337>
- Richards, K. E., Zeleniak, A. E., Fishel, M. L., Wu, J., Littlepage, L. E., & Hill, R. 2017. Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells. *Oncogene*, 36(13), 1770–1778. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.353>

- Robertson, I. B., & Rifkin, D. B. 2016. Regulation of the bioavailability of TGF- β and TGF- β -related proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021907>
- 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), 1496–1501. <https://doi.org/10.1126/science.1157535>
- Schlingensiepen, K. H., Jaschinski, F., Lang, S. A., Moser, C., Geissler, E. K., Schlitt, H. J., Kielmanowicz, M., & Schneider, A. 2011. Transforming growth factor-beta 2 gene silencing with trabedersen (AP 12009) in pancreatic cancer. *Cancer Science*, 102(6), 1193–1200. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01917.x>
- Shen, W., Tao, G. Q., Zhang, Y., Cai, B., Sun, J., & Tian, Z. Q. 2017. TGF- β in pancreatic cancer initiation and progression: two sides of the same coin. *Cell & bioscience*, 7, 39. <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0168-0>
- Thompson, J. E., Vaughan, T. J., Williams, A. J., Wilton, J., Johnson, K. S., Bacon, L., Green, J. A., Field, R., Ruddock, S., Martins, M., Pope, A. R., Tempest, P. R., & Jackson, R. H. 1999. A fully human antibody neutralising biologically active human TGF β 2 for use in therapy. *Journal of Immunological Methods* (Vol. 227). www.elsevier.nl/locate/jim
- Tolcher, A. W., Berlin, J. D., Cosaert, J., Kauh, J., Chan, E., Piha-Paul, S. A., Amaya, A., Tang, S., Driscoll, K., Kimbung, R., Kambhampati, S. R. P., Gueorguieva, I., & Hong, D. S. 2017. A phase 1 study of anti-TGF β receptor type-II monoclonal antibody LY3022859 in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 79(4), 673–680. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3245-5>
- Vilchis-Landeros, M. M., Montiel, J. L., Mendoza, V. N., Mendoza-Hernández, López-Casillas, F. 2001. Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor- β neutralizing agent. *The Biochemical Journal*. J, 355(Pt 1), 215–222. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3550215>
- Wang, X., Luo, G., Zhang, K., Cao, J., Huang, C., Jiang, T., Liu, B., Su, L., & Qiu, Z. 2018. Hypoxic tumor-derived exosomal miR-301a mediates M2 macrophage polarization via PTEN/PI3K to promote pancreatic cancer metastasis. *Cancer Research*, 78(16), 4586–4598. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3841>
- Wang, Y. W., Liou, N. H., Cherng, J. H., Chang, S. J., Ma, K. H., Fu, E., Liu, J. C., & Dai, N. T. 2014. siRNA-targeting transforming growth factor- β type I receptor reduces wound scarring and extracellular matrix deposition of scar tissue. *The Journal of Investigative Dermatology*, 134(7), 2016–2025. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.84>
- Wiater, E., Lewis, K. A., Donaldson, C., Vaughan, J., Bilezikjian, L., & Vale, W. 2009. Endogenous betaglycan is essential for high-potency inhibin antagonism in gonadotropes. *Molecular Endocrinology*, 23(7), 1033–1042. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0021>
- Wu, D. M., Wen, X., Han, X. R., Wang, S., Wang, Y. J., Shen, M., Fan, S. H., Zhang, Z. F., Shan, Q., Li, M. Q., Hu, B., Lu, J., Chen, G. Q., & Zheng, Y. L. 2019. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived

Exosomal MicroRNA-126-3p Inhibits Pancreatic Cancer Development by Targeting ADAM9. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 16(June), 229–245. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.022>

Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. 2019. Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell and Bioscience*, 9(19). <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>

Zúñiga, R. A., Gutiérrez-González, M., Collazo, N., Sotelo, P. H., Ribeiro, C. H., Altamirano, C., Lorenzo, C., Aguilón, J. C., & Molina, M. C. 2019. Development of a new promoter to avoid the silencing of genes in the production of recombinant antibodies in chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Engineering*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0187-y>

