

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 SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

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 de Autor.

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



**Doctorado en Ciencias
en Ciencias de la Vida con
Orientación en Biotecnología Marina**

**Desarrollo de exosomas $\alpha_v\beta_5^+$ como una terapia anti-
TGF- β dirigida al nicho pre-metastásico hepático**

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

Presenta:

Blanca Paloma Acosta Montaña

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Blanca Paloma Acosta Montaña

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Director de tesis

Dra. Patricia Juárez Camacho

Dr. Fernando López Casillas

Dr. Rubén Darío Cadena Nava

Dr. Octavio Galindo Hernández



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Blanca Paloma Acosta Montaña** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctora en Ciencias en Ciencias de la Vida.

Desarrollo de exosomas $\alpha_v\beta_5^+$ como una terapia anti-TGF- β dirigida al nicho pre-metastásico hepático

Resumen aprobado por:

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Director de tesis

La metástasis al hígado es común en cáncer pancreático y colorrectal. Su desarrollo es promovido por exosomas secretados por el tumor primario, que, por la presencia de la integrina $\alpha_v\beta_5$ en su membrana, se dirigen al hígado. Internalizados en células de Kuppfer, que son macrófagos residentes en el hígado, estos exosomas incrementan la producción de TGF- β iniciando la formación del nicho pre-metastásico que aumenta la probabilidad de formación de metástasis. Considerando que las terapias anti-TGF- β no han sido eficientes en ensayos clínicos y causan efectos secundarios, nuestro objetivo fue desarrollar una terapia anti-TGF- β dirigida al hígado utilizando exosomas funcionalizados con la integrina $\alpha_v\beta_5$. Para esto seleccionamos las células 293T, una línea celular humana, no cancerosa en las cuales detectamos la expresión endogénica de la integrina $\alpha_v\beta_5$. Los exosomas se purificaron mediante centrifugación diferencial. Las vesículas obtenidas tuvieron un diámetro de 111 ± 44.0 nm, de acuerdo con los análisis de dispersión de luz dinámica y microscopía electrónica de transmisión, y contienen la proteína CD81, un marcador de exosomas, lo que cumple con los criterios para exosomas. Cuando los exosomas marcados fluorescentemente se inocularon por vía intravenosa en ratones, fueron detectados en el hígado 24 horas después. Para incrementar la localización de estos exosomas en el hígado, se sobreexpresó la integrina $\alpha_v\beta_5$. Las células 293T fueron transfectadas con plásmidos que codifican para las subunidades α_v y β_5 , y seleccionadas para obtener un subclon con niveles de expresión 9 veces mayor en comparación con las células parentales. Por medio de western blot, confirmamos que los exosomas derivados de este subclon contienen la integrina exógena. In vitro, la internalización de exosomas $\alpha_v\beta_5^+$ fue mayor en macrófagos (RAW 264.7). En ratones, la sobreexpresión de $\alpha_v\beta_5$ incrementó las cantidades de estos exosomas en el hígado (4.9x vs parental) y estos exosomas $\alpha_v\beta_5^+$ se localizaron preferentemente en el hígado comparado con pulmones, riñones y cerebro. Para cargar los exosomas con una agente anti-TGF- β , decidimos usar una estrategia de ARN de interferencia con shRNA. Células 293T- $\alpha_v\beta_5^+$, fueron transducidas para producir shRNA con *Tgfb1* (shTgfb1) para que sean cargados directamente en los exosomas. Aunque ambos shTgfb1 silenciaron eficientemente *Tgfb1* en células de ratones transducidas, los exosomas derivados de las células 293T no disminuyeron los niveles de *Tgfb1* en células RAW 264.7. A pesar de que no se logró cargar los exosomas con un inhibidor de TGF- β y determinar su potencial terapéutico *in vivo*, nuestros resultados indican que los exosomas $\alpha_v\beta_5^+$ podrían utilizarse como nanovehículos para terapias dirigidas al hígado.

Palabras clave: cáncer, metástasis hepática, terapia dirigida, exosomas, integrinas

Abstract of the thesis presented by **Blanca Paloma Acosta Montaña** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Sciences

Development of $\alpha_v\beta_5$ exosomes as an anti-TGF- β therapy targeting the hepatic pre-metastatic niche

Abstract approved by:

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Thesis director

Liver metastasis is a common complication in pancreatic and colorectal cancer. Its development is promoted by exosomes, extracellular vesicles, secreted by the primary tumor that accumulate in the liver due to the presence of the $\alpha_v\beta_5$ integrin on their membrane. Once in the liver, exosomes are internalized by Kupffer cells, the resident macrophages in the liver, increasing their production of TGF- β , the first step in establishing the pre-metastatic niche that supports metastasis formation. Since anti-TGF- β therapies have not been effective in clinical trials and cause side effects, our aim was to develop a liver-targeted anti-TGF- β treatment using exosomes functionalized with the $\alpha_v\beta_5$ integrin. We selected 293T cells as a human, non-cancerous cell line, in which we detected the expression of endogenous integrin $\alpha_v\beta_5$ to obtain exosomes using differential centrifugation. From the conditioned medium of 293T cells, we isolated vesicles that had a diameter of 111 ± 44.0 nm, as determined by dynamic light scattering analysis and transmission electron microscopy, and contained CD81, an exosome marker, which corresponds to exosome characteristics. We used fluorescently labeled exosomes to follow exosomes *in vivo*. After intravenous inoculation into mice, exosomes were detected in the liver 24 hours later. To enhance the accumulation of 293T exosomes in the liver, we decided to overexpress the integrin $\alpha_v\beta_5$. 293T cells were transfected with plasmids encoding the α_v and β_5 subunits. After antibiotic selection and clonal expansion, we obtained a subclone of 293T cells that had 9-times more $\alpha_v\beta_5$ integrin on their surface, and we confirmed these exosomes contained the exogenous integrin. *In vitro*, $\alpha_v\beta_5$ exosomes showed higher uptake in RAW 264.7 macrophage cells, compared to parental exosomes. In mice, we confirmed that $\alpha_v\beta_5$ overexpression significantly increased exosome localization in the liver (4.9x vs parental) and that $\alpha_v\beta_5$ exosomes preferentially accumulated in the liver compared to the lungs, kidneys, and brain. To load the exosomes with an anti-TGF- β agent, we chose to use RNA interference with shRNA. 293T- $\alpha_v\beta_5$ cells were transduced to produce different shRNA against *Tgfb1* (shTgfb1) to be directly loaded into their exosomes. Although both shTgfb1 efficiently silenced *Tgfb1* in transduced mouse cells, exosomes derived from 293T cells did not reduce *Tgfb1* levels in RAW 264.7 cells. Despite not achieving the loading of exosomes with a TGF- β inhibitor or determining their therapeutic potential *in vivo*, our results indicate that $\alpha_v\beta_5$ exosomes could serve as nanocarriers for liver-targeted therapies.

Keywords: cancer, liver metastasis, targeted therapy; exosomes; integrins.

Dedicatoria

Para mis papás, mis hermanos y Roger

Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada durante la realización del posgrado, con número de CVU 745000, al igual que por el financiamiento del proyecto a través del apoyo CB2017-2018 A1-S-15911 de la Convocatoria de Investigación en Ciencia Básica 2017-2018.

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 (DIB), por darme la oportunidad de formar parte de esta comunidad y brindarme sus instalaciones para realizar mis estudios de doctorado.

A mi director, el Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier, por aceptarme en su grupo de investigación, por su constante guía, por compartir su conocimiento con generosidad y por confiar en mí incluso en los momentos en que yo misma dudaba. Por su paciencia, compromiso y dedicación y su disposición para acompañarme en experimentos, su ayuda incansable en el laboratorio y su apoyo en momentos difíciles. Gracias por ser mentor, guía y un apoyo humano invaluable en esta etapa.

A mis sinodales. A la Dra. Patricia Juárez Camacho por su constante apoyo y consejos. Al Dr. Octavio Galindo Hernández de la Facultad de Medicina de UABC Mexicali, por 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. Al Dr. Fernando López Casillas por compartir su conocimiento. Gracias por su apoyo, ayuda y seguimiento durante seis años.

Al Dr. Diego Delgado del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) por su apoyo con el microscopio confocal.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla y a la M. en C. Yanet Guerrero Rentería por el uso del criostato y la asesoría.

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

Al personal técnico del DIB. A la Dra. Johanna por sus enseñanzas de cultivo celular. Al Dr. Ricardo por su apoyo en los experimentos de mutagénesis, en el citómetro de flujo y con el autoclave. A la M. en C. Samanta Jiménez por su ayuda con el cuidado de los animales del laboratorio. Gracias por toda su ayuda en el laboratorio durante estos años de doctorado.

Al personal administrativo del DIB. A Adriana Mejía por su continua atención y ayuda, gracias por siempre estar al pendiente de nosotros estudiantes. A Carmen Labastida por su apoyo con todos los pedidos y solicitudes.

A mis compañeros de laboratorio, ahora amigos, con quienes no solo compartí horas de trabajo y aprendizaje, sino también una hermosa amistad que trascendió el laboratorio y la distancia. A mi Verónica Castro favorita, mi primera lab partner, a Paloma Almeida, a Óscar Colunga y Eréndira Olvera, gracias por los cafés, las pláticas, las risas, las lágrimas, por su constante apoyo, tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por creer en mí, tanto como yo creo en ustedes.

A mis compañeros y excompañeros de PnP: Danna, Florian, Juan Alberto, Arturo, Brenda, Tonantzin, José Jorge, Hugo, Sharlin.

A mi roomie, Diana Lara, por compartir vidas, por tantas pláticas. A las amistades que hice en Ensenada: Isaí, Blanca, Alan, Mayela, Sadot, Itzae. Gracias por sus palabras, por sus oídos, por su ayuda, y en su momento por las distracciones. Fue un placer conocerlos y coincidir con ustedes en esta vida.

A mis maestras de baile, Jocelyne y María Renée, y al equipo de Tequila Movement Ensenada, gracias por ese año que formaron parte de mi vida en Ensenada, siempre atesoraré el tiempo que coincidimos.

A Rodrigo, por tu apoyo y cariño en el último año de experimentos, en el año más difícil.

A mis amigos de Mexicali: Martha, Carolina, Mariana, Óscar, por siempre estar, por escucharme. A mis amigas tenistas, Erika, Bárbara, Karine, Samantha, Raquel, Mafer y Mary; en realidad no tienen idea de lo que me ayudaron este año. En especial a Erika, en verdad fuiste un regalo inesperado, gracias por tu amistad y por todos los partidos.

A mi familia, mis abuelos, a mi tíos: Graciela, Alma y Jaime, mis primas Daniela, Graciela, Mariana e Ilvia, por los viajes, las pláticas, por tantas risas, por transportarme a otro mundo cuando estaba con ustedes.

A mis hermanos y a mis papás, que sin ellos no hubiera llegado a ningún lado, no estaría donde estoy ahora, no sería la persona que soy ahora. Me faltará vida para agradecerles todo lo que han dado y hecho por mí. Gracias por siempre creer en mí, aun cuando yo no creía en mí misma.

A Roger, por enseñarme el amor incondicional; pasaré el resto de mi vida extrañándote por el privilegio de haberte amado toda tu vida.

Gracias a todos los que creyeron en mí.

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	3
1.1.1 Metástasis	3
1.1.2 Nicho pre-metastásico	6
1.1.3 Exosomas.....	9
1.1.3.1 Biogénesis y secreción de los exosomas	9
1.1.3.2 Internalización de exosomas	13
1.1.3.3 Función de los exosomas en el cáncer	14
1.1.3.4 Modificación de exosomas y aplicaciones clínicas.....	16
1.1.4 Integrinas.....	20
1.1.5 Papel de las integrinas en los exosomas y el cáncer	22
1.1.6 Factor de crecimiento transformante- β	25
1.1.6.1 TGF- β en cáncer.....	27
1.1.6.2 Tratamientos para inhibir TGF- β	30
1.2 Justificación	31
1.3 Hipótesis.....	32
1.4 Objetivos	32

1.4.1	Objetivo general.....	32
1.4.2	Objetivos específicos.....	32
Capítulo 2.	Metodología.....	34
2.1	Cultivo celular.....	34
2.2	Obtención de plásmidos.....	35
2.2.1	Preparación de bacterias competentes	35
2.2.2	Transformación de bacterias por choque térmico.....	35
2.2.3	Extracción de ADN plasmídico con Miniprep	36
2.3	Transfección de células con plásmidos	36
2.3.1	Método de fosfato de calcio	36
2.3.2	Método basado en la formación de polímeros catiónicos.....	37
2.4	Citometría de flujo	37
2.5	Selección de células 293T $\alpha\beta_5^+$	38
2.5.1	Selección de células con antibiótico.....	38
2.5.2	Selección de células por separación celular	38
2.5.3	Selección de células por dilución límite	38
2.6	Western blot.....	39
2.6.1	Lisado y cuantificación proteica	39
2.6.2	Electroforesis y transferencia de proteínas	39
2.7	Aislamiento de exosomas.....	40
2.7.1	Aislamiento por ultracentrifugación	40
2.7.2	Caracterización de exosomas por dispersión de luz dinámica.....	41
2.7.3	Tinción de vesículas extracelulares	41
2.7.4	Ensayo de internalización de exosomas y transferencia de β_5	41
2.8	Distribución de exosomas <i>in vivo</i>	42
2.9	Inserción de secuencia de shRNA en un vector lentiviral	42
2.10	Transducción lentiviral	43

2.11	Silenciamiento de <i>Tgfb1</i>	44
2.11.1	Extracción de ARN total.....	44
2.11.2	PCR cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR)	44
2.12	Estadística.....	45
Capítulo 3.	Resultados.....	46
3.1	Selección de una línea celular para obtención de exosomas.....	46
3.1.1	Aislamiento de exosomas derivados de células 293T y B16-F1	46
3.1.2	Modificación de células 293T y B16-F1 con el plásmido pLenti-GFP	47
3.2	Modificación de las células 293T con los plásmidos pCMV3-ITGAV-HA y pLenti-ITGB5-T7 .	49
3.2.1	Obtención de células 293T- $\alpha_v\beta_5^+$ por co-transfección de los plásmidos pCMV3-ITGAV-HA y pLenti-ITGB5-T7	49
3.3	Obtención de exosomas derivados de células 293T- $\alpha_v\beta_5^+$	53
3.3.1	Caracterización de exosomas	53
3.3.2	Internalización de exosomas	55
3.4	Organotropismo de exosomas derivados de células 293T- $\alpha_v\beta_5^+$	61
3.5	Silenciamiento de TGF- β 1 con shRNA en células RAW 264.7	64
3.5.1	Inserción de secuencias de shRNA en plásmidos pLKO.1	64
3.5.2	Silenciamiento de <i>Tgfb1</i>	67
Capítulo 4.	Discusión	71
Capítulo 5.	Conclusiones.....	81
	Literatura citada	83

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer en el mundo..	1
Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer en México.....	1
Figura 3. Pasos de la cascada metastásica.	4
Figura 4. Formación del nicho pre-metastásico.....	7
Figura 5. Biogénesis de los exosomas.....	10
Figura 6. Mecanismos de tráfico intracelular de ectosomas y exosomas.....	12
Figura 7. Internalización de vesículas extracelulares.....	13
Figura 8. Pasos de la formación del nicho pre-metastásico hepático.....	16
Figura 9. Modificaciones de exosomas..	18
Figura 10. Diferentes combinaciones de integrinas.....	20
Figura 11. Señalización multidireccional de las integrinas.....	21
Figura 12. Vía de señalización del TGF- β	26
Figura 13. Participación del TGF- β en el microambiente tumoral..	28
Figura 14. Estrategias de tratamientos anti-TGF- β	30
Figura 15. Caracterización de exosomas derivados de células 293T.	47
Figura 16. Caracterización de exosomas derivados de células B16-F1.	47
Figura 17. Transfección de células 293T con pLenti-GFP-higro..	48
Figura 18. Transfección de células B16-F1 con pLenti-GFP-higro.	48
Figura 19. Selección de células $\alpha_v\beta_5^+$ con antibiótico..	50
Figura 20. Separación celular de células 293T- $\alpha_v\beta_5$ (500 ng).....	51
Figura 21. Selección clonal de células 293T- $\alpha_v\beta_5$ (500 ng).....	51
Figura 22. Comparación de la expresión de $\alpha_v\beta_5$ en clona 2B y 9B.	52
Figura 23. Expresión de α_v , β_5 y $\alpha_v\beta_5$ en células $\alpha_v\beta_5^+$..	52

Figura 24. Expresión exógena de las subunidades de la integrina.....	53
Figura 25. Diámetro hidrodinámico de exosomas.	54
Figura 26. Expresión proteica en lisados de exosomas.....	54
Figura 27. Efecto de la tinción con SP-DilC ₁₈ en la internalización de exosomas en células RAW 264.7..	55
Figura 28. Internalización de diferentes cantidades de exosomas en células RAW 264.7.	57
Figura 29. Internalización de diferentes cantidades de exosomas en células RAW 264.7..	58
Figura 30. Internalización de ectosomas.....	59
Figura 31. Internalización de exosomas.	60
Figura 32. Transferencia de integrina a células RAW 264.7.....	61
Figura 33. Transferencia de integrina a células RAW 264.7.....	61
Figura 34. Localización de exosomas parentales en hígado de ratones.	62
Figura 35. Organotropismo de exosomas $\alpha_v\beta_5$	63
Figura 36. Diagrama del sitio de inserción de los shRNA en el plásmido pLKO.1-puro.	64
Figura 37. Screening de colonias positivas a la inserción de shTgfb1 ¹ en pLKO.1..	65
Figura 38. Secuenciación Sanger de clonas positivas pLKO.1-shTgfb1 ¹	65
Figura 39. Screening de colonias positivas a la inserción de shTgfb1 ² en pLKO.1..	66
Figura 40. Secuenciación Sanger de clonas positivas pLKO.1-shTgfb1 ²	66
Figura 41. Silenciamiento de GFP.....	67
Figura 42. Expresión de <i>Tgfb1</i> y <i>pac</i> en células 4T1.....	69
Figura 43. Expresión de <i>pac</i> en células 293T- $\alpha_v\beta_5$	69
Figura 44. Expresión de <i>Tgfb1</i> en células RAW 264.7 tratadas con exosomas shTgfb1 ⁺	70

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos para mutagénesis dirigida y PCR de colonia.....	43
Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos para qPCR.	45

Capítulo 1. Introducción

El cáncer se ha convertido en una de las principales causas de muerte antes de los 70 años en 91 países, superando las enfermedades coronarias y los infartos (Sung et al., 2021). Su impacto negativo global es considerable, afectando a todos los países así que los grupos socioeconómicos de todos los niveles. Actualmente, el cáncer es responsable de 1 de cada 7 muertes en todo el mundo, una cifra que supera las muertes por VIH/SIDA, tuberculosis y malaria combinadas (Siegel et al., 2019). Según la Organización Mundial de la Salud, los tipos de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial son el cáncer de pulmón, de mama y colorrectal (Figura 1A), mientras que, en términos de mortalidad, el cáncer de hígado también se encuentra entre los más letales (Figura 1B). En México, el cáncer de próstata destaca por su alta tasa de incidencia (Figura 2A), mientras que los cánceres colorrectal, mama y pulmón permanecen entre las principales causas de mortalidad (Figura 2B) (Bray et al., 2024).

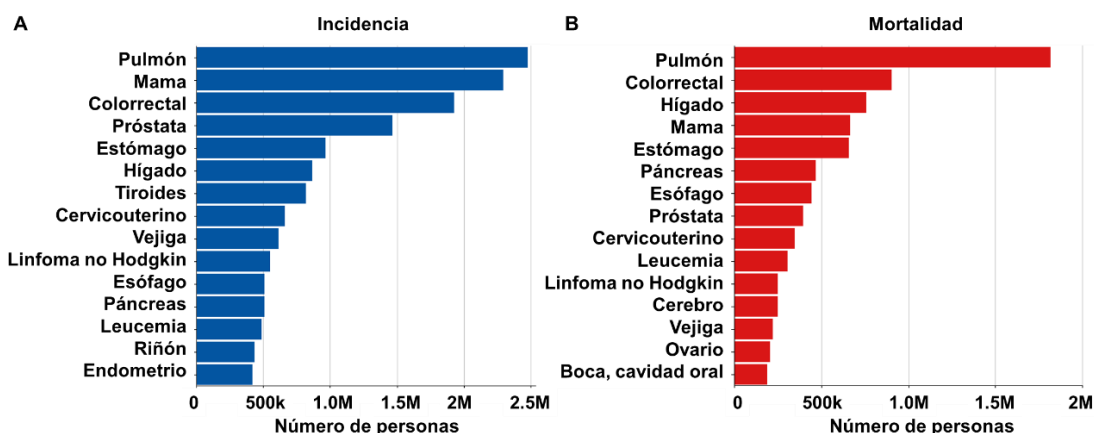


Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer en el mundo. Números absolutos de A) incidencia y B) mortalidad del cáncer en ambos sexos y en todas las edades. Modificado de Bray et al. (2024).

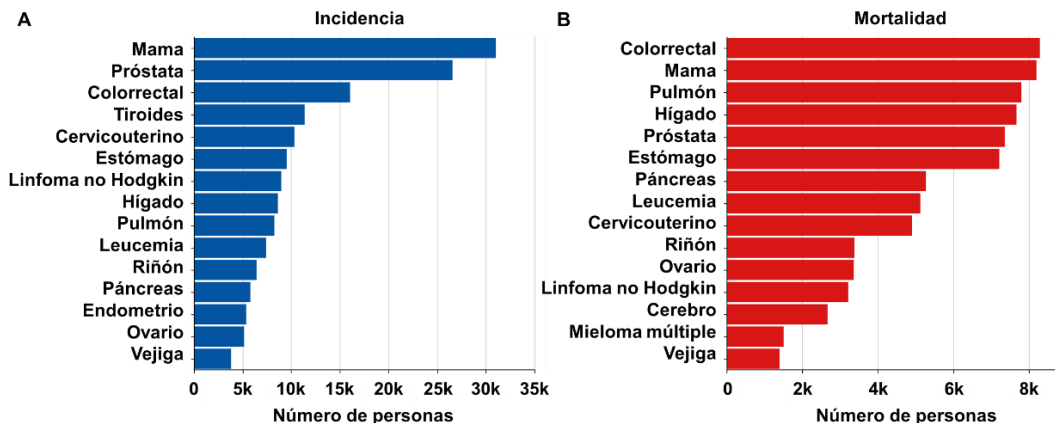


Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer en México. Números absolutos de A) incidencia y B) mortalidad del cáncer en ambos sexos y en todas las edades. Modificado de Bray et al. (2024).

El cáncer se define como un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento celular desregulado, y el carácter invasivo de las células tumorales que pueden propagarse localmente en el órgano de origen o a distancia a otras partes del cuerpo. Las características y los factores de riesgo varían según el tipo de cáncer por lo que los mecanismos moleculares y celulares del cáncer pueden ser diferente entre dos tipos de cáncer o hasta entre dos pacientes con el mismo tipo de cáncer. Sin embargo, se han identificado propiedades comunes a la mayoría de los tipos de cáncer: la autonomía de crecimiento, la evasión de señales de inhibidoras de crecimiento, la interferencia con la respuesta inmune, su capacidad ilimitada de división, la invasión y metástasis, la inducción de angiogénesis, así como la reprogramación del metabolismo energético (Hanahan y Weinberg, 2000). A esta primera lista de características, con los avances científicos en nuestro entendimiento del cáncer, se agregaron nuevas propiedades comunes como la inestabilidad del genoma, las mutaciones y la inflamación (Hanahan y Weinberg, 2011).

Conforme el cáncer progresa, las células del tumor primario adquieren características que les permiten desprenderse, invadir tejidos circundantes, entrar a la circulación y viajar a diferentes tejidos distales, en un proceso conocido como metástasis (Massagué y Obenauf, 2016). Un paso crucial para el establecimiento del tumor secundario es la formación del nicho pre-metastásico (NPM) (Kaplan et al., 2005). En este proceso, factores liberados por el tumor primario se dirigen al futuro sitio de metástasis, preparando el tejido para que las células metastásicas puedan implantarse y llevar a cabo una colonización metastásica (Peinado et al., 2012).

El hígado es un sitio común de metástasis en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de páncreas, mama, colorrectal (Tsilimigras et al., 2021). En la formación del NPM, el tumor primario libera exosomas, un tipo de vesículas extracelulares (VE) nanométricas que participan en la comunicación intercelular, y debido a la presencia de la integrina $\alpha_v\beta_5$ se dirigen al hígado y son internalizados por las células de Kupffer, los macrófagos residentes del hígado (Costa-Silva et al., 2015; Hoshino et al., 2015). Las células de Kupffer activadas liberan el factor transformante β (transforming growth factor β o TGF- β , por sus siglas en inglés), iniciando una serie de eventos que crean un ambiente fibrótico ideal para la adhesión de células derivadas de la médula ósea (Costa-Silva et al., 2015). Estos cambios crean un microambiente que favorece la colonización por las células metastásicas.

El TGF- β desempeña un papel importante en la formación del NPM hepático (Costa-Silva et al., 2015), lo que lo convierte en un blanco terapéutico interesante. Dado que el TGF- β participa en múltiples procesos celulares, como la homeostasis y la regeneración de tejidos, así como el crecimiento y diferenciación

celular tanto en células sanas como cancerosas, es esencial inhibirlo de manera específica y dirigida a un órgano y célula particular (Massagué, 2008).

Los exosomas pueden ser utilizados como vehículo terapéutico (Kamerkar et al., 2017) y dirigirlos específicamente al hígado. De este modo, se puede aprovechar el mecanismo de comunicación intercelular de las células tumorales ya descrito, para desarrollar una terapia dirigida que detenga la progresión del cáncer al inhibir la formación del NPM hepático.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Metástasis

Las células cancerosas pueden adquirir características que les permiten diseminarse a otras partes del cuerpo como células tumorales diseminadas (CTD) o células tumorales circulantes (CTC), hacer micrometástasis, o macrometástasis, que tiene como resultado un tumor secundario. La metástasis es responsable del 90% de las muertes en pacientes con cáncer. Los principales tipos de cáncer que desarrollan metástasis hepática incluyen el colorrectal, de páncreas, de mama, entre otros (Tsilimigras et al., 2021). Una vez que el cáncer hace metástasis, se vuelve más difícil de tratar, ya que adquiere características que lo vuelven más agresivo, como la resistencia al tratamiento (Ravindranath et al., 2015). Dado que la metástasis es un proceso muy frecuente en el cáncer de páncreas, es crucial desarrollar nuevas estrategias e identificar blancos terapéuticos para aumentar las posibilidades de curación y supervivencia de los pacientes.

La formación de metástasis es un proceso complejo y altamente regulado, que comprende una serie de pasos denominado cascada metastática: invasión localizada, intravasación, transporte a través de la circulación (interacción con plaquetas, linfocitos y otros componentes de la sangre), extravasación, formación de micrometástasis, la colonización y formación de macrometástasis (Figura 3). Una vez en el órgano blanco, la mayoría de las células tumorales no logran colonizar el nuevo órgano para formar metástasis ya que pueden entrar en un estado de senescencia (inhibición irreversible de la proliferación) o morir por apoptosis, necrosis u otro modo de muerte celular. Sin embargo, en algunos casos, las células metastásicas pueden sobrevivir y entrar en una etapa de dormancia (inhibición reversible de la proliferación) de duración variable antes de proliferar para formar un tumor secundario. Esto dependerá

de las características intrínsecas de las células metastásicas y de que el nuevo tejido tenga las condiciones favorables para que estas células proliferen (Fares et al., 2020).

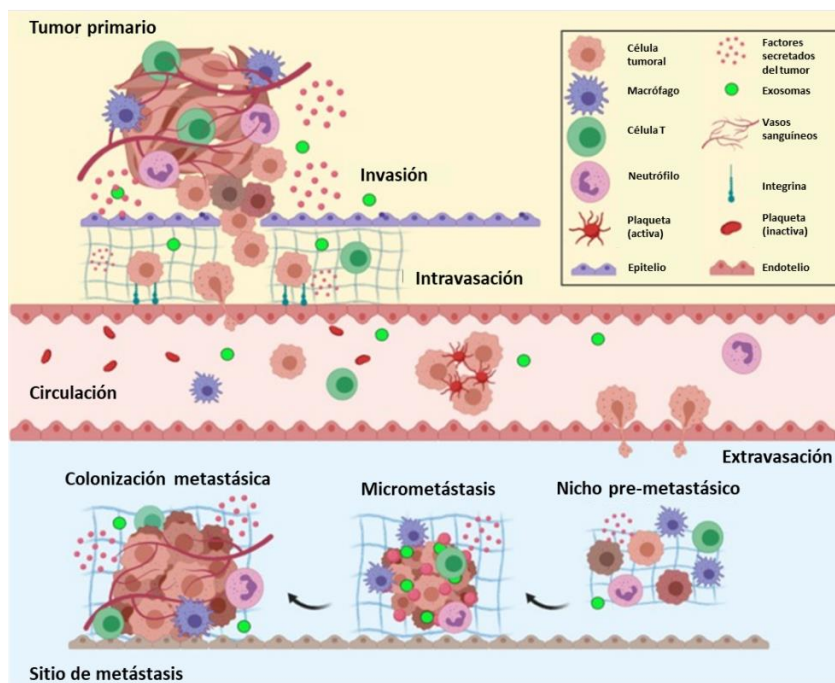


Figura 3. Pasos de la cascada metastásica. Los cinco pasos clave de la metástasis: invasión, intravasación, transporte en la circulación, extravasación y la colonización. Modificado de Fares et al. (2020).

Durante la progresión del cáncer, las células tumorales adquieren características que les permiten dejar el tumor primario y viajar a tejidos distantes, en un proceso conocido como transición epitelio-mesénquima (epithelial-mesenchymal transition o EMT, por sus siglas en inglés) (Nieto, 2009). La EMT es un proceso por el cual una célula epitelial, típicamente estrechamente conectada, adquiere temporalmente un fenotipo de célula mesenquimal con alta movilidad y se caracteriza por la pérdida de polaridad celular y un aumento en la motilidad (Dongre y Weinberg, 2019).

En condiciones no patológicas, la EMT de tipo 1 ocurre durante la embriogénesis en etapas de desarrollo, así como en la curación de tejidos epiteliales en adultos (Nieto, 2009). La EMT de tipo 2 inicia en respuesta a la inflamación, particularmente durante la sanación de heridas y la regeneración de tejido (Marconi et al., 2021). Este proceso es utilizado por las células cancerosas para adquirir ciertos rasgos mesenquimales que promueven la invasión de tejidos circundantes, proceso conocido como EMT de tipo 3 (Nieto, 2009).

En el contexto del cáncer, se observa una disminución en la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina, junto con un aumento en la expresión de marcadores mesenquimales como N-cadherina (Cano

et al., 2000). También se incrementa la secreción de metaloproteinasas, que degradan los componentes de la matriz extracelular (extracellular matrix o ECM, por sus siglas en inglés) (Spiegel et al., 2016).

La EMT inicia mediante señales provenientes de factores de crecimiento liberados por el estroma tumoral, el TGF- β , las proteínas Wnt y diversas interleucinas (Labelle et al., 2011; Malladi et al., 2016). Estas señales inducen la EMT en las células adyacentes al activar vías de señalización como ERK, MAPK, PI3K y AKT, que aumentan la expresión de factores de transcripción, como Snail, Slug, Twist y Zeb1 (Labelle et al., 2011). Estos factores de transcripción reprimen la expresión de marcadores epiteliales (E-cadherina) e inducen la expresión de marcadores mesenquimales (N-cadherina) (Labelle et al., 2011). La activación de la EMT generalmente es reversible; las células cancerosas pueden revertir el fenotipo epitelial a través de la transición mesenquimal-epitelial (mesenchymal-epithelial transition o MET, por sus siglas en inglés). Sin embargo, en algunos casos, las células cancerosas retienen ciertas características epiteliales, manteniendo un fenotipo mixto entre epitelial y mesenquimal (Lambert et al., 2017).

Cuando las células cancerosas logran invadir tejidos circundantes, entran a la circulación sanguínea o linfática a través del proceso denominado intravasación. Primero, la célula tumoral debe adherirse al estroma del vaso, seguido de la liberación de metaloproteinasas y serina proteasas para degradar la membrana basal y pasar entre las células endoteliales para entrar al torrente sanguíneo. La creación de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis, estimulada por el tumor facilita la entrada a la circulación, haciéndolos más permeables y tortuosos (Hanahan y Weinberg, 2011).

Una vez en la circulación, las CTC se transportan de forma individual o en cúmulos, a menudo asociados con plaquetas, siguiendo la dirección del flujo sanguíneo. Estos cúmulos pueden alcanzar diámetros de hasta 30 μm , y según la teoría del órgano de primer paso, los cúmulos más grandes se quedan atrapados en los capilares del primer órgano que encuentran en su trayecto (Mizuno et al., 1998). Sin embargo, los cúmulos de CTC pueden viajar más lejos debido a su maleabilidad, ya que pueden modificar su forma para pasar por vasos sanguíneos de menor diámetro (Au et al., 2016), indicando que los cúmulos de CTC también pueden alcanzar tejidos distales para colonizar (Chambers et al., 2002).

Las CTC para salir de la circulación deben adherirse a la pared endotelial del vaso sanguíneo, atravesar las células endoteliales y la membrana basal, y migrar dentro del estroma circundante. Las CTC pueden ser arrestadas en la microvasculatura, que es favorecido por la participación de plaquetas para formar cúmulos (Stegner et al., 2014). En otros casos, puede ser mediante adhesión molecular al vaso sanguíneo, donde participan selectinas como la E-selectina, que son cruciales para la adhesión de las células

cancerosas en el endotelio (Häuselmann et al., 2016). Las selectinas modulan interacciones de las células cancerosas mediante la unión a glicoproteínas presentes en la célula adherente. La expresión de selectinas endoteliales varía entre diferentes órganos, lo que podría conferir especificidad de las células tumorales para hacer metástasis a un órgano particular (Fares et al., 2020). El hígado y el hueso constan de vasos sinusoides altamente permeables, por lo que hay una tasa mayor de metástasis de las CTC a estos órganos (Lorusso y Rüegg, 2012).

La colonización metastásica es el último y más crítico paso del proceso, ya que solo una pequeña proporción de las células tumorales que viajan por el torrente sanguíneo logrará colonizar un segundo tejido (Chambers et al., 2002). Antes del inicio de la cascada metastásica, se ha descrito un proceso que promueve el establecimiento de las CTC en el órgano blanco, favoreciendo su implantación. Este concepto es conocido como nicho pre-metastásico.

1.1.2 Nicho pre-metastásico

En 1889, la hipótesis de Paget sobre “la semilla y el suelo” propuso que la diseminación de células tumorales no es al azar, sino determinada (Paget, 1989). Según este concepto, las células tumorales (semillas) viajan a un tejido blanco (suelo) previamente adaptado por mecanismos del tumor primario para hacerlo más fértil y favorecer una metástasis exitosa, concepto conocido como nicho pre-metastásico (NPM). Desde entonces, se ha demostrado que las células tumorales muestran preferencia por órganos específicos al hacer metástasis que (Aguado et al., 2017).

El NPM es el sitio en un órgano distal donde se producen cambios moleculares y celulares debido a efectos sistémicos del tumor primario, creando un ambiente favorable para la colonización metastásica. Estos cambios ocurren antes de la llegada de las células metastásicas con para preparar el “suelo”, facilitando la implantación de las células cancerosas y promoviendo una colonización exitosa. La importancia de la formación del nicho radica en sus implicaciones para la prevención de la metástasis y en los cambios celulares y moleculares que se llevan a cabo para facilitar el crecimiento tumoral en un sitio distinto, como el hígado. Estudios recientes han resaltado la relevancia de la comunicación intercelular y del NPM en la formación de la metástasis (Liu y Cao, 2016).

El establecimiento del NPM puede ocurrir por diferentes mecanismos en los futuros sitios de metástasis (Figura 4). Diversos componentes moleculares y celulares participan en este proceso, como los factores

secretados del tumor (FSDT), las VE, así como células derivadas de la médula ósea movilizadas por el tumor, como las células hematopoyéticas progenitoras (hematopoietic progenitor cells, o HPC, por sus siglas en inglés), las células mieloides, y las células de la respuesta inmune como las células supresoras derivadas de mieloides (myeloid derived suppressor cells o MDSC, por sus siglas en inglés), los linfocitos T reguladores (Treg), los macrófagos asociados a tumores (tumor-associated macrophages o TAM, por sus siglas en inglés) y los neutrófilos asociados a tumores (tumor-associated neutrophils o TAN, por sus siglas en inglés) al tejido blanco, con el fin de crear un microambiente adecuado caracterizado por condiciones de hipoxia y remodelación de la ECM y formar el NPM (Liu y Cao, 2016).

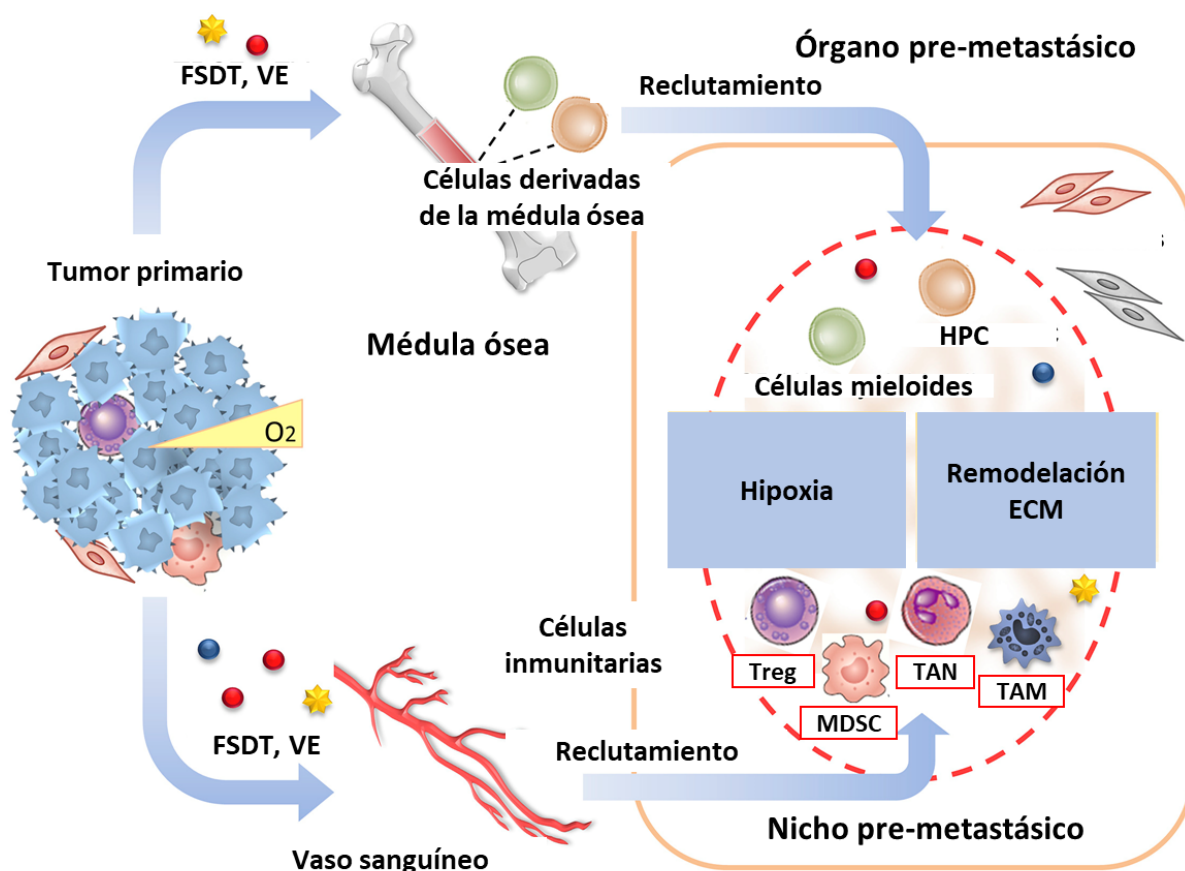


Figura 4. Formación del nicho pre-metastásico. Los FSDT y las VE favorecen la movilización y reclutamiento de diferentes poblaciones celulares hacia el futuro órgano metastásico, incluidas las BMDC VEGFR1⁺, HPC, células mieloides CD11b⁺ y distintas células reguladoras y supresoras del sistema inmune, como las MDSC, Treg, TAM y TAN. La interacción entre estos factores, células y el estroma local puede generar un microambiente adecuado para la colonización de las células tumorales metastásicas. Además, la hipoxia y la remodelación de la ECM también contribuyen a la formación del nicho pre-metastásico. Modificado de Liu y Cao (2016).

