

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

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



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

**Neutralización del TGF- β con betaglicano soluble mediante
exosomas en un modelo de nicho pre-metastásico hepático**

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

Presenta:

Erendira Guadalupe Olvera Felix

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Erendira Guadalupe Olvera Felix

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Director de tesis

Dra. Patricia Juárez Camacho

Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez



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

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Erendira Guadalupe Olvera Felix** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología

Neutralización del TGF- β con betaglicano soluble mediante exosomas en un modelo de nicho pre-metastásico hepático

Resumen aprobado por:

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Director de tesis

Los pacientes con cáncer mueren principalmente por metástasis, siendo el hígado un sitio común. La colonización, etapa limitante de la metástasis, es favorecida por un nicho pre-metastásico (NPM) inducido por el tumor primario. En el hígado, el NPM se caracteriza por ser un ambiente fibrótico, promovido por el TGF- β o factor de crecimiento transformante- β , una citocina esencial para el desarrollo del cáncer. Para neutralizar al TGF- β , se planteó utilizar como vehículos exosomas cargados con ARNm de betaglicano soluble (sBG), un inhibidor del TGF- β . Usamos transducción lentiviral de células 293T para producir sBG con o sin secuencias de “códigos postales” en 3’UTR y aumentar la transferencia del ARNm a exosomas. Se comprobó la expresión de los ARNm por RT-qPCR y la producción/secreción de la proteína por Western blot. Aislamos exosomas y ectosomas y detectamos sBG, pero a niveles bajos comparado con las células. Los códigos postales no mejoraron la transferencia del ARNm a los exosomas, pero sí a los ectosomas. Como modelo de NPM-hepático utilizamos macrófagos RAW-264.7 que producen TGF- β . Confirmamos por Western blot que su medio condicionado induce la fosforilación de SMAD2/3 en células hepáticas HepG2. Cultivamos RAW-264.7 con vesículas extracelulares fluorescentes y se confirmó su internalización en >95% de las células. Las vesículas extracelulares entregaron el ARNm de sBG en las células RAW-264.7 y se detectó la proteína en su medio condicionado, pero en bajas cantidades. Este medio condicionado neutralizó la vía de señalización del TGF- β en células HepG2, sin embargo, el efecto neutralizante se detectó solo en una condición, la cual tuvo la mayor transferencia de ARNm de sBG de los exosomas a las células RAW-264.7. En conclusión, logramos modificar células 293T para obtener exosomas con el ARNm de sBG, que inducen la producción de sBG y neutralizan al TGF- β en un modelo de NPM. Sin embargo, se necesita aumentar la cantidad de ARNm en los exosomas para potenciar su efecto terapéutico.

Palabras clave: exosomas, nicho pre-metastásico, betaglicano soluble, TGF- β

Abstract of the thesis presented by **Erendira Guadalupe Olvera Felix** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology

Neutralization of TGF- β with soluble betaglycan through exosomes in a hepatic pre-metastatic niche model

Abstract approved by:

Pierrick Gerard Jean Fournier, Ph D.
Thesis director

Metastases are responsible for most of the cancer-associated deaths and the liver is a common site of metastasis. During the development of metastasis, the colonization of the new organ is the limiting step and is favored by a pre-metastatic niche (PMN) induced by the primary tumor. The PMN in the liver is a fibrotic environment that is promoted by TGF- β or transforming growth factor- β that is essential to the development of cancer. To neutralize TGF- β , we proposed to use exosomes as vehicles loaded with soluble betaglycan (sBG), an inhibitor of TGF- β . We used lentiviral transduction of 293T cells to produce sBG with or without “Zip codes” sequences in 3’UTR that could increase the transfer of mRNA to exosomes. The expression of mRNA was confirmed by RT-qPCR and protein production/secretion by Western blot. We isolated exosomes and ectosomes and detected sBG, but at low levels compared to cells. Zip codes did not enhance mRNA transfer to exosomes, but did to ectosomes. To simulate the hepatic-PMN, we used RAW-264.7 macrophages that produce TGF- β . We confirmed by Western blot that their conditioned media induced SMAD2/3 phosphorylation in HepG2 liver cells. We cultured then RAW-264.7 with fluorescent extracellular vesicles and confirmed their internalization in >95% of the cells. Extracellular vesicles delivered sBG mRNA into RAW-264.7 cells and sBG was detected in their conditioned medium, but in low amounts. This conditioned medium neutralized the TGF- β signaling pathway in HepG2 cells, however, the neutralizing effect was detected only in one condition, which had the highest transfer of sBG mRNA from exosomes to RAW-264.7 cells. In conclusion, we were able to modify 293T cells to obtain exosomes with sBG mRNA, which induce sBG production and neutralized TGF- β in a PMN model. Nevertheless, it is necessary to increase the amount of mRNA in exosomes to enhance its therapeutic effect.

Keywords: exosomes, pre-metastatic niche, soluble betaglycan, TGF- β

Dedicatoria

A mis ancestros, mis guías que me ayudan a crecer y caminan conmigo
en esta experiencia llamada vida.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la realización del posgrado, con número de registro 932653. Al igual que por el apoyo del proyecto CONACYT-SEP A1-S-15911 de Investigación en Ciencia Básica.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), al Posgrado en Ciencias de la Vida y al Departamento de Innovación Biomédica, por darme la oportunidad de formar parte de esta comunidad y brindarme sus instalaciones para realizar la maestría.

A mi director, el Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier por aceptarme en su grupo de investigación, por estar presente y guiarme durante cada etapa de la maestría, por su disposición para recibirme cada que tocaba su puerta, por compartir su conocimiento con paciencia y dedicación, y sobre todo por creer en mí, muchas gracias.

A mis sinodales, la Dra. Patricia Juárez Camacho y el Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez por sus preguntas y sugerencias que enriquecieron este proyecto, pero sobre todo mi formación.

Al Dr. Octavio Galindo Hernández de la Facultad de Medicina de UABC Mexicali, por abrirme las puertas de su laboratorio, compartir su conocimiento en exosomas y por el uso de la ultracentrífuga, con el número de proyecto 300015 apoyado por CONACYT (Apoyos para Adquisición y Mantenimiento de Infraestructura en Instituciones y Laboratorios de Investigación Especializada 2019 del CONACYT).

Al Dr. Rubén Darío Cadena Nava por sus aportaciones en aislamiento de exosomas y disposición en el uso de la ultracentrífuga.

A la Dra. Edna Sánchez Castrejón por su apoyo en el uso del fotodocumentador.

Al personal del DIB, a la Dra. Johanna Bernáldez Sarabia por enseñarme a amar cultivo celular, a Adriana Mejía por estar al pendiente de los estudiantes y facilitarnos los trámites administrativos, y a Epifanio por siempre recibirme con una sonrisa.

A Paloma Acosta por ser mi gran equipo exosomas, por compartir sus experiencias científicas y no científicas y por las bonitas pláticas en carretera. A Oscar Colunga por introducirme al mundo del Western blot y por hacer más amenos los días largos con risas. A Monserrat Rentería por ser mi

compañera de jornadas largas y por el apoyo técnico en el laboratorio. A Claudia Alcira por ser mi compañera de cafés, waffles y avances, y por brindarme su apoyo. A Jorge Hernández que más que compañero de generación se volvió un gran amigo, gracias por escucharme, por tu sincera amistad y por enseñarme la bella Ensenada.

A todos los integrantes del P&P con los que tuve el gusto de coincidir y que de alguna forma hicieron más enriquecedores mis días: Brenda, Paloma Almeida, Sharlin, Eduardo, Ana, Oyuki, Tonatzin y Selene.

A Mili Jiménez, mi roommate, amiga y compañera de danza. Gracias por motivarme en los días de estrés, por las pláticas existenciales, por compartir cafés y elotes conmigo, por compartir tu danza y tu arte, por venir en combo con una humanita de cuatro patas y una cola que alegraba mis días, por ser una gran amiga y navegar conmigo la travesía ensenadense.

A mis amigos dancísticos y de la vida: Mariana Sandoval, Erkah, Sebastián Beltrán, Belén Delgado, Mónica Adame, Fernanda Sabori, Fernando Avelar, Nikol Guzmán, Georgea Ruíz, Stefhany Jiménez, Israel Carbajal y Vielka Ibarra. Gracias por su apoyo, sus palabras, su luz, las risas, los llantos, los viajes y cada momento que nos ha hecho crecer, son un gran pilar.

Y a mi mamá y a mi hermana, por creer en mí y apoyarme, por motivarme a ser mejor y ser mi fortaleza.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	xi
Lista de tablas.....	xiii
 Capítulo 1. Introducción.....	 1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Cáncer y metástasis al hígado	2
1.1.2 Nicho pre-metastásico	3
1.1.3 Exosomas.....	4
1.1.4 TGF- β	6
1.1.4.1 Vía de señalización del TGF- β	6
1.1.4.2 TGF- β en cáncer	8
1.1.4.3 Tratamientos anti-TGF- β	8
1.2 Justificación.....	10
1.3 Hipótesis.....	10
1.4 Objetivos	10
1.4.1 Objetivo general	10
1.4.2 Objetivos específicos.....	10
 Capítulo 2. Metodología.....	 12
2.1 Cultivo celular	12

2.2 Optimización de un modelo de activación de la vía de señalización de TGF- β por macrófagos en células hepáticas.....	12
2.2.1 Inducción de la expresión de TGF- β en células RAW 264.7	12
2.2.2 Caracterización de la activación de la vía de señalización del TGF- β en células Hep G2.....	13
2.3 Determinación de genes reporteros de la vía de señalización del TGF- β en células Hep G2	13
2.4 Obtención de plásmidos	14
2.5 Generación de células 293T con sobreexpresión de sBG	14
2.5.1 Sensibilidad de las células 293T a la puromicina.....	14
2.5.2 Transducción lentiviral de células 293T	15
2.5.3 Selección con puromicina de células 293T transducidas	15
2.6 Citometría de flujo	16
2.7 Aislamiento de exosomas	16
2.7.1 Determinación de la cantidad de células 293T a sembrar por cm ²	16
2.7.2 Preparación de medios condicionados con exosomas.....	16
2.7.3 Aislamiento de exosomas por precipitación con polietilenglicol	17
2.7.4 Aislamiento de exosomas por ultracentrifugación	17
2.8 Caracterización de exosomas.....	18
2.9 Marcaje fluorescente de vesículas extracelulares	18
2.10 Ensayos de internalización de vesículas extracelulares	19
2.11 Evaluación de la capacidad de los exosomas para entregar al ARNm de sBG a células RAW 264.7 e inducir la producción de sBG	19
2.12 Evaluación de la neutralización de la vía de señalización del TGF- β en células Hep G2, inducida por los exosomas con ARNm de sBG.....	20
2.13 Cuantificación de proteína por Micro BCA	20
2.14 Western blot	20
2.15 Cuantificación de ARNm por RT-qPCR	22
2.15.1 Extracción de ARN total.....	22
2.15.2 PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR).....	22

2.16 Análisis estadístico	23
Capítulo 3. Resultados	24
3.1 Optimización de un modelo de activación de la vía de señalización del TGF- β por macrófagos en células hepáticas	24
3.1.1 Las células RAW 264.7 producen suficiente TGF- β que activa su vía de señalización en células Hep G2.....	24
3.1.2 Genes reporteros de la vía de señalización del TGF- β en células Hep G2	26
3.2 Estandarización del método de aislamiento de exosomas.....	28
3.2.1 Determinación de la cantidad de células 293T a sembrar	28
3.2.2 Comparación de métodos de aislamiento de exosomas	28
3.2.3 Comparación de rotores para aislamiento de exosomas por ultracentrifugación	31
3.2.4 Determinación de la morfología y el tamaño de los exosomas	32
3.2.5 Comparación de fluoróforos para tinción de exosomas	33
3.3 Generación y caracterización de células 293T que sobreexpresen el sBG	33
3.3.1 Sensibilidad de las células 293T a la puromicina.....	33
3.3.2 Modificación de células 293T para sobreexpresión de betaglicano soluble.....	36
3.3.3 Las células 293T transducidas expresan el ARNm de sBG-Myc	36
3.3.4 Las células 293T transducidas producen y secretan la proteína sBG-Myc.....	38
3.3.5 Las células 293T-sBG-Zip1 expresan de manera estable el sBG-Myc.....	39
3.4 Caracterización de la presencia del ARNm de sBG en los exosomas de las células 293T-sBG	40
3.4.1 Los códigos postales no aumentan la transferencia del ARNm <i>de sBG-Myc</i> a exosomas	40
3.5 Evaluación de la capacidad de los exosomas para entregar al ARNm de sBG a células RAW 264.7 e inducir la producción de sBG.	43
3.5.1 Medición de la internalización de exosomas por las células RAW 264.7.....	43
3.5.2 Los exosomas y ectosomas entregan al ARNm de sBG a las células RAW 264.7 e inducen la producción de sBG	43

3.6 Evaluación de la neutralización de la vía de señalización del TGF- β en células Hep G2, inducida por los exosomas con ARNm de sBG.....	46
Capítulo 4. Discusión.....	47
Capítulo 5. Conclusiones	51
Literatura citada	52
Anexos.....	58

Lista de figuras

Figura	Página
1. Formación, secreción y captación de exosomas.	5
2. Activación del TGF- β latente.....	6
3. Vía de señalización del TGF- β	7
4. Las células RAW 264.7 producen TGF- β que activa su vía de señalización en células Hep G2	25
5. Las células RAW 264.7 producen TGF- β en su forma activa.....	26
6. Expresión del ARNm de <i>FN1</i> y <i>CDH2</i> en células Hep G2.....	27
7. Densidad celular de 293T-sBG	29
8. Efecto de diferentes métodos en el aislamiento de exosomas.....	30
9. Los métodos de ultracentrifugación y precipitación con polietilenglicol permiten aislar exosomas	31
10. Los exosomas aislados por ultracentrifugación no se ven afectados por el tipo de rotor	31
11. Morfología y tamaño de exosomas provenientes de células 293T-sBG-Zip1	32
12. Efecto de diferentes fluoróforos en la tinción de exosomas.....	34
13. Evaluación de la sobrevivencia de células 293T tratadas con puromicina.....	35
14. Efecto de la puromicina en la morfología de células 293T en cultivo	35
15. Generación y selección de células 293T transducidas.....	37
16. Expresión del ARNm de sBG-Myc en células 293T-sBG	38
17. sBG-Myc es producido y secretado por células 293T-sBG	39
18. sBG-Myc es producido de forma estable por las células 293T-sBG-Zip1	40
19. Determinación de la producción de ectosomas y exosomas por células 293T-sBG	41
20. Niveles de los ARNm de sBG-Myc en células, ectosomas y exosomas 293T-sBG	42
21. Las células RAW 264.7 internalizan exosomas y ectosomas	44
22. Los exosomas entregan el ARNm de sBG a células RAW 264.7 e inducen la producción de sBG ..	45
23. Efecto del medio condicionado de las RAW 264.7 tratadas con exosomas o ectosomas sBG-Zip1 en la activación de la vía del TGF- β en Hep G2.....	46

24. Membranas de Western blot sin cortar correspondientes a las figuras 4A, 4C y 5A.....	58
25. Membranas de Western blot sin cortar correspondientes a las figuras 6A, 9 y 10	59
26. Membranas de Western blot sin cortar correspondientes a las figuras 17A, 18A y 19A.....	60
27. Membranas de Western blot sin cortar correspondientes a las figuras 19B, 22C y 23A	61

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Características de anticuerpos utilizados en Western blot.	21
2. Oligonucleótidos para qPCR.	23
3. Comparación del tiempo de centrifugación y concentración de proteína de exosomas con diferentes rotores.	32

Capítulo 1. Introducción

El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo, por lo que es considerado un problema de salud pública a nivel mundial (OMS, 2022). Los pacientes con cáncer mueren principalmente por metástasis, es decir, que el cáncer se ha diseminado a otros órganos distantes al tumor primario. El hígado es un sitio común de metástasis para varios tipos de cáncer entre ellos: el cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de mamá, melanoma, de pulmón, entre otros (Tsilimigras et al., 2021).

La metástasis se desarrolla mediante varios procesos conocidos como cascada metastásica, en donde la colonización, que es el último proceso de la cascada metastásica, es considerada como el cuello de botella, ya que solo el 0.02% de las células que llegan al nuevo tejido logran hacer metástasis (Luzzi et al., 1998). Para que las células tumorales puedan colonizar un nuevo tejido necesitan sobrevivir al nuevo ambiente, ya sea mediante características intrínsecas de las células tumorales o por el establecimiento de un nicho pre-metastásico inducido por el tumor primario a distancia (Liu y Cao, 2016).

Las células del tumor primario secretan factores como proteínas y vesículas celulares como exosomas, para inducir la formación de un nicho pre-metastásico en el futuro sitio de metástasis antes de la llegada de las células tumorales (Charan et al., 2020; Ji et al., 2020). En la metástasis, los exosomas secretados por el tumor primario propician un ambiente favorable para el establecimiento de las células tumorales. La formación del nicho pre-metastásico en el hígado inicia mediante la activación de las células de Kupffer por los exosomas (Costa-Silva et al., 2015). Las células de Kupffer activadas liberan el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), que activa a las células estrelladas hepáticas para generar un ambiente fibrótico, en donde se pueden adherir células derivadas de la médula ósea y así inducir un ambiente inflamatorio. Tanto el ambiente fibrótico, como el ambiente inflamatorio, favorecen la colonización de las células tumorales (Costa-Silva et al., 2015).

Al ser un regulador del paso inicial en la formación del nicho pre-metastásico hepático, el TGF- β es un blanco terapéutico. Además de inducir la formación del nicho pre-metastásico hepático, el TGF- β participa en diversas funciones fisiológicas, por lo que es importante neutralizarlo de forma localizada en el sitio de interés. Para esto se puede aprovechar el mecanismo de las células tumorales y utilizar como vehículos a exosomas que contengan el ARNm de betaglicano soluble, un inhibidor del TGF- β , para reducir la formación del nicho pre-metastásico hepático y por ende la metástasis al hígado.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Cáncer y metástasis al hígado

El cáncer es un grupo de enfermedades en donde las células crecen sin control, y adquieren la capacidad de invadir otros tejidos diferentes al sitio de origen. Es considerado un problema de salud pública a nivel mundial, con 11.4 millones de muertes estimadas para 2025, de las cuales 105,000 corresponden a México (Ferlay et al., 2020).

La principal causa de muerte en el cáncer es la metástasis, proceso que se caracteriza por la diseminación de células cancerosas desde un tumor primario a otras partes del cuerpo. Entre los diferentes sitios de metástasis, el hígado se encuentra entre los tres más comunes junto con los pulmones y los huesos (Riihimäki et al., 2018). Los tipos de cáncer que hacen metástasis al hígado son: el cáncer colorrectal, el cáncer pancreático, el cáncer de mama, el melanoma, el cáncer de pulmón, entre otros. Al ser un órgano con mucha irrigación sanguínea por la vena porta y la arteria hepática, el hígado es un sitio rico en nutrientes para las células cancerosas. Los pacientes con metástasis al hígado tienen una baja tasa de supervivencia a 5 años, la mayor siendo de 20-50% en caso del cáncer colorrectal, mientras que pacientes con cáncer pancreático tienen la menor supervivencia con una media de 6 meses (Tsilimigras et al., 2021).

Para que se pueda llevar a cabo la metástasis, las células tumorales pasan por varios procesos denominados cascada metastásica. La cascada metastásica incluye: el desprendimiento de las células tumorales del tumor primario, la invasión del tejido circundante, la entrada a los vasos sanguíneos o linfáticos (intravasación), el transporte hacia otros sitios distantes del tumor primario, la salida de los vasos sanguíneos (extravasación) hacia un nuevo tejido y la colonización (Steeg, 2006). De todos estos, la colonización es la etapa limitante de la cascada metastásica. En un estudio realizado en ratones se investigó la eficiencia metastásica mediante el uso de células de melanoma y la evaluación de su capacidad de hacer metástasis al hígado (Luzzi et al., 1998). Las células de melanoma se marcaron con nanoesferas fluorescentes y se inyectaron en la vena mesentérica ascendente con dirección al hígado. De las células inyectadas, más del 80% logró salir de la circulación hacia el hígado, sin embargo, solo el 2% de las células proliferaron para formar micrometástasis (4 a 16 células), y únicamente el 0.02% formó un tumor (Luzzi et al., 1998). La colonización se considera exitosa únicamente si las células tumorales logran sobrevivir en un nuevo tejido y formar un nuevo tumor. La supervivencia depende de las características intrínsecas de las células y de que exista un ambiente favorable para estas células en el tejido a colonizar. Este ambiente

favorable se crea por la combinación entre las características propias del tejido y del establecimiento de un nicho pre-metastásico.

1.1.2 Nicho pre-metastásico

El nicho pre-metastásico es un ambiente favorable creado mediante modificaciones celulares y moleculares, que son inducidas por el tumor primario a distancia en el futuro sitio de metástasis, antes de la llegada de las células cancerosas (Liu y Cao, 2016). El nicho pre-metastásico beneficia a las células tumorales para que puedan establecerse y crecer en tejidos diferentes del tumor primario.

Un estudio en modelos de melanoma y carcinoma pulmonar de Lewis reveló que el tumor primario activa células hematopoyéticas en la médula ósea. Estas células expresan el receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1) y el receptor VLA-4 de unión a fibronectina (Kaplan et al., 2005). Posteriormente estas células se dirigen a futuros sitios de metástasis como el hígado y los pulmones, y se adhieren a depósitos de fibronectina antes de la llegada de las células cancerosas. Las células hematopoyéticas con VEGFR1 secretan factores solubles que son quimioatrayentes para las células cancerosas. Tanto los depósitos de fibronectina como las células con VEGFR1 son parte del nicho pre-metastásico que favorece el desarrollo de la metástasis (Kaplan et al., 2005). En otro estudio en un modelo de osteosarcoma en ratones, se observó que la metástasis a los pulmones es favorecida por un nicho pre-metastásico rico en neutrófilos (Charan et al., 2020). El tumor primario secreta la proteína similar a la angiopoyetina 2 (ANGPTL2) que se une a la integrina $\alpha 5 \beta 1$ para activar a las células epiteliales alveolares. Estas células activadas secretan quimiocinas que estimulan el reclutamiento de neutrófilos a los pulmones, lo que favorece la colonización de las células cancerosas. Para confirmar que el tumor primario era responsable del reclutamiento de neutrófilos, silenciaron la expresión ANGPTL2 en las células tumorales y observaron una disminución significativa en el número de neutrófilos en los pulmones. Con el fin de demostrar la importancia del nicho pre-metastásico rico en neutrófilos en la formación de la metástasis, inocularon células tumorales en ratones con o sin depleción de neutrófilos y observaron una menor formación de metástasis en los ratones depletados de neutrófilos, lo que indica que el nicho pre-metastásico es importante para el desarrollo la metástasis (Charan et al., 2020).

Entre las modificaciones que se dan en el nicho pre-metastásico hepático se encuentran la remodelación de la matriz extracelular y la formación de un ambiente inflamatorio (Ji et al., 2020). En la formación del nicho pre-metastásico hepático por cáncer colorrectal, las células estrelladas hepáticas (hStC) activadas

liberan citocinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-8, IL-1 β , y otros factores pro-fibróticos como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y la quimiocina CXCL12, lo que genera un ambiente inflamatorio y fibrótico. La activación de las hStC se da por vesículas extracelulares (EVs) que son secretadas por el tumor primario y contienen la proteína similar a la integrina beta 1 (ITGBL1) (Ji et al., 2020). Los factores secretados por los tumores primarios que inducen la formación de nichos pre-metastásicos en órganos distantes, pueden ser de tipo proteína como la ANGPTL2 (Charan et al., 2020) o la lisil-oxidasa (Cox et al., 2015), o tipo EVs como los exosomas (Costa-Silva et al., 2015).

1.1.3 Exosomas

Las células producen EVs, tanto en condiciones fisiológicas normales como en condiciones patológicas, que participan en la comunicación celular. Las EVs se clasifican en tres grupos principales dependiendo de su tamaño y de su mecanismo de formación: los cuerpos apoptóticos, los ectosomas y los exosomas (Kalra et al., 2016). Los cuerpos apoptóticos y los ectosomas se forman directamente de la membrana plasmática y miden entre 100nm a 5 μ M y 100nm a 1 μ M, respectivamente (Mathieu et al., 2019). Los exosomas miden entre 30 a 150 nm de diámetro y se caracterizan por su biogénesis endocítica. La formación comienza con la invaginación de la membrana plasmática y la formación de endosomas tempranos (Figura 1) (Tan et al., 2021). Posteriormente los endosomas tempranos forman vesículas intraluminales (ILVs) que se agrupan en cuerpos multivesiculares. Los cuerpos multivesiculares pueden tomar dos rutas: dirigirse a lisosomas para su degradación o dirigirse a la membrana plasmática para liberar las ILVs al espacio extracelular. Cuando las ILVs se liberan al espacio extracelular se denominan exosomas (Figura 1). Los exosomas contienen biomoléculas presentes en el citosol como proteínas, lípidos, ADN y ARN, que son incorporadas durante la formación de las ILVs (Tan et al., 2021).

La transferencia de ARN a exosomas se puede dar de varias formas: de forma pasiva debido a la abundancia de ARN en el citosol, o de forma activa que incluye: la acción de proteínas de unión a ARN, modificaciones de los ARNm como uridilación o la presencia de secuencias específicas en la región 3' no codificante (3' UTR) de los ARNm (Bolukbasi et al., 2012; O'Brien et al., 2020). Bolukbasi et al. (2012) identificaron que la secuencia de 25nt "ACCCTGCCGCTGGACTCCGCTGT" al estar presente en la región 3' UTR de los ARNm funciona como un código postal que dirige los ARNm a los exosomas.

