



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR.

**PARTICIPACIÓN DE LAS ENZIMAS PROTEOLITICAS
EXOSOMALES (FURINA, MT1-MMP, MMP-2), SOBRE
LA DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR,
EN LA LINEA CELULAR DE CANCER DE MAMA MDA-
MB-231.**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

Presenta:

Sandra Chavez Bolás

Director de tesis

Dra. Maria Rosa Padros Semorile

Asesor metodológico

Cenobia Silvia Durán Gonzalez

Puebla, Pue. Junio 2017.

Agradecimientos

A la Dra María Rosa Padrós por brindarme la oportunidad y la confianza, para realizar este trabajo en el Laboratorio de Bioquímica celular, también por su compromiso y apoyo para la realización de esta tesis.

A la Mtra Silvia Durán por compartirme su conocimiento y amor a la ciencia, además de brindarme su valiosa amistad y apoyo en mi formación académica.

A los miembros del jurado: Dr Fabián Galindo, Dr Eduardo Monjaraz y Dr Rubén Vázquez. Gracias por sus aportaciones y por el tiempo invertido a mi trabajo de tesis.

Al Biól. José Luis Córdova de la Cruz jefe del laboratorio de microscopia, por su inestimable ayuda y disposición al trabajo, así como también por su apoyo, amistad y permanente buen humor.

A mis padres Luis Chávez Javier y Antonia Bolás Nolasco por todo su cariño, comprensión y apoyo incondicional.

A Gonzalo Lara, por su apoyo, confianza y amor, también por creer en mí en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio, Lili, Lawrence, e Ivan. Que hicieron ameno el trabajo en el laboratorio

“Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado mediante la beca como alumna de maestría”.

“Se agradece a la vicerrectoría de investigación y estudios de posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del programa II. Investigación y posgrado. Aseguramiento de la calidad en el posgrado. Indicador establecido en el plan de desarrollo institucional 2013-2017”

ÍNDICE.

1. RESUMEN.....	6
2. INTRODUCCIÓN	9
2.1 Exosomas	9
2.1.1 Biogénesis de los exosomas	11
2.1.2 Exosomas y cáncer.....	14
2.2 Furina	18
2.3 Metaloproteinasas.	23
2.3.1 MMPs y cáncer	25
2.3.1 MT1-MMP O MMP-14 Y MMP-2.....	26
2.4 Matriz extracelular	30
3. JUSTIFICACIÓN.....	34
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS.....	35
6. METODOLOGÍA	37
6.1 Cultivos celulares.....	37
6.2 Ensayo de viabilidad celular por MTT.....	37
6.3 Obtención de exosomas.....	38
6.4 Extractos de células en buffer Laemmli.....	39
6.5 Determinación espectrofotométrica de proteínas totales	40
6.6 Western- blot.....	40
6.7 Zimografía en gelatina	43
6.8 Tratamiento de inhibición de la degradación de gelatina.....	44
6.9 Tratamiento para la degradación de fibronectina y laminina.....	45
6.10 Tratamiento para la inhibición de la degradación de fibronectina y laminina	46
6.11 Análisis de datos	47
6.12 Diagrama de trabajo	48
7. RESULTADOS.....	49
8. DISCUSION	82
9. CONCLUSIONES.....	93
10. BIBLIOGRAFÍA.....	94

ABREVIATURAS.

a.a	Aminoácido
α1-PDX	alpha 1- antitrypsin variant Portland
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
ESCRT	Complejo endosomal requerido para el transporte y clasificación
GPI	Glicofosfatidilinositol
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinasa de matriz extracelular
MT-MMP	Metaloproteinasa de tipo membrana
MVB	Cuerpos multivesiculares
PACE	Paired basic amino acid cleaving enzyme
PBS	Buffer fosfato salino
PC	Proteína convertasa
PMSF	Fenilmetilsufonil fluoruro
SDS	Dodecilsulfato sódico
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasa
TLCK	N-alfa-tosil-L-lisinil-clorometilcetona
VI	Vesículas intraluminales
RE	Retículo endoplásmico
TGN	Red de Trans- Golgi

1. RESUMEN.

La comunicación intercelular es la capacidad que permite a las células individuales coordinar su función, por lo tanto es importante para el desarrollo de procesos tanto fisiológicos como patológicos. Tal comunicación involucra principalmente factores solubles, pero recientemente, se ha descrito una nueva vía de comunicación intercelular a través de vesículas extracelulares. Los exosomas son un subgrupo de vesículas extracelulares, los cuales se les ha considerado como actores claves en distintas patologías por ejemplo enfermedades hepáticas, neurodegenerativas y en el desarrollo y progresión del cáncer.

La progresión tumoral es un mecanismo complejo, donde las células tumorales se caracterizan por su habilidad para degradar componentes de la MEC (matriz extracelular). Es por ello que nosotros nos propusimos investigar si los exosomas liberados por las células MDA-MB-231, contienen enzimas proteolíticas y si éstas tienen la capacidad de degradar componentes de la MEC tales como: gelatina (colágeno tipo 1), fibronectina y laminina.

Antes de realizar los ensayos de degradación sobre los componentes de la MEC, probamos tres distintos métodos ya publicados, donde utilizan el ionóforo A23187 a distintas concentraciones y tiempos con la finalidad de obtener una mayor cantidad de exosomas, para ello se utilizaron las células MDA-MB-231 las cuales cuando presentaban una confluencia de 90% fueron tratadas con el ionóforo A-23187 obteniéndose los siguientes resultados: para cada uno de los tratamientos: para 1 μM por 4 y 24 horas se obtuvo un porcentaje de aumento del 0 y 29%, para la concentración de 5 μM del ionóforo por 4 y 24 horas se obtuvo 68% y 112% de aumento, respectivamente. Sin embargo cuando se mantuvieron las células en suspensión no hubo un aumento significativo, por lo tanto podemos concluir que el método más eficaz para aumentar la liberación de exosomas en la línea celular de cáncer de mama es de 5 μM de A23187 por 24 horas, es por ello que para el desarrollo experimental de esta tesis se utilizó dicha concentración y tiempo de tratamiento. No obstante debido a que el ionóforo provoca un aumento intracelular de calcio, el cual podría estar correlacionado con un aumento de daño y muerte celular, se hicieron ensayos de MTT, para descartar posibles efectos adversos provocados por el fármaco, pero no se encontraron cambios significativos

cuando se compararon las células control vs las células tratadas, por lo tanto demostramos que la concentración utilizada por un tiempo de 24 hr no provocó daño celular.

Posteriormente mediante la técnica de western blot comprobamos que la fracción o pellet obtenido después de la ultra-centrifugación corresponde a exosomas debido a que se detectó a cada una de las siguientes proteínas consideradas como marcadores moleculares exosomales: β -actina, CD-63, CD-81, HLA-DRA.

Varias enzimas se ven involucradas durante el proceso de degradación de la MEC, entre ellas se encuentra furina, la cual tiene un papel clave en la activación de las MMPs (metaloproteinasas), en especial a la MT1-MMP (Metaloproteinasa transmembrana tipo 1) MT1-MMP se caracteriza por procesar diferentes componentes de la MEC, así como también tiene la capacidad de activar proteínas sustrato como a la MMP-2. En este trabajo de Tesis encontramos las distintas formas de expresión de Furina, en las células MDA-MB-231: pro-Furina de 110 kDa, furina activa de 98 kDa y furina soluble de 80-82 kDa. Además como era de esperarse en esta misma línea celular, se detectó a MT1-MMP activa de 55 kDa, Pro-MT1-MMP de 64 kDa, así como también un fragmento transmembranal de 43 kDa. Pero, cuando se estudió la expresión de estas enzimas en extractos exosomales, utilizando los mismos anticuerpos, sorpresivamente solo detectamos a las formas activas tanto para furina de 98 kDa y MT1-MMP activa de 55 kDa. También se montó en el Laboratorio de Bioquímica Celular la técnica de Zimografía, la cual permite detectar a enzimas con capacidad gelatinolítica tanto las formas activas como las pro, aprovechando de ello se prepararon las muestras exosomales; donde demostramos que tales vesículas tienen actividad gelatinolítica debido a que expresan MMP-2 de 62 kDa, pro-MMP-2 de 72 kDa y un fragmento de 20 kDa. La inhibición de la degradación de gelatina se logró completamente con el uso de EDTA y una disminución moderada con Bestatina y TLCK.

También investigamos el efecto de la degradación de fibronectina y laminina utilizando exosomas a diferentes concentraciones, donde se constató que a una mayor concentración de exosomas obtuvimos una mayor degradación de ambas proteínas. Al incubar 1 μ g de fibronectina con exosomas se obtuvieron dos fragmentos de degradación con pesos moleculares de 150 y 76 kDa los cuales fueron detectados mediante western blot. Por

otra parte cuando se incubó 1 µg de laminina con las mismas concentraciones de exosomas mencionadas en el ensayo anterior, se obtuvieron 3 fragmentos de degradación con pesos moleculares de 200, 110 y 60 kDa, respectivamente. Para inhibir la capacidad proteolítica de las enzimas exosomales se utilizaron diferentes inhibidores tales como: EDTA 10 mM, Bestatina 100 µM, TLCK 10 µM.

Cuando se utilizó EDTA con 1 µg de exosomas y 1 µg de fibronectina, los fragmentos obtenidos de 150 y 76 kDa disminuyeron con un porcentaje de 57 y 58 %, respectivamente, mientras que cuando se cambió la concentración de exosomas a 5 µg obtuvimos una disminución de los fragmentos de degradación de 41.5 y 47%, por lo tanto a ambas concentraciones de enzimas exosomales el inhibidor EDTA, resultó tener un efecto significativo. Cuando se utilizó Bestatina, analizando dichos fragmentos, con 1 µg de exosomas hubo una disminución del 35 y 37 %, mientras que cuando se utilizaron 5 µg de exosomas, el inhibidor no logró disminuir la actividad proteolítica significativamente.

Para el caso de laminina- 1 cuando se utilizó EDTA con los exosomas y 1 µg de esta proteína, los fragmentos obtenidos de 200, 110 y 60 kDa disminuyeron con un porcentaje de 54, 56 y 72%, respectivamente. Mientras, que cuando se utilizó Bestatina, analizando dichos fragmentos de degradación ya mencionados, hubo una disminución del 38, 54 y 64 %, respectivamente. Por otra parte el inhibidor TLCK solo logró disminuir de manera significativa al fragmento de 200 kDa con un porcentaje del 89 % lo que nos sugiere que presumiblemente las serin proteasas estén involucradas en dicho proceso proteolítico.

Por lo tanto los exosomas no solo actúan como mensajeros intercelulares como lo han sugerido muchos autores, sino también y en base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pueden considerar como vesículas con la capacidad de degradar componentes de la MEC, participando así en los procesos de migración e invasión tumoral.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Exosomas

Las células del organismo se comunican a través de una amplia variedad de mecanismos los cuales no solo incluyen la liberación de moléculas, sino también de vesículas que viajan hasta la célula diana afectando su actividad y función, ejemplo de ello son los exosomas, los cuales son un subconjunto de vesículas extracelulares con un diámetro entre 30-100 nm (Raposo & Stoorvogel, 2013; Koumangoye *et al.*, 2011). Están delimitados por una bicapa lipídica y desprovistos de orgánulos celulares, tienen una densidad de (1.13 a 1.19 g/ml), y una morfología de “plato” visto en el microscopio electrónico (Figura 1), además contienen elementos moleculares específicos de la célula de origen, incluyendo proteínas, lípidos, ARNm/ miARN (Figura 1) (Yu *et al.*, 2015).

A la fecha se han identificado como moléculas cargo a 4,563 proteínas, 1,639 mRNA y 764 miRNA, provenientes de distintos tipos celulares (Yu *et al.*, 2015).

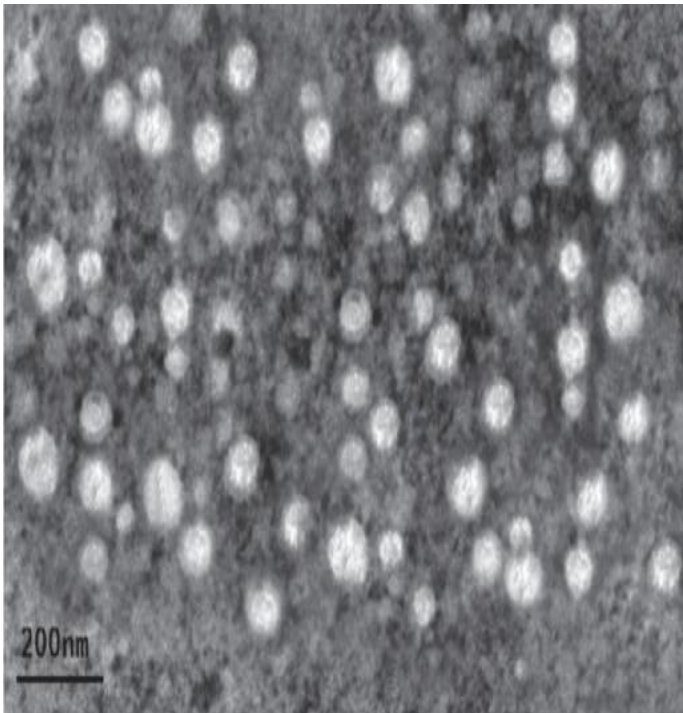


FIGURA 1.

Exosomas aislados y purificados de células T-24. Micrografía electrónica de transmisión. (Yang *et al.*, 2013)

La primera descripción de los exosomas fue hecha en 1980 por Rose Johnstone donde proponía que solo eran liberados por reticulocitos (glóbulos rojos inmaduros), sin embargo los exosomas son secretados por varios tipos celulares: tanto células hematopoyéticas, por ejemplo linfocitos T y B, plaquetas, células dendríticas y macrófagos, así como también por células de origen no hematopoyético: células de Schwann, astrocitos, fibroblastos y **células tumorales**, en estas últimas se ha demostrado que son capaces de liberar una mayor cantidad de exosomas al espacio extracelular ya que en un estudio de Rabinowits en el 2009 demostró que existe una mayor concentración de exosomas en pacientes con adenocarcinoma 2.85 mg/ml respecto al grupo control 0.77 mg/ml.

También los exosomas son liberados hacia el espacio extracelular incluyendo fluidos biológicos como: orina, líquido amniótico, saliva, linfa, líquido cefalorraquídeo y sangre, por lo tanto estos son transportados a regiones distantes de su célula de origen. (Tamkovich, et al., 2016). Cuando se les descubrió se creía que servían de “bolsas de basura” es decir para la eliminación de material no deseado por las células, sin embargo su función es aún más compleja, pues estas vesículas juegan un papel esencial en la comunicación intercelular. Recientemente se les ha implicado en diversos procesos patológicos entre ellos el cáncer, pues participan activamente en la transformación oncogénica de las células, en el microambiente tumoral, resistencia a fármacos, y transporte de factores tumorales (Frydrychowicz *et al.*, 2015). Por lo tanto las células tumorales parecieran utilizar a los exosomas como mensajeros para transformar células vecinas y crear un ambiente ideal para su crecimiento y expansión (Kahlert & Kalluri, 2013)

De tal manera estas vesículas podrían utilizarse para una temprana detección o control del cáncer; por otra parte, la estructura y función de los exosomas pueden hacerlos útiles en el diagnóstico y pronóstico del cáncer.

2.1.1 Biogénesis de los exosomas.

El mecanismo detallado para la biogénesis de los exosomas no está totalmente definido, sin embargo modelos actuales sugieren que se forman dentro de la vía endocítica y se liberan mediante la fusión de los cuerpos multivesiculares (MVBs) con la membrana plasmática (Kahlert & Kallury., 2013; Frydrychowicz et al., 2015).

