

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**Unidad Iztapalapa**



**Casa abierta al tiempo**

Efecto de los exosomas derivados de macrófagos sobre la migración de las células de meduloblastoma

**T E S I S**

Que para obtener el grado de  
Maestra en Biología Experimental

**P R E S E N T A**

Itzel Jovana Morales Hernández

**Comité de Tutores:**

Co-Directora Externa: Dra. Ma. de Lourdes Álvarez Arellano

Co-Directora Externa: Dra. Beatriz Gómez González

Asesor Externo: Dr. Fausto Sánchez Muñoz

2021

**El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad**

**Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.**

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 858034.

El presente trabajo fue financiado por CONACYT CB-2015-01-253630 y Secretaria de Salud HIM-2017-09-SSA-1304 y HIM-2016-010-SSA-1225. Fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Neurociencias en el Hospital Infantil Federico Gómez y en el Hospital de Gineco-Obstetricia número 4 del IMSS.

Miembros del comité Tutorial:

**Co-Directora Externa:** Dra. Ma. de Lourdes Álvarez Arellano. Laboratorio de Investigación en Neurociencias Hospital Infantil Federico Gómez.

malvarez@himfg.edu.mx

**Co-Directora Interna:** Dra. Beatriz Gómez González.

Profesor Titular C, Área de neurociencias, Dpto. de Biología de la Reproducción, laboratorio de neuropsicobiología. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

bgomezglez@gmail.com & bgomez@xanum.uam.mx

**Asesor Externo:** Dr. Fausto Sánchez Muñoz

Investigador en Ciencias Médicas nivel "D". Dpto de Inmunología Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

fausto22@yahoo.com

## Declaración de originalidad

La que suscribe \_\_\_\_\_ Itzel Jovana Morales Hernández \_\_\_\_\_, alumna del posgrado \_\_\_Biología Experimental\_\_\_, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: “\_\_\_\_\_Efecto de los exosomas derivados de macrófagos sobre la migración de las células de meduloblastoma\_\_\_\_\_”

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante \_\_\_el honorable jurado\_\_\_\_\_ para lo obtención del grado de \_\_\_\_\_Maestra\_\_\_\_\_ es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el \_\_5\_\_ de \_\_junio\_\_\_\_\_ del 2021\_\_.

Atentamente



Itzel Jovana Morales Hernández

Nombre y firma del alumno

## CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 5 de Junio de 2021

Comisión Académica del Posgrado

\_\_en Biología Experimental\_\_

Presente

La que suscribe Itzel Jovana Morales Hernández alumna con número de matrícula \_\_\_\_\_2183801561\_\_\_\_\_, del posgrado \_\_\_\_Biología Experimental\_\_\_\_\_ de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación \_\_“Efectos de los exosomas derivados de macrófagos sobre la migración de las células de meduloblastoma”\_\_ a desarrollar en \_el hospital infantil de México Federico Gómez\_, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.



\_\_\_\_\_Itzel Jovana Morales Hernández\_\_\_\_\_

Nombre completo y firma autógrafa\*

## MIEMBROS DEL JURADO



---

Presidente Dr. Julio Cesar Pérez  
Almanza



---

Secretario Dr. Fausto Sánchez Muñoz



---

Vocal Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo



---

Vocal Dra. Roxana Uri Miranda Labra



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00228

Matricula: 2183801561

Efecto de los exosomas derivados de macrófagos sobre las células de meduloblastoma.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 15:00 horas del día 17 del mes de junio del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ  
DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA  
DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO  
DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ITZEL JOVANA MORALES HERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

**APROBAR**

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

ITZEL JOVANA MORALES HERNANDEZ  
ALUMNA

REVISÓ  
  
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS  
  
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE  
  
DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL  
  
DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA

VOCAL  
  
DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO

SECRETARIO  
  
DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella

## **Agradecimientos**

En primera instancia quiero agradecer a mis padres y a mi hermano por apoyarme en todo momento, que a pesar de que a mis padres a veces les costaba entender lo que hago, siempre estaban alentándome a seguir adelante con sus consejos que me daban y brindándome su compañía cuando más lo necesitaba. A mi hermano por ayudarme a relajarme en momentos de estrés viendo películas y por hacerme reír.

De igual forma quiero agradecerle a mi novio (casi esposo) Roberto por estar siempre a mi lado, y por compartir su vida conmigo. Si tú no hubieras formado parte de mi vida yo no habría logrado mucho de lo que he hecho hasta ahora. Gracias por alentarme con tus palabras y por hacerme reír en los momentos más difíciles. Tú y Loki ahora son mi nueva familia. También agradezco a la familia Santín-Márquez por darme su apoyo y enseñarme nuevas cosas que no había experimentado.

Por otro lado, quiero agradecer a mis amigos de la maestría, Mara e Israel, por hacer más ligero este proceso con sus buenas pláticas y consejos que me brindaron y por siempre estar ahí cuando los necesitaba.

A otra amiga que quiero agradecer es a Jessica Avilés porque a pesar del tiempo seguimos compartiendo momentos juntas y apoyándonos tanto en situaciones académicas, como personales.

A mis compañeros del laboratorio por haberme apoyado en el transcurso de mi proyecto, en especial a mi compañera y amiga Jessica Alarcón por quedarse conmigo hasta que terminaba mis experimentos en el laboratorio para poder irnos a platicar.



También agradezco a la Dra. Beatriz Gómez González por guiarme en la escritura de la tesis dándome sus consejos y observaciones, así como apoyarme en todo momento durante el proceso final.

Por último quiero agradecer a la Dra. Lourdes por haberme guiado y enseñado durante este proyecto y por ser muy paciente conmigo. Gracias también por compartirme sus consejos. También quiero agradecer al Dr. Pablo por haberme enseñado a mantener correctamente a mis células. Sin su ayuda no hubiera aprendido lo que es tener paciencia con células tan delicadas.

## Resumen

El meduloblastoma es el tumor cerebral maligno más común en niños y constituye el 20% de los tumores cerebrales pediátricos. Se origina en el cerebelo, pero puede extenderse a otras partes del sistema nervioso central. Además de las células tumorales, el meduloblastoma está formado por diferentes células heterogéneas transformadas, lo que hace más complejo su estudio y comprensión. El desarrollo del meduloblastoma tiene lugar en un escenario llamado microambiente tumoral, formado de componentes celulares y no celulares (factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y vesículas extracelulares). La interacción de las células tumorales con otras células como las células endoteliales, fibroblastos, células neuroendocrinas, pericitos y células del sistema inmune infiltradas como los macrófagos ocurre mediante la liberación de diferentes moléculas solubles y de vesículas extracelulares que median la comunicación intercelular. Los exosomas son pequeñas vesículas (<200 nm de diámetro) capaces de promover la progresión del tumor. En este trabajo se evaluó el efecto de los exosomas provenientes de macrófagos en células de meduloblastoma. Se diferenciaron los macrófagos a partir de monocitos de la línea celular THP-1. Una vez diferenciados, se aislaron sus exosomas. Posteriormente, los exosomas fueron caracterizados mediante microscopía electrónica y western blot. Se utilizaron diferentes concentraciones de exosomas 10, 20 y 40  $\mu\text{g/ml}$  para tratar a células de meduloblastoma provenientes de la línea celular DAOY y se observaron sus efectos sobre la migración y la presencia de la molécula de adhesión cadherina E. Observamos que las concentraciones de 10 y 40  $\mu\text{g/ml}$  de exosomas promueven la migración de las células de meduloblastoma en un periodo de 48 horas. Por otro lado, la presencia de

cadherina E se ve alterada por el tratamiento con exosomas, por lo que podemos concluir que los exosomas provenientes de macrófagos promueven la migración de las células de meduloblastoma posiblemente por un cambio en la regulación de la expresión de la proteína cadherina E.

## **Abstract**

Medulloblastoma is the most common malignant brain tumor developed during childhood and it accounts for 20% of total pediatric brain tumors. It is originated in the cerebellum, but it can invade other central nervous system regions. Besides tumoral cells, medulloblastoma is also composed by many groups of heterogeneous transformed cells. Medulloblastoma development is placed in a physical background called tumoral microenvironment, formed by cellular and non-cellular components. The interaction between tumor cells with their surrounding cells is mediated by the secretion of several soluble factors and extracellular vesicles which orchestrate the intercellular communication. Exosomes are small vesicles (<200 nm in diameter) that promote tumor progression. In this project, the effect of macrophage-derived exosomes over medulloblastoma cells was evaluated. Macrophages were differentiated after monocytes from the cell line THP-1. Once differentiated, exosomes were isolated. Then, exosomes were characterized by electron microscopy and western blot. Different concentrations of exosomes were used to treat medulloblastoma cells from the cell line DAOY and the effects on migration and presence of the adhesion molecule E-cadherin were determined.

We have observed that the exosomes concentrations of 10 and 40  $\mu\text{g/ml}$  promoted medulloblastoma cell migration in a time lapse of 48 hrs. On the other hand, the presence of E-cadherin was altered after exosomes treatment, therefore, we could conclude that macrophage-derived exosomes promote medulloblastoma cells migration, possibly by a change in the regulation of E-cadherin expression.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
1.1. Generalidades del cáncer.....	1
1.2. Características del meduloblastoma.....	1
1.3. Clasificación del meduloblastoma.....	3
1.4. Microambiente Tumoral.....	6
1.5. Macrófagos en el microambiente tumoral.....	8
1.6. Exosomas.....	11
1.7. Mecanismos de comunicación intercelular mediado por exosomas .....	14
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>15</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>18</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>18</b>
<b>7. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>19</b>
<b>8. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>8.1 Líneas celulares.....</b>	<b>19</b>
8.1.1. THP-1(ATCC TIB-202).....	19
8.1.2. DAOY (ATTC HTB-186).....	19
8.1.3. Diferenciación de células THP-1 a macrófagos activados.....	20
<b>8.2 Aislamiento de exosomas provenientes de la línea celular monocítica THP-1,         células diferenciadas a macrófagos y de suero fetal bovino.....</b>	<b>20</b>
8.2.1 Caracterización de exosomas mediante microscopía electrónica de transmisión.....	21
8.3 Western Blot.....	21
8.4 Ensayo de migración por estría en monocapa.....	22
8.5 Presencia de Cadherina E en células de meduloblastoma mediante Western Blot.....	23
<b>9. RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
9.1 Diferenciación de las células mononucleares THP-1 a macrófagos y obtención de exosomas derivados de macrófagos.....	23
9.2 Los exosomas derivados de macrófagos (Exo-Mφ) promueven la migración de las células de meduloblastoma.....	26
9.3 Presencia de cadherina E en células de meduloblastoma tratadas con diferentes concentraciones de Exo-Mφ.....	28

<b>10. DISCUSIÓN.....</b>	<b>30</b>
<b>11. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>12. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>32</b>
<b>13. REFERENCIAS.....</b>	<b>33</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Generalidades del cáncer**

El cáncer es una de las causas de muerte más comunes en todo el mundo, siendo un crecimiento anormal y descontrolado de células y tejido que invaden el organismo [1]. Cuando una célula anormal evoluciona progresivamente hasta un estado neoplásico adquiere una serie de características, tales como: autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales de anti-crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión tisular, metástasis, reprogramación metabólica y evasión del sistema inmunológico [2, 3].

La biología de un tumor sólo se puede entender mediante el estudio de las células especializadas que lo conforman [4], así como del microambiente tumoral (TME; por sus siglas en inglés). El microambiente tumoral se conforma por células tumorales, que interactúan con las células circundantes a través de los vasos sanguíneos del tumor, y por las células del sistema inmunológico que inhiben la respuesta inmunitaria antitumoral influyendo en el desarrollo y progresión del cáncer [5, 6].

### **1.2 Características del meduloblastoma**

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) representan la segunda causa de muerte infantil y el tumor sólido más común en niños [7]. Entre ellos se encuentran los gliomas y los tumores embrionarios que representan el 53% y el 20% en niños de 0 a 14 años, respectivamente.