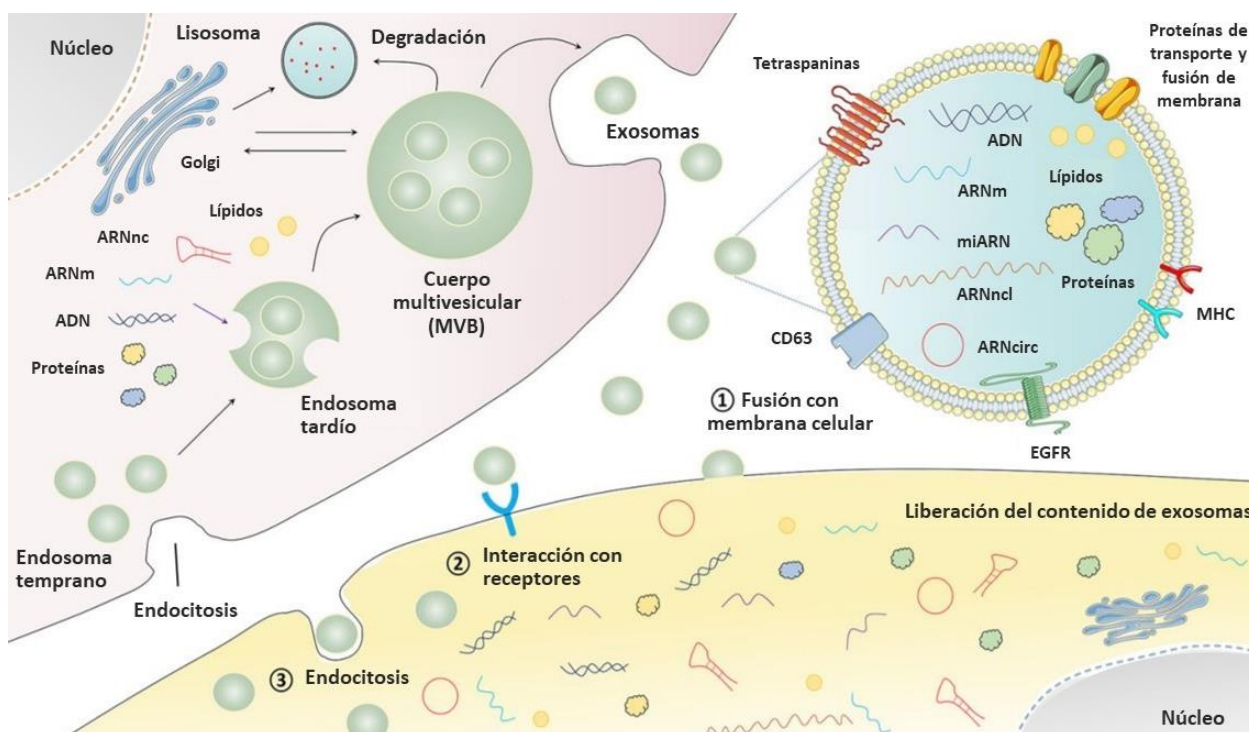


Figura 1. Formación, secreción y captación de exosomas. La biogénesis de exosomas inicia por endocitosis y la formación de ILVs a las que se agregan biomoléculas en el citoplasma. Las ILVs se agrupan en cuerpos multivesiculares que pueden ser degradados en lisosomas o secretados como exosomas. En las células receptoras, los exosomas liberan su contenido mediante fusión con la membrana, interacción con receptores de membrana y endocitosis. Imagen modificada de Tan et al. (2021).

Una vez que los exosomas se liberan de las células de origen inician su recorrido hacia las células receptoras, en donde interactúan con los receptores membranales para activar cascadas de señalización, o ingresan a las células mediante fusión con la membrana o endocitosis para liberar su contenido (Figura 1). El contenido de los exosomas puede generar cambios en las células receptoras. En la metástasis al hígado por cáncer pancreático, los exosomas secretados por el tumor primario que contienen el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) inducen el establecimiento del nicho pre-metastásico (Costa-Silva et al., 2015). Estos exosomas son internalizados por las células de Kupffer (KCs) que en consecuencia liberan TGF- β . El TGF- β activa a las hStC, las cuales en respuesta producen fibronectina. A su vez, los exosomas también inducen el reclutamiento de macrófagos provenientes de la médula ósea, que se adhieren a la fibronectina en el nicho pre-metastásico hepático para promover la metástasis. Al silenciar MIF en las células de cáncer pancreático que liberan los exosomas, hubo una disminución en la producción de TGF- β por las KCs y a su vez disminuyó la metástasis en el hígado en modelo de ratones (Costa-Silva et al., 2015). Debido a la habilidad natural de los exosomas de transferir biomoléculas a las células, estos podrían ser utilizados como vehículos para entrega de fármacos.

1.1.4 TGF- β

1.1.4.1 Vía de señalización del TGF- β

El TGF- β es una citocina que forma parte de la superfamilia TGF- β . La superfamilia TGF- β incluye TGF- β , inhibinas, activinas, factores de crecimiento y diferenciación (GDF), y proteínas morfogénicas del hueso (BMP). Entre las funciones del TGF- β se encuentran: inhibir la proliferación celular, inducir la apoptosis y la diferenciación celular, y promover la remodelación de la matriz extracelular (Xie et al., 2018).

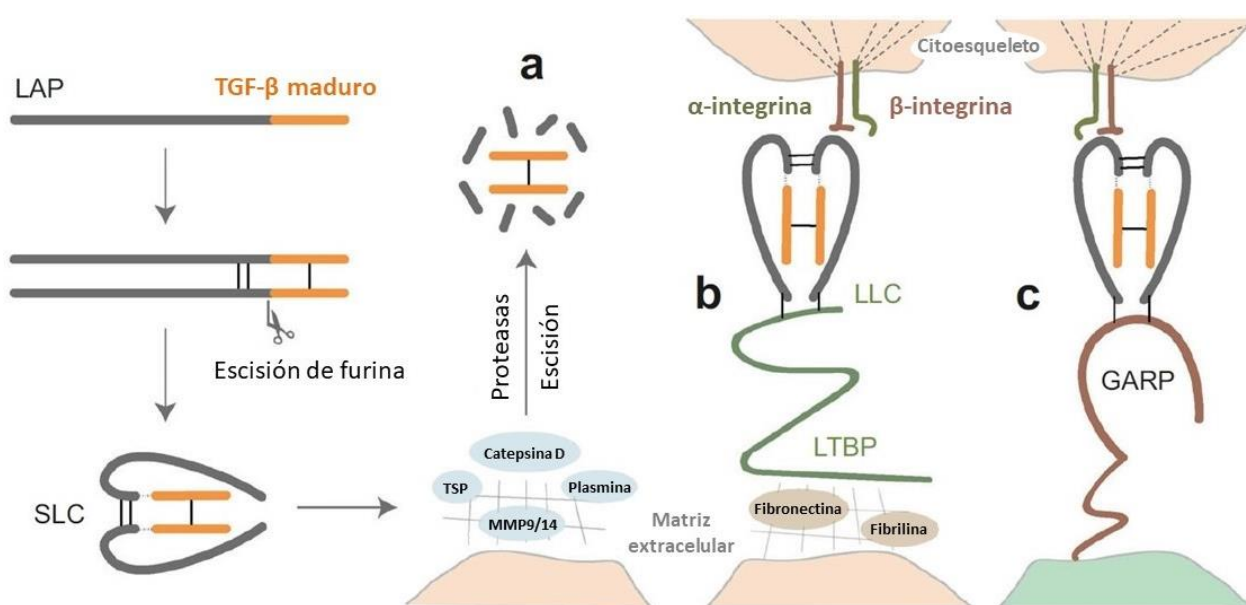


Figura 2. Activación del TGF- β latente. El TGF- β es producido como una proteína precursora que forma un complejo latente pequeño (SLC). El TGF- β se activa mediante 3 vías: por la acción de proteasas (b), por fuerzas de contracción dadas por la interacción con integrinas al encontrarse unido a la matriz extracelular (b) o al estar unido a repeticiones predominantes de Glicoproteína A (GARP) (c). Imagen modificada de S. Liu et al. (2021).

El TGF- β es producido por las células en forma de péptido precursor que contiene dos fragmentos: un péptido asociado a latencia (LAP) y un péptido maduro (TGF- β) (Figura 2). El péptido precursor se ensambla en un homodímero que forma un complejo latente pequeño (SLC, por sus siglas en inglés), en donde los fragmentos LAP rodean al TGF- β . De esta forma el TGF- β no puede activar otras células, por lo que es necesario disociarlo del complejo LAP. En condiciones fisiológicas el TGF- β se puede activar por la acción de proteasas en la matriz extracelular que degradan el LAP, por fuerzas de contracción entre integrinas y el SLC, por especies reactivas de oxígeno (ROS) o por un pH ácido producido por los osteoclastos durante

la resorción ósea (Xu et al., 2018). El TGF- β también puede ser activado *in vitro* con pH extremos, calor o detergentes (Liu et al., 2021).

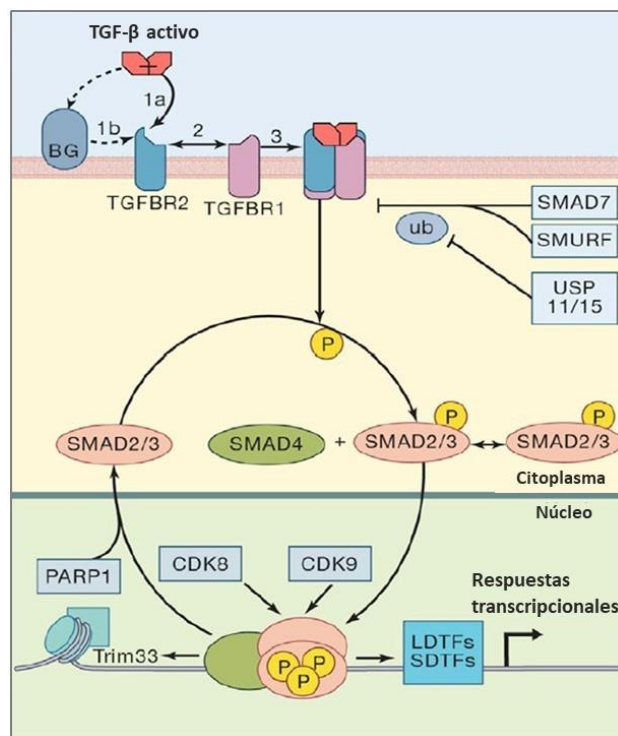


Figura 3. Vía de señalización del TGF- β . El TGF- β extracelular se une al BG en la membrana. El BG presenta al TGF- β al TGFBR2 y este se dimeriza con el TGFBR1 y lo fosforila. En consecuencia, TGFBR1 fosforila a las SMAD2/3 que se unen a SMAD4 y en conjunto se translocan al núcleo para activar la transcripción de los genes diana, entre ellos SMAD7. Imagen modificada de Batlle y Massagué (2019).

Una vez que el TGF- β se encuentra en su forma activa interactúa con sus receptores en la membrana plasmática para encender su vía de señalización (Figura 3). La señalización inicia con la unión de TGF- β al receptor tipo II (TGFBR2) (Derynck y Budi, 2019). Esta unión recluta al receptor tipo I (TGFBR1) que es fosforilado por el TGFBR2 en la región GS. La fosforilación de TGFBR1 libera a la proteína FKBP12 de la región GS y activa su acción cinasa. Por la vía canónica, TGFBR1 actúa sobre las proteínas SMADs reguladas por el receptor (R-SMAD): SMAD2 y SMAD3. TGFBR1 activo fosforila a SMAD2 y SMAD3 que posteriormente forman un complejo con SMAD4 mediadora común (Co-SMAD), y juntas se translocan al núcleo para regular la expresión de sus genes diana. Entre los genes diana de TGF- β se encuentran proteínas que participan en diversas funciones de mantenimiento celular y también SMAD7, que es un inhibidor intracelular de la vía de señalización de TGF- β . SMAD7 inactiva esta vía al reclutar a las proteínas SMURF1 y SMURF2, que marcan con ubiquitina al TGFBR1 para promover su degradación (Derynck y Budi, 2019).

Además de SMAD7 existen otros inhibidores de la vía de señalización de TGF- β . TGF- β tiene un tercer receptor (TGFB3) adicional a TGFBR1 y TGFBR2, pero a diferencia de estos no tiene actividad cinasa, sino que facilita la unión de TGF- β a los receptores tipo I y II (Figura 3). TGFB3, también conocido como betaglicano (BG), se encuentra unido a la membrana plasmática, pero también se puede encontrar en forma soluble cuando es escindido de la membrana por proteasas. La forma soluble del BG (sBG) se une a TGF- β y puede funcionar como un inhibidor extracelular de TGF- β (Gatza et al., 2010).

1.1.4.2 TGF- β en cáncer

El TGF- β participa en el cáncer y su función varía dependiendo de la etapa del cáncer. En estados iniciales puede actuar como supresor de tumores al inducir la apoptosis, mientras que en etapas más avanzadas puede actuar como promotor de tumores, mediar la invasión celular y la metástasis (Huynh et al., 2019). Lin et al. (2018) estudiaron los efectos del TGF- β en células de hepatocarcinoma y observaron que el TGF- β indujo la transición epitelio mesénquima. El marcador de células epiteliales E-cadherina disminuyó en las células tratadas con TGF- β , mientras que los marcadores de células mesenquimales N-cadherina y vimentina aumentaron. La transición epitelio mesénquima es una característica de las células cancerosas que adquieren la capacidad migratoria. El TGF- β también juega un papel importante en la formación del nicho pre-metastásico. Costa-Silva et al. (2015) encontraron que la formación del nicho pre-metastásico en el hígado inicia con la activación de las KCs que producen diversos factores, entre ellos TGF- β . Para evaluar la importancia de TGF- β se utilizó A83-01 para inhibir al TGFBR1 en ratones. Como resultado se redujo la producción de fibronectina y reclutamiento de macrófagos en el hígado de los ratones que se inocularon con exosomas derivados de células de cáncer pancreático. Al reducirse la formación de nicho pre-metastásico también se redujo la formación de metástasis al hígado (Costa-Silva et al., 2015). Por lo tanto, el TGF- β puede ser un blanco terapéutico contra el nicho pre-metastásico hepático.

1.1.4.3 Tratamientos anti-TGF- β

Debido a la importancia del TGF- β en el cáncer se han desarrollado diferentes tratamientos anti-TGF- β . Entre ellos se encuentran: oligonucleótidos antisentido, anti-integrinas, inhibidores de cinasas y trampas de ligando (Teixeira et al., 2020). Los oligonucleótidos antisentido se unen al ARNm de TGF- β e inhiben su traducción. Los tratamientos anti-integrinas bloquean la activación de TGF- β mediada por integrinas (Stupp et al., 2014). Los inhibidores de cinasas bloquean la unión de ATP a los receptores de TGF- β y por

tanto se reduce la activación de la vía de señalización río abajo de los receptores. En cuanto a los tratamientos con trampas de ligando, inhiben al TGF- β o a sus receptores mediante el uso de anticuerpos neutralizantes, receptores fusionados con fragmentos de inmunoglobulina (TGFB2:Fc) o receptores solubles de TGF- β como sBG (Teixeira et al., 2020). El potencial terapéutico del sBG se ha estudiado en modelos *in vivo* de cáncer y ha mostrado resultados favorables. En un estudio en modelos con xenoinjertos de cáncer de próstata, el tratamiento con sBG recombinante inhibió el crecimiento de tumores debido a una disminución de la angiogénesis. Al disminuir la fuente de nutrientes y oxígeno a las células tumorales aumentó la apoptosis en estas células (Bandyopadhyay et al., 2005). En otro estudio, Bandyopadhyay et al. (2002) inyectaron sBG recombinante en ratones desnudos portadores de xenoinjertos de cáncer de mama humano y observaron un efecto similar. Hubo una reducción en el crecimiento de los tumores debido a una disminución en la formación de vasos sanguíneos, y además se redujo la formación de metástasis a los pulmones. A pesar de los buenos resultados en modelos preclínicos no se han realizado estudios clínicos utilizando el sBG como terapia contra el TGF- β . Entre los tratamiento anti-TGF- β con estudios clínicos se encuentran el Cilengitide y el Fresolimumab. El Cilengitide es una molécula que bloquea la activación del TGF- β mediada por integrinas al inhibir la acción de las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$. En los ensayos clínicos realizados se probó el Cilengitide solo o en combinación con quimioterapia en pacientes con glioblastoma, sin embargo, no mejoró la supervivencia libre de progresión ni supervivencia promedio (Stupp et al., 2014). Los estudios clínicos con Fresolimumab, un anticuerpo monoclonal neutralizante del TGF- β , al utilizarse en conjunto con radioterapia en cáncer de mama metastásico, no redujo el tamaño de los tumores metastásicos aunque sí logró mejorar la supervivencia promedio de los pacientes (Formenti et al., 2018).

El funcionamiento del TGF- β en el cáncer es muy variado y aún no se conocen todos sus mecanismos que participan en la propagación del cáncer. A pesar de que se han desarrollado muchas terapias anti-TGF- β con buenos resultados en ensayos preclínicos, los ensayos clínicos no han mostrado una mejora en el tratamiento del cáncer, en comparación con la quimioterapia. Además de que al ser terapias sistémicas la inhibición del TGF- β puede tener un efecto tanto en las células cancerosas como las células normales. Es por esto que, en este proyecto se plantea utilizar exosomas que contengan el ARNm de sBG y utilizarlos para inducir la producción de betaglicano soluble, y neutralizar al TGF- β en un modelo de nicho pre-metastásico, con el fin de inhibir la formación de metástasis.

1.2 Justificación

El hígado es un sitio común de metástasis. Los pacientes con metástasis al hígado presentan bajas tasas de supervivencia, que van desde 6 meses hasta una supervivencia a 5 años de 20 a 50%. En el desarrollo de la metástasis, la colonización es considerada la etapa más crítica. Para poder colonizar el hígado, las células tumorales necesitan de un ambiente favorable que es apoyado por el nicho pre-metastásico. La formación del nicho pre-metastásico hepático inicia con la producción de TGF- β , por lo que TGF- β puede utilizarse como un blanco terapéutico. Actualmente los tratamientos propuestos contra TGF- β son sistémicos y no han logrado reducir el cáncer o la metástasis en ensayos clínicos, e incluso se han observado efectos adversos. Por lo que es preciso que la inhibición sea localizada. El uso de exosomas como vehículos cargados con el ARNm de sBG, es un mecanismo por el cual se pueden reducir los efectos del TGF- β de forma localizada en el hígado.

1.3 Hipótesis

Los exosomas cargados con ARNm de betaglicano soluble inducen la producción de betaglicano soluble que neutraliza al TGF- β .

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Obtener exosomas con el ARNm de betaglicano soluble a partir de células en cultivo para inducir la producción de betaglicano soluble y neutralizar al TGF- β .

1.4.2 Objetivos específicos

1. Generar y caracterizar células 293T que sobreexpresen el sBG.
2. Caracterizar los exosomas de las células 293T-sBG que contengan ARNm de sBG.

3. Evaluar la capacidad de los exosomas para entregar ARNm de sBG e inducir la producción de sBG.
4. Optimizar un modelo de activación de la vía de señalización del TGF- β por macrófagos en células hepáticas.
5. Evaluar la neutralización de la vía de señalización del TGF- β en células hepáticas, inducida por los exosomas con ARNm de sBG.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cultivo celular

En este proyecto se trabajaron con tres líneas celulares provenientes de la American Type Culture Collection (ATCC): células 293T de riñón embrionario humano cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Corning), células Hep G2 de hepatocarcinoma humano cultivadas en medio EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, Corning) y células RAW 264.7 tipo monocito/macrófago de ratón cultivadas en medio RPMI 1640 (Corning). Todos los medios de cultivo fueron suplementados con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS por sus siglas en inglés, Biowest) y 1% (v/v) de solución de antibióticos (penicilina, estreptomicina) y antimicótico (anfotericina B) (Corning).

Para el subcultivo y re-suspensión de las células 293T y Hep G2 se utilizó una solución de tripsina-EDTA (Caisson Labs) ya que son líneas adherentes. Las células RAW 264.7 se desprendieron de la placa por medio de raspado mecánico o pipeteo. Todas las células se cultivaron en una incubadora con atmósfera húmeda, a 37°C y 5% de CO₂, realizándose cambio de medio cada 2 a 3 días.

2.2 Optimización de un modelo de activación de la vía de señalización de TGF- β por macrófagos en células hepáticas

2.2.1 Inducción de la expresión de TGF- β en células RAW 264.7

Se sembraron células RAW 264.7 en una placa de 12 pozos con 500x10³ células por pozo. Al día siguiente se retiró el medio y se agregó medio suplementado con 2% (v/v) de FBS y diferentes concentraciones de LPS (desde 125 hasta 1,000 ng/mL). Se colectaron los medios condicionados de 24 y 48 horas y se centrifugaron a 1,000g por 5 min a 4°C para eliminar debris celulares. Los medios condicionados se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Se activó al TGF- β en los medios condicionados liberándolo del péptido asociado a latencia (LAP por sus siglas en inglés) con un proceso de acidificación y neutralización. Primero, se agregó ácido clorhídrico (HCl

4M) a los medios condicionados para tener una concentración final de 160 mM. Después de 10 minutos de incubación, a temperatura ambiente (TA), neutralizamos los medios agregando hidróxido de sodio (NaOH 2.4M) y HEPES (1.0M) para tener una concentración final de 192mM y 80mM, respectivamente. A los medios condicionados que no recibieron activación se les agregó un volumen de agua correspondiente al volumen de HCl y NaOH y el mismo volumen de HEPES.

2.2.2 Caracterización de la activación de la vía de señalización del TGF- β en células Hep G2

Se sembraron células Hep G2 en placas de 12 pozos (800×10^3 células/pozo). Al día siguiente se realizaron dos lavados de la monocapa de células con PBS 1X y se cultivaron las células en medio MEM de base por 15 horas. Pasado este periodo de inanición, se retiró el medio de cultivo de las células Hep G2 y se incubaron por 1h con los medios condicionados de las células RAW 264.7, con o sin activación. Como control positivo se utilizó medio suplementado con TGF- β 1 humano recombinante (10pM, Peprotech).

Para determinar si había activación de la vía de señalización de TGF- β en las células Hep G2 lisamos las células con una solución de lisis (SDS 0.1% p/v, NP-40 1% v/v, NaCl 150mM en TRIS-HCl 50mM, pH 8.0) que contiene inhibidores de proteasas (EDTA y Complete, Roche) y fosfatasas (PhoSTOP, Roche). Se cuantificó la concentración de proteínas con un ensayo Micro BCA (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante y se analizó por Western blot la activación de las proteínas SMAD asociadas a los receptores, SMAD2 y SMAD3 con anticuerpos contra su forma fosforilada o total.

2.3 Determinación de genes reporteros de la vía de señalización del TGF- β en células Hep G2

Cultivamos 400×10^3 células HepG2 por pozo en placa de 24 pozos por 1 día. Se realizó un periodo de inanición en medio libre de FBS por 15 horas, seguido del tratamiento correspondiente: medio condicionado de células RAW 264.7 o medio RPMI-FBS (2% v/v) con o sin TGF- β 1 recombinante humano (10-100pM) por hasta 24h. Las células se re-suspendieron y se centrifugaron a 1,000g por 5 minutos, a 4°C. El precipitado celular se procesó para RT-qPCR de acuerdo al punto 2.15 y se analizó la expresión de Fibronectina 1 (*FN1*) y N-Cadherina (*CDH2*) por RT-qPCR.

2.4 Obtención de plásmidos

Se utilizaron tres plásmidos para la formación de partículas lentivirales (PLVs): pLP1, pLP2 y pMD2.G. Los plásmidos pLP1 y pLP2 fueron obtenidos de Thermo Fisher Scientific. El plásmido pLP1 contiene el gen *gag* que codifica para proteínas estructurales de la matriz y del núcleo virales, así como el gen *pol* que codifica para una transcriptasa inversa y una integrasa. Mientras que, pLP2 contiene el gen *rev* que codifica la proteína Rev encargada de activar la transcripción lentiviral. El plásmido pMD2.G fue un obsequio de Didier Trono (Addgene plasmid #12259; <http://n2t.net/addgene:12259>; RRID: Addgene_12259, datos no publicados). Este plásmido contiene la secuencia codificante para la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), que permite infectar un amplio rango de células.

Como plásmido de transferencia se utilizó el vector pLJM1 unido al gen de interés (sBG-wt, sBG-Zip1, sBG-Zip2, sBG-Zip1y2 y eGFP). El plásmido pLJM1-eGFP fue un obsequio de David Sabatini (Addgene plasmid #19319; <http://n2t.net/addgene:19319>; RRID: Addgene_19319) y se utilizó para la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP por sus siglas en inglés). El plásmido pLJM1-sBG contiene el gen que codifica para la forma soluble del betaglicano con una etiqueta Myc (sBG-wt) (Gárate-Carrillo, 2016). Los plásmidos pLJM1-sBG-Zip1, pLJM1-sBG-Zip2 y pLJM1-sBG-Zip1y2 además de contener la secuencia codificante de sBG y de la etiqueta Myc, contienen la secuencia “ACCCTGCCGCCTGGACTCCGCCTGT” de 25nt introducida por mutagénesis dirigida en uno o dos sitios (Acosta Montaña, datos no publicados).

2.5 Generación de células 293T con sobreexpresión de sBG

2.5.1 Sensibilidad de las células 293T a la puromicina

Se sembró una placa de 24 pozos ($1.9 \text{ cm}^2/\text{pozo}$) con 100×10^3 células 293T por pozo y al día siguiente se realizó un cambio de medio. A los 4 días de cultivo se desprendieron las células de la placa y se transfirieron a una placa de 12 pozos ($3.8 \text{ cm}^2/\text{pozo}$) con medio suplementado con diferentes concentraciones de puromicina (desde 100 hasta 700 ng/mL, Corning). Las células se mantuvieron en puromicina por 9 días, evaluando la confluencia con un microscopio óptico invertido (modelo CKX41, Olympus) y realizando cambio de medio cada 2 días.