Se forman durante la maduración del endosoma temprano al endosoma tardío con la acumulación de vesículas intraluminales (VI), que una vez liberadas al espacio extracelular les llamaremos exosomas (Dimov et al., 2009). Tras la maduración de los MVBs, éstos pueden ser fusionados con el lisosoma donde su contenido será sometido a degradación o pueden fusionarse a la membrana plasmática liberando su carga al medio extracelular (Ver Figura 2). El destino de una u otra vía no está totalmente claro. No obstante, se supone que podrían existir dos tipos MVBs, unos exclusivos para la fusión con lisosomas y otros que se fusionan con la membrana plasmática; sin embargo esto es solo especulativo ya que no hay estudios claves que lo demuestren (Frydrychowicz et al., 2015).

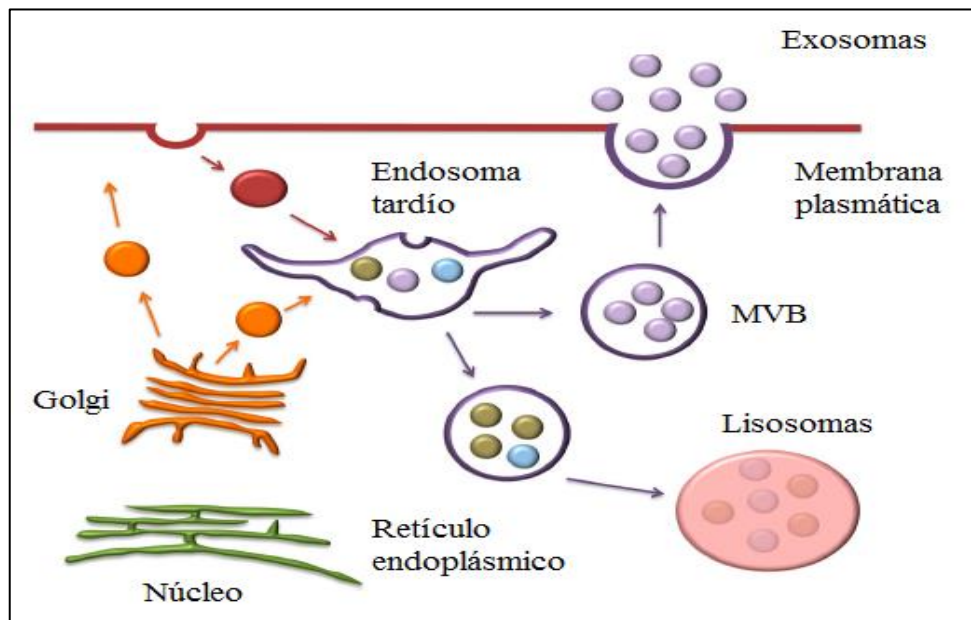


FIGURA 2. Biogénesis de los exosomas.

Una vez maduros los MVB pueden fusionarse con la membrana plasmática y liberar sus vesículas intraluminales llamadas exosomas al medio extracelular. (Villagrasa et al., 2014)

Hasta la fecha se han descrito dos vías distintas para la formación de vesículas dentro de los MVBs, la primera es mediada por el complejo ESCRTs (complejo endosomal requerido para el transporte y clasificación), y la segunda vía es ESCRTs independiente (Tanaka et al., 2008).

El complejo ESCRTs es una maquinaria proteica compuesta por 20 proteínas que se ensamblan dentro de cuatro complejos ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III, y Vps4. En la superficie citoplasmática del endosoma, la proteína cargo es capturada por ESCRT-0 y ambos son retenidos por una red de clatrina, posteriormente se pasa a ESCRT-1 y sucesivamente al ESCRT-II (Tanaka et al., 2008). Diferentes trabajos revelan que estos complejos tienen dominios de unión a ubiquitina, y por lo tanto tienen un papel central en la clasificación de proteínas cargo en las VI (Hannafon et al., 2013). Sin embargo ESCRT-III no tiene dominios de unión a ubiquitina y es probablemente debido a que recluta a enzimas desubiquitizadoras con el objetivo de remover ubiquitina de las proteínas cargo, así como también se encarga del cierre y escisión de la vesícula. Mientras tanto Vps4 induce la disociación de la maquinaria ESCRT de manera ATP dependiente. (Dimov et al., 2009)

La segunda vía de formación de VI en los MVBs, es independiente ESCRTs, la cual requiere del esfingolípido ceramida, ésta es sintetizada por las enzimas esfingomielinasa ácida (aSMase) o por esfingomielinasa neutra (nSMase). Esta última media la hidrólisis de la esfingomielina, para formar ceramida, la cual es indispensable para la invaginación de la membrana y formación de vesículas dentro de los MVBs (Frydrychowicz et al., 2015).

El que existan dos vías distintas es muy interesante, ya que la depleción de componentes del complejo ESCRT no reduce la secreción de exosomas por los MVBs (Frydrychowicz et al., 2015). Por otra parte la secreción de exosomas puede verse afectada por varios mecanismos, entre ellos; aumento intracelular de calcio, estrés e hipoxia. (Kharaziha et al., 2012).

La composición de los exosomas es analizada por diferentes métodos tales como citometría de flujo, inmunoelectromicroscopia y western blot posterior a un fraccionamiento diferencial del medio de secreción (Kharaziha et al., 2012). Las proteínas cargo de los exosomas (ver figura 3) varía dependiendo de la célula y tejido de origen, no obstante, tienen una serie de componentes proteicos conservados. Las proteínas citosólicas presentes en los

exosomas incluyen las Rabs, que constituyen una gran familia de pequeñas GTPasas las cuales promueven el acoplamiento y fusión con la membrana, anexinas, incluyendo I, II, V, VI las cuales regulan la dinámica del citoesqueleto y eventos de fusión con la membrana, además de proteínas del choque térmico Hsp 70, Hsp 90, que pueden facilitar la carga de péptidos en el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II, así como también proteínas del citoesqueleto como miosina y actina. (Mathivanan et al., 2010).

Los marcadores celulares conservados de los exosomas son las tetraspaninas que incluyen: CD 9, CD63, CD81. Las tetraspaninas son proteínas que se encuentran constitutivamente expresadas en los exosomas y que contribuyen a la selección de célula blanco (Asfar et al., 2012).

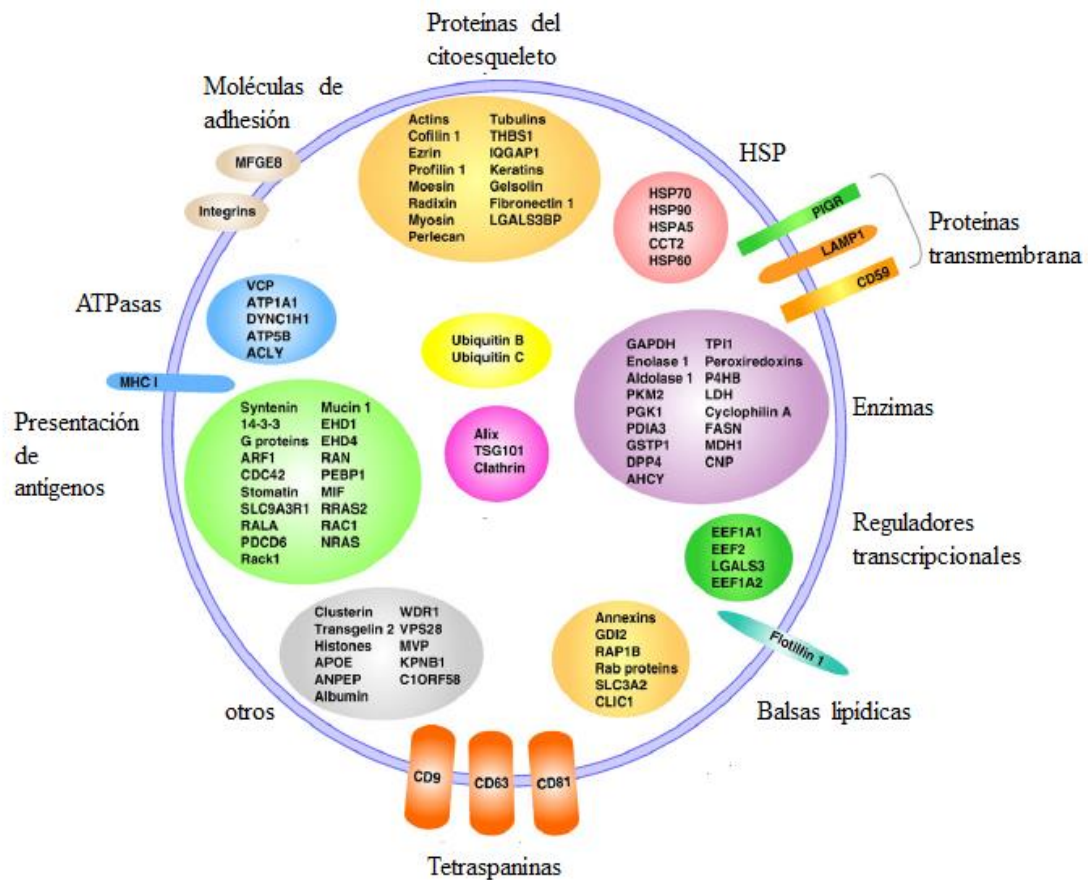


FIGURA 3. Composición proteica de exosomas.

Las proteínas cargo han sido determinadas mediante estudios proteómicos. (Mathivavan et al., 2010)

Adicionalmente mediante los mecanismos de liberación exosomal se ha determinado la participación de una serie de proteínas de la familia Rab, incluyendo RAB27A Y Rab27b las cuales participan como reguladores claves en la vía de secreción de los exosomas además estas proteínas interactúan con complejos proteicos que regulan la fusión del exosoma con la membrana de la célula receptora (Mathivanan et al., 2010).

2.1.2 Exosomas y cáncer.

La organización mundial de salud estima que el cáncer de mama representa el 16% de todos los cánceres femeninos, siendo el cáncer más frecuente entre las mujeres de todo el mundo ya que muestra un aumento especialmente marcado en los países en vías de desarrollo, donde la mayoría se diagnostican en etapas avanzadas (Villagrasa et al., 2014).

El desarrollo del cáncer es un proceso de múltiples pasos en el cual las células experimentan acumulación de modificaciones genéticas que tienen como resultado un crecimiento descontrolado, también las células son capaces de liberar exosomas que tienen como carga a oncogenes, y a otras moléculas bioactivas relacionadas con el desarrollo tumoral, las cuales no solo modifican a las células vecinas sino que pueden viajar a través de los fluidos corporales y llegar a células blanco lejanas en diferentes tejidos (Figura 4) (Mollaei et al., 2017).

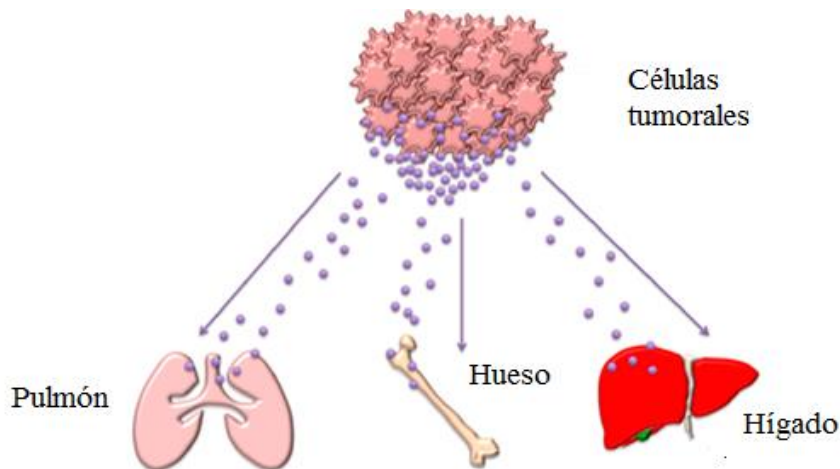


FIGURA 4. Migración de exosomas.

Los exosomas pueden viajar a través de fluidos corporales y llegar a otros tejidos (Villagrasa et al., 2014).

En general se reconoce que tanto las células tumorales y su microambiente contribuyen a la progresión del tumor y metástasis, la importancia del microambiente tumoral se ve reflejada por la inclusión de células del estroma, factores solubles, moléculas, y exosomas. Las células del estroma se componen de fibroblastos, células del sistema vascular, y células del sistema inmune, mientras que los factores solubles incluyen; factores de crecimiento, hormonas, citoquinas. Además otra característica importante en el microambiente tumoral es la hipoxia, ya que esta facilita la liberación de los exosomas que promueven la angiogénesis (Kalluri, 2016).

El papel de los exosomas en el cáncer es multifactorial ya que están relacionados con: la iniciación, crecimiento, progresión, resistencia a fármacos, inmunosupresión, interacciones con el medio ambiente tumoral, formación del nicho pre-metastásico, angiogénesis, diferenciación de fibroblastos etc. (ver figura 5). La generación de inmunosupresión es muy importante para el desarrollo tumoral, en el cual se ha demostrado que los exosomas están implicados en la inducción de apoptosis de las células T, en la inhibición de citotoxicidad de las células NK (Kahlert & Kallury., 2013).

Experimentos *in vitro* han revelado que TGF- β 1 expresado en los exosomas puede desencadenar la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, lo cual resulta muy interesante ya que estos últimos son clave para el remodelamiento de la matriz extracelular, también, en el cáncer de mama se ha observado que los adipocitos derivados de las células mesenquimales pueden convertirse en miofibroblastos mediante la vía SMAD (Kahlert & Kallury., 2013). Otros estudios en líneas celulares de cáncer de mama, han confirmado que los exosomas llevan consigo moléculas con antígenos expresados en la superficie celular (Palazzolo et al., 2012). De hecho las vesículas provenientes de las células MDA-MB-231 células de cáncer de mama y células de glioblastoma U87 demostraron ser capaces de conferir un fenotipo tumoral a las células MCF-10A (que son células de mama normales). Esta es una evidencia directa de que las células normales adquieren un fenotipo tumoral cuando son expuestas a exosomas provenientes de células tumorales, por lo tanto la masa tumoral no solo depende de la expansión clonal sino también de los exosomas, los cuales están provocando la transformación de las células del estroma (Villagrasa et al., 2014), además, los exosomas de las células MDA-MB-231 y los de las células U87 de glioblastoma

también son capaces de conferir un fenotipo tumoral a NIH3T3 fibroblastos (fibroblastos embrionarios de ratón) y a las células MCF-10 A, en estos co-cultivos estas células empiezan a adquirir un fenotipo tumoral como: incremento de su supervivencia, y habilidad para vivir en condiciones pobres de suero, que representa una menor cantidad de factores de crecimientos externos (Villagrasa et al.,2014).

Por otra parte se ha demostrado que los exosomas provenientes de las células T-24 de cáncer de vejiga, promueven la proliferación e inhiben la apoptosis, donde los niveles de Bcl-2 y su mRNA se encuentran incrementados mientras que las concentraciones de Bax y su mensajero se encuentran reducidos, es importante resaltar que la expresión de ciclina D1 está significativamente incrementada (Yang *et al.*, 2013).