El meduloblastoma (MB) es el tumor embrionario cerebral maligno más común en los niños y constituye el 20% de los tumores cerebrales pediátricos [8]. Es un tumor neuroectodermal primitivo altamente invasivo que se origina en el cerebelo, pero puede extenderse a otras partes del sistema nervioso central (SNC) [9, 10]. Cada año se diagnostican aproximadamente 450 nuevos casos pediátricos con MB [8]. La mayoría ocurre en niños menores de 10 años [11].

El diagnóstico de MB se basa en síntomas clínicos, realización de una resonancia magnética del cerebro y la columna para detectar si hay metástasis macroscópicas, citología del líquido cefalorraquídeo para detectar metástasis microscópicas y un análisis histopatológico y molecular integrado [11].

Los síntomas clínicos pueden ser vómitos, cefalea, náuseas, alteraciones visuales y marcha inestable o torpeza, que puede deberse a un aumento de la presión intracraneal relacionado con la hidrocefalia o un efecto directo del tumor [11].

Las pruebas por imagen son fundamentales para ayudar a determinar la ubicación y el tamaño del tumor cerebral, así como para identificar la presión o el bloqueo de las vías del líquido cefalorraquídeo (LCR) [11, 12]. Una característica del meduloblastoma cuando se realizan las pruebas de imagen es que se observa una masa entre la línea media del vermis que tienden a estar bien contrastados [13].

La extracción del líquido cefalorraquídeo se obtiene mediante punción lumbar y ayuda a detectar a las células tumorales u otras anomalías [13].

Los pacientes con "enfermedad de riesgo promedio" se someten a una resección total o casi total y no tienen evidencia de diseminación en el momento del



diagnóstico, sin embargo los pacientes con "enfermedad de alto riesgo" tienen tumores que se resecan subtotalmente o tienen evidencia de diseminación [11, 13].

La terapia estándar para el MB incluye una resección quirúrgica para extirpar el tumor, acompañada de quimioterapia y, en los pacientes mayores de 3 años irradiación cráneo-espinal (CSI); disminuyendo la tasa de mortandad en un 80% en pacientes de riesgo promedio y un 60% en pacientes de alto riesgo combinando los tratamientos [14]. A pesar de la intervención, se ha descrito que los pacientes que sobreviven padecen deficiencias del desarrollo, psicosociales y neurológicas, debido a los efectos adversos que la radiación y la quimioterapia ejercen en el cerebro en desarrollo, además de tener un mayor riesgo de padecer cáncer por segunda vez con peores resultados [11, 15].

### **1.3 Clasificación del meduloblastoma**

El MB se ha clasificado en al menos cuatro subgrupos moleculares que se identifican de acuerdo a las células que los originan, a su localización, su grado y a su edad de distribución (Fig. 1) [16, 17]. Los cuatro subgrupos son: Wnt, Shh, grupo 3 y grupo 4 [18]. Los grupos Shh, grupo 3 y grupo 4 surgen de células progenitoras cerebelares y pueden llegar a ser mortales en un 40-70% de los casos; mientras que, el subgrupo Wnt surge de células del labio rómbico inferior y tiene mejor pronóstico en comparación a los otros subgrupos [17].

El subgrupo Wnt está caracterizado por una activación constitutiva de la señalización de Wnt debido a una mutación en el gen de la beta-catenina, CTNNB1, que normalmente están destinados a la fosforilación y es la mutación más frecuente en el meduloblastoma [19-21]. El meduloblastoma Wnt surge de

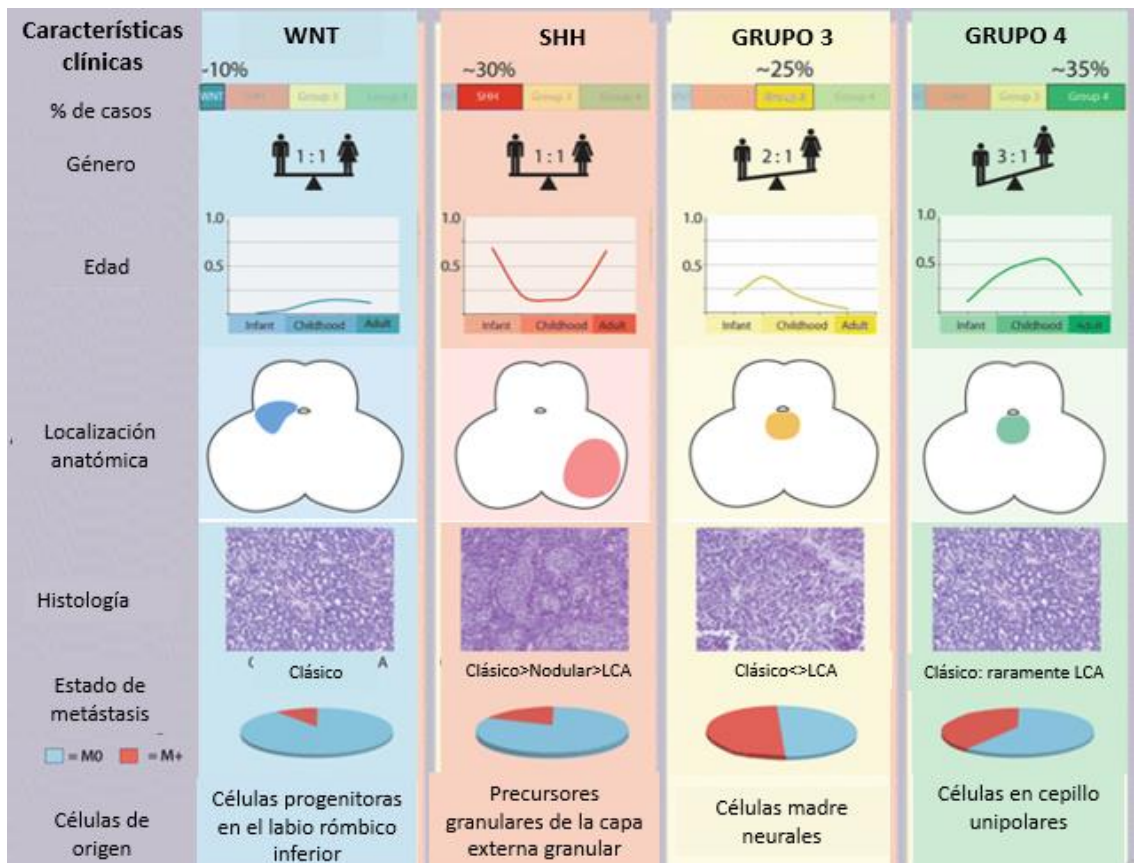
células del labio rómbico inferior, teniendo una forma histológica clásica, es decir, grupo de pequeñas células redondas densamente empaquetadas aunque rara vez también pueden presentar células grandes/anaplásicas [17, 22]. Estos tumores suelen estar ubicados en la línea media del cerebro y ocupando el cuarto ventrículo [23]. Representa el 10% de los casos, teniendo el pronóstico más favorable. Los tumores tipo Wnt generalmente ocurren en niños mayores de 4 años y adolescentes, afectan tanto a hombres como mujeres [24, 25].

El subgrupo Shh se identifica por su activación o mutación en la vía de señalización de Shh, dando lugar así a la nomenclatura Shh [26]. Pueden tener una sobreactivación del ligando Sonic hedgehog a su receptor Patched 1 (PTCH1) o bien contener mutaciones en genes que activan o promueven la señalización Shh como PTCH1, SMO SUFU y amplificaciones de GLI1 y GLI2 [19]. Este tipo de meduloblastoma surge de los precursores de las células granulares del cerebelo, en la capa externa granular del cerebelo e histológicamente las células se encuentran de forma nodular/desmoplásico, es decir, son células redondas con espacios libres y representa el 30% de los meduloblastomas [23, 24]. Los tumores de Shh se localizan en la línea media del cerebro en bebés o en el vermis cerebeloso en adolescentes y adultos [23], este es un subtipo de enfermedad menos tratable ya que mantiene a la barrera hematoencefálica intacta, lo que hace que este tumor sea impermeable y resistente a la quimioterapia [17].

Los subgrupos 3 y 4 son muy heterogéneos y frecuentemente albergan alteraciones genéticas raras; sin embargo aún no se sabe mucho acerca de las vías de señalización implicadas [27]. El subgrupo 3 está caracterizado por una inestabilidad genómica y una alta amplificación del proto-oncogen MYC,

teniendo una supervivencia de 5 años que va entre el 39% y 58%, dependiendo la edad del paciente y el régimen del tratamiento [23, 26]. Es uno de los grupos con el peor pronóstico debido a que el 50% de los tumores son metastásicos al momento de ser diagnosticados [28]. Se cree que el grupo 3 proviene de precursores neuronales de la capa granular externa de la región subventricular y presenta una histología clásica y anaplásica de células grandes. Los tumores del grupo 3 se localizan en la línea media del cerebelo [26].

Por último el subgrupo 4 es el más común de los meduloblastomas (36%), presentando un pronóstico intermedio, similar al del subgrupo Shh [29]. Tiene mutaciones genéticas comunes que incluyen la amplificación de MYCN y CDK6, pero se caracterizan por las deleciones encontradas en el brazo corto del cromosoma 17 en el 66% de los pacientes [23]. Suelen ubicarse entre la línea media del vermis y aunque no se ha establecido su origen definitivamente, se cree que estos tumores parecen tener similitudes transcripcionales con las células en cepillo unipolares [24]. Los pacientes con meduloblastoma del subgrupo 4 que se encuentran en riesgo estándar tienen una tasa de supervivencia que supera el 80%, mientras que los pacientes de alto riesgo tienen una supervivencia del 60% [20].



**Fig.1. Características clínicas de los subgrupos moleculares de meduloblastoma.** Se observan las características clínicas principales para determinar el tipo de meduloblastoma. Tomado y modificado de [24, 30].

#### 1.4. Microambiente Tumoral

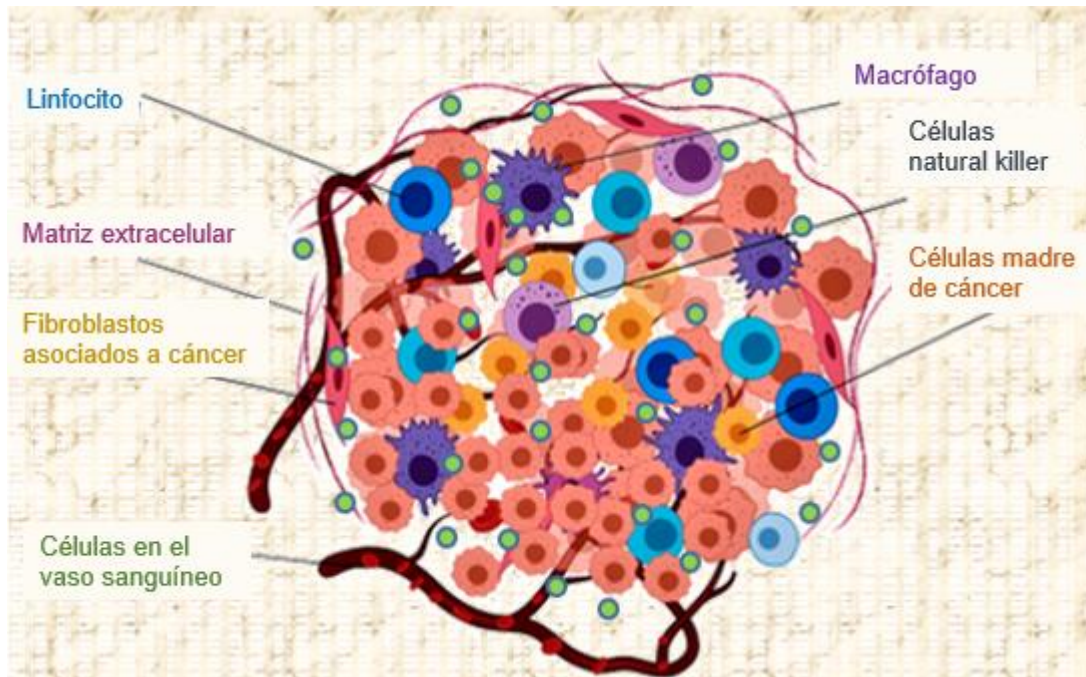
El TME tiene múltiples poblaciones celulares, las células tumorales están rodeadas de células inmunes, células estromales, células endoteliales, vasos sanguíneos, así como de componentes no celulares, incluyendo la matriz extracelular, compuesta de proteoglicanos y ácido hialurónico, y moléculas solubles tales como quimiocinas, citocinas, factores de crecimiento y vesículas extracelulares (Fig. 2 y tabla 1) [31, 32]. Las interacciones entre las células cancerosas y su entorno dentro del TME pueden participar o promover procesos como la evasión inmunitaria, angiogénesis, hipoxia e invasión que determinen la progresión del tumor, provocando que el tumor primario erradique o haga micrometástasis y así tener una mayor resistencia a los tratamientos [33, 34]. A

pesar de que existen estos tipos de células en los tumores cerebrales, existen algunas características importantes que distinguen al cerebro normal de otros tejidos, por ejemplo la composición de la matriz extracelular es diferente pues existen células únicas como la microglía, astrocitos y neuronas que están físicamente protegidas de la inflamación por la barrera hematoencefálica (BHE) [22, 35].