2.5.2 Transducción lentiviral de células 293T

Se sembraron 200×10^3 células 293T por pozo en una placa de 12 pozos. Al día siguiente se transfectaron por el método de fosfato de calcio, el cual consiste en la preparación de una mezcla equimolar de los plásmidos de empaquetamiento - pLP1, pLP2 y pMD2.G - y de un plásmido de transferencia pLJM1 con la secuencia codificante de interés (sBG-wt, sBG-Zip1, sBG-Zip2, sBG-Zip1y2 y eGFP) a una concentración de $12.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$, en una solución de CaCl_2 (240 mM). La mezcla ADN/ CaCl_2 se incubó durante 15 minutos y posteriormente se transfirió gota a gota a un volumen igual de buffer salino HBS (HEPES 50 mM , NaCl 280 mM , Na_2HPO_4 1.5 mM , pH 7.0), mientras se mantuvo en agitación con un vortex a 900 rpm para crear la mezcla de transfección. Esta mezcla se incubó 1 minuto a TA y después se agregó encima de las células ($160 \mu\text{L}$ correspondiente a $1 \mu\text{g}$ de plásmidos). Pasadas 15 horas, se retiró el medio de las células para eliminar el material no transfectado y se agregaron $500 \mu\text{L}$ de medio nuevo para iniciar el primer periodo de recolección de PLVs. El día siguiente se revisó la presencia de la GFP en las células transfectadas con la mezcla que contenía el plásmido pLJM1-eGFP en el microscopio de fluorescencia FLOID (Thermo Fisher Scientific). Adicionalmente, se recolectó el medio que contiene las PLVs y se agregó medio nuevo para el segundo periodo de recolección de PLVs, el cual se recolectó 24 horas después. En paralelo, el día 1 post-transducción se sembró una placa de 24 pozos con 100×10^3 células 293T por pozo. Al finalizar la recolección de PLVs, estas se combinaron y se agregó polibreno para tener una concentración final de $8 \mu\text{g}/\text{mL}$. Se realizó la transducción de las células 293T sembradas en la placa de 24 pozos, retirando el medio y agregando 1 mL de una solución de PLVs-polibreno o el volumen equivalente de medio de cultivo con polibreno como control negativo. Al día siguiente de la transducción se realizó un cambio de medio para eliminar las PLVs remanentes en el medio y 2 días después se inició la selección con puromicina de las células transducidas. Tres días posteriores a la transfección y a la transducción, las células modificadas con la GFP y las células control fueron re-suspendidas y analizadas con el citómetro de flujo Attune (Thermo Fisher Scientific) utilizando el software Attune Flow Cytometer (v1.1, Thermo Fisher Scientific), para determinar la eficiencia de transfección y transducción.

2.5.3 Selección con puromicina de células 293T transducidas

Las células 293T transducidas (293T-eGFP, 293T-sBG, 293T-sBG-Zip1, 293T-sBG-Zip2 y 293T-sBG-Zip1y2) se cultivaron en medio DMEM completo suplementado con $500 \text{ ng}/\text{mL}$ de puromicina para eliminar las células no transducidas. Se confirmó la eliminación de estas células al cultivar células 293T parentales no transducidas en presencia de puromicina y observando la desaparición progresiva de las células

vivas/adherentes en la placa. Además, después de 15 días en selección se evaluó la eficiencia de selección mediante la cuantificación por citometría de flujo del porcentaje de células GFP⁺ en la población de células 293T-eGFP.

2.6 Citometría de flujo

Para el análisis de células en citometría de flujo se desprendieron las células con tripsina y se centrifugaron a 1,000g por 5 minutos. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se re-suspendieron en una solución salina isotónica amortiguadora de fosfato (PBS por sus siglas en inglés) 1X. Las suspensiones de células se analizaron en el citómetro de flujo Attune con el software Attune Flow Cytometer.

2.7 Aislamiento de exosomas

2.7.1 Determinación de la cantidad de células 293T a sembrar por cm²

Se sembraron de 13×10^3 hasta 52×10^3 células 293T-sBG por cm² en una placa de 12 pozos (3.8 cm²), en medio DMEM completo suplementado con 500 ng/mL de puromicina y se cultivaron por 3 días. Se realizó cambio de medio a DMEM con 2% (v/v) de FBS y se renovó el medio a las 48 horas. Las células se revisaron en microscopio óptico a las 48 y 96 horas de cultivo para evaluar la confluencia en los pozos.

2.7.2 Preparación de medios condicionados con exosomas

Se sembraron 2×10^6 células 293T parentales o transducidas en placas de 15 cm y se cultivaron por 3 días. Se retiró el medio de cultivo, se lavó la monocapa de células 2 veces con una solución de PBS 1X y se cultivaron las células en medio suplementado con 2% (v/v) de FBS sin exosomas. Se colectó el medio condicionado a las 48 horas y se agregó medio nuevo sin exosomas para una segunda colecta a las siguientes 48 horas. Una vez colectados, los medios condicionados con exosomas se sometieron inmediatamente a una serie de centrifugaciones diferenciales para eliminar las células en suspensión (300g, 10 minutos, 4°C), los cuerpos apoptóticos (2,000g, 20 minutos, 4°C) y los ectosomas (10,000g, 30 minutos, 4°C) en un rotor de ángulo fijo (modelo 75002006, Sorvall Heraeus) con una centrifuga. El

sobrenadante con los exosomas se congeló a -80°C hasta el aislamiento de exosomas. El precipitado de la última centrifugación ($10,000g$) que contiene los ectosomas se lavó en 1mL de PBS 1X, seguido de una centrifugación a $14,000g$ por 30 minutos a 4°C (modelo 5417R, Eppendorf). Los ectosomas se re-suspendieron en 50 μL de PBS 1X y se congelaron a -80°C hasta su uso.

2.7.3 Aislamiento de exosomas por precipitación con polietilenglicol

Se preparó una mezcla en proporción 1:1 de solución de medio condicionado de exosomas y de solución de polietilenglicol 4000 (PEG 4000) al 16% (p/v) en NaCl (1M) que se incubó una noche a 4°C . Al día siguiente se centrifugaron los medios a $9,000g$ por 120 minutos a 4°C en un rotor de ángulo fijo (modelo 75002006, Sorvall Heraeus). Se eliminó el sobrenadante mediante inversión de los tubos por 5 minutos. Posteriormente los exosomas se tiñeron o se lavaron con PBS para eliminar los restos de medio y fenol rojo.

Para el lavado se agregaron 10 mL de solución PBS (0.5X), PEG 4000 (5% p/v) y NaCl (0.5M). Posteriormente se centrifugaron los exosomas a $9,000g$ por 120 minutos a 4°C (rotor 75002006, Sorvall Heraeus). Se eliminó el sobrenadante por inversión y los exosomas se re-suspendieron en 100 μL de PBS 1X. Para la tinción de exosomas y ensayos de internalización se mantuvieron a 4°C hasta su uso y para análisis de proteínas se almacenaron a -20°C .

2.7.4 Aislamiento de exosomas por ultracentrifugación

Para aislar exosomas por ultracentrifugación se realizaron varias pruebas. La primera caracterización de los exosomas de las células 293T transducidas se realizó mediante una única centrifugación con el rotor de columpio SW 32 Ti (Factor $K_{ave}=232.32$, Beckman Coulter) a 30,000 rpm por 140 minutos a 4°C . Posteriormente, para los exosomas aislados para los experimentos de comparación entre métodos de aislamiento y rotores de ultracentrífuga se utilizó el rotor de columpio SW 32 Ti a 30,000 rpm por 4 horas a 4°C . Para el rotor de ángulo fijo se utilizó el rotor 50.2 Ti (Factor $K_{ave}=133.85$, Beckman Coulter) a 36,000 rpm por 2 horas a 4°C ; los siguientes experimentos se continuaron haciendo con este rotor. Después de la primera ultracentrifugación se realizó una segunda ultracentrifugación para lavar los exosomas con PBS 1X utilizando el rotor 90 Ti (Factor $K_{ave}=105.33$, Beckman Coulter) a 44,000 rpm por 90 minutos a 4°C . Los precipitados de exosomas se re-suspendieron en 100 μL de PBS 1X para experimentos de Western blot y

ensayos en células, o en 300µL de solución de lisis del kit GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) para aislamiento de ARN.

2.8 Caracterización de exosomas

El diámetro hidrodinámico de los exosomas se midió utilizando la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés) con el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical).

La morfología y el tamaño de los exosomas se analizó por microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés). Los exosomas se depositaron en una rejilla de cobre de malla 75 (TED PELLA) y se dejó reposar la muestra 5 minutos. Se retiró el exceso con papel filtro y los exosomas se tiñeron con acetato de uranilo al 2% por 7 minutos. La rejilla se secó con papel filtro y las muestras se visualizaron con el TEM Hitachi H7500, utilizando un voltaje de aceleración de 80kV.

2.9 Marcaje fluorescente de vesículas extracelulares

Para el marcaje fluorescente de exosomas, se aislaron los exosomas por el método de ultracentrifugación y después de la primera ultracentrifugación se re-suspendieron en PBS 1X. Para los ectosomas, se tomó el precipitado de ectosomas (centrifugación de 10,000g de la preparación de medios condicionados con exosomas) y se re-suspendió en PBS 1X. Las vesículas extracelulares re-suspendidas en PBS se mezclaron en proporción 1:1 con una solución de PBS 1X con 10µM de CFSE (éster de succinimidil-carboxifluoresceína, BioLegend) o 5µM de SP-DiI_{C18} (1,1'-dioctadecil-6,6'-di(4-sulfofenil)-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina, Thermo Fisher Scientific) y se incubaron por 20 o 40 minutos, respectivamente, a 37°C en la oscuridad. Después del marcaje, las vesículas fueron lavadas con PBS 1X y centrifugadas a 44,000 rpm (rotor 90 Ti), por 90 min a 4°C para los exosomas y a 14,000g por 30min a 4°C para los ectosomas. Las vesículas se re-suspendieron en 100µL de PBS 1X y se cuantificó la concentración de proteínas con un ensayo Micro BCA (Pierce). Para los ensayos de internalización se mantuvieron en oscuridad a 4°C hasta su uso y posteriormente se almacenaron a -20°C para los análisis de proteínas.

2.10 Ensayos de internalización de vesículas extracelulares

Se sembraron células RAW 264.7 a una densidad de 125×10^3 células/cm². El día siguiente se realizó un cambio de medio lavando la monocapa de células con PBS 1X y añadiendo medio RPMI-1640 suplementado con FBS (2% v/v) y lipopolisacáridos (LPS) provenientes de la bacteria *Escherichia coli* (serotipo 026: B6, 500 ng/mL, Sigma). Posteriormente, se añadieron entre 1.56 y 7.8 µg/cm² de exosomas o ectosomas teñidos y se incubaron por 24 horas. Las células se procesaron para análisis por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células CFSE⁺ o SP-DiIC₁₈⁺, o para análisis por microscopia de fluorescencia. Para este último, se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) re-suspendido al 2% (p/v) en una solución de PBS 1X, seguido de una incubación por 10 minutos a TA. Se retiró el PFA y se lavó la monocapa de células con PBS 1X. Después, se realizó una tinción de los núcleos celulares con una solución de DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol, diclorhidrato, 0.1 µg/mL, Sigma) y se incubaron las células 10 minutos a TA. Finalmente, se tomaron fotografías con el microscopio de fluorescencia FLOID y se editaron con el software ImageJ (Schneider et al., 2012).

2.11 Evaluación de la capacidad de los exosomas para entregar al ARNm de sBG a células RAW 264.7 e inducir la producción de sBG

Se sembraron 250×10^3 células RAW 264.7 en una placa de 24 pozos y se cultivaron por 24 horas. Retiramos el medio y lavamos la monocapa de células con PBS 1X, para seguir cultivando las células en medio RPMI-1640 suplementado con FBS (2% v/v) y LPS (500 ng/mL). Para los tratamientos se agregaron 6 o 15 µg de exosomas o ectosomas y se incubaron por 24 horas. Colectamos los medios condicionados y se centrifugaron a 1,000g por 5 min a 4°C para eliminar debris celulares. Se analizó por Western blot la presencia de sBG-Myc en los medios condicionados y el medio restante se almacenó a -20°C para su posterior uso en células Hep G2. Las células se procesaron para RT-qPCR de acuerdo al punto 2.15 y medimos la expresión de *sBG-Myc* por RT-qPCR. Evaluamos los productos de la RT-qPCR por electroforesis de ADN utilizando un gel de agarosa (2.5% p/v) conteniendo bromuro de etidio. La electroforesis se corrió a 100V por 1 hora y las bandas se visualizaron con el equipo de adquisición de imágenes E-Gel Imager (Life Technologies).

2.12 Evaluación de la neutralización de la vía de señalización del TGF- β en células Hep G2, inducida por los exosomas con ARNm de sBG

Sembramos células Hep G2 en placas de 24 pozos (400×10^3 células/pozo). Al día siguiente las células se pusieron en inanición de FBS. Se realizaron dos lavados de la monocapa de células con PBS 1X y se cultivaron las células en medio MEM de base por 15 horas. Retiramos el medio de cultivo y agregamos los medios condicionados de células RAW 264.7 cultivadas con exosomas o ectosomas (producidos en el punto 2.11). Como control negativo se utilizó medio RPMI-1640 suplementado con 2% (v/v) de FBS. Las células se incubaron por 2 horas y posteriormente las lisamos con una solución de lisis (SDS 0.1% p/v, NP-40 1% v/v y NaCl 150mM en TRIS-HCl 50mM, pH 8.0) con inhibidores de proteasas (EDTA y Complete, Roche) y fosfatasas (PhoSTOP, Roche). La concentración de proteínas de lisados celulares se cuantificó con un ensayo Micro BCA (Pierce). Evaluamos las proteínas SMAD2 y SMAD3 en su forma fosforilada o total por Western blot.

2.13 Cuantificación de proteína por Micro BCA

Para determinar la concentración de proteína en las muestras de medios condicionados, lisados celulares, exosomas y ectosomas se realizó un ensayo de proteínas Micro BCA (Pierce) en placas de 96 pozos, siguiendo las instrucciones del fabricante. La densidad óptica a 562nm se midió con un lector de placa Epoch (Biotek). La concentración de proteínas se calculó mediante una curva estándar realizada con dilución de albumina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés, Biobasic).

2.14 Western blot

Se realizó Western blot para caracterizar la presencia de proteínas de interés en medios condicionados, lisados celulares, exosomas y ectosomas. Las proteínas se separaron por medio de electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con un sistema Mini-PROTEAN (BioRad). Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Merck) utilizando un sistema de transferencia semi-seco, Trans-Blot SD Semi-Dry (BioRad). Se comprobó la transferencia de las proteínas a la membrana mediante una tinción con Ponceau S. La membrana se bloqueó para evitar uniones inespecíficas con una solución salina, amortiguadora con TRIS y Tween-20

(0.1% v/v) (TBS-T) y leche en polvo libre de grasa (5% p/v) (TBS-T – leche 5% (p/v)) durante 1h a TA. Después se incubó la membrana durante una noche con el anticuerpo primario diluido en TBS-T con leche (5% p/v) o BSA (5% p/v) (Tabla 1). Al día siguiente, la membrana se incubó por 1h con un anticuerpo secundario contra inmunoglobulina de ratón o de conejo, conjugado con una peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés). Después de la tinción con Ponceau S y de cada incubación con anticuerpos, se lavó la membrana con TBS-T (3 lavados de 5 minutos) para desteñirla o para retirar los anticuerpos residuales. Para analizar diferentes proteínas en la misma membrana, después de una primera detección se incubó la membrana con una solución de Stripping (Glicina 0.75% p/v, SDS 0.5% p/v, pH 2.5) por 30 minutos a 60°C, para retirar los anticuerpos de la membrana. Seguidamente se lavó la membrana con TBS-T (4 lavados de 5 minutos) y se bloqueó la membrana para incubarla con el siguiente anticuerpo de interés.

Las proteínas se detectaron con el método de quimioluminiscencia usando el reactivo Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck) y el fotodocumentador ChemiDoc MP (BioRad). Las imágenes se analizaron con el software ImageJ (Schneider et al., 2012), mediante la medición del valor medio de gris de las bandas.

Tabla 1. Características de anticuerpos utilizados en Western blot.

Anticuerpo	Marca	Especie	Dilución	Diluyente
Anti-Myc	Abcam	Ratón	1:1,000	TBS-T – leche (5% p/v)
Anti- α -Tubulina	Sigma Aldrich	Ratón	1:8,000	TBS-T – leche (5% p/v)
Anti-CD81	Santa Cruz	Ratón	1:250	TBS-T – leche (5% p/v)
Anti-Flotilina-2	Santa Cruz	Ratón	1:500	TBS-T – leche (5% p/v)
Anti-Smad2/3 fosforiladas	Cell Signaling	Conejo	1:1,000	TBS-T – leche (5% p/v)
Anti-Smad2/3	Cell Signaling	Conejo	1:1,000	TBS-T – BSA (5% p/v)
Anti-Ratón IgG-HRP	Sigma Aldrich	Cabra	1:40,000	TBS-T – leche (5% p/v)
Anti-Conejo IgG-HRP	Sigma Aldrich	Cabra	1:80,000	TBS-T – leche (5% p/v)

2.15 Cuantificación de ARNm por RT-qPCR

2.15.1 Extracción de ARN total

Para la purificación de ARN total se utilizó el kit de purificación GeneJET RNA (Thermo Fisher Scientific) y se siguió el protocolo para células de mamífero en cultivo. Para las muestras de células se utilizaron 600µL de solución de lisis y 360µL de etanol (99%), mientras que para los exosomas y ectosomas se utilizó la mitad de volumen. La siguiente parte del protocolo se realizó como indica el kit. La concentración de ARN se cuantificó con un espectrómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) y el ARN purificado se almacenó a -20°C.

La integridad del ARN se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con bromuro de etidio, evaluando las bandas de ARN ribosomal de las subunidades 28S (5kb) y 18S (2kb).

2.15.2 PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR)

La RT-qPCR se realizó en dos partes: obtención de los ADN complementarios (ADNc) por transcripción inversa y análisis de los ADNc por qPCR. La transcripción inversa se realizó con la retrotranscriptasa SuperScript II (1.25 U/µL, Thermo Fisher Scientific), usando un oligonucleótido poly-T anclado (N-V-T₂₀, 25 ng/µL, T4Oligo) como iniciador y 125-250ng de ARN total para un volumen de reacción de 5-10µL, respectivamente. Después de la transcripción inversa (42°C, 75 minutos), se desnaturalizó la encima (75°C, 15 minutos) y se agregaron 4 volúmenes de agua (grado biología molecular). Los ADNc se usaron inmediatamente o se conservaron a -20°C.

Los análisis de qPCR se realizaron mediante la amplificación de los ADNc con un termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems) y la mezcla de PCR QuantiTect SYBR Green (Qiagen) con 1µL de solución ADNc por reacción de 10µL, en presencia de 0.4µM de cada oligonucleótido iniciador. Los niveles de expresión de los ARNm se cuantificaron mediante una curva estándar y se normalizaron con el gen de referencia *RPL32*. Los oligonucleótidos específicos para cada gen se diseñaron con Primer-BLAST (Ye et al., 2012) y las secuencias se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos para qPCR.

Gen	Iniciador directo (5'-3')	Iniciador reverso (5'-3')
<i>Tgfbβ3</i> (rata)	ATACACAATGGCTCCCGTGG	GGAAGAGTGGGTTGTCCAGG
<i>FN1</i> (humano)	TTGCTCCTGCACATGCTTTG	TCGGGAATCTTCTCTGTCAGC
<i>CDH2</i> (humano)	TGCATGAAGGACAGCCTCTT	TGGGTCTCTTTGTCTTGGGC
<i>RPL32</i> (humano)	CAGGGTTCGTAGAAGATTCAAGGG	CTTGGAGGAAACATTGTGAGCGATC
<i>Rpl32</i> (ratón)	CAGGGTGCGGAGAAGGTTCAAGGG	CTTAGAGGACACGTTGTGAGCAATC

2.16 Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos las pruebas se llevaron a cabo por triplicado. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía utilizando la prueba Tukey o la prueba Dunnet con el programa GraphPad Prism versión 9.0.2.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Optimización de un modelo de activación de la vía de señalización del TGF- β por macrófagos en células hepáticas

3.1.1 Las células RAW 264.7 producen suficiente TGF- β que activa su vía de señalización en células Hep G2

Las células RAW 264.7 producen TGF- β y se ha observado que su producción aumenta en presencia de LPS (Ferré et al., 2009). Para confirmar si el LPS aumenta la producción de TGF- β y determinar las condiciones óptimas, se cultivaron células RAW 264.7 en presencia de LPS (125-1,000 ng/mL), hasta 48 horas. Se colectaron los medios condicionados y se sometieron a un tratamiento de acidificación para activar al TGF- β , al disociarlo del péptido asociado a latencia. Posteriormente, se hizo un tratamiento a células Hep G2 con estos medios activados, en donde se identificó la activación de la vía de señalización del TGF- β vía la fosforilación de las proteínas SMAD2 y 3 por Western blot (Figura 4). El tratamiento de las células Hep G2 con TGF- β 1 recombinante indujo la fosforilación de SMAD2/3 como se esperaba, y la acidificación del TGF- β 1 no disminuyó la señal indicando que no perjudica a la función de la citocina (Figura 4A, B). En paralelo, el tratamiento de las células Hep G2 de 24 horas con los medios condicionados de las células RAW 264.7 indujo la fosforilación de SMAD2/3 a niveles más altos que en las células cultivadas con 10pM de TGF- β 1 recombinante (Figura 4A, B). Esta inducción de la activación de vía de señalización del TGF- β fue independiente de la adición de LPS, lo que indica que las células RAW 264.7 producen suficiente TGF- β en condición basal. Al contrario, parece que la presencia de LPS en concentraciones de 500ng/mL y más, disminuyó la fosforilación de SMAD2/3 (Figura 4A, B). Los medios condicionados de 48h también indujeron la activación de la vía de señalización del TGF- β (Figura 4C, D). Sin embargo, en ausencia de LPS, la tasa fosfo/total SMAD2/3 fue similar a la activación inducida por 10pM de TGF- β 1, e incrementa con la adición de LPS (Figura 4C, D). Estos resultados indican que las células RAW 264.7 producen suficiente TGF- β en presencia o ausencia de LPS por 24 o 48 horas para inducir la fosforilación de SMAD2/3 en células Hep G2.

Después de demostrar que las células RAW 264.7 producen niveles suficientes de TGF- β para activar su vía de señalización en células Hep G2, se decidió determinar si es necesario usar el proceso de acidificación para tener niveles aptos de TGF- β activado, ya que no sabemos si esta etapa podría afectar la función del

sBG-Myc. Cultivamos células RAW 264.7 con o sin LPS (500ng/mL) por 24 o 48 horas y la mitad del medio condicionado de cada tratamiento fue acidificado. Se trataron a células Hep G2 con los medios, con o sin la acidificación, y se realizó un Western blot para determinar si la vía de señalización del TGF- β se enciende. Se observó una mayor fosforilación de SMAD2/3 con los medios condicionados que recibieron activación en todas las condiciones (Figura 5). Sin embargo, también se encontró que las células RAW 264.7 en presencia de LPS producen suficiente TGF- β en su forma activa para encender la vía de señalización del TGF- β en las células Hep G2 (Figura 5). En consecuencia, se decidió continuar trabajando con medios condicionados de 24 horas de las células RAW 264.7, cultivadas con 500ng/mL de LPS y sin el proceso de acidificación-neutralización.

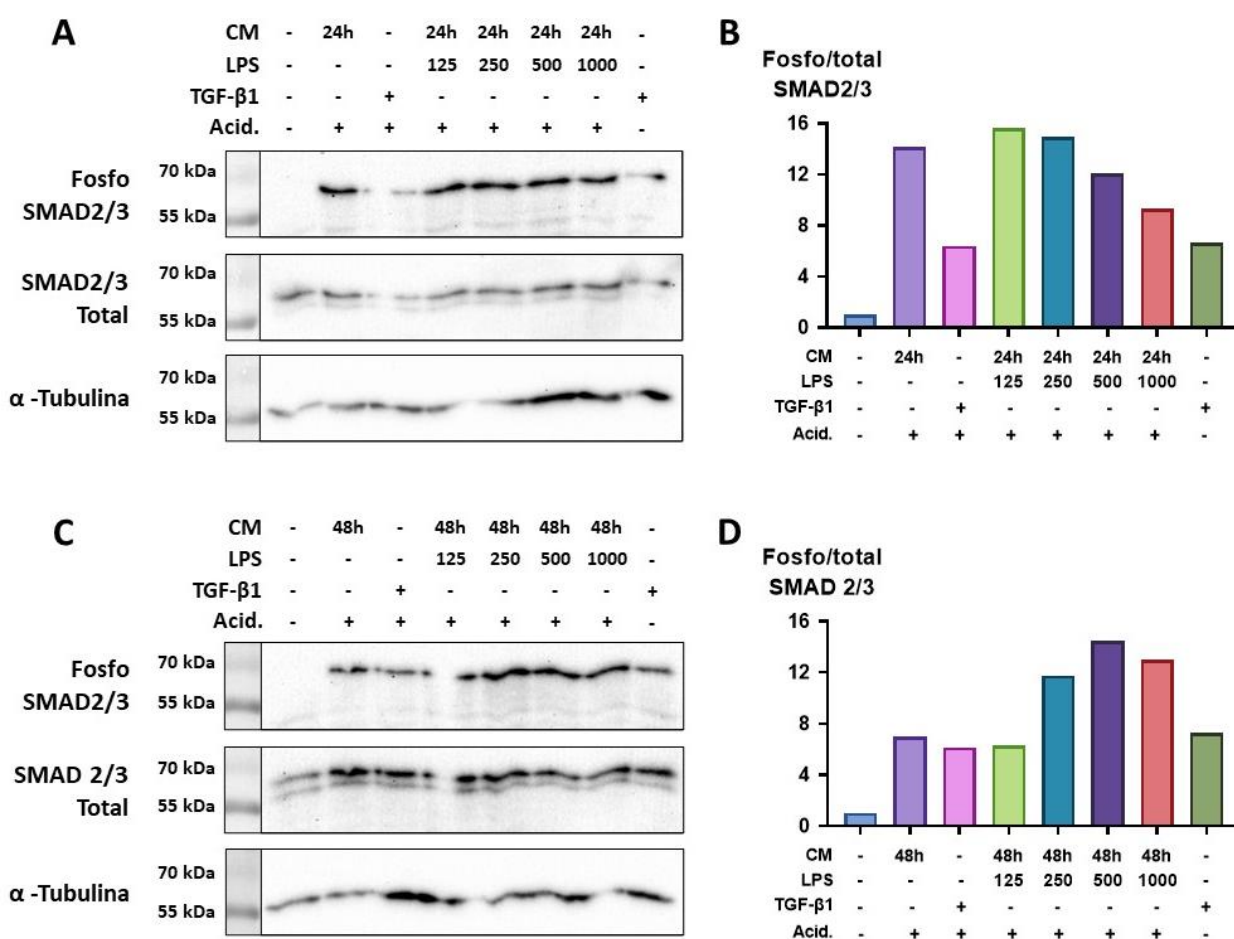


Figura 4. Las células RAW 264.7 producen TGF- β que activa su vía de señalización en células Hep G2. Western blot de los niveles de las proteínas SMAD2/3 fosforiladas y total en células Hep G2 tratadas con medios condicionados de 24h (A) o 48h (C) de células RAW 264.7. Representación de los niveles de SMAD2/3 fosforiladas normalizados a SMAD2/3 total en células Hep G2 con medios de células RAW 264.7 de 24h (B) o 48h (D). Los pesos moleculares de las proteínas se indican a la izquierda de las imágenes de Western blot. CM: Medio condicionado; LPS: Lipopolisacárido; Acid: Acidificación. Las imágenes de las membranas de Western blot sin cortar se muestran en los anexos.