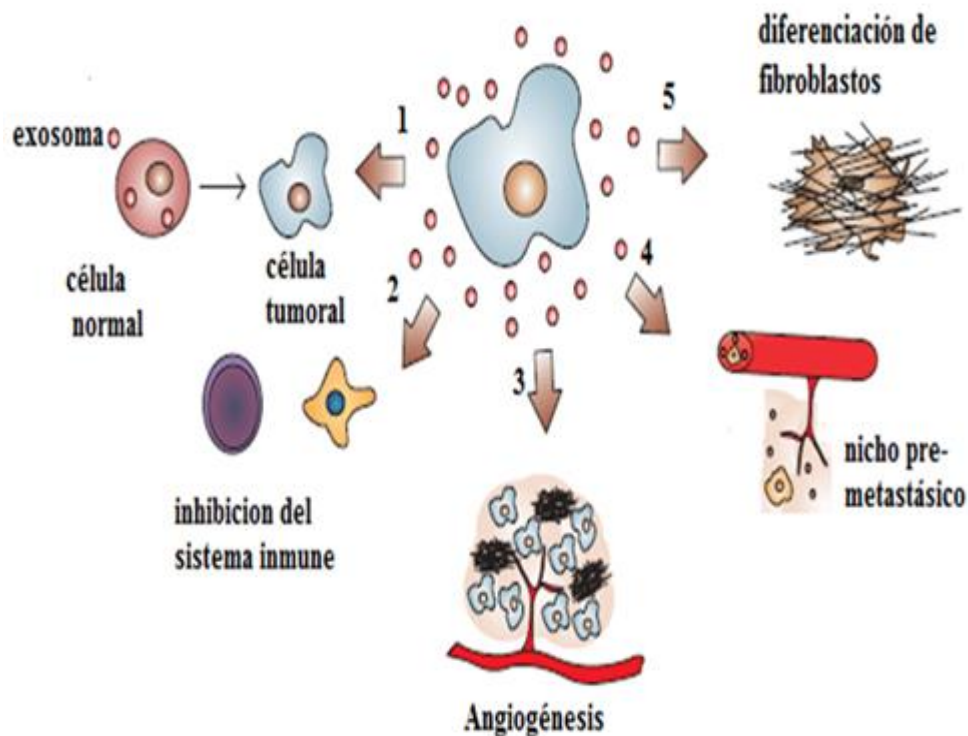


FIGURA 5. Microambiente tumoral generado por exosomas provenientes de células tumorales. 1) modificación del fenotipo de células tumorales después de la internalización, 2) inhibición de la respuesta inmune contra células tumorales inhibiendo la actividad proliferativa de células del sistema inmune, 3) los exosomas contienen factores que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos que promueven el desarrollo tumoral. 4) los exosomas provenientes de células tumorales inician la formación del nicho pre-metastásico en otros tejidos 5) activación y diferenciación de fibroblastos.

Como puede verse hasta ahora todos los trabajos descritos solo mencionan el papel del exosoma en la comunicación célula-célula, no obstante la relación exosoma-matriz extracelular no ha sido estudiada a profundidad. Sin embargo, esta interacción es de suma importancia en procesos del desarrollo del cáncer, ya que la modificación de la MEC es crucial para procesos de migración, invasión y metástasis.

En un trabajo reciente en el Laboratorio de Bioquímica Celular del instituto de fisiología BUAP, se ha determinado la presencia de furina en los exosomas liberados por los macrófagos activados por LPS de la línea celular U937. (Ortega Jennifer, 2015) Esta enzima en el cáncer tiene un papel clave ya que escinde sustratos que potencian la actividad tumoral tales como MT1-MMP y otros. **Los Análisis de proteómica de exosomas** han revelado que algunas MMPs se encuentran en ellos como proteínas cargo por ejemplo ADAM 10 (Shimoda & Khokha., 2012).

En la siguiente tabla se enlistan algunos de los sustratos de las enzimas proteolíticas presentes en las células, sin embargo a nivel exosomal las funciones son poco conocidas.

ENZIMAS PROTEOLITICAS	FUNCIONES BIOLÓGICAS
FURINA	Activación de MMPs
MMP-2 (gelatina A)	Digestión de gelatina.
MMP-9 (gelatina B)	Digestión de gelatina, colágeno tipo IV
MT1-MMP o MMP-14	Digestión de colágeno tipo I, II,III, y activación de MMP-2.

En este trabajo de Tesis nosotros estudiaremos la asociación de los exosomas como vesículas con actividad proteolítica sobre la matriz extracelular, la cual es uno de los primeros pasos para la invasión y metástasis.

2.2 Furina.

Furina es una serin-proteasa dependiente de calcio que pertenece a la familia de las proteínas convertasas (PC), también es conocida como PACE 1 (Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme) o SPC1 y es el miembro mejor caracterizado de las PC (Gemma et al., 2011). *FUR* es el gen que codifica para furina y contiene al menos tres diferentes promotores dos de los cuales, P1A y P1B son responsables de la expresión constitutiva y otro P1 para la expresión inducible (Ayoubi et al.,1994).

Furina es responsable del procesamiento de proteínas precursoras inactivas a proteínas funcionales dentro de la vía secretora en el *trans*-Golgi (TGN), escinde diferentes sustratos; tales como factores de crecimiento, hormonas, receptores, MMPs, etc. Para activarlos realiza un corte en el sitio consenso el cual está localizado después de la Arg carboxilo-terminal en la secuencia -Arg-X-Lys/Arg-Arg-↓ (donde Lys es lisina, X es cualquier otro aminoácido e ↓ identifica el sitio de corte); aunque también puede procesar sustratos que contengan la secuencia Arg-X-X- Arg-↓, la cual representa la secuencia mínima consenso en el extremo carboxilo terminal (Coppola et al., 2008; Thomas, 2002). Furina ejerce su actividad en un **amplio rango de pH de 5.0 a 8.0** dependiendo el tipo de sustrato que procese (Molloy S. 1992).

En cuanto a su estructura furina, comparte un alto grado de identidad en su secuencia con otras PC, la gran similitud reside en los dominios catalíticos, donde Aspartato, Histidina y Serina forman la triada catalítica y son rigurosamente conservados (Thomas, 2002).

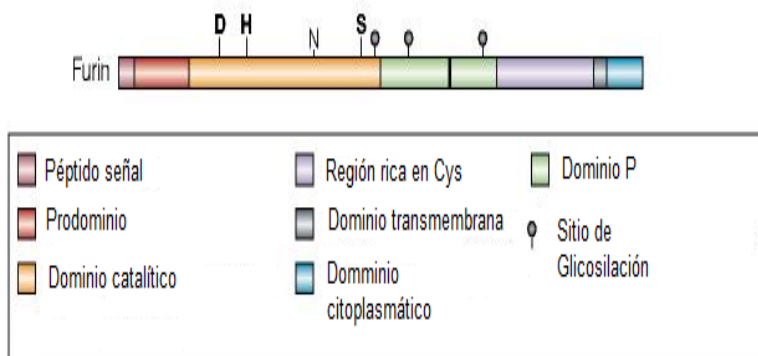


FIGURA 6.
Estructura proteica de furina.

En el dominio catalítico se expresan las posiciones de los residuos catalíticos D,H, S.

Furina está constituida por: un péptido señal, un prodominio, dominio catalítico, un dominio P, así como también una región rica en cisteína, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático. El péptido señal dirige la translocación de la proteína al retículo endoplásmico, mientras que el prodominio tiene un papel crucial en el plegamiento, activación y en la regulación de su actividad enzimática. El dominio P es primordial para la actividad de la enzima debido a que participa en la modulación de pH y requerimientos de calcio (Figura 6) (Thomas, 2002).

Para que Furina actúe sobre sus pro-proteínas sustratos es necesario primero que se auto-active, para ello se necesita la translocación de esta convertasa al retículo endoplásmico (RE) el péptido señal se escinde, y el prodominio actúa como una chaperona intramolecular que facilita el plegamiento y activación del sitio catalítico (ver Figura 7). Furina se auto activa mediante dos procesos consecutivos, el primero ocurre en un ambiente de pH neutro en el retículo endoplásmico a nivel del sitio consenso -Arg-Thr-Lys- Arg107↓, este pro-péptido no se libera sino que permanece unido a la forma madura de furina. Para desplazarlo se necesita de un segundo corte auto-proteolítico, el cual ocurre en el TGN, en condiciones más ácidas y alto contenido en calcio, en la secuencia consenso -Arg70Gly-Val-Thr-Lys-Arg 75↓, a nivel de la Arginina 75 (Thomas, 2002).

Una vez que se escinde el pro-péptido en el TGN, pierde su inhibición y esta convertasa ya puede actuar sobre sus sustratos. Los pesos moleculares de furina reportados tanto para la forma inactiva (pro-furina) como activa son de 110 kDa y 97 kDa, respectivamente (Creemers et al., 1995).

Furina una vez que fue translocada como precursor en el RE, transita a través de varios compartimentos celulares tales como TGN, endosomas, lisosomas y membrana celular, pasando probablemente por los cuerpos multivesiculares, pudiendo realizar vías de reciclaje. Durante este mecanismo Furina puede sufrir un tercer procesamiento catalítico pero esta vez en su dominio transmembrana produciendo una forma de la enzima activa soluble con un peso molecular aproximado de entre 80-82 kDa, capaz de ser secretada al espacio extracelular (Bassi et al., 2003)

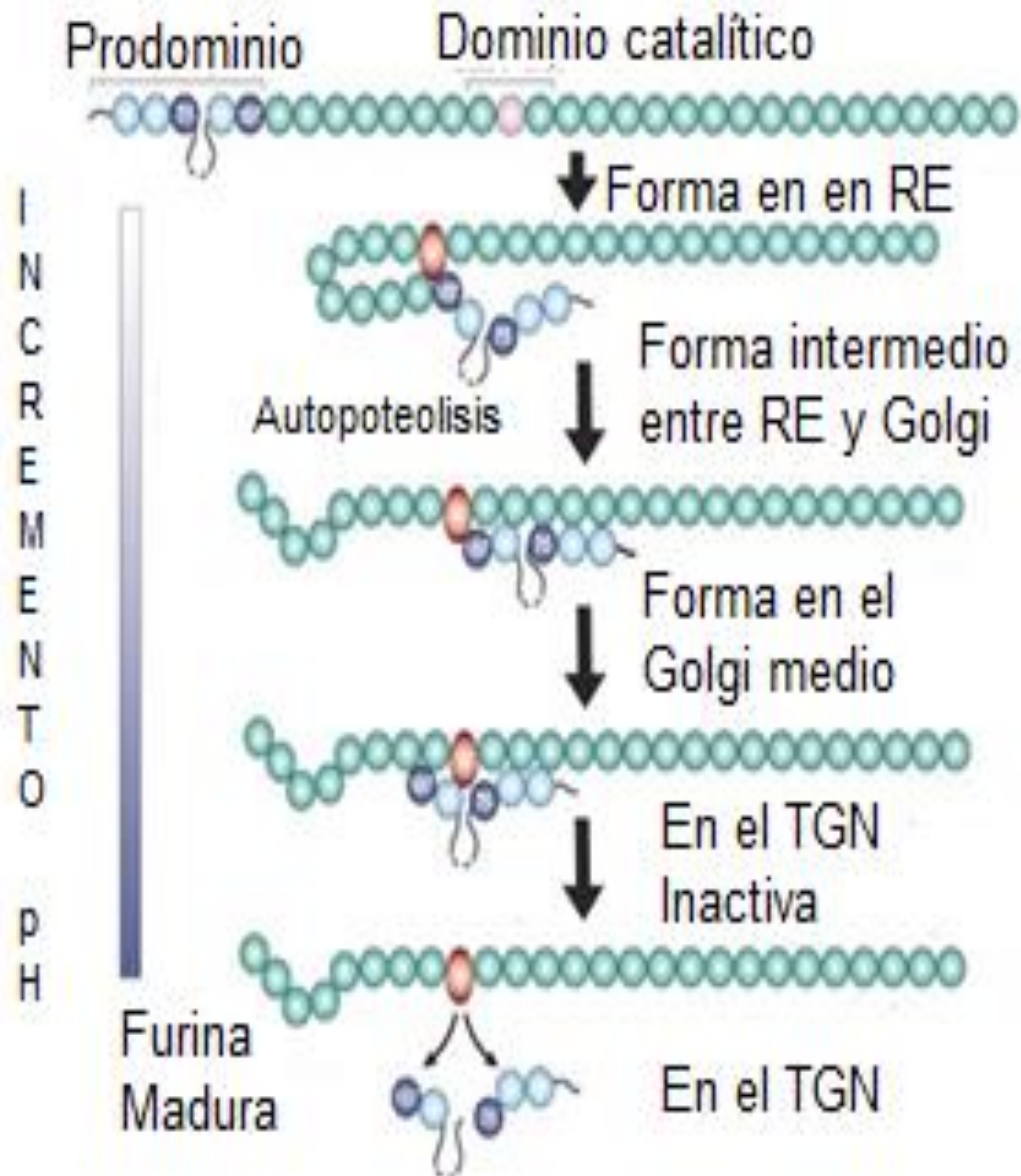


FIGURA 7. Auto-activación catalítica de la enzima furina, después de la translocación y remoción del péptido señal, la enzima furina transita para su activación a través de los compartimentos intracelulares Figura tomada y modificada de (Thomas Gari. 2002).

Determinar la localización de furina en la célula es muy importante, debido a la gran variedad de proteínas que son procesadas en más de uno de los compartimentos celulares, ya desde 1992 con estudios de Molloy y colaboradores demostraron que furina activa muestra un patrón de expresión diferente a su zimógeno; concluyendo que la furina madura se encuentra mayormente expresada en el TGN. Además este grupo demostró mediante estudios de delección y mutación en la cola citoplasmática de furina, que se produce una enzima incapaz de reciclarse entre la membrana plasmática y el TGN, indicando que la información que se encuentra en su dominio citoplasmático es necesario para conferir una correcta localización de la enzima.

Furina se encuentra ubicuamente expresada, y debido a su alta distribución celular, no sorprende que esta enzima sea capaz de procesar y activar a una gran variedad de sustratos, que intervienen en procesos celulares fisiológicos, por ejemplo: factores de crecimiento, hormonas, receptores de superficie celular, factores de coagulación, metaloproteinasas de la matriz extracelular. No obstante, también se ha determinado la contribución de furina en diferentes procesos patológicos tales como: Alzheimer, artritis, y cáncer. En este último se ha reportado que existe una elevada expresión de furina, la cual tiene como consecuencia un aumento en la agresividad tumoral y metástasis, así como también en sus sustratos que participan en la progresión tumoral, angiogénesis y degradación de la MEC principalmente mediante la activación de las MMPs (Siegfried et al., 2003).

En cuanto a la expresión de furina en células normales se sabe que ésta se encuentra expresada en bajos niveles, sin embargo en condiciones tumorales se encuentra asociada con el desarrollo del fenotipo maligno celular, adicionalmente se han encontrado altos niveles de mRNA en tumores humanos (Bassi., 2001) por ejemplo en cáncer de mama hay una relación entre el incremento de la expresión de furina con un aumento en la invasividad de la células tumorales. También, controla la proliferación celular tumoral mediante el procesamiento y secreción de TGF- β 1 (Taylor et al., 2003). Por otra parte, estudios realizados en cáncer uterino han determinado que una alta expresión de furina promueve la migración de estas células tumorales (Kumar et al. 2010).

Hasta la fecha se han demostrado que esta sobreexpresión de furina se correlaciona con el aumento en el procesamiento de una gran variedad de sustratos que de manera directa o indirecta participan en la cascada de invasión y metástasis.

Entre los sustratos procesados por furina que intervienen el cáncer se encuentran algunos miembros de la familia de las MMP, las cuales son sintetizadas como precursores inactivos, uno de ellos es la metaloproteinasa MT1-MMP (metaloproteinasa de tipo 1 o también llamada MMP14) la cual está implicada en eventos de remodelación tisular que abarca desde la invasión tumoral, hasta la angiogénesis y el desarrollo tumoral. (Sato. 1994). La inhibición de furina puede ser una vía prometedora para el tratamiento contra el cáncer, ya que se ha observado *in vitro*, que las células de fibrosarcoma tratadas con Val-Lys-Arg-clorometilcetona decrecientan su habilidad invasora. Por otra parte la variante de antitripsina Portland ($\alpha 1$ -PDX), impide la movilidad e invasividad de las células de adenocarcinoma de colon y de glioma. (Jean et al.,1998; Bassi et al., 2003).

Otros inhibidores de furina tales como PMSF, TLCK y diisopropyl fluorofosfato, logran inhibir a furina a altas concentraciones desde 5-30 mM. TLCK es un inhibidor irreversible que se une al sitio activo de la serin-proteasa, previendo la degradación proteolítica de sus pro-proteínas sustratos (Molloy, 1992).

Para el desarrollo experimental de esta tesis se utilizó como inhibidor de furina a TLCK.