Las células inmunitarias que se infiltran en el tumor pueden representar alrededor del 50% de la masa tumoral como los linfocitos T, leucocitos, macrófagos, células natural killer que pueden apoyar al crecimiento tumoral [36, 37]. Los macrófagos asociados a tumores (TAMs, por sus siglas en inglés) son las células inmunes más abundantes del microambiente tumoral en tumores sólidos debido a que constituyen el 30% de la masa tumoral [35].

Debido al tamaño limitado de muestras de pacientes y los modelos preclínicos, el estado y función del microambiente relacionado con células del sistema inmune sigue siendo muy controvertido, debido a que existe una heterogeneidad del microambiente tumoral entre los diferentes subgrupos de meduloblastoma incluyendo todos los componentes celulares del parénquima cerebral, como las neuronas, los astrocitos y la microglía, que establecen una intercomunicación extensa con las células tumorales del meduloblastoma [26, 38]. Por ejemplo el subgrupo Shh muestra fuertes señales de macrófagos y células T, mientras que el grupo 3 y 4 está enriquecido con el mayor número de linfocitos citotóxicos y células endoteliales [26]. Por otro lado se ha asociado al meduloblastoma Wnt con una BHE que posee una vasculatura aberrante y ampliamente fenestrada que permite la entrada de agentes quimioterapéuticos en el cerebro, teniendo una mejor respuesta al tratamiento, sin embargo el meduloblastoma Shh

presenta una BHE intacta que lo hace ser impermeable a la quimioterapia [35, 39].



**Fig. 2. Ilustración esquemática de los tipos celulares en el microambiente tumoral.** En el microambiente tumoral existen diferentes tipos celulares que están asociados al tumor, como las células estromales, células del sistema inmune, fibroblastos y moléculas solubles. Tomada y modificada de [40].

Células residentes dentro del tumor	Células del sistema inmune infiltradas en el tumor	Componentes no celulares
Células endoteliales, pericitos, células madre mesenquimales, fibroblastos asociados al cáncer, células epiteliales, células madre del cáncer.	Linfocitos B, linfocitos T, células natural killer, macrófagos, células supresores mieloides.	Moléculas de adhesión, citocinas (TNF, TGF- $\beta$ , IL-1, IL-6), quimiocinas (CCL2, CCL5 entre otras) vesículas extracelulares, factores de crecimiento.

**Tabla 1. Principales componentes celulares y no celulares que participan en el microambiente tumoral.**

### 1.5. Macrófagos en el microambiente tumoral

Los macrófagos son células del sistema inmune que juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos y muchos procesos fisiológicos más allá de la inmunidad innata [41]. Participan en la fagocitosis y la eliminación de restos celulares, microorganismos invasores, cuerpos extraños,

y en la reparación y remodelación de tejidos [42]. Los macrófagos se originan de los precursores monocíticos derivados de la médula ósea [4, 41]. Los macrófagos pueden cambiar su fenotipo desde un macrófago no polarizado (M0) a macrófagos polarizados (M1 y M2) en respuesta a las señales del microambiente, mostrando diferente expresión de citocinas, enzimas y marcadores de superficie celular [41, 43].

Los macrófagos polarizados son categorizados en dos subconjuntos: los activados por la vía clásica, denominados M1, y los activados por la vía alternativa denominados M2 [44].

Los macrófagos M1 son activados por ligandos del receptor tipo Toll (como los lipopolisacáridos) y el interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) [41]. Los macrófagos M1 expresan citocinas pro-inflamatorias Th1 como interleucina IL-1 $\beta$ , IL-12 y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y altos niveles de sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS), entre otros [45]. Los macrófagos M1 tienen la función de servir como un componente crítico celular involucrado en la respuesta inflamatoria e inmunidad antitumoral [41]. Por otro lado, los macrófagos M2 expresan citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$ . Están involucrados en procesos como la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos junto con una alta capacidad fagocítica [46]. Son estimulados por la IL-4, IL-13 o por el factor estimulante de colonias de macrófagos 1 (CSF-1). Los macrófagos M2 expresan la arginasa 1, el receptor de manosa CD206 y la cadena  $\alpha$  del receptor IL-4 entre otros (Fig. 3). [43, 45].

La infiltración de macrófagos en tumores sólidos se ve favorecida por la presencia de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas, como la proteína

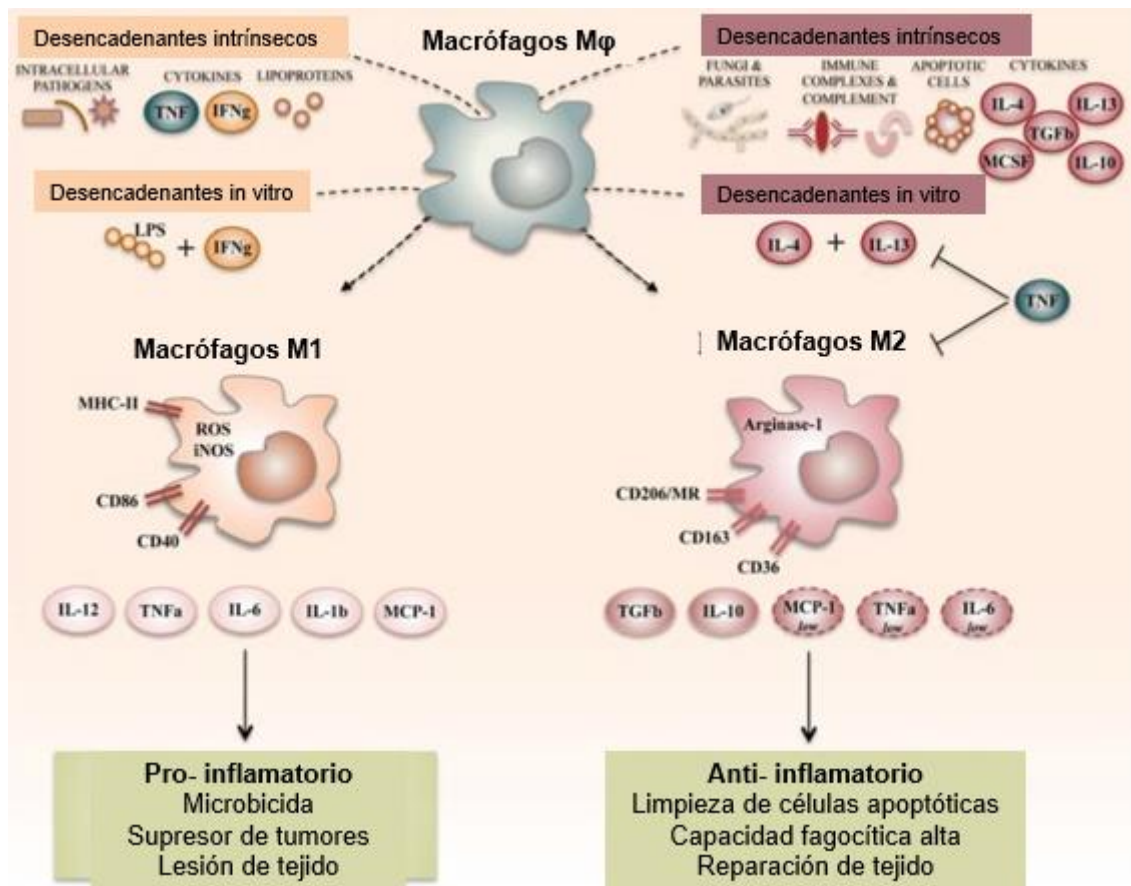
quimioatrayente de monocitos 1 (CCL2 ó MCP-1), y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Los TAMs pueden constituir más del 30% de las células inmunes presentes en el tumor y pueden adoptar diferentes fenotipos funcionales, los M2 presentan una actividad pro-tumoral, por el contrario los M1 presentan un fenotipo antitumoral [47]. Los TAMs son responsables de la aparición de una inflamación latente que evita que las células T y las células *natural killer* (NK) ataquen al tumor [44].

Los TAMs son heterogéneos y pueden sufrir cambios fenotípicos basados en factores microambientales, como la hipoxia, y la cantidad de citocinas que se encuentren en el microambiente. Los TAMs con un fenotipo M1 están relacionados con un mejor efecto antitumoral; mientras que, los TAMs parecidos a M2 facilitan la progresión del tumor, promoviendo la angiogénesis, la proliferación celular y metástasis del tumor. Los TAMs M1 pueden también promover una transformación maligna al inducir una inflamación crónica [43, 46, 48]. Los TAMs son considerados una población radiorresistente del TME, especialmente cuando están polarizados hacia un fenotipo parecido a M2 [47].

En el subgrupo de meduloblastoma shh se ha visto que los TAMs se encuentran más abundantes, aunque su estado de polarización de macrófago M1 y M2 con su correlación en la progresión tumoral aún se sigue investigando [38]. Sin embargo, se ha visto que un alto reclutamiento de macrófagos M1 debido a una señal anormal de IFN- $\gamma$  en el cerebro en desarrollo esta correlacionado con un mal pronóstico en pacientes con meduloblastoma Shh [49].

Existen otros moduladores del microambiente tumoral que probablemente participan en la activación de los macrófagos, que se les denomina vesículas extracelulares, también conocidas como exosomas [46].





**Fig. 3. Principales estados de polarización de los macrófagos.** Para la polarización de macrófagos existen múltiples señales que causan la activación en uno de los dos fenotipos. Los activados por la vía clásica, denominados M1, que son estimulados por patógenos intracelulares, citocinas (TNF y IFN- $\gamma$ ) y lipopolisacáridos (LPS) teniendo una función pro-inflamatoria y los activados por la vía alternativa denominados M2 que se estimulan con citocinas como IL-10, TGF $\beta$ , IL-4 y tienen una función anti-inflamatoria. Tomada y modificada de [40].

### 1.6. Exosomas

Los exosomas son vesículas extracelulares pequeñas con una membrana formada por una bicapa lipídica. Se originan de compartimentos endosomales intracelulares y su rango de tamaño ronda entre los 30 y 200 nm [50]. La fusión de las vesículas endocíticas primarias es el primer paso en la formación de los endosomas tempranos; los cuáles tienen varios cambios a medida que van madurando hasta convertirse en endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares

(MVBs; por sus siglas en inglés) [51]. Durante este proceso, la membrana limitante del endosoma tardío se invagina hasta separarse para formar vesículas cerradas, conocidas como vesículas intraluminales (ILVs; por sus siglas en inglés) dentro de los MVBs. Los MVBs se fusionan con la membrana plasmática y así, liberan al medio extracelular a las vesículas intraluminales. Las vesículas liberadas se denominan exosomas (Fig. 4A) [41, 52, 53].