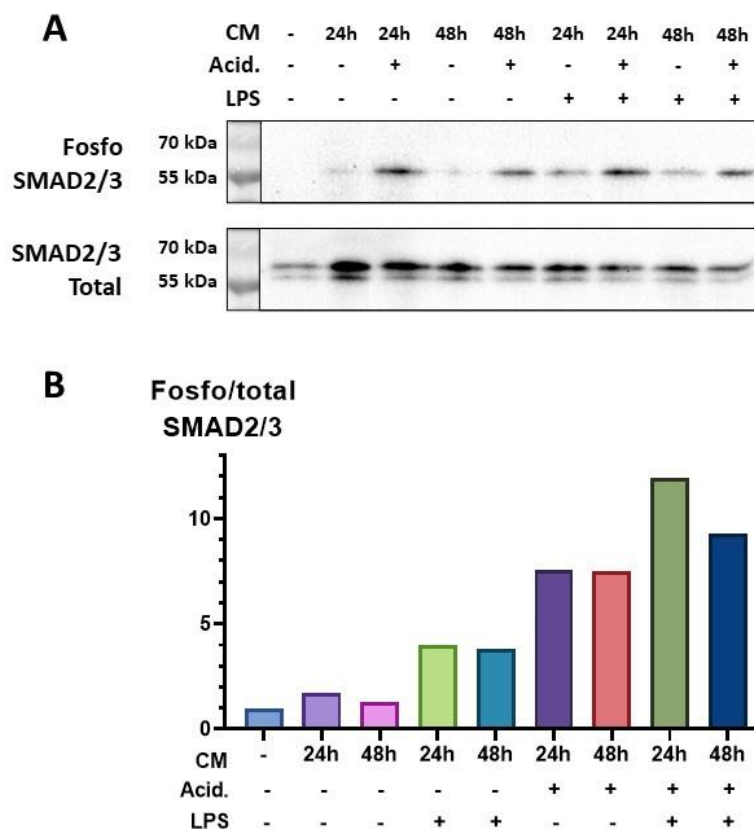


Figura 5. Las células RAW 264.7 producen TGF- β en su forma activa. (A) Western blot de los niveles de las proteínas SMAD2/3 fosforiladas y total en células Hep G2 tratadas con medios condicionados de células RAW 264.7 con y sin activación del TGF- β . Los pesos moleculares de las proteínas se indican a la izquierda de las imágenes de Western blot. (B) Representación de los niveles de SMAD2/3 fosforiladas normalizados a SMAD2/3 total en células Hep G2 con medios de células RAW 264.7 con y sin activación. CM: Medio condicionado; LPS: Lipopolisacárido; Acid: Acidificación. Las imágenes de las membranas de Western blot sin cortar se muestran en los anexos.

3.1.2 Genes reporteros de la vía de señalización del TGF- β en células Hep G2

Al confirmar que las células Hep G2 son sensibles al TGF- β , se buscó determinar genes reporteros de esta vía en las células Hep G2. Se analizó la expresión de Fibronectina-1 (*FN1*) al estar involucrada en la formación del nicho pre-metastásico hepático (Costa-Silva et al., 2015), y de N-Cadherina (*CDH2*) que se ve incrementada por TGF- β durante la transición epitelio-mesénquima en células Hep G2 (Lin et al., 2018). Se cultivaron células Hep G2 con el medio condicionado de células RAW 254.7 o con TGF- β 1 recombinante (10-100pM) hasta por 24 horas. Por medio de Western blot se determinó la fosforilación de SMAD2/3 después de 60 minutos de tratamiento. En todos los tratamientos con TGF- β 1 recombinante se observó fosforilación de SMAD2/3, en el tratamiento con el medio condicionado de células RAW 264.7 se observó muy poca fosforilación y en el control negativo no se observó fosforilación de SMAD2/3 (Figura 6). Por RT-qPCR se observó un aumento significativo en la expresión de *FN1* con 50pM de TGF- β 1. Mientras que,

CDH2 aumenta su expresión a partir de 10pM, en comparación con la expresión basal (Figura 6). Los resultados indican que *FN1* y *CDH2* son genes reporteros de la vía de señalización del TGF- β en células Hep G2 cuando hay altos niveles de TGF- β , sin embargo, el TGF- β producido por las células RAW 264.7 no es suficiente para generar un cambio en la expresión de estos genes, aunque sí hay activación de la vía dada por la fosforilación de SMAD2/3.

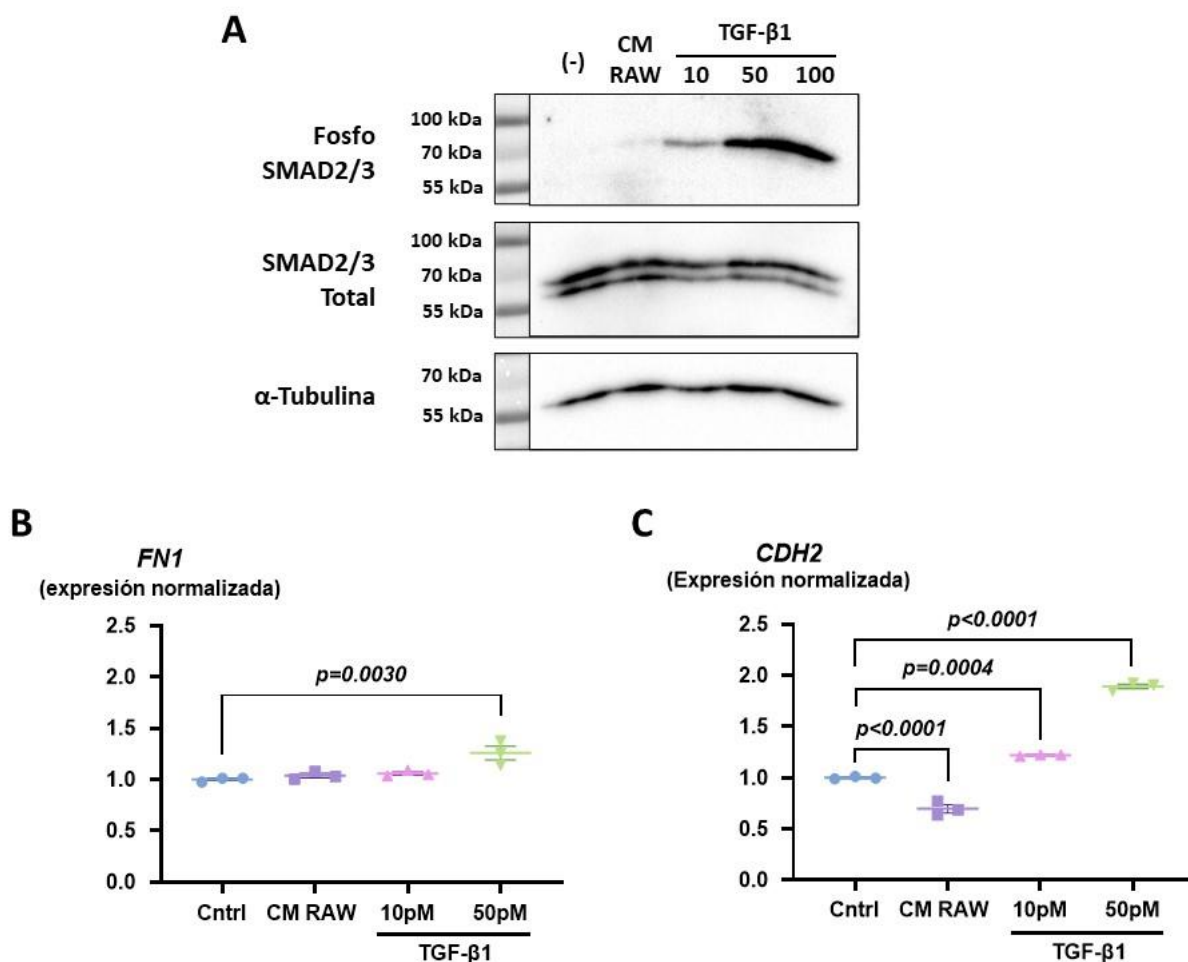


Figura 6. Expresión del ARNm de *FN1* y *CDH2* en células Hep G2. Se trataron células Hep G2 con medio condicionado de células RAW 264.7 o TGF- β 1 a 10, 50 y 100pM. Se midió la activación de la vía de señalización del TGF- β por Western blot y la expresión de genes reporteros por RT-qPCR. (A) Western blot de los niveles de las proteínas SMAD2/3 fosforiladas y total en células Hep G2. Expresión del ARNm de *FN1* (B) y *CDH2* (C) en células Hep G2. Los niveles fueron normalizados con el gen *RPL32* y expresados en base al Control. Representación de los valores individuales de cada triplicado, con promedio $\pm$ error estándar. Análisis ANOVA de 1 vía con prueba Dunnett. Los valores de p se indican en la gráfica. Cntrl: Control; CM: Medio condicionado; *FN1*: Fibronectina 1; *CDH2*: N-Cadherina. Las imágenes de las membranas de Western blot sin cortar se muestran en los anexos.

3.2 Estandarización del método de aislamiento de exosomas

3.2.1 Determinación de la cantidad de células 293T a sembrar

Se realizó una optimización de la cantidad de células a sembrar para los experimentos de aislamiento de exosomas, con el fin de colectar 2 preparaciones de medios condicionados de 48h, a partir de una misma placa. Se sembraron entre 13×10^3 (13K) y 40×10^3 (40K) células 293T-sBG por cm^2 , con las condiciones de cultivo para aislamiento de exosomas y se evaluó la confluencia en los pozos en los días siguientes (Figura 7A). Al día 3, para la condición más baja (13k) las células se encontraban al 60% de confluencia, mientras que las condiciones siguientes (26k células o más) se encontraban arriba del 80% (Figura 7B). Al día 5, para 13k células la confluencia fue del 80% y al día 7 alcanzaron el 100% de confluencia. A partir de la condición de 26k las células alcanzaron el 100% de confluencia al día 5 y se mantuvieron así hasta el día 7. A partir de la confluencia de las células se decidió utilizar 13×10^3 células/ cm^2 para los experimentos de aislamientos de exosomas, ya que permite un crecimiento gradual de las células durante la recolección de los medios condicionados.

3.2.2 Comparación de métodos de aislamiento de exosomas

Una vez teniendo el modelo de nicho pre-metastásico hepático se decidió estandarizar el método de aislamiento de exosomas. Preparamos medios condicionados de células 293T y comparamos dos métodos de aislamiento: precipitación con polietilenglicol (PEG) y ultracentrifugación. Los exosomas se tiñeron con el fluoróforo SP-DilC₁₈ y se hizo tratamiento a células RAW 264.7 por 24 horas, desde 0.05 hasta 1 μg de exosomas. Por microscopía de fluorescencia se observaron más células fluorescentes en el aislamiento con PEG en comparación con ultracentrifugación (Figura 8A). Al analizar estas células por citometría de flujo también se obtuvo mayor internalización de exosomas con el método de precipitación con PEG, visto por el porcentaje de células SP-DilC₁₈⁺ (Figura 8B y C) y la intensidad media de fluorescencia (Figura 8D). Sin embargo, en el aislamiento con PEG se observó que en el control de tinción (PBS-Dil) hubo un gran número de células SP-DilC₁₈⁺, de hasta 55.7%, en comparación con el método de ultracentrifugación que fue de 7.3%, para la concentración mayor de exosomas. Adicionalmente, se utilizaron los exosomas aislados por ultracentrifugación para determinar si el LPS podría afectar la internalización. Al cultivar células RAW 264.7 con LPS y exosomas se observó que el LPS no tiene efecto en la internalización de exosomas (Figura 8). Para verificar que las muestras obtenidas eran exosomas, se analizó por Western blot

la presencia de Flotilina-2 y CD81, una proteína encontrada en vesículas extracelulares (Hoshino et al., 2020) y un marcador específico de exosomas (Kowal et al., 2016), respectivamente. Se detectó la presencia de CD81 y Flotilina-2 en las muestras aisladas por ultracentrifugación y únicamente CD81, en bajas cantidades, en las muestras aisladas por precipitación con PEG (Figura 9). Debido a que la ultracentrifugación permite aislar buenos exosomas con un artefacto de tinción 7 veces menor que en el aislamiento por precipitación con PEG, se establece la ultracentrifugación como el método para aislar exosomas y se decide continuar trabajando con LPS en los experimentos con células RAW 264.7 al no afectar la internalización.

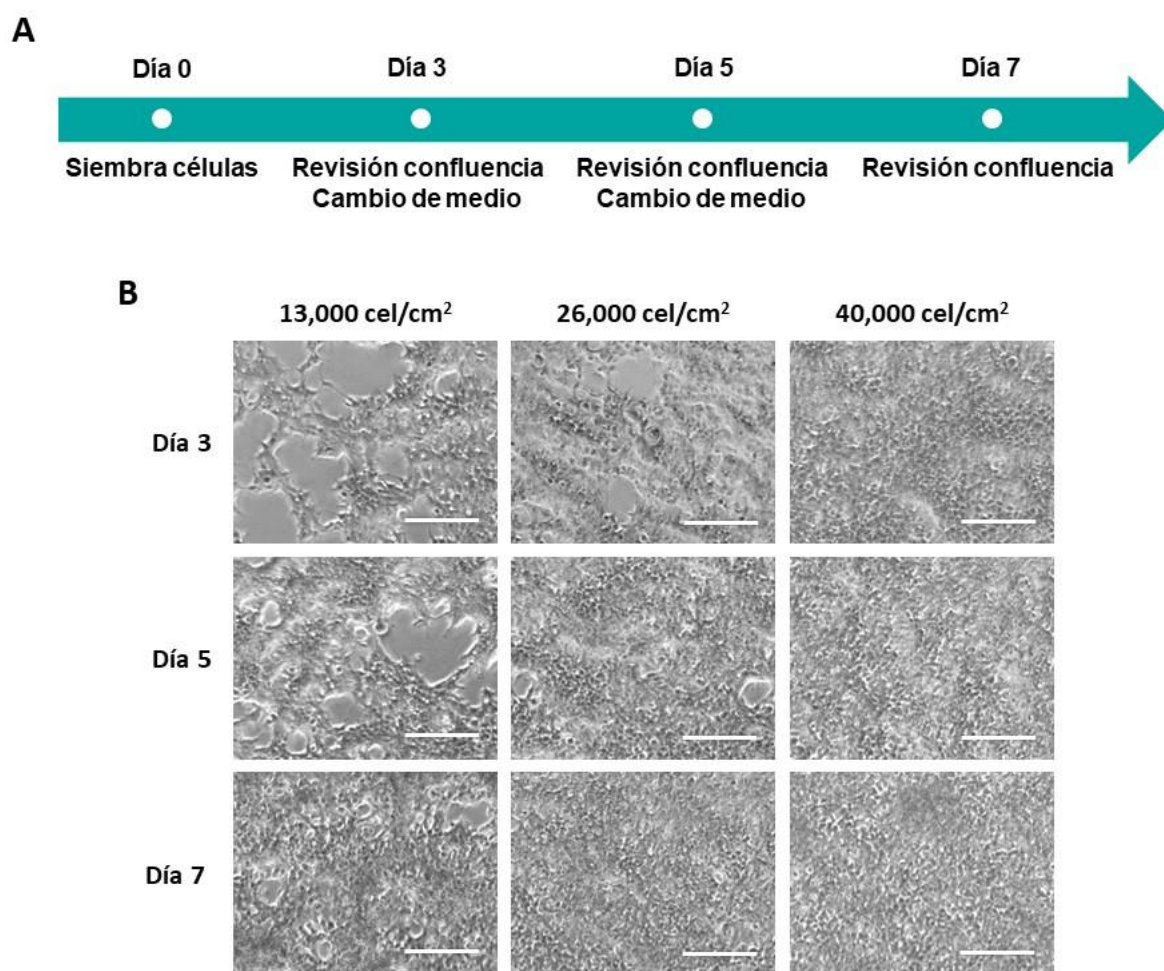


Figura 7. Densidad celular de 293T-sBG. Se cultivaron células 293T-sBG desde 13×10^3 hasta 40×10^3 células/cm² durante 7 días y se evaluó la confluencia a los días 3, 5 y 7. (A) Línea del tiempo de las etapas del ensayo. (B) Imágenes representativas del crecimiento de las células 293T-sBG a los días 3, 5 y 7 de cultivo. Barra de escala: 50 μ m.

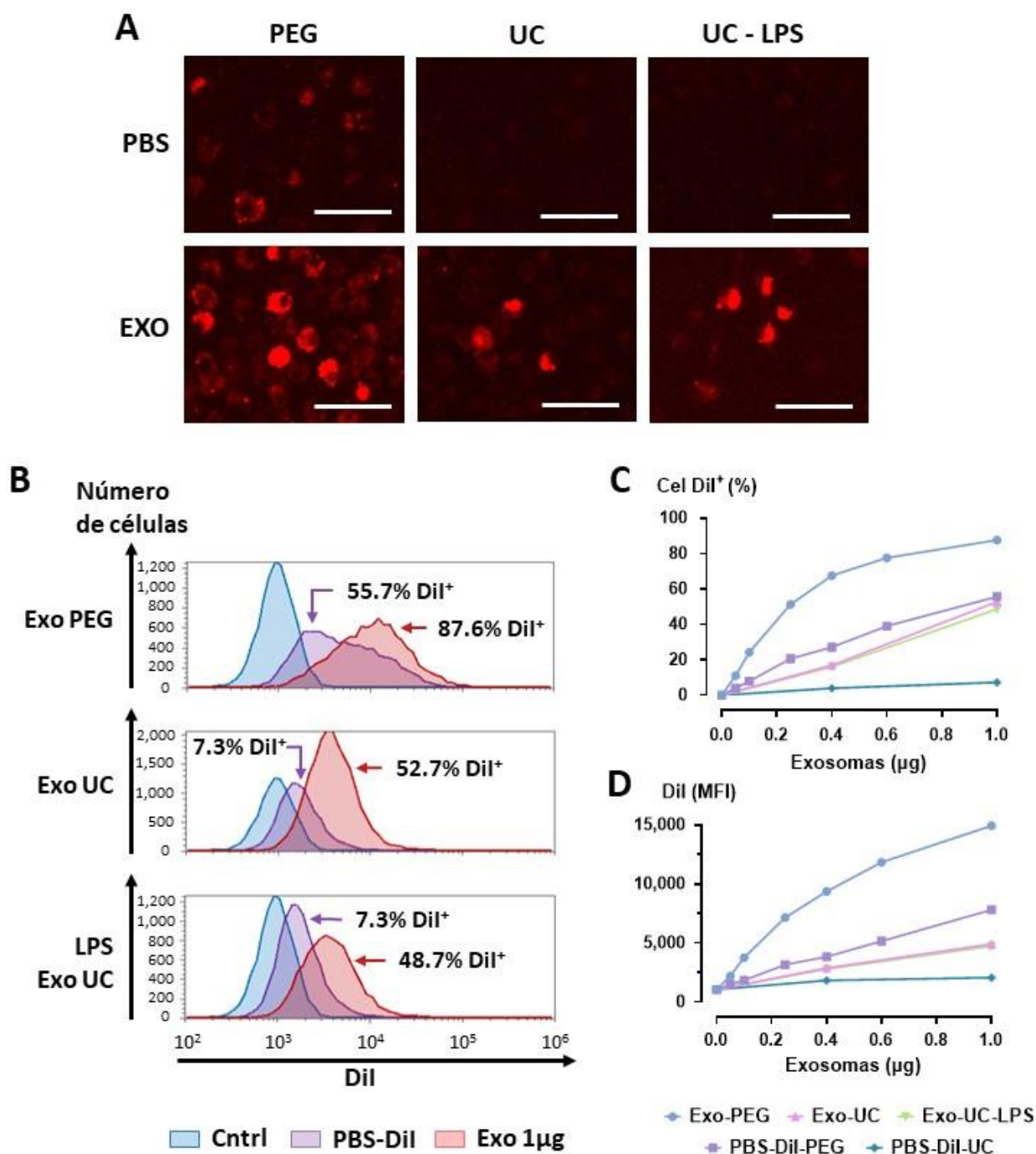


Figura 8. Efecto de diferentes métodos en el aislamiento de exosomas. Se aislaron exosomas por precipitación con PEG y ultracentrifugación, se tiñeron con SP-DilC₁₈ y se hicieron tratamientos a células RAW 264.7 con o sin LPS. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de las células que recibieron los exosomas y su control de tinción. (B) Histogramas representativos del porcentaje de células SP-DilC₁₈⁺. (C) Representación gráfica del porcentaje de células SP-DilC₁₈⁺ y de la intensidad media de fluorescencia de las células (D). Cntrl: células sin exosomas; PBS-Dil: control de tinción; Exo-Dil: exosomas teñidos; PEG: Polietilenglicol; UC: Ultracentrifugación; LPS: Lipopolisacárido; MFI: Intensidad media de fluorescencia. Barra de escala: 50 μm.

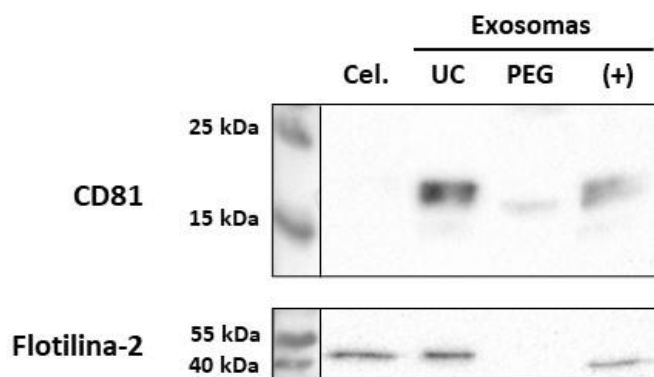


Figura 9. Los métodos de ultracentrifugación y precipitación con polietilenglicol permiten aislar exosomas. Western blot de la expresión de las proteínas CD81 y Flotilina-2 en exosomas aislados por ultracentrifugación o precipitación con PEG. Los pesos moleculares de las proteínas se indican a la izquierda de las imágenes. PEG: Polietilenglicol; UC: Ultracentrifugación. Las imágenes de las membranas de Western blot sin cortar se muestran en los anexos.

3.2.3 Comparación de rotores para aislamiento de exosomas por ultracentrifugación

Después de seleccionar el método de ultracentrifugación para el aislamiento de los exosomas, se decidió hacer una comparación de dos rotores, el SW 32 Ti de columpio y el 50.2 Ti de ángulo fijo (Tabla 3), para determinar si uno es superior al otro, considerando el tiempo de centrifugación, la cantidad de proteínas obtenidas y la calidad de estos exosomas. Se observó Flotilina-2 y CD81 en las muestras obtenidas con ambos rotores, lo que confirma que hay vesículas extracelulares y que son exosomas (Figura 10). La concentración de proteína en cada muestra fue similar, siendo la principal diferencia entre los dos rotores el tiempo de centrifugación (Tabla 3). Con base en esto se decidió realizar los aislamientos de exosomas con el método de ultracentrifugación utilizando el rotor de ángulo fijo 50.2 Ti.

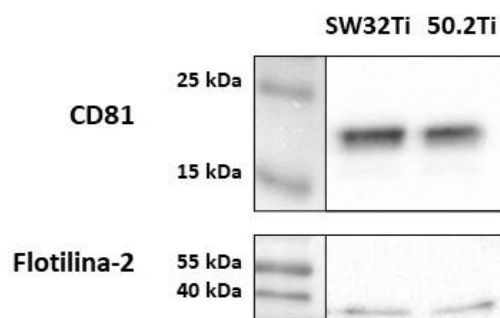


Figura 10. Los exosomas aislados por ultracentrifugación no se ven afectados por el tipo de rotor. Western blot de la expresión de las proteínas CD81 y Flotilina-2 en exosomas aislados por ultracentrifugación, con rotor de columpio (SW32Ti) y rotor de ángulo fijo (50.2Ti). Los pesos moleculares de las proteínas se indican a la izquierda de las imágenes. Las imágenes de las membranas de Western blot sin cortar se muestran en los anexos.

Tabla 3. Comparación del tiempo de centrifugación y concentración de proteína de exosomas con diferentes rotores.

Rotor	Velocidad (rpm)	Factor k a velocidad especificada	Tiempo total de centrifugación (h)	µg proteína/mL de CM
SW 32 Ti	31,000	217.57	3	2.0
50.2 Ti	36,000	133.85	2	2.6

3.2.4 Determinación de la morfología y el tamaño de los exosomas

Ya que se definió el protocolo para aislar exosomas, se caracterizó por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y dispersión dinámica de la luz (DLS), la morfología y el tamaño de los exosomas producidos por las células 293T-sBG-Zip1. En las imágenes de microscopía se observaron vesículas de forma redonda (Figura 11A). El tamaño de los exosomas medido por TEM se encontró entre 30 a 100 nm de diámetro, obteniéndose un tamaño promedio de 50.5 ± 15.4 nm (Figura 11B). El diámetro hidrodinámico medido por DLS mostró partículas entre 20 a 100nm, con un tamaño promedio de 39.7 ± 16 nm (Figura 11C). Estos resultados confirman que los exosomas secretados por las células 293T-sBG-Zip1 tienen una morfología redonda. Además, se determina que estas células secretan principalmente exosomas de tamaño pequeño, menores a 65 nm de diámetro.