Algunos FSDT promueven la movilización de las células derivadas de la médula ósea (bone marrow derived cells o BMDC, por sus siglas en inglés) al nicho, donde participan activamente en la formación del NPM al secretar citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento y moléculas proangiogénicas, que en conjunto

modifican el microambiente y promueven la proliferación de las células metastásicas en el tejido blanco (McAllister y Weinberg, 2014). En modelos preclínicos de melanoma y cáncer de pulmón, se demostró que el tumor primario libera factores que favorecen el reclutamiento de BMDC positivas al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1) y VLA-4 a sitios enriquecidos en fibronectina en el pulmón formando nichos permisivos en el pulmón antes de la llegada de las células tumorales y de esta manera se promueve la metástasis (Kaplan et al., 2005). Mientras que, en modelos de metástasis a pulmón por cáncer de mama en ratones, la enzima lisil oxidasa (LOX) secretada por las células tumorales se acumula en el NPM pulmonar, que favorece el reclutamiento de células mieloides CD11b⁺ y BMDC (Erler et al., 2009).

Además de las BMDC, diversas células del sistema inmune participan en la formación del NPM. Las quimiocinas y citocinas derivadas del tumor reclutan a MDSC, TAM, Tregs y TAN a sitios secundarios distantes para promover la metástasis (Liu y Cao, 2016). El ligando 2 de quimiocina con motivo C-C (CCL2) derivado del tumor primario recluta monocitos Ly6C⁺ al pulmón para promover la formación del NPM y aumentando la metástasis (van Deventer et al., 2013).

Condiciones de inflamación e hipoxia aumentan la producción de FSDT. El factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) promueve la producción del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) en células de cáncer de mama, lo que a su vez fomenta la movilización de las MDSC al pulmón para formar el NPM de cáncer de mama (Chafe et al., 2015).

El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y TGF- β , junto con VEGF-A, estimulan la expresión de los quimioatrayentes S100A8 y S100A9 en el pulmón, atrayendo así células mieloides positivas al antígeno 1 de macrófagos (Mac1) hacia este órgano (Hiratsuka et al., 2006). Por otra parte, el aumento de los niveles sistémicos del inhibidor de metaloproteinasas de tejido 1 (TIMP-1) en ratones promueve el reclutamiento de neutrófilos a hígado a través del factor derivado de células estromales 1 (SDF-1) y su receptor CXCR4, resultado en la metástasis de células de cáncer de colon CT26L al hígado (Seubert et al., 2015). Además, TIMP-1 aumenta la expresión de fibronectina, el TGF- β 1, el activador de plasminógeno urocinasa (uPA) y S100A8 en el hígado de ratones. Sin embargo, en el pulmón estos factores no se vieron afectados, al igual que la cantidad de neutrófilos (Seubert et al., 2015).

Estos estudios demuestran existe una preferencia sobre un órgano para hacer metástasis, y esto depende de diversos factores derivados del tumor primario. Los FSDT y las BMDC, así como las citocinas secretadas por estas, favorecen la remodelación de la ECM. La secreción de factores como SDF-1, TGF- β , metaloproteinasas de la matriz (MMP)-2 y MMP-9 aumenta la producción de nuevos componentes de la

ECM. El aumento en depósitos de fibronectina favorece la implantación de las células reclutadas al NPM y las células metastásicas (Costa-Silva et al., 2015; Seubert et al., 2015).

Durante la formación del NPM en el hígado, factores provenientes del microambiente tumoral pancreático inducen fibrosis hepática a través de las células estrelladas hepáticas (hepatic stellate cells o HSC, por sus siglas en inglés) (Ren et al., 2018). En un estudio en ratones se demostró que tres diferentes líneas celulares de cáncer pancreático estimulaban directamente la proliferación de las HSC y la síntesis de componentes de la ECM, como el colágeno I y la fibronectina, y fomentaban un microambiente inmunosupresor (Tien et al., 2009). Además, demostraron que el uso anticuerpos neutralizantes contra PDGF, FGF2 y TGF- β 1 podía disminuir la síntesis de ECM en células HSC en cultivo (Tien et al., 2009).

Por lo tanto, las células cancerosas emplean mecanismos de comunicación intercelular para inducir la formación del NPM, enviando FSDT, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y otros agentes como VE, como los exosomas, para que preparen el tejido blanco y fomenten la formación del NPM, lo que facilita la colonización hepática por las células tumorales.

1.1.3 Exosomas

Los exosomas son VE de origen endocítico que miden entre 50 y 150 nm de diámetro y juegan un papel crucial en la comunicación intercelular. Estas vesículas son liberadas por diferentes tipos de células y se pueden encontrar en fluidos extracelulares como la sangre, orina y líquido cefalorraquídeo, así como de sobrenadantes de cultivos celulares. A diferencia de otras VE de mayor tamaño, como los ectosomas (200-1000 nm) y los cuerpos apoptóticos (>500 nm), los exosomas se forman por un proceso de doble invaginación y se liberan por exocitosis a través de la fusión con la membrana plasmática (Kalluri y LeBleu, 2020).

1.1.3.1 Biogénesis y secreción de los exosomas

Durante la primera invaginación de la membrana plasmática, se forma el endosoma temprano, cuyo contenido incluye proteínas membranales y solubles relacionadas con el ambiente extracelular (Figura 5). Tanto el trans-Golgi como el retículo endoplásmico contribuyen en la formación y el contenido del endosoma temprano, que posteriormente madura a un endosoma tardío. Mediante una segunda

invaginación del endosoma, se forman las vesículas intraluminales (intraluminal vesicles o ILV, por sus siglas en inglés) y el conjunto de estos se conoce como cuerpos multivesiculares (multivesicular bodies o MVB, por sus siglas en inglés). Los MVB pueden ser degradados por lisosomas o autofagosomas, o pueden fusionarse con la membrana plasmática para liberar las vesículas intraluminales, denominadas exosomas. (Kalluri y LeBleu, 2020).

Diversas proteínas y complejos de empaquetamiento participan en la biogénesis de los exosomas. Los complejos de clasificación endosómica necesarios para la maquinaria de transporte (ESCRT) son una familia de proteínas que regulan el cargamento y la formación de las ILV en la membrana de los MVB. Las proteínas ESCRT-I/II/III, junto con la proteína del gen 101 de susceptibilidad tumoral (TSG101) y moléculas accesorias como la proteína X que interactúa con ALG-2 (ALIX) y la proteína vacuolar clasificadora asociada a la proteína 4 (VPS4), están involucradas en la gemación y escisión de la membrana que da lugar a la liberación de VE (Hurley, 2015; Mathieu et al., 2019).

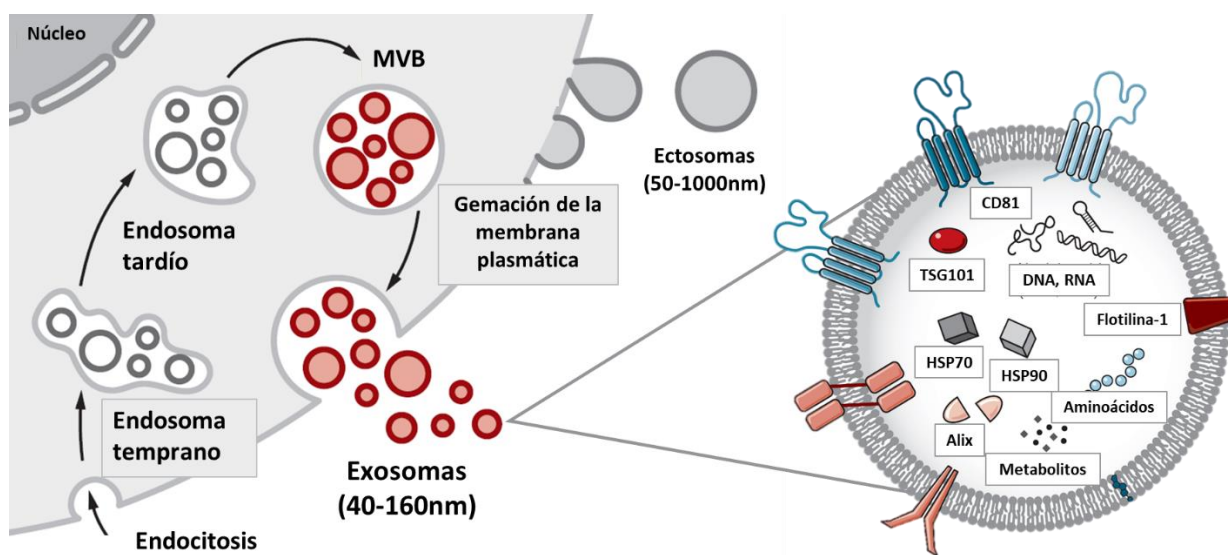


Figura 5. Biogénesis de los exosomas. Los exosomas se generan a partir de la vía endosomal mediante la formación de endosomas, lo que da lugar a los MVB que contienen ILV. Cuando los MVB se fusionan con la membrana plasmática, los exosomas se liberan (~40-160 nm). Los ectosomas se liberan a través de la gemación de la membrana plasmática y tienen un rango de diámetro entre 50 nm a 1 mm. Modificado de Kalluri y LeBleu (2020).

Aunque el contenido de proteínas depende del tipo de célula, estas proteínas deben estar en proximidad a la membrana plasmática o cercanas a los endosomas a través del aparato de Golgi (van Niel et al., 2018). Las proteínas ESCRT, como la proteína Hrs, reclutan proteínas de membrana ubiquitinizadas para integrarse a los endosomas que darán lugar a las ILV dentro de los MVB (Bache et al., 2003).

Los exosomas están enriquecidos en dominios de membrana plasmática altamente dinámicos y heterogéneos, conocidos como balsas lipídicas (Skryabin et al., 2020). Estos dominios contienen colesterol, ceramidas y esfingomiélin, mientras que presentan bajos niveles de fosfatidilcolina. Las ceramidas se forman por la hidrólisis del extremo fosfocolina de la esfingomiélin por la esfingomiélinasa neutral tipo 2 (nSMase-2). Este proceso genera dominios de membrana que imponen una curvatura negativa espontánea de la membrana, iniciando la primera invaginación en la formación de los exosomas. La inhibición de la nSMase-2 con GW4869, reduce notablemente la liberación de exosomas al prevenir la gemación necesaria para la formación de ILV en MVB (Trajkovic et al., 2008; van Niel et al., 2018).

Proteínas de la familia de las tetraspaninas, como CD81, CD63, CD82 y CD9 están involucradas en la selección de cargamento en los exosomas. El análisis de la estructura de CD81 reveló una forma de cono con una cavidad donde entra el colesterol y que la acumulación de varias de estas tetraspaninas induce la invaginación del sitio donde se encuentran enriquecidas (Zimmerman et al., 2016). En melanocitos, CD63 es esencial para la formación de las ILV en los endosomas tardíos y participa en la selección de la proteína del melanocito (PMEL) para integrarse en las ILV (van Niel et al., 2011). En células dendríticas, CD9 se asocia con el complejo mayor de histocompatibilidad II (class II of the major histocompatibility complex o MHC-II, por sus siglas en inglés) para su integración en las ILV (Buschow et al., 2009). Además, CD9 y CD82 facilitan el transporte de β -catenina en exosomas derivados de células 293T (Chairoungdua et al., 2010). Debido al enriquecimiento de tetraspaninas en exosomas, estas se utilizan experimentalmente como marcadores de exosomas en su purificación (Théry et al., 2018).

Además de proteínas, los exosomas pueden transportar ácidos nucleicos, incluyendo ARN mensajero (ARNm) y ARN no codificante como microRNA (miRNA), así como secuencias de ADN. También existen mecanismos específicos para la selección de los ácidos nucleicos en los exosomas. Se han identificado motivos de secuencias cortas en miRNA enriquecidos en exosomas, conocidos como EXOmotifs. Por ejemplo, la secuencia GGAG en el extremo 3' del miRNA se encuentra en el 75% de los miRNA presentes en los exosomas derivados de células T. La ribonucleoproteína heterogénea nuclear A2B1 (hnRNP A2B1) se une a este motivo y dirige a los miRNA a los exosomas (Villarroya-Beltri et al., 2013). Otros mecanismos indican que el ESCRT-II, ciertas tetraspaninas y el complejo de silenciamiento inducido de miRNA (miRISC) y la proteína argonauta 2 (AGO2) pueden actuar como complejos de unión al ARN (van Niel et al., 2018).

Una vez formados, los MVB pueden ser transportados hacia los lisosomas a degradación o a la membrana plasmática donde se fusionan y liberan las ILV, ahora denominados exosomas (Figura 6). En el proceso de secreción de exosomas participan proteínas GTPasas de la familia RAB y receptores de proteínas de fijación

soluble de NSF (SNARE). Las GTPasas Rab son fundamentales en el movimiento de vesículas entre los compartimentos intracelulares y en el transporte de los MVB a la membrana plasmática para la liberación de exosomas. Se ha demostrado que el silenciamiento de cinco proteínas Rab (Rab2b, Rab9a, Rab5a, Rab27a y Rab27b) mediante ARN de interferencia en células HeLa inhibe la secreción de exosomas sin alterar la secreción de proteínas solubles a través de la vía de secreción regular (Ostrowski et al., 2010). Además, las proteínas Rab27a/b participan en el anclaje de los MVB a la membrana plasmática para la liberación de los exosomas (Ostrowski et al., 2010).

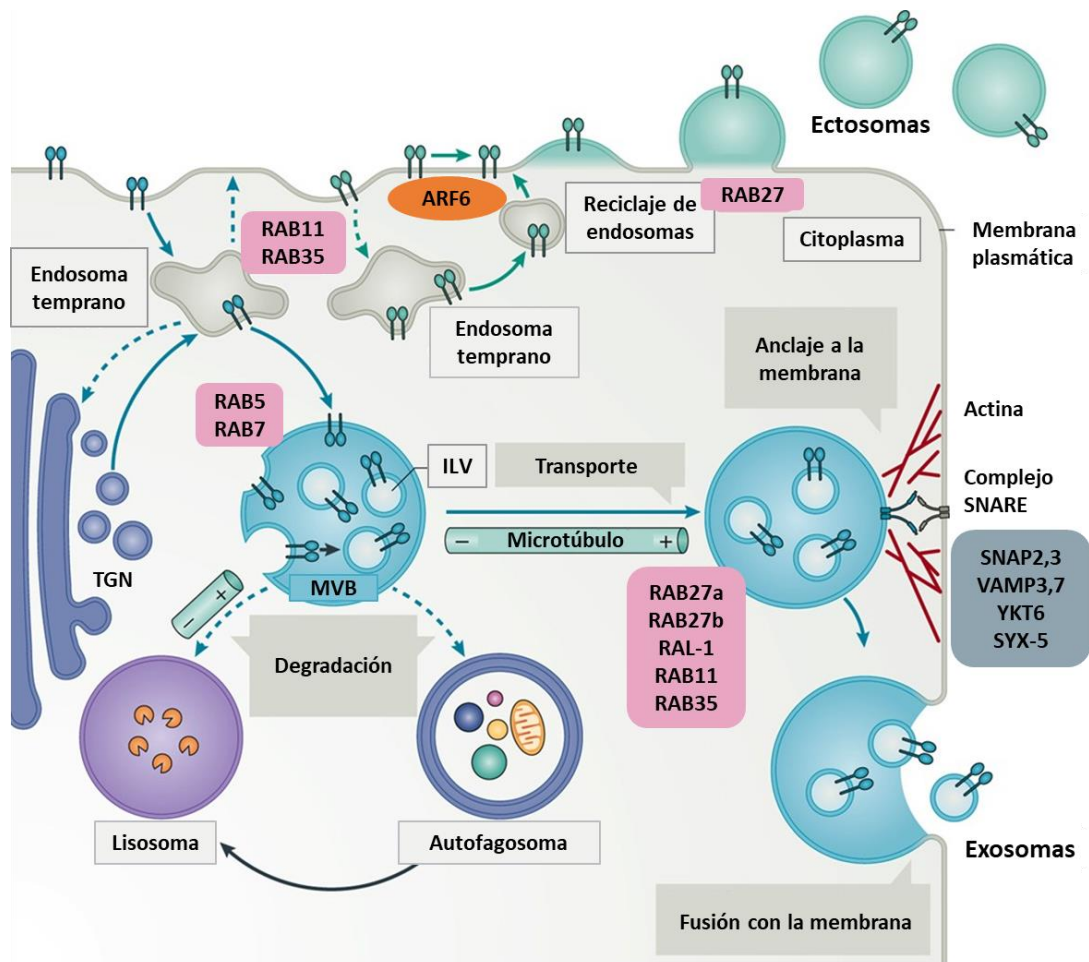


Figura 6. Mecanismos de tráfico intracelular de ectosomas y exosomas. El empaquetamiento y la liberación de ectosomas (flechas verdes) y exosomas (flechas azules) involucran múltiples pasos regulados por diversas GTPasas RAB (en rosa). El cargamento de los ectosomas permanece cerca de la membrana plasmática para su direccionamiento, y su liberación ocurre inmediatamente después de su generación y fisión. Los cargamentos destinados a los MVB pueden originarse por endocitosis en la membrana plasmática o ser transportados específicamente a los endosomas tempranos desde el trans-Golgi (TGN). Algunos pueden desviarse mediante transporte retrógrado hacia el TGN o reciclarse hacia la membrana plasmática (flechas punteadas), y así incorporarlos a las ILV. Los MVB pueden ser dirigidos a degradación por lisosomas o autofagosomas, o transportados a través de los microtúbulos a la membrana plasmática, seguido del anclaje y la fusión de los MVB con la membrana plasmática para liberar los exosomas. En este paso, participan las proteínas RAB, SNARE y la actina participan en la liberación de los exosomas. Modificado de van Niel et al. (2018).

Por otro lado, las proteínas SNARE son esenciales para la fusión de los MVB con la membrana plasmática. En un modelo de *Caenorhabditis elegans*, se comprobó que en ausencia de syntaxina-5, una proteína SNARE, los MVB se acumulan debajo de la membrana plasmática. La syntaxina-5 dirige los MVB a la membrana plasmática a través de la GTPasa Ral-1 (Hyenne et al., 2015).

Una vez en el espacio extracelular, los exosomas viajan hasta la célula blanco, son internalizados y entregan su contenido, lo que puede afectar el estado fisiológico o patológico de las células receptoras.

1.1.3.2 Internalización de exosomas

Para su internalización, los exosomas deben anclarse a la membrana plasmática e interactuar con receptores membranales, lo que puede activar vías de señalización o permitir su internalización mediante diversos mecanismos como fusión, macropinocitosis, fagocitosis o endocitosis dependiente o independiente de receptores, dependiendo del tipo de célula blanco (Figura 7) (Mathieu et al., 2019). En el trayecto hacia un tejido específico, los exosomas evitan la degradación por macrófagos por la presencia el receptor CD47 y así prolongando su tiempo en circulación (Kamerkar et al., 2017).

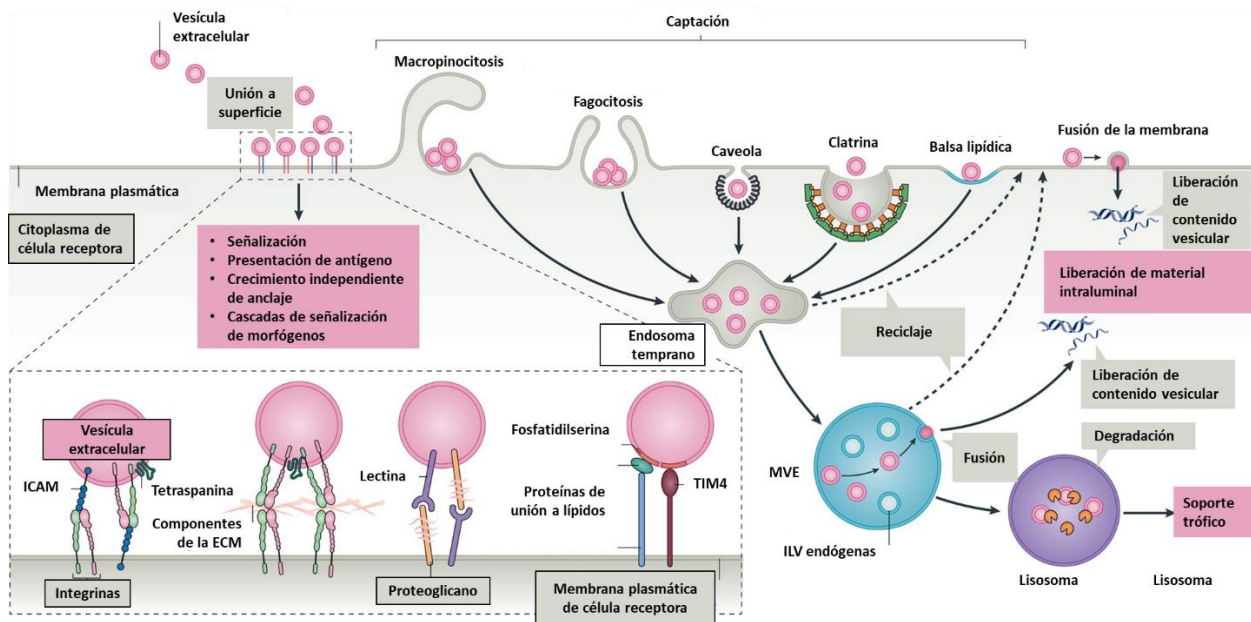


Figura 7. Internalización de vesículas extracelulares. Las vesículas se adhieren a la superficie celular a través de diferentes proteínas de adhesión. Dependiendo de la célula, pueden tener diferentes destinos e iniciar vías de señalización. En la mayoría de los casos, los mecanismos de internalización dirigen a las vesículas a la formación de endosomas tempranos, donde posteriormente liberan su contenido. La fusión de las vesículas con la membrana permite la liberación inmediata de su contenido en el citoplasma. También el contenido puede ser reciclado o degradado. Modificado de van Niel et al. (2018).

Diferentes mediadores facilitan el direccionamiento de los exosomas, como las integrinas. Las integrinas $\alpha_6\beta_1/\beta_4$ o $\alpha_v\beta_5$ pueden dirigir exosomas derivados de células cancerosas a tejidos específicos como el pulmón o el hígado, respectivamente, promoviendo la formación del NPM (Hoshino et al., 2015). Al llegar al tejido blanco, las integrinas interactúan con componentes de la ECM como la fibronectina en el hígado y laminina en el pulmón. Otras proteínas, como las tetraspaninas, y moléculas como el heparán sulfato, también contribuyen a la unión de los exosomas a las células receptoras (Christianson et al., 2013).

Una vez unidos a la célula receptora, los exosomas pueden permanecer en la membrana plasmática o ser internalizados mediante endocitosis dependiente o independiente de clatrina, como la macropinocitosis y la fagocitosis, o a través de caveolas o balsas lipídicas. Esto depende de la composición de los exosomas y de cada tipo de célula blanco. Por ejemplo, en células fagocíticas como los macrófagos, los exosomas son internalizados vía fagocitosis (Feng et al., 2010). Posteriormente, los exosomas entran a una vía endocítica y pueden ser enviados al lisosoma para su degradación, o su contenido puede ser reciclado en la misma célula. En células fagocíticas se encontraron marcadores fagolisosomales colocalizados con exosomas internalizados, lo que indica la posible degradación de los exosomas (Feng et al., 2010).

Cuando los exosomas se fusionan a la membrana plasmática liberando su contenido al citoplasma de la célula receptora. Este proceso se ha descrito para la entrega de miRNA (van Niel et al., 2018). La unión de los exosomas a la célula receptora desencadena diversas respuestas. Los exosomas derivados de linfocitos B y células dendríticas pueden presentar antígenos a los linfocitos T e inducir una respuesta antigénica (Raposo et al., 1996; Zitvogel et al., 1998). Además, se ha demostrado que los exosomas derivados de células tumorales pueden fomentar la progresión del cáncer, en diferentes etapas de la cascada metastásica.

1.1.3.3 Función de los exosomas en el cáncer

Los exosomas participan en la comunicación entre células tumorales y su microambiente a través de la transferencia horizontal de su contenido, que incluye proteínas, ADN, mRNA y miRNA. Esta comunicación regula procesos de transcripción y traducción, afectando la supervivencia, proliferación y diferenciación celular, y el equilibrio de la respuesta inmune, entre otros aspectos (Kalluri y LeBleu, 2020). Los exosomas intervienen en múltiples procesos fisiopatológicos sistémicos, como el crecimiento de tumores primarios y la reprogramación de células receptoras para apoyar la formación del NPM, lo que finalmente facilita la metástasis (Becker et al., 2016).

Las células cancerosas liberan exosomas que participan en diferentes etapas de la progresión metastásica, incluida la formación del NPM. Por ejemplo, exosomas derivados de astrocitos cerebrales transportan el miRNA-19a a células metastásicas cerebrales. Este miRNA-19a silencia al homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), lo que aumenta la secreción de CCL2 y recluta células mieloides, favoreciendo el crecimiento de las células metastásicas tumorales en el cerebro (Zhang et al., 2015).

En exosomas derivados de cultivos primarios de células de cáncer de próstata de pacientes, se observó un aumento en los niveles de miR100-5p, miR21-5p y miR139-5p, que de acuerdo con análisis bioinformáticos están relacionados con la carcinogénesis de cáncer de próstata, con la proliferación, diferenciación y migración de fibroblastos, y con la angiogénesis (Sánchez et al., 2016). Además, al transfectar estos miRNA en una línea celular de fibroblastos normales de próstata (WPMY-1), hubo un incremento la expresión de MMP, especialmente MMP-9, MMP-2 y MMP-13, proteínas que degradan la ECM y promueven cambios en el microambiente, favoreciendo la progresión del cáncer de próstata y la metástasis (Sánchez et al., 2016).

Las mutaciones en el oncogén *KRAS* y en el gen supresor de tumores *TP53* son las más comunes en adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC) (Biankin et al., 2012). En el suero de pacientes con cáncer pancreático, se encontraron exosomas que contenían ADN genómico de doble cadena con estas mutaciones, lo que propone la utilización de exosomas como herramientas de diagnóstico (Kahlert et al., 2014). En la metástasis hepática en cáncer de páncreas, los exosomas derivados de células de PDAC son internalizados en el hígado por las células de Kupffer, entregando el factor inhibitorio de macrófagos (MIF). En respuesta a esto, las células de Kupffer secretan el TGF- β , lo que aumenta la producción de fibronectina en las HSC. La acumulación de fibronectina promueve el reclutamiento de BMDC al hígado (Figura 8), completando así la formación del NPM en el hígado y fomentando la colonización por células metastáticas del tumor pancreático (Costa-Silva et al., 2015). La inhibición o silenciamiento de TGF- β en este modelo pudo prevenir la formación del NPM y la metástasis en el hígado (Costa-Silva et al., 2015).

En células normales, el TGF- β promueve la homeostasis y suprime la progresión tumoral directamente a través de efectos supresores de tumores e indirectamente mediando la inflamación en el estroma. Sin embargo, cuando el TGF- β pierde el efecto supresor en células tumorales, promueve la evasión de la respuesta inmune, la producción de factores de crecimiento, la invasión y la diseminación metastásica (Massagué, 2008). Por esto, la inhibición o silenciamiento específico del TGF- β como blanco terapéutico representa una oportunidad farmacológica significativa.

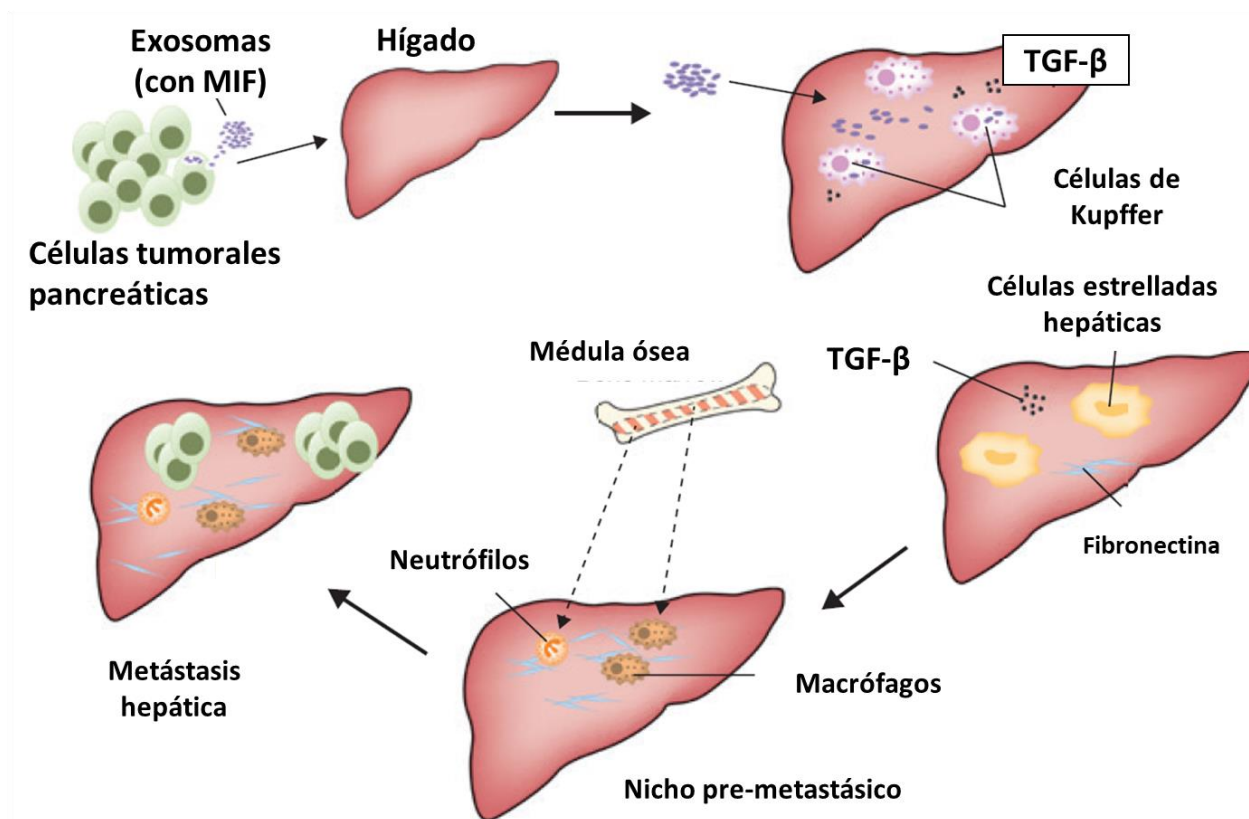


Figura 8. Pasos de la formación del nicho pre-metastásico hepático. Los exosomas MIF⁺ derivados de PDAC se unen a las células de Kupffer en el hígado, induciendo la producción de TGF-β en estas células. TGF-β activa las células estrelladas hepáticas, lo que aumenta la producción de fibronectina por estas células. BMDC como macrófagos y granulocitos se adhieren a los sitios ricos en fibronectina en el hígado, llevando a la formación del nicho pre-metastásico. Modificado de Zhang y Wang (2015).

1.1.3.4 Modificación de exosomas y aplicaciones clínicas

Ciertos descubrimientos posicionan a los exosomas como potenciales marcadores de pronóstico y diagnóstico, así como vehículos terapéuticos para diversos tipos de cáncer. Además, la presencia de exosomas en todos los fluidos corporales y su recolección mínimamente invasiva en pacientes, los posiciona como excelentes biomarcadores. La presencia de marcadores específicos de exosomas, como CD81, CD9 y CD63, permite su identificación en fluidos corporales.

Los exosomas han sido utilizados en el diagnóstico de diversas enfermedades, como enfermedades cardiovasculares (Zhang et al., 2017) y enfermedades que afectan al sistema nervioso central (Kanninen et al., 2016), así como algunos tipos de cáncer (Hoshino et al., 2020). Por ejemplo, se encontraron niveles elevados del miR-133a en exosomas derivados del plasma de pacientes con infarto agudo al miocardio, comparado con pacientes sanos (Kuwabara et al., 2011). También en un estudio de casos y controles de

pacientes con la enfermedad de Alzheimer, encontraron que los niveles de la proteína tau estaban incrementados en exosomas de pacientes que diez años más tarde desarrollaron esta enfermedad (Fiandaca et al., 2015).

El contenido de los exosomas, como miRNA, proteínas y fosfatidilserina en la membrana, podría ser potencialmente útil como marcador de diagnóstico o pronóstico. Niveles elevados de miR-21 en exosomas en plasma y otros miRNA oncogénicos (miR-155, miR-17-92, miR-1246) se han asociado con la progresión diversos tipos de cáncer, incluyendo de cerebro, páncreas, colon e hígado, al compararlos con pacientes sanos o con tumores benignos (Salehi y Sharifi, 2018). Algunos estudios sugieren que la presencia del proteoglicano GPC1 y fosfatidilserina en exosomas circulantes podría ser útil en el diagnóstico temprano del cáncer de páncreas (Frampton et al., 2018; Sharma et al., 2017).

Los exosomas se presentan como vehículos terapéuticos atractivos debido a su estabilidad, baja toxicidad e inmunogenicidad, flexibilidad para ser modificados y capacidad para atravesar barreras biológicas (Weng et al., 2021). Estas características incrementan su potencial en diversas patologías, y debido a su bicapa lipídica pueden resistir a manipulaciones. Además, estudios *in vivo* han demostrado que los exosomas pueden entregar su contenido sin ser fagocitados en la circulación por macrófagos, cuando el receptor CD47 está en su superficie (Kamerkar et al., 2017). No obstante, también enfrentan limitaciones como en su aislamiento, caracterización, control de calidad y la reproducibilidad en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Diversos estudios han demostrado la baja toxicidad e inmunogenicidad de los exosomas en cultivo celular y modelos preclínicos. En líneas celulares de monocitos humanos, THP-1 y U937, las VE derivadas de células embrionarias de riñón humano 293T no afectaron la capacidad fagocítica de las células y no exhibieron efectos citotóxicos (Rosas et al., 2016). En ratones C57BL/6 tratados con 8.5 µg de proteína de exosomas cada tercer día durante tres semanas, las VE derivadas de células 293T no causaron toxicidad o una respuesta inmunitaria (Zhu et al., 2017). También, se ha demostrado que exosomas derivados células dendríticas primarias de médula ósea de ratones C57BL/6 fueron capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y entregar ARN de silenciamiento en neuronas, microglía y oligodendrocitos (Alvarez-Erviti et al., 2011).

Existen varios métodos para la modificación de exosomas: difusión pasiva por incubación, métodos físicos y modificaciones de la superficie (Figura 9). La difusión pasiva por incubación es el método más sencillo, permitiendo la incorporación espontánea de compuestos hidrofóbicos debido a la bicapa lipídica de los exosomas (Sadeghi et al., 2023). En un estudio, se cultivaron células endoteliales de ratón con 7.5 µM de

curcumina durante 72 horas, para obtener exosomas cargados con curcumina (CUR-EXO). Se demostró la incorporación de la curcumina en los exosomas por microscopía confocal y al incubar células endoteliales de ratón con los CUR-EXO observaron una protección contra el neurotóxico homocisteína (Kalani y Chaturvedi, 2017). Sin embargo, este método tiene una baja eficiencia y puede provocar citotoxicidad, afectando la integridad de los exosomas. La eficiencia pudiera mejorarse ajustando la concentración de la curcumina, temperatura y el tiempo de la incubación (Sadeghi et al., 2023).

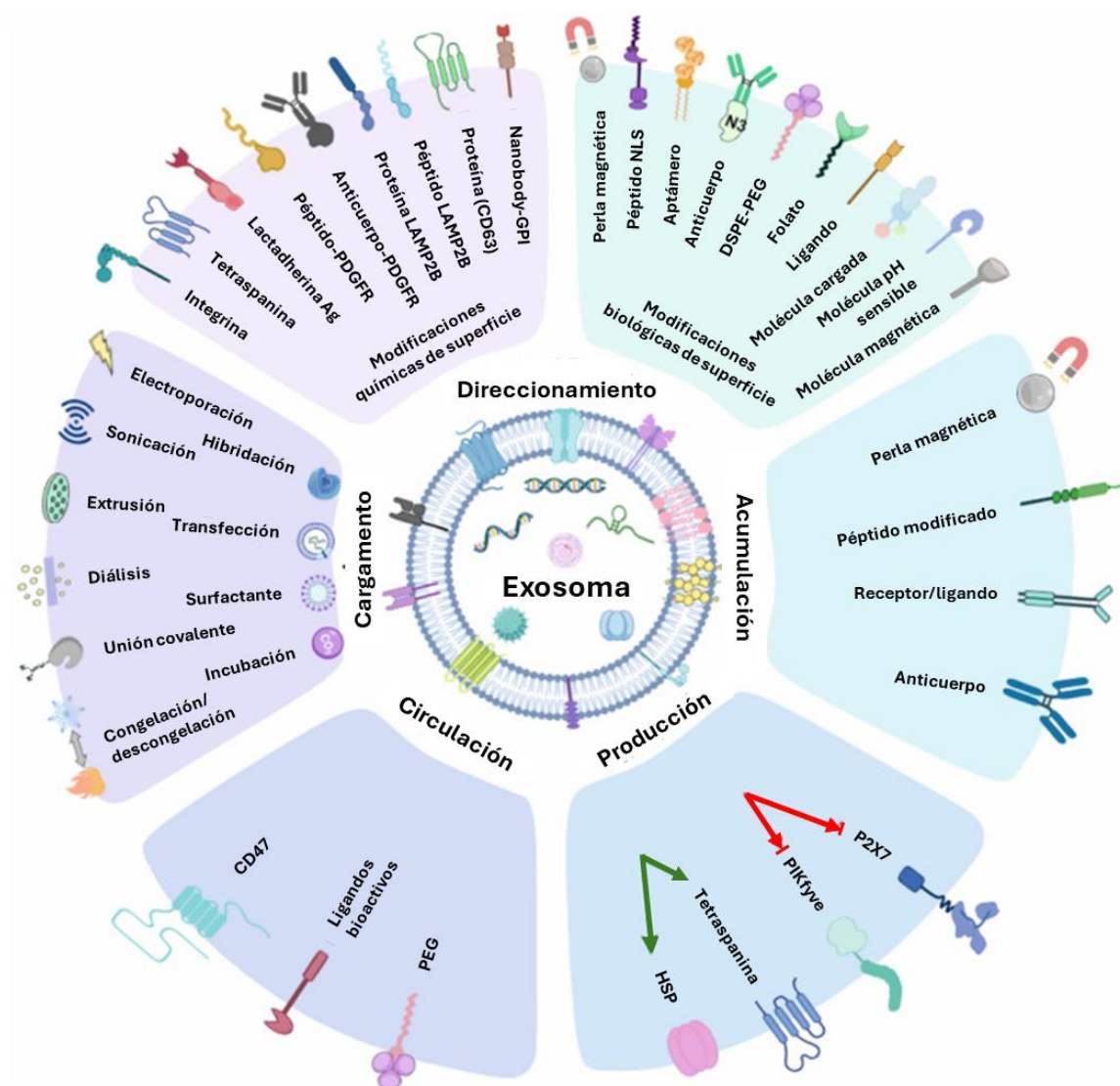


Figura 9. Modificaciones de exosomas. Ejemplos de modificaciones reportadas en exosomas para promover su direccionamiento y acumulación a un órgano o células específicas, para mejorar su producción, para aumentar su tiempo en circulación y para editar su cargamento. Modificado de Sadeghi et al. (2023).

Los métodos físicos incluyen la congelación-descongelación, tratamientos con surfactantes, sonicación, extrusión, diálisis y electroporación. Aunque estos métodos son los más eficientes, aumentan el riesgo de contaminación y daño a los exosomas. La sonicación debilita la integridad de la membrana sin afectar su

estructura, siendo ideal para ARN pequeños. La electroporación utiliza pulsos de voltaje para generar microporos en la membrana exosomal, adecuada para moléculas grandes, ARN pequeño de interferencia (small interfering RNA o siRNA, por sus siglas en inglés) y ARN mensajero (messenger RNA o mRNA, por sus siglas en inglés). No obstante, estos métodos pueden comprometer la integridad de los exosomas y conllevan riesgos de agregaciones de los ARN (Sadeghi et al., 2023). En un estudio se comparó la incorporación del quimioterapéutico paclitaxel (PTX) en exosomas (exoPTX) mediante sonicación incrementó el cargado de PTX comparado con los métodos de incubación y electroporación. Además, exosomas derivados de macrófagos cargados con PTX disminuyeron la metástasis pulmonar en ratones, siendo más efectivos que el tratamiento sistémico con PTX (Kim et al., 2016).