2.3 Metaloproteinasas.

Las metaloproteinasas de la matriz extracelular, constituyen una familia de endopeptidasas neutras dependientes de Zn^{2+} y Ca^{2+} , las cuales fueron descritas a mediados del siglo pasado, éstas juegan un papel crucial en varios procesos fisiopatológicos los cuales incluyen: remodelación tisular, regulación de procesos inflamatorios, así como también tienen una participación importante en el cáncer. En el ser humano se han descrito 23 MMP codificadas por 24 genes. Estas enzimas son capaces de procesar todos los componentes de la matriz extracelular, por lo tanto su actividad proteolítica debe ser regulada necesariamente por sus inhibidores endógenos, inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) (Shimoda & Khokha, 2013).

Basándose en la homología de su secuencia y especificidad de su sustrato las MMP pueden clasificarse en varios grupos incluyendo: colagenasas/estromelinas gelatinasas, matrilisinas y las metaloproteinasas de tipo membranal (MT-MMP). Una característica importante de las MMPs es el conservado motivo de unión a zinc HEXXHXXGXXH. En cuanto a su estructura las MMPs (figura 8) comparten características estructurales similares, todas tienen un péptido señal N-terminal que dirige a las enzimas a la vía secretora, un

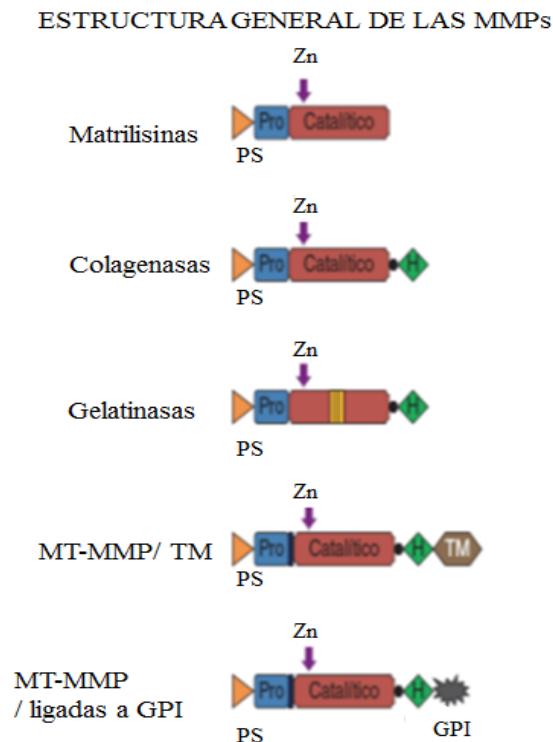


FIGURA 8. Estructura general de las diferentes MMPs. Se observa la unión del ion Zinc al dominio catalítico, así como también se observa el péptido señal (PS).

prodominio con una secuencia conservada PRCGXPD. Este dominio es el que mantiene a la enzima latente hasta que se elimina por proteólisis dirigida por la acción de otra enzima, un dominio catalítico que tiene la región conservada de unión a Zn^{2+} . A excepción de las matrilisinas (MMP-7 y -26), todas las MMPs tienen un dominio de hemopexina C-terminal, vinculado con el dominio catalítico a través de una región bisagra la cual consta de unos 10-30 aa. El dominio hemopexina ejerce influencia sobre la unión a TIMP, algunas MMPs contienen dominios adicionales incluyendo un dominio de unión a gelatina (MMP2 y MMP9) (Hadler et al., 2011).

Las MMPs son sintetizadas como zimógenos (pro-MMPs), las cuales permanecen inactivas debido a la interacción entre una cisteína en el pro-péptido y un ión Zinc que se encuentra en el dominio catalítico, la activación requiere, la remoción proteolítica o deslocalización del pro-péptido. Al menos dos mecanismos están envueltos en la activación de las MMPs. Uno es el clivaje proteolítico y remoción de pro-péptido y el otro es la activación alostérica donde el pro-péptido es desplazado del sitio catalítico sin necesidad de que sea cortado (Hadler et al., 2011). Muchas de las pro-MMPs son secretadas al espacio extracelular y su activación ocurre del lado extracelular, por el contrario las de tipo transmembrana (MT-MMPs) son activadas del lado intracelular por furina, antes de que alcancen la superficie celular (Egeblad et al., 2002; Itoh., 2015; Hadler et al., 2011).

2.3.1 MMPs y cáncer.

Se sabe que las MMPs activas en las células son capaces de degradar componentes de la MEC, el clivaje de ciertas proteínas por ejemplo laminina y colágeno, cuyos fragmentes de éstas exponen “criptic sites” (sitios crípticos) que facilita la migración celular (Egeblad et al., 2002, Shimoda & Khokha, 2013). Adicionalmente las MMPs tienen otros tipos de sustrato por ejemplo receptores de factores de crecimiento y moléculas de adhesión celular. La escisión de E-cadherina y CD44 liberan fragmentos del dominio extracelular responsables del aumento de la conducta invasiva (Seiki, 2003).

La MEC juega un papel importante en el soporte estructural, señalización celular, y respuesta a factores de crecimiento. La composición de la MEC depende del equilibrio entre la actividad y la inhibición de las MMPs, el cambio del microambiente mediante la degradación de la MEC, el procesamiento de factores de crecimiento y la activación de las moléculas de adhesión. Todas estas acciones son esenciales para la proliferación y progresión tumoral, donde las MMPs son cruciales para dichos procesos, cuya expresión se encuentra elevada (Angosto. 2009) e inversamente las células altamente malignas llegan a disminuir su agresividad cuando la expresión de las MMPs se ve reducida y esto es debido a que la actividad de éstas es requerida para la activación de moléculas pro-tumorales (Egeblad et al., 2002).

En los tumores humanos, las MMPs son producidas por las células tumorales y del estroma, ya que las células tumorales estimulan a las células del estroma para producir las MMPs de manera parácrina a través de la secreción de interleucinas, interferones, y factores de crecimiento. Además, existe evidencia experimental del rol de las MMPs en la metástasis, en la cual hay una sobre-expresión de MT1-MMP, MMP-2 y MMP-9 (Seiki, 2003).

2.3.2 MT1-MMP o MMP-14 y MMP-2.

El papel fisiológico de las MMP es la regulación homeostática del medio extracelular, y no solo para degradar componentes de la matriz extracelular como su nombre lo indica. Por casi tres décadas el interés por las MMPs ha ido en incremento, ya que varias enfermedades tales como el cáncer son asociados con una alta expresión de estas enzimas (Ohuchi, 1997).

MT1-MMP es una de las metaloproteinasas más estudiadas, fue originalmente descubierta y caracterizada como activador de la proMMP-2 en las células tumorales, pero, en otros tipos celulares también la expresan por ejemplo: fibroblastos, osteoclastos, etc. El fenotipo de ratones MT1-MMP knockout, provoca defectos en el desarrollo esquelético y pulmonar, fibrosis así como también anomalía craneofacial, todo esto es debido a la falta de su actividad colagenolítica (Itoh et al., 2015).

MT1-MMP es sintetizada como un precursor inactivo o proenzima: pro-MT1-MMP (~64 kDa), y tiene en su estructura dos sitios consenso de reconocimiento y activación en la región del prodominio (Sounni et al., 2002). De todas las PCs estudiadas, furina es la enzima que realiza la ruptura en ambos sitios consenso en el prodominio mayor eficiencia $R^{89}-R-P-R \downarrow C^{93}$ y $R^{108}-R-K-R \downarrow Y^{112}$ (Vindrola, 1994). El procesamiento de pro-MT1-MMP ocurre intracelularmente en el tránsito desde la salida del aparato de Golgi y antes de su llegada a la membrana plasmática (Mazzone et al., 2004). Adicionalmente, varios procesos se han desarrollado para el control y disponibilidad de MT1-MMP activa en la membrana plasmática, estos son: procesamiento autocatalítico, reciclado de proteínas, homodimerización y endocitosis. El primero resulta de la escisión de MT1-MMP en dos fragmentos uno soluble de 20 kDa y otro inactivo de 43 kDa que se queda anclado a la membrana (Osenkowski et al., 2004; Hakulinen et al., 2008), mientras que la endocitosis de MT1-MMP es mediada por clatrina y caveolina, llegando al endosoma temprano y tardío (Poincloux et al., 2009). Sin embargo estos procesos que mantienen el control de la disponibilidad en la membrana plasmática de las células tumorales, parecen no ser suficientes. Por otra parte Poincloux y colaboradores en el 2009 demostraron una disminución de caveolina 1 en las células tumorales lo que contribuye a la disminución de endocitosis y una mayor exposición de MT1-MMP en la membrana plasmática, la cual se encuentra funcionalmente activa participando directamente en la degradación de la matriz

extracelular que rodea a los vasos sanguíneos, en la invasión de las células endoteliales y tubulogénesis, favoreciendo de esta manera la neovascularización del tumor (Remacle et al., 2006; Hannafon et al., 2013), no obstante MT1-MMP, es capaz de activar a otras MMPs en el espacio extracelular, mediante la remoción del prodominio. Uno de los sustratos de MT1-MMP (~55 kDa) madura activa es la pro-MMP-2 (pro-gelatinasa) para generar MMP-2 ó collagenasa A con lo cual se potencia la degradación de componentes de la MEC. (Itoh et al., 2015).

El modelo de activación de la MMP-2 por MT1-MMP involucra a TIMP-2 y a la homodimerización de MT1-MMP, este complejo se forma por el dominio hemopexina y de transmembrana, en el cual una de las moléculas de MT1-MMP es inhibida por TIMP-2 que se une al sitio catalítico, mientras que la proMMP-2 tiene afinidad por el lado carboxilo terminal del inhibidor, por lo tanto se forma un complejo ternario (MT1-MMP₂, pro-MMP2 y TIMP-2), entonces la molécula de MT1-MMP que se encuentra libre, es capaz de remover el prodominio y activar a MMP-2 (ver figura 9) (Itoh et al., 2015)

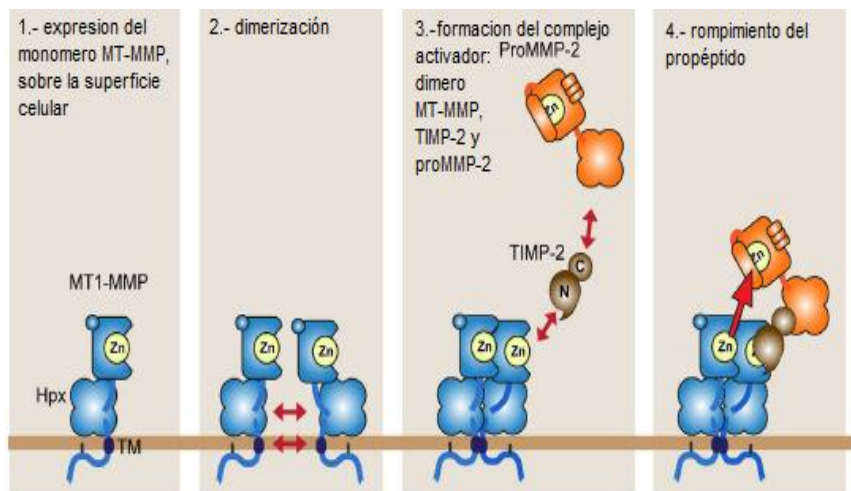


FIGURA 9. Modelo de activación de proMMP-2 por MT1-MMP, en la membrana plasmática. Modificada. Itoh et al., 2015.

En los últimos años varias MMPs han adquirido una gran importancia como blancos de acción terapéuticos para disminuir la invasión y metástasis de diversos tipos de cáncer, y por lo tanto se han desarrollado varias clases de inhibidores que están en fase de experimentación I, II y/o III (Nuti et al., 2007). Sin embargo, una gran cantidad de ellos no han demostrado tener la eficacia que se esperaba en cuanto al aumento de supervivencia del paciente y la disminución de la diseminación de las células malignas en comparación con las terapias convencionales.

Además, en un trabajo experimental se demuestra que furina no sólo corta el prodominio de pro-MT1-MMP para que MT1-MMP ejerza su actividad enzimática, sino que además controla los niveles de MT1-MMP activa en las células tumorales. Por lo que los autores sugieren que furina u otras convertasas relacionadas serían en realidad las moléculas claves que controlan los niveles de la enzima MT1-MMP funcionalmente activa y madura en la superficie celular para generar continuamente la proteólisis pericelular (Remacle et al., 2006)

Por otro lado, la inhibición de la enzima furina en células de carcinoma de cuello y cabeza, así como también en células escamosas y de astrocitomas, produce una disminución en el procesamiento de MT1-MMP y como consecuencia de MMP-2 dando como resultado una disminución en la metástasis tumoral; este fenómeno es observado en ensayos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo* (Bassi et al., 2003).

MT1-MMP promueve la degradación de componentes de la matriz extracelular tales como fibronectina, laminina, vitronectina y colágeno fibrilar tipo I, II, III así como también, degrada moléculas de adhesión por ejemplo CD44 e integrinas. Además, es capaz de activar otras MMP como MMP-2 y MMP-13 (Itoh et al., 2015).

MT1-MMP, MMP-2 y MMP-9 se encuentran ampliamente expresadas en los invadopodios o frente de invasión celular (Sato et al., 1994; Seiki, 2003), estas son protuberancias de la membrana plasmática que se forman por re-arreglos de los microfilamentos de actina, y juegan un rol fundamental en la invasión tumoral, ya que promueven la intravasación al torrente sanguíneo y vasos linfáticos así como también una extravasación a sitios secundarios (ver Figura 10). La organización estructural de invadopodia es independiente de MT1-MMP. Los estudios realizados en la línea celular

MDA-MB-231, las cuales presentaban una depleción de MT1-MMP se formaron invadopodias pero, eran incapaces de degradar la MEC y de producir metástasis (Tanikawi et al., 2007).

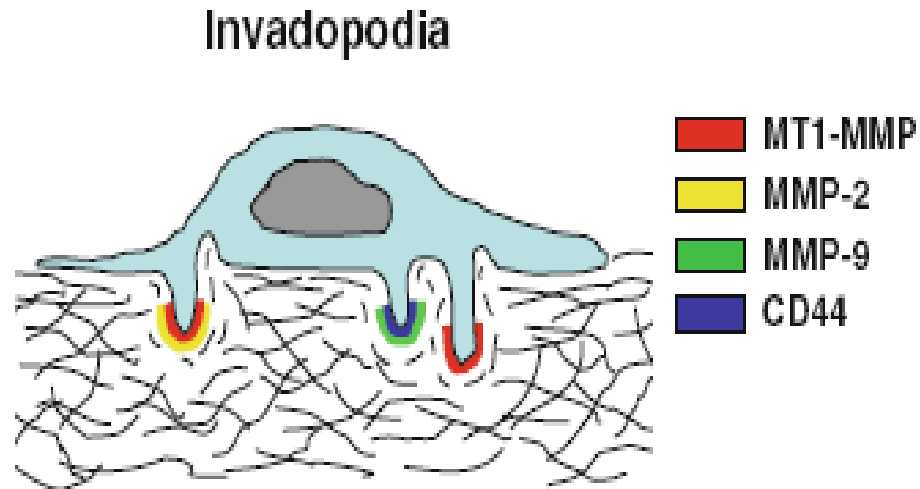


FIGURA 10. Invadopodia: son estructuras especializadas en las células tumorales, están ampliamente relacionadas con la degradación de la MEC. Sin embargo en exosomas no se sabe si estas enzimas se encuentran en el mismo arreglo que en las invadopodias de la membrana celular.

Como puede observarse en la figura 10, se muestran las principales enzimas con actividad proteolítica, presentes en los invadopodias. Estas enzimas pueden activarse mediante el procesamiento de su prodominio.