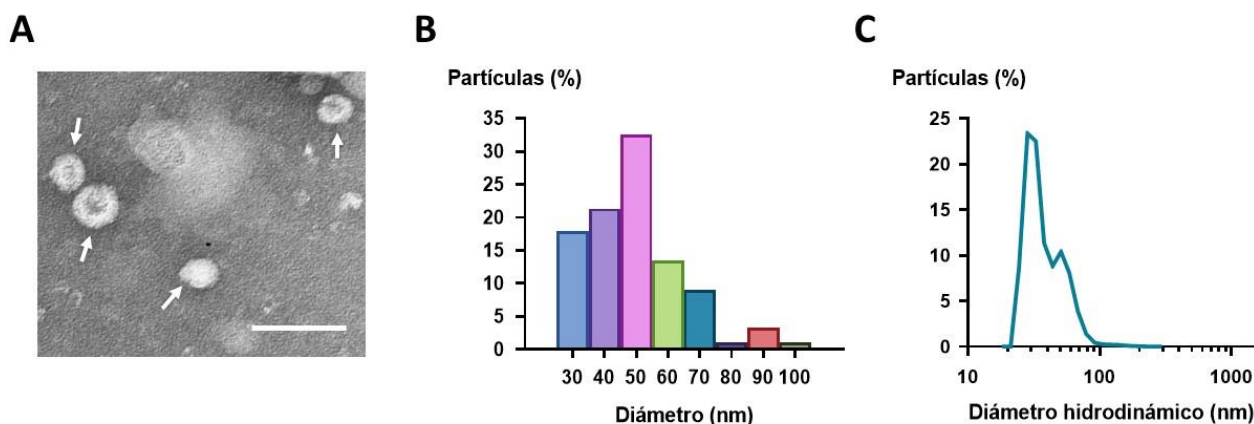


Figura 11. Morfología y tamaño de exosomas provenientes de células 293T-sBG-Zip1. (A) Micrografía representativa de exosomas tomada con TEM. Las flechas blancas indican los exosomas. Barra de escala: 100 nm. (B) Representación gráfica del tamaño de los exosomas medidos por TEM. (C) Diámetro hidrodinámico de los exosomas medido por DLS.

3.2.5 Comparación de fluoróforos para tinción de exosomas

Como siguiente punto en la estandarización del método de aislamiento de exosomas se hizo una comparación de los fluoróforos SP-DiIC₁₈ y CFSE, con el fin de determinar cuál era el mejor para teñir exosomas para los ensayos de internalización. Se aislaron exosomas de células 293T por ultracentrifugación y se tiñeron con SP-DiIC₁₈ o CFSE. Se cultivaron células RAW 264.7 en presencia o ausencia de 0.5 a 2.5µg de exosomas durante 24 horas. Por microscopía de fluorescencia, solo fue posible observar fluorescencia en las células que recibieron exosomas teñidos con SP-DiIC₁₈ (Figura 12A). Por citometría de flujo, se obtuvo que únicamente 3-11% de células fueron positivas a CFSE, mientras que para el SP-DiIC₁₈ se obtuvieron valores del 69-90% de células positivas, dependiendo de la cantidad de exosomas colocados a las células (Figura 12B, C). Considerando la cantidad de células positivas con cada fluoróforo, se decidió utilizar SP-DiIC₁₈ para teñir exosomas para los ensayos de internalización.

3.3 Generación y caracterización de células 293T que sobreexpresen el sBG

3.3.1 Sensibilidad de las células 293T a la puromicina

Para la generación de células con expresión de sBG lo primero que se realizó fue determinar la concentración de puromicina que elimina a las células 293T en un periodo de 7 a 10 días, se cultivaron estas células con diferentes concentraciones de puromicina en un rango de 100 a 700ng/mL, y se evaluó la sobrevivencia de las células a lo largo del tratamiento.

Se observó que en ausencia de puromicina las células llegaron a confluencia el día 4, mientras que, a partir de 100ng/mL hasta 400ng/mL las células llegaron a confluencia el día 7 y se mantuvieron vivas en los pozos durante los días de tratamiento (Figura 13 y Figura 14). Para las concentraciones de 500 y 600ng/mL se observó una disminución en la densidad celular en comparación con el control sin puromicina desde el día 2, hasta el día 7 que se detuvo el crecimiento de las células. A la concentración de 700ng/mL las células comenzaron a morir desde el día 2 y continuaron muriendo hasta el día 9 (Figura 13 y Figura 14). Considerando la cantidad de células muertas y la morfología se decidió utilizar la concentración de 500ng/mL para futuros experimentos de selección con las células 293T.

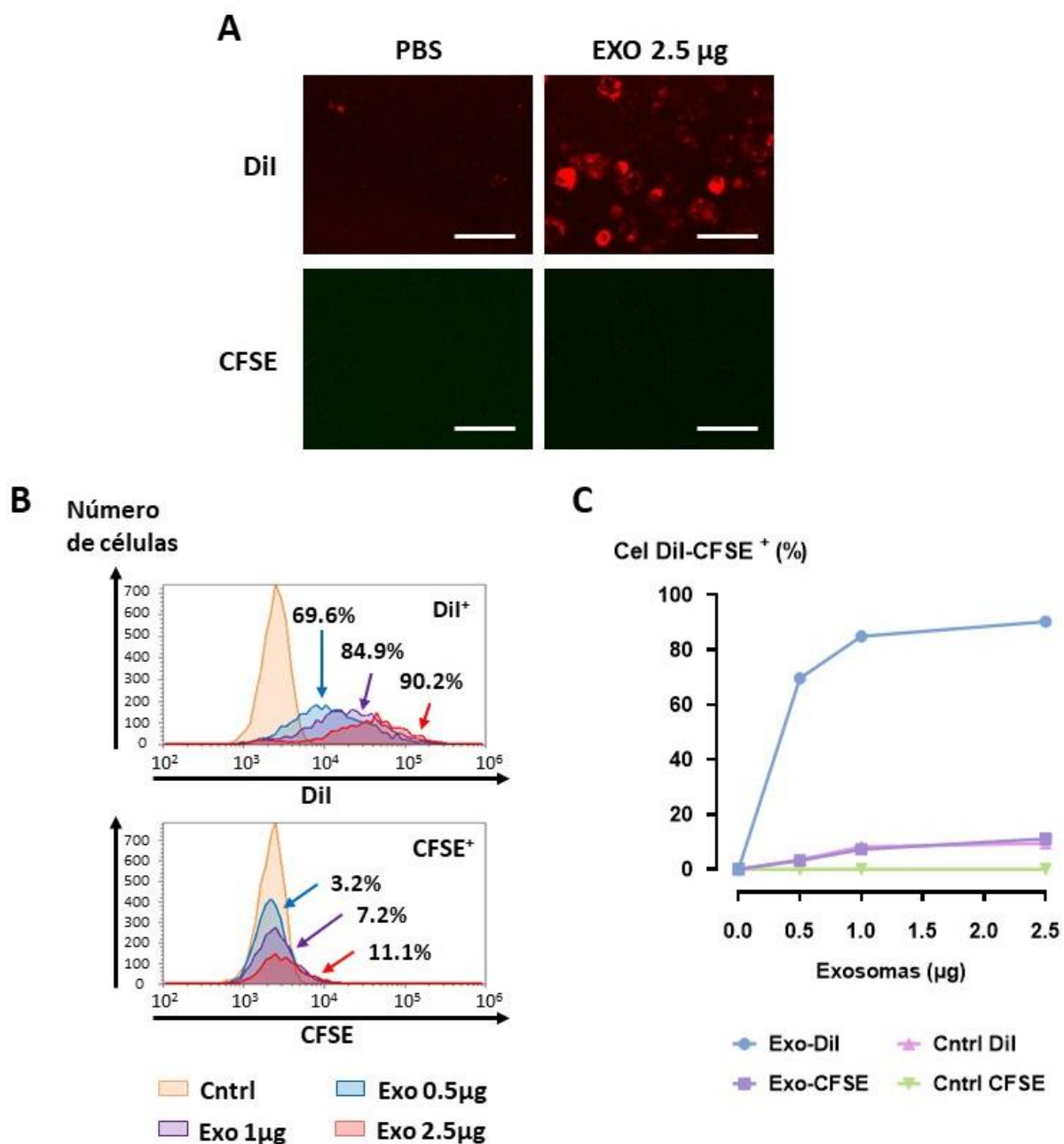


Figura 12. Efecto de diferentes fluoróforos en la tinción de exosomas. Se tiñeron exosomas con SP-DilC₁₈ o CFSE, se agregaron a células RAW 264.7 y se cuantificó el porcentaje de células positivas a cada fluoróforo. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de las células que recibieron 2.5 μg de exosomas y su control de tinción. (B) Histogramas del porcentaje de células positivas para cada fluoróforo. (C) Gráfica comparativa del porcentaje de células positivas a SP-DilC₁₈ o CFSE. Cntrl: células sin exosomas. Barra de escala: 50 μm .

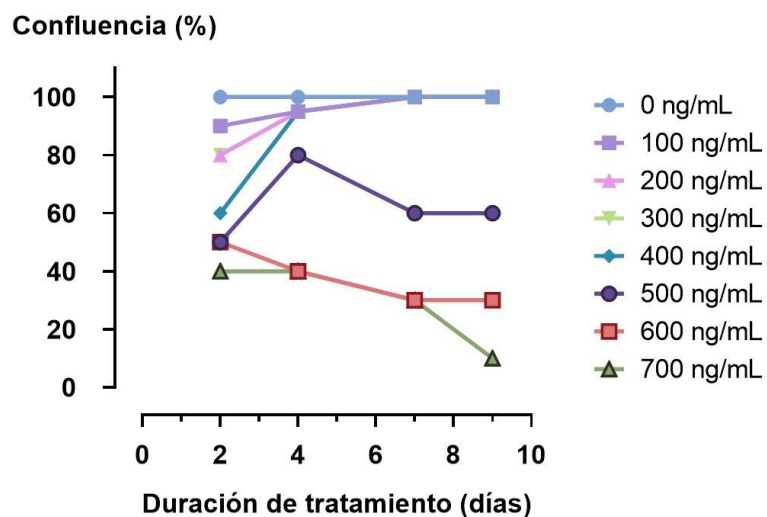


Figura 13. Evaluación de la sobrevivencia de células 293T tratadas con puromicina. Se cultivaron células 293T en presencia de puromicina desde 0 hasta 700ng/mL. Gráfica representativa de la cuantificación de la confluencia de células en los pozos desde el día 2 hasta el día 9 de tratamiento.

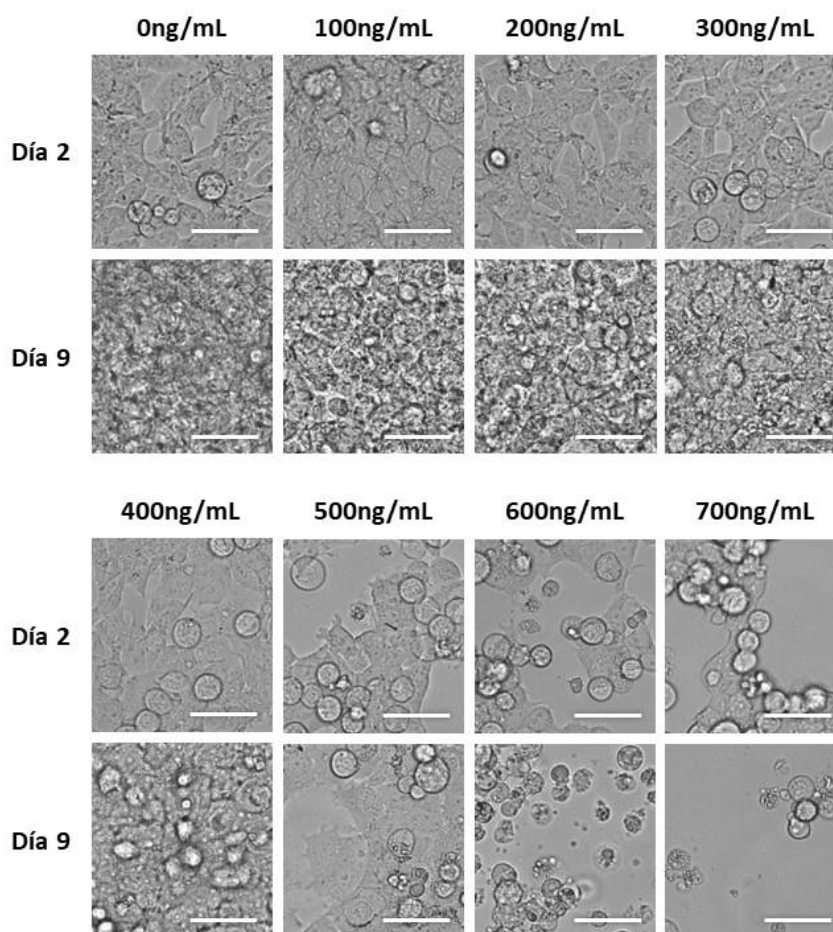


Figura 14. Efecto de la puromicina en la morfología de células 293T en cultivo. Imágenes representativas de células 293T en cultivo con puromicina, a los días 2 y 9 de tratamiento. Barra de escala: 50 μ m.

3.3.2 Modificación de células 293T para sobreexpresión de betaglicano soluble

Con el fin de obtener células con expresión de sBG con y sin códigos postales (Zip), se modificaron células 293T mediante transducción lentiviral. En paralelo, también se modificaron células para la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP), que se usó como control para evaluar la eficiencia de transfección, transducción y selección.

Tres días después de que se transfectaron células 293T con una mezcla de plásmidos lentivirales, que contenía pLJM1-eGFP, el análisis por citometría de flujo mostró la presencia de 85% de células GFP⁺ lo que equivale a una eficiencia de transfección de 85% (Figura 15A). El medio condicionado de estas células, que contiene partículas lentivirales, se utilizó para la transducción de células 293T. Tres días después de la transducción, la eficiencia de transducción fue de 97% (Figura 15A). Las células transducidas fueron seleccionadas en medio con puromicina. Las células control, sin transducción, murieron al día 7 de la selección, mientras que las células transducidas continuaron creciendo (Figura 15B). Posterior a 25 días de selección con puromicina más del 99% de las células expresaban GFP (Figura 15A).

En paralelo, se produjeron partículas lentivirales para transducir células 293T y tener la expresión y producción de una forma soluble de betaglicano de rata (*Rattus rattus*) con una etiqueta Myc (sBG-Myc), y otras células además con una o dos secuencias putativas de Zip en 3'UTR que favorecen la transferencia de ARNm a los exosomas. Debido a las dificultades técnicas para la detección de betaglicano por citometría de flujo (Colunga Flores, 2022), no fue posible determinar la eficiencia de transducción o la tasa de selección de estas células. Sin embargo, observamos que, de manera similar a las células transducidas para producir la GFP, pocas células fueron eliminadas durante la etapa de selección con la puromicina (Figura 15B) lo que sugiere que se tuvo una transducción y selección exitosa, aunque se necesita confirmar la producción de sBG.

3.3.3 Las células 293T transducidas expresan el ARNm de sBG-Myc

Para la caracterización de las células 293T-sBG con y sin códigos postales, se midió la expresión del ARNm de sBG-Myc a través de RT-qPCR. Se realizó extracción del ARN total de las células seguido de una transcripción inversa y los ADNc obtenidos se analizaron por qPCR. En la Figura 16A se muestran los sitios de inserción de las secuencias Zip1 y Zip2. En el análisis de qPCR se detectó el ARNm de sBG-Myc solo en las células transducidas 293T-sBG Wt, Zip1, Zip2 y Zip1y2, con una expresión estadísticamente más elevada

en las células Zip1 y Zip1y2 (2.23 y 1.33 veces más, respectivamente) en comparación con las células parentales (Figura 16). Por lo tanto, se demuestra que las células 293T transducidas expresan el ARNm de sBG.

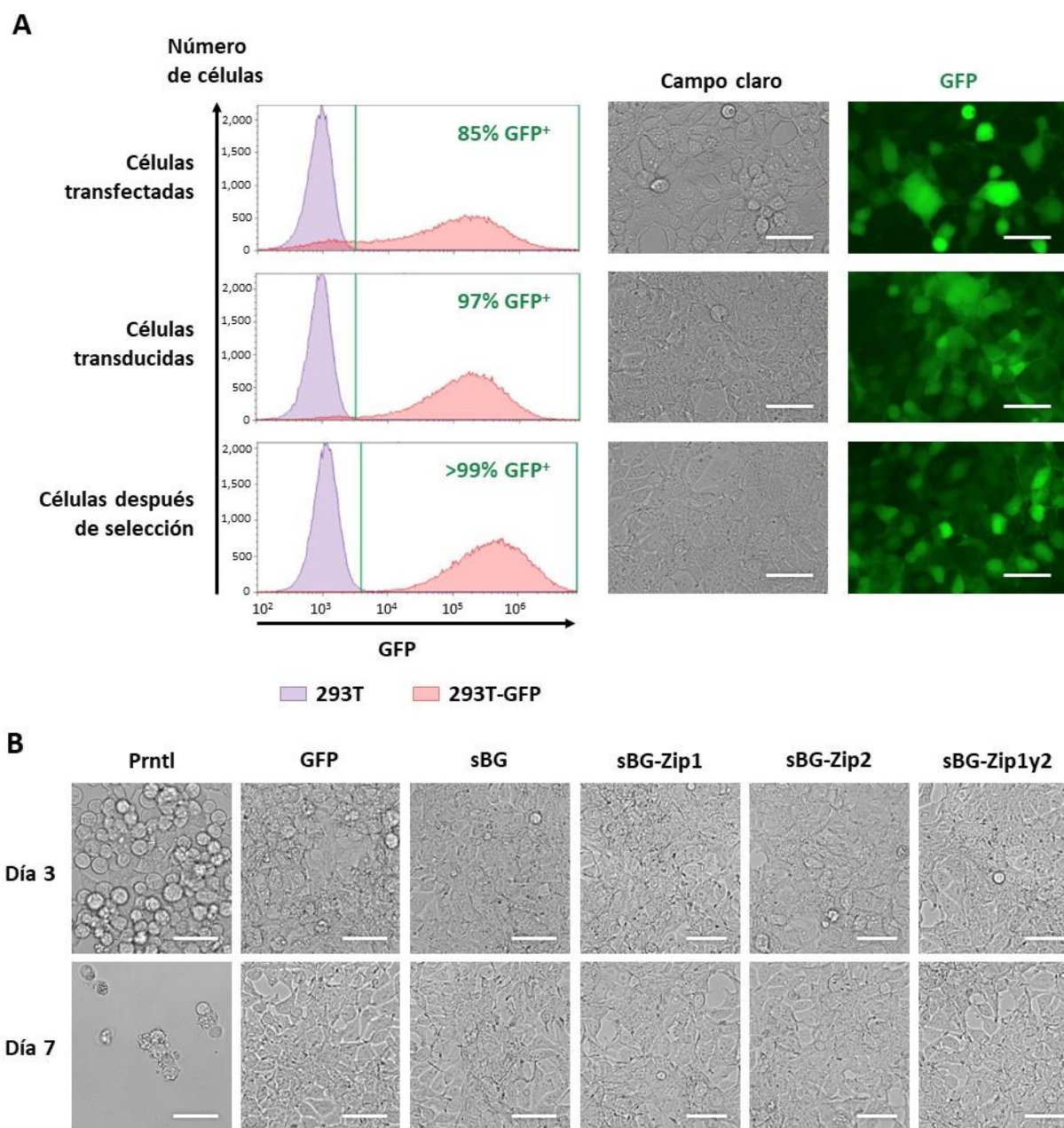


Figura 15. Generación y selección de células 293T transducidas. Se transfectaron células 293T para producir partículas lentivirales (PLVs). Las PLVs se utilizaron para transducir células 293T y generar células con expresión de sBG con y sin códigos postales (Zips) y GFP. Las células transducidas se seleccionaron con puromicina. (A) Histogramas representativos de la eficiencia de transfección, transducción y selección en células 293T-GFP por citometría de flujo, utilizando células 293T parentales como control negativo (lado izquierdo). Imágenes de células 293T-GFP en campo claro y luz verde después de la transfección, transducción y selección (lado derecho). (B) Imágenes representativas de la selección de células transducidas a los días 3 y 7 de selección. Prntl: Parental; GFP: Proteína fluorescente verde; sBG: Betaglicano soluble; Zip: Código postal. Barra de escala: 50 μ m.

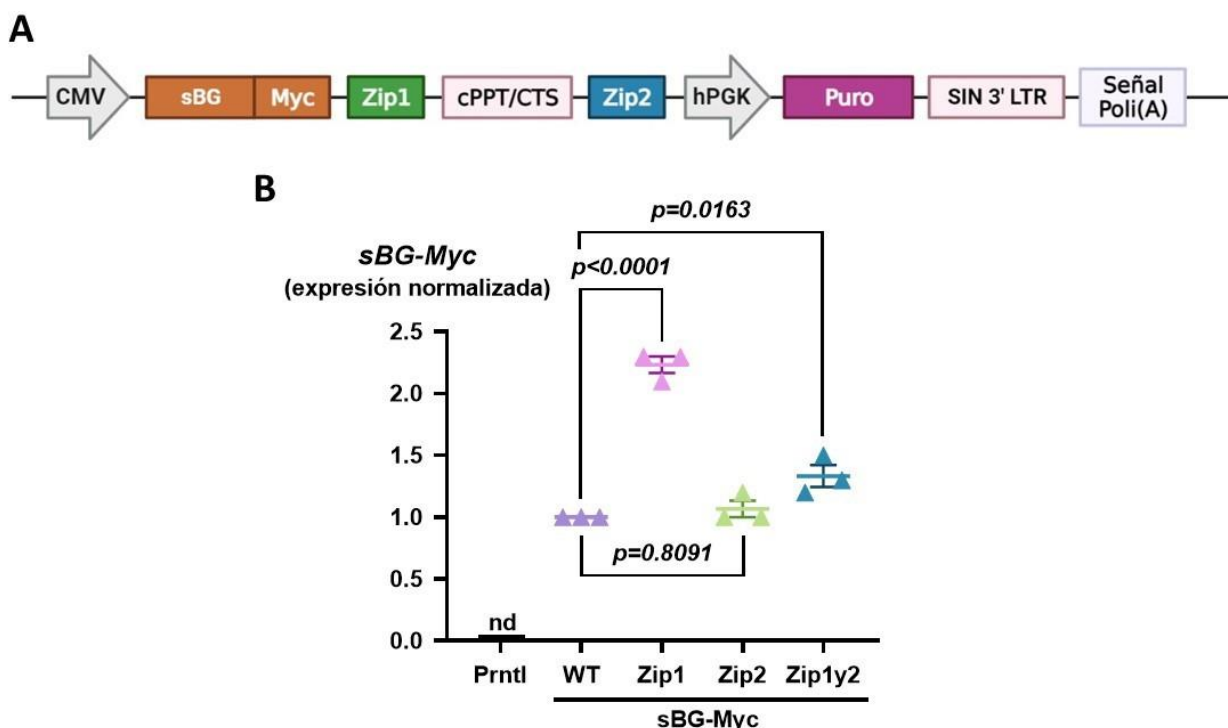


Figura 16. Expresión del ARNm de sBG-Myc en células 293T-sBG. (A) Sitios de inserción de las secuencias Zip1 y Zip2 en el plásmido de transferencia. (B) Expresión del ARNm de sBG-Myc en células 293T-sBG con y sin códigos postales medido por RT-qPCR. Los valores fueron normalizados con el gen *RPL32* y expresados a los niveles de las células sBG wild type. Representación de los valores individuales, con barras que indican el promedio $\pm$ error estándar ($n=3$). Análisis ANOVA de 1 vía con prueba Dunnett. Los valores de p se indican en la gráfica. Prntl: Parental; Wt: Silvestre; sBG: Betaglicano soluble; Zip: Código postal; nd: no detectado. normalizado con el gen *RPL32*.

3.3.4 Las células 293T transducidas producen y secretan la proteína sBG-Myc

Como segunda caracterización de las células 293T-sBG con y sin códigos postales se realizó un análisis de Western blot para determinar si las células transducidas producían y secretaban la proteína sBG-Myc. Se detectó una banda correspondiente al peso molecular estimado del núcleo proteico de sBG-Myc (120kDa) en todos los lisados de células transducidas, mientras que no se observó en las células sin transducción o parentales (Figura 17A). Después de normalizar la intensidad de señal usando la proteína α -Tubulina, se determinó que las células transducidas para producir sBG-Myc sin código postal (Wt) tienen la mayor producción de sBG. En los medios condicionados también se detectó el núcleo proteico de sBG-Myc solo en las células transducidas, además en las células que contienen el Zip1 o Zip2 se observó una segunda banda arriba de 180kDa correspondiente a sBG-Myc con glicosaminoglicanos (GAGs). En las células 293T-sBG Zip1 se observó la mayor secreción de la proteína en los medios condicionados, siendo 8 veces mayor en comparación con el medio condicionado de las células 293T-sBG Wt (Figura 17B). Con lo anterior se

determinó que las células 293T transducidas con sBG, con o sin códigos postales, producen la proteína sBG-Myc y la secretan al medio.

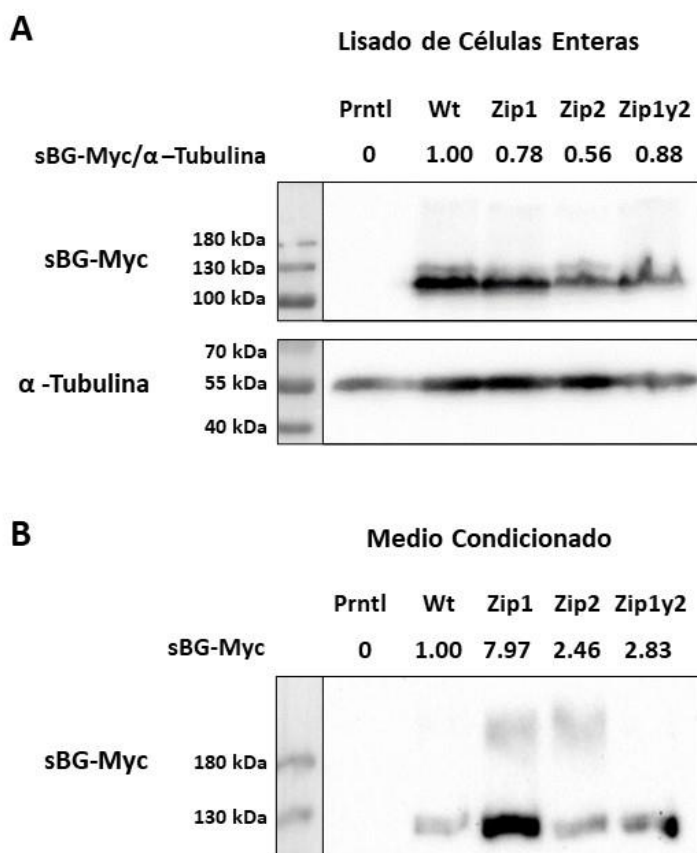


Figura 17. sBG-Myc es producido y secretado por células 293T-sBG. Detección de sBG-Myc por western blot en lisados celulares (A) y medios condicionados (B) de células 293T parentales y 293T-sBG con y sin códigos postales. En la parte superior de las imágenes se muestra la cuantificación de la señal de sBG-Myc/ α -Tubulina para lisados celulares y sBG-Myc en medios condicionados. A la izquierda de las imágenes se indican los pesos moleculares de las proteínas. Prntl: Parental; Wt: Silvestre; sBG: Betaglicano soluble; Zip: Código postal. Las imágenes de las membranas de Western blot sin cortar se muestran en los anexos.