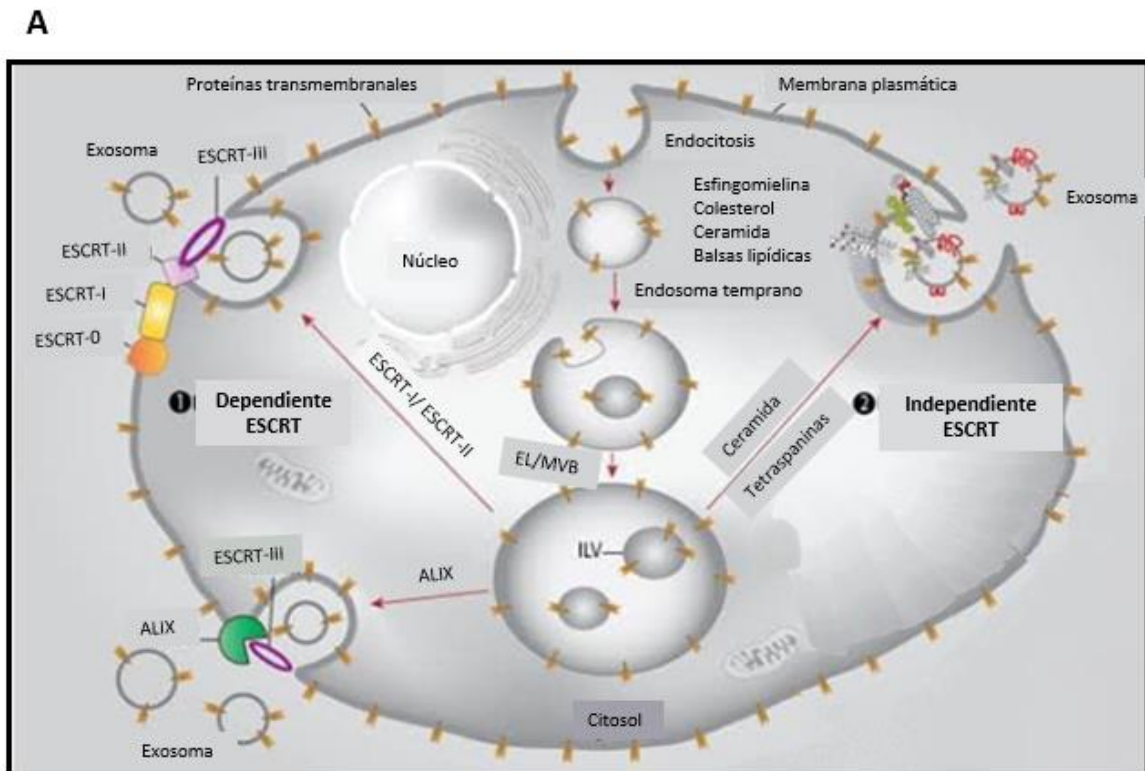
Los MVBs requieren de la función del complejo de clasificación requerido para el transporte (ESCRT, por sus siglas en inglés) y la vía dependiente de ceramidas, además de la coordinación de varias proteínas que se encuentran incorporadas en la membrana invaginada listas para fusionarse nuevamente con la membrana celular y liberar a los exosomas hacia el espacio extracelular [54-56].

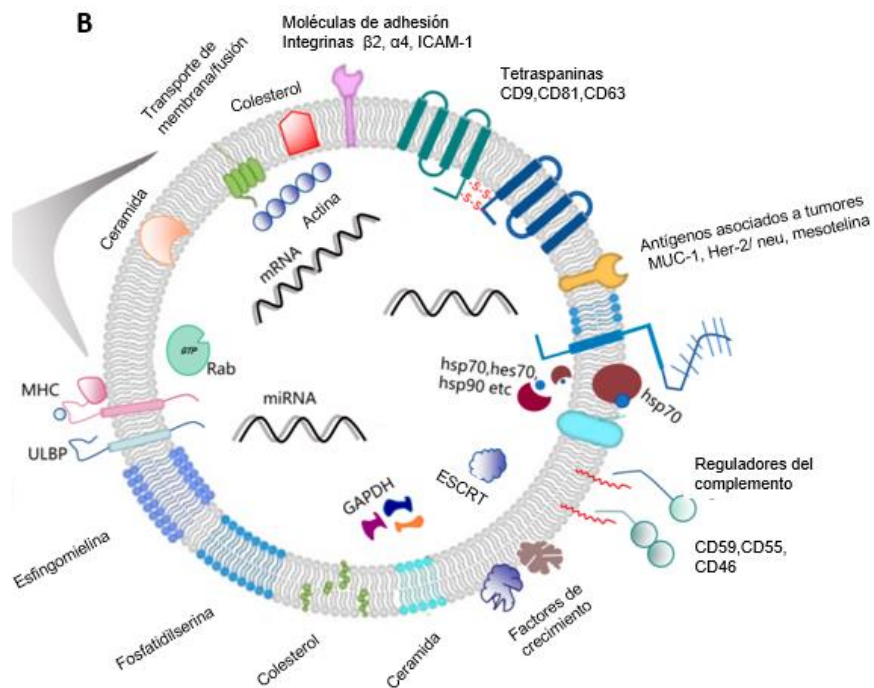
La vía dependiente de ESCRT se subdivide en diferentes grupos; ESCRT0, ESCRTI, ESCRTII, ESCRTIII donde serán reclutadas hacia la membrana endosomal, que implica el reconocimiento de proteínas cargo ubiquitinadas lo que permite su reclutamiento y la invaginación de la membrana endosomal tardía mediada por ESCRTI y ESCRTII [54, 57-59]. El reclutamiento de ESCRTIII hacia el sitio de la invaginación de la membrana ocurre a través de la unión a ESCRTII (debido a la proteína ALIX asociada con TSG101) y conduce a la desubiquitinación de las proteínas cargo, la abscisión de vesículas y, por lo tanto, a la generación de ILV [59].

Por otro lado, en la vía independiente de la activación de ESCRT la ceramida es clave para la formación de la membrana intravesicular de los MVBs [54, 60]. Esta vía requiere de la acción de distintos tipos de lípidos y tetraspaninas [61]. Las proteínas ALIX, sintetina, sindecanos y CD63 se acumulan en los MVBs y forman parte de esta vía independiente, provocando que la ubiquitinación no sea

necesaria [54, 61]. La liberación de los exosomas desde las células es facilitada por la fusión de la membrana limitante de los MVBs con la membrana plasmática, proceso que está regulado por las GTPasas pequeñas de la familia Rab [51, 62].

Los exosomas no sólo reflejan la composición de la célula en la que se originan, sino que también reflejan un mecanismo altamente regulado. El contenido de los exosomas incluye una gran diversidad de macromoléculas como: receptores, factores de transcripción, enzimas, proteínas de matriz extracelular, proteínas transmembranales o citosólicas; lípidos, fragmentos de ADN y ARN (Fig. 4B) [58, 63]. Los exosomas pueden ser liberados por cualquier tipo celular, ya sea células del sistema inmune como mastocitos, células dendríticas, macrófagos, células natural killer, células T, células B, células epiteliales, células tumorales células de tipo neural, células madre entre otras [53].





**Fig. 4. Biogénesis y componentes estructurales de los exosomas.** A) Los exosomas son vesículas de origen endocítico. Después de que la membrana plasmática se invagina, forma un endosoma temprano que posteriormente se agrupan para formar los cuerpos multivesiculares (MVB), donde empieza a brotar su membrana hacia adentro formando las vesículas intraluminales (ILVs). Los MVBs requieren de dos vías diferentes (la vía de ceramidas o la vía dependiente de ESCRT) que permiten fusionarse con la membrana plasmática y liberar a los exosomas hacia el espacio extracelular. B) Los exosomas contienen principalmente proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, así como tetraspaninas en su superficie de membrana. Tomada y modificada de [64, 65].

### 1.7. Mecanismos de comunicación intercelular mediada por exosomas.

Los exosomas son muy importantes en la comunicación intercelular; se sabe que actúan mediante distintos mecanismos, ya sea por medio de la interacción del exosoma con algún receptor, por la endocitosis del exosoma, o por la fusión de la membrana del exosoma con la membrana plasmática de la célula receptora [53]. Los exosomas han sido explorados como un factor clave en la comunicación entre las células tumorales y las células del microambiente tumoral, ya que

pueden promover el desarrollo del tumor, la tumorigénesis, la evasión del sistema inmune, la angiogénesis tumoral, la resistencia a fármacos y la metástasis [66].

La transferencia de proteínas mediada por exosomas entre las células cancerosas y las células estromales contribuye al mantenimiento de un entorno inflamatorio para la progresión del cáncer [67]. Particularmente las vesículas extracelulares pueden ser usadas como biomarcadores en el diagnóstico de cáncer, principalmente de los cánceres pediátricos; sin embargo, poco se ha estudiado el efecto de las vesículas extracelulares provenientes de macrófagos sobre la comunicación celular heterotípica que se lleva a cabo dentro del TME de distintos tumores [68].

## **2. ANTECEDENTES**

Previamente se ha reportado que exosomas derivados de la línea celular D283, que pertenecen al grupo 3 de meduloblastoma, mejoran la capacidad de migración e invasión de la línea celular Daoy que pertenecen al grupo Shh; sin embargo, las células de D283 de meduloblastoma tratadas con exosomas derivados de la línea celular DAOY se vuelven menos agresivas [69].

Por otro lado se reportó que las líneas celulares de meduloblastoma D283MED, DAOY y UW288 liberan exosomas con características físicas y químicas (como el tamaño, la densidad, el contenido de proteínas de choque térmico, la actividad de la acetilcolinesterasa y los puntos isoeléctricos extremadamente básicos) similares con otro tipo de tumores de cerebro. Además, se observó que los exosomas provocaban un aumento en la migración de las células de meduloblastoma con concentraciones de 50 y 500  $\mu\text{g/ml}$ . Este resultado fue de

manera dependiente de la dosis comparado con los exosomas provenientes del suero fetal bovino tomado como control positivo y por las células de meduloblastoma sin ningún tratamiento [70].

A pesar de las investigaciones recientes acerca de las funciones de los exosomas, aún no se conoce su papel en la comunicación entre las células de meduloblastoma y las células del sistema inmune. Estudios previos han reportado la función de los exosomas en otros tipos de cáncer; por ejemplo, se ha reportado que exosomas derivados de la línea celular U251 de células de glioblastoma aumenta la migración e invasión de células troncales mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, indica que los exosomas pueden influir en las MSC provocando que se transformen en células cancerosas malignas [71].

Posteriormente otros colaboradores observaron que los exosomas derivados de macrófagos M2 en células de cáncer colorrectal promueven la migración e invasión de las mismas debido a que muestran altos niveles de expresión de miR-21-5p y miR-155- 5p [64].

En investigaciones recientes utilizaron a las líneas celulares T98 y U251 de glioma y las trataron con exosomas derivados de macrófagos M0, M1 y M2, observando que los exosomas derivados de macrófagos M2 podían promover la migración e invasión de las células de glioma. Una vez que obtuvieron esos resultados analizaron a los miRNAs que se encontraban expresados en los exosomas de M2. Encontraron que miR-15a y miR-92a-3p estaban regulados a la baja, por lo tanto decidieron transfectar esos miRNAs a los exosomas de macrófagos M2 y observaron que miR-15a miR-92a-3p inhibe la migración e invasión de células de glioma a través de la vía de señalización PI3K / AKT /

mTOR [72]. En otro estudio utilizando células de cáncer gástrico para observar el efecto de los exosomas derivados de macrófagos sobre la migración. Encontraron que los exosomas promovían la migración de las células de cáncer gástrico *in vitro* e *in vivo* mediante la apolipoproteína E (ApoE). Esta proteína participa en muchas funciones como el metabolismo de lípidos, transporte de colesterol, reparación de tejido, regulación de la respuesta inmune y en el crecimiento y diferenciación celular [66].