La diálisis es más eficiente que la incubación para incorporar siRNA y miRNA, aunque puede tener efectos negativos sobre proteínas y péptidos en los exosomas. La extrusión consiste en mezclar los exosomas y el cargamento a través de una jeringa con poros. Este método es sencillo y más eficiente que la incubación y la congelación-descongelación, pero puede deformar la membrana de los exosomas. La congelación-descongelación, menos eficiente, implica incubar la molécula de interés con los exosomas a temperatura ambiente, congelar rápidamente a -80°C o en nitrógeno líquido y descongelar a temperatura ambiente. Los tratamientos con surfactantes, como saponinas o tritón, aumentan la permeabilidad de la membrana exosomal, permitiendo la entrada del fármaco. La elección del método de cargado de los exosomas debe basarse en el tipo de medicamento y su forma de administración (Sadeghi et al., 2023).

Diversos estudios han demostrado el uso de exosomas como vehículos terapéuticos en modelos *in vivo* e *in vitro*, como la encapsulación de ARN de interferencia (RNA interference o RNAi, por sus siglas en inglés) como los siRNA (Kamerkar et al., 2017; Shtam et al., 2013; Subhan y Torchilin, 2019). Por ejemplo, exosomas cargados con siRNA contra Kras^{G12D} para tratar cáncer pancreático en ratones disminuyeron el tamaño de los tumores (Kamerkar et al., 2017). También, el tratamiento con VE cargadas con un siRNA contra survivina, un inhibidor de la apoptosis sobreexpresado células cancerosas, disminuyeron el volumen y tamaño de los tumores en ratones con cáncer colorrectal (Pi et al., 2018).

Para dirigir los exosomas a una célula o tejido específico, se pueden modificar sus características superficiales mediante técnicas químicas o genéticas. Las modificaciones químicas unen moléculas pequeñas, macromoléculas y polímeros de forma covalente a la superficie de los exosomas. Un grupo de investigadores utilizó folato para dirigir a las VE a células cancerosas, aprovechando la afinidad del folato por diferentes tipos de cáncer de origen epitelial, como el cáncer colorrectal, que sobreexpresa receptores de folato (Pi et al., 2018). La dirección de los exosomas a tejidos específicos también puede ser mediada

por integrinas: las integrinas $\alpha_6\beta_1$ y $\alpha_6\beta_4$ dirigen exosomas derivados de células tumorales los dirigen al pulmón, mientras que la integrina $\alpha_v\beta_5$ los dirige al hígado (Hoshino et al., 2015).

1.1.4 Integrinas

Las integrinas son los principales receptores de adhesión celular para componentes de la ECM. Esta familia está compuesta por 24 heterodímeros transmembranales, formados a partir de la combinación de 18 subunidades α y 8 subunidades β , y su unión no covalente involucra una integrina α y una integrina β (Figura 10). El dímero dicta la especificidad por un ligando en particular, pueden unirse a motivos peptídicos (Arg-Gly-Asp o RGD), colágeno, laminina y leucocitos (Mezu-Ndubuisi y Maheshwari, 2021). Los heterodímeros de integrinas se ensamblan en el retículo endoplásmico, luego se someten a modificaciones postraduccionales en el aparato de Golgi y se transportan a la membrana celular en su estado inactivo (Hamidi e Ivaska, 2018).

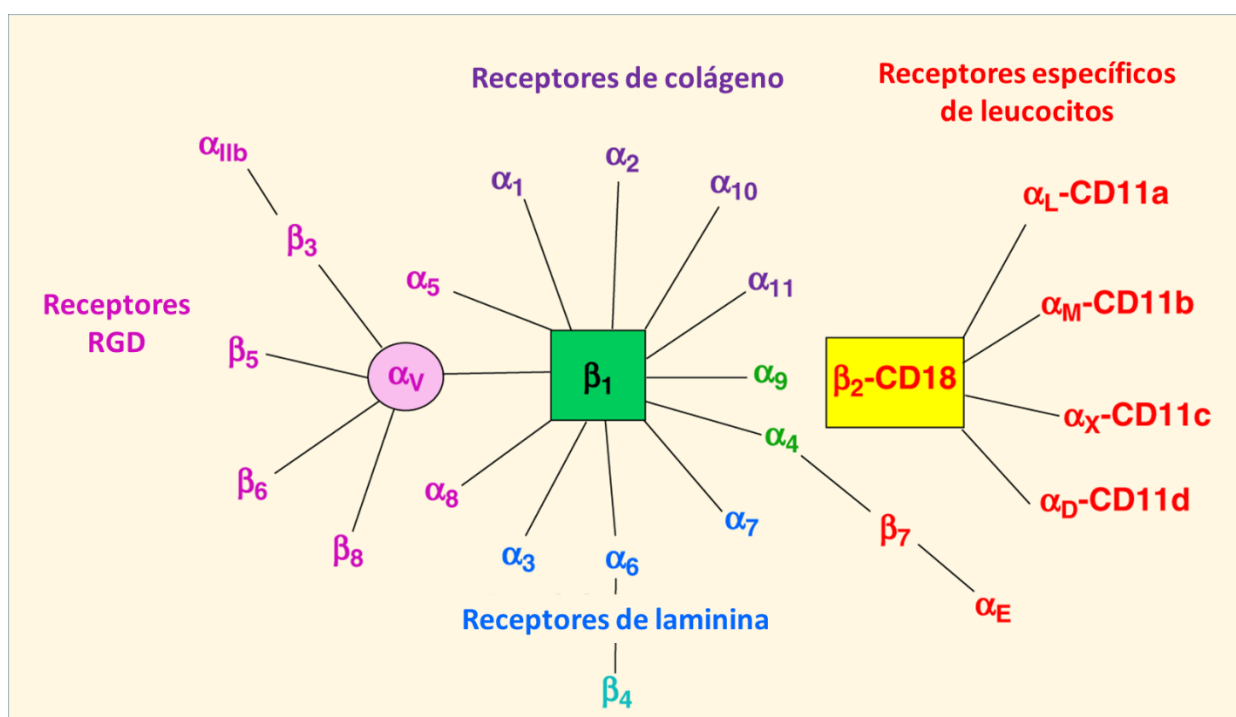


Figura 10. Diferentes combinaciones de integrinas. Modificado de Mezu-Ndubuisi y Maheshwari (2021).

Las integrinas actúan como moléculas de señalización bidireccional y tienen dos estados conformacionales: un estado inactivo (cerrado), que por su forma cerrada tiene baja afinidad por los ligandos, y un estado activo (abierto) donde se encuentran completamente extendidas (Figura 11). La

interacción de la integrina con ligandos de la ECM causa un cambio conformacional que estimula la actividad de la GTPasa RAP1A. Esto desencadena el reclutamiento de la molécula adaptadora que interactúa con RAP1-GTP (RIAM), para activar a la proteína talina (señal adentro-afuera). La unión de la talina a la subunidad β ocasiona el cambio a la conformación activa. Esto da lugar a la formación de clústeres de integrinas, causando un cambio conformacional en la cola citoplasmática, llevando a la activación de cinasas de la familia Src, moléculas de adhesión y de andamio en el citosol, que activan vías de señalización como RAS-MAPK y PI3K-AKT (señal afuera-adentro). Por último, las señales adentro-adentro puede ser desencadenadas por integrinas que se encuentran en endosomas (Hamidi e Ivaska, 2018).

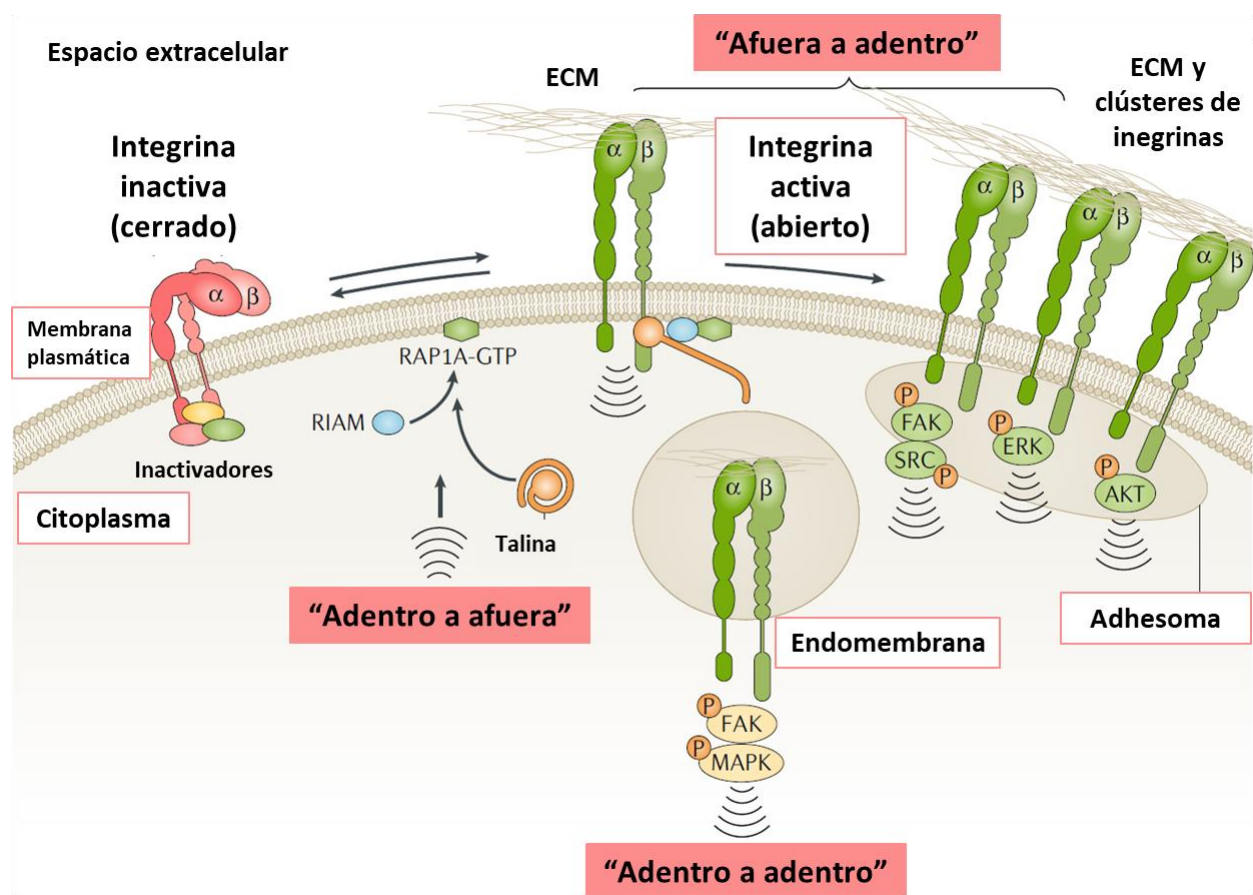


Figura 11. Señalización multidireccional de las integrinas. Las integrinas en su estado inactivo tienen baja afinidad a los ligandos de la ECM. Las señales adentro-afuera estimulan la actividad de RAP1A y el reclutamiento de RIAM para promover la unión de la talina a la subunidad β , activando a la integrina. En su estado activo pueden activar vías de señalización y respuestas celulares al unirse el ligando. Las señales afuera-adentro promueven la formación de los clústeres de integrinas e involucra la fosforilación de FAK y la activación de SRC. Las integrinas activas en los endosomas pueden iniciar señales adentro-adentro con la fosforilación de FAK y MAPK. Modificado de Hamidi e Ivaska (2018).

Las funciones de las integrinas constituyen una maquinaria compleja y altamente dinámica, responsable de regular aspectos como la supervivencia celular, adhesión, migración y diferenciación. Por esto, la disregulación de la función y señalización de las integrinas es factor precursor en la patogénesis de muchas enfermedades humanas, incluyendo el cáncer (Hamidi e Ivaska, 2018).

1.1.5 Papel de las integrinas en los exosomas y el cáncer

Las integrinas participan en la mayoría de las etapas de la progresión del cáncer, incluyendo su iniciación y proliferación, como en la metástasis. En diferentes pasos de la cascada metastásica, las células cancerosas deben atravesar la membrana basal, proceso que requiere de actividad proteolítica y las integrinas participan regulando la expresión de genes de las MMP para facilitar la degradación de la ECM. Además, los fibroblastos asociados a cáncer (cancer-associated fibroblasts o CAF, por sus siglas en inglés) pueden favorecer la invasión y migración al aumentar los depósitos de fibronectina a través de la integrina $\alpha_v\beta_3$ (Attieh et al., 2017). El aumento en la expresión de la integrina $\alpha_v\beta_3$ favorece el crecimiento independiente de anclaje y la resistencia a la apoptosis inducida por falta de anclaje (anoikis), al reclutar a la proteína SRC a la subunidad β_3 (Desgrosellier et al., 2009). Asimismo, la formación de trombos facilita la extravasación de las células tumorales mediante el reclutamiento de fibronectina para activar las integrinas (Knowles et al., 2013). Finalmente, la unión de las integrinas a la ECM en el tejido perivascular dicta si las células cancerosas proliferan o entran a dormancia (Hamidi e Ivaska, 2018).

En cáncer de mama, la integrina $\alpha_3\beta_1$ favorece la progresión del tumor (White et al., 2004), mientras que la integrina $\alpha_2\beta_1$ actúa como supresora de la metástasis (Ramirez et al., 2011). Las integrinas que activan el TGF- β actúan como supresoras tumorales, pero al momento de que el TGF- β pierde su efecto supresor tumoral, las mismas integrinas pueden funcionar como promotoras tumorales. La depleción génica de la integrina β_1 induce un aumento en la expresión de la integrina β_3 , promoviendo la activación del TGF- β y la EMT mediada por el TGF- β en células de cáncer de mama (Truong et al., 2014).

En el cáncer de pulmón, el aumento en la expresión de la integrina $\alpha_5\beta_1$ y de la fibronectina se relaciona con un mal pronóstico y con la progresión tumoral, induciendo la migración celular a través de la proteína de unión estrecha ZO1 (Tuomi et al., 2009). Por otro lado, en células de cáncer de ovario, la unión de la fibronectina a la integrina $\alpha_5\beta_1$ activa el receptor tirosina cinasa MET (Mitra et al., 2011), mientras que en células de cáncer de mama MET requiere de la integrina $\alpha_6\beta_4$ para promover la invasión (Trusolino et al., 2001).

La movilización de las integrinas es crucial para la migración e invasión celular, particularmente en células con formas mutantes de TP53. Las mutaciones en TP53 están estrechamente relacionadas con una mayor invasión y metástasis. Tanto la pérdida de función, como la ganancia de función de TP53 favorece la progresión del cáncer (Attardi y Boutelle, 2024). En las mutaciones de ganancia de función, TP53 actúa con otros factores de transcripción para reprogramar la expresión génica para promover la tumorigénesis, aumentan la asociación de la integrina $\alpha_5\beta_1$ con la proteína acopladora de Rab (RCP), el reclutamiento de receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) 1 y su subsecuente reutilización, promoviendo la formación de protrusiones de la membrana plasmática en ambientes ricos en fibronectina (Jacquemet et al., 2013). Este reciclaje, junto con la sobreexpresión del complejo proteico transportador de integrina 2/3 (ARP2/3) promueve la invasión de células de cáncer de ovario en modelos *in vivo* (Paul et al., 2015).

En células cancerosas, las integrinas activas y sus ligandos de la ECM, como la fibronectina, se encuentran en los endosomas. La cinasa de adhesión focal (FAK) activa se localiza en endosomas con la integrina β_1 , manteniendo activa la integrina por el reclutamiento de talina 1 a los endosomas. Esta cascada de señalización prolonga la activación de FAK, lo que favorece el crecimiento independiente de anclaje y la metástasis en células de cáncer de mama (Alanko et al., 2015).

Las integrinas pueden promover la supervivencia celular en suspensión y prolongar la señalización oncogénica de manera independiente de ligandos. La activación de MET por el factor de crecimiento hepático (HGF) induce la endocitosis de MET e integrinas β_1 y sus posibles dímeros. La integrina β_1 y sus posibles dímeros mantiene su conformación activa dentro de endosomas, aún en la ausencia de ligandos, y esto promueve la señalización de MET a ERK. El complejo MET- β_1 es necesario en el crecimiento independiente de anclaje y la metástasis impulsado por MET en un modelo de ratones. Además, MET puede desplazar a la integrina α_5 de la integrina β_1 , para formar el complejo MET- β_1 en cáncer de mama y glioblastoma (Barrow-McGee et al., 2016).

En células en suspensión, se pierden los clústeres de integrinas, y junto con la reducción de la formación de otros clústeres de receptores, como el EGFR, lo que puede desencadenar anoikis. Sin embargo, el aumento de la expresión de integrinas específicas, como la $\alpha_v\beta_3$, puede conferir una resistencia a este tipo de muerte celular. La integrina $\alpha_v\beta_3$ mantiene los clústeres incluso en células no adherentes al reclutar a SRC, una proteína de señalización intracelular que generalmente actúa junto con FAK, a la subunidad β_3 , que lleva a la activación de SRC y la supervivencia celular. A diferencia de la resistencia que confiere la integrina β_1 , la resistencia mediada por la integrina $\alpha_v\beta_3$ es independiente de la activación de FAK (Desgrosellier et al., 2009).

Durante el proceso de extravasación, las integrinas tienen un papel importante en las interacciones de las células cancerosas con el endotelio vascular. Por ejemplo, proteínas dependientes de integrinas, como la miosina X, inducen la formación de protrusiones de la membrana plasmática de células de cáncer de mama, lo que se relaciona con la extravasación al pulmón (Arjonen et al., 2014). Además, en el pulmón, la laminina, un componente de la membrana basal, interactúa con la integrina $\alpha_3\beta_1$ en las células tumorales para regular el arresto de las CTC en la vasculatura pulmonar (Wang et al., 2004).

En modelos de metástasis hepática por cáncer colorrectal, se han reportado depósitos de fibronectina en el lado luminal de los vasos sanguíneos de hígados de ratones con tumor primario y de hígados humanos con metástasis. Así, las CTC pueden adherirse a estos depósitos a través de talina 1 y posiblemente integrinas (Barbazán et al., 2017). También, la inhibición de la integrina β_1 reduce la metástasis en cáncer de mama y en PDAC. Se ha demostrado que las células de cáncer de mama MDA-MB-231 inyectadas en embriones de pez cebra se adhieren a la pared intraluminal del vaso sanguíneo a través de la integrina β_1 , permitiendo la migración de las células a través del endotelio al inducir su remodelación (Stoletov et al., 2010).

Por otro lado, las integrinas, siendo los receptores mayormente expresados en exosomas (Hamidi e Ivaska, 2018), pueden determinar el sitio de colonización de las células metastásicas al dirigir a los exosomas a órganos específicos. Un análisis mediante espectrometría de masas y western blot de exosomas derivados de células metastásicas a hígado y pulmón demostró una relación entre el sitio de metástasis y la expresión de diferentes integrinas. Los exosomas con direccionamiento al hígado presentaron una mayor expresión de la integrina β_5 , asociada con la integrina α_v , mientras que los exosomas con direccionamiento al pulmón expresaron predominantemente la integrinas α_6 asociada a la integrina β_4 o β_1 (Hoshino et al., 2015).

En un experimento, se trataron ratones con exosomas derivados de células metastásicas al hígado con un silenciamiento de ITG β_5 . La secuenciación de ARN proveniente de las KC mostró una disminución en la transcripción de los factores proinflamatorios, *S100P* y *S100A8*, en comparación con el tratamiento con exosomas derivados de células sin el silenciamiento (Hoshino et al., 2015). Cabe mencionar que factores de la familia S100 habían sido reportados anteriormente como importantes quimioattractores en la formación del NPM (Yamamoto et al., 2008).

Además, ensayos de ELISA realizados en exosomas derivados de plasma de pacientes con PDAC revelaron un incremento significativo en la ITG α_v en pacientes con cáncer con metástasis hepática, en comparación con pacientes con cáncer sin metástasis. También se midieron los niveles de la integrina α_v en exosomas

de pacientes al momento del diagnóstico de cáncer de páncreas, encontrándose niveles elevados de la integrina α_v en aquellos que desarrollaron metástasis hepática, en comparación con sujetos control o pacientes sin metástasis hepática tres años después de su diagnóstico. Esta evidencia sugiere que la medición de integrinas en exosomas podría tener un papel como marcador pronóstico, permitiendo predecir la metástasis a órganos específicos.

1.1.6 Factor de crecimiento transformante- β

La denominación del TGF- β corresponde a tres isoformas de citocinas: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. Esta superfamilia de citocinas incluye los tres TGF- β , así como las activinas/inhibinas, los factores de crecimiento y diferenciación (GDF), y las proteínas morfogénicas del hueso (BMP). Los miembros de esta superfamilia regulan el desarrollo embrionario, la homeostasis y la regeneración de tejidos, el crecimiento y diferenciación celular, la apoptosis, la invasión, la transición epitelio mesénquima, la producción de ECM, la angiogénesis y la respuesta inmune (Syed, 2016).

Las tres isoformas del TGF- β son sintetizadas como moléculas precursoras que contienen un homodímero de TGF- β que interactúa con el péptido asociado a la latencia (LAP), formando el complejo latente pequeño (SLC). Al unirse a la proteína de unión al TGF- β latente (LTBP), se forma el complejo latente grande (LLC), que es secretado a la ECM en un estado inactivo. La proteólisis del LAP libera el TGF- β activo para su unión a sus receptores, primero el TGFBR2 y luego el TGFBR1, con actividad serina/treonina proteína cinasas. El TGFBR3 o betaglicano (BG) funciona como co-receptor ya que no tiene actividad cinasa, pero facilita la unión del TGF- β al TGFBR2 (Figura 12). El BG tiene una afinidad, medida por la constante de afinidad K_D , para los tres ligandos en un rango de 4 a 20 nM (Mendoza et al., 2009). De los tres ligandos, BG tiene más afinidad para TGF- β 2 con una K_D de ~ 4 nM mientras la afinidad del TGFBR2 para TGF- β 2 es de ~ 3 μ M (Villarreal et al., 2016). Estos estudios indican que BG permite concentrar TGF- β , especialmente TGF- β 2, en la superficie de las células para presentarlos al TGFBR2. Recientemente, una combinación de análisis por cristalografía, criomicroscopía electrónica y espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN) permitió determinar como la unión del BG al TGF- β deja libre el sitio de unión del TGF- β al TGFBR2, potenciando la transferencia (Wieteska et al., 2025). A partir de esta interacción, se activa una cascada de señalización intracelular vía SMAD2 y SMAD3, las proteínas SMAD regulados por receptores (R-SMAD) que regulan diversas funciones celulares (Liu et al., 2021). Las proteínas SMAD contienen dominios globulares N-terminal y C-terminal, conocidos como MH1 y MH2 respectivamente. El dominio MH1 de las R-SMAD y

SMAD4 (co-SMAD) se unen al ADN, mientras que el dominio MH2 se une a otras SMAD y a factores de transcripción (Batlle y Massagué, 2019).

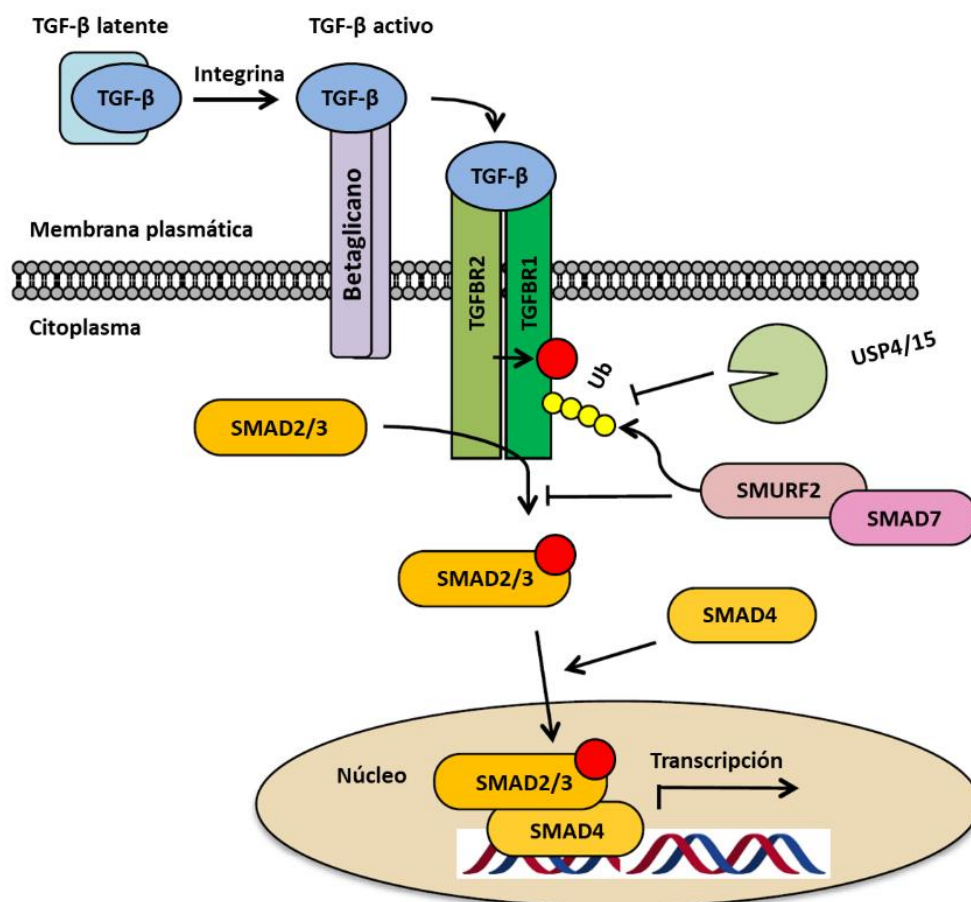


Figura 12. Vía de señalización del TGF-β. El TGF-β latente se une al BG en la membrana. El BG presenta al TGF-β al TGFBR2, se dimeriza con el TGFBR1 y lo fosforila. Seguido a esto, TGFBR1 fosforila a las SMAD2/3 que se unen a SMAD4 y en conjunto se translocan al núcleo para activar la transcripción de los genes blanco. SMAD7 junto con la ligasa E3 de ubiquitina SMURF2 pueden inducir la degradación proteosomal o lisosomal de TGFBR1. Este proceso puede ser revertido con la acción de la USP4/15, una enzima que remueve ubiquitinas. Modificado de Huynh et al. (2019).

La unión del TGF-β activo a los receptores de membrana induce cambios conformacionales en el TGFBR2, que forma dímero con el TGFBR1 y lo fosforila en residuos específicos de serina y treonina. El TGFBR1 fosforila a los receptores SMAD (R-SMAD-1, 2, 3, 5 y 8), que actúan como efectores citosólicos activando múltiples vías de señalización. Los R-SMAD fosforilados forman un complejo con el mediador co-SMAD4, que es transportado al núcleo para regular la expresión génica, deteniendo la cascada de señalización y enviando al receptor a degradación. (Batlle y Massagué, 2019; Syed, 2016). En el núcleo, los complejos SMAD activados pueden unirse a numerosas regiones reguladoras al interactuar con factores de transcripción. Por ejemplo, las R-SMAD son fosforiladas por las cinasas dependientes de ciclinas (cyclin-

dependent kinase o CDK, por sus siglas en inglés) CDK8 y CDK9, creando sitios de reclutamiento para cofactores adicionales. La fosforilación de SMAD desencadena más fosforilaciones que resultan en la ubiquitinación por ligasas de ubiquitina como SMURF2, llevando a la degradación del complejo SMAD. El TGF- β puede actuar sobre vías de señalización independientes de las proteínas SMADs, como PI3K, JNK, P38 y ERK MAP cinasas, para regular la expresión génica (Batlle y Massagué, 2019).

La vía de señalización TGF- β es regulada por SMAD7, que funciona como un inhibidor de la vía de señalización. En condiciones basales, SMAD7 se localiza en el núcleo, pero al formarse el complejo de los receptores del TGF- β , se transloca a la membrana plasmática para inhibir la interacción con las R-SMADS y bloquear la señalización. Además, SMAD7 puede unirse al ADN y bloquear eventos transcripcionales mediados por TGF- β , e inducir la degradación proteosomal de los receptores del TGF- β a través de su interacción con ligasas de ubiquitina (Syed, 2016). El BG puede ser escindido por proteasas para liberar el dominio extracelular soluble, conocido como BG soluble (BGs), y esta fracción regula la adhesión y migración celular, y puede tener un efecto inhibitorio sobre el TGFBR3 (Gatza et al., 2010).

Diversos estudios han descrito la participación del TGF- β en la carcinogénesis, haciendo énfasis su rol dual en este proceso.

1.1.6.1 TGF- β en cáncer

En células normales o no cancerosas, el TGF- β actúa como un supresor de tumores, regulando la proliferación celular, la apoptosis, la diferenciación, la senescencia, la adhesión y la motilidad. Sin embargo, la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas puede cambiar la función del TGF- β , promoviendo el potencial invasivo y metastásico de células cancerosas (Figura 13) (Syed, 2016).

El TGF- β afecta la progresión del ciclo celular causando arresto en la fase G1 al regular la expresión p21 y c-Myc, que actúan como inhibidores de las CDK (Huynh et al., 2019). También induce la expresión de p15INK4b para inhibir los complejos de ciclina-CDK e inhibe la expresión de la fosfatasa CDC25a, requerida para la activación del complejo ciclina-CDK (Iavarone y Massagué, 1997). Además, suprime la traducción, el crecimiento celular y la proliferación mediante la activación de la proteína inhibidora de la traducción 4E-BP1 (Azar et al., 2009). En líneas celulares de mama, como MCF10A, y de cáncer de mama, como MDA-MB-231, p53 promueve la expresión de p21 inducida por el TGF- β para bloquear la progresión del ciclo celular (Xu et al., 2015).

Las mutaciones que eliminan la vía de señalización del TGF- β no solo transforman a las células a un estado completamente maligno, sino que también estas células utilizan esta vía para crear un microambiente tumoral inmunosupresor para promover la progresión tumoral y metástasis (Batlle y Massagué, 2019). Se han encontrado mutaciones o deleciones en el TGF- β , sus receptores y las proteínas SMAD en el 25-50% de los casos de cáncer de esófago, colorrectal y adenocarcinoma pancreático, y en el 10-20% de los casos de cáncer de cabeza y cuello, adenocarcinomas de vejiga y endometrio, y carcinomas cervicouterino y pulmonar. Las mutaciones más frecuentes se presentan en SMAD2, SMAD3, TGFBR1 y TGFBR2 (Batlle y Massagué, 2019). Las mutaciones en el TGFBR1 y TGFBR2 están relacionadas con diversos tipos de carcinomas, como los de ovario, cervical, gástrico y de cabeza y cuello (Syed, 2016). Colectivamente, estas mutaciones donde se pierde la función del TGF- β , sus receptores o proteínas SMAD, proveen evidencia del rol de la vía de señalización del TGF- β como supresor de tumores.

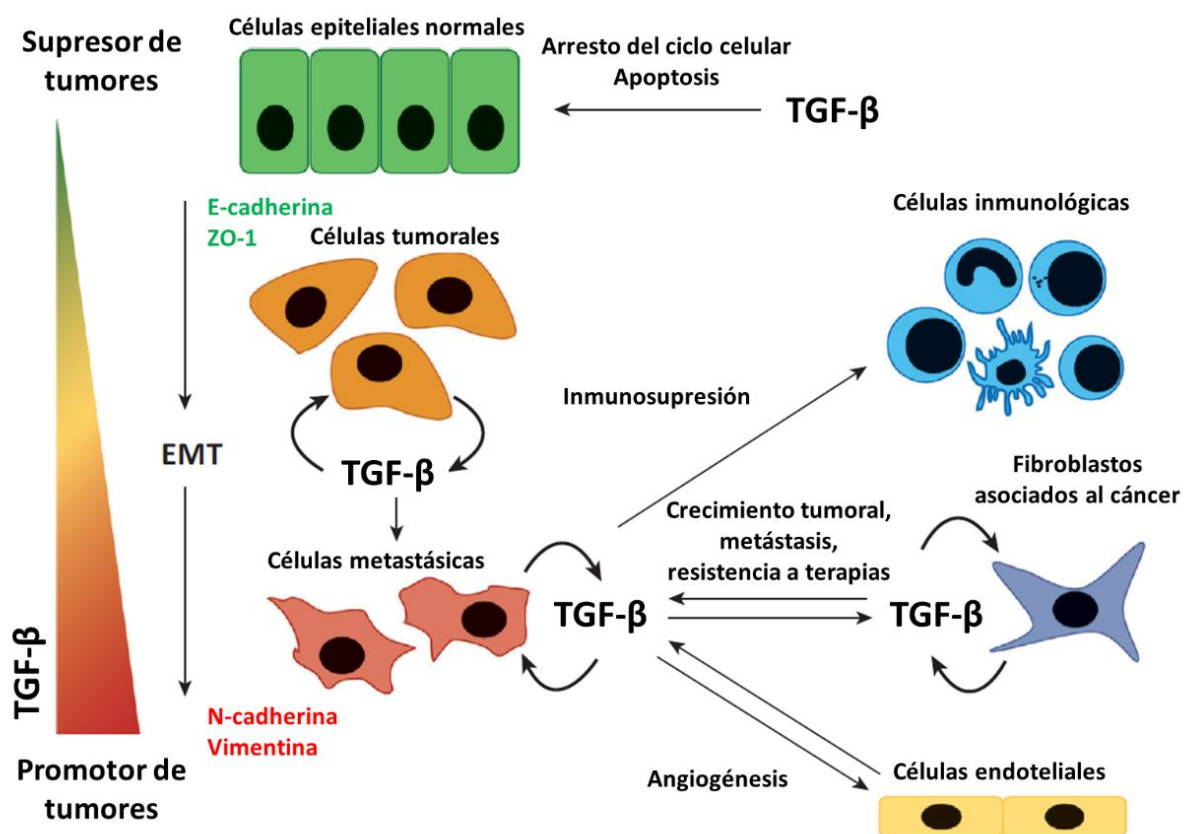


Figura 13. Participación del TGF- β en el microambiente tumoral. En células normales el TGF- β induce el arresto del ciclo celular y la apoptosis. En el cáncer, se aumenta su expresión y estimula la EMT induciendo el cambio en la expresión de marcadores epiteliales (E-cadherina, ZO-1) a mesenquimales (N-cadherina, vimentina) en las células tumorales. La EMT promueve la migración e invasión tumoral, y puede conferir resistencia a terapias. El TGF- β estimula la angiogénesis y la evasión del sistema inmune. También los CAF liberan TGF- β que favorece la progresión del cáncer. Modificado de Colak y Ten Dijke (2017).

En este contexto, el BG también ha sido identificado como un importante modulador de esta vía y como un supresor tumoral en diversos tipos de cáncer, incluyendo el de mama, melanoma, próstata, páncreas, colon, mieloma múltiple, neuroblastoma, ovario, endometrio y pulmón (Gatza et al., 2010). Una de sus funciones más relevantes radica en el desprendimiento del BGs, capaz de antagonizar los efectos inmunosupresores y protumorales del TGF- β (Gatza et al., 2010; Hanks et al., 2013). Niveles bajos de BGs en plasma han sido asociados con un peor pronóstico en cáncer de mama y melanoma en etapa III, lo que sugiere su potencial como biomarcador pronóstico (Gatza et al., 2010).

En pacientes con cáncer colorrectal se han encontrado mutaciones en el TGFBR2, y la pérdida del TGFBR3 se ha relacionado la progresión y mal pronóstico de la enfermedad. En ensayos *in vitro* e *in vitro* se ha demostrado que el TGFBR3 puede regular la migración celular, la invasión, la angiogénesis y la metástasis. Además, se han encontrado mutaciones en SMAD2 y SMAD4 en pacientes con cáncer pancreático, colorrectal, hepatocarcinoma, y cáncer de pulmón (Huynh et al., 2019; Syed, 2016).

Durante la progresión del cáncer, la función del TGF- β cambia de supresor a promotor de tumores. En algunos casos, la vía de señalización TGF- β y las SMADs se mantienen funcionales, pero las células no responden a los efectos supresores de tumor. Esto lleva a la adquisición de nuevas mutaciones oncogénicas en componentes de las vías de PI3K/AKT y RAS/MAPK. En estos casos, el TGF- β actúa promoviendo la EMT, la invasión y la metástasis (Lin et al., 2018). El TGF- β también puede inducir apoptosis al incrementar marcadores apoptóticos BIM y BIK. El TGF- β producido por las células tumorales actúa de manera autocrina. Las células cancerosas evaden los efectos citostáticos inducidos por el TGF- β debido a mutaciones somáticas en componentes de la vía de señalización de TGF- β (Huynh et al., 2019).

El TGF- β tiene un papel importante en la formación del NPM en el hígado. Las células de cáncer pancreático liberan exosomas cargados con MIF que, al ser internalizados por las KC, promueve la liberación del TGF- β por estos macrófagos. Esto desencadena una serie de eventos que favorecen la implantación de BMDC para completar la formación del NPM. Para demostrar la participación del TGF- β en este proceso, se utilizó un inhibidor del TGFBR1 (A83-01) en ratones tratados con exosomas derivados de células de cáncer pancreático, observándose una reducción en los depósitos de fibronectina y la migración de macrófagos al hígado. Además, disminuyó la metástasis hepática en los ratones tratados con el inhibidor (Costa-Silva et al., 2015). Por esto, el TGF- β puede ser un posible blanco terapéutico para evitar la metástasis al hígado.

1.1.6.2 Tratamientos para inhibir TGF- β

En estudios preclínicos y clínicos, se han probado diversos tratamientos para inhibir la vía del TGF- β , tales como anticuerpos neutralizantes, trampas de ligando e inhibidores de receptores serina/treonina cinasa (Figura 14). Cada uno presenta ventajas y limitaciones. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos no han tenido los resultados esperados en fases clínicas debido al desarrollo de efectos secundarios adversos.

Los anticuerpos neutralizantes, 264RAD y fresolimumab, bloquean la activación de la forma latente del TGF- β , al interferir con la unión del ligando a su receptor. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 264RAD, dirigido contra la integrina $\alpha_v\beta_6$ por su papel en la activación del TGF- β latente, mostró una reducción del crecimiento tumoral y la metástasis en un modelo *in vivo*. No obstante, en un estudio clínico de fase 1 en pacientes de melanoma, el anticuerpo monoclonal fresolimumab (GC1008), que se une a TGF- β 1 y TGF- β 2 para bloquear su unión a su receptor, produjo efectos secundarios como queratoacantomas cutáneos y carcinomas de células escamosas en 4 de 28 pacientes (Morris et al., 2014). El uso del anticuerpo monoclonal LY3022859, que al unirse TGFBR2 inhibe la unión del ligando, fue descartado debido a que la dosis requerida en pacientes provocaba síntomas adversos como la liberación descontrolada de citocinas (Tolcher et al., 2017).

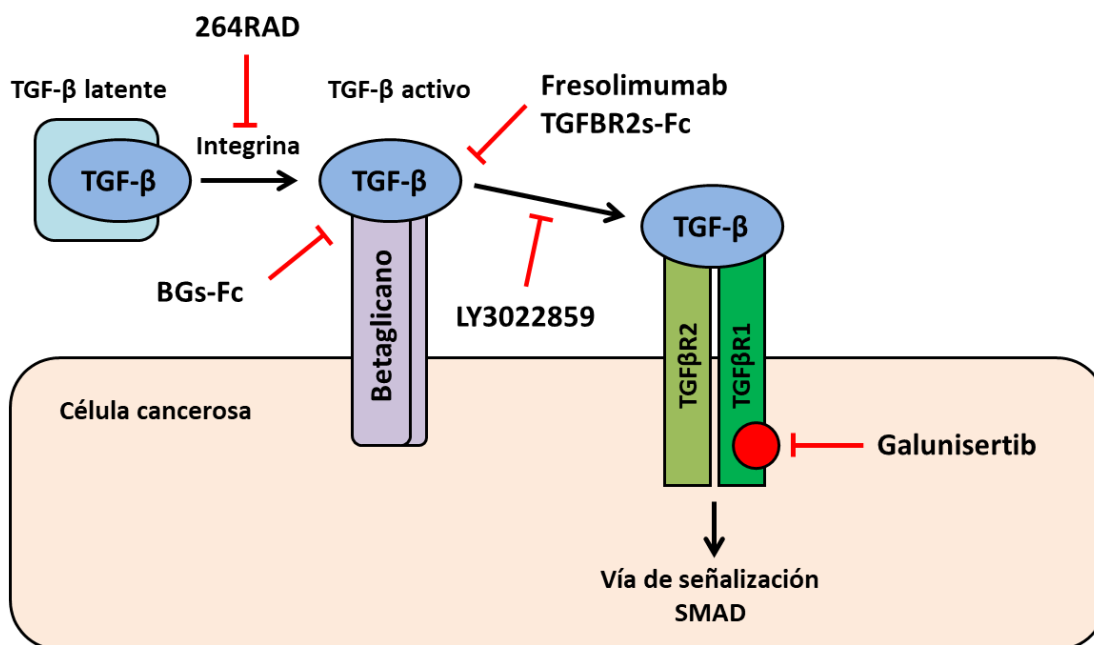


Figura 14. Estrategias de tratamientos anti-TGF- β . Diferentes agentes inhibidores de la vía del TGF- β , incluyendo anticuerpos neutralizantes (264RAD, fresolimumab, LY3022859), trampas de ligando (TGFBR2s-Fc, BGs-Fc) e un inhibidor de receptores cinasa (galunisertib). Modificado de Colak y Ten Dijke (2017) y Huynh et al. (2019).