3.3.5 Las células 293T-sBG-Zip1 expresan de manera estable el sBG-Myc

Para determinar si la producción de sBG-Myc por las células transducidas era estable, se cultivaron células 293T-sBG-Zip en presencia y ausencia de puomicina y se evaluó la producción de sBG-Myc por Western blot a los días 0, 7 y 14. En los lisados celulares se observó el núcleo proteico de la proteína sBG-Myc en todas las muestras. No se observó una diferencia en la producción de la proteína entre las muestras con o sin puomicina (Figura 18A). En los medios condicionados se detectó tanto el núcleo proteico como la proteína glicosilada en todas las muestras (Figura 18B). En el día 0, correspondiente a la producción basal, se detectó una banda de menor intensidad en comparación con los días 7 y 14, lo que se relaciona con una

menor cantidad de proteína. Sin embargo, al comparar la producción de proteína en presencia o ausencia de puromicina al día 7 o al día 14, no se detecta una diferencia. A partir de esto se confirma que las células 293T-sBG-Zip1 tienen una producción estable de la proteína sBG-Myc.

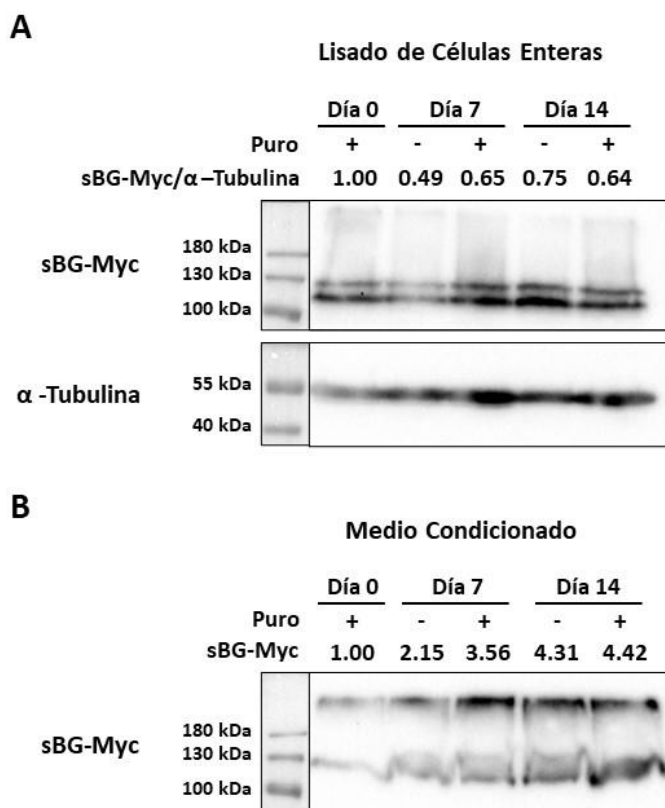


Figura 18. sBG-Myc es producido de forma estable por las células 293T-sBG-Zip1. Western blot de la evaluación de la estabilidad de producción de sBG-Myc en lisados celulares (A) y medios condicionados (B) de células 293T-sBG-Zip1 durante 14 días. A la izquierda de las imágenes se indican los pesos moleculares de las proteínas. sBG: Betaglicano soluble. Las imágenes de las membranas de Western blot sin cortar se muestran en los anexos.

3.4 Caracterización de la presencia del ARNm de sBG en los exosomas de las células 293T-sBG

3.4.1 Los códigos postales no aumentan la transferencia del ARNm de sBG-Myc a exosomas

Una vez que obtuvimos células con sobreexpresión de sBG se procedió a aislar los exosomas para determinar si contenían el ARNm de sBG. Se produjeron medios condicionados de 48h de células 293T parentales, 293T-sBG Wt, Zip1, Zip2 y Zip1y2 y se aislaron los exosomas por el método de

ultracentrifugación. Adicionalmente también se aislaron los ectosomas. Las muestras obtenidas se analizaron por western blot para confirmar la presencia de exosomas. Se evaluó CD81 y Flotilina-2 en las muestras de exosomas y ectosomas, y α -Tubulina como control de carga de los lisados celulares. Se detectó Flotilina-2 únicamente en los ectosomas derivados de células parentales y sBG-Wt y no se detectó el marcador de exosomas CD81 (Figura 19). Flotilina-2 se encuentra en la mayoría de las muestras de exosomas a excepción de los exosomas derivados de las células sBG-Zip2, pero CD81 si se encuentra en todas las muestras y no se encuentra en las células, lo que confirma que las muestras obtenidas sí contienen exosomas (Figura 19).

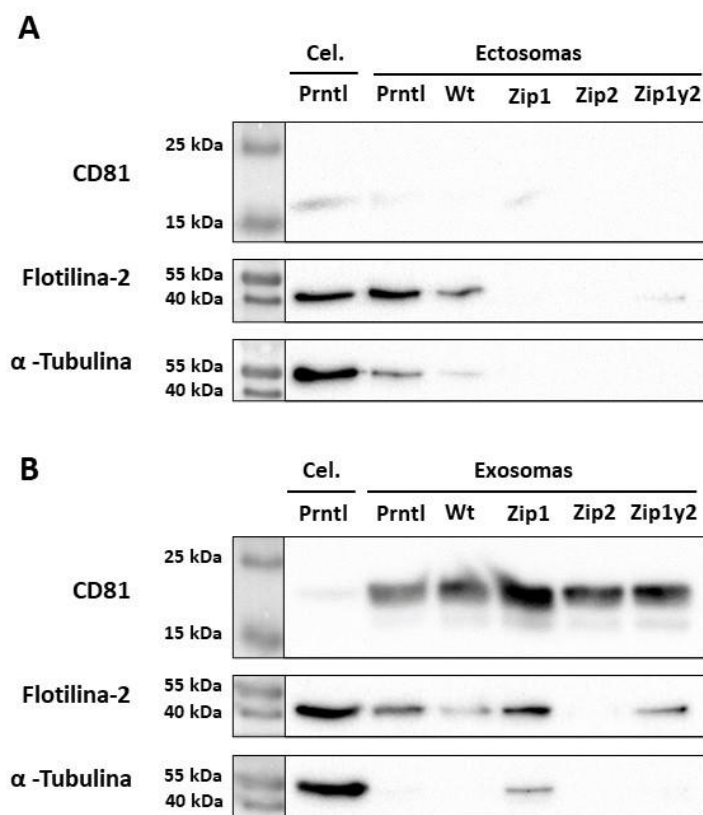


Figura 19. Determinación de la producción de ectosomas y exosomas por células 293T-sBG. Western blot de la expresión de las proteínas CD81, Flotilina-2 y α -Tubulina en ectosomas (A) y exosomas (B) derivados de células 293T-sBG. Los pesos moleculares de las proteínas se indican a la izquierda de las imágenes. Cel: Células; Prntl: Parental; Wt: Silvestre; Zip: Código postal. Las imágenes de las membranas de Western blot sin cortar se muestran en los anexos.

Posteriormente se midieron por RT-qPCR los niveles de *sBG-Myc* en las células, ectosomas y exosomas. El ARNm *sBG-Myc* se encuentra en todas las células 293T transducidas, con niveles más elevados para los ARNm con Zip1 y Zip1y2 en comparación con los ARNm de sBG silvestre (Wt, por sus siglas en inglés) (3 y

1.3 veces más, respectivamente) (Figura 20). De la misma manera, *sBG-Myc* se encuentra presente en los ectosomas, con niveles más altos si el ARNm cuenta con una secuencia Zip (8.8 y 2.6 veces más para Zip 1 y Zip2, respectivamente) o dos secuencias (5.5 veces más para Zip1y2) (Figura 20). En los exosomas, el ARNm de *sBG-Myc* se encuentra también presente, sin embargo, en cantidades 40 veces menores comparado con sus células de procedencia (Figura 20). De manera similar a los niveles en las células, se detectó en los exosomas un incremento de la cantidad de ARNm de *sBG-Myc* con una secuencia Zip (Zip1) o dos secuencias Zip (Zip1y2) (2.5 y 2 veces más, respectivamente) (Figura 20). Los resultados indican que los códigos postales no aumentan la transferencia de ARNm *sBG-Myc* a los exosomas y que los niveles dependen de la cantidad inicial en las células. Sin embargo, en los ectosomas los códigos postales si tienen un efecto aumentando la transferencia de ARNm. A partir de estos resultados se decidió continuar trabajando únicamente con exosomas derivados de las células sBG-Zip1, al tener mayor cantidad de ARNm de sBG en comparación con los exosomas de las otras líneas generadas.

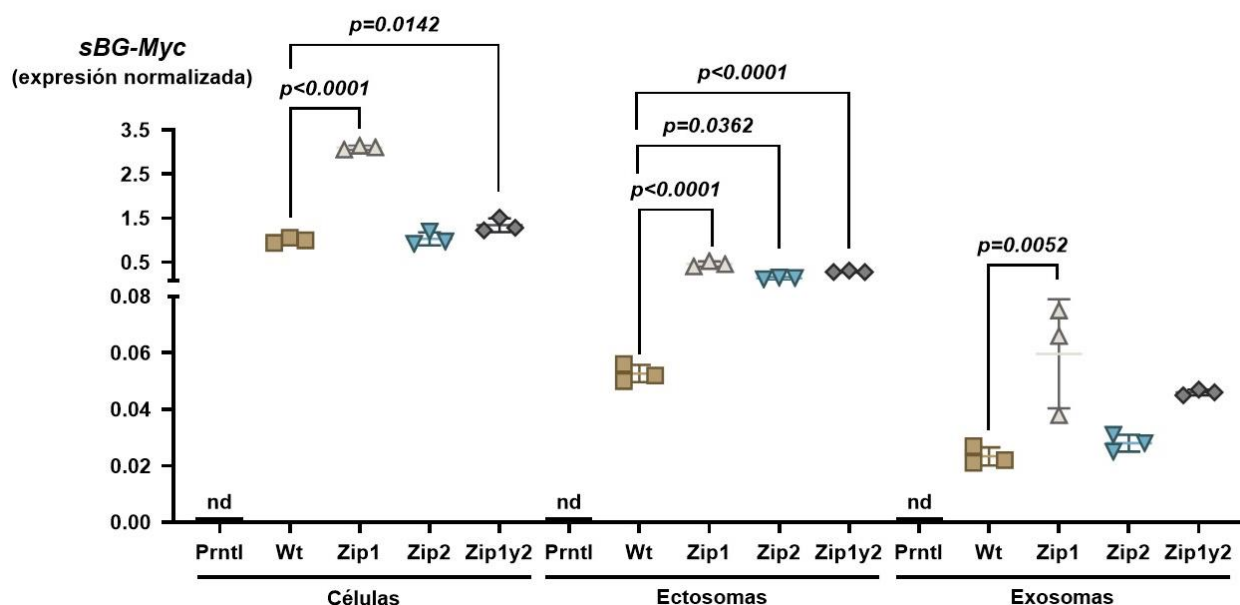


Figura 20. Niveles de los ARNm de sBG-Myc en células, ectosomas y exosomas 293T-sBG. Niveles de los ARNm de sBG-Myc con y sin códigos postales, medidos por RT-qPCR en extractos de células, exosomas y ectosomas y normalizado con el gen *RPL32*. Representación de los valores individuales, con barras que indican el promedio $\pm$ error estándar ($n = 3$). Análisis ANOVA de 1 vía con prueba Dunnett. Los valores de p se indican en la gráfica. Prntl: Parental; Wt: Silvestre; sBG: Betaglicano soluble; Zip: Código postal; nd: no detectado.

3.5 Evaluación de la capacidad de los exosomas para entregar al ARNm de sBG a células RAW 264.7 e inducir la producción de sBG.

3.5.1 Medición de la internalización de exosomas por las células RAW 264.7

Al confirmar que los exosomas contienen el ARNm de sBG-Myc, se evaluó la capacidad de las células RAW 264.7 para internalizar exosomas y poder ser utilizadas como modelo de células de Kupffer. Además, también se decidió evaluar si hay internalización de otro tipo de vesículas extracelulares, como ectosomas. Se añadieron entre 0.5 a 2.5 μg de exosomas y de 0.5 a 1 μg de ectosomas teñidos con SP-DiI_{C18} a células RAW 264.7 por 24h. Se realizó una contra tinción de los núcleos celulares con DAPI y se tomaron fotografías con el microscopio de fluorescencia (Figura 21A). Posteriormente se cuantificó por citometría de flujo la internalización de vesículas y se obtuvo que más del 95% de las células recibieron exosomas o ectosomas desde la concentración más baja (Figura 21B). Además, al aumentar la concentración de vesículas se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia en las células, lo que sugiere que hay mayor número de vesículas internalizadas por cada célula (Figura 21C). Esto confirma que las células RAW 264.7 pueden internalizar diversos tipos de vesículas, entre ellas exosomas y por tanto funcionar como un modelo de células de Kupffer.

3.5.2 Los exosomas y ectosomas entregan al ARNm de sBG a las células RAW 264.7 e inducen la producción de sBG

Para determinar si los exosomas y ectosomas entregaban el ARNm de sBG a las células RAW 264.7 y si podían inducir la producción de la proteína, se trataron células RAW 264.7 con 6 o 15 μg de exosomas o ectosomas de células 293T-sBG-Zip1 por 24 horas. Evaluamos por RT-qPCR la presencia del ARNm *sBG-Myc* en las células y por Western blot la presencia de la proteína en los medios condicionados. La RT-qPCR indicó la presencia del ARNm *sBG-Myc* en las células con tratamiento, aunque en bajas cantidades (Figura 22A). Los productos de amplificación de la RT-qPCR se corrieron en un gel de agarosa y se detectó una banda para sBG-Myc en las células que recibieron exosomas o ectosomas, pero no en el control (Figura 22B). En el Western blot se observó una ligera banda únicamente en los medios condicionados de las células tratadas con exosomas (Figura 22C). Los resultados indican que los exosomas y ectosomas

transfieren el ARNm de sBG-Myc a las células RAW 264.7 y que, además los exosomas también inducen la producción de sBG-Myc a nivel proteína.

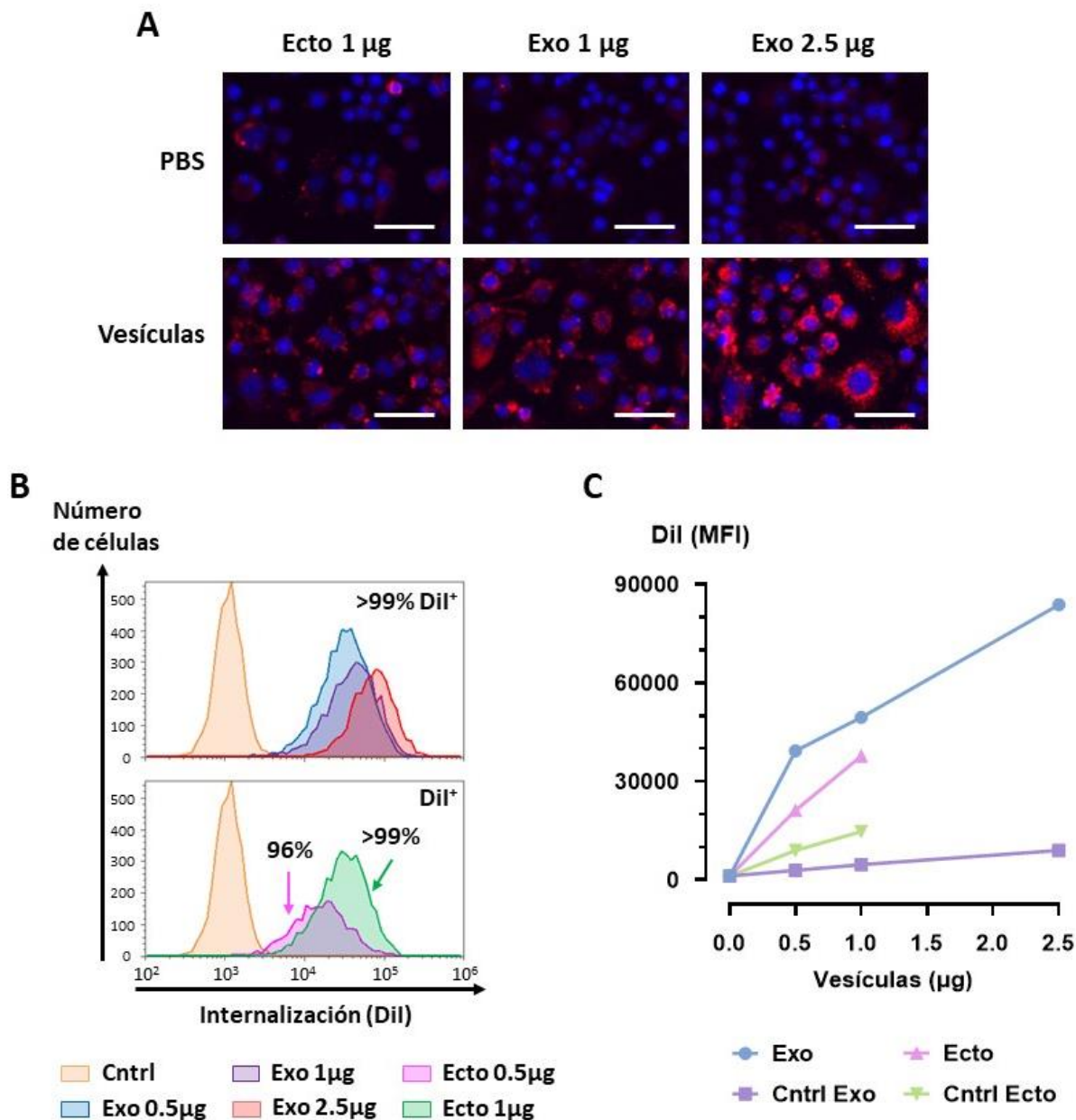


Figura 21. Las células RAW 264.7 internalizan exosomas y ectosomas. Se trataron células RAW 264.7 con exosomas y ectosomas y se cuantificó la internalización de vesículas. (A) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de las células; en azul se observan los núcleos y en rojo las células. Barra de escala: 50 μm . (B) Histogramas representativos de la internalización de vesículas por las células RAW 264.7. (C) Representación gráfica de la intensidad media de fluorescencia de las células que internalizaron exosomas o ectosomas. Cntrl: células sin exosomas; MFI: Intensidad media de fluorescencia.

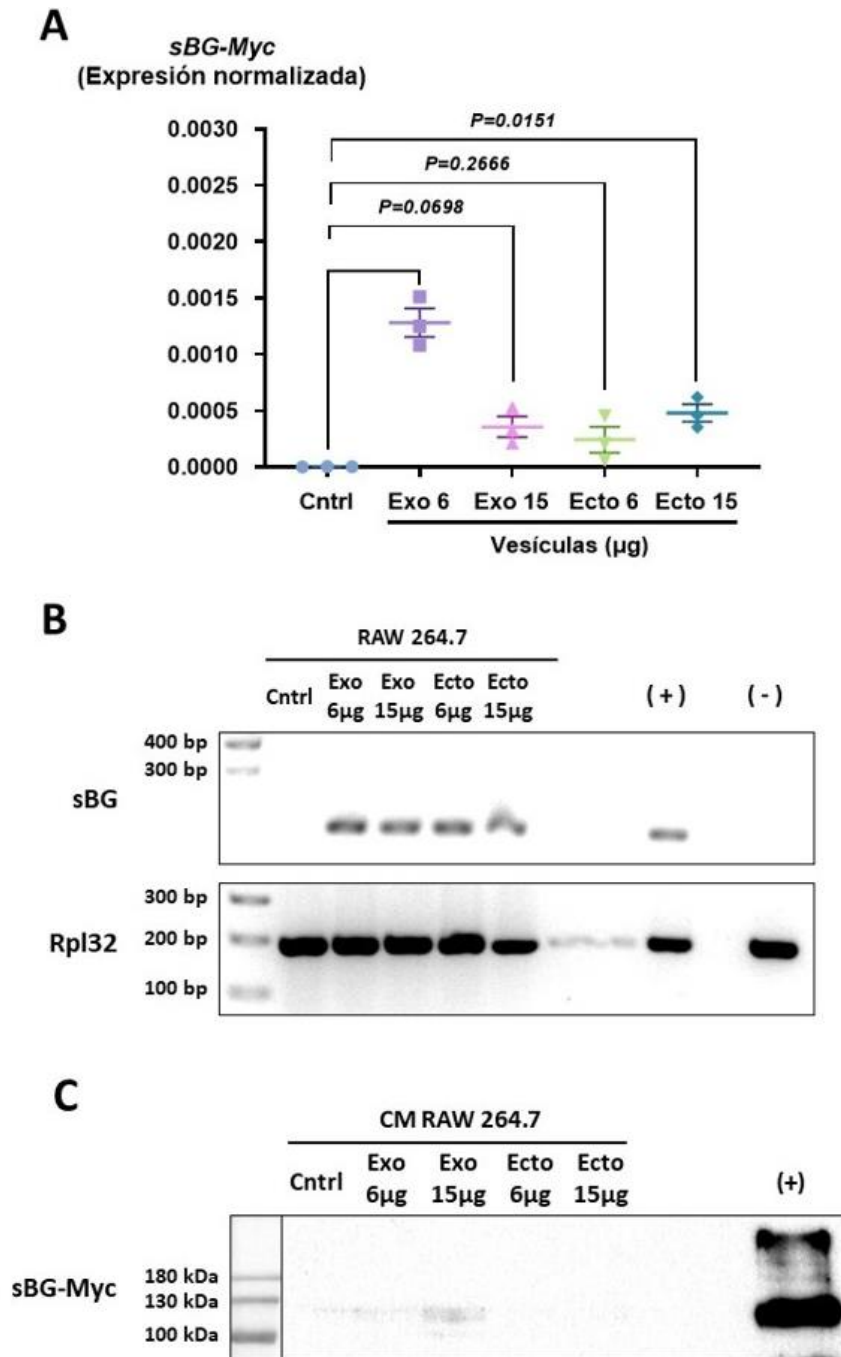


Figura 22. Los exosomas entregan el ARNm de sBG a células RAW 264.7 e inducen la producción de sBG. Se trataron células RAW 264.7 con exosomas o ectosomas de células 293T-sBG-Zip1 y se determinó la presencia del ARNm de sBG-Myc en las células por RT-qPCR y la proteína en el medio condicionado por Western blot. (A) Niveles del ARNm de sBG-Myc normalizado con el gen *RPL32*. Representación de los valores individuales, con barras que indican el promedio $\pm$ error estándar ($n = 3$). Análisis ANOVA de 1 vía con prueba Dunnett. Los valores de p se indican en la gráfica. (B) Productos de amplificación de la RT-qPCR analizados en gel de agarosa. (C) Western blot de la evaluación de la presencia de sBG-Myc en los medios condicionados. Los pesos moleculares de los ADN y de las proteínas se indican a la izquierda de las imágenes. Cntrl: Control; sBG: Betaglicano soluble. Las imágenes de las membranas de Western blot sin cortar se muestran en los anexos.

3.6 Evaluación de la neutralización de la vía de señalización del TGF- β en células Hep G2, inducida por los exosomas con ARNm de sBG

Finalmente evaluamos la capacidad de los exosomas para inducir la neutralización de la vía del TGF- β en Hep G2. Se trataron células Hep G2 con medios condicionados de células RAW 264.7 cultivadas con exosomas o ectosomas sBG-Zip1. Se utilizaron los medios producidos en el punto 3.5.2. Por medio de Western blot medimos la activación de la vía del TGF- β . Con los medios condicionados de ectosomas o 15 μ g de exosomas la fosforilación de SMAD2/3 fue igual o mayor a la producida por las células RAW 264.7 sin tratamiento (Figura 23). Sin embargo, con los medios condicionados de células RAW 264.7 tratadas con 6 μ g de exosomas obtuvimos una reducción del 50% en la fosforilación de SMAD2/3, en comparación con la fosforilación inducida por las células RAW 264.7 sin tratamiento (Figura 23). Con estos resultados se determina que los exosomas cargados con ARNm de sBG pueden neutralizar el TGF- β en un modelo de nicho pre-metastásico hepático.

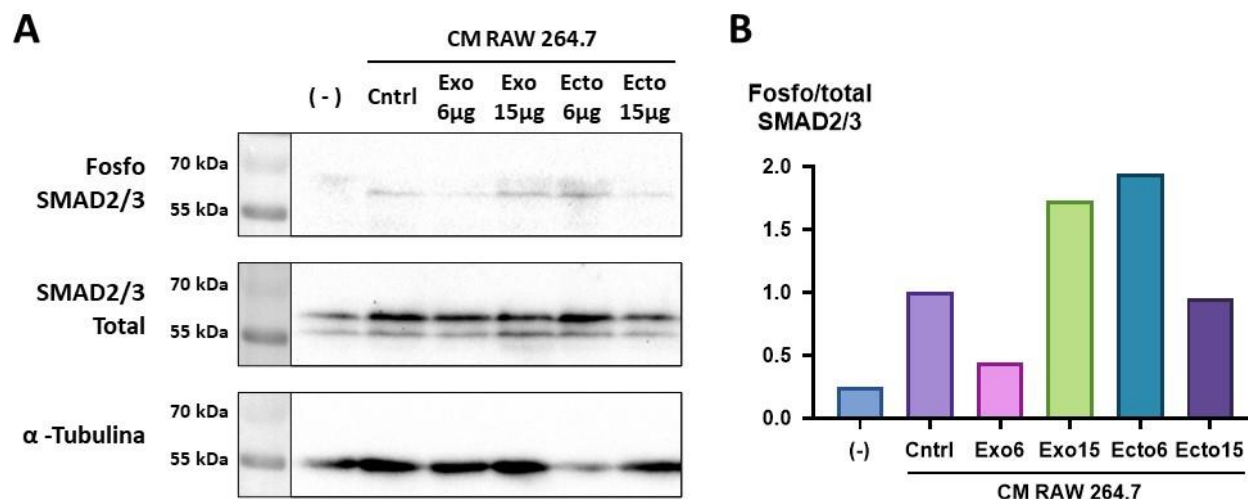


Figura 23. Efecto del medio condicionado de las RAW 264.7 tratadas con exosomas o ectosomas sBG-Zip1 en la activación de la vía del TGF- β en Hep G2. (A) Western blot de los niveles las proteínas SMAD2/3 fosforiladas y total en células Hep G2 tratadas con medios condicionados de células RAW 264.7 que recibieron exosomas o ectosomas sBG-Zip1. Los pesos moleculares de las proteínas se indican la izquierda de las imágenes de Western blot. (B) Representación de los niveles de SMAD2/3 fosforiladas normalizados a SMAD2/3 total en las células Hep G2 tratadas. CM: Medio condicionado; Cntrl: Control. Las imágenes de las membranas de Western blot sin cortar se muestran en los anexos.