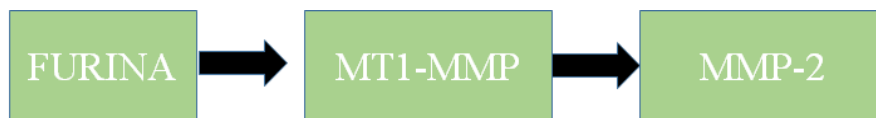


Figura 11. Diagrama de activación de las enzimas proteolíticas.

2.4 MATRIZ EXTRACELULAR.

La matriz extracelular (MEC) es responsable del mantenimiento físico de todas las células y puede ser definida como el componente no-celular de los tejidos, (Kular et al., 2014). La MEC es una extensa red dinámica de proteínas que sirve como andamio para tejidos y órganos (Singh et al., 2012), está conformada por un amplio número de constituyentes macromoleculares que son sintetizados y secretados al medio extracelular formando una estructura altamente organizada, no solo es responsable del mantenimiento celular, sino que también se le ha relacionado con procesos tales como proliferación celular, diferenciación, migración y participa en la regulación de diversas funciones metabólicas. Los conocimientos actuales sobre la MEC demuestran que su composición es compleja y de organización muy variada, los principales constituyentes macromoleculares son: proteoglicanos y proteínas fibrosas tales como colágeno, elastina y proteínas no fibrosas o glicoproteínas, por ejemplo fibronectina, laminina, vitronectina (Kular et al., 2014; Frantz et al., 2010).

El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo, se han descrito 28 tipos, a cada uno de ellos se les ha asignado un número de acuerdo al orden de su descubrimiento. Todos los colágenos son triples trímeros helicoidales (homotrímeros o heterotrímeros) que se caracterizan por repeticiones del triplete Gly-XY, en la cadena de aminoácidos. Los diversos tipos de colágeno pueden ser divididos en diferentes clases:

- Colágeno fibrilar: (I, II, III, V y XI) se auto-ensamblan para formar fibrillas, las cuales se componen de moléculas de colágeno que consisten en una triple hélice de aproximadamente 300 nm de longitud y 1.5 nm de diámetro.
- Colágenos que forman redes: (IV, VII, XV y XVIII) un ejemplo típico de red es la lámina basal que se compone principalmente por colágeno tipo IV.
- Otros colágenos: se asocian con superficies de fibrillas (tipos VI, IX, XII, y XIV). No obstante, otros colágenos son proteínas transmembranales (tipos XIII y XVIII, XXIII y XXV) o forman estructuras de cuentas periódicas (tipo VI) (Bosman, 2003).

Vitronectina es una glicoproteína adhesiva multifuncional, se han encontrado dos formas de ésta, una de ~ 75 kDa conocido como el precursor de vitronectina el cual es escindido por furina en el extremo carboxilo terminal generando otra isoforma de entre ~65

kDa+ ~10KDa la cual está formada por dos cadenas unidas por un enlace disulfuro. Vitronectina está presente en la MEC en forma fibrilar, sin embargo está ausente en la lámina basal (Seiffert, 1997).

Otra glicoproteína es la fibronectina que está presente en la MEC es producida por los fibroblastos y células mesenquimales, no solo es importante para la interacción célula-matriz, sino que también desempeña un papel fundamental en la organización de los otros componentes de la MEC. Esto es debido a que la fibronectina es una proteína muy “pegajosa” ya que tiene sitios de unión para otros componentes incluyendo colágenos. Datos recientes sugieren que la fibronectina junto con las integrinas contribuye a especificar el sitio de unión de las fibras de colágeno (Kular et al., 2014).

La fibronectina es un glicoproteína de la MEC de expresión ubicua, ésta se encuentra conformada por dos subunidades de 250 kDa cada una conectadas por puentes disulfuro del lado carboxilo terminal (Zollinger et al., 2016)

La degradación de la MEC es un paso crucial, pues las células tumorales secretan altos niveles de enzimas proteolíticas, las más sobresalientes son las MMPs y serin proteasas. Los fragmentos producidos por estas enzimas proteolíticas tienen nuevas propiedades, las cuales no se muestran en la molécula nativa completa, estas propiedades se refieren a que dichos fragmentos promueven la up regulación de IL-1 y las MMPs lo que conlleva a un estado pro inflamatorio y además promueven la migración celular (Labat. 2002)

Laminina comprende una familia de 12 glicoproteínas, las cuales son secretadas como heterotrimeros, compuestos de una cadena α , β y γ , respectivamente. Se han caracterizado 12 isoformas y todas comparten ciertos dominios, tales como sitios de unión para nidogen, e integrinas (Tanzer et al., 2006).

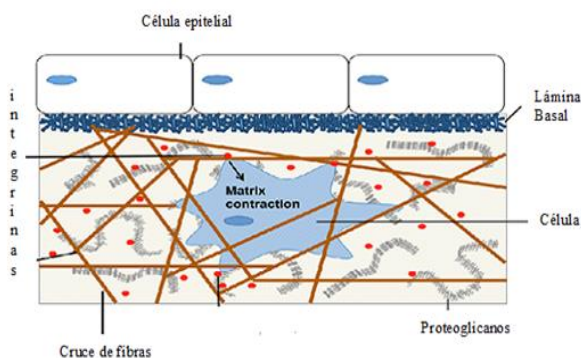


FIGURA 12. Representación de los componentes de la MEC.

La lámina basal es una zona especializada de la MEC, se presenta prácticamente como una malla de 40-120 nm de grosor, que separa a las células epiteliales de los tejidos conectivos y proporciona un soporte estructural. Además determina la polaridad, el metabolismo y la proliferación celular. Sus componentes son colágeno tipo IV, laminina, fibronectina, entactina (nidogen) y perlecan, siendo los dos primeros los primordiales. Nidogen se une a laminina y a colágeno tipo IV formando un puente entre ellos, mientras que perlecan también los une formando dímeros u oligómeros (Tanzer et al., 2006).

Prácticamente todos los órganos y tejidos, tienen una arquitectura organizada, que contiene células adherentes a una lámina basal subyacente, generalmente esta lámina es una barrera impermeable a la migración celular. Las células tumorales tienen la capacidad de degradar esta zona de la MEC, entrar en el sistema circulatorio y posteriormente instalarse en un nuevo tejido (Tanzer et al., 2006). Uno de los primeros signos detectados durante el inicio de la cascada metastásica es precisamente la degradación de la lámina basal.

La cascada metastásica es un proceso complejo que implica la propagación del cáncer, por su naturaleza sistémica y su resistencia a ciertos agentes terapéuticos es difícilmente tratable, por lo tanto se considera la causa de muerte del más del 90% de los pacientes con cáncer (Daves et al., 2011).

Los pasos incluidos para el desarrollo de la metástasis son los siguientes: las células tumorales necesitan liberarse del tumor primario e invadir la MEC circundante, entrar y sobrevivir a la circulación periférica (intravasación). Se cree que las células tumorales viajan como parte de un coágulo de fibrina para protegerse de la tensión tangencial en la circulación, posteriormente al salir del torrente sanguíneo (extravasación), y sobreviven, proliferan en el nuevo entorno. Es primordial que las células tumorales sean capaces de degradar por proteólisis las barreras de los tejidos: la lámina basal y el tejido conectivo intersticial. Durante los procesos metastásicos las células son capaces de atravesar la MEC por tres ocasiones: cuando escapan las células del tumor primario, en la intra y extra-vasación (ver Figura 13) (Arya et al., 2006)

Recientes estudios han confirmado la participación de los exosomas en el proceso metastásico: Ya que los exosomas promueven el establecimiento del nicho pre-metastásico, quizá una de las funciones más estudiadas es su habilidad inmunosupresora. También se ha

demostrado que las tetraspaninas localizadas sobre la superficie de los exosomas son cruciales para el reclutamiento de las células endoteliales y la angiogénesis (Peinado et al., 2011).

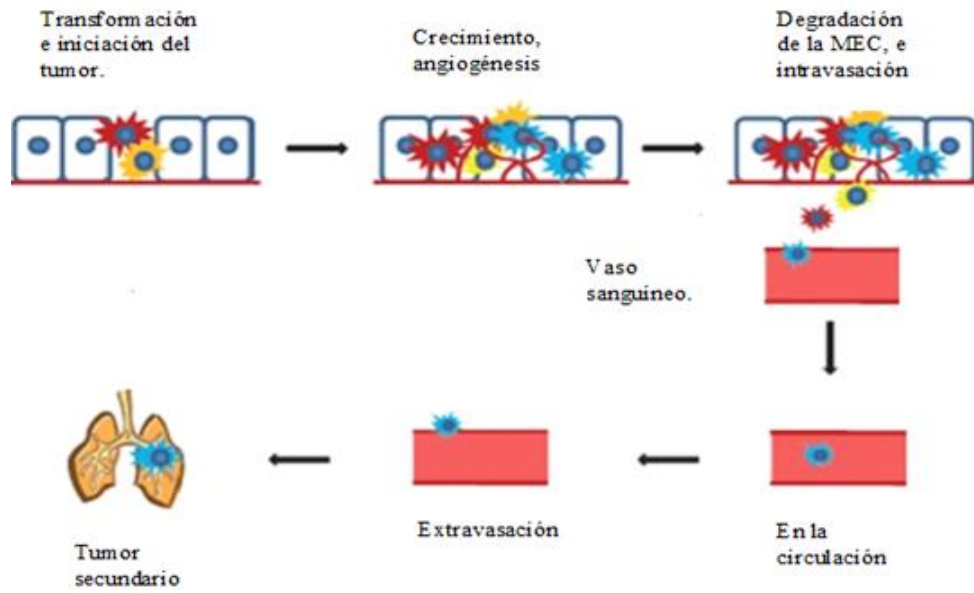


FIGURA 13. Representación de los pasos de la cascada metastásica

3. JUSTIFICACIÓN.

EL cáncer de mama es el más común en las mujeres del mundo, desde el año 2008 la incidencia se ha incrementado en más de un 20% y la mortalidad en un 14% (Lin et al., 2015). Las células tumorales malignas se caracterizan por su crecimiento anormal, por su alta liberación de exosomas, por su tendencia a invadir tejidos adyacentes y diseminarse a sitios distantes originando focos metastásicos (Guo & Guo et al., 2015).

Para que una célula tumoral sea capaz de hacer metástasis o colonizar un tejido secundario, necesita degradar la MEC en repetidas ocasiones. Esta capacidad de las células tumorales se asocia con enzimas proteolíticas (Furina, MT1-MMP, MMP-2) presentes en la estructuras específicas de la membrana plasmática, llamadas invadopodias. También estudios de proteómica han encontrado a las enzimas MT1-MMP, MMP-2 en exosomas provenientes de fibrosarcoma y cáncer de ovario (Rejendran et al., 2006; Shimoda & Khokha, 2013). Sin embargo, la función y la presencia de furina en exosomas es poco conocida.

El propósito de nuestro trabajo es determinar que las enzimas proteolíticas furina, MT1-MMP, MMP-2 presentes en los exosomas participan en la proteólisis de proteínas componentes de la matriz extracelular, para ello utilizaremos la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 que es altamente invasiva, y tiende a liberar gran cantidad de exosomas al medio extracelular.

4. HIPOTESIS.

Las enzimas proteolíticas: Furina, MT1-MMP, MMP-2, que se secretan vía exosomal en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, participan en procesos de degradación sobre los componentes de la MEC.

5. OBJETIVOS.

5.1 General.

Determinar la participación de enzimas exosomales: furina, MT1-MMP, MMP-2, en el proceso proteolítico de la MEC, utilizando la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

1.- Determinar cuál es el método óptimo para obtener la mayor cantidad de exosomas de la línea celular MDA-MB-231.

2.-Purificar los exosomas por centrifugación diferencial y comprobar la presencia de sus marcadores específicos.

3.- Determinar la expresión de las formas de Furina en las células y en los exosomas liberados de la línea celular MDA-MB-231, mediante western blot con anticuerpos específicos.

4.- Determinar la expresión de las formas de MT1-MMP en las células y en los exosomas liberados de la línea celular MDA-MB-231, mediante western blot con anticuerpos específicos.

5.- Determinar la presencia y actividad proteolítica de MMP-2, en los exosomas purificados de la línea celular MDA-MB-231, mediante Zimografía en gelatina.

6.-Realizar curvas de concentración de los exosomas provenientes de la línea celular MDA-MB-231, sobre la degradación de proteínas que constituyen la MEC.

a) Curva de degradación de fibronectina.

b) Curva de degradación de laminina.

7.- Analizar la inhibición de la degradación de componentes de la MEC utilizando:

a) Inhibidores generales de metaloproteinasas tales como: EDTA 10 mM y Bestatina 100 μ M

b) El inhibidor de furina TLCK 10 μ M

6. METODOLOGIA.

6.1 Cultivos celulares.

La línea celular MDA-MB-231 fue donada por el Dr Eduardo Monjaraz Guzmán, y se cultivó en medio Advanced DMEM, en matraces de poliestireno T-75, suplementado con 3% de suero bovino fetal, 2 mM de glutamina, y antibióticos 1X (InVitrogen) a 37°C en el incubador húmedo con 5% de CO₂.

Una vez que los matraces presentan una confluencia del 90%, se descartó el medio y se lavó 3 veces con PBS, posteriormente se colocó medio DMEM libre de suero bovino fetal con ionóforo de calcio A-23187 5µM con un tratamiento de 4 y 24h.

Debido a los efectos adversos del calcio se realizaron pruebas de viabilidad celular.

6.2 Ensayo de viabilidad celular (citotoxicidad) por MTT.

Descrito en 1983 por Mosmann y modificado por François Denizot y Rita Lang en 1986 se basa en la reacción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa que lo reduce a un compuesto de color azul conocido como formazan. La cantidad de formazan producida es proporcional a la cantidad de células vivas. La cantidad de MTT-formazan puede ser determinada espectrofotométricamente una vez que el MTT- formazan es disuelto en un solvente adecuado.

Para este estudio en cada pozo de una placa de 96 pocillos se sembraron $2.5 \cdot 10^4$ células / pocillo, por sextuplicado para cada condición: control (sin agregado de ionóforo de calcio) para las condiciones tratamiento con 1 µM y 5 µM de ionóforo de calcio por un tiempo de 24 horas, y otra placa por 4 horas).

Se le agregaron 10 µl de una solución de 2 mg/ml de MTT en medio HEPES. A continuación las placas se incubaron durante 4 y 24 horas con 5% CO₂ y a 37 °C, para después centrifugar a 1,200 rpm durante 5 minutos y a 20 °C. Una vez que se cumplió este proceso se retiró el medio e inmediatamente se añadieron 200 µl de DMSO, a cada pozo, se

re -suspendió hasta notar que los sedimentos se disgregaran, en este paso los pozos cambian a color morado.

Finalmente se agregaron 25 µl del buffer glicina Sorensen (0.1 M glicina, 0.1 M NaCl, pH 10.5) por pozo antes de llevar a cabo la lectura espectrofotométrica. La lectura de cada placa se realizó en el lector de microplaca BIO-RAD modelo 550 a $\lambda=570$ nm.

6.3 Obtención de exosomas.

Todo el procedimiento se llevó a cabo en hielo y centrifugación a 4°C

Se utilizó el método descrito por Raposo G. y cols 1996, y reportado por otros autores.

La obtención de exosomas se realizó mediante centrifugaciones seriadas de los sobrenadantes y posteriormente ultrafiltración y concentración de la muestra, como se indica en la Tabla y en la Figura 2.

	Gravedades	Velocidad (rpm)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Centrífuga
1	400	1,400	10	4	Beckman
2	3500	5,800	5	4	Sorvall
3	4500	6,710	5	4	Sorvall
4	10,000	9,800	30	4	Sorvall
5	14,000	16,000	30	4	Sorvall
CONCENTRACIÓN (4,000 rpm) a 4 °C					
6	100,000	35,000	60	4	Ultracentrífuga Beckman

El sobrenadante de cada paso se sometió a la siguiente centrifugación, y así sucesivamente, luego se procedió a concentrar los sobrenadantes en columnas de Amicon Ultra-4. Dichas columnas se centrifugaron a 4,000 rpm a 4°C hasta obtener un volumen final de aproximadamente 1 ml de la muestra.