Las trampas de ligando secuestran a la citocina para evitar su unión a los receptores. Entre ellos están la forma soluble del receptor 2 (TGFB2s) y el BGs fusionados a un fragmento cristizable de una inmunoglobulina (Fc) en el dominio extracelular. Ambos lograron reducir el crecimiento tumoral y la metástasis en modelos preclínicos. Se demostró que el TGFB2s-Fc induce la apoptosis en tumores primarios y reduce la movilidad de las células tumorales, la intravasación y la metástasis pulmonar (Muraoka et al., 2002). Además, el tratamiento con BGs-Fc en ratones con xenoinjertos de células de cáncer de mama MDA-MB-231 inhibió el crecimiento tumoral y la metástasis pulmonar (Bandyopadhyay et al., 2002).

El inhibidor de la actividad cinasa del TGFB1, galunisertib, se utilizó en combinación con gemcitabina, un quimioterapéutico ampliamente usado, en un estudio clínico de fase 2 en 104 pacientes con cáncer pancreático irresecable. La supervivencia general aumentó de 7.2 meses en el grupo placebo a 10.9 meses en los pacientes tratados con galunisertib y gemcitabina (Melisi et al., 2018). Además, en otro estudio, galunisertib mejoró la supervivencia de pacientes con carcinoma hepatocelular (Kelley et al., 2019). Sin embargo, anteriormente se había descrito en estudios preclínicos que galunisertib causaba toxicidad cardíaca al demostrar cambios histopatológicos inusuales en las válvulas cardíacas (Anderton et al., 2011). Este efecto se mitigó en pacientes con glioma, administrando una dosis intermitente de ciclos de 28 días, de dos semanas con tratamiento y dos semanas sin tratamiento (Kovacs et al., 2015).

Aunque los compuestos dirigidos a la vía de señalización del TGF- β han mostrado promesa en estudios preclínicos, los resultados en ensayos clínicos han sido menos alentadores y acompañados de efectos secundarios negativos. Por esto, para inhibir eficazmente al TGF- β , se necesitan tratamientos más específicos que se dirijan únicamente a las células cancerosas, minimizando así los efectos secundarios en pacientes.

1.2 Justificación

La diseminación de las células tumorales es la principal causa de muerte en pacientes con cáncer, siendo el hígado un órgano frecuentemente afectado por metástasis, lo cual subraya la necesidad de nuevos tratamientos para inhibir el desarrollo de la metástasis.

Las células cancerosas tienen la habilidad de preparar el nicho pre-metastásico, el futuro sitio donde las células metastásicas derivadas del tumor primario se establecerán para formar un nuevo tumor. Estas

células secretan exosomas que pueden diseminarse a diferentes tejidos debido a la presencia de integrinas que les confiere especificidad. En el cáncer de páncreas, los exosomas cargados con MIF son internalizados por las KC, lo que promueve la liberación de TGF- β , aumentando la producción de fibronectina y favoreciendo el reclutamiento de BMDC para completar la formación del nicho pre-metastásico.

El silenciamiento de TGF- β en KC en modelos preclínicos de cáncer de páncreas y en pacientes con cáncer de páncreas podría inhibir el establecimiento de metástasis en el hígado. Sin embargo, por las múltiples funciones del TGF- β en células no cancerosas, su silenciamiento debe ser dirigido y específico a las KC en el contexto del cáncer pancreático, para evitar efectos secundarios nocivos y el desarrollo de otras patologías.

La utilización de exosomas que contengan en su superficie la integrina $\alpha_v\beta_5$ y cargados con un shRNA contra el TGF- β permitirá dirigir los exosomas exclusivamente al hígado y silenciar TGF- β en las células blanco, interfiriendo con la formación del nicho pre-metastásico. Este estudio propone un posible tratamiento dirigido para detener la metástasis hepática.

1.3 Hipótesis

La modificación de exosomas con la integrina $\alpha_v\beta_5$ promoverá el organotropismo al hígado y la integración de un shRNA anti-TGF- β disminuirá la expresión de *Tgfb1* en las células blanco.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Producir exosomas especializados que se dirijan al hígado y carguen con un inhibidor de TGF- β 1.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Generar exosomas con la integrina $\alpha_v\beta_5$ en su membrana usando células 293T.

2. Validar el tropismo de los exosomas funcionalizados *in vivo* en el hígado de ratones.
3. Integrar inhibidores del TGF- β a los exosomas funcionalizados.
4. Caracterizar la expresión de TGF- β en células de ratón tratadas con los exosomas funcionalizados.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cultivo celular

Para los estudios *in vitro*, se utilizaron células de riñón embrionario humano 293T (CRL-3216, ATCC), células de melanoma de ratón B16-F1 (CRL-6323, ATCC), células tipo monocito/macrófago de ratón RAW 264.7 (TIB-71, ATCC), células de cáncer de mama de ratón 4T1 (CRL-2539, ATCC), células de hepatocarcinoma humano HepG2 (HB-8065, ATCC) y preostoblastos de calvaria de ratón MC-3T3E1 (CRL-2593, ATCC). Todas las células fueron cultivadas según las recomendaciones de la ATCC, a 37 °C y en atmosfera húmeda con 5% de CO₂, en el medio de cultivo correspondiente: las células 293T en medio DMEM (Dulbecco Modified Eagles Minimal Essential Medium, Corning), las células RAW 264.7, células B16-F1 y células 4T1 en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Corning), las células HepG2 en medio EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, Corning) y las células MC-3T3E1 en medio α -MEM (Minimum Essential Medium, Corning). Ambos medios suplementados con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB, Biowest) y 1% (v/v) de una solución de antibióticos y antimicótico (Corning).

Para el mantenimiento de células 293T, se desprendieron con una solución de tripsina (0.05% p/v) y EDTA (10 mM) (Corning), incubando a 37 °C durante 5 min. La reacción se detuvo agregando medio de cultivo DMEM completo y las células se diluyeron (1:5-1:10) de acuerdo con lo necesario para cada experimento. Para el mantenimiento de células RAW 264.7, al ser semi-adherentes, las células se desprendieron de manera mecánica con un descamador celular, y se diluyeron (1:5-1:10) de acuerdo con lo necesario para cada experimento.

Para su criopreservación, las células se desprendieron como se mencionó anteriormente y se centrifugaron a 800 g durante 5 min. Las células sedimentadas se resuspendieron en el medio de cultivo correspondiente suplementado con 5% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO). Se realizaron tres crioviales a partir de una placa confluyente de 100 mm de diámetro, con 500 μ L de suspensión celular cada uno y se congelaron en el recipiente de congelación Mr. Frosty (Thermo Scientific).

Para la activación de células, se descongelaron rápidamente a 37 °C, se lavaron con PBS (1x) (Dulbecco Phosphate Buffer Saline, Caisson Labs) y se centrifugaron a 800 g durante 5 min. Las células sedimentadas se resuspendieron en medio y se sembraron en placas de 100 mm con un volumen final de 8 mL de medio.

2.2 Obtención de plásmidos

Los plásmidos utilizados a lo largo del proyecto fueron pLenti-CMV-GFP-Hygro (Addgene plasmid #17446 (Campeau et al., 2009)) y pLenti-CMV-GFP-Puro [Addgene plasmid #17448 (Campeau et al., 2009)], obsequiados por Eric Campeau y Paul Kaufman, pLP1 (Thermo Fisher Scientific), pLP2 (Thermo Fisher Scientific), pMD2.G obsequiado de Didier Trono (Addgene plasmid #12259; <http://n2t.net/addgene:12259>; RRID:Addgene_12259), pLKO.1-puro [Addgene plasmid #8453 (Stewart et al., 2003)], pLKO.1-GFP-shRNA [Addgene plasmid #30323 (Sancak et al., 2008)], pLenti-ITGB5-T7 (Albert et al., 2000; Hernández García, 2018) y pCMV3-ITGAV-HA (#HG11269-CH, Sinobiological).

2.2.1 Preparación de bacterias competentes

Se cultivaron bacterias *Escherichia coli* de la cepa ER2738 en medio LB (Luria-Bertani) a 37 °C en la incubadora MaxQ 4000 (Thermo Fisher Scientific) con agitación a 200 g durante toda la noche. Se tomó un inóculo del cultivo en nuevo medio LB, obteniendo una dilución de 1:100. Se incubó el cultivo a 37 °C en agitación a 200 g hasta obtener una densidad óptica (DO) a 600 nm cerca de 0.3. Una vez obtenida esta DO, se enfrió el cultivo y se centrifugó a 3,000 g durante 5 min a 4 °C. El sedimento fue lavado con una solución de CaCl₂ (100 mM) frío y centrifugado a 2,000 g durante 15 min a 4 °C. El sedimento obtenido se resuspendió en 100 mM CaCl₂ frío y se incubó 20 min en hielo. Por último, se centrifugaron a 2,000 g durante 15 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 mL de una solución de CaCl₂ (100 mM) conteniendo glicerol (15% v/v). Se dividió el volumen total en alícuotas de 100 µL y se congelaron a -80 °C o se utilizaron para la transformación bacteriana.

2.2.2 Transformación de bacterias por choque térmico

Se utilizó la cepa *E. coli* ER2738. Por cada 50 µL de bacterias se añadieron 0.5 ng de plásmido. El choque térmico se realizó incubando 30 min en hielo, 90 seg a 42 °C y 5 min en hielo. Posteriormente, se agregaron 450 µL de medio LB y se incubaron 1 h a 37 °C en agitación. Se sembraron en placas LB/agar con carbenicilina (100 µg/mL) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Se utilizó el plásmido pUC19 como control de transformación.

2.2.3 Extracción de ADN plasmídico con Miniprep

A partir de las placas de LB/agar con colonias de bacterias, se colectó al menos una colonia por cada placa y para sembrar un medio LB con carbenicilina (100 µg/mL), incubando toda la noche a 37 °C a 200 g. Se obtuvieron sedimentos de bacterias centrifugando a 13,000 g durante 1 min. La extracción de ADN plasmídico se realizó con el GeneJet plasmid Miniprep kit (Thermo Fisher Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante. Al final de cada extracción, se cuantificó la concentración del ADN plasmídico utilizando un Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific) para medir la DO a 260 nm y la relación 260/280nm para establecer la pureza del ADN. Los plásmidos se almacenaron a -20 °C.

2.3 Transfección de células con plásmidos

2.3.1 Método de fosfato de calcio

Se sembraron 50,000 células 293T o B16-F1 por cm² y se incubaron durante 24 h. Se diluyeron los plásmidos a transfectar a una concentración de 12.5 ng/µL en solución de 240 mM de CaCl₂ y H₂O. Luego se agregó un volumen igual de solución amortiguadora de HEPES (1.5 mM de Na₂HPO₄, 280 mM de NaCl, 50 mM de HEPES, a pH 7.0) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 min. Se realizó un cambio de medio a las células por transfectar, antes de agregar 40 µL de la mezcla de soluciones por cm², correspondiendo a 250 ng de ADN plasmídico.

Las células se incubaron durante 18-24 h y se realizó cambio de medio para eliminar los plásmidos no transfectados. Después de 48 h se observaron al microscopio de fluorescencia (Fluid Cell Imaging System, Thermo Fisher Scientific) y se analizaron las células en el citómetro de flujo Attune Acoustic Cytometer (Thermo Fisher Scientific).

Las células transfectadas se mantuvieron en selección con higromicina, 100 y 300 µg/mL para las células 293T y B16-F1, respectivamente, durante 30 días, expandiendo cada vez que se alcanzaba 80% de confluencia. Las células se volvieron a analizar por citometría de flujo para confirmar que las células mantenían la expresión de las proteínas transfectadas. Posterior a esto, se mantuvieron en cultivo disminuyendo la concentración de higromicina a 50 y 150 µg/mL para las células 293T y B16-F1, respectivamente.

2.3.2 Método basado en la formación de polímeros catiónicos

Se sembraron 50,000 células 293T o B16-F1 por cm^2 y se cultivaron durante 24 h. En microtubos diferentes, se agregaron 125 μL de medio DMEM basal, a uno se agregaron 500 ng de plásmido y al otro 3 μL del reactivo de transfección Sinofection y se incubaron por 5 min. Se mezclaron las soluciones y se incubaron a temperatura ambiente por 15 min. Se eliminó el medio de cultivo de las células, se agregó la mezcla de transfección y 5 h después se realizó un cambio de medio.

Después de 48 h, se observaron al microscopio de fluorescencia (Floid Cell Imaging System) y se analizaron las células en el citómetro de flujo Attune Acoustic Cytometer (Thermo Fisher Scientific) y se mantuvieron en selección con higromicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las células 293T y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para B16-F1) durante 30 días, expandiendo cada vez que se alcanzaba 80% de confluencia. Las células se volvieron a analizar por citometría de flujo para confirmar que las células mantenían las proteínas transfectadas. Posterior a esto, se mantuvieron en cultivo disminuyendo de 50% la concentración de higromicina.

2.4 Citometría de flujo

Las células se desprendieron con tripsina-EDTA, se contaron las células vivas utilizando azul tripano en una cámara de Neubauer. Se centrifugaron a 350 g durante 8 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en una solución amortiguadora FACS (0.5% p/v de albúmina de suero bovino (BSA), 10 mM de EDTA en PBS 1X) suplementada con SFB (10% v/v) para el bloqueo de las interacciones no específicas. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se procedió a la tinción con anticuerpos (anti- α_v conjugada con ficoeritrina (PE) (clon NK1-M9, Biolegend), anti- β_5 conjugada con PE (clon AST-3T, Biolegend) y anti- $\alpha_v\beta_5$ conjugado PE (clon P1F6, Biolegend)), diluidos en solución amortiguadora de bloqueo. Se incubaron las células durante 40 min a 4 °C.

Las células se lavaron con solución FACS fría y se centrifugaron a 350 g durante 8 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 600 μL de solución amortiguadora fría. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo Attune Acoustic Cytometer (Thermo Fisher Scientific). Para el análisis, en el programa Attune® Cytometric Software (versión 2.1), se seleccionó la población celular y se establecieron los parámetros de fluorescencia basal utilizando células sin tratamiento ni tinción. A partir de esta referencia, se identificaron como positivas aquellas células que mostraron una fluorescencia superior a la basal tras la marcación con el anticuerpo correspondiente. Para los análisis estadísticos, se

consideraron la intensidad media de fluorescencia, el número de células y la desviación estándar obtenidos del citómetro. Los datos obtenidos fueron graficados y analizados utilizando el software GraphPad Prism, versión 9.0.1 o más elevada.

2.5 Selección de células 293T $\alpha_v\beta_5^+$

2.5.1 Selección de células con antibiótico

Las células transfectadas con los plásmidos pCMV3-ITGAV-HA y pLenti-ITGB5-T7, transcurridas las 72h después de la transfección, se cultivaron en medio DMEM completo suplementado con 100 $\mu\text{g/mL}$ de higromicina. Las células transfectadas con el plásmido pLenti-GFP-puro se cultivaron en medio DMEM suplementado con 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de puomicina. A los 30 días en selección se analizó la expresión de las integrinas y GFP por citometría de flujo.

2.5.2 Selección de células por separación celular

Las células 293T- $\alpha_v\beta_5$ (500 ng) se desprendieron y contaron utilizando el protocolo estándar. Las células se analizaron por citometría de flujo para establecer la población a seleccionar. Para separar las células $\alpha_v\beta_5^+$, se utilizó el equipo Moflo XDP Sorter (Beckman Coulter) en el Centro de Ciencias de la Salud Mexicali de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Se recuperaron las poblaciones de células y se mantuvieron en cultivo con 100 $\mu\text{g/mL}$ de higromicina. Las células se expandieron hasta obtener una confluencia suficiente para analizar por citometría de flujo.

2.5.3 Selección de células por dilución límite

Las células 293T- $\alpha_v\beta_5$ (500 ng) se desprendieron y contaron utilizando el protocolo estándar. Para sembrar una célula por pozo en placas de 96 pozos, las células 293T- $\alpha_v\beta_5$ se diluyeron hasta obtener una célula por cada 100 μL de medio; sembrando 100 μL en cada pozo. Las placas se observaron al microscopio cada día hasta identificar pozos en los cuales había una célula por pozo. Las células se expandieron hasta obtener una confluencia suficiente para analizar por citometría de flujo.

2.6 Western blot

2.6.1 Lisado y cuantificación proteica

Para la obtención de lisados proteicos, las células se desprendieron mecánicamente de la placa de cultivo o con el método tripsina-EDTA. Se agregó una solución amortiguadora de lisis (0.05 M de Tris-HCl pH 8.0, 0.15 M de NaCl, 0.1% v/v, de NP-40, 4 mM de EDTA e inhibidores de proteasas cOmplete). Se incubaron durante 10 min en hielo, se centrifugaron a 14,000 g durante 10 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Se utilizó el kit MicroBCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) para determinar la concentración de proteínas en lisados de células y exosomas. La densidad óptica a 562 nm se midió con un lector de placa Epoch (Biotek Instrument Inc.). La concentración de proteínas se calculó mediante una curva estándar realizada con dilución de BSA.

2.6.2 Electroforesis y transferencia de proteínas

Los lisados de células y exosomas se diluyeron con una solución de carga (50%, v/v, de glicerol, 5%, p/v, de SDS, 0.1%, p/v, de azul de bromofenol, 3.58 M de 2-mercaptoetanol en 50 mM de TRIS-HCl a pH 6.8; dilución 1:5). Para desnaturalizar las proteínas, las muestras se incubaron 5 min a 95 °C y después 5 min en hielo. Las proteínas se separaron por electroforesis (30 min a 75 V; 1.5h a 110 V) en geles de poliacrilamida al 10-15%. Se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (Inmobilon) en una cámara semihúmeda (45 min, 15 V, 500 mA). Las membranas se bloquearon con una solución amortiguadora TBS-T (0.1%, v/v, Tween-20, 1.37 M NaCl en 200 mM de TRIS-HCl a pH 7.6) con 5% (p/v) de leche en polvo libre de grasa (TBS-T leche) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación (60 rpm) y se incubaron toda la noche a 16°C en agitación (60 rpm) con anticuerpos primarios: CD81 (dilución 1:250 o 0.8 µg/mL, anticuerpo monoclonal de ratón IgG2b κ, clon B-11, Santa Cruz Biotechnology), T7 (dilución 1:2,500 o 0.4 µg/mL, anticuerpo policlonal de conejo, Merck Millipore), HA (dilución 1:200 o 1.0 µg/mL, anticuerpo monoclonal de ratón, IgG2a κ, clon F-7, Santa Cruz Biotechnology), Myc (dilución 1:1,000 o 0.2 µg/mL, anticuerpo monoclonal de ratón IgG1, clon 9E10, Santa Cruz Biotechnology) o α-tubulina (dilución 1:8,000 o 0.625 µg/mL, anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 κ, clon B-5-1-2, Sigma-Aldrich). Las membranas se lavaron tres veces en TBS-T e incubadas 1 h con anticuerpos secundarios conjugados con la peroxidasa de rábano: anti-conejo IgG (dilución 1:80,000 o 0.09 µg/mL, Sigma-Aldrich) o anti-ratón IgG (dilución 1:40,000 o 0.19 µg/mL, Sigma-Aldrich). Se analizaron las

membranas con un foto-documentador (BioRad ChemiDoc XRS) utilizando la solución de sustrato quimioluminiscente de HRP (Millipore). Las imágenes obtenidas fueron analizadas usando el programa FIJI (versión 1.54) (Schindelin et al., 2012).

2.7 Aislamiento de exosomas

2.7.1 Aislamiento por ultracentrifugación

Se cultivaron células 293T y B16-F1 en cajas de cultivo de 150 cm² hasta alcanzar confluencia de 70%. Una vez alcanzada la confluencia, se retiró el medio y se agregaron 15 mL de medio DMEM con 2% (v/v) de SFB libre de exosomas y se incubaron durante 48 h. Se recolectó el medio condicionado y los exosomas se aislaron por el método de ultracentrifugación. Los medios condicionados con exosomas se sometieron a una serie de centrifugaciones para eliminar las células (300 g, 10 min, 4 °C), los cuerpos apoptóticos (2,000 g, 20 min, 4 °C) y los ectosomas (10,000 g, 30 min, 4 °C) en un rotor de ángulo fijo (modelo 75002006, Sorvall Heraeus) con una centrífuga Multifuge 1 S-R (Sorvall Heraeus), recuperando el sobrenadante entre cada centrifugación. El sobrenadante con los exosomas se congeló a -80 °C. El precipitado de la centrifugación a 10,000 g con los ectosomas se lavó en 1 mL de PBS 1X, seguido de una centrifugación a 14,000 g por 30 min a 4 °C en una microcentrífuga 5417R (Eppendorf). Los ectosomas se resuspendieron en 50 µL de PBS 1X y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Se procedió con dos rondas de ultracentrifugación de los medios condicionados libre de células, cuerpos apoptóticos y ectosomas en una ultracentrífuga Optima XPN-100 (BeckmanCoulter) para obtener los exosomas. La primera ronda se hizo a 150,000 g durante 2 h (rotor 50.2 Ti) a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en PBS 1X filtrado para lavarlo. Se procedió con una segunda ultracentrifugación a 120,000 g durante 1.5 h (rotor 90 Ti) a 4 °C. El sedimento se resuspendió en 100 µL de PBS 1X. Los exosomas obtenidos se caracterizaron por dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering o DLS, por sus siglas en inglés) utilizando un NanoSizer (Malvern Panalytical) y se almacenaron a 4 °C para su uso en ensayos *in vitro* e *in vivo* y para análisis de proteínas se almacenaron a -20 °C.

2.7.2 Caracterización de exosomas por dispersión de luz dinámica

Los exosomas obtenidos se transfirieron a una cubeta ZEN40 (Malvern Panalytical) y se midió el diámetro hidrodinámico utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical) con PBS como dispersante. Cada muestra fue medida en triplicado con 15 mediciones individuales cada una.

2.7.3 Tinción de vesículas extracelulares

Se tomaron los exosomas después de la primera ultracentrifugación, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en una solución de PBS 1X filtrado con SP-DiIC₁₈ (1.0-5.0 μ M, Thermo Fisher Scientific). Las vesículas se incubaron 40 min a 37 °C en un termobloque, seguido de 15 min en hielo. Para eliminar el fluoróforo libre, los exosomas se lavaron con PBS 1X y se ultracentrifugaron a 120,000 g durante 1.5 h (rotor 90 Ti) a 4 °C. El sedimento se resuspendió en 100 μ L de PBS 1X.

2.7.4 Ensayo de internalización de exosomas y transferencia de β_5

Para determinar la internalización de vesículas y la transferencia de la integrina, se sembraron 120,000 células RAW 264.7 por cm² de superficie. Se agregaron entre 0.75-6.0 μ g de vesículas teñidas por cada cm² y las células se incubaron 24 h.

Para el análisis por citometría de flujo, las células se desprendieron por pipeteo y se resuspendieron en 600 μ L de solución FACS 1X fría. Para análisis por microscopía de fluorescencia, las células se lavaron con PBS 1X, se fijaron con 50 μ L de paraformaldehído al 4% (p/v, PFA) y se incubaron 10 min a temperatura ambiente. Se eliminó el PFA y se lavó con PBS 1X. Se agregaron 50 μ L de DAPI (Thermo Fisher Scientific) a 0.1 μ g/mL, se incubaron 10 min a temperatura ambiente, seguido de una incubación a 4 °C durante toda la noche.

Se tomaron fotografías con el microscopio de fluorescencia Fluid Cell Imaging System (ThermoFisher Scientific) y las imágenes se analizaron con el software FIJI v1.54 (Schindelin et al., 2012). Para el western blot, se obtuvieron los lisados de proteína de las células tratadas.

2.8 Distribución de exosomas *in vivo*

Los protocolos se realizaron acorde a la regulación federal para el cuidado y experimentación con animales, la NOM-062-ZOO-1999 en CICESE. Los ratones Balb/CA_NHNsd (Envigo) se reprodujeron en CICESE y se alimentaron ad libitum con agua y comida sólida (Laboratory Autoclavable Rodent Diet, 24% protein content; LabDiet). Los ratones habitaron en jaulas ventiladas del sistema Optimice (Animal Care Systems) a 20-24 °C y con ciclos controlados de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad.

Los ratones macho de 6-8 semanas de edad recibieron una inoculación intravenosa de PBS 1X o exosomas (10-40 µg de proteína total) por la vena de la cola en un volumen total de 200 µL utilizando una jeringa de 30 G de 500 µL. Al día siguiente (16-24 h después), los ratones fueron sacrificados. Los órganos recolectados se embebieron en el medio de inclusión O.C.T. Tissue-Tek (Sakura Finetek) y los bloques se congelaron sobre hielo seco. Se prepararon secciones de 8 µm de ancho con el criostato CM1510S (Leica), y se secaron al aire en portaobjetos. Los cortes se fijaron con PFA (2% v/v) durante 20 min a temperatura ambiente. Se eliminó el exceso PFA y se lavó una vez con TBS 1X durante 5 min. Las muestras se incubaron con 50 µL de DAPI a 1 µg/mL durante 1 h a temperatura ambiente, y posteriormente se eliminó el exceso de DAPI. Para el montaje, se agregaron 50 µL de medio de montaje acuoso (90% glicerol en TRIS-HCl 0.2 M, pH 8.5-9.0) y cuidadosamente se colocó el cubreobjetos. Se utilizó barniz de uñas para sellar el cubreobjetos en el portaobjetos. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron utilizando el microscopio confocal FV100 Olympus (Evident) del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) del CICESE, y fueron analizadas con el software FIJI v1.54 (Schindelin et al., 2012).

2.9 Inserción de secuencia de shRNA en un vector lentiviral

Para el silenciamiento del *Tgfb1* de ratón, utilizamos dos secuencias de shRNA que reconocen *Tgfb1*: GCTCTTGTGACAGCAAAGATA [shTgfb1¹, correspondiente a la clona TRCN0000065997 de la librería TRC (Yang et al., 2011)] y GTGGAAGCTCTACCAGAAATAT (shTgfb1², diseñada con el programa VectorBuilder's shRNA Target Design tool). Los oligonucleótidos fueron diseñados con NEBaseChanger (New England Biolabs). Las secuencias se insertaron inmediatamente después del sitio de restricción para *AgeI* del plásmido pLKO.1-puro [obsequiados de Bob Weinberg, Addgene plasmid #8453 (Stewart et al., 2003)] utilizando el kit de mutagénesis dirigida Q5 (New England Biolabs). Se seleccionaron múltiples colonias para cada inserción y se realizó PCR de colonia para validar la inserción. De las colonias positivas, se realizaron cultivos líquidos seguido de la extracción de ADN plasmídico. Los plásmidos obtenidos se

secuenciaron con la compañía Genewiz por secuenciación de Sanger para confirmar que la secuencia correcta fue insertada en el plásmido.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos para mutagénesis dirigida y PCR de colonia.

Nombre	Orientación	Secuencia 5'-3'
shTgfb1¹	Forward	GTATCTTTGCTGTCACAAGAGCTTTTGAATTCTCGACCTCGAG
	Reverse	TCGAGTATCTTTGCTGTCACAAGAGCCCGGTGTTTCGTCCTTTC
shTgfb1²	Forward	GATATTCTGGTAGAGTTCCACTTTTGAATTCTCGACCTCGAG
	Reverse	TCGAGATATTCTGGTAGAGTTCCACCCGGTGTTCGTCCTTTC
Inserción	Forward	ACTGGAGTTGTACGGCAGTG
shTgfb1	Reverse	GGGGCTGATCCCGTTGATT

2.10 Transducción lentiviral

Para la sobreexpresión de shTgfb1 o shGFP en células 293T, utilizamos un sistema lentiviral de tercera generación que consiste en vectores de empaquetamiento pLP1 y pLP2, el vector de envoltura pMD2.G y el vector de transferencia pLenti-CMV-GFP-puro, pLKO.1-puro, pLKO.1-GFP-shRNA, pLKO.1-shTgfb1¹ o pLKO.1-shTgfb1².

Se sembraron 50,000 células 293T por cm² en una placa de 12 pozos y se cultivaron durante 24 h. Al día siguiente se transfectaron cantidades equimolares de los plásmidos por el método de fosfato de calcio o Ca₃(PO₄)₂. Se recolectaron las partículas lentivirales a las 48 y 72 h posteriores a la transfección, se mezclaron y se agregó polibreno (Sigma-Aldrich) para tener una concentración final de 8 µg/mL. El primer día de recolección se sembraron células 293T-α_vβ₅ (50,000 células por cm²) o 4T1 (12,000 células por cm²) en placa de 24 pozos. El segundo día de recolección, 1 mL de partículas lentivirales suplementadas con polibreno se agregó a cada pozo de células 293T-α_vβ₅ o 4T1. Para la obtención de células 293T-α_vβ₅ con ambos shTgfb1, se mezclaron las partículas lentivirales obtenidas de shTgfb1¹ y shTgfb1² y se agregaron al pozo correspondiente. Al día siguiente de la transducción se realizó cambio de medio y dos días después se inició la selección con 0.5 o 5.0 µg/mL de puomicina (Corning) de las células 293T-α_vβ₅ o 4T1, respectivamente. Las células transfectadas o transducidas fueron monitoreadas por microscopía de fluorescencia, tomando pLenti-CMV-GFP-puro como control positivo de transfección o transducción.

2.11 Silenciamiento de *Tgfb1*

Para la validación de los shRNA, los plásmidos con las inserciones de los shRNA fueron transducidos en células 4T1 o 293T- $\alpha_v\beta_5$ y seleccionadas con el antibiótico de selección puromicina. Para el silenciamiento de TGF- β con shRNA, se aislaron exosomas por ultracentrifugación de las células 293T- $\alpha_v\beta_5$, 293T- $\alpha_v\beta_5$ -shGFP, 293T- $\alpha_v\beta_5$ -shTgfb1¹, 293T- $\alpha_v\beta_5$ -shTgfb1² and 293T- $\alpha_v\beta_5$ -shTgfb1^{1&2} y se agregaron a cultivos de células RAW264.7 (3.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), y 8, 12 y 24 h después se recolectaron los lisados celulares.

2.11.1 Extracción de ARN total

Las células RAW 264.7 tratadas con exosomas se centrifugaron y se realizó la extracción de ARN total con el kit de purificación GeneJET RNA (Thermo Fisher Scientific) siguiendo el protocolo para células de mamífero en cultivo. Para la lisis se utilizaron 600 μL de solución de lisis y 360 μL de etanol (95%). La concentración de ARN se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) y el ARN purificado se almacenó a -20°C . La integridad del ARN se confirmó por electroforesis en gel de agarosa nativo al 1% (p/v) con bromuro de etidio, evaluando las bandas de ARN ribosomal de las subunidades 28S (5 kb) y 18S (2 kb) en un fotodocumentador E Gel® Imager (Thermo Fisher Scientific).

2.11.2 PCR cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR)

Para la RT-qPCR, primero se realizó la obtención de los ADN complementarios (ADNc) por transcripción inversa con la retrotranscriptasa SuperScript II (1.25 U/250 ng de ARN total, Thermo Fisher Scientific), un oligonucleótido poly-T anclado (N-V-T₂₀, 25 ng/ μL , T4Oligo) y 250 ng de ARN total para un volumen de reacción de 10 μL . Después de la transcripción inversa (42°C , 75 min), se desnaturalizó la encima (75°C , 15 min) y se agregaron 4 volúmenes de H₂O grado biología molecular. Los ADNc se usaron inmediatamente o se conservaron a -20°C . Para la qPCR, mezclamos 1 μL de solución de ADNc con la mezcla de PCR QuantiTect SYBR Green (Qiagen) y 0.4 μM de cada oligonucleótido iniciador, para obtener un volumen final de 10 μL por reacción. Los ADNc se amplificaron con un termociclador ABI 7500 (Thermo Fisher Scientific). Los niveles de expresión de los ARNm se cuantificaron mediante una curva estándar y se normalizaron con el gen de referencia *RPL32* (en células humanas) o *Rpl32* (en células de ratones). Los oligonucleótidos para cada gen se diseñaron con Primer-BLAST (Ye et al., 2012) y las secuencias se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos para qPCR.

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>Tgfb1</i> (ratón)	ACTGGAGTTGTACGGCAGTG	GGGGCTGATCCCGTTGATT
<i>Pac</i>	ATGACCGAGTACAAGCCAC	ACACCTTGCCGATGTCGAG
<i>Rpl32</i> (ratón)	CAGGGTGCGGAGAAGGTTCAAGGG	CTTAGAGGACACGTTGTGAGCAATC
<i>RPL32</i> (humano)	CAGGGTTCGTAGAAGATTCAAGGG	CTTGGAGGAAACATTGTGAGCGATC

2.12 Estadística

Para el análisis estadístico de los resultados, se utilizó el software GraphPad Prism versión 9.0.1. Se comprobó la normalidad de los datos con la prueba D'Agostino-Pearson y/o Shapiro-Wilk. Los datos que no cumplieron con este criterio de normalidad fueron analizados por la prueba U de Mann-Whitney (2 grupos) o Kruskal-Wallis (>2 grupos). Los datos que si pasaron la prueba de normalidad fueron analizados por la prueba t de Student (2 grupos) o por ANOVA de 1 vía y una prueba de comparaciones múltiples (>2 grupos). Datos con ≥ 2 grupos y 2 variables serán analizados por ANOVA de 2 vías y una prueba de comparaciones múltiples. El nivel de significancia utilizado será de ≤ 0.05 .

Capítulo 3. Resultados

3.1 Selección de una línea celular para obtención de exosomas

Para la obtención de exosomas, buscamos una línea celular que (1) produjera exosomas, (2) que fuera fácilmente modificada por transfección o transducción, (3) que fueran células no cancerosas o cancerosas con baja tasa de metástasis para evitar el riesgo de promover el NPM y (4) que expresen o puedan expresar la integrina $\alpha_v\beta_5$ para favorecer la acumulación en el hígado. Para esto, se analizaron las células 293T, B16-F1 y MC-3T3-E1

3.1.1 Aislamiento de exosomas derivados de células 293T y B16-F1

Las líneas celulares cancerosas metastásicas producen más proteína exosomal que las no metastásicas o no cancerosas (Peinado et al., 2012). Por esto, decidimos comparar la producción de exosomas entre dos líneas celulares: una no cancerosa, 293T, y una cancerosa, pero con baja tasa de metástasis, B16-F1 (Peinado et al., 2012). Utilizamos la ultracentrifugación para aislar exosomas del medio condicionado de células 293T y B16-F1, y las vesículas obtenidas se caracterizaron por dispersión de luz dinámica (DLS). Además, se analizaron los lisados proteicos por western blot para demostrar la presencia de la tetraspanina CD81, un marcador de exosomas (Théry et al., 2018).

Los exosomas derivados de las células 293T presentaron un rango de diámetro hidrodinámico de 58.7 a 220.0 nm, con un promedio de 111.2 ± 44.0 nm (Figura 15A), y se confirmó la presencia de CD81 en los lisados de exosomas (Figura 15B). Por otro lado, los exosomas derivados de las células B16-F1 tuvieron un diámetro en un rango de 50.7 a 190.1 nm, con un promedio de 89.2 ± 35.9 nm (Figura 16A), y también se corroboró la presencia del marcador de exosomas CD81 por western blot (Figura 16B). Considerando el diámetro y la presencia del marcador de exosomas CD81, estos resultados confirman que las vesículas obtenidas de las células 293T y B16-F1 son exosomas (Théry et al., 2018).

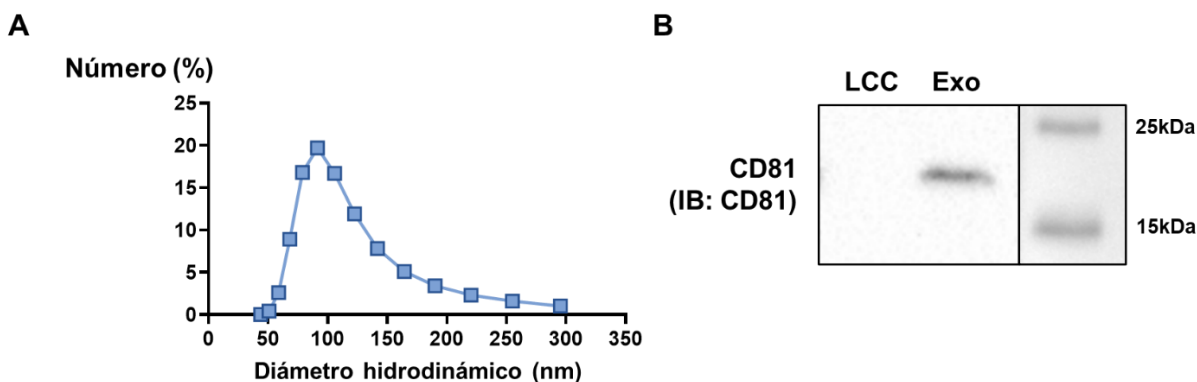


Figura 15. Caracterización de exosomas derivados de células 293T. A) Gráfica del diámetro hidrodinámico por DLS de exosomas derivados de células 293T. B) Western blot del marcador de exosomas CD81 en lisados de células completas (LCC) y en exosomas (Exo) derivados de células 293T.

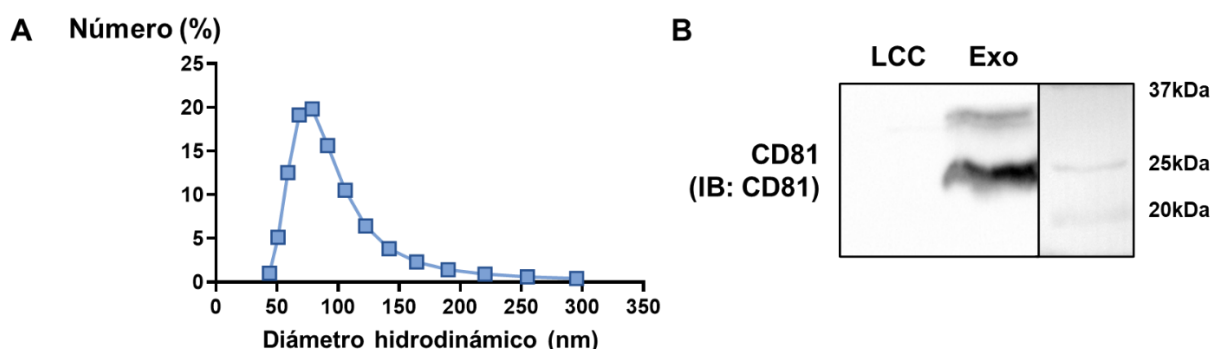


Figura 16. Caracterización de exosomas derivados de células B16-F1. A) Gráfica del diámetro hidrodinámico por DLS de exosomas derivados de células B16-F1. B) Western blot del marcador de exosomas CD81 en lisados de células completas (LCC) y en exosomas (Exo) derivados de células B16-F1.

3.1.2 Modificación de células 293T y B16-F1 con el plásmido pLenti-GFP

Además de producir exosomas, la línea celular debe ser modificable por transfección para sobreexpresar la integrina $\alpha_v\beta_5$. Para evaluar esto, primero transfectamos cada línea celular con un plásmido fluorescente y analizamos la eficiencia de transfección y analizamos mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo.

Transfectamos células 293T y B16-F1 con plásmido pLenti-GFP-higo utilizando dos métodos químicos, uno a base de fosfato de calcio o $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y otro basado en la formación de polímeros catiónicos por el reactivo Sinofection. La microscopía de fluorescencia mostró que las células 293T expresaron la GFP con ambos métodos de transfección (Figura 17A).