Capítulo 4. Discusión

La metástasis al hígado son tumores que se forman a partir de células cancerosas provenientes de tumores de otras partes del cuerpo. El cáncer colorrectal, el cáncer pancreático, el cáncer de mama, el cáncer de pulmón y el melanoma son algunos tipos de cáncer que se diseminan al hígado. Cuando los pacientes presentan metástasis al hígado las tasas de supervivencia son bajas, desde una supervivencia a 5 años entre 20-50% (cáncer colorrectal), hasta una supervivencia media de 6 meses (cáncer pancreático) (Tsilimigras et al., 2021). Una vez que las células tumorales salen de los vasos sanguíneos se enfrentan a condiciones diferentes a las del tumor primario, razón por la cual la colonización del nuevo órgano es el cuello de botella de la metástasis. Para favorecer la colonización y la metástasis el tumor primario crea un ambiente favorable en el sitio de metástasis antes de la llegada de las células cancerosas, conocido como nicho pre-metastásico. Para formar el nicho pre-metastásico hepático, en el cáncer pancreático se ha descrito que el tumor libera exosomas que son captados por las KCs y estas en respuesta secretan TGF- β (Costa-Silva et al., 2015). El TGF- β activa a las hStC que en consecuencia liberan fibronectina, en donde macrófagos residentes de la médula ósea se adhieren y juntos crean un ambiente favorable para las células cancerosas. Debido a que el TGF- β es un punto inicial en la formación del nicho pre-metastásico hepático, en este proyecto se planteó utilizar exosomas para transportar ARNm de betaglicano soluble, un inhibidor del TGF- β , de modo que se pueda reducir la formación del nicho pre-metastásico hepático y la metástasis al hígado.

Para simular *in vitro* el nicho pre-metastásico hepático se utilizaron macrófagos RAW 264.7 como un modelo de células de Kupffer, los macrófagos residentes del hígado, y células de hepatocarcinoma Hep G2 como modelo de células estrelladas hepáticas, para evaluar la respuesta de la vía del TGF- β . La activación de la vía de la señalización del TGF- β se midió mediante la fosforilación de las R-SMADs, utilizando un anticuerpo contra la forma fosforilada de SMAD2 y SMAD3. Sin embargo, en los ensayos realizados únicamente se observa una banda, que al compararla con el peso molecular de SMAD2/3 total se determina que se trata de SMAD2 fosforilada, por lo que al final, la activación de la vía de la señalización del TGF- β se determinó mediante la fosforilación de SMAD2. Las células RAW 264.7 produjeron TGF- β que activó la vía de señalización del TGF- β en células Hep G2. Al cultivar las células RAW 264.7 con LPS aumentó la fosforilación de SMAD2, lo que sugiere que aumenta la producción de TGF- β , reafirmando lo descrito por Ferré et al. (2009) en donde utilizan LPS para estimular la producción de TGF- β 1 por las células RAW 264.7. Naturalmente las células producen el TGF- β en un estado latente, que debe ser activado para poder desarrollar su papel como citocina (Aubert et al., 2021). Al utilizar el medio condicionado de las RAW 264.7

sin activación, pero tratadas con LPS se observó fosforilación de SMAD2, y al activar el TGF- β en el medio hubo mayor fosforilación de SMAD2, lo que indica que en presencia de LPS, en el medio condicionado de las RAW 264.7 hay TGF- β tanto en su forma latente como en su forma activa. La activación *in vitro* del TGF- β se realizó por un proceso de acidificación que se hipotetiza pudiera afectar la función del sBG. Ya que se encontró que en presencia de LPS las RAW producen suficiente TGF- β ya activado para estimular esta vía de señalización en células Hep G2, se decidió trabajar con los medios condicionados sin activación, sin embargo, no se evaluó si la acidificación tiene un efecto en la función del sBG.

Para ver el efecto del TGF- β en células Hep G2 a nivel expresión de genes, probamos *FN1*, considerando que en el nicho pre-metastásico hepático el TGF- β activa este gen (Costa-Silva et al., 2015), sin embargo, no hubo variación en los niveles de expresión de *FN1*. Al analizar los CT de los genes amplificados, observamos que el CT para el gen de referencia *RPL32*, que tiene una alta expresión, fue de 18.71 ± 0.153 , mientras que *FN1* presentó un CT de 16.51 ± 0.149 (datos no presentados), lo que indica que *FN1* tiene una expresión más alta que *RPL32*. Es por esto que la estimulación de las células Hep G2 con TGF- β no aumentó la expresión de este gen, sino hasta concentraciones de 50pM de TGF- β 1 recombinante. En el cáncer, el TGF- β promueve la invasión y metástasis mediante la inducción de la transición epitelio mesénquima. Debido a que las Hep G2 son células de cáncer se decidió buscar genes que se vean aumentados por TGF- β en estas células. Se ha reportado que en presencia de TGF- β el marcador de células mesenquimales N-cadherina aumenta su expresión, por lo que se decidió evaluar este gen (Lin et al., 2018). En los resultados observamos que a partir de 10pM de TGF- β por 24 horas aumentó la expresión de N-Cadherina. Lin et al. (2018) utilizaron 10 μ M de TGF- β por 48 horas para inducir la transición epitelio mesénquima y con esta concentración observaron un aumento en N-cadherina. Nosotros obtuvimos que desde una concentración 1×10^6 veces menor de TGF- β aumenta la expresión de N-cadherina. Debido a que el medio condicionado de las RAW 264.7 no aumentó la expresión de N-Cadherina y que la fosforilación de SMAD2/3 es muy ligera, esto sugiere que en las condiciones utilizadas las RAW producen cantidades menores de 10pM de TGF- β . A pesar de que las RAW 264.7 producen suficiente TGF- β para inducir la fosforilación de la proteína SMAD2 en Hep G2, los niveles no son suficientes para ver un efecto en la expresión de genes.

El modelo utilizado sirve para dar un primer indicio que lo que pudiera suceder en el nicho pre-metastásico, sin embargo, las células utilizadas no son las mismas que se encuentran en el hígado. Estas células se utilizaron debido a que ya se encontraban disponibles en el laboratorio y tienen características de interés. Las células RAW 264.7 son macrófagos al igual que las células de Kupffer, sin embargo, son aislados de un tumor de leucemia murina. Las células Hep G2 son una línea celular de hepatocarcinoma

que tiene buena sensibilidad al TGF- β , pero tienen un fenotipo diferente a las células estrelladas hepáticas. Las Hep G2 son células epiteliales, mientras que las estrelladas hepáticas son células mesenquimales que naturalmente se encuentran en estado quiescente con baja proliferación y actividad metabólica. Las células estrelladas hepáticas se pueden obtener a partir de hígado y realizar cultivo primario, sin embargo, el aislamiento es complejo, el tiempo de vida de los cultivos primarios es corto, y estas células al sembrarse en placas de cultivo tienen una rápida activación que dificulta los ensayos (Vallverdú et al., 2021). Las células Hep G2 al ser una línea celular inmortalizada no presenta las dificultades de cultivo que las células estrelladas, y pueden ser utilizadas como modelo para una aproximación de los efectos del TGF- β . Debido a que los ensayos se realizaron en un modelo aproximado de nicho pre-metastásico hepático, los resultados se deben validar utilizando células de Kupffer y células estrelladas hepáticas, y posteriormente en un modelo *in vivo*.

Por otra parte, el aislamiento de exosomas con el método de precipitación por PEG generó gran artefacto de tinción, creando falsos positivos en la internalización de exosomas, además que el marcador de exosomas no se pudo detectar. El aislamiento de exosomas por precipitación con polímeros tiene la ventaja de ser un método relativamente sencillo y que no requiere de aparatos especiales, sin embargo, es un método que a pesar de tener alto rendimiento tiene baja pureza, ya que sedimenta una mayor diversidad de partículas, además de dejar residuos de polímero en las muestras (Gámez-Valero et al., 2016).

El método de ultracentrifugación es una buena técnica de aislamiento, sin embargo, fue necesario una estandarización larga. Anteriormente se trató de utilizar este método en el grupo de laboratorio utilizando el protocolo propuesto por Théry et al. (2006), sin embargo, el campo de investigación en exosomas empezaba a crecer y mucha información no se encontraba detallada. Tal es el caso del factor k de formación del pellet de los rotores, que no se especificaba en los artículos, y este factor es necesario para poder reproducir los resultados y ajustar el tiempo de centrifugación al rotor disponible. Debido a los grandes problemas que se han presentado para reproducir resultados publicados, la sociedad internacional de vesículas extracelulares (ISEV, por sus siglas en inglés) propuso en el 2018 una guía con la información mínima para el estudio de vesículas extracelulares y la publicación artículos relacionados, en donde se describe que es necesario especificar el tipo de rotor y el factor k (Théry et al., 2018).

Los códigos postales no tuvieron un efecto en la transferencia de ARNm a exosomas. Sin embargo, se cree que esto es debido al tamaño del ARNm de sBG y no al código postal. El vector pLJM1 utilizado para hacer la transducción genera un ARNm de sBG-Myc con una sección 3'UTR muy larga. Posterior al gen de sBG-

Myc no hay una señal de poliadenilación inmediata para terminar la transcripción, por lo que la polimerasa continúa transcribiendo la secuencia lentiviral cPPT/CTS y el gen de resistencia a la puromicina. Al terminar, el tamaño del ARNm que se produce es de aproximadamente 4,120nt, de los cuales únicamente 2,200nt corresponden al sBG-Myc. Para los exosomas se ha descrito que el tamaño de los ARNm presentes varía entre 25-4,000nt y preferentemente se encuentran ARNm pequeños (Berardocco et al., 2017; He et al., 2015). Esto explica las bajas cantidades encontradas en los exosomas. Además, otro factor que puede influir es que los exosomas provenientes de células 293T-sBG-Zip1 son principalmente pequeños, con diámetros entre 30 a 50nm.

Por otra parte, en los ectosomas, que miden arriba de 100nm y hasta 1 μ m, los niveles de ARNm de sBG son 19 veces menores que en las células para los que no contienen códigos postales (sBG-Wt), mientras que los que contienen códigos postales tienen niveles 6 veces menores que las células, lo que sugiere que los códigos postales sí afectan la transferencia de ARNm a ectosomas. En los ectosomas provenientes de células con códigos postales hay 3 veces más ARNm de sBG que en los provenientes de células sBG-Wt. Lo que sugiere que la secuencia de 25 nucleótidos es un mecanismo para aumentar la transferencia de ARNm a vesículas extracelulares y no específicamente a exosomas.

Las células RAW 264.7 presentaron una buena internalización de exosomas y ectosomas (>95%), sin embargo, debido a las bajas cantidades de ARNm de sBG-Myc encontradas en los exosomas, el ARNm transferido a las células RAW 264.7 fue poco y por ende se secretó poco sBG a los medios condicionados. A pesar de los bajos niveles de sBG se logró tener un efecto en la neutralización de la vía de señalización del TGF- β en Hep G2 con 6 μ g de exosomas. Con la cantidad mayor de exosomas (15 μ g) no fue posible ver un efecto neutralizante del TGF- β a pesar de que se detectó el ARNm de sBG en las células RAW 264.7 y la proteína en el medio condicionado. Por los tiempos solo fue posible realizar el ensayo de neutralización una vez, por lo que se sugiere repetir el experimento para evaluar la reproducibilidad de los resultados. Finalmente, es necesario mejorar la transferencia de ARNm a los exosomas con el fin de tener un efecto terapéutico. Por lo que se sugiere utilizar un sistema que produzca el ARNm de sBG más corto, o utilizar otros sistemas de silenciamiento como miRNA o shRNA.

Capítulo 5. Conclusiones

Se desarrolló un modelo de nicho pre-metastásico hepático utilizando macrófagos RAW 264.7 que activan la vía de señalización del TGF- β células Hep G2 de hepatocarcinoma.

Se modificaron células 293T que expresan la forma soluble del betaglicano de manera estable. Se estandarizó un método de aislamiento de exosomas y con este método se aislaron exosomas de las células 293-sBG produciendo sBG con y sin códigos postales. Estos exosomas contienen el ARNm del sBG. Los ectosomas aislados de estas células también contienen el ARNm de sBG. Los exosomas y los ectosomas son bien internalizados por las células RAW 264.7 (>95%) y transfieren el ARNm de sBG a las células. Las RAW 264.7 traducen este ARNm de sBG a proteína y la secretan al medio.

El sBG producido por las células RAW 264.7 tratadas con exosomas neutralizó la vía de señalización del TGF- β en células Hep G2, sin embargo, el efecto neutralizante se detectó solo en una condición. Esto puede ser debido a que las vesículas extracelulares tuvieron bajos niveles del ARNm de sBG y, en consecuencia, las células RAW 264.7 recibieron bajas cantidades del ARNm de sBG.

Se comprobó que los exosomas pueden ser utilizados como vehículos en la entrega de tratamientos del tipo ARNm, sin embargo, es necesario aumentar los niveles de ARNm en los exosomas para lograr obtener un efecto terapéutico.

Literatura citada

- Aubert, A., Mercier-Gouy, P., Agüero, S., Berthier, L., Liot, S., Prigent, L., Alcaraz, L. B., Verrier, B., Terreux, R., Moali, C., Lambert, E., y Valcourt, U. 2021. Latent TGF- β Activation Is a Hallmark of the Tenascin Family. *Frontiers in Immunology*, 12, pp 613438. doi: 10.3389/fimmu.2021.613438
- Bandyopadhyay, A., Wang, L., López-Casillas, F., Mendoza, V., Yeh, I. T., y 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. *Prostate*, 63(1), pp. 81–90. doi: 10.1002/pros.20166
- Batlle, E. y Massagué, J. 2019. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*, 50(4), pp 924-940. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.024
- Berardocco, M., Radeghieri, A., Busatto, S., Gallorini, M., Raggi, C., Gissi, C., D'Agnano, I., Bergese, P., Felsani, A., y Berardi, A. C. 2017. RNA-seq reveals distinctive RNA profiles of small extracellular vesicles from different human liver cancer cell lines. *Oncotarget*, 8(47), pp. 82920–82939. doi: 10.18632/oncotarget.20503
- Bolukbasi, M. F., Mizrak, A., Ozdener, G. B., Madlener, S., Ströbel, T., Erkan, E. P., Fan, J. B., Breakefield, X. O., y Saydam, O. 2012. MiR-1289 and “zipcode”-like sequence enrich mRNAs in microvesicles. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 1(2), pp. e10. doi: 10.1038/mtna.2011.2
- Charan, M., Dravid, P., Cam, M., Setty, B., Roberts, R. D., Houghton, P. J., y Cam, H. 2020. Tumor secreted ANGPTL2 facilitates recruitment of neutrophils to the lung to promote lung pre-metastatic niche formation and targeting ANGPTL2 signaling affects metastatic disease. *Oncotarget*, 11(5), pp. 510–522. doi: 10.18632/oncotarget.27433
- Colunga Flores, O. 2022. Inhibición del TGF-Beta por medio de exosomas cargados con mRNA de betaglicano soluble. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 75 pp.
- Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B. K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M. T., Molina, H., Xiang, J., Zhang, T., Theilen, T. M., García-Santos, G., Williams, C., Ararso, Y., Huang, Y., Rodrigues, G., Shen, T. L., Labori, K. J., Lothe, I. M. B., Kure, E. H., Hernandez, J., Doussot, A., Ebbesen, S. H., Grandgenett, P. M., Hollingsworth, M. A., Jain, M., Mallya, K., Batra, S. K., Jarnagin, W. R., Schwartz, R. E., Matei, I., Peinado, H., Stanger, B. Z., Bromberg, J., y Lyden, D. 2015. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature Cell Biology*, 17(6), pp. 816–826. doi: 10.1038/ncb3169
- Cox, T. R., Rumney, R. M. H., Schoof, E. M., Perryman, L., Høye, A. M., Agrawal, A., Bird, D., Latif, N. A., Forrest, H., Evans, H. R., Huggins, I. D., Lang, G., Linding, R., Gartland, A., y Erler, J. T. 2015. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature*, 522(7554), pp. 106–110. doi: 10.1038/nature14492
- Derynck, R. y Budi, E. H. 2019. Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling. *Science Signaling*, 12(570), pp eaav5183. doi: 10.1126/scisignal.aav5183
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. 2020. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.

Consultado el 27 de septiembre de 2022, de: <https://gco.iarc.fr/today>

- Ferré, N., Martínez-Clemente, M., López-Parra, M., González-Pérez, A., Horrillo, R., Planagumà, A., Camps, J., Joven, J., Tres, A., Guardiola, F., Bataller, R., Arroyo, V., y Clària, J. 2009. Increased susceptibility to exacerbated liver injury in hypercholesterolemic ApoE-deficient mice: Potential involvement of oxysterols. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(3), pp. 553–562. doi: 10.1152/ajpgi.00547.2007
- Formenti, S. C., Lee, P., Adams, S., Goldberg, J. D., Li, X., Xie, M. W., Ratikan, J. A., Felix, C., Hwang, L., Faull, K. F., Sayre, J. W., Hurvitz, S., Glaspy, J. A., Comin-Anduix, B., Demaria, S., Schaeue, D., y McBride, W. H. 2018. Focal irradiation and systemic TGF β blockade in metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 24(11), pp. 2493–2504. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3322
- Gámez-Valero, A., Monguió-Tortajada, M., Carreras-Planella, L., Franquesa, M., Beyer, K., y Borràs, F. E. 2016. Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents. *Scientific Reports*, 6, pp. 33641. doi: 10.1038/srep33641
- 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 en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 71 pp.
- Gatza, C. E., Oh, S. Y., y Blobel, G. C. 2010. Roles for the type III TGF- β receptor in human cancer. *Cellular Signalling*, 22(8), pp. 1163–1174. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.01.016
- He, M., Qin, H., Poon, T. C. W., Sze, S. C., Ding, X., Co, N. N., Ngai, S. M., Chan, T. F., y Wong, N. 2015. Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs. *Carcinogenesis*, 36(9), pp. 1008–1018. doi: 10.1093/carcin/bgv081
- Hoshino, A., Kim, H. S., Bojmar, L., Gyan, K. E., Cioffi, M., Hernandez, J., Zambirinis, C. P., Rodrigues, G., Molina, H., Heissel, S., Mark, M. T., Steiner, L., Benito-Martin, A., Lucotti, S., Di Giannatale, A., Offer, K., Nakajima, M., Williams, C., Nogués, L., Pelissier Vatter, F. A., Hashimoto, A., Davies, A. E., Freitas, D., Kenific, C. M., Ararso, Y., Buehring, W., Lauritzen, P., Ogitani, Y., Sugiura, K., Takahashi, N., Alečković, M., Bailey, K. A., Jolissant, J. S., Wang, H., Harris, A., Schaeffer, L. M., García-Santos, G., Posner, Z., Balachandran, V. P., Khakoo, Y., Raju, G. P., Scherz, A., Sagi, I., Scherz-Shouval, R., Yarden, Y., Oren, M., Malladi, M., Petriccione, M., De Braganca, K. C., Donzelli, M., Fischer, C., Vitolano, S., Wright, G. P., Ganshaw, L., Marrano, M., Ahmed, A., DeStefano, J., Danzer, E., Roehrl, M. H. A., Lacayo, N. J., Vincent, T. C., Weiser, M. R., Brady, M. S., Meyers, P. A., Wexler, L. H., Ambati, S. R., Chou, A. J., Slotkin, E. K., Modak, S., Roberts, S. S., Basu, E. M., Diolaiti, D., Krantz, B. A., Cardoso, F., Simpson, A. L., Berger, M., Rudin, C. M., Simeone, D. M., Jain, M., Ghajar, C. M., Batra, S. K., Stanger, B. Z., Bui, J., Brown, K. A., Rajasekhar, V. K., Healey, J. H., de Sousa, M., Kramer, K., Sheth, S., Baisch, J., Pascual, V., Heaton, T. E., La Quaglia, M. P., Pisapia, D. J., Schwartz, R., Zhang, H., Liu, Y., Shukla, A., Blavier, L., DeClerck, Y. A., LaBarge, M., Bissell, M. J., Caffrey, T. C., Grandgenett, P. M., Hollingsworth, M. A., Bromberg, J., Costa-Silva, B., Peinado, H., Kang, Y., Garcia, B. A., O'Reilly, E. M., Kelsen, D., Trippett, T. M., Jones, D. R., Matei, I. R., Jarnagin, W. R., y Lyden, D. 2020. Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers. *Cell*, 182(4), pp. 1044-1061.e18. doi: 10.1016/j.cell.2020.07.009
- Huynh, L. K., Hipolito, C. J., y Dijke, P. Ten. 2019. A perspective on the development of TGF- β inhibitors for cancer treatment. *Biomolecules*, 9(11), pp 743. doi: 10.3390/biom9110743

- Ji, Q., Zhou, L., Sui, H., Yang, L., Wu, X., Song, Q., Jia, R., Li, R., Sun, J., Wang, Z., Liu, N., Feng, Y., Sun, X., Cai, G., Feng, Y., Cai, J., Cao, Y., Cai, G., Wang, Y., y Li, Q. 2020. Primary tumors release ITGBL1-rich extracellular vesicles to promote distal metastatic tumor growth through fibroblast-niche formation. *Nature Communications*, 11(1), pp 1211. doi: 10.1038/s41467-020-14869-x
- Kalra, H., Drummen, G. P. C., y Mathivanan, S. 2016. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), pp 170. doi: 10.3390/ijms17020170
- Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D. D., Jin, D. K., Shido, K., Kerns, S. A., Zhu, Z., Hicklin, D., Wu, Y., Port, J. L., Altorki, N., Port, E. R., Ruggero, D., Shmelkov, S. V., Jensen, K. K., Rafii, S., y Lyden, D. 2005. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438(7069), pp. 820–827. doi: 10.1038/nature04186
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., y Théry, C. 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(8), pp. E968–E977. doi: 10.1073/pnas.1521230113
- Lin, X. L., Liu, M., Liu, Y., Hu, H., Pan, Y., Zou, W., Fan, X., y Hu, X. 2018. Transforming growth factor β 1 promotes migration and invasion in HepG2 cells: Epithelial-to-mesenchymal transition via JAK/STAT3 signaling. *International Journal of Molecular Medicine*, 41(1), pp. 129–136. doi: 10.3892/ijmm.2017.3228
- Liu, S., Ren, J., y ten Dijke, P. 2021. Targeting TGF β signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), pp. 8. doi: 10.1038/s41392-020-00436-9
- Liu, Y. y Cao, X. 2016. Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell*, 30(5), pp. 668–681. doi: 10.1016/j.ccell.2016.09.011
- Luzzi, K. J., MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Morris, V. L., Chambers, A. F., y Groom, A. C. 1998. Multistep nature of metastatic inefficiency: Dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *American Journal of Pathology*, 153(3), pp. 865–873. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65628-3
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., y Théry, C. 2019. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, 21(1), pp. 9–17. doi: 10.1038/s41556-018-0250-9
- O'Brien, K., Breyne, K., Ughetto, S., Laurent, L. C., y Breakefield, X. O. 2020. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(10), pp. 585–606. doi: 10.1038/s41580-020-0251-y
- OMS, 2022, febrero 2. Cáncer. Consultado el 12 de noviembre de 2022, de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Riihimäki, M., Thomsen, H., Sundquist, K., Sundquist, J., y Hemminki, K. 2018. Clinical landscape of cancer metastases. *Cancer Medicine*, 7(11), pp. 5534–5542. doi: 10.1002/cam4.1697
- Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L., y Sabatini, D. M. 2008.