Posteriormente se lavó la membrana del Amicon Ultra-4, 3 veces con PBS, centrifugando nuevamente a 4,000 rpm a 4°C y se recuperó la muestra en PBS o buffer de reacción dependiendo de la prueba a realizar. Después de la ultra-centrifugación a 100,000 g por 1 hora a un aceleración 9 y desaceleración 0.

Una vez que se terminó la ultra-centrifugación se re-suspendieron los pellets en buffer Laemmli 2X y se hicieron los extractos exosomales para ello, se incubaron las muestras por 5 minutos en hielo, posteriormente se hirvió por 5 minutos. A continuación se hizo la homogenización mediante pasajes sucesivos utilizando agujas hipodérmicas de diferentes calibres, se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C, y después se separó el pellet del sobrenadante; este último fue almacenando a -20°C, para su posterior determinación de proteínas totales.

6.4 Extractos celulares en buffer Laemmli.

Se hicieron extractos de las células MDA-MB-23, una vez que se observó una confluencia del 90 % en frascos T-75, se procedió a eliminar el medio de cultivo y se lavó 3 veces con PBS con Ca^{2+} 100 μM no estéril. Después se despegaron las células con la ayuda de un levantador de células y se centrifugó a 1,400 rpm a 4°C. La pastilla celular se re-suspendió en buffer Laemmli, y se incubó por 5 minutos en hielo, después se hirvió la muestra por 5 minutos y el homogenato se hizo pasar varias veces con agujas de diferentes calibres, para su posterior centrifugación a 14,000 rpm por 10 min a 4 °C. Finalmente se separó el pellet del sobrenadante, este último se guardó a -20°C para su posterior uso.

6.5 Determinación espectrofotométrica de proteínas totales

La determinación de proteínas de los extractos de exosomas y celulares se realizó por un método espectrofotométrico el cual se basa en la absorbancia de la luz UV (280 nm) por los a.a aromáticos, triptófano, tirosina y cisteína (puentes disulfuro), los datos obtenidos se interpolaron en los datos de la curva estándar, a fin de obtener las concentraciones de proteínas totales de las diferentes muestras.

6.6 Western-blot.

El western blot es una técnica ampliamente utilizada para el estudio de las proteínas ya que permite su identificación, mediante la separación en base a sus pesos moleculares y su identificación por medio de anticuerpos específicos.

En la primera parte de la técnica, se separan las proteínas por electroforesis donde las muestras son depositadas en los pozos del gel, luego se hace pasar un campo eléctrico, y las proteínas iniciarán su migración hacia el ánodo en relación a sus pesos moleculares, a la carga neta y a la porosidad de la poliacrilamida. La segunda fase denominada electrotransferencia, las proteínas, ya separadas en el gel, son transferidas a una membrana de nitrocelulosa por medio de un campo eléctrico. Finalmente la inmunodetección se llevó a cabo mediante el uso de anticuerpos específicos dirigidos a las moléculas que son de nuestro interés. De esta manera se visualiza la presencia y los patrones de expresión de dichas proteínas.

Tanto los sobrenadantes obtenidos de los extractos exosomales y celulares se llevaron a un volumen final de 50 μ L con buffer Laemmli 2X con azul de bromofenol y se hirvieron por 3 min, posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm por 2 minutos, estas muestras fueron las que se sembraron en los geles de diferentes concentraciones de poliacrilamida. Como estándar de peso molecular se utilizaron 4 μ L del marcador de peso molecular de rango completo o de bajo rango (Amersham, GE Healthcare); diluidos en buffer Laemmli 2X.

La electroforesis se corrió a 100V por aproximadamente 2 hrs a diferentes porcentajes del gel: 15%, 12%, 8.8% o 7.5%. Para montar la cámara de electroforesis se lavaron perfectamente las placas de vidrio, y se preparó el gel de corrida, dependiendo del porcentaje final del gel, se prepararon las pre-mezclas (1.5 M Tris-HCl pH 8.8, acrilamida 30%, bis-acrilamida 2%, SDS al 10% , agua desionizada, persulfato de amonio siendo este último el

iniciador del proceso de polimerización y TEMED el cual cataliza la formación de radicales libres a partir del persulfato), lo que definitivamente inicia la reacción de polimerización. La solución se mezcló suavemente evitando formar burbujas y se agregó inmediatamente en las placas de vidrio, se adicionó una capa de butanol y se dejó polimerizar 30 minutos, mientras que para los geles al 7.5% se dejó polimerizar por 1 hora.

Posteriormente con la ayuda de una piseta se procedió a eliminar la capa de butanol enjuagando el gel 3 veces, y se agregó la mezcla del stacking gel (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, acrilamida 30%, bis-acrilamida 2%, SDS al 10% , agua desionizada, persulfato de amonio, TEMED), se insertó el peine para la formación de los carriles y se dejó polimerizar aproximadamente 30 minutos. Mientras la cámara de electroforesis se llenó con el buffer de corrida de la electroforesis que contiene (0.19 M de Glicina, 0.025 M de Tris y 0.1% de SDS), se sumergió el gel en esta mezcla con el fin de sembrar tanto las muestras como el marcador de peso molecular como se muestra en la figura 14.

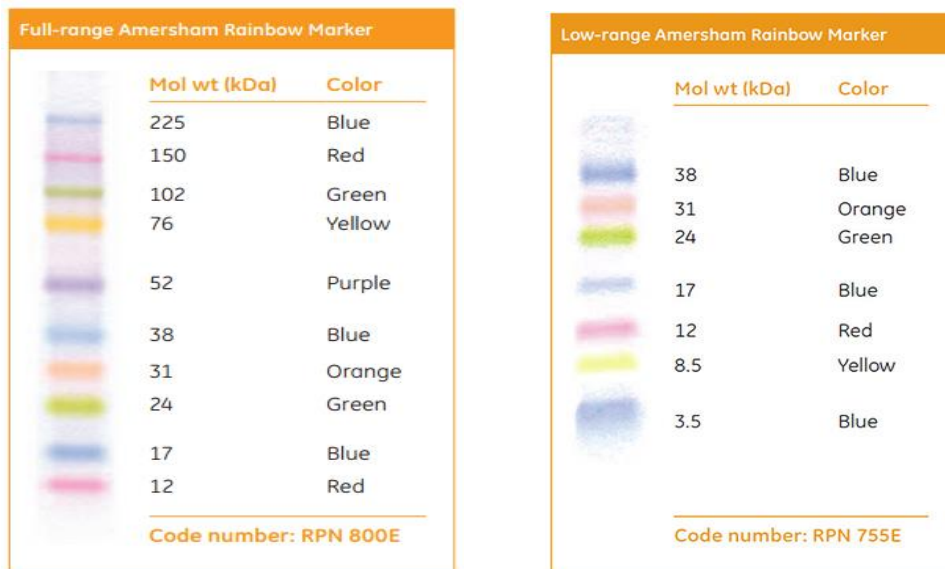


FIGURA 14. Marcadores de alto y bajo peso molecular, utilizados para la metodología de western blot.

En la electrotransferencia: una vez realizado el corrimiento electroforético se realizó la transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa. El gel se colocó en un cassette

de electrotransferencia, sumergiendo previamente todos los componentes del cassette en el buffer de transferencia (Tris-Glicina, metanol) lo cual se hizo en dos tiempos a 140 V y 190 mA por 45 min cada uno. Luego, se desmontó el cassette, se cortó la membrana y se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos de la membrana con solución TBS/Tween 20 0.1% en agitación constante a 60 rpm. La incubación con el primer anticuerpo se realizó utilizando los siguientes primeros anticuerpos que se muestran en la siguiente Tabla.

1^{er} anticuerpo	Epítomos:
Anti-fibronectina	<ul style="list-style-type: none"> Epítopo correspondiente a los amino ácidos 2087-2386 localizados en el C-terminal de fibronectina de origen humano
Anti-furina	<ul style="list-style-type: none"> Epítopo correspondiente a los amino ácidos 575-794 localizados en el C-terminal de furina de origen humano
Anti-actina	<ul style="list-style-type: none"> Epítopo correspondiente a los amino ácidos 76-375 localizados en el C-terminal de actina origen humano
Anti-CD-63	<ul style="list-style-type: none"> Epítopo correspondiente a los amino ácidos 45-238 localizados en el C-terminal de CD63 de origen humano
Anti-CD-81	<ul style="list-style-type: none"> Epítopo correspondiente a los amino ácidos 90-210 localizados en una región interna de CD81 de origen humano
Anti-HLA-DR α	<ul style="list-style-type: none"> Epítopo correspondiente a los aminoácidos 1-254 de origen humano.
Anti-laminina	<ul style="list-style-type: none"> Epítopo correspondiente a los aminoácidos 1420-1609, localizados en el C-terminal de laminina - 1 de origen humano.
Anti- MT1-MMP	<ul style="list-style-type: none"> Epítopo correspondiente a los amino ácidos 511-582 localizados en el C-terminal of MT-MMP-1 de origen humano

La incubación con el primer anticuerpo diluido en TBS (50 mM de Tris pH 7.4, 200 mM de NaCl, Tween al 0.1%) se realizó por toda la noche a 4°C con agitación constante. Al siguiente día, se realizaron 4 lavados con TBS/Tween al 0.1% por 10 minutos a temperatura ambiente y agitación a 90 rpm, para luego incubar las membranas con el segundo anticuerpo anti IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina por 1 hr a temperatura ambiente. Después se volvió a lavar la membrana con TBS/Tween al 0.1% por 10 minutos a temperatura ambiente a 90 rpm 4 veces, y después se reveló la membrana exponiéndola a la solución del Kit de color de BioRad en buffer AP color.

6.7 Zimografía en gelatina

La zimografía es una técnica electroforética ampliamente usada para la detección de aquellas enzimas con actividad de gelatinasas; como son MMP-2 y MMP-9. Permite detectar niveles muy bajos de MMP-2 de hasta 10 pg (Snoek-van et al., 2005). Para el análisis se utilizaron gel de poliacrilamida copolimerizado con gelatina 0.2 mg/ml. Las muestras son desnaturalizadas con SDS (sodium dodecil sulfato), pero no son hervidas o reducidas, una vez que obtuvimos el pellet de exosomas este se resuspendió en buffer Laemmli 2X sin azul de bromofenol, ni β mercaptoetanol y glicerol. Posteriormente se incubaron las muestras por 5 minutos en hielo y se procedió a hacer pasajes con agujas de diferentes calibres, y no se hirvieron para evitar la desnaturalización proteica, posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min, se separó el sobrenadante. Se realizó la cuantificación de proteínas totales y se guardó a -20 °C para su posterior uso.

Las muestras obtenidas por el procedimiento anteriormente mencionado, fueron sometidas a la electroforesis, empleándose un gel de acrilamida al 10%, para montar la cámara de electroforesis se lavaron perfectamente las placas de vidrio, y se preparó el gel separador (acrilamida al 30%, bisacrilamida al 0.8%, 0.5 M Tris-HCl pH 8.8%, gelatina 0.2 mg/ml, SDS 10%, APS 10%, dd H₂O, TEMED). La solución se mezcló suavemente y se agregó inmediatamente a la cámara con los vidrios evitando crear burbujas, y se agregó una capa de butanol, y se dejó polimerizar por 1 hr, posteriormente se lavó el gel con H₂O dd para eliminar la capa de butanol, y se preparó el gel de empaquetamiento al 4 % (acrilamida 30%, bisacrilamida al 2%, 0.5 M Tris- HCl pH 6.8, SDS 10%, APS 10%, TEMED), se

mezcló cuidadosamente y se agregó a la cámara, e inmediatamente se colocó el peine para formar los carriles donde se sembraron las muestras, posteriormente se envolvieron los geles y se guardaron a 4 °C para su uso al siguiente día.

Al siguiente día se preparó y se llenó la cámara de electroforesis con el buffer de corrida (0.192 M de Glicina, 0.025M de Tris, 0.1% de SDS, dd H₂O), y posteriormente se sumergieron los geles, se retiró el peine y se sembraron las muestras correspondientes. Además se utilizó el marcador de alto peso molecular.

Para la corrida electroforética se utilizó un voltaje de 100 V por 15 min y después se cambió el voltaje por 140 V por aproximadamente 2 hrs.

Después se lavó el gel 2 veces con Triton X-100 al 2.5% por 30 min utilizando agitación orbital ~80 rpm, este paso es importante ya que permite intercambiar el SDS presente en el gel, por Triton X-100 y con ello se facilita la re-naturalización de las enzimas. Luego se dejó incubando el gel de gelatina con el buffer de incubación (0.05 M Tris/HCL pH 8.8%, 5 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃) por 20 hr sin agitación a 37 °C y para el gel de colágeno por 36 hr, después se tiñieron como azul de Comassie al 0.1% por 2 horas y luego se hizo el desteñido del gel con (metanol: ácido acético, agua (4.5:1:4.5, v,v,v)) hasta que se observaron las bandas de degradación. Para detener la reacción de desteñido se lavó el gel por 30 min con H₂O a 80 rpm, y se tomaron fotografías con una cámara Fotodyne con filtro para azul de Comassie.

6.8 Tratamiento para la inhibición de la degradación de gelatina

Para la inhibición de la degradación de gelatina, se hicieron los geles tal como se describe en la zimografía (6.8), después de la electroforesis se cortaron los geles en forma de espagueti y cada fragmento del gel se lavó con tritón X-100 y finalmente se incubaron con el buffer de reacción más el inhibidor correspondiente. EDTA 10 mM y Bestatina 100 µM para inhibir a las MMPs, y TLCK 10 µM para furina. Finalmente se tiñieron los geles y se destiñeron de igual manera que en el ensayo de zimografía.

6.9 Tratamiento para la degradación de: fibronectina y laminina.

El protocolo de degradación de la MEC se basó en el trabajo de Ohuchi y colaboradores en 1996, cabe resaltar que para cada uno de los ensayos siempre se trabajó con muestras frescas además se hicieron algunos cambios pertinentes que se describen a continuación. El tratamiento de degradación lo podemos dividir en 3 fases.

1. Preparación de las muestras e incubación
2. Preparación de extractos de buffer Laemmli 2X
3. Western blot

1.- Preparación de muestras.

Los exosomas provenientes de las células MDA-MB-231 en cultivo, fueron recolectados y purificados mediante centrifugación diferencial como se describió anteriormente. Además éstos se lavaron utilizando un buffer de degradación (0.1 M de Tris-HCL, 0.15 M NaCl, 0.01 M CaCl₂) (Hakulinen et al., 2008), posteriormente se sometió a ultracentrifugación, cuando se obtuvo la pastilla correspondiente a los exosomas, se re-suspendieron en el buffer de degradación, y se hizo la cuantificación de proteínas.

Para determinar la degradación de los componentes de la MEC ya mencionados, se hicieron curvas utilizando concentraciones crecientes de exosomas (0.1, 0.5, 1 y 5 µg de exosomas) conjuntamente con 1 µg de laminina o 1 µg de fibronectina.

Para la preparación de las muestras se usaron tubos eppendorf de 0.5 mL, en donde se mezcló (laminina o fibronectina dependiendo de la curva de degradación a realizar, exosomas, buffer de degradación y brij 0.05%) a un volumen final de 50 µL y se incubó por 24 Hrs en agitación constante a 37°C.