En células de cáncer de colon se observó que los exosomas provenientes de macrófagos M2 promueven la migración e invasión, a través de una regulación negativa de supresores de tumores y de la subunidad del complejo remodelante de cromatina BRG1 (gen 1 relacionado a Braghma) [64]. BRG1 es un componente fundamental de diferentes complejos remodeladores de cromatina conocidos como SWI/SNF, que juegan roles esenciales en una variedad de procesos celulares como la diferenciación, proliferación y reparación del ADN [73].

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los tumores de cerebro son el segundo cáncer pediátrico más común, afectando a más de 100,000 niños en el mundo. La supervivencia de los niños con cáncer de meduloblastoma varía según la histología y las características clínicas [16]. Además, los sobrevivientes de tumores cerebrales infantiles suelen tener graves efectos secundarios por el tratamiento actual [74]. Es por eso que existe una gran necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y la inmunoterapia parece ser una opción prometedora [75]. Para ello es muy importante entender el microambiente tumoral, ya que puede ser clave para diseñar inmunoterapias específicas para el meduloblastoma

Los tumores sólidos comprenden células tumorales, células estromales, células inflamatorias, vasculatura y matriz extracelular que, juntos, forman el microambiente del tumor. El desarrollo del tumor, metástasis y la resistencia al tratamiento con drogas depende de la comunicación entre las células del tumor y su microambiente que puede ser mediado por los exosomas. Por lo tanto, los exosomas son clave para la comunicación intercelular entre las células tumorales y las del microambiente. Sabiendo eso, es importante evaluar si la liberación de exosomas provenientes de macrófagos tiene un efecto sobre la migración de las células de meduloblastoma.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La liberación de los exosomas provenientes de macrófagos M0 promoverá la migración de células de meduloblastoma mediante cambios en las moléculas de adhesión?

#### **5. HIPÓTESIS**

Sabiendo que los exosomas son clave para la comunicación entre las células tumorales y las células del sistema inmune, los exosomas provenientes de macrófagos M0 promoverán un efecto sobre la migración de las células de meduloblastoma.

#### **6. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de los exosomas provenientes de macrófagos M0 sobre la migración de células de meduloblastoma.



## **7. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Obtener exosomas provenientes de macrófagos M0 a partir de células THP1.
2. Evaluar el efecto de los exosomas sobre la migración en células de meduloblastoma.
3. Determinar el efecto de los exosomas sobre la expresión de la molécula de adhesión cadherina E en las células de meduloblastoma.

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1 Líneas celulares**

#### **8.1.1 THP1 (ATCC TIB-202)**

Se utilizó la línea celular THP-1 (ATCC® TIB-202™) proveniente de sangre periférica humana de niños de 1 año de edad con leucemia monocítica aguda. Se cultivaron en botellas de cultivo T75 con el medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10%, 2 mM de L-glutamina (gibco), 1 mM de piruvato de sodio, penicilina (100 U/ml) y streptomicina (100 µg/ml) (gibco), se mantuvieron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **8.1.2 DAOY (ATCC HTB-186)**

Las células de la línea DAOY (ATCC® HTB-186™) son células provenientes de meduloblastoma desmoplásico cerebelar humano de niños de 4 años de edad. Se cultivaron en medio EMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y 2 mM de antibiótico-antimicótico y se mantuvieron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **8.1.3 Diferenciación de células THP-1 a macrófagos**

Se sembraron  $6 \times 10^6$  células THP-1 en 5 ml de medio RPMI sin suero fetal bovino en botellas de cultivo T25. Para la diferenciación de las células THP-1 a macrófagos activados se agregó PMA (Forbol éster 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato; Sigma Aldrich) al medio a una concentración de 100 ng/ml y se dejó incubando durante 24 hrs [76].

### **8.2 Aislamiento de exosomas provenientes de la línea celular monocítica THP-1, células diferenciadas a macrófagos y de suero fetal bovino.**

Los exosomas fueron aislados de acuerdo a las indicaciones del fabricante del kit de aislamiento total de exosomas (Invitrogen, Cat. 4478359). Brevemente, se recolectó el sobrenadante de las células y se colocó en un tubo estéril de 15 ml. Se centrifugó el sobrenadante a 3 600 rpm durante 30 minutos. Al término de la centrifugación, el sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se agregó el reactivo de aislamiento total de exosomas (Invitrogen, Cat. 4478359.) a una concentración de 500  $\mu$ l/ml, se agitó vigorosamente hasta que se homogenizó completamente la solución y se incubó toda la noche a 4°C.

Una vez incubado el sobrenadante con el reactivo, se procedió a centrifugarlo a 10 300 rpm durante 1 h. Se retiró el sobrenadante y el botón de exosomas se resuspendió en PBS 1x y se almacenaron a -20°C. En el caso de ser analizados por western blot, después de obtener el pellet y resuspenderlo en PBS se agregó buffer de lisis y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

### **8.2.1 Caracterización de exosomas mediante microscopía electrónica de transmisión**

Después de obtener los exosomas de las tres condiciones se utilizó la línea celular de monocitos THP-1 y del suero fetal bovino para visualizar a los exosomas por microscopía electrónica. Se fijaron con glutaraldehído al 2% durante toda la noche. Se colocaron mediante una pipeta Pasteur en una caja Petri que contenía papel filtro, parafilm y las rejillas para microscopía electrónica de transmisión. Las muestras se dejaron secar durante un día. Una vez secado se colocaron los reactivos tetraóxido de osmio y ácido fosfotungstícico (PTA) para contrastar las muestras durante toda la noche. Por último, las muestras se observaron en el microscopio electrónico de transmisión (modelo: Flash marca: Jeol).

### **8.3 Western Blot**

Para la obtención de proteínas totales, los exosomas provenientes de macrófagos y los exosomas del suero fetal bovino se resuspendieron en buffer de lisis y se mantuvieron en hielo durante 10 minutos. La muestra se centrifugó a 12 500 rpm durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Después se obtuvo la concentración de proteínas de exosomas mediante espectrofotometría a 595 nm utilizando el método de Bradford. Una vez obtenida la concentración requerida se colocaron las muestras con buffer de carga LDS 4X (NuPAGE 2083421) separándolas por SDS-PAGE usando geles de bis-acrilamida al 10%. Se corrió el gel a 60 V por 20 minutos y posteriormente se subió el voltaje a 120 V. Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF (AmershamHybond™-P) previamente activada con metanol y se dejó a 250 mA por 2 h. Una vez terminada la transferencia se

bloquearon los sitios de unión inespecíficos durante una hora a temperatura ambiente con leche desnatada al 8% (p/v) con TBS 1x+ Tween 20 al 0.1 % (TBST). Se lavó la membrana 2 veces durante 10 minutos (cada lavado) con TBST y se incubó con los anticuerpos primarios anti-actina (Abcam ab179467; 1:1500) y CD63 (Abcam ab21630; 1:650) durante toda la noche a 4°C. Se retiró el anticuerpo primario, se lavaron con TBST y se incubó durante 2 h con el anticuerpo secundario ( $\alpha$ - anti-rabbit HRP, Santa Cruz Biotechnology, Sc-2357; 1:4000). Por último se hicieron 2 lavados con TBST y se agregó el reactivo luminol (Santa Cruz Biotechnology, sc-2048.) para la detección de las bandas de proteínas mediante un fotodocumentador.

#### **8.4 Ensayo de migración por estría en monocapa**

Se sembraron  $5 \times 10^5$  células DAOY en placas de cultivo de 24 pozos y se dejaron estabilizar por 24 h. Una vez alcanzada una confluencia del 100% se realizó una estría con una punta estéril de 200  $\mu$ l en cada pozo y se retiró el medio de cultivo para quitar las células desprendidas. Se agregó 1 ml de medio fresco DMEM con colchicina (10 nM) y libre de suero fetal bovino para detener la proliferación de las células y así asegurarse que el cierre de la estría se da por la migración de las células y no por la proliferación de las mismas.

Posteriormente se añadieron los exosomas obtenidos de los macrófagos (10, 20 y 40  $\mu$ g/ml). Se documentó tomando imágenes secuenciales de la estría y se calculó el área sin cicatrizar empleando el programa Image J (1.50i).

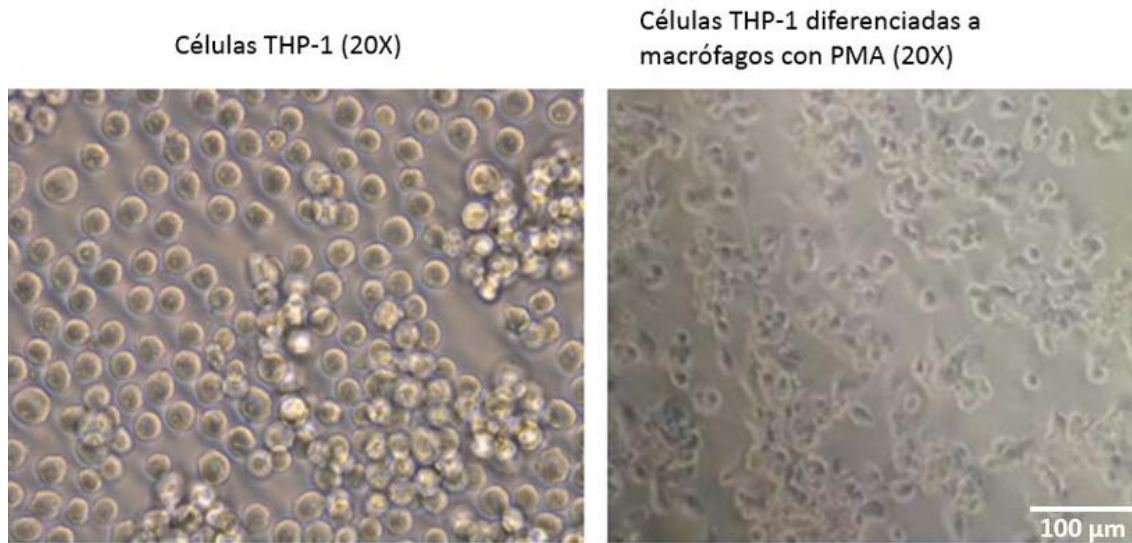
## **8.5 Presencia de Cadherina E en células de meduloblastoma mediante Western Blot.**

Se sembraron  $1 \times 10^6$  células de meduloblastoma en placas de cultivo de 12 pozos y se dejaron estabilizar por 24 h. Una vez alcanzada una confluencia del 100% se agregaron los exosomas obtenidos de los macrófagos (10, 20 y 40  $\mu\text{g/ml}$ ), durante 24 horas. Posteriormente se desprendieron las células de meduloblastoma mecánicamente con un *scraper*, agregando 60  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis por pozo. La extracción de proteínas y el western blot se realizó como se indicó en el apartado anterior con los anticuerpos anti-actina (Abcam ab179467; 1:1500) y anti-Cadherina E (invitrogen UG2809094; 1:1500).