La citometría de flujo reveló que el 60% de las células 293T eran GFP⁺ por el método de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, y el 54% con Sinofection, lo que indica las eficiencias de transfección respectivas (Figura 17B). Por otro lado, la mayoría de las células B16-F1 murieron siguiendo la transfección por el método de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Figura 18A). El análisis por citometría de flujo demostró la ausencia de células B16-F1-GFP⁺ posterior a la transfección por el método de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, mientras que con Sinofection, solamente 14% de células B16-F1 fueron GFP⁺ (Figura 18B).

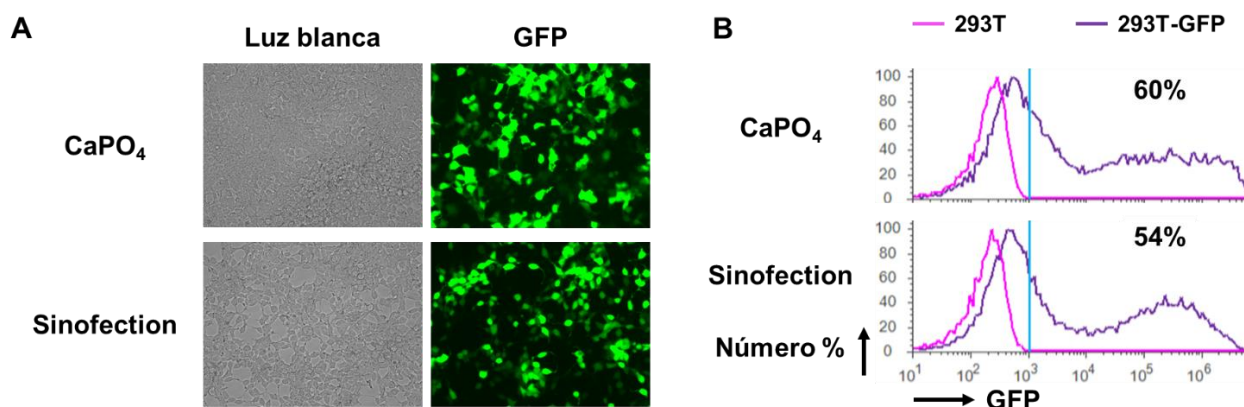


Figura 17. Transfección de células 293T con pLenti-GFP-hgro. A) Imágenes de fluorescencia de células 293T transfectadas por el método de fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) y con Sinofection. B) Histogramas de citometría de flujo del porcentaje de células 293T-GFP⁺ transfectadas por el método de fosfato de calcio y con Sinofection.

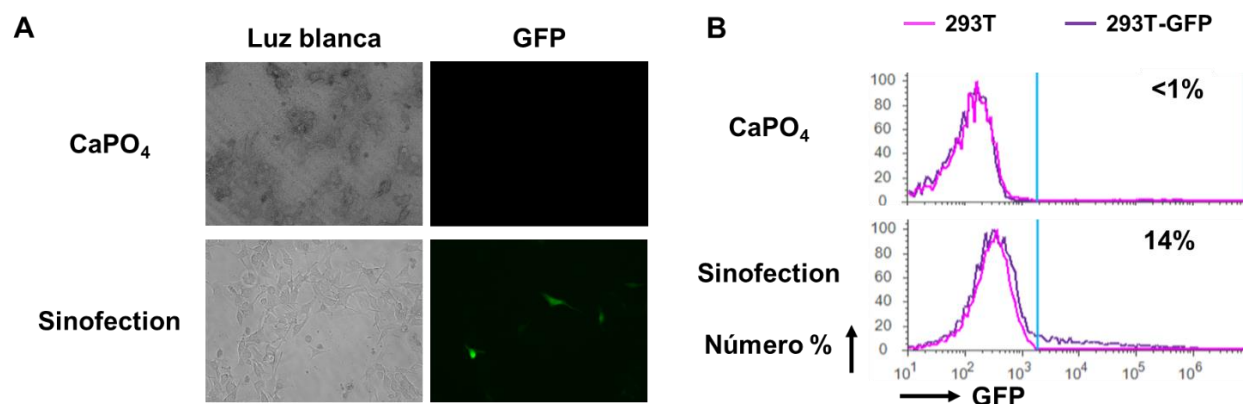


Figura 18. Transfección de células B16-F1 con pLenti-GFP-hgro. A) Imágenes de fluorescencia de células B16-F1 transfectadas por el método de fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) y con Sinofection. B) Histogramas de citometría de flujo del porcentaje de células B16-F1-GFP⁺ transfectadas por el método de fosfato de calcio y con Sinofection.

También evaluamos las células MC-3T3E1 debido a su baja tasa de proliferación y su fuerte adherencia, lo que permitiría recolectar vesículas de la misma placa en múltiples ocasiones sin que las células se desprendieran fácilmente. Sin embargo, a pesar de múltiples intentos, no logramos obtener vesículas ni transfectar eficientemente estas células (datos no mostrados). Considerando estos resultados y la

necesidad de una línea celular más adecuada para la producción de vesículas, se optó por modificar las células 293T con la integrina para continuar con el estudio.

3.2 Modificación de las células 293T con los plásmidos pCMV3-ITGAV-HA y pLenti-ITGB5-T7

3.2.1 Obtención de células 293T- $\alpha_v\beta_5$ ⁺ por co-transfección de los plásmidos pCMV3-ITGAV-HA y pLenti-ITGB5-T7

Una vez seleccionada la línea celular 293T, procedimos a la sobreexpresión de la integrina $\alpha_v\beta_5$. Para esto, realizamos una co-transfección con los plásmidos pCMV3-ITGAV-HA y pLenti-ITGB5-T7, que codifican para las subunidades α_v y β_5 , respectivamente. Evaluamos dos condiciones: utilizar 250 ng de cada plásmido, sumando 500 ng en total, o 500 ng de cada plásmido, sumando 1,000 ng.

Transfectamos células 293T con ambos plásmidos, y también con cada plásmido por separado como control. Para establecer la expresión basal de cada subunidad y el dímero, utilizamos las células 293T parentales sin transfección. Después de la transfección, separamos 250,000 células para el análisis por citometría de flujo, y el resto se mantuvo en selección con higromicina. Observamos una mayor cantidad de células positivas a la integrina $\alpha_v\beta_5$ (29.7%) al usar 500 ng de cada plásmido, en comparación con 250 ng de cada plásmido (24.6%) (Figura 19A, arriba).

Después de un mes de selección con higromicina, volvimos a analizar por citometría de flujo. Se formaron dos poblaciones bien definidas que sobrevivieron al antibiótico, por lo que definimos dos grupos: una población con baja sobreexpresión (lo) y una población con alta sobreexpresión (hi). Para las células transfectadas con 250 ng de cada plásmido, la población de células positivas (hi) aumentó a 47.74%, mientras que las células transfectadas con 500 ng de cada plásmido aumentó a 37.2% (Figura 19A, abajo).

Al analizar la intensidad de fluorescencia de estas poblaciones celulares, observamos un aumento significativo en la expresión de la integrina $\alpha_v\beta_5$ en ambas líneas celulares comparado con las células parentales. Las células 293T- $\alpha_v\beta_5$ (250 ng) sobreexpresaron la integrina 4 veces, mientras que las células 293T- $\alpha_v\beta_5$ (500 ng) 4.6 veces (Figura 19B). Por este motivo, decidimos continuar trabajando con las células 293T- $\alpha_v\beta_5$ transfectadas con 500 ng de cada plásmido.

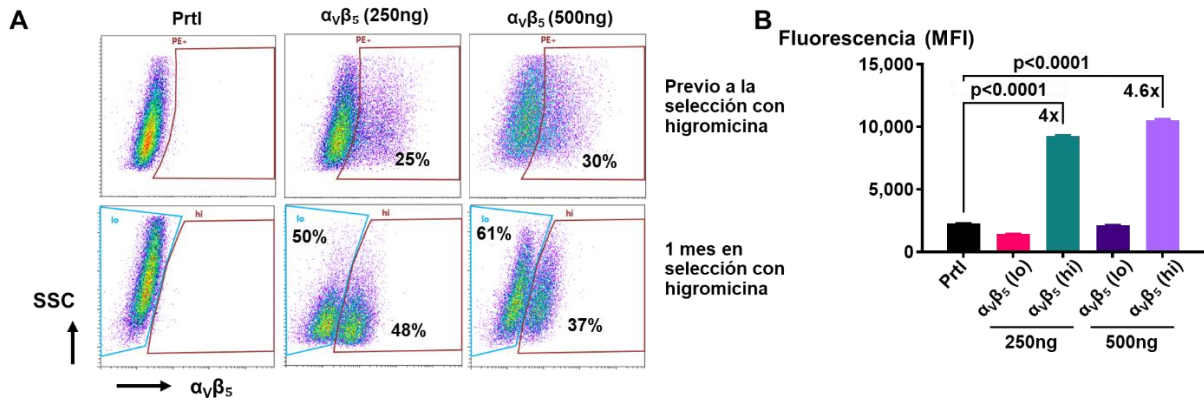


Figura 19. Selección de células $\alpha_v\beta_5^+$ con antibiótico. A) Gráfica de densidad de células 293T parentales (prtI), 293T- $\alpha_v\beta_5$ transfectadas con 250 ng de cada plásmido ($\alpha_v\beta_5$ 250 ng) y 293T- $\alpha_v\beta_5$ transfectadas con 500 ng de cada plásmido ($\alpha_v\beta_5$ 500 ng) antes y después de la selección con higromicina (100 μ g/mL). B) Media ($\pm$ error estándar) de intensidad de fluorescencia (MFI) de las células $\alpha_v\beta_5^+$. ANOVA de una vía, prueba post hoc Bonferroni.

Para mantener solo las células con sobreexpresión, utilizamos la separación celular para seleccionar la población de células $\alpha_v\beta_5^+$ de las células 293T- $\alpha_v\beta_5$ (500 ng). Pasamos 4 millones de células 293T- $\alpha_v\beta_5$ (500 ng) y obtuvimos tres poblaciones diferentes. Una vez cultivadas y expandidas, se analizó la expresión de $\alpha_v\beta_5$ por citometría de flujo al alcanzar confluencia en un pozo de 4 cm². En la población 1A, solo el 8% de las células mantuvieron la sobreexpresión, mientras que en las poblaciones 2A y 2B, el 60% y el 80% de las células, respectivamente, mantuvieron la sobreexpresión (Figura 20A), manteniéndose una población policlonal en las tres poblaciones celulares. También se observó un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia comparado con las células parentales (Figura 20B).

Debido al bajo porcentaje de células $\alpha_v\beta_5^+$ y la naturaleza policlonal de la población celular, utilizamos la dilución límite como otra forma de selección. Diluimos las células 293T- $\alpha_v\beta_5$ (500 ng) hasta obtener una célula por pozo de 0.32 cm², las expandimos y analizamos la expresión de $\alpha_v\beta_5$ por citometría de flujo al alcanzar confluencia en un pozo de 4 cm². Obtuvimos dos clones en las que más del 70% de las células sobreexpresaban la integrina donde ambas mostraban una sola población celular (Figura 21A), representando un incremento significativo comparado con el pool de células 293T- $\alpha_v\beta_5$ (500 ng) (Figura 21B).

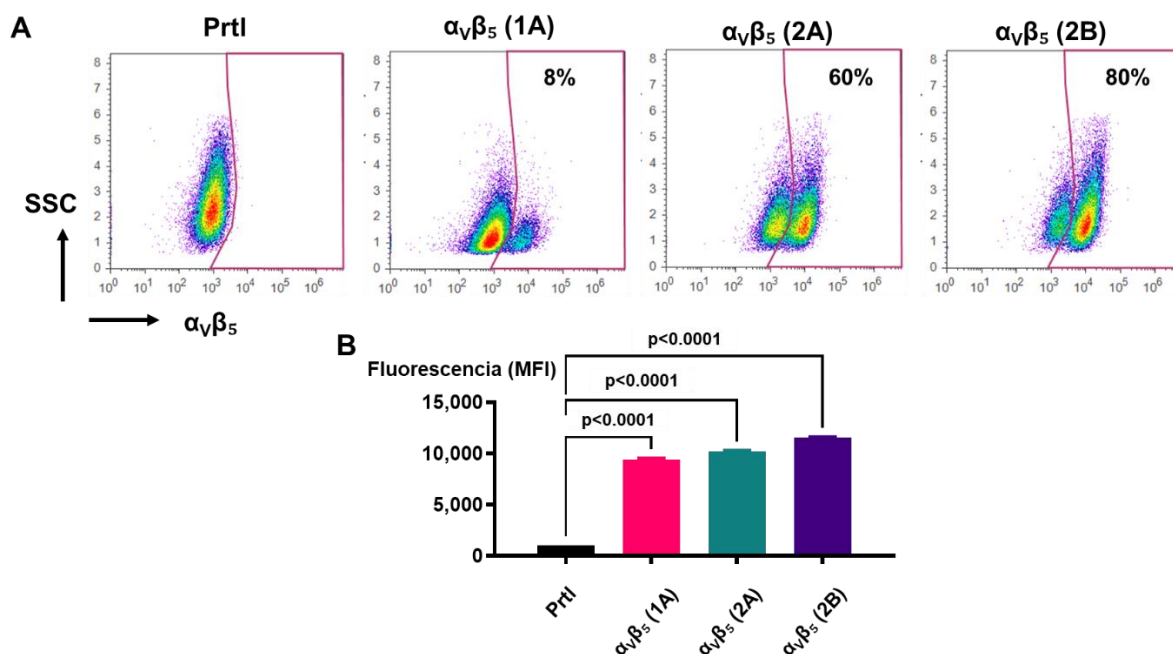


Figura 20. Separación celular de células 293T- $\alpha_v\beta_5$ (500 ng). A) Gráficas de densidad de células 293T parentales (Prtl), 293T- $\alpha_v\beta_5$ clona 1A, 2A y 2B. B) Media ($\pm$ error estándar) de fluorescencia de las células $\alpha_v\beta_5^+$. ANOVA de una vía, prueba post hoc Tukey.

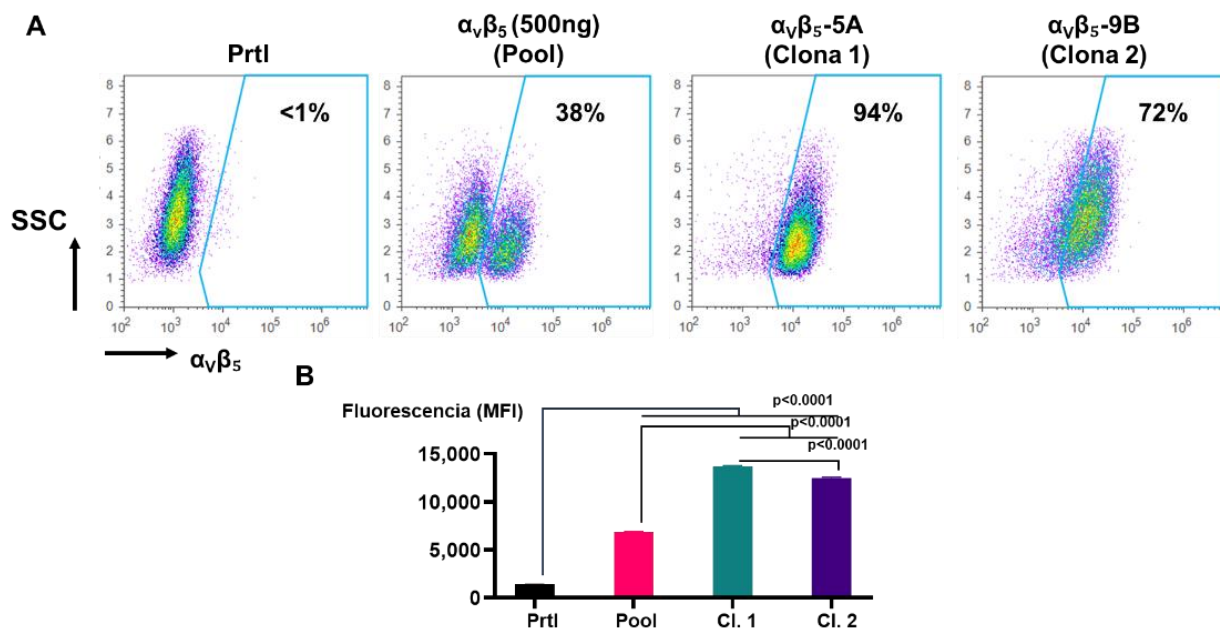


Figura 21. Selección clonal de células 293T- $\alpha_v\beta_5$ (500 ng). A) Gráficas de densidad de células 293T parentales (Prtl), $\alpha_v\beta_5$ (500 ng) (Pool), 293T- $\alpha_v\beta_5$ clona 5A (clona 1) y 9B (clona 2). B) Intensidad de fluorescencia de las células $\alpha_v\beta_5^+$. ANOVA de una vía, prueba post hoc Dunnet.

Para seleccionar entre la clona 2B obtenida por separación de células y la clona 9B obtenida por dilución límite, en un mismo experimento evaluamos la expresión de la integrina por citometría de flujo.

Observamos que en la clona 2B solo el 45% de las células tenían la sobreexpresión, mientras que en la clona 9B el 90% de las células mantenían la sobreexpresión (Figura 22A), teniendo ambas clonas una diferencia significativa en la expresión de $\alpha_V\beta_5$ comparada con las células parentales (Figura 22B). Sin embargo, la clona 9B mantuvo una población monoclonal, comparado con las células 2B (Figura 22A). Por esto, decidimos continuar trabajando con la clona 9B, referida como clona 2 o $\alpha_V\beta_5^+$.

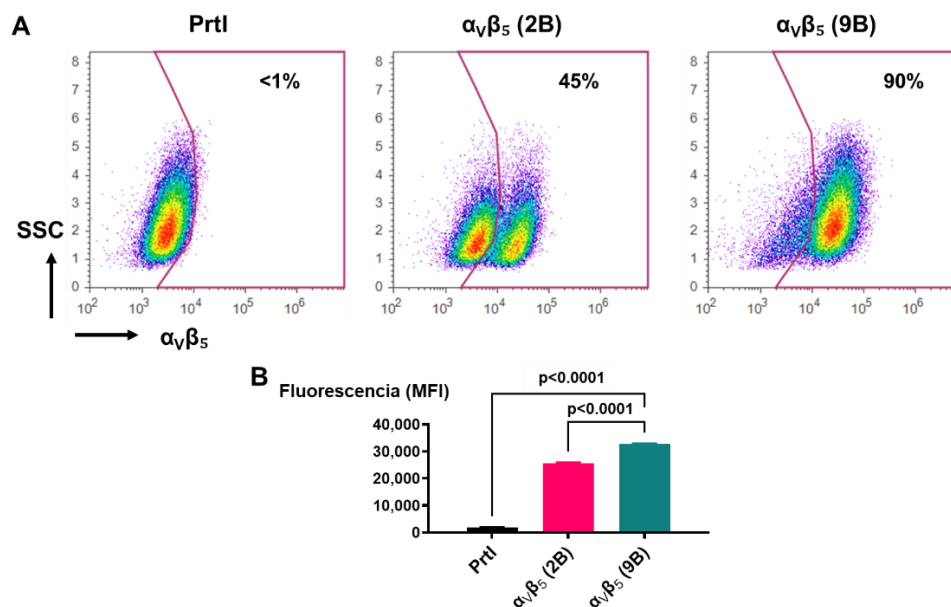


Figura 22. Comparación de la expresión de $\alpha_V\beta_5$ en clona 2B y 9B. A) Gráficas de densidad de células 293T parentales (prtI), 293T- $\alpha_V\beta_5$ clona 2B y 9B. B) Media ($\pm$ error estándar) de fluorescencia de las células $\alpha_V\beta_5^+$. ANOVA de una vía, prueba post hoc Tukey.

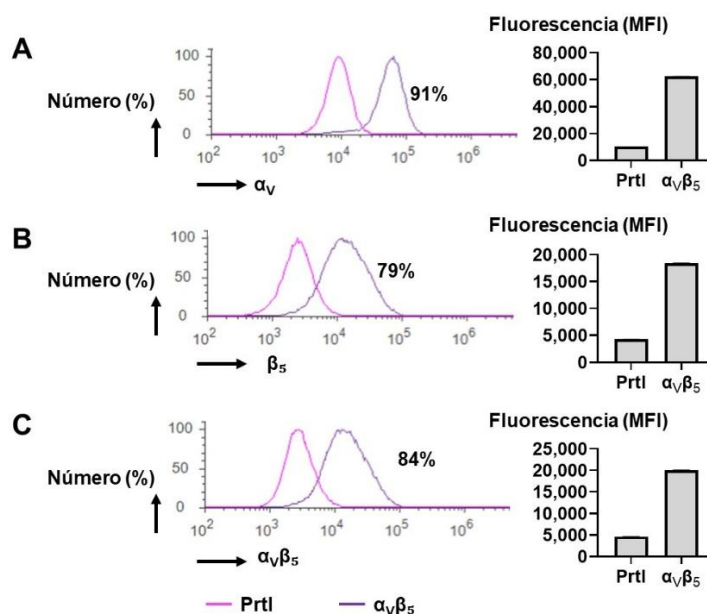


Figura 23. Expresión de α_V , β_5 y $\alpha_V\beta_5$ en células $\alpha_V\beta_5^+$. Histograma y gráfica de fluorescencia de la expresión de la integrina A) α_V , B) β_5 y C) $\alpha_V\beta_5$.

Además, evaluamos la expresión de cada subunidad y el dímero de la integrina en la clona 9B, confirmando que en todos los casos se hay sobreexpresión de las integrinas (Figura 23). Para corroborar que en los lisados de las células se detectan las integrinas que cuentan con las etiquetas, analizamos la expresión de cada subunidad en los lisados de células 293T, $\alpha_v\beta_5$ (500 ng, Pool) y de ambas clonas (Figura 24). Detectamos expresión exógena de ambas subunidades en las células 293T- $\alpha_v\beta_5$ (Pool) antes de la selección y las clonas $\alpha_v\beta_5^+$ 1 y 2. Con estos resultados, confirmamos que la clona 2 (9B) mantiene la sobreexpresión.

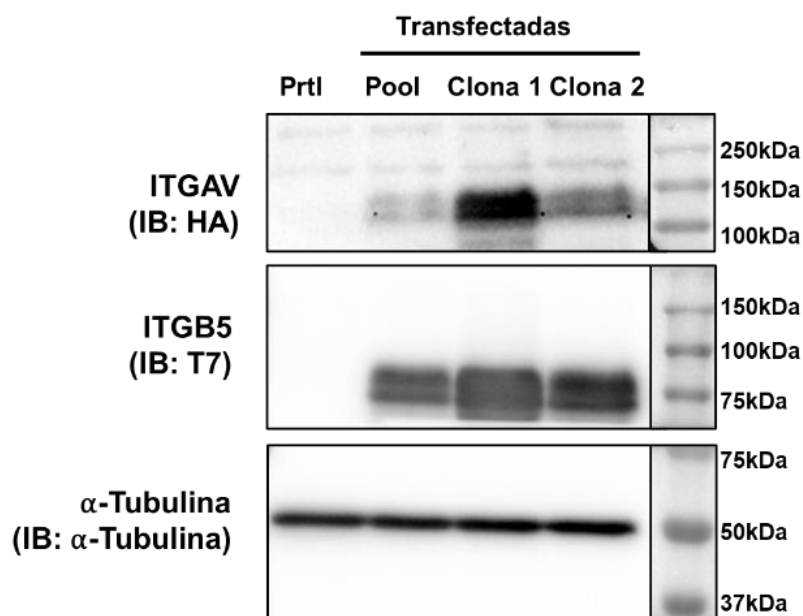


Figura 24. Expresión exógena de las subunidades de la integrina. Análisis de western blot de la expresión exógena de la subunidad ITGAV-HA e ITGB5-T7 en células 293T sin transfección (prtl: parentales), después de transfección y selección con antibiótico (Pool: $\alpha_v\beta_5$ (500 ng)) o selección clonal por dilución límite (Clona 1 (5A) y Clona 2 (9B)). α -Tubulina fue utilizada como control de carga.

3.3 Obtención de exosomas derivados de células 293T- $\alpha_v\beta_5^+$

3.3.1 Caracterización de exosomas

Una vez obtenidas las células con sobreexpresión de la integrina $\alpha_v\beta_5$, procedimos al aislamiento de exosomas de esta nueva línea celular. Los exosomas fueron aislados mediante ultracentrifugación a partir del medio de cultivos de células 293T y 293T- $\alpha_v\beta_5$ incubadas durante 48 h con medio condicionado.

Determinamos el diámetro hidrodinámico mediante análisis de DLS. Los exosomas derivados de células 293T presentaron un rango de diámetro hidrodinámico de 58.8 a 190.1 nm, con un promedio de 110.2 ± 38.1 nm (Figura 25A). Por otro lado, los exosomas derivados de las células 293T- $\alpha_v\beta_5$ tuvieron un rango de diámetro hidrodinámico de 43.3 a 141.8 nm, con un promedio de $78.5 \text{ nm} \pm 22.7$ nm (Figura 25B).

Además, analizamos la presencia de la integrina en las muestras de exosomas. Confirmamos la expresión de la subunidad ITGB5-T7 en los exosomas derivados de células 293T- $\alpha_v\beta_5$, indicando que estos exosomas están cargados con la integrina exógena (Figura 26).

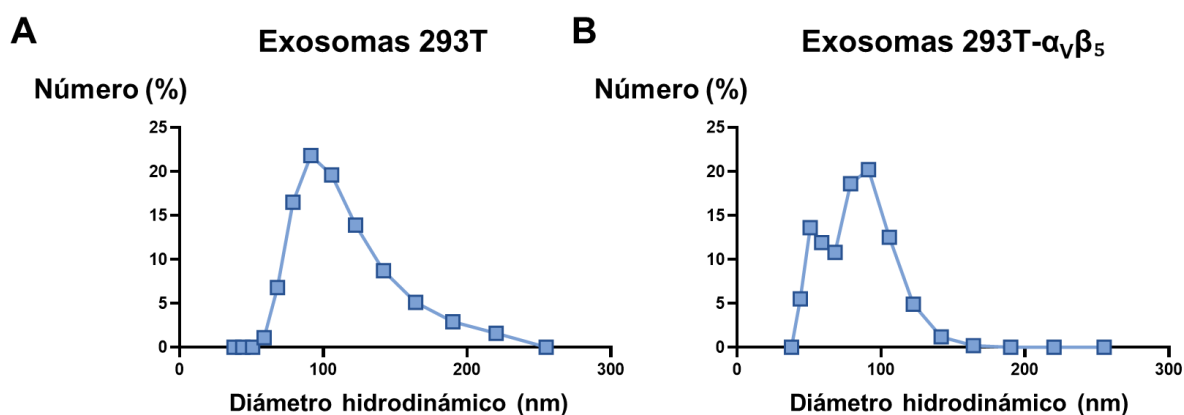


Figura 25. Diámetro hidrodinámico de exosomas. Gráficas de la distribución del diámetro hidrodinámico de exosomas derivados de células (A) 293T y (B) 293T- $\alpha_v\beta_5$ por DLS.

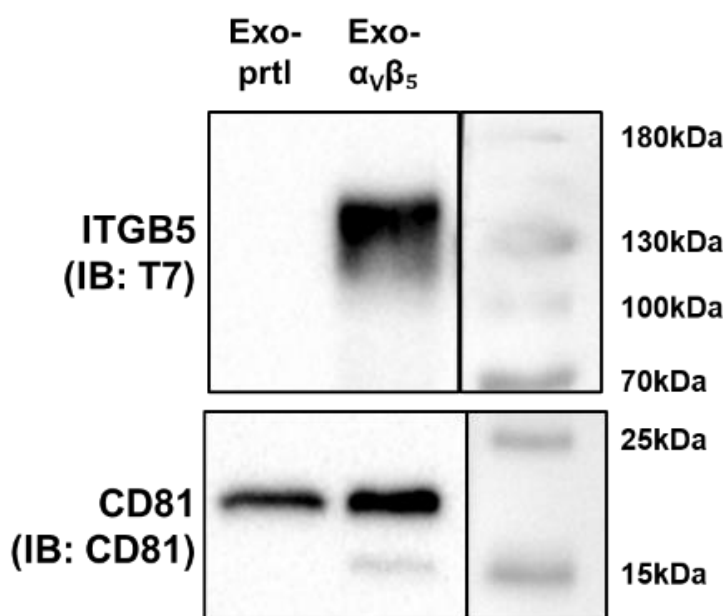


Figura 26. Expresión proteica en lisados de exosomas. Análisis de western blot de los niveles de proteína exógena de la subunidad ITGB5-T7 en exosomas derivados de células 293T parentales (Exo-prtl) y células 293T- $\alpha_v\beta_5$ (Exo- $\alpha_v\beta_5$). CD81 fue utilizado como control de carga.

3.3.2 Internalización de exosomas

Para confirmar la funcionalidad de los exosomas, procedimos a evaluar su internalización en células blanco. Para esto, teñimos los exosomas con el fluoróforo SP-DiIC₁₈ y evaluamos la internalización en células RAW 264.7 mediante la transferencia de fluorescencia a las células. Primero, determinamos la concentración óptima de SP-DiIC₁₈ para teñir los exosomas sin comprometer la integridad de sus membranas, usando concentraciones crecientes de 0.125 a 1 μ M, según las recomendaciones del proveedor. Los exosomas se teñieron después de la primera ultracentrifugación y se eliminó el exceso de fluoróforo en una segunda ultracentrifugación. Cuantificamos la cantidad de proteína total y agregamos 1.0 o 1.5 μ g de proteína de exosomas en células RAW 264.7 en pozos de 0.32 cm². Al día siguiente, las células fueron desprendidas y analizadas por citometría de flujo (Figura 27).

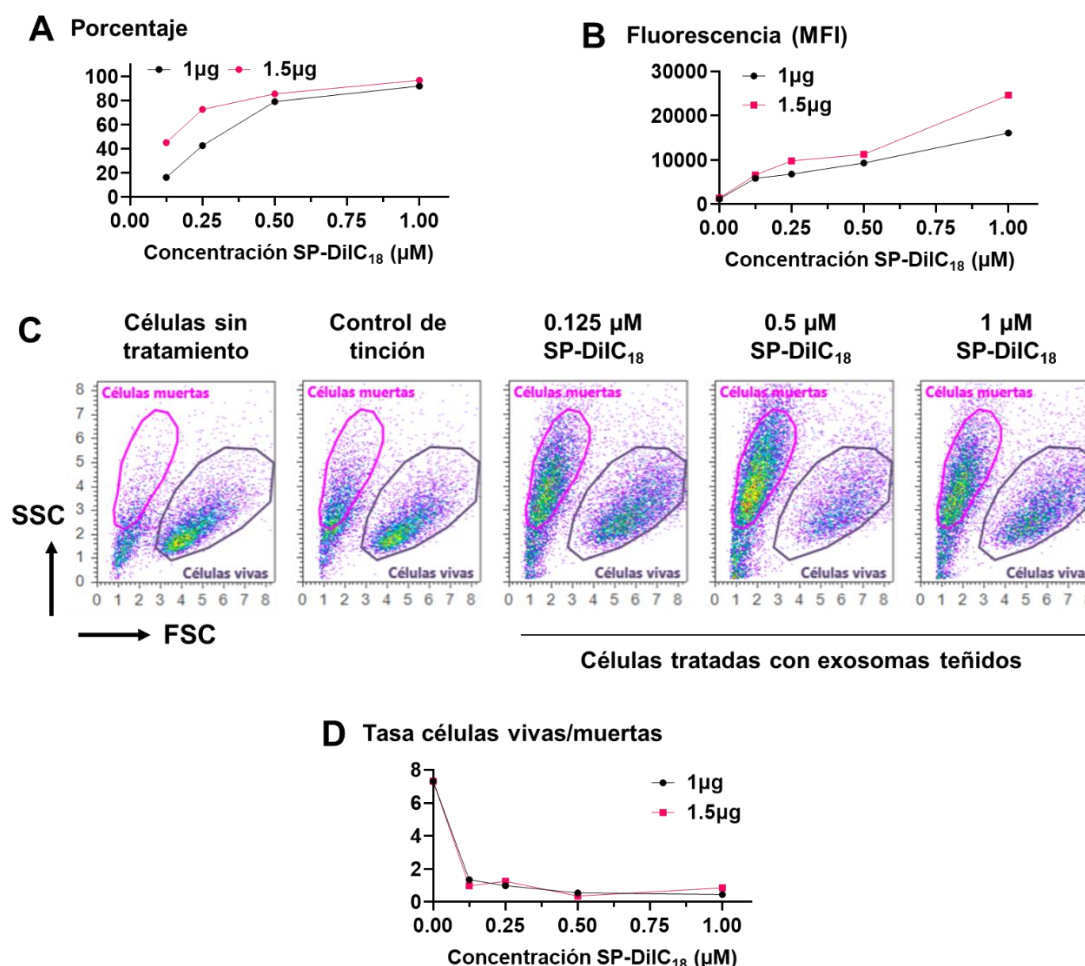


Figura 27. Efecto de la tinción con SP-DiIC₁₈ en la internalización de exosomas en células RAW 264.7. Células RAW 264.7 se trataron con 1.0 o 1.5 μ g/cm² exosomas derivados de células 293T teñidos con 0.125-1 μ M de SP-DiIC₁₈, por 24 h y se analizaron por citometría de flujo. A) Porcentaje de células positivas. B) Intensidad de fluorescencia. Se representa el promedio $\pm$ error estándar. C) Gráficas de densidad representativas de las poblaciones de células vivas y muertas. D) Tasa de células vivas y muertas que internalizaron exosomas.

El porcentaje de células que internalizaron exosomas teñidos con 0.125 μM de SP-DiIC₁₈ incrementó a 20 y 40% con 1.0 y 1.5 μg de exosomas, respectivamente, alcanzando el 100% al ser teñidos con 1 μM de SP-DiIC₁₈ (Figura 27A). La intensidad de fluorescencia de las células que internalizaron exosomas, aumentaba con la concentración de SP-DiIC₁₈ y la cantidad de exosomas agregados (Figura 27B).

Se observó que la población de células vivas disminuía, mientras que la de células muertas y desechos celulares aumentaba conforme se incrementaba la concentración de SP-DiIC₁₈ (Figura 27C). Por esto, para elegir la concentración de fluoróforo con el menor impacto negativo en las células RAW 264.7, analizamos la tasa de células vivas/muertas tras la incubación con exosomas teñidos con SP-DiIC₁₈. La tasa de células vivas/muertas se calculó dividiendo la cantidad de células vivas entre la de células muertas, considerando que un valor cercano a uno indica una proporción similar de ambas. A concentraciones superiores a 0.5 μM de SP-DiIC₁₈, la tasa de células vivas y muertas era cercana a cero, indicando que estas concentraciones posiblemente pueden afectar la integridad de las membranas de células y exosomas (Figura 27C). Por esta razón, se utilizó una concentración de 0.25 μM de SP-DiIC₁₈ para teñir los exosomas utilizados en los ensayos de internalización.

A continuación, definimos la cantidad de exosomas a utilizar en los ensayos de internalización y organotropismo. Teñimos exosomas con 0.25 μM de SP-DiIC₁₈ y eliminamos el exceso de fluoróforo libre. Cuantificamos la proteína total y agregamos 1.5-6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de proteína de exosomas derivados de células 293T (Exp-prtl) o células 293T- $\alpha_v\beta_5$ (Exo- $\alpha_v\beta_5$) en células RAW 264.7.

Al día siguiente, por microscopía de fluorescencia observamos que a mayores concentraciones de exosomas, la señal fluorescente dentro de las células aumentaba, lo que sugiere una mayor captación de estas vesículas (Figura 28). Además, las células fueron desprendidas y analizadas por citometría de flujo. Observamos que a medida que aumentaba la cantidad de exosomas, también aumentaba el porcentaje (Figura 29A) y la intensidad media de fluorescencia (Figura 29B) de células que internalizaron exosomas. Además, observamos una mayor internalización de exosomas $\alpha_v\beta_5^+$ comparados con los exo-prtl (Figura 29). Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo y microscopía indican una relación directa entre la cantidad de exosomas añadidos y su internalización celular.

Con base en estos resultados, seleccionamos un rango de concentración óptimo de 4.5-6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de exosomas para los experimentos posteriores de internalización, asegurando así una captación eficiente sin alcanzar niveles que pudieran inducir efectos citotóxicos o de saturación en las células analizadas.

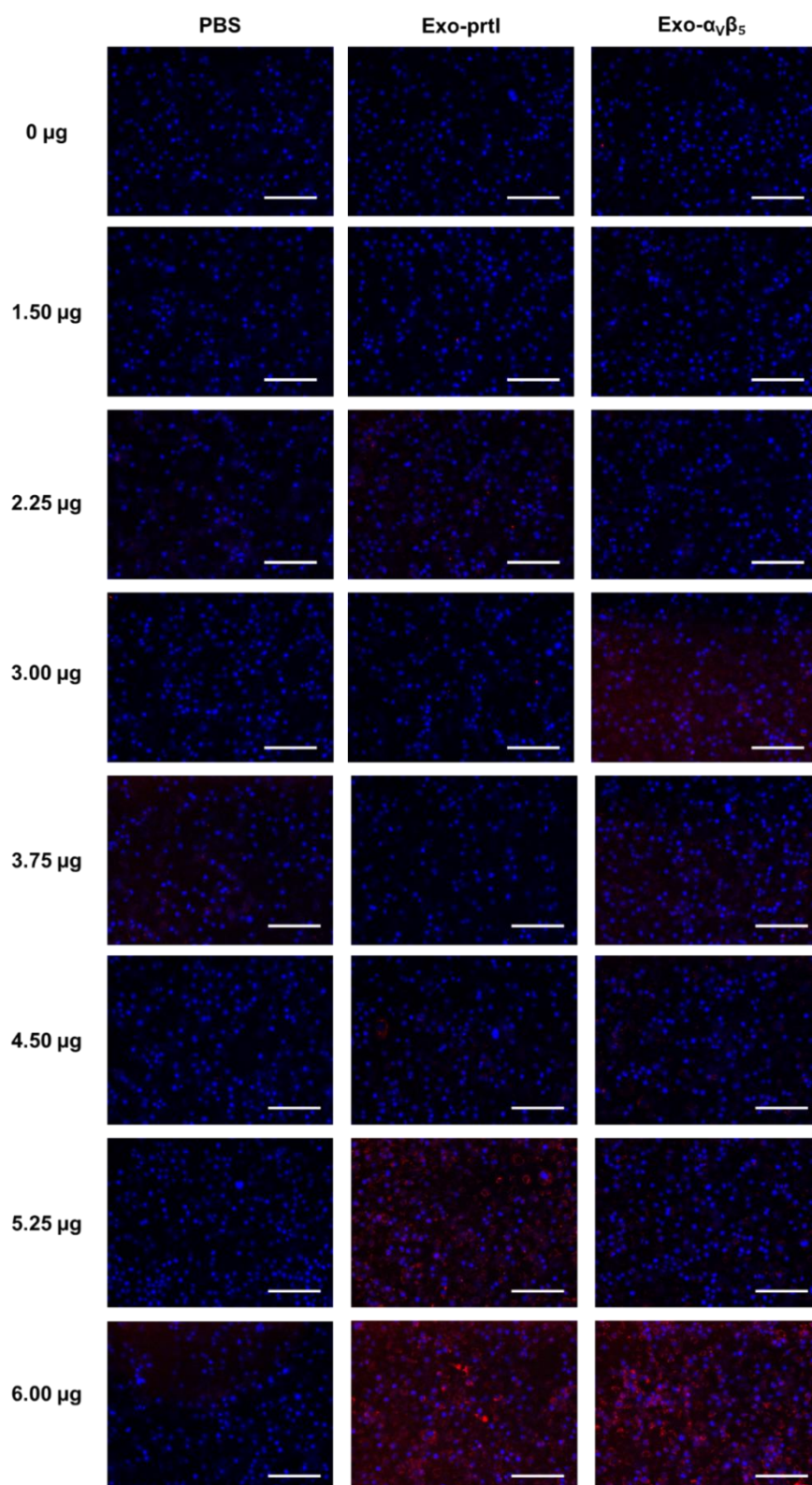


Figura 28. Internalización de diferentes cantidades de exosomas en células RAW 264.7. Micrografías de fluorescencia de células RAW 267.7 cultivadas en ausencia o presencia de 1.5 a 6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de exosomas derivados de células 293T (Exo-prtl), 293T- $\alpha_v\beta_5$ (Exo- $\alpha_v\beta_5$) o su equivalente en volumen de PBS. Azul: DAPI, Rojo: SP-DilC₁₈. Barra de escala: 100 μm .