2. Preparación de muestras para western blot

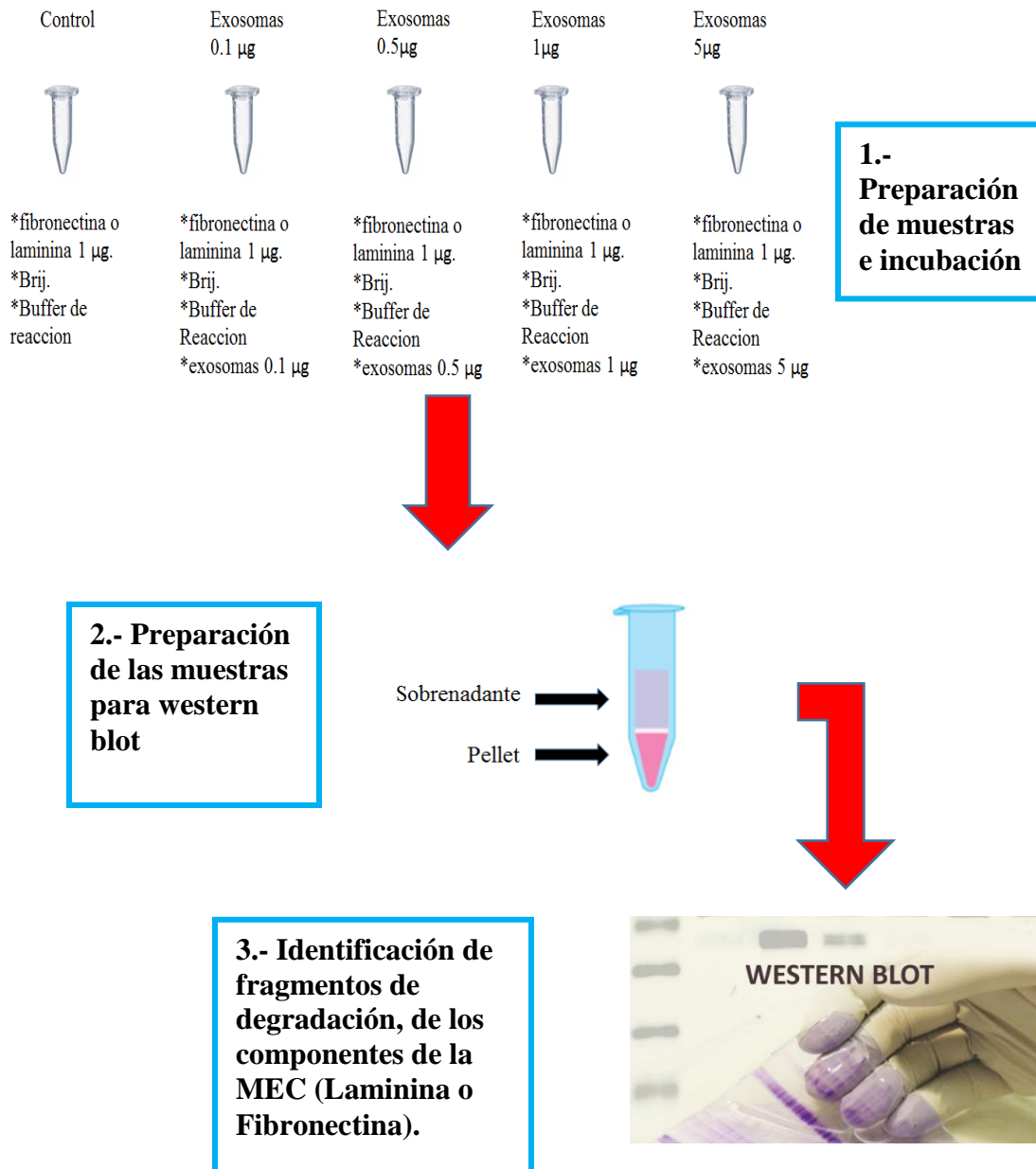
Pasado dicho tiempo de incubación se realizaron los extractos con buffer Laemmli al 2X a 4°C, se hirvieron las muestras y se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min, se separó el pellet del sobrenadante y este último se guardó a -20 °C para su posterior uso.

3. Western blot

Finalmente para determinar los fragmentos de la degradación de los componentes de la MEC, se realizó la técnica de western blot utilizando anticuerpos policlonales contra laminina o fibronectina dependiendo la curva realizada (descrito en 6.6).

6.10 Tratamiento para la inhibición de la degradación de laminina y fibronectina

Para la inhibición de la degradación debida a las MMPs se utilizó EDTA 10 mM y bestatina 100 μ M, mientras que para inhibir el efecto de furina se utilizó TLCK 10 μ M, estos se prepararon en eppendorf de 0.5 mL (laminina o fibronectina, exosomas, buffer de degradación, brij 0.05%, inhibidor).



6.11 Análisis de datos.

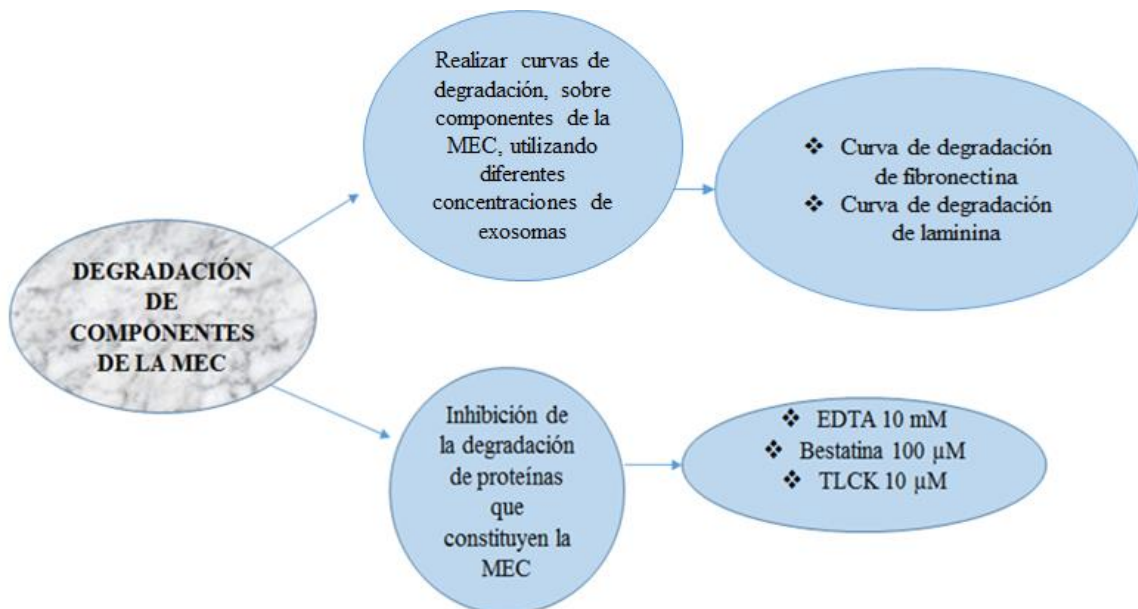
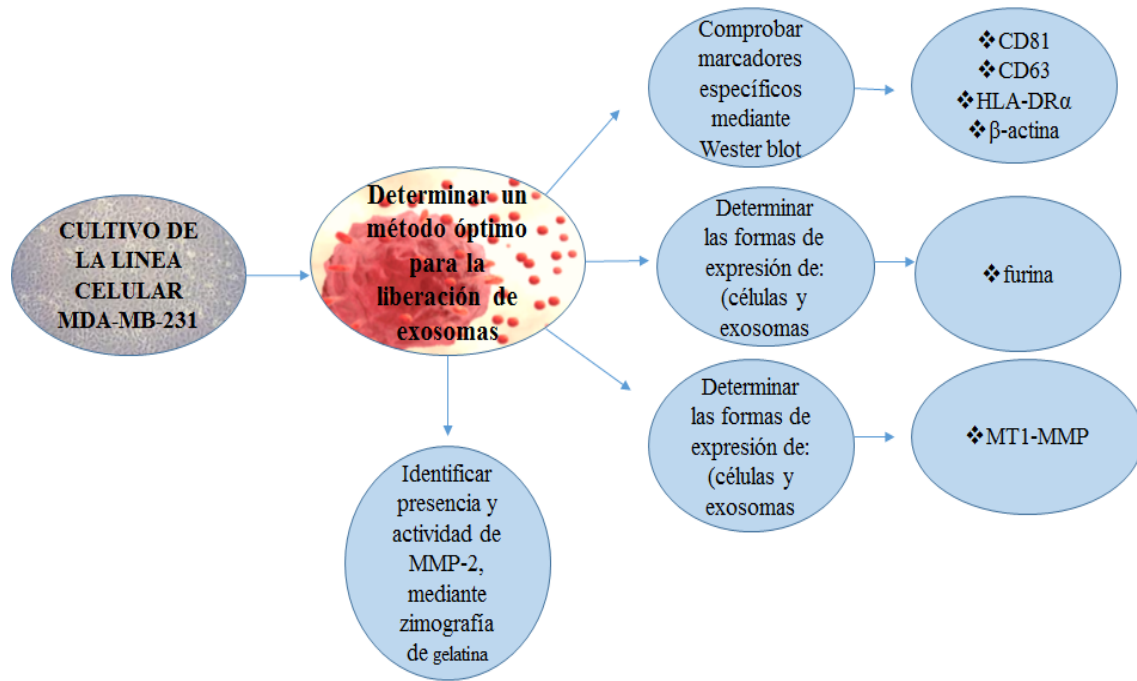
Para medir la expresión de cada una de las proteínas, se analizó la densidad óptica de las bandas que corresponden con el peso molecular de cada una de las mismas o de los fragmentos proteicos producidos por la degradación, mediante el escaneo de las membranas de nitrocelulosa con la ayuda del software Image J.

Para el análisis estadístico se utilizó:

1. En el análisis de cada una de los tratamientos utilizados con el inóforo de calcio se realizó una ANOVA de una vía y una prueba de Tuckey para demostrar las diferencias del tratamiento con respecto al control.
2. Para la comparación de la expresión de marcadores proteicos de los exosomas a diferentes concentraciones, se utilizó un análisis de varianza de dos vías.
3. Y también se realizó la prueba t-student para muestras no pareadas.

Para el análisis estadístico se utilizaron los programas Minitab y Sigma plot 12.3

6.12 Diagrama de trabajo.



7. RESULTADOS.

7.1 Determinación del método óptimo para la mayor liberación de exosomas por las células MDA-MB-231.

Con el objetivo de determinar cuál es el método óptimo, que nos permitiera obtener una mayor cantidad de exosomas en el medio extracelular; y por otra parte debido a que en la literatura varios grupos de investigación difieren en la obtención máxima de los mismos, (Soo et al.,2012; Koumangoye et al.,2011; Sabina et al.,2013), se llevó a cabo su obtención mediante métodos distintos:

1. Tratamiento de las células con 1 y 5 μM del ionóforo de calcio A23187 por 4 y 24 horas
2. Tratamiento de las células en suspensión con ionóforo A23187 por 4h.

Cuando obtuvimos una confluencia del 90% de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 se procedió a lavar las células con PBS y se agregó el medio de cultivo (ADVANCED DMEM) sin SFB más el ionóforo A23187 con la concentración correspondiente, después se recolectó el sobrenadante por separado tanto de las células control como las tratadas, y mediante una serie de centrifugaciones diferenciales anteriormente descritas en el apartado de metodológico (6.3), se pudieron obtener los exosomas.

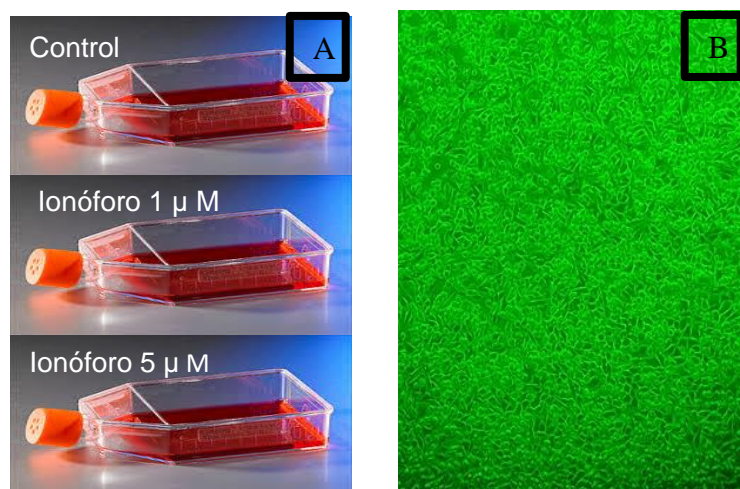


FIGURA 15. En A) se muestra el esquema del tratamiento con el ionóforo. Para el cultivo celular utilizamos frascos T-75 para obtener un mayor número de células MDA-MB-231, en B) una fotografía de la línea celular MDA-MB-231 después del tratamiento con el ionóforo por 24h.

Una vez que se obtuvo el pellet de los exosomas se continuó inmediatamente a hacer los extractos con buffer Laemmli 2X a 4°C. Se cuantificó la concentración de proteínas totales, obtenidas en las distintas muestras. Para ello se utilizó un método espectrofotométrico el cual se basa en la absorbancia de la luz UV (280 nm) por los aa aromáticos, triptófano, tirosina y cisteína (puentes disulfuro), los datos obtenidos se compararon con una curva estándar.

7.1.1 Tratamiento de 1 y 5 μM del ionóforo de calcio A23187 por 4 y 24 horas

En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos, cuando las células son tratadas por 4 y 24 horas a dos concentraciones diferentes del ionóforo de calcio A23187.

Con la finalidad de analizar si a un mayor tiempo de incubación y a una mayor concentración del ionóforo, obteníamos una mayor cantidad de exosomas en el medio de cultivo. En donde a una concentración de 1 μM por 4h no se logró un aumento de la liberación de exosomas cuando se comparó con la condición control; sin embargo cuando se utilizó la concentración de 5 μM por 4 horas obtuvimos un aumento del 68 %. Mientras que cuando se usó el ionóforo por 24 horas a 1 μM y 5 μM , se observó un aumento de 29%, y 114.2 %, respectivamente. Por lo tanto el uso de la concentración del ionóforo 5 μM por 24 horas resultó ser más significativa y más efectiva.

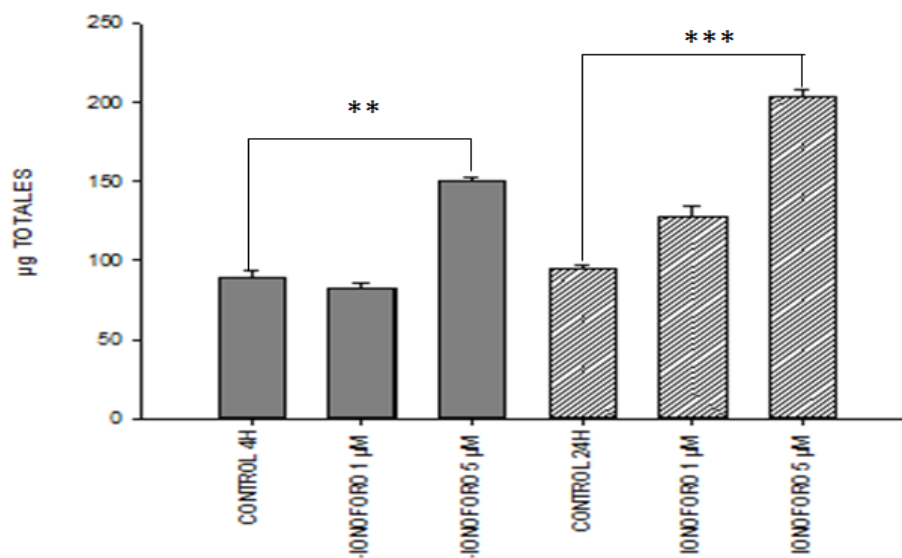


FIGURA 16. Tratamiento de 4 y 24 horas con el ionóforo de calcio A23187 en células MDA-MB-231. Cada una de las barras indica el promedio \pm desviación estándar para cada condición de tratamiento. Se observa que a una concentración 5 μM por 4 horas obtenemos un aumento significativo con respecto al control con una $p < 0.001$, y $n = 4$. Mientras que para 24 horas obtenemos un aumento significativo con respecto al control con una $p < 0.0001$ y $n = 4$. Por otra parte no encontramos un aumento significativo con el tratamiento de 1 μM con respecto al control.