- The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, 320(5882), pp. 1496–1501. doi: 10.1126/science.1157535
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., y Eliceiri, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), pp. 671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089
- Steeg, P. S. 2006. Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges. *Nature Medicine*, 12(8), pp. 895–904. doi: 10.1038/nm1469
- Stupp, R., Hegi, M. E., Gorlia, T., Erridge, S. C., Perry, J., Hong, Y. K., Aldape, K. D., Lhermitte, B., Pietsch, T., Grujicic, D., Steinbach, J. P. et al., Wick, W., Tarnawski, R., Nam, D. H., Hau, P., Weyerbrock, A., Taphoorn, M. J. B., Shen, C. C., Rao, N., Thurzo, L., Herrlinger, U., Gupta, T., Kortmann, R. D., Adamska, K., McBain, C., Brandes, A. A., Tonn, J. C. hristia., Schnell, O., Wiegel, T., Kim, C. Y., Nabors, L. B. ur., Reardon, D. A., van den Bent, M. J., Hicking, C., Markivskyy, A., Picard, M., y Weller, M. 2014. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 15(10), pp. 1100–1108. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70379-1
- Tan, Y., Luo, X., Lv, W., Hu, W., Zhao, C., Xiong, M., Yi, Y., Wang, D., Wang, Y., Wang, H., Wu, Y., y Zhang, Q. 2021. Tumor-derived exosomal components: the multifaceted roles and mechanisms in breast cancer metastasis. *Cell Death and Disease*, 12(6). doi: 10.1038/s41419-021-03825-2
- Teixeira, A. F., ten Dijke, P., y Zhu, H. J. 2020. On-Target Anti-TGF- β Therapies Are Not Succeeding in Clinical Cancer Treatments: What Are Remaining Challenges? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, pp 605. doi: 10.3389/fcell.2020.00605
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., y Clayton, A. 2006. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 30(1), pp. 1–29. doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., Beckham, C., Bedina Zavec, A., Benmoussa, A., Berardi, A. C., Bergese, P., Bielska, E., Blenkiron, C., Bobis-Wozowicz, S., Boilard, E., Boireau, W., Bongiovanni, A., Borràs, F. E., Bosch, S., Boulanger, C. M., Breakefield, X., Breglio, A. M., Brennan, M., Brigstock, D. R., Brisson, A., Broekman, M. L. D., Bromberg, J. F., Bryl-Górecka, P., Buch, S., Buck, A. H., Burger, D., Busatto, S., Buschmann, D., Bussolati, B., Buzás, E. I., Byrd, J. B., Camussi, G., Carter, D. R. F., Caruso, S., Chamley, L. W., Chang, Y. T., Chaudhuri, A. D., Chen, C., Chen, S., Cheng, L., Chin, A. R., Clayton, A., Clerici, S. P., Cocks, A., Cocucci, E., Coffey, R. J., Cordeiro-da-Silva, A., Couch, Y., Coumans, F. A. W., Coyle, B., Crescitelli, R., Criado, M. F., D'Souza-Schorey, C., Das, S., de Candia, P., De Santana, E. F., De Wever, O., del Portillo, H. A., Demaret, T., Deville, S., Devitt, A., Dhondt, B., Di Vizio, D., Dieterich, L. C., Dolo, V., Dominguez Rubio, A. P., Dominici, M., Dourado, M. R., Driedonks, T. A. P., Duarte, F. V., Duncan, H. M., Eichenberger, R. M., Ekström, K., EL Andaloussi, S., Elie-Caille, C., Erdbrügger, U., Falcón-Pérez, J. M., Fatima, F., Fish, J. E., Flores-Bellver, M., Försonits, A., Frelet-Barrand, A., Fricke, F., Fuhrmann, G., Gabrielsson, S., Gámez-Valero, A., Gardiner, C., Gärtner, K., Gaudin, R., Ghossein, Y. S., Giebel, B., Gilbert, C., Gimona, M., Giusti, I., Goberdhan, D. C. I., Görgens, A., Gorski, S. M., Greening, D. W., Gross, J. C., Gualerzi, A., Gupta, G. N., Gustafson, D., Handberg, A., Haraszti, R. A., Harrison, P., Hegyesi, H., Hendrix, A., Hill, A. F., Hochberg, F. H., Hoffmann, K. F., Holder, B., Holthofer, H., Hosseinkhani, B., Hu, G., Huang, Y., Huber, V., Hunt, S., Ibrahim, A. G. E., Ikezu, T., Inal, J. M., Isin, M., Ivanova, A., Jackson, H. K.,

- Jacobsen, S., Jay, S. M., Jayachandran, M., Jenster, G., Jiang, L., Johnson, S. M., Jones, J. C., Jong, A., Jovanovic-Talisman, T., Jung, S., Kalluri, R., Kano, S. ichi, Kaur, S., Kawamura, Y., Keller, E. T., Khamari, D., Khomyakova, E., Khvorova, A., Kierulf, P., Kim, K. P., Kislinger, T., Klingeborn, M., Klinke, D. J., Kornek, M., Kosanović, M. M., Kovács, Á. F., Krämer-Albers, E. M., Krasemann, S., Krause, M., Kurochkin, I. V., Kusuma, G. D., Kuypers, S., Laitinen, S., Langevin, S. M., Languino, L. R., Lannigan, J., Lässer, C., Laurent, L. C., Lavieu, G., Lázaro-Ibáñez, E., Le Lay, S., Lee, M. S., Lee, Y. X. F., Lemos, D. S., Lenassi, M., Leszczynska, A., Li, I. T. S., Liao, K., Libregts, S. F., Ligeti, E., Lim, R., Lim, S. K., Linē, A., Linnemannstöns, K., Llorente, A., Lombard, C. A., Lorenowicz, M. J., Lörincz, Á. M., Lötvall, J., Lovett, J., Lowry, M. C., Loyer, X., Lu, Q., Lukomska, B., Lunavat, T. R., Maas, S. L. N., Malhi, H., Marcilla, A., Mariani, J., Mariscal, J., Martens-Uzunova, E. S., Martin-Jaular, L., Martinez, M. C., Martins, V. R., Mathieu, M., Mathivanan, S., Maugeri, M., McGinnis, L. K., McVey, M. J., Meckes, D. G., Meehan, K. L., Mertens, I., Minciocchi, V. R., Möller, A., Møller Jørgensen, M., Morales-Kastresana, A., Morhayim, J., Mullier, F., Muraca, M., Musante, L., Mussack, V., Muth, D. C., Myburgh, K. H., Najrana, T., Nawaz, M., Nazarenko, I., Nejsun, P., Neri, C., Neri, T., Nieuwland, R., Nimrichter, L., Nolan, J. P., Nolte-'t Hoen, E. N. M., Noren Hooten, N., O'Driscoll, L., O'Grady, T., O'Loghlen, A., Ochiya, T., Olivier, M., Ortiz, A., Ortiz, L. A., Osteikoetxea, X., Ostegaard, O., Ostrowski, M., Park, J., Pegtél, D. M., Peinado, H., Perut, F., Pfaffl, M. W., Phinney, D. G., Pieters, B. C. H., Pink, R. C., Pisetsky, D. S., Pogge von Strandmann, E., Polakovicova, I., Poon, I. K. H., Powell, B. H., Prada, I., Pulliam, L., Quesenberry, P., Radeghieri, A., Raffai, R. L., Raimondo, S., Rak, J., Ramirez, M. I., Raposo, G., Rayyan, M. S., Regev-Rudzki, N., Ricklefs, F. L., Robbins, P. D., Roberts, D. D., Rodrigues, S. C., Rohde, E., Rome, S., Rouschop, K. M. A., Rugghetti, A., Russell, A. E., Saá, P., Sahoo, S., Salas-Huenuleo, E., Sánchez, C., Saugstad, J. A., Saul, M. J., Schiffelers, R. M., Schneider, R., Schøyen, T. H., Scott, A., Shahaj, E., Sharma, S., Shatnyeva, O., Shekari, F., Shelke, G. V., Shetty, A. K., Shiba, K., Siljander, P. R. M., Silva, A. M., Skowronek, A., Snyder, O. L., Soares, R. P., Sódar, B. W., Soekmadji, C., Sotillo, J., Stahl, P. D., Stoorvogel, W., Stott, S. L., Strasser, E. F., Swift, S., Tahara, H., Tewari, M., Timms, K., Tiwari, S., Tixeira, R., Tkach, M., Toh, W. S., Tomasini, R., Torrecilhas, A. C., Tosar, J. P., Toxavidis, V., Urbanelli, L., Vader, P., van Balkom, B. W. M., van der Grein, S. G., Van Deun, J., van Herwijnen, M. J. C., Van Keuren-Jensen, K., van Niel, G., van Royen, M. E., van Wijnen, A. J., Vasconcelos, M. H., Vechetti, I. J., Veit, T. D., Vella, L. J., Velot, É., Verweij, F. J., Vestad, B., Viñas, J. L., Visnovitz, T., Vukman, K. V., Wahlgren, J., Watson, D. C., Wauben, M. H. M., Weaver, A., Webber, J. P., Weber, V., Wehman, A. M., Weiss, D. J., Welsh, J. A., Wendt, S., Wheelock, A. M., Wiener, Z., Witte, L., Wolfram, J., Xagorari, A., Xander, P., Xu, J., Yan, X., Yáñez-Mó, M., Yin, H., Yuana, Y., Zappulli, V., Zarubova, J., Žekas, V., Zhang, J. ye, Zhao, Z., Zheng, L., Zheutlin, A. R., Zickler, A. M., Zimmermann, P., Zivkovic, A. M., Zocco, D., y Zuba-Surma, E. K. 2018. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), pp 1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750
- Tsilimigras, D. I., Brodt, P., Clavien, P. A., Muschel, R. J., D'Angelica, M. I., Endo, I., Parks, R. W., Doyle, M., de Santibañes, E., y Pawlik, T. M. 2021. Liver metastases. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), pp 27. doi: 10.1038/s41572-021-00261-6
- Vallverdú, J., Martínez García de la Torre, R. A., Mannaerts, I., Verhulst, S., Smout, A., Coll, M., Ariño, S., Rubio-Tomás, T., Aguilar-Bravo, B., Martínez-Sánchez, C., Blaya, D., Verfaillie, C. M., van Grunsven, L. A., y Sancho-Bru, P. 2021. Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells to hepatic stellate cells. *Nature Protocols*, 16(5), pp. 2542–2563. doi: 10.1038/s41596-021-00509-1
- Xie, F., Ling, L., Van Dam, H., Zhou, F., y Zhang, L. 2018. TGF- β signaling in cancer metastasis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50(1), pp. 121–132. doi: 10.1093/abbs/gmx123

- Xu, X., Zheng, L., Yuan, Q., Zhen, G., Crane, J. L., Zhou, X., y Cao, X. 2018. Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis. *Bone Research*, 6(1), pp. 2. doi: 10.1038/s41413-017-0005-4
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., y Madden, T. L. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), pp. 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134

Anexos

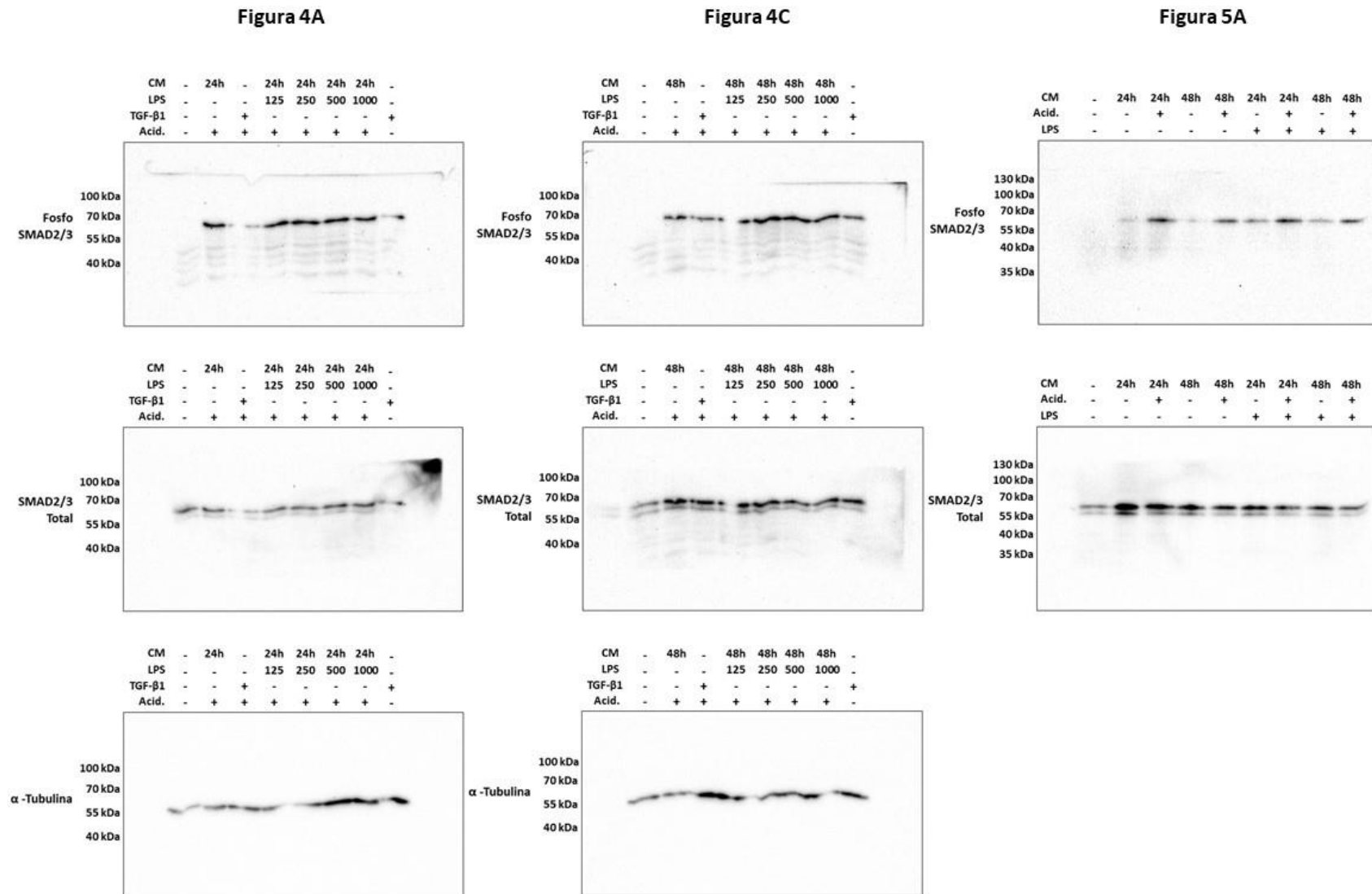


Figura 24. Membranas de Western blot sin cortar correspondientes a las figuras 4A, 4C y 5A.

Figura 6A

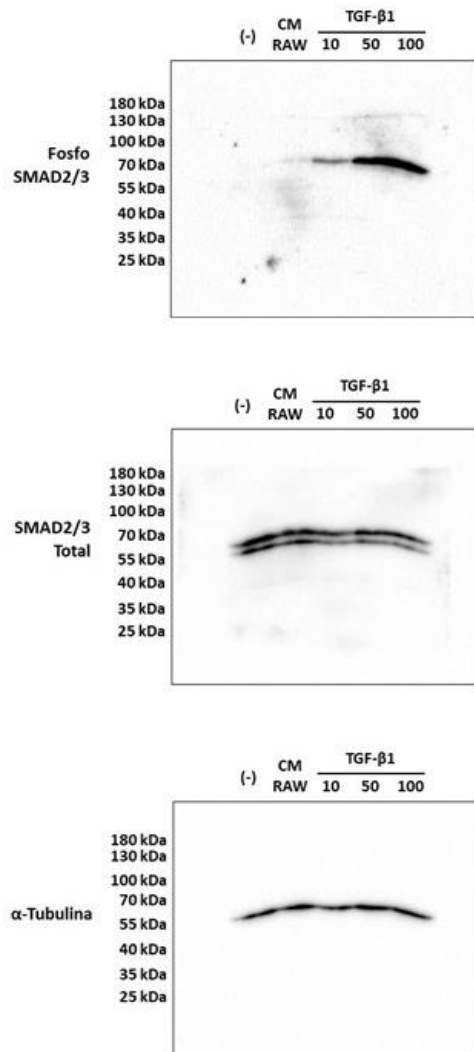


Figura 9

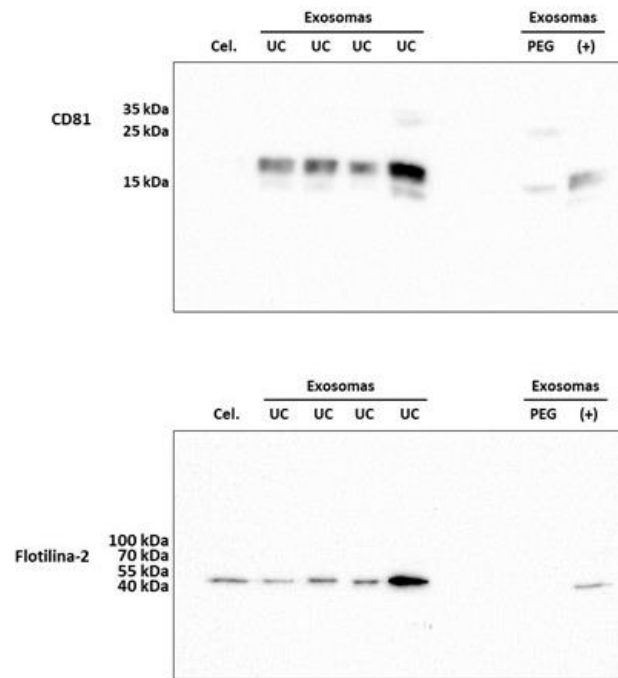


Figura 10

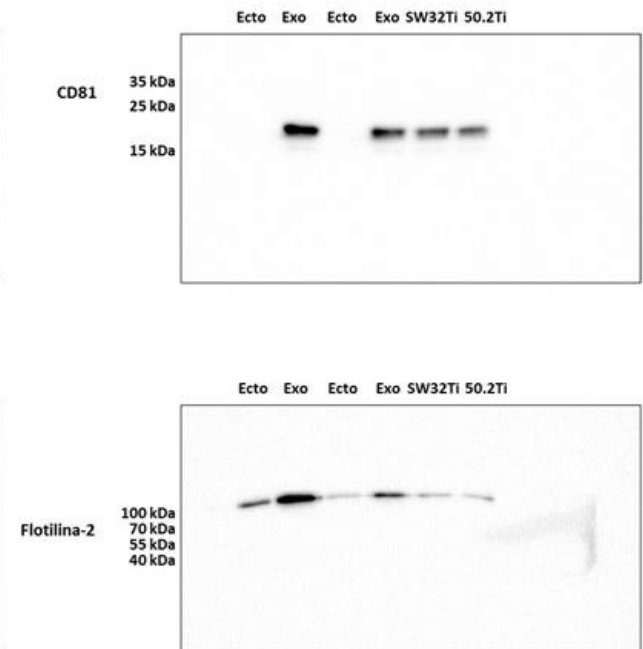


Figura 25. Membranas de Western blot sin cortar correspondientes a las figuras 6A, 9 y 10.

Figura 17A

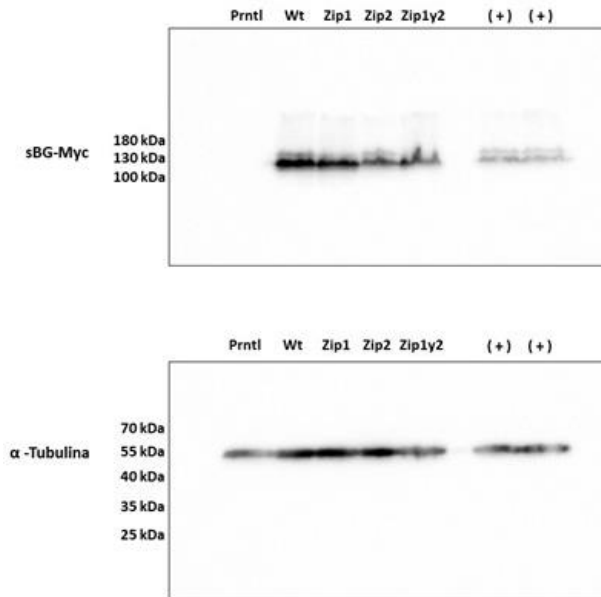


Figura 18A

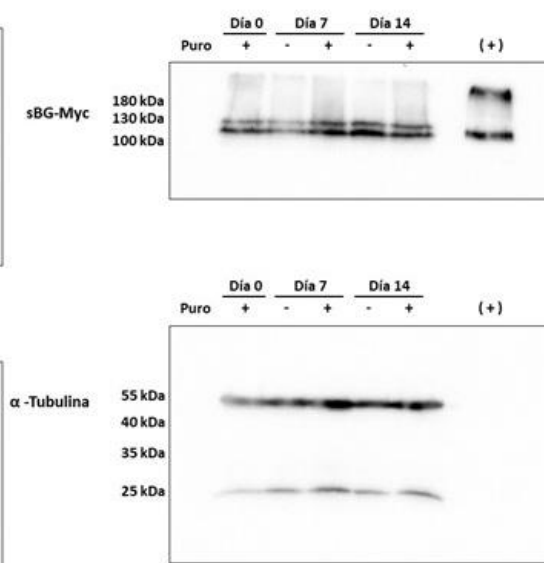


Figura 19A

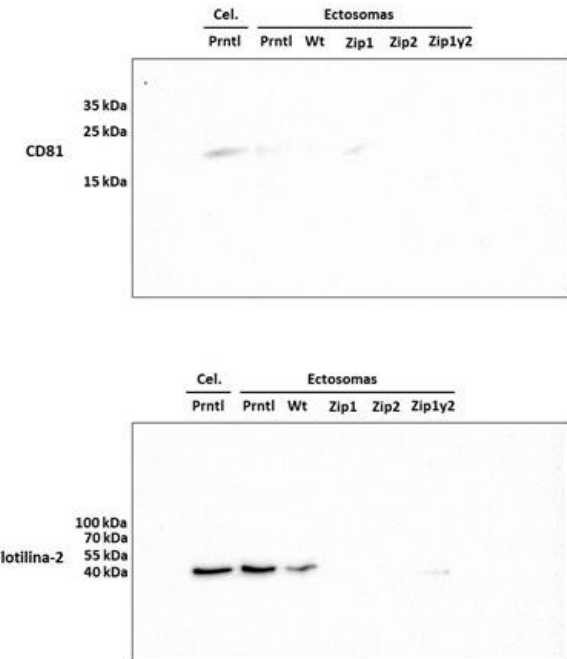


Figura 17B

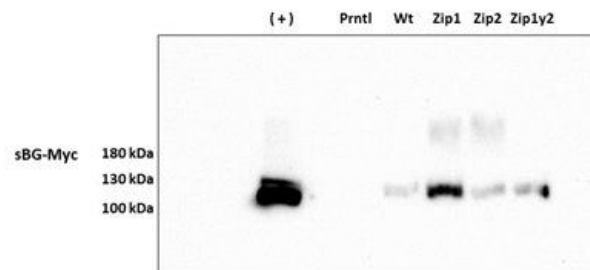


Figura 18B

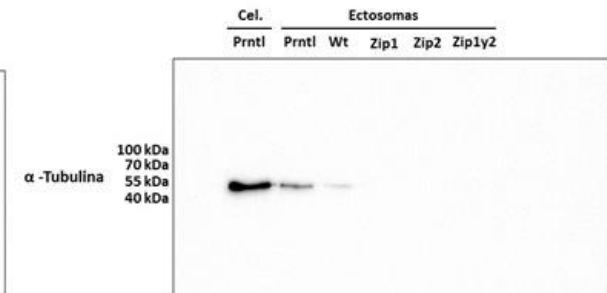
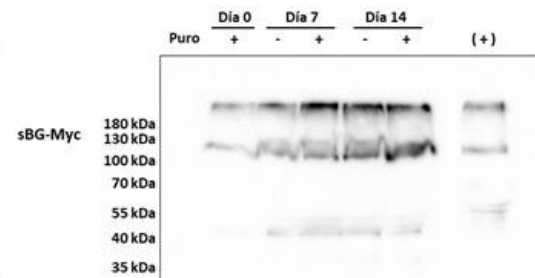


Figura 26. Membranas de Western blot sin cortar correspondientes a las figuras 17A, 18A y 19A.

Figura 19B

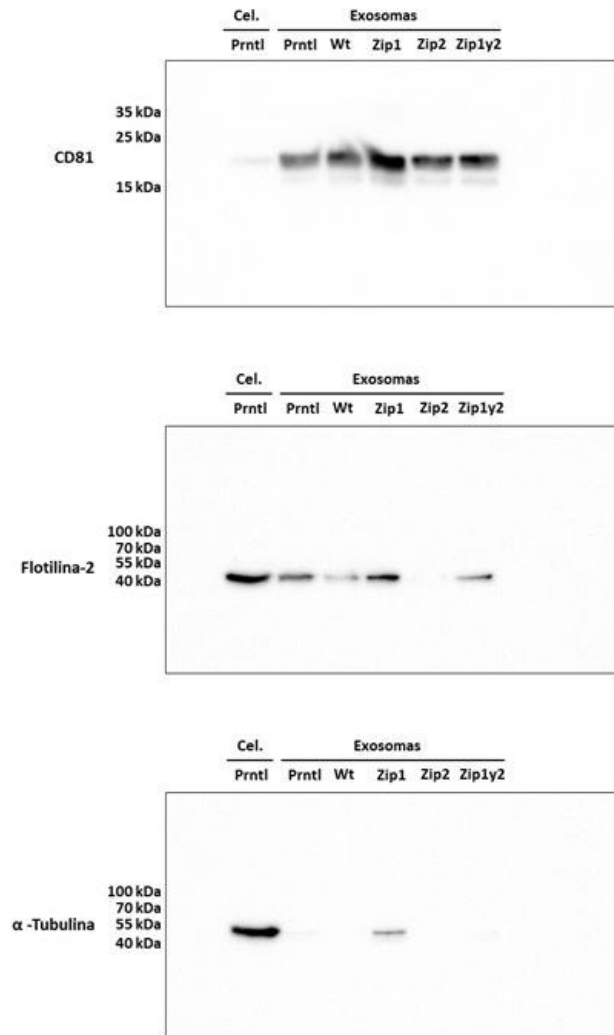


Figura 22C

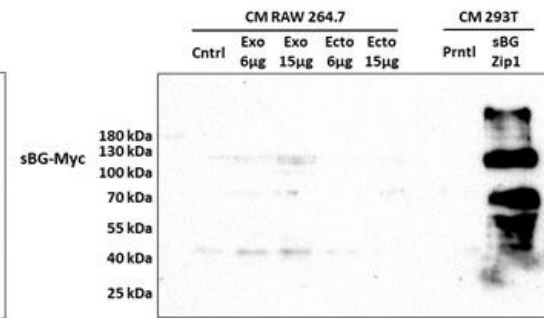


Figura 23A

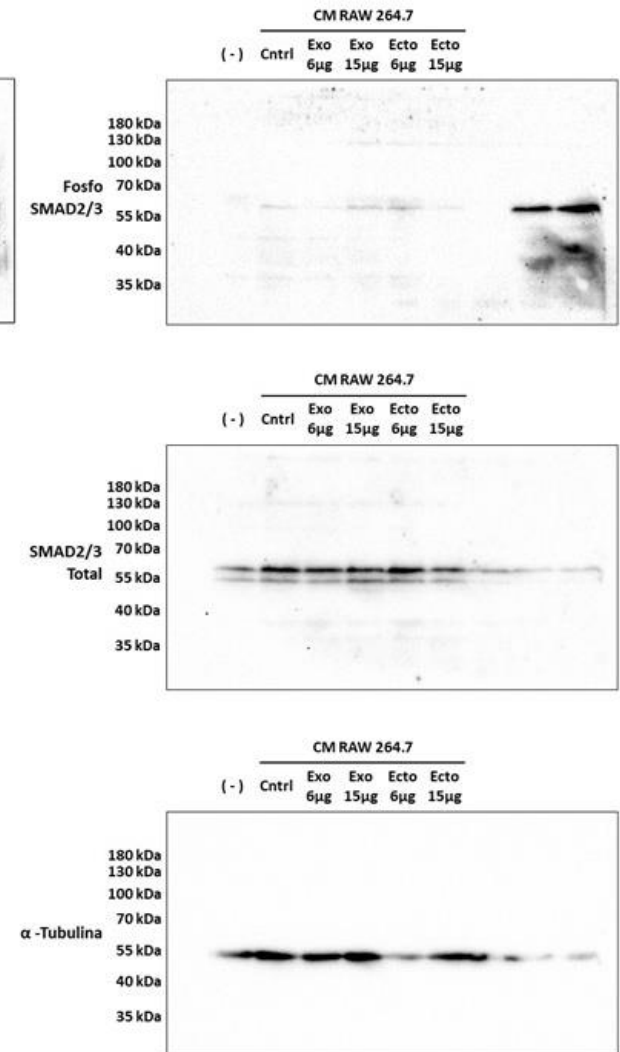


Figura 27. Membranas de Western blot sin cortar correspondientes a las figuras 19B, 22C y 23A.