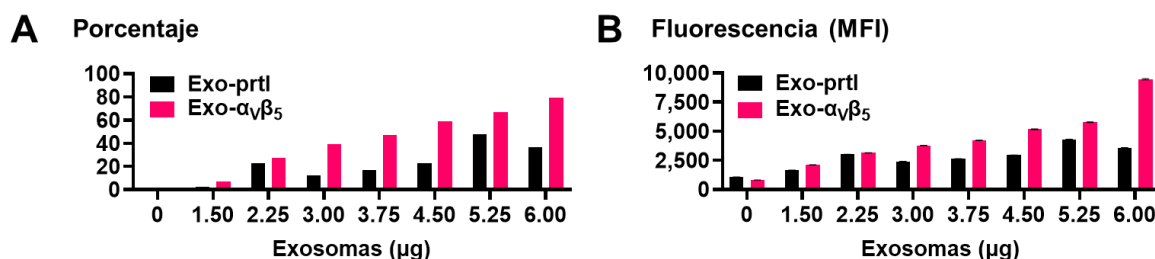


Figura 29. Internalización de diferentes cantidades de exosomas en células RAW 264.7. Células RAW 264.7 se trataron con 1.5-6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ exosomas derivados de células 293T (Exo-prtl) o 293T- $\alpha\text{v}\beta_5$ (Exo- $\alpha\text{v}\beta_5$) teñidos con 0.25 μM de SP-DiIC₁₈ por 24 h y se analizaron por citometría de flujo. A) Porcentaje de células positivas. B) Intensidad de fluorescencia. Las barras indican la media $\pm$ error estándar.

Habiendo confirmado que las células RAW 264.7 son capaces de internalizar exosomas derivados de células 293T y 293T- $\alpha\text{v}\beta_5$, procedimos a evaluar si esta capacidad de internalización también se extiende a otras líneas celulares y si tanto los exosomas como los ectosomas pueden ser captados de manera diferencial. De esta manera, podríamos lograr más acumulación de vesículas en el hígado. Para esto, comparando la internalización de ectosomas y exosomas derivados de células 293T (exo-prtl) y 293T- $\alpha\text{v}\beta_5$ (exo- $\alpha\text{v}\beta_5$) en células RAW 264.7, HepG2, 293T y 4T1. A cada línea celular se le agregaron 7.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de proteína de ectosomas y exosomas teñidos con SP-DiIC₁₈. Al día siguiente se realizó la contratinción con DAPI y se observaron las células al microscopio de fluorescencia 24 horas después.

Para el ensayo de internalización de ectosomas, observamos fluorescencia del SP-DiIC₁₈ en todas las líneas celulares (Figura 30). Las células RAW 264.7 mostraron la mayor señal, seguidas de las células 293T, HepG2 y 4T1, sin diferencia entre ectosomas derivados de células 293T (Ecto-prtl) y 293T- $\alpha\text{v}\beta_5$ (Ecto- $\alpha\text{v}\beta_5$). Por otro lado, la internalización de exosomas varió entre línea celulares, con mayor internalización en células RAW 264.7 (Figura 31). En el resto de las líneas celulares, la señal del fluoróforo fue escasa o nula. Los exosomas $\alpha\text{v}\beta_5^+$ fueron internalizados predominantemente por las células RAW 264.7, sugiriendo una afinidad por células tipo macrófagos. Decidimos continuar utilizando las células RAW 264.7 para ensayos de internalización.

Seguido de esto, se caracterizó la presencia de la integrina en las vesículas para promover su acumulación en el hígado. A partir de lisados proteicos de exosomas, evaluamos la presencia de ITGB5-T7 en exosomas y ectosomas derivados de células 293T y 293T- $\alpha\text{v}\beta_5$. Observamos que los exosomas derivados de las células 293T- $\alpha\text{v}\beta_5$ contienen una mayor cantidad de la ITGB5-T7 en comparación con los ectosomas (Figura 32A). De los dos tipos de vesículas, solo los exosomas derivados de ambas líneas celulares presentaron el marcador de exosomas, la tetraspanina CD81 (Figura 32A). Una vez confirmado que ambas vesículas tienen

la integrina $\alpha_v\beta_5$, procedimos a analizar su internalización por células RAW 264.7. Para esto, agregamos 3.0 o 7.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de ectosomas o exosomas derivados de células 293T (Exo-prtl) y células 293T- $\alpha_v\beta_5$ (Exo- $\alpha_v\beta_5$) en cultivos de células RAW 264.7. Al día siguiente recuperamos los lisados de las células tratadas con vesículas y buscamos la expresión de la ITGB5-T7, observándola solamente en las células tratadas con 7.5 μg los exosomas $\alpha_v\beta_5$ (Figura 32B). Con estos resultados, confirmamos que los exosomas derivados de células 293T- $\alpha_v\beta_5$ tienen la integrina y la transfieren a las células blanco.

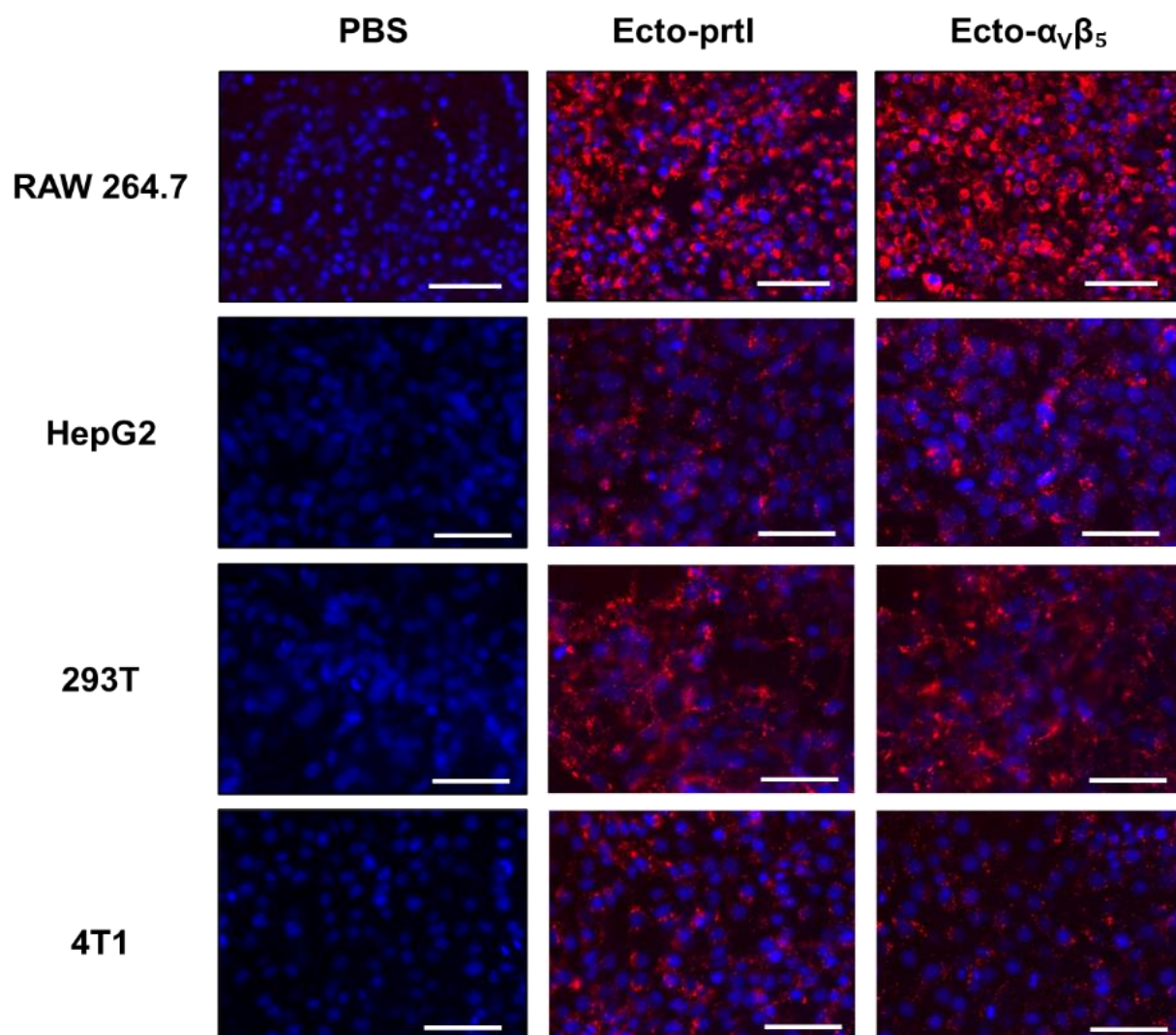


Figura 30. Internalización de ectosomas. Micrografías de fluorescencia de células RAW 267.7, HepG2, 293T y 4T1 cultivadas en ausencia o presencia de 7.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de ectosomas derivados de células 293T (Exo-prtl), 293T- $\alpha_v\beta_5$ (Exo- $\alpha_v\beta_5$) o su equivalente en volumen de PBS. Azul: DAPI, Rojo: SP-DilC₁₈. Barra de escala: 50 μm .

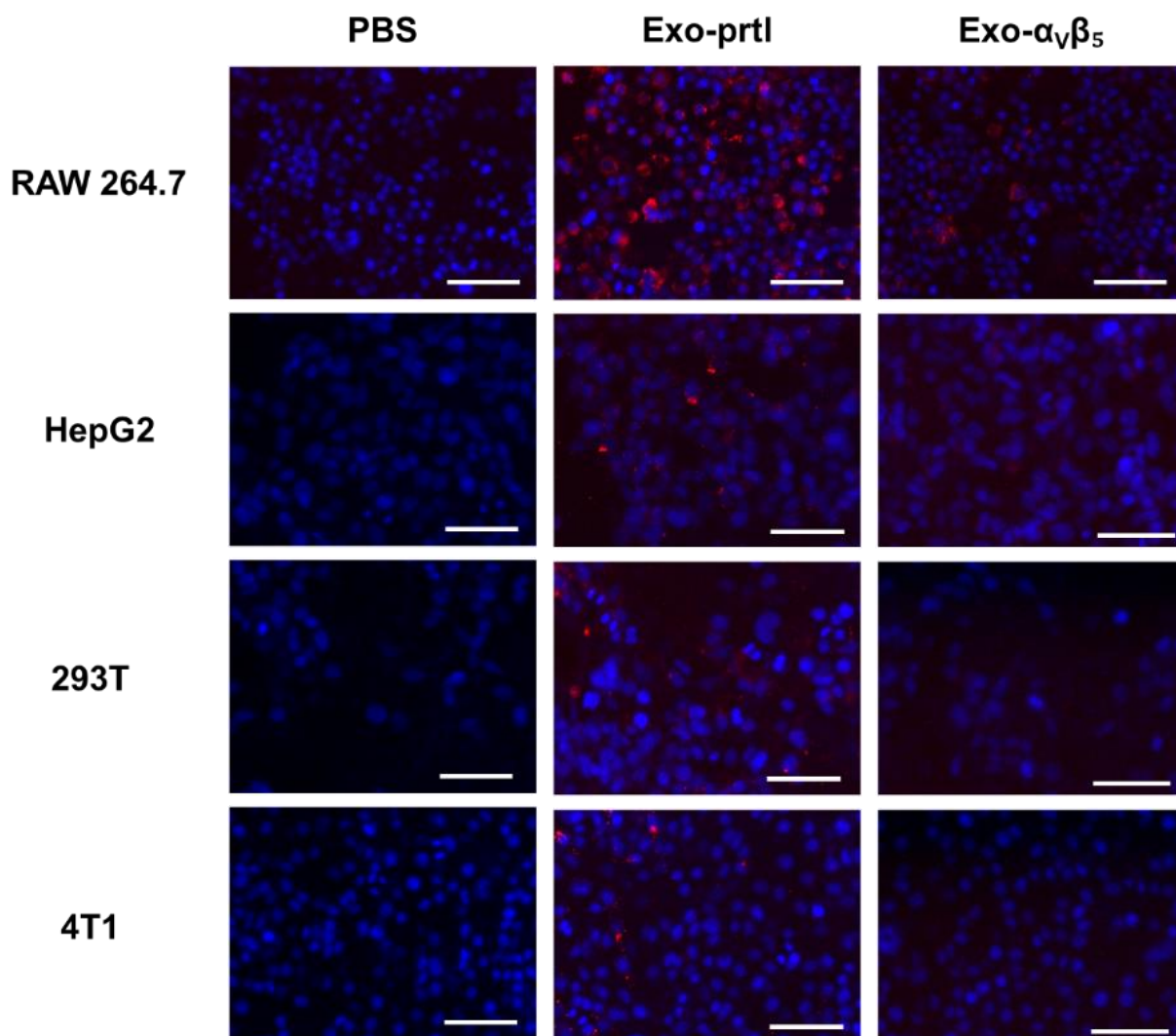


Figura 31. Internalización de exosomas. Micrografías de fluorescencia de células RAW 267.7, HepG2, 293T y 4T1 cultivadas en ausencia o presencia de 7.5 μg de exosomas derivados de células 293T (Exo-prtl), 293T- $\alpha_v\beta_5$ (Exo- $\alpha_v\beta_5$) o su equivalente en volumen de PBS. Azul: DAPI, Rojo: SP-DilC18. Barra de escala: 50 μm .

Repetimos el experimento y confirmamos nuevamente la presencia de la ITGB5-T7 en los exosomas (Figura 33A) y la transferencia de la ITGB5-T7 a las células RAW 264.7 (Figura 33B). Considerando que la integrina $\alpha_v\beta_5$ dirige a las vesículas al hígado (Hoshino et al., 2015), decidimos continuar trabajando con exosomas debido a la mayor presencia de la integrina y su transferencia a las células blanco.

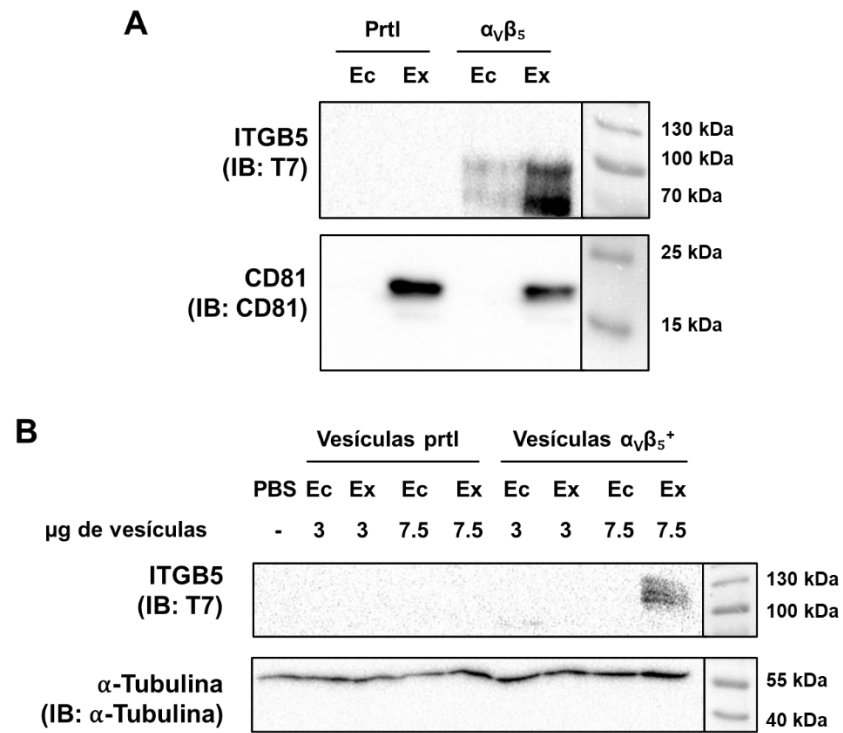


Figura 32. Transferencia de integrina a células RAW 264.7. A) Análisis de western blot de la ITGB5-T7 exógena y CD81 en ectosomas y exosomas derivados de células 293T (Prtl) y células 293T- $\alpha_V\beta_5$ ($\alpha_V\beta_5$). B) Análisis de western blot de la expresión de la ITGB5-T7 en células RAW 264.7 tratadas con 3.0 o 7.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de ectosomas (Ec) o exosomas (Ex). α -Tubulina fue utilizada con control de carga.

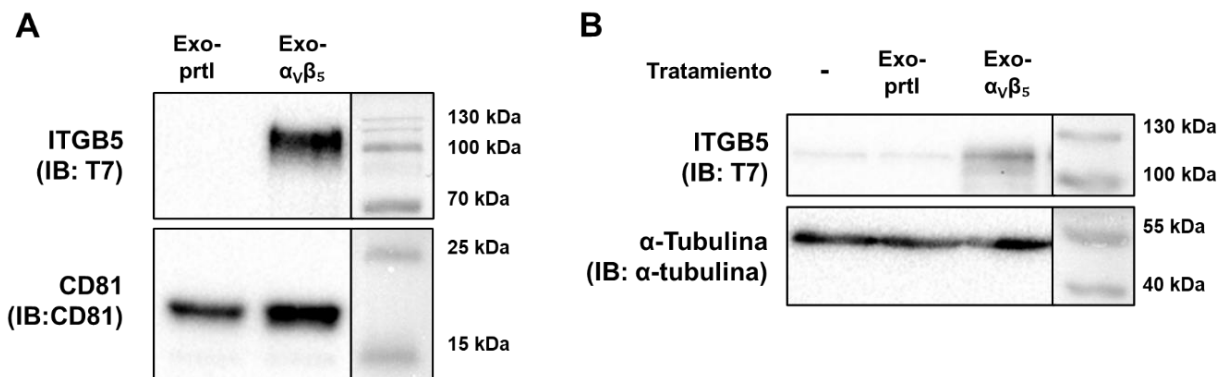


Figura 33. Transferencia de integrina a células RAW 264.7. A) Análisis de western blot de la ITGB5-T7 exógena y CD81 en exosomas. B) Análisis de western blot de la transferencia de la ITGB5-T7 exógena en células RAW 264.7 tratadas con exosomas.

3.4 Organotropismo de exosomas derivados de células 293T- $\alpha_V\beta_5^+$

Una vez comprobado que los exosomas llevan la integrina y la transfieren a células blanco, procedimos a inocular exosomas en ratones para validar su direccionamiento hacia el hígado. Para esto, a ratones Balb/c

administramos PBS o 100 μg de exosomas derivados de células 293T (Exo-prtl) teñidos con SP-DiI_{C18} vía intravenosa en un volumen total de 200 μL de PBS. Al día siguiente, se recuperó el hígado, se hicieron criosecciones, se realizó una contratinción con DAPI y se observaron por microscopía confocal. Las imágenes demostraron que se detecta la fluorescencia correspondiente a los Exo-prtl en el hígado (Figura 34, arriba) posiblemente debido a la expresión basal de $\alpha_v\beta_5$. El análisis del área de fluorescencia de todas las imágenes mostró una mayor fluorescencia en el hígado tratado con exosomas (Figura 34, abajo). Con esto, concluimos que la fluorescencia observada en las imágenes obtenidas por microscopía confocal corresponde al fluoróforo unido a exosomas, y no al remanente del fluoróforo presente en el diluyente, lo que valida la especificidad de la señal.

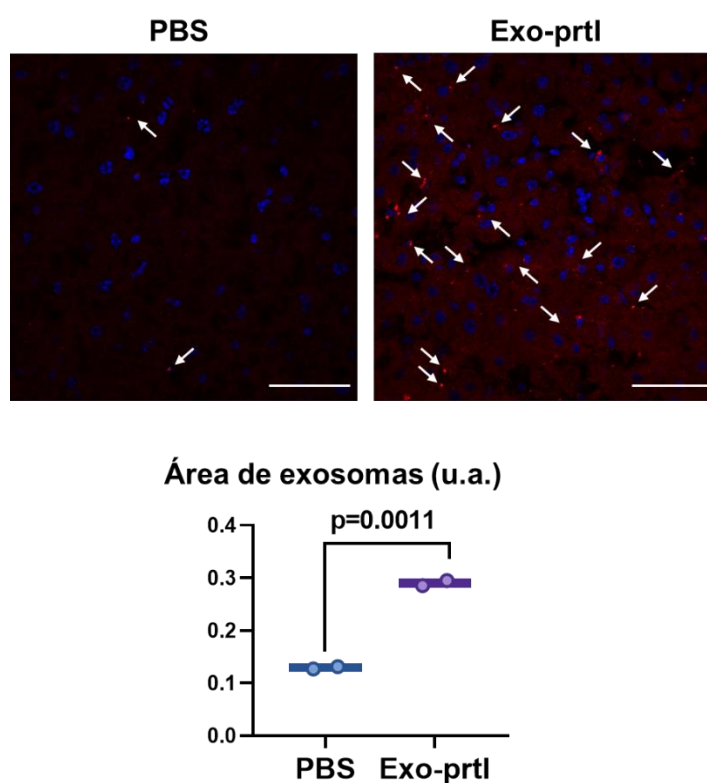


Figura 34. Localización de exosomas parentales en hígado de ratones. Micrografías representativas (arriba) del hígado de ratones tratados con un control de tinción en 100 μL de PBS o 100 μg de proteína de exosomas derivados de células 293T (Exo-prtl), con el análisis cuantitativo (abajo) del área con fluorescencia en unidades arbitrarias (u.a.). Las flechas blancas indican los exosomas fluorescentes. Barra de escala: 50 μm . Azul: DAPI, Rojo: SP-DiI_{C18}; prueba t de Student.

Establecidos los parámetros para visualizar los exosomas en tejidos de ratón con microscopía confocal y confirmada la especificidad de la señal, procedimos a comparar la distribución de exosomas derivados de células 293T (Exo-prtl) con exosomas derivados de células 293T- $\alpha_v\beta_5$ (Exo- $\alpha_v\beta_5$). Administramos 100 μL de PBS o 42 μg de Exo-prtl o Exo- $\alpha_v\beta_5$ fluorescentes en 3-4 ratones Balb/c por vía intravenosa. A las 24 horas

de tratamiento, se recuperaron hígado, pulmón, riñón y cerebro de cada ratón, se realizaron criosecciones y se hizo la contratinción con DAPI. Observamos una mayor localización de los Exo- $\alpha_V\beta_5$ en el hígado en comparación con los Exo-prtl. La presencia de $\alpha_V\beta_5$ en los exosomas resulta en cinco veces más exosomas en el hígado (Figura 35). Además, al comparar con los otros tejidos, la localización de los Exo- $\alpha_V\beta_5$ fue significativamente mayor en el hígado (Figura 35). Estos resultados indican que la sobreexpresión de $\alpha_V\beta_5$ aumenta la acumulación de los exosomas en el hígado.

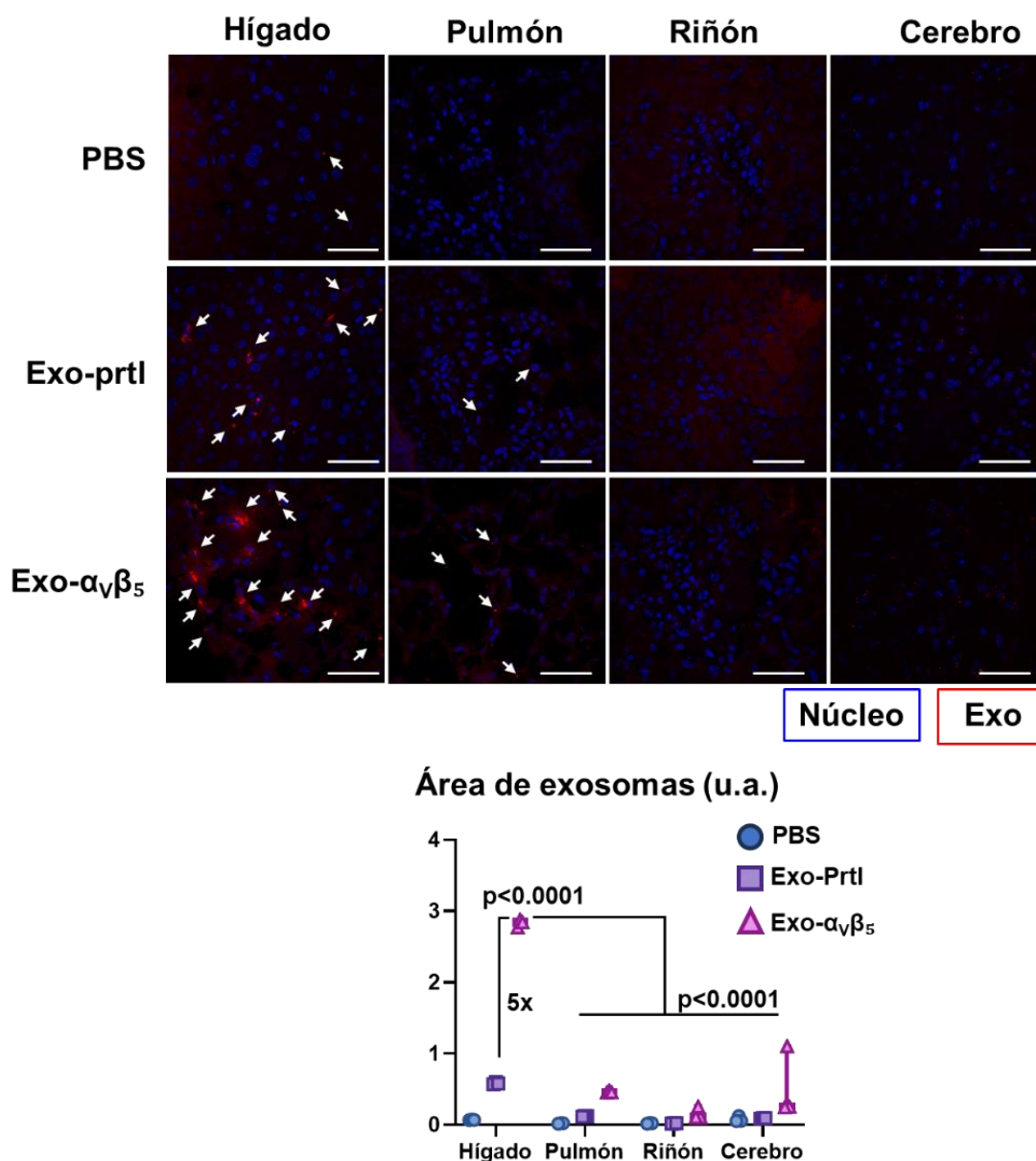


Figura 35. Organotropismo de exosomas $\alpha_V\beta_5^+$. Micrografías de hígado, pulmón, riñón y cerebro ratones inoculados vía intravenosa con PBS, exosomas derivados de células 293T (Exo-prtl) o 293T- $\alpha_V\beta_5$ (Exo- $\alpha_V\beta_5$) teñidos con SP-DilC₁₈ en un volumen total de 200 μ L de PBS; con el análisis cuantitativo (abajo) del área con fluorescencia en unidades arbitrarias (u.a.). Azul: DAPI, Rojo: SP-DilC₁₈. Barra de escala: 50 μ m. ANOVA de una vía, prueba post hoc Tukey. Micrografías representativas de tres experimentos independientes.

3.5 Silenciamiento de TGF- β 1 con shRNA en células RAW 264.7

3.5.1 Inserción de secuencias de shRNA en plásmidos pLKO.1

Para el silenciamiento de TGF- β 1, utilizamos un ARN de silenciamiento (shRNA, por sus siglas en inglés) contra el *Tgfb1* de ratón insertado en el vector de expresión viral pLKO.1-puro, con el objetivo de inhibir la expresión de TGF- β en las células blanco que capten los exosomas.

Seleccionamos dos secuencias de shRNA que reconocen *Tgfb1*. La secuencia utilizada en el shTgfb1¹ corresponde a un clon previamente validado (Yang et al., 2011) y la secuencia para el shTgfb1² se obtuvo con una herramienta para diseñar shRNA. Las secuencias fueron insertadas en el vector pLKO.1 después del sitio de restricción para *Age*1 (Figura 36). Los plásmidos resultantes, pLKO.1-shTgfb1¹-puro y pLKO.1-shTgfb1²-puro, se transformaron en bacterias competentes y se realizó un screening para seleccionar aquellas colonias con la inserción correcta.

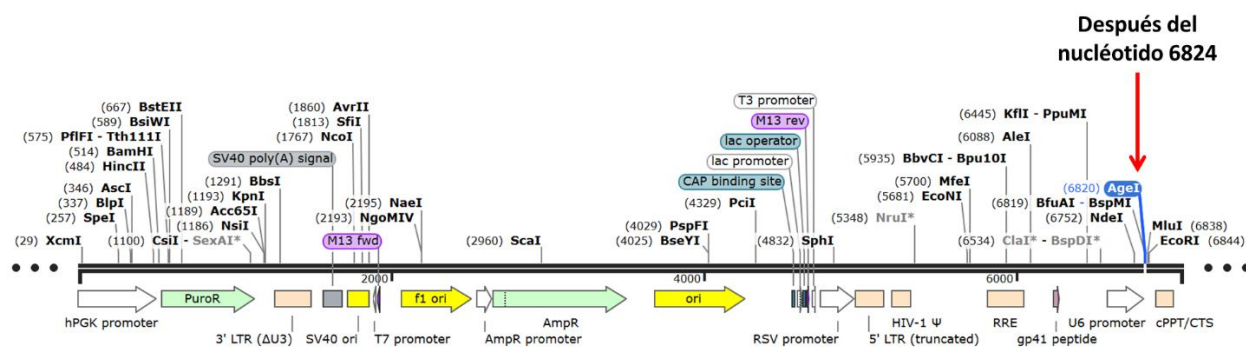


Figura 36. Diagrama del sitio de inserción de los shRNA en el plásmido pLKO.1-puro.

Para el plásmido pLKO.1-shTgfb1¹, analizamos 31 colonias diferentes por PCR de punto final y los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa (Figura 37). Esperábamos obtener un producto de amplificación 71 bp sin la inserción y de 110 bp con la inserción. De las 31 colonias, las colonias 2, 3, 4, 5, 7, 17, 18, 20, 24, 27 y 29 mostraron el producto de amplificación esperado, por lo que se purificaron los plásmidos y se enviaron a secuenciar. De los 11 plásmidos, dos tuvieron la inserción correcta: el plásmido pLKO.1-shTgfb1¹-27 y pLKO.1-shTgfb1¹-29 (Figura 38).

Para el plásmido pLKO.1-shTgfb1², analizamos 30 colonias diferentes por PCR de punto final y los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa (Figura 39). De las 30 colonias, las colonias 1,

2, 5, 6, 8, 12, 24, 25, 26, 27, 28 y 29 mostraron el producto de amplificación esperado, por lo que estos plásmidos se purificaron y se enviaron a secuenciar. De los 12 plásmidos, dos tuvieron la inserción correcta: el plásmido pLKO.1-shTgfb1²⁻⁶ y pLKO.1-shTgfb1²⁻²⁴ (Figura 40).

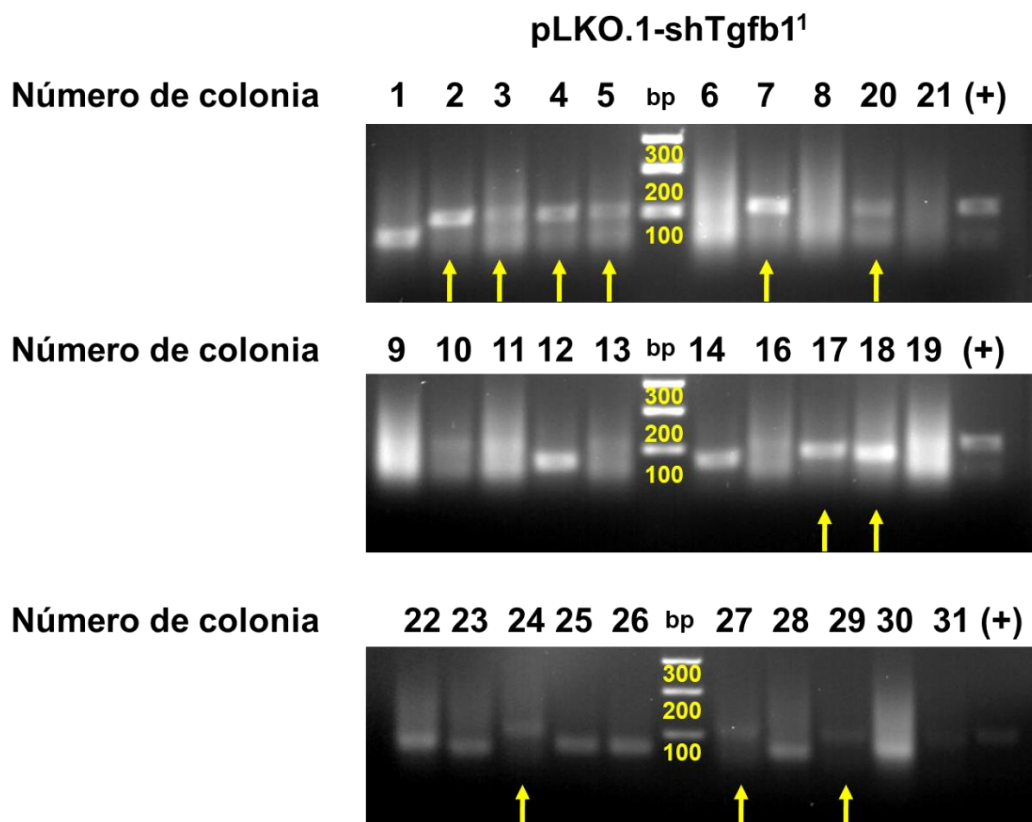
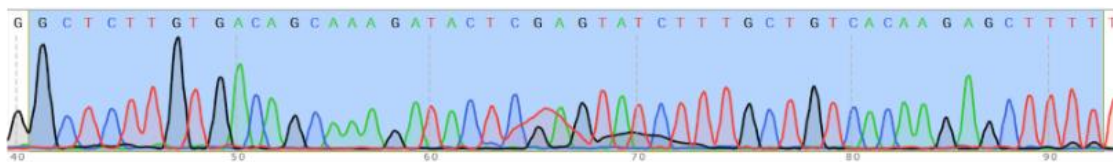


Figura 37. Screening de colonias positivas a la inserción de shTgfb1¹ en pLKO.1. Gel de electroforesis de agarosa al 3% con productos de PCR de 31 colonias correspondientes a los fragmentos de la inserción de shTgfb1¹ con una longitud de 110 bp. Las flechas amarillas indican las colonias que tenían el peso correcto. El control positivo utilizado (+) fue el plásmido pLKO.1-shGFP.

Colonia #27



Colonia #29

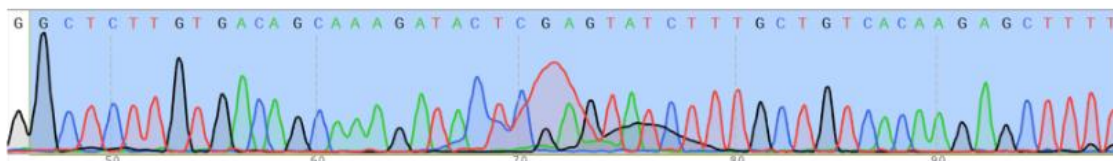


Figura 38. Secuenciación Sanger de clonas positivas pLKO.1-shTgfb1¹. Representación gráfica de la secuencia insertada en los plásmidos pLKO.1-shTgfb1¹⁻²⁷ y pLKO.1-shTgfb1¹⁻²⁹. Sombreado en azul es el empalme de la secuencia del shTgfb1 con la insertada en el plásmido.

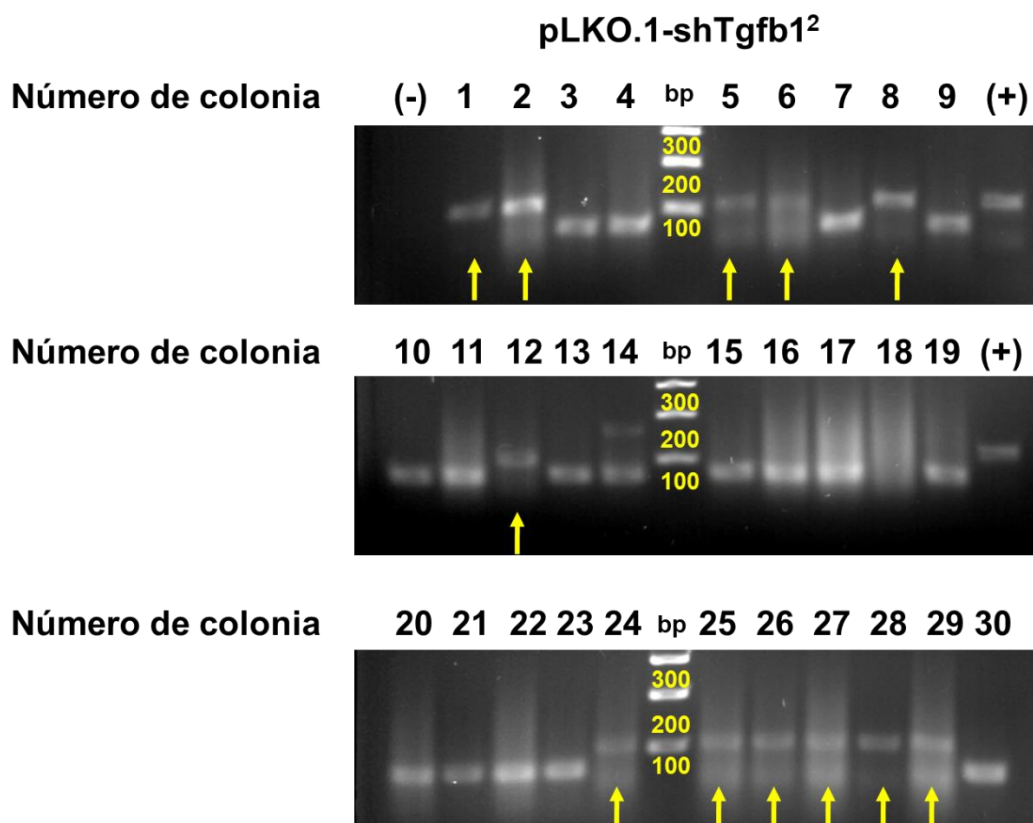


Figura 39. Screening de colonias positivas a la inserción de shTgfb1² en pLKO.1. Gel de electroforesis de agarosa al 3% con productos de PCR de 30 colonias correspondientes a los fragmentos de la inserción de shTgfb1² con una longitud de 110 bp. Las flechas amarillas indican las colonias que tenían el peso correcto. El control positivo utilizado (+) fue el plásmido pLKO.1-shGFP y el control negativo (-) fue H₂O.

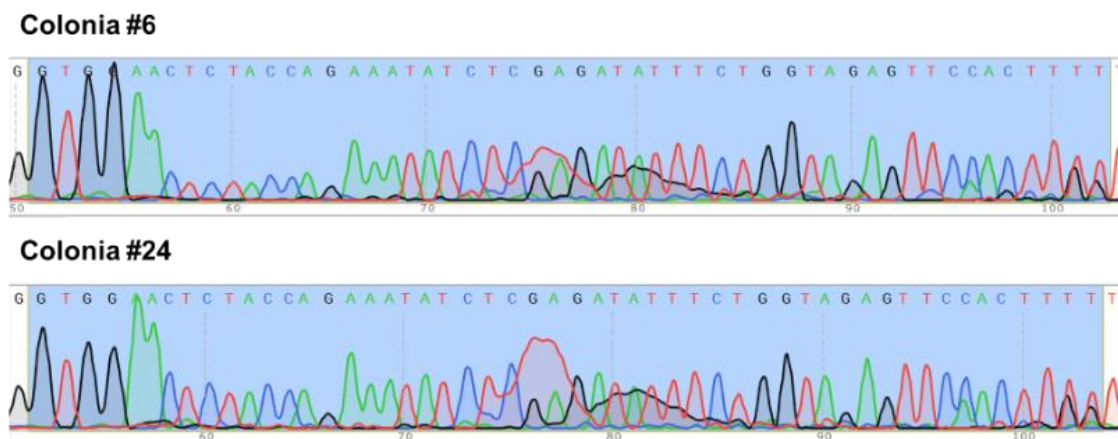


Figura 40. Secuenciación Sanger de clonas positivas pLKO.1-shTgfb1². Representación gráfica de la secuencia insertada en los plásmidos pLKO.1-shTgfb1²-6 y pLKO.1-shTgfb1²-24. Sombreado en azul es el empalme de la secuencia del shTgfb1² con la insertada en el plásmido.