## **9. RESULTADOS**

### **9.1 Diferenciación de las células mononucleares THP-1 a macrófagos y obtención de exosomas derivados de macrófagos**

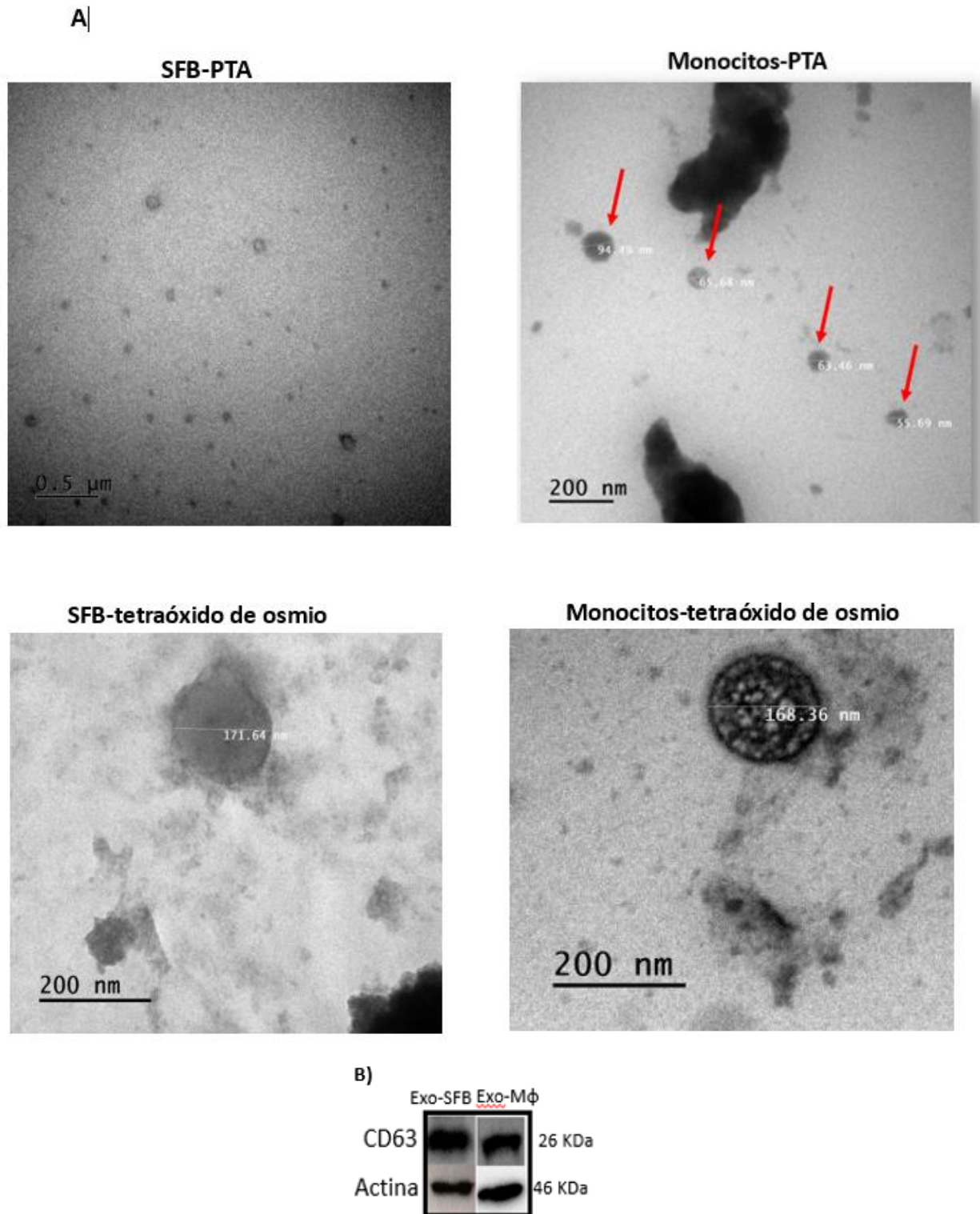
Se determinó que la concentración mínima a la que se obtiene el mayor porcentaje de diferenciación después de 24 h. Este fue de 100 ng/ml debido a que las células monocíticas de la línea celular THP-1 estaban completamente diferenciadas a macrófagos. Esto se determinó mediante la observación del cambio fenotípico y morfológico de las células THP-1 que crecen en suspensión y tienen una morfología esférica, y cuando se diferencian a macrófagos presentan una morfología alargada y se adhieren a la superficie de la botella de cultivo (Fig. 5).



**Fig. 5. Diferenciación de células THP-1 a macrófagos.** Se observan las células THP-1 en el panel izquierdo sin diferenciar, mientras que en el panel derecho se observan las células THP-1 diferenciadas a macrófagos con PMA.

Posteriormente, mediante microscopía electrónica de transmisión se observaron los exosomas del suero fetal bovino (control positivo) y los exosomas de células de THP-1 con los contrastes de tetraóxido de osmio y PTA. Como se muestra en la Fig. 6 los exosomas provenientes de los macrófagos presentaron un rango de diámetro de 70-180 nm, que es característico de los exosomas obtenidos de otras células (Fig. 6A).

Se sabe que unas de las proteínas características de los exosomas son las tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), es por eso que decidimos evaluar la presencia de CD63 en los exosomas de suero fetal bovino y en los exosomas de macrófagos (Fig. 6B), de los cuales observamos que hay presencia de la proteína CD63 tanto en exosomas de suero fetal bovino como en los exosomas de macrófagos (Exo-M $\phi$ ) lo que nos lleva a que el aislamiento de los exosomas se llevó acabo de manera correcta.



**Fig. 6. Caracterización de exosomas derivado de suero fetal bovino y células Thp-1 mediante microscopia electrónica y Western Blot de exosomas de Macrófagos (Exo-Mφ).**

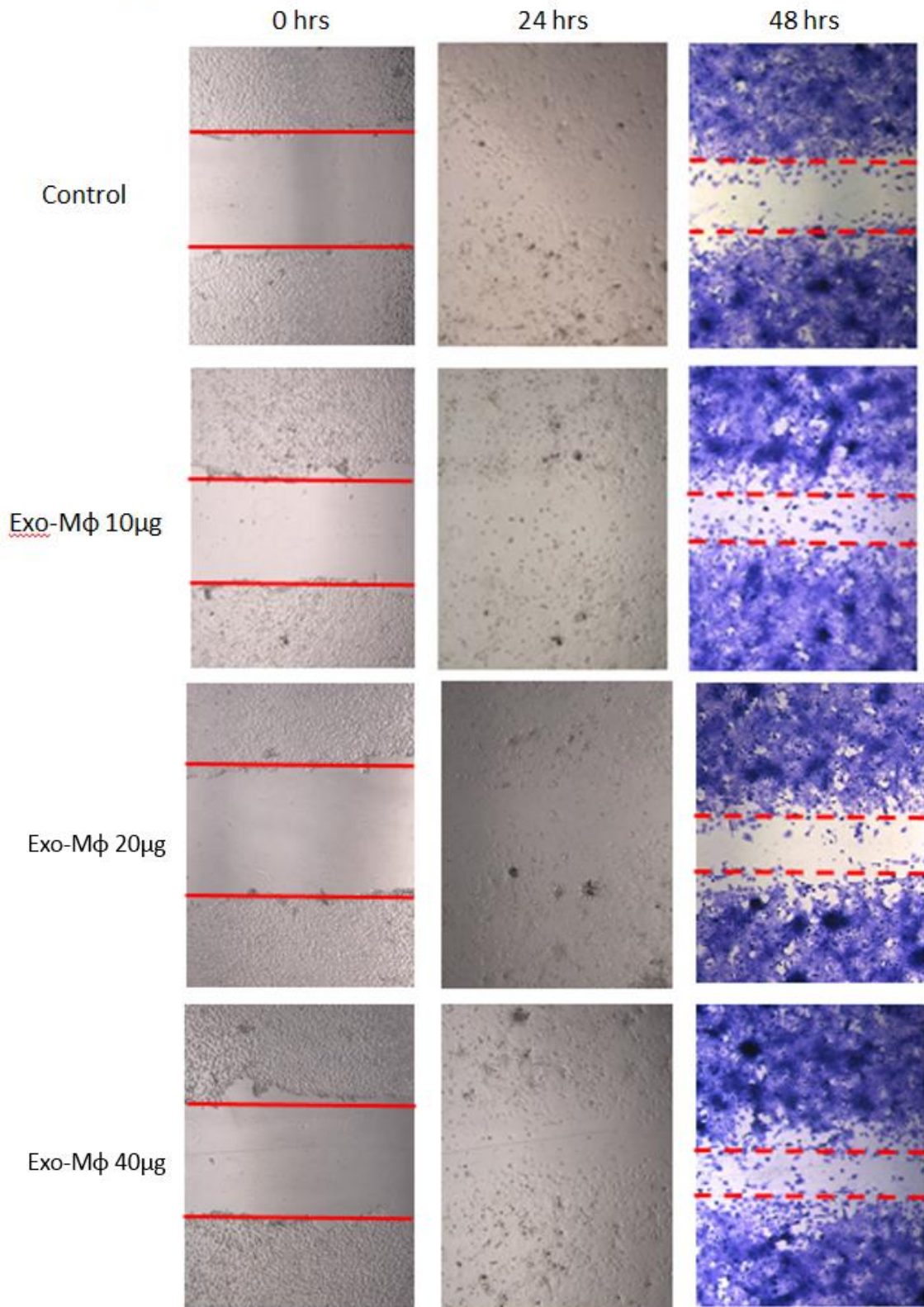
A) Microscopia Electrónica de exosomas derivados de suero fetal bovino (SFB) y exosomas de células THP-1 con dos tipos de contrastes PTA y tetraóxido de osmio. B) Western Blot de la proteína CD63 en exosomas de suero fetal bovino y Exo-Mφ.

## **9.2 Los exosomas derivados de macrófagos (Exo-M $\phi$ ) promueven la migración de las células de meduloblastoma**

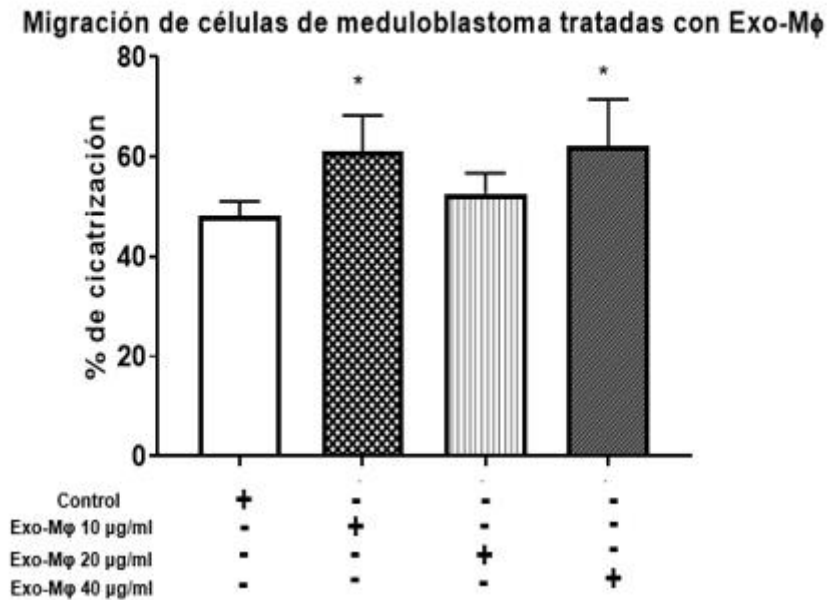
Para mostrar que los Exo-M $\phi$  pueden aumentar la migración en células de meduloblastoma se realizaron ensayos de cicatrización. Los resultados indicaron que las concentraciones de 10 y 40  $\mu\text{g/ml}$  de Exo-M $\phi$  aumentaron significativamente la migración de las células DAOY en comparación con las células control no tratadas con exosomas (Fig.7). Esto nos indica que el efecto sobre la migración en las células de meduloblastoma es regulada parcialmente por los Exo- M $\phi$ .