Anexos

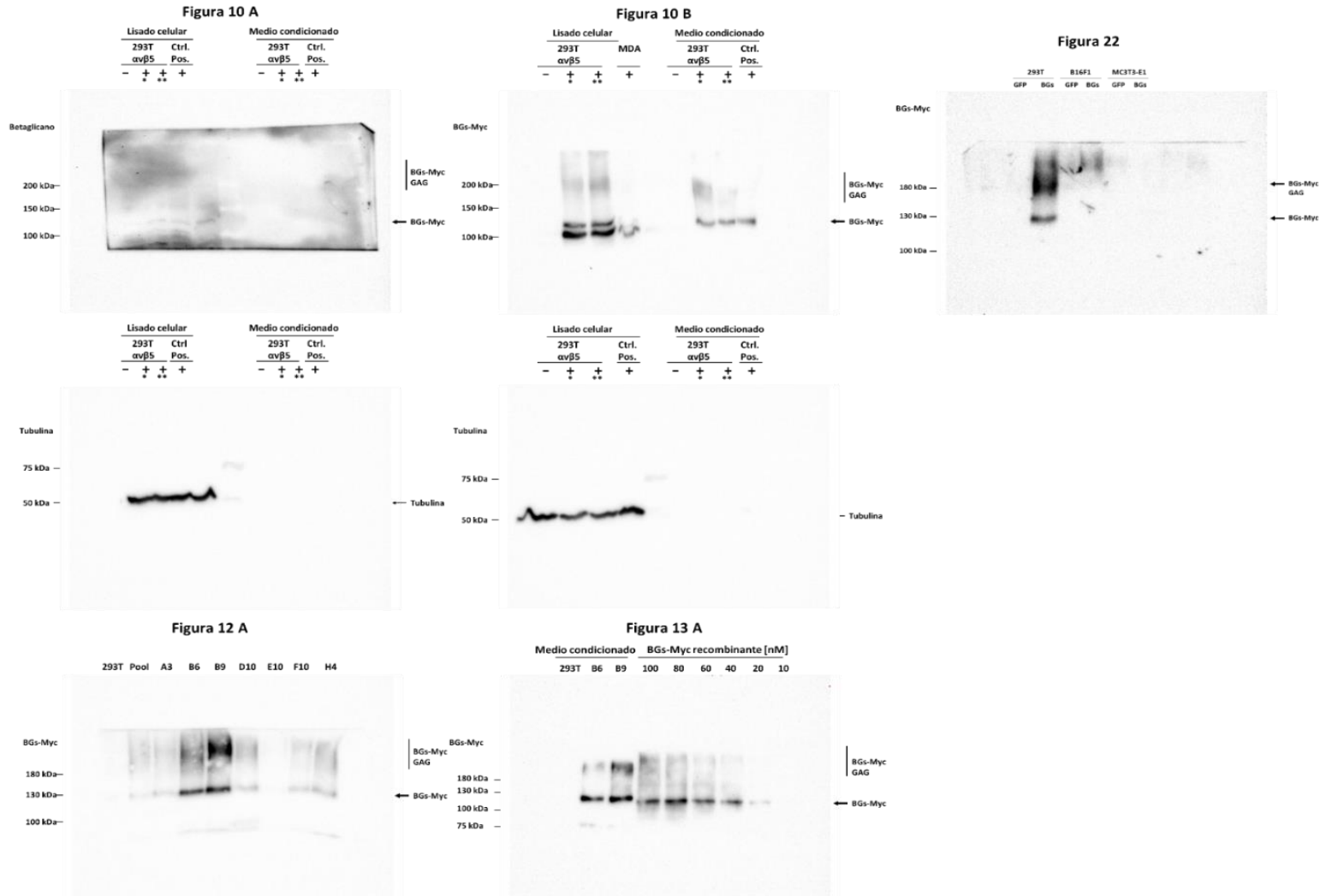


Figura 23.- Membranas sin cortar de Western-blot correspondientes a Figuras 10A, 10B, 12A, 13A, y 22.