3.5.2 Silenciamiento de *Tgfb1*

Para evaluar la eficiencia de silenciamiento de los shRNA, primero analizamos el potencial de silenciamiento del pLKO.1-shGFP. Para esto, transfectamos células 293T con pLenti-GFP junto con pLKO.1-shGFP o el vector vacío pLKO.1 como control. La microscopía de fluorescencia reveló que las células 293T transfectadas con GFP y el vector vacío mostraban una señal fluorescencia intensa, mientras que aquellas transfectadas con GFP y el shGFP presentaron una reducción notable en la fluorescencia (Figura 41A). Estos hallazgos fueron respaldados por citometría de flujo, donde se observó una disminución significativa en la intensidad de fluorescencia en las células transfectadas con shGFP en comparación con el control (Figura 41B). Al cuantificar esta reducción, determinamos una eficiencia de silenciamiento del 90%, lo que demuestra que el pLKO.1-shGFP es altamente efectivo para inhibir la expresión de GFP confirma su potencial para el silenciamiento de *Tgfb1*.

Una vez confirmado el silenciamiento de los shRNA, procedimos a validar el silenciamiento de *Tgfb1* en células de ratón. Modificamos células 4T1 mediante transducción lentiviral con los plásmidos pLKO.1-sh*Tgfb1*¹, pLKO.1-sh*Tgfb1*² o una combinación de ambos. Posterior a la transducción, las células se mantuvieron en cultivo con puomicina para seleccionar las células transducidas. Después de dos semanas en selección, obtuvimos lisados de las células para extracción de ARN total, seguido de una transcripción inversa y análisis de los ADNc obtenidos por qPCR para evaluar la expresión de *Tgfb1* y *pac* (puomicina N-acetil transferasa), el gen de resistencia a la puomicina.

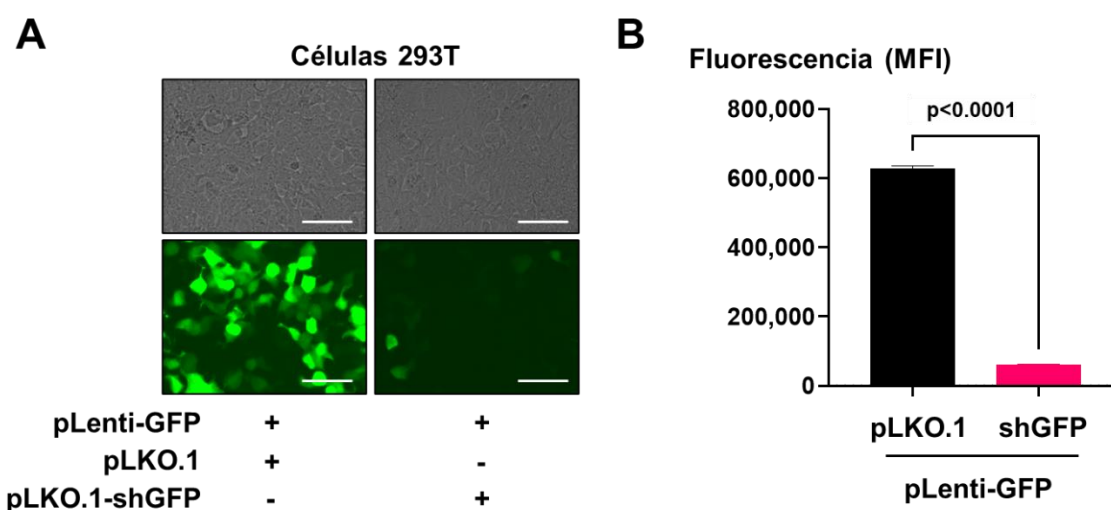


Figura 41. Silenciamiento de GFP. A) Imágenes de fluorescencia de células 293T transfectadas con pLenti-GFP, pLKO.1 o pLenti-GFP y pLKO.1-shGFP. B) Análisis cuantitativo de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células transfectadas obtenido a partir de citometría de flujo. Barra de escala: 50 μ m. ANOVA de una vía, prueba post hoc Tukey.

La RT-qPCR confirmó la expresión del gen de resistencia a la puromicina (*pac*) en todas las células transducidas (Figura 42B), lo que demuestra la integración exitosa del ADN plasmídico en el genoma celular. Por otro lado, se observaron niveles basales de *Tgfb1* tanto en las células 4T1 parentales como en las transducidas con shGFP. En contraste, las células transducidas con shTgfb1¹, shTgfb1² y la combinación, shTgfb1^{1&2} mostraron una reducción drástica en la expresión de *Tgfb1*, sin diferencias significativas entre tratamientos (Figura 42A). Estos resultados validan la eficiencia de silenciamiento de los shRNA dirigidos contra *Tgfb1* y demuestran que la combinación de ambos no ofrece ventaja adicional en la inhibición del gen, consolidando su utilidad como herramientas efectivas para la modulación de la expresión génica.

Una vez validados los shRNA contra *Tgfb1*, procedimos a transducir células 293T- $\alpha_v\beta_5$ con los shTgfb1 para generar células 293T- $\alpha_v\beta_5$ -shTgfb1, diseñadas para liberar exosomas que presenten $\alpha_v\beta_5$ en su membrana y que contengan shTgfb1 en su interior. Dado a que las células 293T son de origen humano y los shRNA están dirigidos contra el *Tgfb1* de ratón, la confirmación de la transducción no podía realizarse mediante la detección de la expresión de *Tgfb1*. En su lugar, decidimos evaluar la expresión del gen de resistencia a la puromicina (*pac*) como marcador indirecto de la transducción. Los resultados de la RT-qPCR demostraron la expresión de *pac* en todas las células 293T- $\alpha_v\beta_5$ transducidas, confirmando así la transducción de las células (Figura 43).

Posteriormente, recolectamos exosomas de las células 293T- $\alpha_v\beta_5$, 293T- $\alpha_v\beta_5$ -shTgfb1¹, 293T- $\alpha_v\beta_5$ -shTgfb1² y 293T- $\alpha_v\beta_5$ -shTgfb1^{1&2}. Para evaluar su efecto en la expresión de *Tgfb1*, cultivamos células RAW 264.7 y agregamos 6.25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de exosomas. Después de 8, 12 o 24 h, recuperamos los lisados celulares para extraer ARN total, seguido de una transcripción inversa y el análisis de los ADNc obtenidos por qPCR para evaluar la expresión de *Tgfb1*. A pesar de haber validado previamente el silenciamiento de los shRNA, los resultados mostraron que en ningún tiempo de tratamiento ni con ninguno de los exosomas portadores de shTgfb1 se observó una disminución significativa de la expresión de *Tgfb1* en las células RAW 264.7 (Figura 44). Estos hallazgos sugieren que la transferencia de shRNA a través de exosomas puede no ser lo suficientemente eficiente para inducir un silenciamiento génico en estas condiciones.

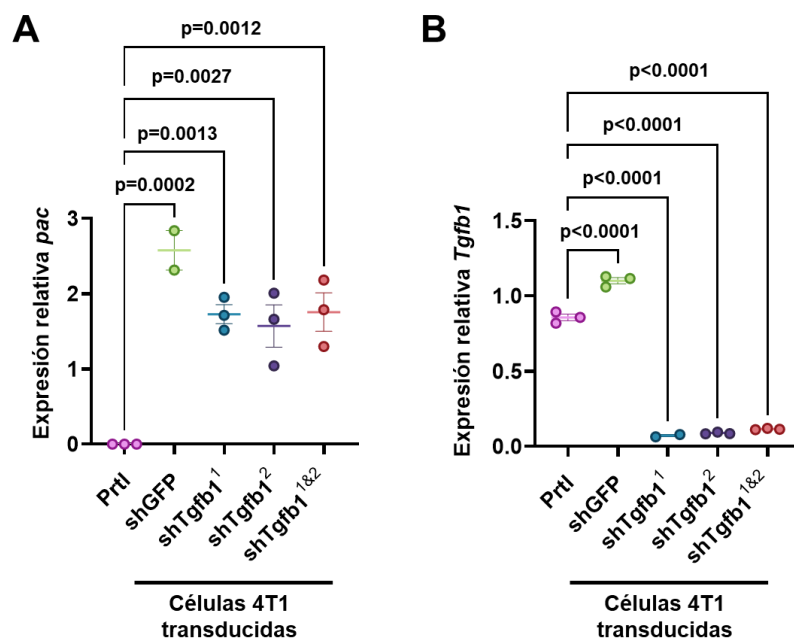


Figura 42. Expresión de *Tgfb1* y *pac* en células 4T1. A) Expresión de *Tgfb1* y B) *pac* en células 4T1 parentales y transducidas con shGFP, shTgfb1¹, shTgfb1² y shTgfb1^{1&2}. ANOVA de una vía, prueba post hoc Tukey.

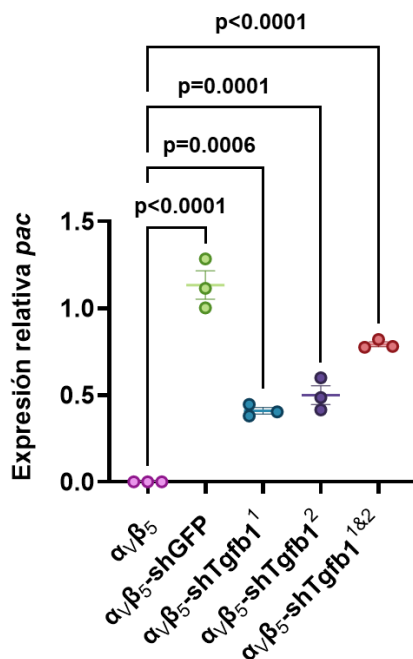


Figura 43. Expresión de *pac* en células 293T-αvβ5. Expresión del gen de resistencia a la puomicina, *pac*, en células 293T-αvβ5 wild-type y transducidas con shGFP, shTgfb1¹, shTgfb1² y shTgfb1^{1&2}. ANOVA de una vía, prueba post hoc Tukey.

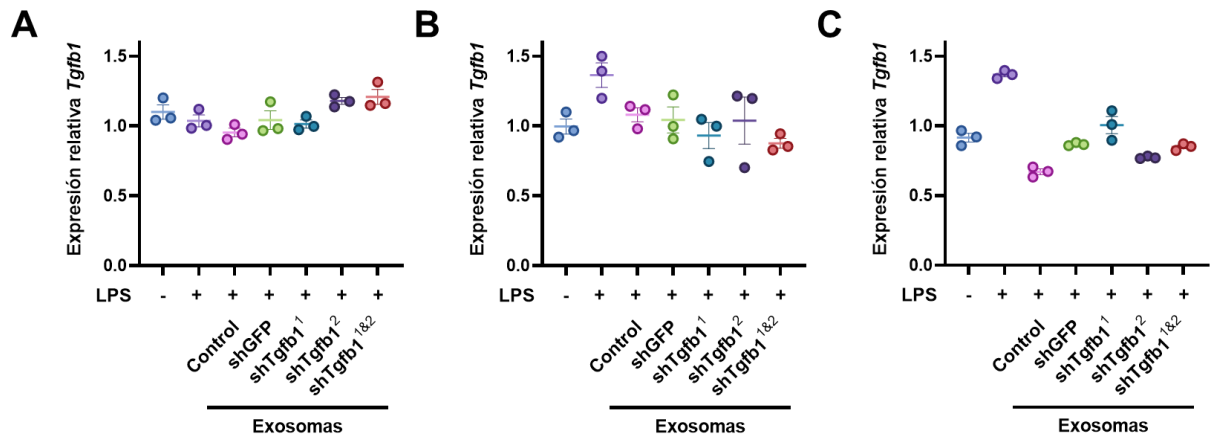


Figura 44. Expresión de *Tgfb1* en células RAW 264.7 tratadas con exosomas shTgfb1⁺. A) Tratamiento por 8h, B) tratamiento por 12h y C) tratamiento por 24h.

Capítulo 4. Discusión

A medida que el cáncer progresa, las células cancerosas se diseminan a otras partes del cuerpo en un proceso llamado metástasis, responsable del 90% de las muertes por cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000). El hígado es un sitio común de metástasis en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de páncreas, mama, colorrectal (Tsilimigras et al., 2021). Para favorecer la metástasis, las células tumorales liberan factores, como los exosomas, que crean un ambiente más favorable para la implantación de las células metastásicas antes de su llegada, etapa conocida como nicho pre-metastásico (Liu y Cao, 2016).

Para facilitar la colonización en el hígado, las células tumorales de cáncer de páncreas liberan exosomas con MIF, que activan las células de Kupffer, desencadenando la producción de TGF- β . Este factor induce un ambiente fibrótico, favoreciendo la adhesión de células metastásicas (Costa-Silva et al., 2015). La selectividad de los exosomas hacia órganos específicos depende de las integrinas en su superficie; en el caso del hígado, predominan exosomas con integrina $\alpha_v\beta_5$ (Hoshino et al., 2015).

Los tratamientos anti-TGF- β han mostrado efectos adversos en ensayos clínicos debido a la función crucial de esta molécula en diversas células (Colak y Ten Dijke, 2017; Huynh et al., 2019). Para evitar estos efectos, se plantea el uso de exosomas como terapia dirigida. Estas vesículas nanométricas destacan por su estabilidad, baja toxicidad, capacidad de atravesar barreras biológicas y posibilidad de ser modificadas para dirigirse a sitios específicos y transportar compuestos terapéuticos como siRNA (Kamerkar et al., 2017; Weng et al., 2021).

Dado que el TGF- β es clave en la formación del nicho pre-metastásico hepático y que los exosomas con integrina $\alpha_v\beta_5$ se dirigen específicamente al hígado (Costa-Silva et al., 2015; Hoshino et al., 2015), proponemos una terapia basada en exosomas modificados con esta integrina y cargados con un inhibidor de TGF- β . Esta estrategia permitiría una entrega selectiva al hígado, bloqueando la formación del nicho pre-metastásico y frenando la progresión metastásica.

Para la producción de exosomas $\alpha_v\beta_5^+$, era fundamental seleccionar una línea celular capaz de liberar exosomas en cantidades suficientes y que permitiera su modificación genética. En este sentido, evaluamos tres líneas celulares con características distintas: 293T, B16-F1 y MC-3T3E1. Las células B16-F1, a pesar de liberar una mayor cantidad de exosomas, presentaron una limitante crucial: no podían ser transfectadas ni transducidas eficientemente, lo que impedía su uso para la producción de exosomas modificados. Por otro lado, las células MC-3T3E1 parecían prometedoras debido a su baja tasa de proliferación y fuerte

adherencia, lo que facilitaría la recolección repetida de vesículas de la misma placa sin pérdida celular significativa. No obstante, tras múltiples intentos, no logramos obtener exosomas de estas células ni transfectarlas de manera eficiente, lo que descartó su uso en nuestro modelo. Las células 293T demostraron ser una opción viable, ya que no solo liberaban exosomas, sino que también podían ser modificadas genéticamente con facilidad.

Nuestros hallazgos son consistentes con lo reportado en la literatura. Se ha descrito previamente a las células 293T como un modelo eficiente para la obtención de exosomas, además de su facilidad para ser modificadas genéticamente (Bellavia et al., 2017; Tian et al., 2018; Zhou et al., 2019). Adicionalmente, estudios de proteómica y transcriptómica han demostrado que los exosomas derivados de estas células contienen proteínas, mRNA y miRNA con mínima asociación a procesos patológicos o vías de señalización relacionadas con el cáncer (Li et al., 2016).

Aunque exploramos diferentes líneas celulares en busca de la mejor opción para la producción de exosomas $\alpha_v\beta_5^+$, los resultados confirmaron que las células 293T eran la alternativa más adecuada por su capacidad de liberar exosomas, junto con su facilidad de modificación genética y la ausencia de contenido molecular relacionado con enfermedades (Li et al., 2016).

Un método muy utilizado para modificar de exosomas y dirigirlos a un órgano o célula específica fue desarrollado por Álvarez-Erviti et al. (2011). En su estrategia, fusionaron la glicoproteína 2b membranal asociada al lisosoma (Lamp2b), una proteína abundante en las membranas de los exosomas (Simhadri et al., 2008), con un péptido neuro-específico de la glicoproteína del virus de la rabia (RVG) con afinidad a los receptores de acetilcolina en el cerebro (Alvarez-Erviti et al., 2011; Liang et al., 2021). Posteriormente, este enfoque ha sido replicado utilizando otros péptidos en lugar del RVG, los cuales se fusionan al extremo N-terminal de Lamp2b para dirigir los exosomas a diferentes células (Sadeghi et al., 2023).

Sin embargo, este método requiere la transfección de la proteína quimérica días antes de la recolección de los exosomas, lo que prolonga el proceso de aislamiento. Nosotros proponemos una alternativa basada en la modificación genética estable de células productoras de exosomas, de manera que estos ya contengan la proteína en su membrana al momento del aislamiento.

Para esto, sobreexpresamos la integrina $\alpha_v\beta_5$ en células 293T a través de la co-transfección de plásmidos que codifican para la subunidad α_v y β_5 , facilitando la obtención de exosomas funcionales sin necesidad de modificaciones adicionales previas a su recolección. Tras implementar varios métodos de selección,

obtuvimos dos poblaciones celulares en las que más del 80% de las células expresaban $\alpha_v\beta_5$. Sin embargo, el análisis a lo largo de múltiples pases reveló todas las células de la clona 9B sobreexpresaba $\alpha_v\beta_5$ en una población monoclonal. Además, confirmamos la presencia de la integrina exogénica en los lisados celulares y en los exosomas derivados de células $\alpha_v\beta_5^+$. La detección de la integrina en los exosomas aislados refuerza la viabilidad de esta estrategia para la producción de vesículas modificadas, lo que sienta las bases para su aplicación en estudios de direccionamiento celular.

Para evaluar la funcionalidad de las vesículas, primero era necesario establecer un método eficiente para su visualización. Para esto, decidimos teñir exosomas con el fluoróforo SP-DiIC₁₈ y añadirlos a cultivos de células RAW 264.7. Sin embargo, observamos que a concentraciones superiores a 0.5 μM , la proporción de células vivas disminuía, lo que sugería que una internalización excesiva de exosomas teñidos afectaba la supervivencia celular. Dado que el SP-DiIC₁₈ es un fluoróforo lipofílico que se integra en las membranas, este efecto podría estar relacionado con la alteración de la integridad de las membranas celulares. Considerando el tamaño nanométrico de los exosomas y la necesidad de preservar su estructura, establecimos un límite de tinción inferior a 0.5 μM para evitar posibles daños en la membrana exosomal. Además, mantuvimos concentraciones de exosomas por debajo de 7.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de superficie de cultivo celular, para asegurar una transferencia eficiente de su contenido a las células blanco. Finalmente, tras evaluar diferentes líneas celulares como modelo de internalización, determinamos que las células RAW 264.7 eran la mejor opción probablemente debido a su naturaleza fagocítica (Feng et al., 2010), lo que favorece la captación de vesículas.

Para optimizar la entrega de vesículas y agilizar su aislamiento, exploramos también el uso de ectosomas como alternativa a los exosomas. A diferencia de estos últimos, los ectosomas pueden obtenerse sin necesidad de ultracentrifugación, lo que permite reducir significativamente el tiempo de procesamiento y simplificar su aislamiento. Estas ventajas nos llevaron a evaluar la internalización comparativa entre exosomas y ectosomas, con el objetivo de determinar cuál de estas vesículas era más eficiente para la transferencia de integrinas.

Al comparar la internalización entre exosomas y ectosomas de células parentales y $\alpha_v\beta_5^+$ teñidos con el SP-DiIC₁₈, observamos mayor internalización de los ectosomas en general, pero no hubo diferencia entre los ectosomas parentales y los $\alpha_v\beta_5$. Sin embargo, notamos una mayor internalización de los exosomas $\alpha_v\beta_5$ en comparación con los exosomas parentales. Interesantemente, los exosomas $\alpha_v\beta_5$ fueron internalizados exclusivamente por las células RAW 264.7, lo que sugiere una afinidad específica de los exosomas $\alpha_v\beta_5^+$ por células tipo macrófagos. También observamos que solo los exosomas, y no los

ectosomas transfieren la integrina a las células RAW 264.7, lo que plantea la posibilidad de una entrega más eficaz de su cargamento a las células blanco.

Aunque logramos detectar fluorescencia y la presencia de la integrina en las células RAW 264.7 tratadas con exosomas teñidos, no podemos confirmar que hayan sido internalizados, ya que los exosomas podrían haberse quedado adheridos a la membrana plasmática. Sin embargo, dado que las células RAW 264.7 son fagocíticas, es probable que los exosomas hayan sido internalizados por fagocitosis y dirigidos a los fagolisosomas, como se ha descrito previamente (Feng et al., 2010). Una de las principales limitaciones de utilizar células RAW 264.7 como modelo es que, al ser degradados en los fagolisosomas, los exosomas podrían perder su funcionalidad antes de liberar su contenido, lo que podría comprometer la eficacia de su aplicación terapéutica.

Para determinar la eficacia y especificidad de los exosomas en un contexto fisiológico, pasamos a evaluarlos en un modelo animal. A pesar de que observamos su captura por células RAW 264.7, la dinámica de internalización y destino final de los exosomas puede diferir en un organismo completo, donde factores como la circulación, la captación por distintos tejidos y la degradación enzimática influyen en su biodistribución.

Para confirmar que los exosomas $\alpha_v\beta_5$ se dirigen específicamente al hígado, inyectamos por vía intravenosa exosomas teñidos a ratones Balb/c. Posteriormente, analizamos diversos tejidos utilizando microscopía confocal y observamos mayor localización de los exosomas $\alpha_v\beta_5$ en el hígado en comparación con los exosomas parentales. Además, la localización de los exosomas $\alpha_v\beta_5$ en el hígado fue cinco veces mayor en que en los otros tejidos analizados. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de $\alpha_v\beta_5$ en los exosomas aumenta significativamente su localización en el hígado, que junto con los hallazgos de Hoshino et al. (2015) confirman el organotropismo de las integrinas en los exosomas. Este descubrimiento abre la posibilidad de desarrollar terapias dirigidas específicamente al hígado.

Nuestros hallazgos respaldan el potencial de modificar exosomas con integrinas específicas para dirigirlos a distintos tejidos. En el estudio de Hoshino et al. (2015) se silenció la integrina β_5 endógena en células de cáncer pancreático BxPC-3, las cuales hacen metástasis al hígado. Sin embargo, nuestro trabajo representa el primer reporte en el que se diseñan exosomas con una integrina específica para dirigirlos activamente a este órgano. Además, esta estrategia podría extenderse a otras integrinas, como $\alpha_6\beta_1$, para redirigir los exosomas hacia el pulmón (Hoshino et al., 2015). En particular, los exosomas $\alpha_v\beta_5$, debido a su afinidad

por la fibronectina, podrían utilizarse como una herramienta terapéutica para intervenir en sitios fibróticos, abriendo nuevas posibilidades en el tratamiento dirigido en el cáncer.

Sin embargo, el uso de exosomas como herramienta terapéutica presenta diversas limitaciones, especialmente en términos de rendimiento y escalabilidad. Para un modelo de metástasis hepática en ratones se requiere la administración de 5 μg de exosomas de células de cáncer pancreático cada tercer día (Costa-Silva et al., 2015). Además, el tratamiento con exosomas modificados puede ir desde 0.15–0.20 μg de proteína de exosomas cada 48 h (Kamerkar et al., 2017). Tomando en cuenta las cantidades de exosomas requeridas para estudios *in vivo*, la escalabilidad es la principal limitante. La obtención de exosomas requiere grandes volúmenes de medio de cultivo, lo que dificulta su producción a gran escala. Esto representa un obstáculo para su aplicación en estudios preclínicos o clínicos, donde se necesitan altas cantidades de exosomas para evaluar su efectividad en modelos animales.

Como una alternativa para superar estas limitaciones, el uso de biorreactores ha demostrado ser una estrategia eficiente para escalar la producción de exosomas. Se ha reportado su aplicación en cultivos 2D y 3D de células madre mesenquimales (Cao et al., 2020; Kink et al., 2024). Además, su eficacia ha sido validada en la producción de partículas lentivirales a partir de cultivos de células 293T, en combinación con incubadoras tipo Cell Factory, las cuales ofrecen superficies de cultivo que van desde 4 m^2 hasta 500 m^2 (Valkama et al., 2018), lo que permite un aumento significativo en la producción celular y la recolección de exosomas. La integración de estas tecnologías no solo optimiza la producción de exosomas, sino que también facilita su escalamiento para aplicaciones terapéuticas en fases preclínicas como clínicas.

El uso de biorreactores y sistemas Cell Factory permitiría una producción eficiente de exosomas derivados de PAN02 para inducir la formación del NPM en hígado a través de la educación de ratones con estos exosomas. Además, se producirían suficientes exosomas $\alpha_v\beta_5$ para utilizarlos como herramienta terapéutica para dirigirlos específicamente al hígado, interfiriendo con la señalización pro-metastásica. Este enfoque permitiría evaluar tanto la biodistribución como la funcionalidad de los exosomas $\alpha_v\beta_5$ en un contexto preclínico.

Una vez confirmada la acumulación de los exosomas $\alpha_v\beta_5$ en el hígado, el siguiente paso fue integrar un inhibidor del TGF- β en los exosomas $\alpha_v\beta_5$, dado su papel clave en la formación del NPM hepático para utilizarlos como vehículos terapéuticos. Para evitar pasos adicionales en la manipulación de los exosomas y mantenerlos lo más puros y estériles posibles, planteamos la hipótesis modificar genéticamente las

células $\alpha\beta_5$ con un shRNA contra el TGF- β de ratón. Esto debido a que previamente habíamos detectado pocos ARN largos en los exosomas (Olvera Felix, 2023).

Decidimos insertar una secuencia de dos shTgfb1 validados en un plásmido lentiviral, para transducir estos plásmidos en las células $\alpha\beta_5^+$ y obtener exosomas $\alpha\beta_5^+$ shTgfb1⁺. Después de un amplio screening de las colonias obtenidas e identificamos dos colonias de cada plásmido con la inserción, que por secuenciación se confirmó que contaban con la inserción correcta.

Utilizamos células de ratón para validar el silenciamiento de *Tgfb1*. Transducimos células 4T1 con plásmidos que contenían los shTgfb1 y plásmidos controles. En las células transducidas con los shTgfb1, confirmamos la disminución de la expresión de *Tgfb1*. Además, observamos una correlación entre la baja expresión de *Tgfb1* en las células transducidas con shTgfb1 y la alta expresión del gen de resistencia a la puomicina en las células transducidas con cualquier plásmido, independientemente del plásmido utilizado. Procedimos a transducir las células $\alpha\beta_5$ y confirmamos la transducción mediante la alta expresión del gen de resistencia a la puomicina. Sin embargo, al tratar macrófagos con los exosomas derivados de estas células, no observamos disminución en la expresión de *Tgfb1*.

Dado que en las células 4T1 logramos confirmar el funcionamiento de los shTgfb1, podríamos obtener exosomas de estas células y utilizarlos en macrófagos aislados de ratones, lo que proporcionaría una indicación más directa de la efectividad de los shRNA cargados en los exosomas para modificar la función celular de manera específica. Sin embargo, dado que las células 4T1 hacen metástasis a pulmón, por lo que si las utilizáramos como modelo podría traer efectos contraproducentes al promover el cáncer.

Estos hallazgos sugieren que la transferencia de shRNA a través de exosomas puede no ser lo suficientemente eficiente para inducir un silenciamiento génico bajo las condiciones utilizadas en este estudio, lo que resalta la necesidad de optimizar la entrega del inhibidor o explorar estrategias complementarias para potenciar el efecto de los shRNA. Es importante destacar que, hasta la fecha, no se ha reportado el uso de exosomas cargados con shRNA mediante transducción genética de las células productoras. En contraste, en un estudio en ratones utilizaron la electroporación para cargar los exosomas con shRNA, logrando efectos terapéuticos como la disminución de agregados de alfa-sinucleína en un modelo de la enfermedad de Parkinson (Izco et al., 2019). Esto sugiere que la estrategia basada en transducción aún no ha sido explorada ni validada experimentalmente, y podría representar una limitación clave en la eficiencia de entrega observada.

Asimismo, la falta de silenciamiento de *Tgfb1* en las células receptoras podría explicarse por la fagocitosis de los exosomas, que al ser internalizados por las células RAW 264.7, siendo enviados a los fagolisosomas (Feng et al., 2010), y posiblemente sean degradados previo al procesamiento de los shRNA. Esta hipótesis ofrece una posible explicación de por qué el tratamiento con exosomas derivados de células 293T modificadas genéticamente para expresar shTgfb1 no logra disminuir la expresión de TGF- β 1. Además, el hecho de que las células productoras generen continuamente shTgfb1 no garantiza su incorporación efectiva en los exosomas secretados, lo que refuerza la necesidad de confirmar y optimizar el proceso de carga para lograr un efecto biológico deseado.

A pesar de que los exosomas han sido utilizados previamente como vehículos terapéuticos de siRNA en modelos de ratones (Kamerkar et al., 2017), existen limitaciones de reproducibilidad al trabajar con exosomas y el uso de siRNA es costoso y poco sustentable. Toda esta información debe considerarse al trabajar con exosomas como vehículos terapéuticos.

Una estrategia prometedora para mejorar la carga de ARN en exosomas es el uso de secuencias específicas, conocidas como zipcodes, que facilitan el empaquetamiento de ARN en estas vesículas. Estudios previos han demostrado que la adición de zipcodes en la región 3' UTR de ciertos mRNA puede promover su enriquecimiento en ectosomas (Bolukbasi et al., 2012).

En esta línea, nuestro grupo propuso la inserción de una o dos secuencias de zipcodes en el mRNA de BGs (Olvera Felix, 2023). Sin embargo, en células 293T, la inclusión de estos zipcodes no resultó en un aumento significativo de la carga de mRNA-BGs en los exosomas, lo que sugiere una limitación en su mecanismo de incorporación. Dado que la funcionalidad del zipcode depende de su interacción con miR-1289 (Bolukbasi et al., 2012), es posible que una baja expresión de este miRNA en células 293T restringe su eficacia. En este contexto, la sobreexpresión de miR-1289 podría representar una estrategia viable para mejorar el empaquetamiento de mRNA en los exosomas generados a partir de estas células (Olvera Felix, 2023). Por otro lado, se comprobó que los exosomas con el ARNm de BGs neutralizaron la vía del TGF- β en un modelo *in vitro*. Sin embargo, es necesario aumentar los niveles de ARNm en los exosomas para lograr obtener un efecto terapéutico (Olvera Felix, 2023).

Además, se han desarrollado sistemas innovadores para optimizar la entrega de mRNA desde los exosomas a las células receptoras, como el sistema EXOtic (Kojima et al., 2018). Este enfoque permite no solo una mayor carga de mRNA en los exosomas, sino también una transferencia más eficiente al citoplasma celular, lo que mejora su funcionalidad como vehículos de entrega de material genético.

Como alternativa al mRNA, el uso de miRNA podría ser una estrategia eficaz para modular la expresión de *Tgfb1*, ya que se han identificado motivos exosomales (EXOmotifs) que favorecen su empaquetamiento y enriquecimiento en los exosomas (Garcia-Martin et al., 2022). Esta estrategia podría aprovecharse para desarrollar exosomas funcionalizados con miRNA terapéuticos, ampliando su potencial en la regulación de señales clave dentro del microambiente tumoral.

Un aspecto fundamental en la optimización de los exosomas como herramientas terapéuticas es mejorar su producción y liberación. Diversas proteínas han sido identificadas como reguladoras clave en la biogénesis de exosomas, entre ellas la metalorreductasa STEAP3 y syndecan-4 (SDC4). La sobreexpresión combinada de STEAP3, SDC4 y L-aspartato oxidasa ha demostrado incrementar significativamente la producción de exosomas en células 293T (Kojima et al., 2018).

Además, se han desarrollado sistemas avanzados para mejorar la carga de mRNA en exosomas, como la nanoporación celular (CNP) a través de biochips (Yang et al., 2020). En esta técnica, la monocapa celular se siembra sobre un chip con nanocanales de aproximadamente 500 nm de diámetro, a través de los cuales se aplican pulsos eléctricos que permiten la entrada de plásmidos desde un medio amortiguador a las células adheridas. Una vez en la célula, los plásmidos son transcritos a mRNA, y posteriormente son empaquetados en vesículas. Interesantemente, con este sistema se muestra una mayor tendencia a ser empaquetado en exosomas en lugar de ectosomas. Este sistema permitió generar aproximadamente 10^{12} exosomas terapéuticos en un ciclo de CNP de 2 a 3 días por cada chip de 1 cm^2 con $\sim 10^6$ células, lo cual es suficiente para inocular 10^{12} exosomas vía intravenosa de ratones cada tercer día durante 12 días (Z. Yang et al., 2020).

Una tecnología relevante es el sistema de nanoelectroporación basado en membranas (TM-nanoEP), que permite la producción de grandes cantidades de vesículas extracelulares cargadas con mRNA terapéutico y miRNAs funcionales (Ma et al., 2023). Estas estrategias aumentan la producción de exosomas a través de la activación de vías de estrés celular que pueden favorecer su liberación.

Una estrategia viable es la encapsulación de una molécula quimioterapéutica dentro de los exosomas, una técnica que ha demostrado eficacia en modelos preclínicos. Por ejemplo, los exoPTX, exosomas cargados con paclitaxel, redujeron la metástasis pulmonar en ratones con una mayor efectividad que el tratamiento sistémico con PTX (Kim et al., 2016). Sin embargo, hasta el momento, no se ha reportado la encapsulación de un quimioterapéutico específicamente para el tratamiento de la metástasis hepática.

Una opción prometedora sería la 5-fluoro-2-deoxiuridina (FUDR), el agente quimioterapéutico más comúnmente utilizado para este tipo de metástasis, que actualmente se administra mediante una bomba de infusión arterial hepática (Thiels y D'Angelica, 2020). La integración de la FUDR en exosomas podría representar una alternativa menos invasiva, potencialmente eliminando la necesidad de intervención quirúrgica y mejorando la biodisponibilidad del fármaco en el hígado.

La liofilización de exosomas ha demostrado eficacia en el tratamiento de fibrosis y lesiones pulmonares en modelos *in vivo* (Dinh et al., 2020). Además, ha sido utilizada para el desarrollo de vacunas de mRNA dirigidas a enfermedades pulmonares, como para la COVID-19 (Popowski et al., 2022). Esta técnica no solo prolonga la estabilidad de los exosomas, facilitando su almacenamiento y transporte, sino que también permite su administración por vías menos invasivas, como la intranasal, y amplifica su potencial terapéutico.

El uso de estas metodologías podría potenciar la producción de exosomas $\alpha_v\beta_5$ funcionalizados, mejorando su aplicabilidad en terapias dirigidas y facilitando su escalamiento para estudios preclínicos y potenciales aplicaciones clínicas. Estas innovaciones ofrecen soluciones prometedoras para mejorar la eficiencia en la carga de ARN en exosomas, incrementar su producción y optimizar su entrega a células blanco. La combinación de enfoques basados en EXOmotifs, sobreexpresión de factores clave en la biogénesis de exosomas y tecnologías de nanoporación podría ser clave para el desarrollo de terapias avanzadas basadas en exosomas modificados.

La mayoría de los estudios con exosomas se realizan en modelos *in vitro* e *in vivo*, con el objetivo de entender mejor sus mecanismos biológicos y potencial terapéutico. En la actualidad, el uso de exosomas en ensayos clínicos a partir del suero de pacientes se ha centrado principalmente en su aplicación como biomarcadores de diagnóstico o pronóstico en cáncer (Rezaie et al., 2022). Los exosomas han demostrado ser útiles en la identificación de biomarcadores específicos para el cáncer, facilitando la detección temprana y el monitoreo de la progresión de la enfermedad (Kalluri y LeBleu, 2020). Sin embargo, su uso terapéutico sigue siendo un campo emergente, y se requiere más investigación para optimizar la carga terapéutica y la especificidad de los exosomas dirigidos.

Nuestros hallazgos representan el primer reporte en el que se diseñan exosomas con una integrina específica para dirigirlos activamente al hígado. Los resultados obtenidos posicionan a los exosomas $\alpha_v\beta_5$ como nanotransportadores con potencial terapéutico, capaces de ofrecer una alternativa innovadora para el tratamiento dirigido de enfermedades hepáticas.

El tratamiento con inhibidores de TGFBR1 ha demostrado prevenir la reacción fibrótica y reducir las metástasis hepáticas en modelos murinos (Costa-Silva et al., 2015). Sin embargo, su uso sistémico en pacientes puede generar efectos adversos significativos. En este contexto, los exosomas $\alpha_v\beta_5^+$ funcionalizados con inhibidores de TGF- β podrían representar una estrategia más específica para tratar enfermedades hepáticas fibróticas, incluyendo la fibrosis inducida por hepatitis crónica, el abuso de alcohol y la cirrosis. En estos casos, la sobreexpresión de TGF- β impulsa la producción de fibronectina y contribuye a la progresión del daño hepático, donde el trasplante sigue siendo la única opción terapéutica viable (Dewidar et al., 2019).

La capacidad de los exosomas $\alpha_v\beta_5$ para modular selectivamente la señalización de TGF- β en el hígado abre nuevas perspectivas para el desarrollo de terapias dirigidas, ofreciendo una opción potencialmente más efectiva y segura para el tratamiento de patologías hepáticas avanzadas.

Capítulo 5. Conclusiones

Se estandarizó un protocolo para la tinción de exosomas y ectosomas utilizando el fluoróforo lipofílico SP-DilC₁₈, con el objetivo de rastrear estas vesículas tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta estrategia permitió seguir su dinámica de internalización en células receptoras, minimizando el impacto técnico que pudiera derivarse de este proceso y asegurando una visualización confiable de su localización y distribución.

Con el fin de estudiar el papel de la integrina $\alpha_v\beta_5$ en el direccionamiento de exosomas, se modificaron células 293T para inducir la sobreexpresión de esta integrina. Los exosomas derivados de esta línea celular contuvieron la integrina $\alpha_v\beta_5$ exogénica, la cual fue posteriormente transferida a células receptoras tras la internalización de las vesículas.

La validación funcional de esta modificación mostró que un aumento en la cantidad de integrina $\alpha_v\beta_5$ en la superficie de los exosomas incrementa significativamente su direccionamiento hacia el hígado de ratones, en comparación con los exosomas parentales. En este modelo, la localización hepática de los exosomas $\alpha_v\beta_5^+$ fue cinco veces mayor que en otros órganos como pulmón, riñón o cerebro, lo que sugiere un mecanismo de direccionamiento selectivo mediado por esta integrina.

Para evaluar una posible estrategia terapéutica, se insertaron secuencias específicas para la transcripción de shRNA dirigidos contra *Tgfb1* de ratón en el plásmido pLKO.1. La funcionalidad de estos plásmidos fue comprobada mediante análisis de silenciamiento efectivo del gen *Tgfb1* en células de ratón transducidas.

Posteriormente, se examinó el efecto de exosomas derivados de células 293T que expresaban la integrina $\alpha_v\beta_5$ y el shTgfb1 sobre los niveles de *Tgfb1* en células de ratón tratadas. Sin embargo, bajo las condiciones experimentales ensayadas, no se observaron cambios significativos en los niveles de expresión génica, lo que indica la necesidad de optimizar la estrategia de entrega o las condiciones del tratamiento.

En conjunto, estos resultados demuestran que es posible modificar exosomas para dirigirlos de forma específica a órganos como el hígado y que pueden ser cargados con material genético funcional. Sin embargo, también ponen en evidencia los retos técnicos asociados a la eficacia de la entrega intracelular y su impacto biológico, lo que resalta la complejidad de utilizar vesículas extracelulares como vehículos terapéuticos.

Los resultados obtenidos durante este proyecto indican por la primera vez que exosomas $\alpha_v\beta_5^+$ se pueden usar como nanovehículos para la entrega dirigida al hígado. Sin embargo, todavía se necesita optimizar el cargamiento de agentes anti-TGF- β en estos exosomas para lograr tener un efecto terapéutico como la inhibición la formación del nicho premetastásico hepático. Además, estos exosomas podrían ser cargados con agentes quimioterapéuticos como el paclitaxel o la floxuridina para evaluar su capacidad de interferir en la progresión tumoral y fortalecer su potencial como herramientas terapéuticas en oncología, disminuyendo sus efectos secundarios gracias a la entrega dirigida al hígado.