**A)**



**B**

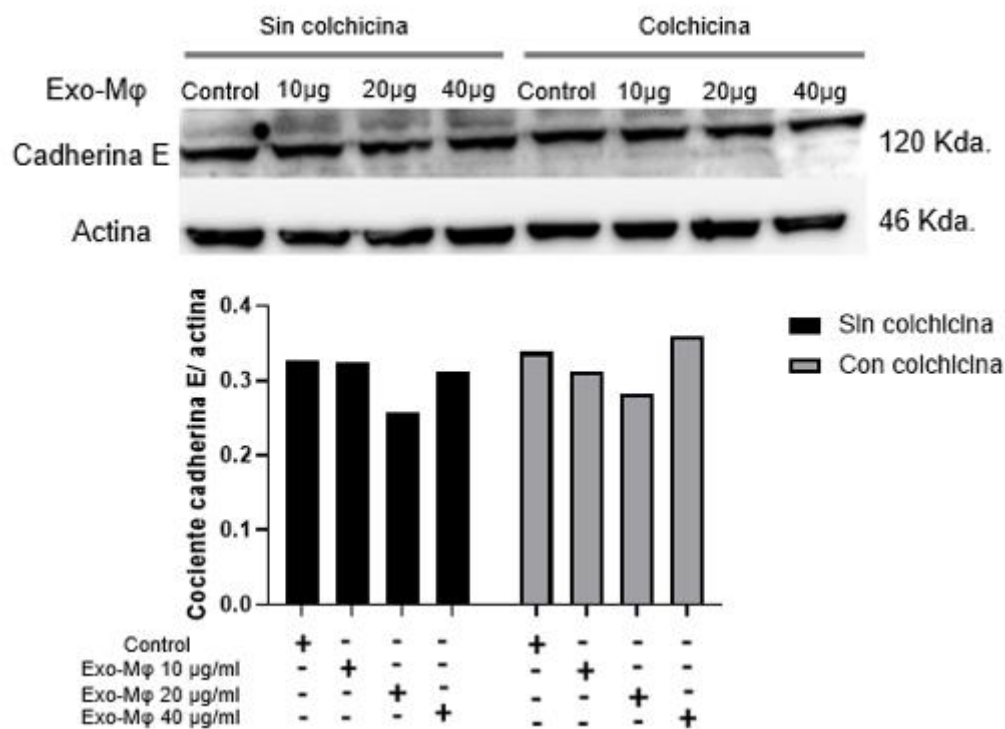


**Fig. 7. Migración de células de meduloblastoma tratadas con diferentes concentraciones de Exo-M $\phi$  durante 48 hrs. A)** Imagen representativa del ensayo de migración por estría en las células de meduloblastoma tratadas con Exo-M $\phi$  durante 24 y 48 hrs (teñidas con cristal violeta). **B)** Porcentaje de cicatrización de las células DAOY tratadas con diferentes concentraciones de Exo-M $\phi$  10 ,20 y 40  $\mu$ g/ml durante 48 hrs. ANOVA seguida de prueba *post hoc* Tukey-Kramer;  $p < 0.05$ ;  $n = 4$ ; \* = diferencia significativa con el grupo control. Media  $\pm$  desviación estándar.

### **9.3 Presencia de cadherina E en células de meduloblastoma tratadas con diferentes concentraciones de Exo-M $\phi$ .**

La cadherina E es una molécula que comúnmente disminuye su expresión en cánceres de origen epitelial, nosotros evaluamos la expresión de esta proteína en las células de meduloblastoma tratadas con Exo-M $\phi$  a diferentes concentraciones. Observamos que la concentración de 20  $\mu$ g/ml de Exo-M $\phi$  disminuye la cantidad de cadherina E (Fig. 8); sin embargo se requiere hacer más experimentos para corroborar la pérdida de la cadherina E.

Además, se agregó un grupo con colchicina para establecer que el efecto de los Exo-Mφ sobre la expresión de la cadherina no se ve afectada por la presencia de la colchicina empleada en los ensayos de migración. Este control es muy importante porque la colchicina inhibe la polimerización de los microtúbulos del huso acromático y por lo tanto impide que se dé la progresión del ciclo celular de metafase hacia anafase [77]. Nosotros encontramos que el efecto de los exosomas sobre la expresión de la cadherina-E es similar con o sin colchicina, por lo tanto el efecto de migración si se está dando por los Exo-Mφ (Fig. 8).



**Fig. 8. Presencia de Cadherina E en las células de meduloblastoma tratadas con Exo-Mφ.**

**A)** Se observa mediante Western Blot la presencia de cadherina E en las células DAOY tratadas con diferentes concentraciones de Exo-Mφ 10 ,20 y 40 μg/ml sin colchicina y con colchicina durante 24 horas. Cuantificación de la densidad óptica de cadherina E de células de meduloblastoma tratadas con diferentes concentraciones de Exo-Mφ. n=1

## DISCUSIÓN

Los tumores del sistema nervioso central son las neoplasias que se presentan con mayor frecuencia en niños, anteceditos sólo por las leucemias y los linfomas [78]. El meduloblastoma ocupa el 20% de los tumores primarios del SNC. A pesar de los tratamientos simultáneos, aproximadamente el 30% de los tipos de subgrupos de meduloblastoma siguen siendo incurables. Por tal motivo es esencial tener una comprensión más profunda de las bases biológicas y celulares del meduloblastoma, principalmente el papel que juega el microambiente tumoral en la progresión del tumor [10, 79].

En el TME se ha encontrado que los macrófagos tienen una relación importante con los tumores [80]. El fenotipo de los macrófagos dentro del microambiente tumoral va a depender de la respuesta a las señales que se estén secretando, como los factores de crecimiento y citocinas. Dependiendo de su fenotipo los macrófagos pueden promover la progresión del tumor [80-82].

En este trabajo llevamos a cabo la diferenciación de células THP1 a macrófagos como se ha reportado previamente en diferentes estudios [76, 83]. Obtuvimos exosomas con un método basado en precipitación, que consiste en agregar un reactivo polimérico que paraliza las moléculas de agua y expulsa partículas con menos solubilidad, ayudándonos a tener una gran cantidad de exosomas, corroborando con lo que se ha reportado en otros trabajos utilizando el mismo método entre otros que ya se conocían con anterioridad [84, 85].

Por otro lado, observamos que los Exo-M $\phi$  aumentaron la migración de las células de meduloblastoma significativamente comparado con el control después de 48 horas. Estos hallazgos son muy relevantes, ya que muchos estudios se

centran en exosomas derivados de las mismas células cancerígenas; sin embargo, en un estudio reciente observaron que los exosomas de macrófagos M2 aumentan la migración de las células de glioma y aunque nuestros macrófagos no se encuentren polarizados obtuvimos el mismo efecto estando sólo diferenciados. También se ha visto que los exosomas derivados de macrófagos M2 promueven la migración de células de cáncer de pulmón y éste aumento está relacionado con miR-501-3p que se encuentra dentro de los exosomas [86]. Similarmente, se ha encontrado que los exosomas derivados de macrófagos, principalmente aquellos que contienen el lncRNA LIFR-AS1, promueven la proliferación, migración e invasión de las células de osteosarcoma [87]. Considerando los estudios de exosomas derivados de macrófagos en otros tipos de cáncer nos sugiere la posibilidad de que moléculas como los miRNAs contenidos en los exosomas sean el mecanismo mediante el cual se esté llevando a cabo un aumento en la migración de las células de meduloblastoma, y a su vez está modificando algunas proteínas de adhesión celular como la cadherina E [88]. Las uniones célula-célula mediadas por cadherinas son esenciales para la organización de tejidos [89]. Estas interacciones se pierden progresivamente en las células tumorales, lo que contribuye a un aumento de las tasas de proliferación y migración celular. La cadherina E es una proteína transmembranal encargada de mediar las interacciones homofílicas célula-célula [90, 91]. Evaluamos la presencia de cadherina E y encontramos que hay una ligera disminución en las células de meduloblastoma tratadas con Exo-M $\phi$  en la concentración de 20  $\mu$ g/ml. Se ha identificado que los exosomas que provienen de células de cáncer de pulmón contenían más cadherina E y promovían mayor capacidad de migración e invasión en diferentes tipos de líneas celulares de

cáncer de pulmón [92]. A pesar de tener una amplia investigación acerca de un aumento en la migración celular mediada por los exosomas derivados de macrófagos ya sea sólo diferenciados o polarizados, pocos lo han relacionado con la modificación en la proteína cadherina E por lo que este trabajo aporta un acercamiento importante.

## **CONCLUSIÓN**

Se diferenciaron las células THP-1 a macrófagos correctamente mostrando una morfología alargada y volviéndose adherentes por lo que la concentración de 100 ng/ml de PMA se considera la más efectiva.

Se aislaron exosomas de macrófagos diferenciados correctamente debido al tamaño y marcadores característicos de los exosomas.

Los Exo-M $\phi$  promueven la migración de las células de meduloblastoma posiblemente a través de la regulación de la expresión de moléculas de adhesión como la cadherina E en células de la línea DAOY de meduloblastoma.

## **PERSPECTIVAS**

Debido a que los resultados obtenidos para la proteína cadherina E no son suficientes para determinar si se encontraba disminuida, se realizarán más repeticiones para la molécula de adhesión de cadherina E a las 24 y 48 horas tratadas con Exo-M $\phi$ .

Ahora que sabemos que los exosomas aumentan la migración en las células de meduloblastoma, profundizaremos en el contenido de los exosomas (miRNAs y proteínas) y los posibles mecanismos que pudieran estar participando en la regulación de la migración en las células de meduloblastoma.

## REFERENCIAS

1. Zubair, H., et al. *Modulation of the tumor microenvironment by natural agents: implications for cancer prevention and therapy*. in *Seminars in Cancer Biology*. 2020. Elsevier.
2. Floor, S.L., et al., *Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time?* Trends in molecular medicine, 2012. **18**(9): p. 509-515.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
4. Castano, Z., et al. *The bed and the bugs: interactions between the tumor microenvironment and cancer stem cells*. in *Seminars in cancer biology*. 2012. Elsevier.
5. Jarosz-Biej, M., et al., *Tumor microenvironment as a “game changer” in cancer radiotherapy*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(13): p. 3212.
6. Arneth, B., *Tumor microenvironment*. Medicina, 2020. **56**(1): p. 15.
7. Udaka, Y.T. and R.J. Packer, *Pediatric brain tumors*. Neurologic clinics, 2018. **36**(3): p. 533-556.
8. Mahapatra, S. and M.J. Amsbaugh, *Cancer, Medulloblastoma*. 2017.
9. Cheng, Y., et al., *NeuroD1 dictates tumor cell differentiation in medulloblastoma*. Cell reports, 2020. **31**(12): p. 107782.
10. Byrd, T., R.G. Grossman, and N. Ahmed, *Medulloblastoma—Biology and Microenvironment: A Review*. Pediatric hematology and oncology, 2012. **29**(6): p. 495-506.
11. Northcott, P.A., et al., *Medulloblastoma*. Nature Reviews Disease Primers, 2019. **5**(1): p. 1-20.

12. Massimino, M., et al., *Childhood medulloblastoma*. Critical reviews in oncology/hematology, 2016. **105**: p. 35-51.
13. Wells, E.M. and R.J. Packer, *Pediatric brain tumors*. CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology, 2015. **21**(2): p. 373-396.
14. Rivera-Luna, R., et al., *Medulloblastoma en pediatría. Pronóstico y tratamiento en la actualidad*. Gaceta médica de México, 2007. **143**(5): p. 415-420.
15. Martirosian, V. and J. Neman, *Medulloblastoma: Challenges and advances in treatment and research*. Cancer Reports, 2019. **2**(3): p. e1146.
16. Society, A.C., *Cancer facts & figures 2014*. 2014: American Cancer Society.
17. Phoenix, T.N., et al., *Medulloblastoma genotype dictates blood brain barrier phenotype*. Cancer cell, 2016. **29**(4): p. 508-522.
18. Mynarek, M., et al., *Nonmetastatic medulloblastoma of early childhood: Results from the prospective clinical trial HIT-2000 and an extended validation cohort*. Journal of Clinical Oncology, 2020: p. JCO. 19.03057.
19. Mahapatra, S. and M.J. Amsbaugh, *History and Physical*.
20. Gopalakrishnan, V., et al., *Medulloblastoma development: tumor biology informs treatment decisions*. CNS oncology, 2015. **4**(2): p. 79-89.
21. Majd, N. and M. Penas-Prado, *Updates on management of adult medulloblastoma*. Current treatment options in oncology, 2019. **20**(8): p. 1-24.
22. De Oliveira, F., J.A. Landeiro, and I. De Castro, *Adult hemispheric cerebellar medulloblastoma*. Surgical neurology international, 2018. **9**.