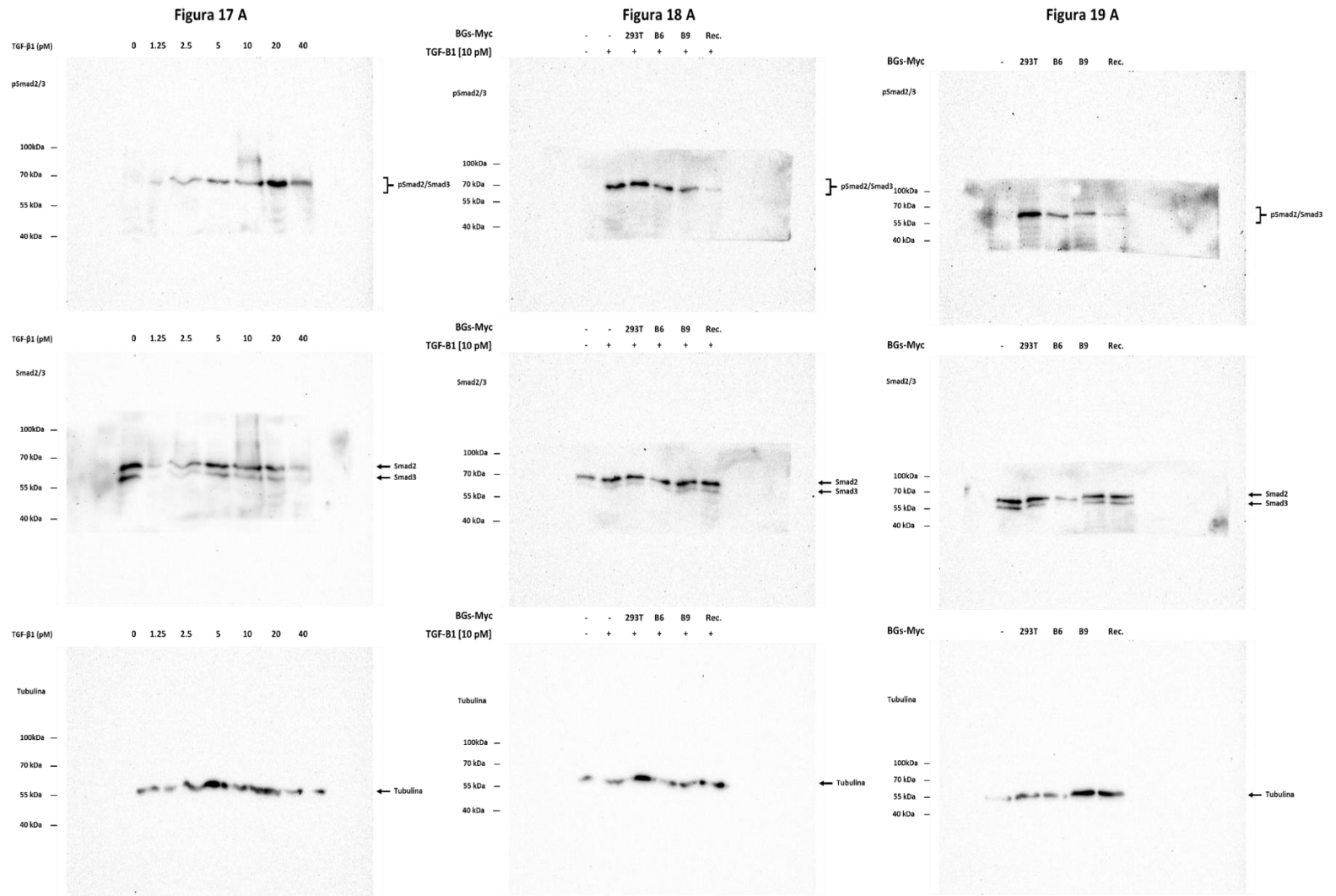


Figura 24.- Membranas sin cortar de Western-blot correspondientes a Figuras 17A, 18A y 19A.