Literatura citada

- Aguado, B. A., Bushnell, G. G., Rao, S. S., Jeruss, J. S., & Shea, L. D. (2017). Engineering the pre-metastatic niche. *Nature Biomedical Engineering*, 1, 0077. <https://doi.org/10.1038/s41551-017-0077>
- Alanko, J., Mai, A., Jacquemet, G., Schauer, K., Kaukonen, R., Saari, M., Goud, B., & Ivaska, J. (2015). Integrin endosomal signalling suppresses anoikis. *Nature Cell Biology*, 17(11), 1412–1421. <https://doi.org/10.1038/ncb3250>
- Albert, M. L., Kim, J.-I., & Birge, R. B. (2000). $\alpha\beta 5$ integrin recruits the CrkII–Dock180–Rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nature Cell Biology*, 2(12), 899–905. <https://doi.org/10.1038/35046549>
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhal, S., & Wood, M. J. A. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*, 29(4), 341–345. <https://doi.org/10.1038/nbt.1807>
- Anderton, M. J., Mellor, H. R., Bell, A., Sadler, C., Pass, M., Powell, S., Steele, S. J., Roberts, R. R. A., & Heier, A. (2011). Induction of heart valve lesions by small-molecule ALK5 inhibitors. *Toxicologic Pathology*, 39(6), 916–924. <https://doi.org/10.1177/0192623311416259>
- Arjonen, A., Kaukonen, R., Mattila, E., Rouhi, P., Högnäs, G., Sihto, H., Miller, B. W., Morton, J. P., Bucher, E., Taimen, P., Virtakoivu, R., Cao, Y., Sansom, O. J., Joensuu, H., & Ivaska, J. (2014). Mutant p53-associated myosin-X upregulation promotes breast cancer invasion and metastasis. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(3), 1069–1082. <https://doi.org/10.1172/JCI67280>
- Attardi, L. D., & Boutelle, A. M. (2024). Targeting p53 gain-of-function activity in cancer therapy: a cautionary tale. *Cell Death and Differentiation*, 31(2), 133–135. <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01253-7>
- Attieh, Y., Clark, A. G., Grass, C., Richon, S., Pocard, M., Mariani, P., Elkhatib, N., Betz, T., Gurchenkov, B., & Vignjevic, D. M. (2017). Cancer-associated fibroblasts lead tumor invasion through integrin- $\beta 3$ -dependent fibronectin assembly. *The Journal of Cell Biology*, 216(11), 3509–3520. <https://doi.org/10.1083/jcb.201702033>
- Au, S. H., Storey, B. D., Moore, J. C., Tang, Q., Chen, Y.-L., Javaid, S., Sarioglu, A. F., Sullivan, R., Madden, M. W., O’Keefe, R., Haber, D. A., Maheswaran, S., Langenau, D. M., Stott, S. L., & Toner, M. (2016). Clusters of circulating tumor cells traverse capillary-sized vessels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(18), 4947–4952. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524448113>
- Azar, R., Alard, A., Susini, C., Bousquet, C., & Pyronnet, S. (2009). 4E-BP1 is a target of Smad4 essential for TGF β -mediated inhibition of cell proliferation. *The EMBO Journal*, 28(22), 3514–3522. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.291>
- Bache, K. G., Brech, A., Mehlum, A., & Stenmark, H. (2003). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *The Journal of Cell Biology*, 162(3), 435–442. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302131>

- Bandyopadhyay, A., López-Casillas, F., Malik, S. N., Montiel, J. L., Mendoza, V., Yang, J., & Sun, L.-Z. (2002). Antitumor activity of a recombinant soluble betaglycan in human breast cancer xenograft. *Cancer Research*, 62(16), 4690–4695. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12183427/>
- Barbazán, J., Alonso-Alconada, L., Elkhatib, N., Geraldo, S., Gurchenkov, V., Glentis, A., van Niel, G., Palmulli, R., Fernández, B., Viaño, P., Garcia-Caballero, T., López-López, R., Abal, M., & Vignjevic, D. M. (2017). Liver Metastasis Is Facilitated by the Adherence of Circulating Tumor Cells to Vascular Fibronectin Deposits. *Cancer Research*, 77(13), 3431–3441. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1917>
- Barrow-McGee, R., Kishi, N., Joffre, C., Ménard, L., Hervieu, A., Bakhouché, B. A., Noval, A. J., Mai, A., Guzmán, C., Robbez-Masson, L., Iturrioz, X., Hult, J., Brennan, C. H., Hart, I. R., Parker, P. J., Ivaska, J., & Kermorgant, S. (2016). Beta 1-integrin-c-Met cooperation reveals an inside-in survival signalling on autophagy-related endomembranes. *Nature Communications*, 7, 11942. <https://doi.org/10.1038/ncomms11942>
- Battle, E., & Massagué, J. (2019). Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*, 50(4), 924–940. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.024>
- Becker, A., Thakur, B. K., Weiss, J. M., Kim, H. S., Peinado, H., & Lyden, D. (2016). Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell*, 30(6), 836–848. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.009>
- Bellavia, D., Raimondo, S., Calabrese, G., Forte, S., Cristaldi, M., Patinella, A., Memeo, L., Manno, M., Raccosta, S., Diana, P., Cirrincione, G., Giavaresi, G., Monteleone, F., Fontana, S., De Leo, G., & Alessandro, R. (2017). Interleukin 3- receptor targeted exosomes inhibit in vitro and in vivo Chronic Myelogenous Leukemia cell growth. *Theranostics*, 7(5), 1333–1345. <https://doi.org/10.7150/thno.17092>
- Biankin, A. V., Waddell, N., Kassahn, K. S., Gingras, M.-C., Muthuswamy, L. B., Johns, A. L., Miller, D. K., Wilson, P. J., Patch, A.-M., Wu, J., Chang, D. K., Cowley, M. J., Gardiner, B. B., Song, S., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Nourse, C., Nourbakhsh, E., Manning, S., ... Grimmond, S. M. (2012). Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*, 491(7424), 399–405. <https://doi.org/10.1038/nature11547>
- Bolukbasi, M. F., Mizrak, A., Ozdener, G. B., Madlener, S., Ströbel, T., Erkan, E. P., Fan, J.-B., Breakefield, X. O., & Saydam, O. (2012). miR-1289 and “Zipcode”-like Sequence Enrich mRNAs in Microvesicles. *Molecular therapy. Nucleic Acids*, 1(2), e10. <https://doi.org/10.1038/mtna.2011.2>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Buschow, S. I., Nolte-’t Hoen, E. N. M., van Niel, G., Pols, M. S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C. J. M., Raposo, G., Wubbolts, R., Wauben, M. H. M., & Stoorvogel, W. (2009). MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic*, 10(10), 1528–1542. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x>

- Campeau, E., Ruhl, V. E., Rodier, F., Smith, C. L., Rahmberg, B. L., Fuss, J. O., Campisi, J., Yaswen, P., Cooper, P. K., & Kaufman, P. D. (2009). A Versatile Viral System for Expression and Depletion of Proteins in Mammalian Cells. *PLoS ONE*, 4(8), e6529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006529>
- Cano, A., Pérez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., & Nieto, M. A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology*, 2(2), 76–83. <https://doi.org/10.1038/35000025>
- Cao, J., Wang, B., Tang, T., Lv, L., Ding, Z., Li, Z., Hu, R., Wei, Q., Shen, A., Fu, Y., & Liu, B. (2020). Three-dimensional culture of MSCs produces exosomes with improved yield and enhanced therapeutic efficacy for cisplatin-induced acute kidney injury. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 206. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01719-2>
- Chafe, S. C., Lou, Y., Sceneay, J., Vallejo, M., Hamilton, M. J., McDonald, P. C., Bennewith, K. L., Möller, A., & Dedhar, S. (2015). Carbonic anhydrase IX promotes myeloid-derived suppressor cell mobilization and establishment of a metastatic niche by stimulating G-CSF production. *Cancer Research*, 75(6), 996–1008. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3000>
- Chairoungdua, A., Smith, D. L., Pochard, P., Hull, M., & Caplan, M. J. (2010). Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *The Journal of Cell Biology*, 190(6), 1079–1091. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002049>
- Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews. Cancer*, 2(8), 563–572. <https://doi.org/10.1038/nrc865>
- Christianson, H. C., Svensson, K. J., van Kuppevelt, T. H., Li, J.-P., & Belting, M. (2013). Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(43), 17380–17385. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304266110>
- Colak, S., & Ten Dijke, P. (2017). Targeting TGF- β Signaling in Cancer. *Trends in Cancer*, 3(1), 56–71. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.11.008>
- 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., Garcia-Santos, G., Williams, C., Ararso, Y., Huang, Y., Rodrigues, G., Shen, T. L., ... Lyden, D. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature Cell Biology*, 17(6), 816–826. <https://doi.org/10.1038/ncb3169>
- Desgrosellier, J. S., Barnes, L. A., Shields, D. J., Huang, M., Lau, S. K., Prévost, N., Tarin, D., Shattil, S. J., & Cheresch, D. A. (2009). An integrin $\alpha(v)\beta(3)$ -c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nature Medicine*, 15(10), 1163–1169. <https://doi.org/10.1038/nm.2009>
- Dewidar, B., Meyer, C., Dooley, S., & Meindl-Beinker, A. N. (2019). TGF- β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis-Updated 2019. *Cells*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/cells8111419>
- Dinh, P.-U. C., Paudel, D., Brochu, H., Popowski, K. D., Gracieux, M. C., Cores, J., Huang, K., Hensley, M. T., Harrell, E., Vandergriff, A. C., George, A. K., Barrio, R. T., Hu, S., Allen, T. A., Blackburn, K., Caranasos, T. G., Peng, X., Schnabel, L. V., Adler, K. B., ... Cheng, K. (2020). Inhalation of lung spheroid cell secretome and exosomes promotes lung repair in pulmonary fibrosis. *Nature communications*, 11(1), 1064. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14344-7>

- Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(2), 69–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- Erler, J. T., Bennewith, K. L., Cox, T. R., Lang, G., Bird, D., Koong, A., Le, Q.-T., & Giaccia, A. J. (2009). Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell*, 15(1), 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.11.012>
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 28. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Feng, D., Zhao, W.-L., Ye, Y.-Y., Bai, X.-C., Liu, R.-Q., Chang, L.-F., Zhou, Q., & Sui, S.-F. (2010). Cellular Internalization of Exosomes Occurs Through Phagocytosis. *Traffic*, 11(5), 675–687. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01041.x>
- Fiandaca, M. S., Kapogiannis, D., Mapstone, M., Boxer, A., Eitan, E., Schwartz, J. B., Abner, E. L., Petersen, R. C., Federoff, H. J., Miller, B. L., & Goetzl, E. J. (2015). Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimer's & dementia*, 11(6), 600-7.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.06.008>
- Frampton, A. E., Prado, M. M., Lopez-Jimenez, E., Fajardo-Puerta, A. B., Jawad, Z. A. R., Lawton, P., Giovannetti, E., Habib, N. A., Castellano, L., Stebbing, J., Krell, J., & Jiao, L. R. (2018). Glypican-1 is enriched in circulating-exosomes in pancreatic cancer and correlates with tumor burden. *Oncotarget*, 9(27), 19006–19013. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24873>
- Garcia-Martin, R., Wang, G., Brandão, B. B., Zanutto, T. M., Shah, S., Kumar Patel, S., Schilling, B., & Kahn, C. R. (2022). MicroRNA sequence codes for small extracellular vesicle release and cellular retention. *Nature*, 601(7893), 446–451. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04234-3>
- Gatza, C. E., Oh, S. Y., & Blobel, G. C. (2010). Roles for the type III TGF-beta receptor in human cancer. *Cellular Signalling*, 22(8), 1163–1174. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.01.016>
- Hamidi, H., & Ivaska, J. (2018). Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, 18(9), 533–548. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0038-z>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanks, B. A., Holtzhausen, A., Evans, K. S., Jamieson, R., Gimpel, P., Campbell, O. M., Hector-Greene, M., Sun, L., Tewari, A., George, A., Starr, M., Nixon, A. B., Augustine, C., Beasley, G., Tyler, D. S., Osada, T., Morse, M. A., Ling, L., Lyster, H. K., & Blobel, G. C. (2013). Type III TGF- β receptor downregulation generates an immunotolerant tumor microenvironment. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(9), 3925–3940. <https://doi.org/10.1172/JCI65745>
- Häuselmann, I., Roblek, M., Protsyuk, D., Huck, V., Knopfova, L., Grässle, S., Bauer, A. T., Schneider, S. W., & Borsig, L. (2016). Monocyte Induction of E-Selectin-Mediated Endothelial Activation Releases VE-

- Cadherin Junctions to Promote Tumor Cell Extravasation in the Metastasis Cascade. *Cancer Research*, 76(18), 5302–5312. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0784>
- Hernández García, A. (2018). *Funcionalización de exosomas con las subunidades de integrinas αv y $\beta 5$ mediante la modificación genética de células 293T*. [Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.]. Repositorio Institucional <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/2601>
- Hiratsuka, S., Watanabe, A., Aburatani, H., & Maru, Y. (2006). Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nature Cell Biology*, 8(12), 1369–1375. <https://doi.org/10.1038/ncb1507>
- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T. L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Sotillo, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., ... Lyden, D. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527(7578), 329–335. <https://doi.org/10.1038/nature15756>
- 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., ... Lyden, D. (2020). Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers. *Cell*, 182(4), 1044–1061.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.009>
- Hurley, J. H. (2015). ESCRTs are everywhere. *The EMBO Journal*, 34(19), 2398–2407. <https://doi.org/10.15252/embj.201592484>
- Huynh, L. K., Hipolito, C. J., & Ten Dijke, P. (2019). A Perspective on the Development of TGF- β Inhibitors for Cancer Treatment. *Biomolecules*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/biom9110743>
- Hyenne, V., Apaydin, A., Rodriguez, D., Spiegelhalter, C., Hoff-Yoessle, S., Diem, M., Tak, S., Lefebvre, O., Schwab, Y., Goetz, J. G., & Labouesse, M. (2015). RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion. *The Journal of Cell Biology*, 211(1), 27–37. <https://doi.org/10.1083/jcb.201504136>
- Izco, M., Blesa, J., Schleef, M., Schmeer, M., Porcari, R., Al-Shawi, R., Ellmerich, S., de Toro, M., Gardiner, C., Seow, Y., Reinares-Sebastian, A., Forcen, R., Simons, J. P., Bellotti, V., Cooper, J. M., & Alvarez-Erviti, L. (2019). Systemic Exosomal Delivery of shRNA Minicircles Prevents Parkinsonian Pathology. *Molecular Therapy*, 27(12), 2111–2122. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.08.010>
- Jacquemet, G., Green, D. M., Bridgewater, R. E., von Kriegsheim, A., Humphries, M. J., Norman, J. C., & Caswell, P. T. (2013). RCP-driven $\alpha 5 \beta 1$ recycling suppresses Rac and promotes RhoA activity via the RacGAP1-IQGAP1 complex. *The Journal of Cell Biology*, 202(6), 917–935. <https://doi.org/10.1083/jcb.201302041>
- Kahlert, C., Melo, S. A., Protopopov, A., Tang, J., Seth, S., Koch, M., Zhang, J., Weitz, J., Chin, L., Futreal, A., & Kalluri, R. (2014). Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(7), 3869–3875. <https://doi.org/10.1074/jbc.C113.532267>
- Kalani, A., & Chaturvedi, P. (2017). Curcumin-primed and curcumin-loaded exosomes: potential neural therapy. *Neural Regeneration Research*, 12(2), 205–206. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.200799>

- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478). <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- Kamerkar, S., LeBleu, V. S., Sugimoto, H., Yang, S., Ruivo, C. F., Melo, S. A., Lee, J. J., & Kalluri, R. (2017). Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*, 546(7659), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature22341>
- Kanninen, K. M., Bister, N., Koistinaho, J., & Malm, T. (2016). Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1862(3), 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.09.020>
- 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., ... Lyden, D. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438(7069), 820–827. <https://doi.org/10.1038/nature04186>
- Kelley, R. K., Gane, E., Assenat, E., Siebler, J., Galle, P. R., Merle, P., Hourmand, I. O., Cleverly, A., Zhao, Y., Gueorguieva, I., Lahn, M., Faivre, S., Benhadji, K. A., & Giannelli, G. (2019). A Phase 2 Study of Galunisertib (TGF- β 1 Receptor Type I Inhibitor) and Sorafenib in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 10(7), e00056. <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000056>
- Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Mahajan, V., Deygen, I., Klyachko, N. L., Inskoe, E., Piroyan, A., Sokolsky, M., Okolie, O., Hingtgen, S. D., Kabanov, A. V., & Batrakova, E. V. (2016). Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine*, 12(3), 655–664. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.012>
- Kink, J. A., Bellio, M. A., Forsberg, M. H., Lobo, A., Thickens, A. S., Lewis, B. M., Ong, I. M., Khan, A., Capitini, C. M., & Hematti, P. (2024). Large-scale bioreactor production of extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells for treatment of acute radiation syndrome. *Stem Cell Research & Therapy*, 15(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03688-2>
- Knowles, L. M., Gurski, L. A., Engel, C., Gnarr, J. R., Maranchie, J. K., & Pilch, J. (2013). Integrin $\alpha v \beta 3$ and fibronectin upregulate Slug in cancer cells to promote clot invasion and metastasis. *Cancer Research*, 73(20), 6175–6184. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0602>
- Kojima, R., Bojar, D., Rizzi, G., Hamri, G. C.-E., El-Baba, M. D., Saxena, P., Ausländer, S., Tan, K. R., & Fussenegger, M. (2018). Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment. *Nature Communications*, 9(1), 1305. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03733-8>
- Kovacs, R. J., Maldonado, G., Azaro, A., Fernández, M. S., Romero, F. L., Sepulveda-Sánchez, J. M., Corretti, M., Carducci, M., Dolan, M., Gueorguieva, I., Cleverly, A. L., Pillay, N. S., Baselga, J., & Lahn, M. M. (2015). Cardiac Safety of TGF- β Receptor I Kinase Inhibitor LY2157299 Monohydrate in Cancer Patients in a First-in-Human Dose Study. *Cardiovascular Toxicology*, 15(4), 309–323. <https://doi.org/10.1007/s12012-014-9297-4>
- Kuwabara, Y., Ono, K., Horie, T., Nishi, H., Nagao, K., Kinoshita, M., Watanabe, S., Baba, O., Kojima, Y., Shizuta, S., Imai, M., Tamura, T., Kita, T., & Kimura, T. (2011). Increased microRNA-1 and microRNA-

- 133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circulation. Cardiovascular Genetics*, 4(4), 446–454. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.110.958975>
- Labelle, M., Begum, S., & Hynes, R. O. (2011). Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell*, 20(5), 576–590. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.009>
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 168(4), 670–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>
- Iavarone, A., & Massagué, J. (1997). Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF- β in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature*, 387(6631), 417–422. <https://doi.org/10.1038/387417a0>
- Li, J., Chen, X., Yi, J., Liu, Y., Li, D., Wang, J., Hou, D., Jiang, X., Zhang, J., Wang, J., Zen, K., Yang, F., Zhang, C.-Y., & Zhang, Y. (2016). Identification and Characterization of 293T Cell-Derived Exosomes by Profiling the Protein, mRNA and MicroRNA Components. *PLoS ONE*, 11(9), e0163043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163043>
- Liang, Y., Duan, L., Lu, J., & Xia, J. (2021). Engineering exosomes for targeted drug delivery. *Theranostics*, 11(7), 3183–3195. <https://doi.org/10.7150/thno.52570>
- Lin, X.-L., Liu, M., Liu, Y., Hu, H., Pan, Y., Zou, W., Fan, X., & 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), 129–136. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3228>
- Liu, S., Ren, J., & Ten Dijke, P. (2021). Targeting TGF β signal transduction for cancer therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00436-9>
- Liu, Y., & Cao, X. (2016). Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell*, 30(5), 668–681. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.011>
- Lorusso, G., & Rüegg, C. (2012). New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, 22(3), 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.03.007>
- Ma, Y., Sun, L., Zhang, J., Chiang, C.-L., Pan, J., Wang, X., Kwak, K. J., Li, H., Zhao, R., Rima, X. Y., Zhang, C., Zhang, A., Liu, Y., He, Z., Hansford, D., Reategui, E., Liu, C., Lee, A. S., Yuan, Y., & Lee, L. J. (2023). Exosomal mRNAs for Angiogenic-Osteogenic Coupled Bone Repair. *Advanced Science*, 10(33), e2302622. <https://doi.org/10.1002/advs.202302622>
- Malladi, S., Macalinao, D. G., Jin, X., He, L., Basnet, H., Zou, Y., de Stanchina, E., & Massagué, J. (2016). Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT. *Cell*, 165(1), 45–60. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.025>
- Marconi, G. D., Fonticoli, L., Rajan, T. S., Pierdomenico, S. D., Trubiani, O., Pizzicannella, J., & Diomedea, F. (2021). Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): The Type-2 EMT in Wound Healing, Tissue Regeneration and Organ Fibrosis. *Cells*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/cells10071587>
- Massagué, J. (2008). TGF β in Cancer. *Cell*, 134(2), 215–230. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>

- Massagué, J., & Obenauf, A. C. (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, 529(7586), 298–306. <https://doi.org/10.1038/nature17038>
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, 21(1), 9–17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
- McAllister, S. S., & Weinberg, R. A. (2014). The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nature Cell Biology*, 16(8), 717–727. <https://doi.org/10.1038/ncb3015>
- Melisi, D., Garcia-Carbonero, R., Macarulla, T., Pezet, D., Deplanque, G., Fuchs, M., Trojan, J., Oettle, H., Kozloff, M., Cleverly, A., Smith, C., Estrem, S. T., Gueorguieva, I., Lahn, M. M. F., Blunt, A., Benhadji, K. A., & Tabernero, J. (2018). Galunisertib plus gemcitabine vs. gemcitabine for first-line treatment of patients with unresectable pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, 119(10), 1208–1214. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0246-z>
- Mendoza, V., Vilchis-Landeros, M. M., Mendoza-Hernández, G., Huang, T., Villareal, M. M., Hinck, A. P., López-Casillas, F., Montiel, J. L. (2009). Betaglycan has two independent domains required for high affinity TGF- β binding: proteolytic cleavage separates the domains and inactivates the neutralizing activity of the soluble receptor. *Biochemistry*, 48(49), 11755–11765. <https://doi.org/10.1021/bi901528w>
- Mezu-Ndubuisi, O. J., & Maheshwari, A. (2021). The role of integrins in inflammation and angiogenesis. *Pediatric Research*, 89(7), 1619–1626. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-01177-9>
- Mitra, A. K., Sawada, K., Tiwari, P., Mui, K., Gwin, K., & Lengyel, E. (2011). Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and $\alpha(5)\beta(1)$ -integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene*, 30(13), 1566–1576. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.532>
- Mizuno, N., Kato, Y., Izumi, Y., Irimura, T., & Sugiyama, Y. (1998). Importance of hepatic first-pass removal in metastasis of colon carcinoma cells. *Journal of Hepatology*, 28(5), 865–877. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(98\)80238-9](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(98)80238-9)
- Morris, J. C., Tan, A. R., Olencki, T. E., Shapiro, G. I., Dezube, B. J., Reiss, M., Hsu, F. J., Berzofsky, J. A., & Lawrence, D. P. (2014). Phase I study of GC1008 (fresolimumab): a human anti-transforming growth factor-beta (TGF β) monoclonal antibody in patients with advanced malignant melanoma or renal cell carcinoma. *PLoS ONE*, 9(3), e90353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090353>
- Muraoka, R. S., Dumont, N., Ritter, C. A., Dugger, T. C., Brantley, D. M., Chen, J., Easterly, E., Roebuck, L. R., Ryan, S., Gotwals, P. J., Kotliansky, V., & Arteaga, C. L. (2002). Blockade of TGF- β inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *The Journal of clinical investigation*, 109(12), 1551–1559. <https://doi.org/10.1172/JCI15234>
- Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives. *The International Journal of Developmental Biology*, 53(8–10), 1541–1547. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072410mn>
- Olvera Felix, E. G. (2023). *Neutralización del TGF- β con betaglicano soluble mediante exosomas en un modelo de nicho pre-metastásico hepático*. [Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación

Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.]. Repositorio Institucional <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3838>

- Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C. F., Schauer, K., Hume, A. N., Freitas, R. P., Goud, B., Benaroch, P., Hacohen, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M. C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L. F., & Thery, C. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature Cell Biology*, 12(1), 19–30. <https://doi.org/10.1038/ncb2000>
- Paget, S. (1989). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Review*, 8(2), 98–101. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2673568>
- Paul, N. R., Allen, J. L., Chapman, A., Morlan-Mairal, M., Zindy, E., Jacquemet, G., Fernandez del Ama, L., Ferizovic, N., Green, D. M., Howe, J. D., Ehler, E., Hurlstone, A., & Caswell, P. T. (2015). $\alpha 5 \beta 1$ integrin recycling promotes Arp2/3-independent cancer cell invasion via the formin FHOD3. *The Journal of Cell Biology*, 210(6), 1013–1031. <https://doi.org/10.1083/jcb.201502040>
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B. A., Callahan, M. K., Yuan, J., Martins, V. R., Skog, J., Kaplan, R. N., ... Lyden, D. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine*, 18(6), 883–891. <https://doi.org/10.1038/nm.2753>
- Pi, F., Binzel, D. W., Lee, T. J., Li, Z., Sun, M., Rychahou, P., Li, H., Haque, F., Wang, S., Croce, C. M., Guo, B., Evers, B. M., & Guo, P. (2018). Nanoparticle orientation to control RNA loading and ligand display on extracellular vesicles for cancer regression. *Nature Nanotechnology*, 13(1), 82–89. <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0012-z>
- Popowski, K. D., Moatti, A., Scull, G., Silkstone, D., Lutz, H., López de Juan Abad, B., George, A., Belcher, E., Zhu, D., Mei, X., Cheng, X., Cisko, M., Ghodsi, A., Cai, Y., Huang, K., Li, J., Brown, A. C., Greenbaum, A., Dinh, P.-U. C., & Cheng, K. (2022). Inhalable dry powder mRNA vaccines based on extracellular vesicles. *Matter*, 5(9), 2960–2974. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2022.06.012>
- Ramirez, N. E., Zhang, Z., Madamanchi, A., Boyd, K. L., O'Rear, L. D., Nashabi, A., Li, Z., Dupont, W. D., Zijlstra, A., & Zutter, M. M. (2011). The $\alpha 2 \beta 1$ integrin is a metastasis suppressor in mouse models and human cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(1), 226–237. <https://doi.org/10.1172/JCI42328>
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(3), 1161–1172. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
- Ravindranath, A. K., Kaur, S., Wernyj, R. P., Kumaran, M. N., Miletti-Gonzalez, K. E., Chan, R., Lim, E., Madura, K., & Rodriguez-Rodriguez, L. (2015). CD44 promotes multi-drug resistance by protecting P-glycoprotein from FBXO21-mediated ubiquitination. *Oncotarget*, 6(28), 26308–26321. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4763>
- Ren, B., Cui, M., Yang, G., Wang, H., Feng, M., You, L., & Zhao, Y. (2018). Tumor microenvironment participates in metastasis of pancreatic cancer. *Molecular Cancer*, 17(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0858-1>

- Rezaie, J., Fegghi, M., & Etemadi, T. (2022). A review on exosomes application in clinical trials: perspective, questions, and challenges. *Cell Communication and Signaling*, 20(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00959-4>
- Rosas, L. E., Elgamal, O. A., Mo, X., Phelps, M. A., Schmittgen, T. D., & Papenfuss, T. L. (2016). In vitro immunotoxicity assessment of culture-derived extracellular vesicles in human monocytes. *Journal of Immunotoxicology*, 13(5), 652–665. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2016.1148089>
- Sadeghi, S., Tehrani, F. R., Tahmasebi, S., Shafiee, A., & Hashemi, S. M. (2023). Exosome engineering in cell therapy and drug delivery. *Inflammopharmacology*, 31(1), 145–169. <https://doi.org/10.1007/s10787-022-01115-7>
- Salehi, M., & Sharifi, M. (2018). Exosomal miRNAs as novel cancer biomarkers: Challenges and opportunities. *J Cell Physiol*, 233(9), 6370–6380. <https://doi.org/10.1002/jcp.26481>
- Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L., & Sabatini, D. M. (2008). The Rag GTPases Bind Raptor and Mediate Amino Acid Signaling to mTORC1. *Science*, 320(5882), 1496–1501. <https://doi.org/10.1126/science.1157535>
- Sánchez, C. A., Andahur, E. I., Valenzuela, R., Castellón, E. A., Fullá, J. A., Ramos, C. G., & Triviño, J. C. (2016). Exosomes from bulk and stem cells from human prostate cancer have a differential microRNA content that contributes cooperatively over local and pre-metastatic niche. *Oncotarget*, 7(4), 3993–4008. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6540>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Seubert, B., Grunwald, B., Kobuch, J., Cui, H., Schelter, F., Schaten, S., Siveke, J. T., Lim, N. H., Nagase, H., Simonavicius, N., Heikenwalder, M., Reinheckel, T., Sleeman, J. P., Janssen, K. P., Knolle, P. A., & Kruger, A. (2015). Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 creates a premetastatic niche in the liver through SDF-1/CXCR4-dependent neutrophil recruitment in mice. *Hepatology*, 61(1), 238–248. <https://doi.org/10.1002/hep.27378>
- Sharma, R., Huang, X., Brekken, R. A., & Schroit, A. J. (2017). Detection of phosphatidylserine-positive exosomes for the diagnosis of early-stage malignancies. *British Journal of Cancer*, 117(4), 545–552. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.183>
- Shtam, T. A., Kovalev, R. A., Varfolomeeva, E. Y., Makarov, E. M., Kil, Y. V., & Filatov, M. V. (2013). Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells in vitro. *Cell Communication and Signaling*, 11, 88. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-88>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*, 69(1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Simhadri, V. R., Reiners, K. S., Hansen, H. P., Topolar, D., Simhadri, V. L., Nohroudi, K., Kufer, T. A., Engert, A., & Pogge von Strandmann, E. (2008). Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS ONE*, 3(10), e3377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003377>

- Skryabin, G. O., Komelkov, A. V., Savelyeva, E. E., & Tchevkina, E. M. (2020). Lipid Rafts in Exosome Biogenesis. *Biochemistry (Moscow)*, 85(2), 177–191. <https://doi.org/10.1134/S0006297920020054>
- Spiegel, A., Brooks, M. W., Houshyar, S., Reinhardt, F., Ardolino, M., Fessler, E., Chen, M. B., Krall, J. A., DeCock, J., Zervantonakis, I. K., Iannello, A., Iwamoto, Y., Cortez-Retamozo, V., Kamm, R. D., Pittet, M. J., Raulet, D. H., & Weinberg, R. A. (2016). Neutrophils Suppress Intraluminal NK Cell-Mediated Tumor Cell Clearance and Enhance Extravasation of Disseminated Carcinoma Cells. *Cancer Discovery*, 6(6), 630–649. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1157>
- Stegner, D., Dütting, S., & Nieswandt, B. (2014). Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis. *Thrombosis Research*, 133, S149–57. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(14\)50025-4](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(14)50025-4)
- Stewart, S. A., Dykxhoorn, D. M., Palliser, D., Mizuno, H., Yu, E. Y., An, D. S., Sabatini, D. M., Chen, I. S. Y., Hahn, W. C., Sharp, P. A., Weinberg, R. A., & Novina, C. D. (2003). Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA*, 9(4), 493–501. <https://doi.org/10.1261/rna.2192803>
- Stoletov, K., Kato, H., Zardoujian, E., Kelber, J., Yang, J., Shattil, S., & Klemke, R. (2010). Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 13), 2332–2341. <https://doi.org/10.1242/jcs.069443>
- Subhan, M. A., & Torchilin, V. P. (2019). Efficient nanocarriers of siRNA therapeutics for cancer treatment. *Translational Research*, 214, 62–91. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.07.006>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Syed, V. (2016). TGF- β Signaling in Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(6), 1279–1287. <https://doi.org/10.1002/jcb.25496>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J.-M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Thiels, C. A., & D'Angelica, M. I. (2020). Hepatic artery infusion pumps. *Journal of Surgical Oncology*, 122(1), 70–77. <https://doi.org/10.1002/jso.25913>
- Tian, T., Zhang, H.-X., He, C.-P., Fan, S., Zhu, Y.-L., Qi, C., Huang, N.-P., Xiao, Z.-D., Lu, Z.-H., Tannous, B. A., & Gao, J. (2018). Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy. *Biomaterials*, 150, 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.012>
- Tien, Y. W., Wu, Y. M., Lin, W. C., Lee, H. S., & Lee, P. H. (2009). Pancreatic carcinoma cells stimulate proliferation and matrix synthesis of hepatic stellate cells. *Journal of Hepatology*, 51(2), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.03.016>
- Tolcher, A. W., Berlin, J. D., Cosaert, J., Kauh, J., Chan, E., Piha-Paul, S. A., Amaya, A., Tang, S., Driscoll, K., Kimbung, R., Kambhampati, S. R. P., Gueorguieva, I., & Hong, D. S. (2017). A phase 1 study of anti-

- TGF β receptor type-II monoclonal antibody LY3022859 in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 79(4), 673–680. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3245-5>
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319(5867), 1244–1247. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>
- Truong, H. H., Xiong, J., Ghotra, V. P. S., Nirmala, E., Haazen, L., Le Dévédec, S. E., Balcioglu, H. E., He, S., Snaar-Jagalska, B. E., Vreugdenhil, E., Meerman, J. H. N., van de Water, B., & Danen, E. H. J. (2014). β 1 integrin inhibition elicits a prometastatic switch through the TGF β -miR-200-ZEB network in E-cadherin-positive triple-negative breast cancer. *Science Signaling*, 7(312), ra15. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004751>
- Trusolino, L., Bertotti, A., & Comoglio, P. M. (2001). A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell*, 107(5), 643–654. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00567-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00567-0)
- 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., & Pawlik, T. M. (2021). Liver metastases. *Nature Reviews. Disease Primers*, 7(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00261-6>
- Tuomi, S., Mai, A., Nevo, J., Laine, J. O., Vilkkii, V., Ohman, T. J., Gahmberg, C. G., Parker, P. J., & Ivaska, J. (2009). PKCepsilon regulation of an alpha5 integrin-ZO-1 complex controls lamellae formation in migrating cancer cells. *Science Signaling*, 2(77), ra32. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000135>
- Valkama, A. J., Leinonen, H. M., Lipponen, E. M., Turkki, V., Malinen, J., Heikura, T., Ylä-Herttuala, S., & Lesch, H. P. (2018). Optimization of lentiviral vector production for scale-up in fixed-bed bioreactor. *Gene Therapy*, 25(1), 39–46. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.91>
- van Deventer, H. W., Palmieri, D. A., Wu, Q. P., McCook, E. C., & Serody, J. S. (2013). Circulating fibrocytes prepare the lung for cancer metastasis by recruiting Ly-6C⁺ monocytes via CCL2. *Journal of Immunology*, 190(9), 4861–4867. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202857>
- van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M. S., Rubinstein, E., & Raposo, G. (2011). The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Developmental Cell*, 21(4), 708–721. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.019>
- van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 19(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Villareal, M. M., Kim, S. K., Barron, L., Kodali, R., Baardsnes, J., Krzysiak, T. C., Henen, M. A., Pakhomova, O., Mendoza, V., O'Connor-McCourt, M., Lafer, E. M., López-Casillas, F., Hinck, A. P. (2016). Binding Properties of the Transforming Growth Factor- β Coreceptor Betaglycan: Proposed Mechanism for Potentiation of Receptor Complex Assembly and Signaling. *Biochemistry*, 55(49), 6880–6896. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00566>
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D. J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F.

- (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications*, 4, 2980. <https://doi.org/10.1038/ncomms3980>
- Wang, H., Fu, W., Im, J. H., Zhou, Z., Santoro, S. A., Iyer, V., DiPersio, C. M., Yu, Q.-C., Quaranta, V., Al-Mehdi, A., & Muschel, R. J. (2004). Tumor cell $\alpha 3 \beta 1$ integrin and vascular laminin-5 mediate pulmonary arrest and metastasis. *The Journal of Cell Biology*, 164(6), 935–941. <https://doi.org/10.1083/jcb.200309112>
- Weng, Z., Zhang, B., Wu, C., Yu, F., Han, B., Li, B., & Li, L. (2021). Therapeutic roles of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1), 136. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01141-y>
- Wieteska, L., Taylor, A. B., Punch, E., Coleman, J. A., Conway, I.O., Lin, Y., Byeon, C., Hinck, C. S., Krzysiak, T., Ishima, R., López-Casillas, F., Cherepanov, P., Bernard, D. J., Hill, C. S. (2025). Structures of TGF- β with betaglycan and signaling receptors reveal mechanisms of complex assembly and signaling. *Nature Communications*, 16, 1778. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-56796-9>
- White, D. E., Kurpios, N. A., Zuo, D., Hassell, J. A., Blaess, S., Mueller, U., & Muller, W. J. (2004). Targeted disruption of $\beta 1$ -integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction. *Cancer Cell*, 6(2), 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.025>
- Xu, J., Acharya, S., Sahin, O., Zhang, Q., Saito, Y., Yao, J., Wang, H., Li, P., Zhang, L., Lowery, F. J., Kuo, W.-L., Xiao, Y., Ensor, J., Sahin, A. A., Zhang, X. H.-F., Hung, M.-C., Zhang, J. D., & Yu, D. (2015). 14-3-3 ζ turns TGF- β 's function from tumor suppressor to metastasis promoter in breast cancer by contextual changes of Smad partners from p53 to Gli2. *Cancer Cell*, 27(2), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.025>
- Yamamoto, M., Kikuchi, H., Ohta, M., Kawabata, T., Hiramatsu, Y., Kondo, K., Baba, M., Kamiya, K., Tanaka, T., Kitagawa, M., & Konno, H. (2008). TSU68 prevents liver metastasis of colon cancer xenografts by modulating the premetastatic niche. *Cancer Research*, 68(23), 9754–9762. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1748>
- Yang, X., Boehm, J. S., Yang, X., Salehi-Ashtiani, K., Hao, T., Shen, Y., Lubonja, R., Thomas, S. R., Alkan, O., Bhimdi, T., Green, T. M., Johannessen, C. M., Silver, S. J., Nguyen, C., Murray, R. R., Hieronymus, H., Balcha, D., Fan, C., Lin, C., ... Root, D. E. (2011). A public genome-scale lentiviral expression library of human ORFs. *Nature Methods*, 8(8), 659–661. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1638>
- Yang, Z., Shi, J., Xie, J., Wang, Y., Sun, J., Liu, T., Zhao, Y., Zhao, X., Wang, X., Ma, Y., Malkoc, V., Chiang, C., Deng, W., Chen, Y., Fu, Y., Kwak, K. J., Fan, Y., Kang, C., Yin, C., ... Lee, L. J. (2020). Large-scale generation of functional mRNA-encapsulating exosomes via cellular nanoporation. *Nature Biomedical Engineering*, 4(1), 69–83. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0485-1>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Zhang, L., Zhang, S., Yao, J., Lowery, F. J., Zhang, Q., Huang, W.-C., Li, P., Li, M., Wang, X., Zhang, C., Wang, H., Ellis, K., Cheerathodi, M., McCarty, J. H., Palmieri, D., Saunus, J., Lakhani, S., Huang, S., Sahin, A. A., ... Yu, D. (2015). Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature*, 527(7576), 100–104. <https://doi.org/10.1038/nature15376>

- Zhang, Y., Hu, Y. W., Zheng, L., & Wang, Q. (2017). Characteristics and Roles of Exosomes in Cardiovascular Disease. *DNA and Cell Biology*, 36(3), 202–211. <https://doi.org/10.1089/dna.2016.3496>
- Zhang, Y., & Wang, X. F. (2015). A niche role for cancer exosomes in metastasis. *Nature Cell Biology*, 17(6), 709–711. <https://doi.org/10.1038/ncb3181>
- Zhou, Y., Yuan, Y., Liu, M., Hu, X., Quan, Y., & Chen, X. (2019). Tumor-specific delivery of KRAS siRNA with iRGD-exosomes efficiently inhibits tumor growth. *ExRNA*, 1(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s41544-019-0034-9>
- Zhu, X., Badawi, M., Pomeroy, S., Sutaria, D. S., Xie, Z., Baek, A., Jiang, J., Elgamal, O. A., Mo, X., Perle, K. La, Chalmers, J., Schmittgen, T. D., & Phelps, M. A. (2017). Comprehensive toxicity and immunogenicity studies reveal minimal effects in mice following sustained dosing of extracellular vesicles derived from HEK293T cells. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1), 1324730. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1324730>
- Zimmerman, B., Kelly, B., McMillan, B. J., Seegar, T. C. M., Dror, R. O., Kruse, A. C., & Blacklow, S. C. (2016). Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. *Cell*, 167(4), 1041-1051.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.056>
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., & Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature Medicine*, 4(5), 594–600. <https://doi.org/10.1038/nm0598-594>