23. Kijima, N. and Y. KaNemura, *Molecular classification of medulloblastoma*. *Neurologia medico-chirurgica*, 2016. **56**(11): p. 687-697.
24. Juraschka, K. and M.D. Taylor, *Medulloblastoma in the age of molecular subgroups: a review: JNSPG 75th Anniversary Invited Review Article*. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, 2019. **24**(4): p. 353-363.
25. Manoranjan, B., et al., *Wnt activation as a therapeutic strategy in medulloblastoma*. *Nature communications*, 2020. **11**(1): p. 1-12.
26. Zou, H., et al., *Molecular Heterogeneity and Cellular Diversity: Implications for Precision Treatment in Medulloblastoma*. *Cancers*, 2020. **12**(3): p. 643.
27. Menyhárt, O., F. Giangaspero, and B. Györffy, *Molecular markers and potential therapeutic targets in non-WNT/non-SHH (group 3 and group 4) medulloblastomas*. *Journal of hematology & oncology*, 2019. **12**(1): p. 29.
28. Ballabio, C., et al., *Modeling medulloblastoma in vivo and with human cerebellar organoids*. *Nature Communications*, 2020. **11**(1): p. 1-18.
29. Sharma, T., et al., *Second-generation molecular subgrouping of medulloblastoma: an international meta-analysis of Group 3 and Group 4 subtypes*. *Acta neuropathologica*, 2019. **138**(2): p. 309-326.
30. Jones, D.T., et al., *Medulloblastoma and CNS primitive neuroectodermal tumors*, in *Molecular Pathology of Nervous System Tumors*. 2015, Springer. p. 121-142.
31. MALLA, R. and P. KIRAN, *TUMOR microenvironment pathways: CROSS regulation in breast cancer metastasis*. *Genes & Diseases*, 2020.
32. Xiao, Y. and D. Yu, *Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer*. *Pharmacology & Therapeutics*, 2020: p. 107753.

33. Jin, M.-Z. and W.-L. Jin, *The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2020. **5**(1): p. 1-16.
34. Polacheck, W.J., I.K. Zervantonakis, and R.D. Kamm, *Tumor cell migration in complex microenvironments*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2013. **70**(8): p. 1335-1356.
35. Quail, D.F. and J.A. Joyce, *The microenvironmental landscape of brain tumors*. Cancer cell, 2017. **31**(3): p. 326-341.
36. Renner, K., et al., *Metabolic hallmarks of tumor and immune cells in the tumor microenvironment*. Frontiers in immunology, 2017. **8**: p. 248.
37. Cassetta, L. and J.W. Pollard, *Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer*. Nature Reviews Drug Discovery, 2018. **17**(12): p. 887-904.
38. Van Ommeren, R., et al., *The molecular biology of medulloblastoma metastasis*. Brain Pathology, 2020. **30**(3): p. 691-702.
39. Pasqualini, C., et al., *Modeling the Interaction between the Microenvironment and Tumor Cells in Brain Tumors*. Neuron, 2020.
40. Hassan, G. and M. Seno, *Blood and Cancer: Cancer Stem Cells as Origin of Hematopoietic Cells in Solid Tumor Microenvironments*. Cells, 2020. **9**(5): p. 1293.
41. Chanmee, T., et al., *Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment*. Cancers, 2014. **6**(3): p. 1670-1690.
42. Orekhov, A.N., et al., *Monocyte differentiation and macrophage polarization*. Vessel Plus, 2019. **3**.

43. Hsieh, C.-H., S.-K. Tai, and M.-H. Yang, *Snail-overexpressing cancer cells promote M2-like polarization of tumor-associated macrophages by delivering MiR-21-abundant exosomes*. Neoplasia, 2018. **20**(8): p. 775-788.
44. van Dalen, F., et al., *Molecular repolarisation of tumour-associated macrophages*. Molecules, 2019. **24**(1): p. 9.
45. Murray, P.J. and T.A. Wynn, *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets*. Nature reviews immunology, 2011. **11**(11): p. 723.
46. Prenen, H. and M. Mazzone, *Tumor-associated macrophages: A short compendium*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2019. **76**(8): p. 1447-1458.
47. Rodriguez-Ruiz, M.E., et al., *Immunological impact of cell death signaling driven by radiation on the tumor microenvironment*. Nature immunology, 2020. **21**(2): p. 120-134.
48. Orihuela, R., C.A. McPherson, and G.J. Harry, *Microglial M1/M2 polarization and metabolic states*. British journal of pharmacology, 2016. **173**(4): p. 649-665.
49. Lee, C., et al., *M1 macrophage recruitment correlates with worse outcome in SHH Medulloblastomas*. BMC cancer, 2018. **18**(1): p. 1-8.
50. Kakarla, R., et al., *Apoptotic cell-derived exosomes: messages from dying cells*. Experimental & Molecular Medicine, 2020: p. 1-6.
51. Ludwig, A.-K. and B. Giebel, *Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2012. **44**(1): p. 11-15.

52. Bebelman, M.P., et al., *Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer*. *Pharmacology & therapeutics*, 2018. **188**: p. 1-11.
53. Subramanian, A., et al., *Exosomes in carcinogenesis: molecular palkis carry signals for the regulation of cancer progression and metastasis*. *Journal of cell communication and signaling*, 2016. **10**(3): p. 241-249.
54. Zhang, Y., et al., *Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential*. *Cell & bioscience*, 2019. **9**(1): p. 19.
55. Wortzel, I., et al., *Exosome-mediated metastasis: communication from a distance*. *Developmental cell*, 2019. **49**(3): p. 347-360.
56. Cao, J., et al., *Exosomes in head and neck cancer: Roles, mechanisms and applications*. *Cancer Letters*, 2020.
57. Xu, R., et al., *Extracellular vesicles in cancer—implications for future improvements in cancer care*. *Nature reviews Clinical oncology*, 2018. **15**(10): p. 617.
58. Mashouri, L., et al., *Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance*. *Molecular cancer*, 2019. **18**(1): p. 75.
59. Dreyer, F. and A. Baur, *Biogenesis and functions of exosomes and extracellular vesicles*, in *Lentiviral Vectors and Exosomes as Gene and Protein Delivery Tools*. 2016, Springer. p. 201-216.
60. McAndrews, K.M. and R. Kalluri, *Mechanisms associated with biogenesis of exosomes in cancer*. *Molecular cancer*, 2019. **18**(1): p. 52.
61. Kim, Y.-S., et al., *The potential theragnostic (diagnostic+ therapeutic) application of exosomes in diverse biomedical fields*. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 2018. **22**(2): p. 113-125.

62. D'Souza-Schorey, C. and J.S. Schorey, *Regulation and mechanisms of extracellular vesicle biogenesis and secretion*. Essays in biochemistry, 2018. **62**(2): p. 125-133.
63. Mrowczynski, O.D., B.E. Zacharia, and J.R. Connor, *Exosomes and their implications in central nervous system tumor biology*. Progress in neurobiology, 2019. **172**: p. 71-83.
64. Lan, J., et al., *M2 macrophage-derived exosomes promote cell migration and invasion in colon cancer*. Cancer research, 2019. **79**(1): p. 146-158.
65. Ghaemmaghami, A.B., et al., *Role of exosomes in malignant glioma: microRNAs and proteins in pathogenesis and diagnosis*. Cell Communication and Signaling, 2020. **18**(1): p. 1-19.
66. Zheng, P., et al., *Tumor-associated macrophages-derived exosomes promote the migration of gastric cancer cells by transfer of functional Apolipoprotein E*. Cell death & disease, 2018. **9**(4): p. 434.
67. Kharaziha, P., et al., *Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2012. **1826**(1): p. 103-111.
68. LeBleu, V.S. and R. Kalluri, *Exosomes Exercise Inhibition of Anti-Tumor Immunity during Chemotherapy*. Immunity, 2019. **50**(3): p. 547-549.
69. Zhu, L.-Y., et al., *Aggressive Medulloblastoma-Derived Exosomal miRNAs Promote In Vitro Invasion and Migration of Tumor Cells Via Ras/MAPK Pathway*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2020. **79**(7): p. 734-745.
70. Epple, L.M., et al., *Medulloblastoma exosome proteomics yield functional roles for extracellular vesicles*. PloS one, 2012. **7**(7): p. e42064.

71. Ma, Z., et al., *Exosomes from glioma cells induce a tumor-like phenotype in mesenchymal stem cells by activating glycolysis*. Stem cell research & therapy, 2019. **10**(1): p. 60.
72. Yao, J., et al., *M2 macrophage-derived exosomal microRNAs inhibit cell migration and invasion in gliomas through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway*. Journal of translational medicine, 2021. **19**(1): p. 1-14.
73. Reisman, D., S. Glaros, and E.A. Thompson, *The SWI/SNF complex and cancer*. Oncogene, 2009. **28**(14): p. 1653-1668.
74. Northcott, P.A., et al., *Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants*. Journal of Clinical Oncology, 2011. **29**(11): p. 1408.
75. Kabir, T.F., et al., *Immunotherapy for medulloblastoma: current perspectives*. ImmunoTargets and therapy, 2020. **9**: p. 57.
76. Maeß, M.B., et al., *Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli*. Journal of immunological methods, 2014. **402**(1-2): p. 76-81.
77. Segura, M., *El citoesqueleto en plantas durante la mitosis y citocinesis*. . Avance y Perspectiva 20: , (2001) p. 389-394.
78. Toro-Moreno, A.C., et al., *Tumores de sistema nervioso central en pediatría: Presente y futuro del abordaje diagnóstico*. Revista Ecuatoriana de Neurología, 2017. **26**(3): p. 283-288.
79. Hovestadt, V., et al., *Resolving medulloblastoma cellular architecture by single-cell genomics*. Nature, 2019. **572**(7767): p. 74-79.
80. Umakoshi, M., et al., *Macrophage-mediated transfer of cancer-derived components to stromal cells contributes to establishment of a pro-tumor microenvironment*. Oncogene, 2019. **38**(12): p. 2162-2176.

81. Guo, W., et al., *Exosomes: a potential therapeutic tool targeting communications between tumor cells and macrophages*. Molecular Therapy, 2020.
82. Shojaei, S., et al., *Effect of mesenchymal stem cells-derived exosomes on tumor microenvironment: Tumor progression versus tumor suppression*. Journal of cellular physiology, 2019. **234**(4): p. 3394-3409.
83. Berg-Rolness, H.S., *Optimized differentiation of THP-1 cells into macrophages for the study of TLR4 signaling and trafficking events*. 2014, Institutt for biologi.
84. Patel, G.K., et al., *Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications*. Scientific reports, 2019. **9**(1): p. 1-10.
85. Tang, Y.-T., et al., *Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum*. International journal of molecular medicine, 2017. **40**(3): p. 834-844.
86. Lei, J., et al., *M2 macrophages-derived exosomal microRNA-501-3p promotes the progression of lung cancer via targeting WD repeat domain 82*. Cancer cell international, 2021. **21**(1): p. 1-13.
87. Zhang, H., et al., *Macrophages-derived exosomal lncRNA LIFR-AS1 promotes osteosarcoma cell progression via miR-29a/NFIA axis*. Cancer Cell International, 2021. **21**(1): p. 1-14.
88. Theveneau, E. and R. Mayor, *Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells*. Current opinion in cell biology, 2012. **24**(5): p. 677-684.

89. Gloushankova, N.A., S.N. Rubtsova, and I.Y. Zhitnyak, *Cadherin-mediated cell-cell interactions in normal and cancer cells*. *Tissue barriers*, 2017. **5**(3): p. e1356900.
90. Canel, M., et al., *E-cadherin–integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis*. *Journal of cell science*, 2013. **126**(2): p. 393-401.
91. Kourtidis, A., et al., *A central role for cadherin signaling in cancer*. *Experimental cell research*, 2017. **358**(1): p. 78-85.
92. Zhang, Y., et al., *Upregulation of E-cadherin in bronchoalveolar lavage fluid-derived exosomes in patients with lung cancer*. *Thoracic cancer*, 2020. **11**(1): p. 41-47.