7.1.2 Tratamiento con ionóforo A23187 en células en suspensión por 4h.

Koumangoye 2011 reporta que las proteínas como la Galectina 3 y otros miembros de la familia promueven el “*detached*” de las células adherentes, en este trabajo ellos proponen que las células en suspensión por previo tratamiento con EDTA tienden a liberar una mayor cantidad de exosomas. Como las células MDA-MB-231 son células adherentes decidimos utilizar este método para despegarlas, manteniéndolas en suspensión y posteriormente aplicar el ionóforo a las concentraciones antes mencionadas. Se encontró un aumento de 3.4% con ionóforo 1 μM cuya comparación se hizo con respecto al control. No obstante, cuando se utilizó el ionóforo a una concentración de 5 μM se obtuvo un aumento de 14.2% con respecto al control.

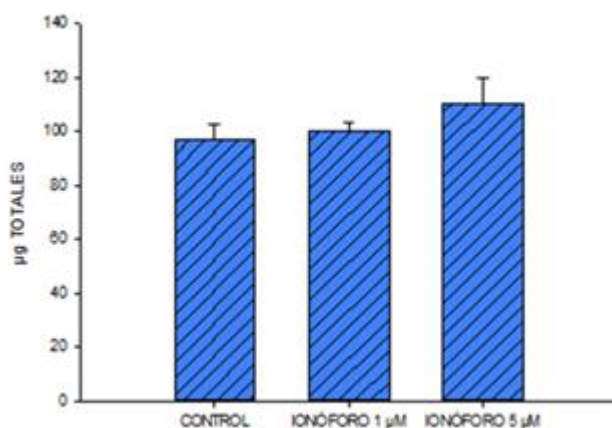


FIGURA 17. Tratamiento con el ionóforo de calcio a23187 sobre las células MDA-MB-231 en suspensión. Cada una de las barras indica el promedio \pm desviación estándar. Se observa que las concentraciones de 1 μM y 5 μM por 4 horas no produjeron un efecto significativo con respecto al control, $n=4$.

Bajo este tratamiento observamos una secreción de exosomas provenientes de la línea celular MDA-MB-231. Sin embargo dicha liberación es menor que la obtenida por el tratamiento con el ionóforo de calcio 5 μM por 24 horas, por lo tanto para el desarrollo experimental de la tesis se utilizó este último procedimiento.

7.2 Viabilidad Celular para el tratamiento de elección

De acuerdo a los datos obtenidos hasta el momento se optó por utilizar el ionóforo 5 μM por 24 horas en las células adherentes. Como ha sido ampliamente descrito que las altas concentración de calcio intracelular están relacionadas con daño y muerte celular, hemos utilizado el método MTT para determinar el posible efecto citotóxico producido por el ionóforo A23187. Sin embargo no encontramos cambios significativos en la viabilidad celular debido a los tratamientos cuando se comparó respecto a su control, por lo tanto podemos concluir que la concentración utilizada del ionóforo no provoca daños citotóxicos en la línea celular MDA-MB-231, y podemos concluir que dicho tratamiento es confiable para la obtención de exosomas.

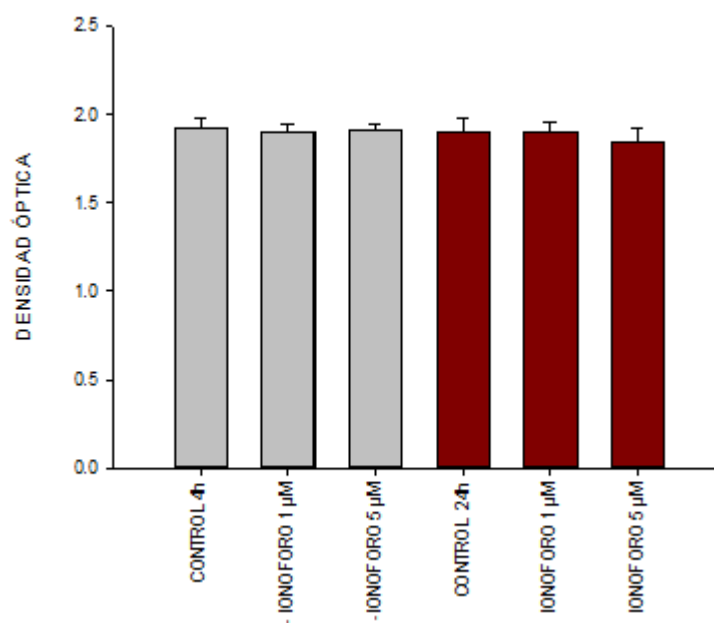


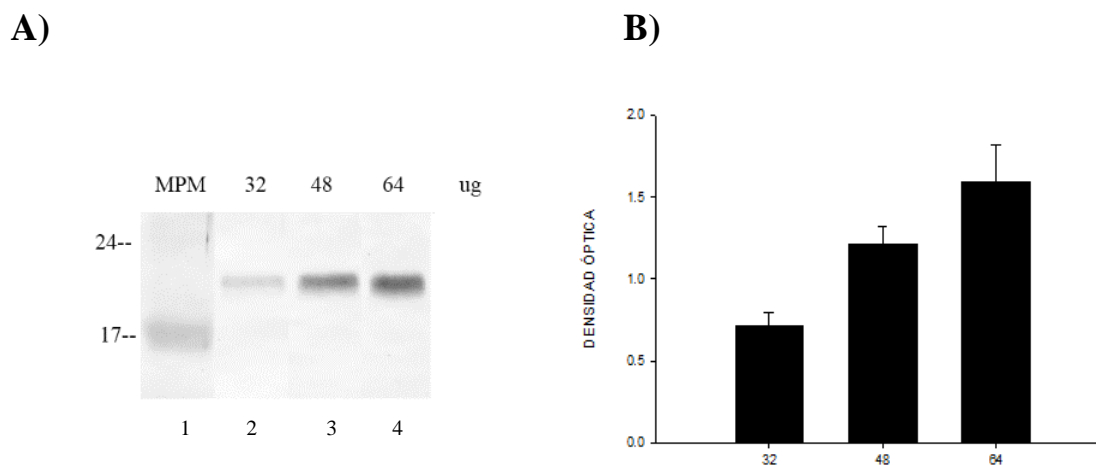
FIGURA 18. Ensayo de viabilidad celular. Valores de la densidad óptica por sextuplicado en condiciones control y con ionóforo a diferentes concentraciones, cada uno de los puntos indican el promedio \pm desviación estándar, Este experimento se realizó dos veces ($n = 2$)

7.3 Marcadores moleculares de los exosomas.

Después de haber obtenido un método fiable para la purificación de exosomas con el ionóforo y además estando seguros que la concentración utilizada no provoca muerte o daño celular, lo siguiente era corroborar que el pellet obtenido al final de la purificación correspondía a estas nano-vesículas. Para ello se realizaron western blot usando anticuerpos específicos que reconocen las tetraspaninas CD81 y CD63, así como también de HLA-DR α y β -actina; ya que estas proteínas son consideradas como marcadores específicos de los exosomas.

7.3.1 Expresión de CD81 en exosomas.

Las muestras que se utilizaron para la identificación de CD81, corresponden a exosomas provenientes de la línea celular MDA-MB-231, las cuales fueron tratadas y purificadas como se indica en Material y métodos (6.3). Luego de la centrifugación diferencial, concentración y ultra-centrifugación de los sobrenadantes del medio de cultivo los pellets o pastillas se extrajeron en buffer Laemmli al 2X, y se sometieron a la metodología de western blot para identificar la molécula de CD81 (Figura 19 A).



FIFURA 19. Expresión de CD81. A. imagen representativa del western blot inmunorreactivo para la proteína CD81 en exosomas provenientes de la línea celular MDA-MB-231. las muestras se sembraron en un gel de poliacrilamida al 15%. En el carril (1) se sembró el marcador de bajo peso molecular, mientras que en los carriles consecutivos se sembraron 32, 48, 64 μ g de proteínas exosomales, respectivamente. B) Cambios en la densidad óptica de CD81 presente en exosomas a diferentes concentraciones, cada uno de los puntos indican la media \pm desviación estándar, (n = 3).

Como se observa en la Figura 19A, la banda correspondiente a la proteína de CD81, que tiene un peso molecular de 20 kDa, incrementa su intensidad conforme se aumenta la cantidad de μg totales de exosomas. Con ello queda claramente demostrado la presencia de este marcador CD81 en los exosomas purificados.

Al realizar el análisis densitométrico de las bandas del western blot (Figura 19B) se observa también esta correlación entre la cantidad de CD81 y los μg totales de exosomas aplicados.

7.3.2 Expresión de CD63 en exosomas

CD63 o LAMP-3 es una proteína transmembrana que al igual que CD81 pertenece al grupo de las tetraspaninas. La cual se expresa ubicuamente y se encuentra predominantemente asociado a MVB, endosomas tardíos y a las membranas de los exosomas, es por ello que se ha utilizado como marcador para estas últimas vesículas. A continuación en la Figura 20A se muestra la expresión de CD63 en exosomas de cáncer de mama MDA-MB-231, a diferentes concentraciones (32, 48, 64 μg).

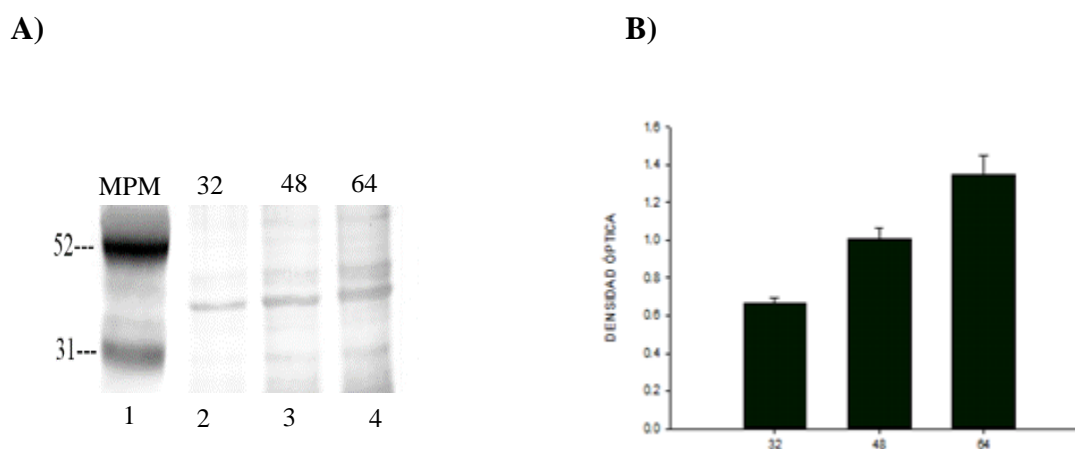


FIGURA 20. Expresión de CD63. A) Imagen representativa de Western blot inmunoreactivo de CD63, las muestras provienen de exosomas de la línea celular MDA-MB-231, las cuales se sembraron en un gel de poliácridamida al 12%. En el carril (1) se sembró el marcador de alto peso molecular, mientras que en los carriles consecutivos se sembraron 32, 48, 64 μg de proteínas exosomales, respectivamente. B) Cambios en la densidad óptica de CD63 presente en exosomas a diferentes concentraciones, cada uno de los puntos indican la media \pm desviación estándar, (n = 3).

La banda correspondiente a la proteína de CD63 tiene un peso molecular de 43 kDa. Se encontró un aumento en la intensidad de la misma a medida que se incrementa la cantidad de μg totales de exosomas aplicados. Con ello demostramos la presencia de este marcador CD63 en los exosomas purificados.

En el análisis densitométrico de las bandas de CD63 (Figura 20A) se observan cambios en la densidad óptica con respecto a las diferentes concentraciones de exosomas totales sembrados, por lo tanto se demuestra que los exosomas provenientes de las células MDA-MB-231 expresan CD63 (Figura 20B).

7.3.3 Expresión de HLA-DR α en exosomas

Las moléculas presentadoras de antígeno tales como MHC tanto clase I y II, han sido identificadas en exosomas provenientes de varios tipos celulares tales como linfocitos T, B y células dendríticas, sin embargo mediante análisis proteómicos se ha demostrado su expresión en células tumorales, y en sus exosomas (Février & Raposo, 2004). Tal como se determinó la expresión de las tetraspaninas CD81 y CD63, aquí se analizó la expresión de HLA-DR α por western blot (Figura 21A).

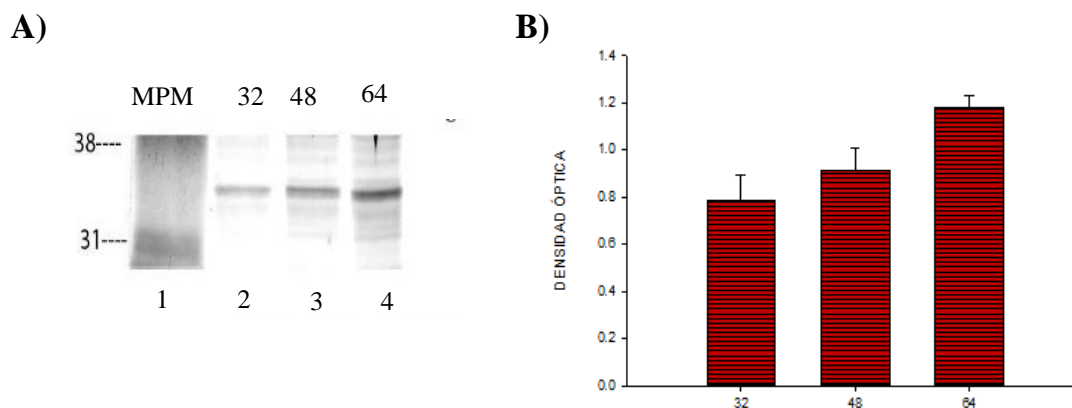


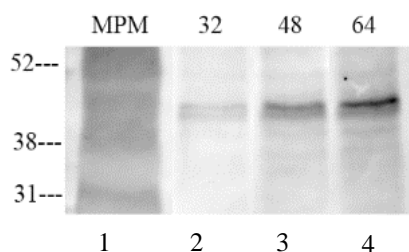
FIGURA 21. Expresión de HLA-DR α . **A)** Imagen representativa de Western blot inmunoreactivo de HLA-DR α , las muestras se sembraron en un gel de poliacrilamida al 12%. En el carril (1) se muestra el marcador de alto peso molecular, mientras que en los carriles consecutivos se sembraron 32, 48, 64 μg de proteínas exosomales, respectivamente. **B)** Cambios en la densidad óptica de HLA-DR α presente en exosomas a diferentes concentraciones, cada uno de los puntos indican la media \pm desviación estándar, (n = 3).

Como se muestra en el western blot (Figura 21A) y en el análisis densitométrico de A (Figura 21 B), la presencia de HLA-DR α , cuyo peso molecular es de 34 kDa, aumenta a medida que se sembraron mayores cantidades de μg totales de exosomas purificados, demostrando que estas nanovesículas contienen dicha proteína, como ya ha sido reportado por otros autores (Février & Raposo, 2004).

7.3.4 Expresión de β -actina en exosomas

Por otra parte, las proteínas del citoesqueleto también han sido reportadas como constituyentes de los exosomas, entre éstas se encuentra β -actina (Février & Raposo, 2004), en base a ello se analizó la expresión de la misma en los exosomas purificados (Figura 22).

A)



B)

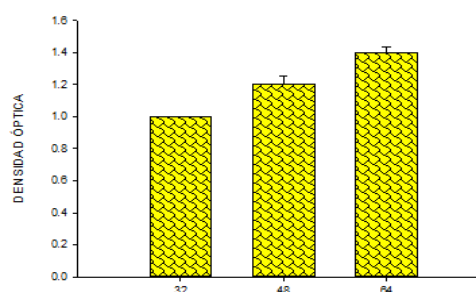


FIGURA 22. Expresión de β -actina. A) Imagen representativa de Western blot inmunoreactivo de actina, las muestras provienen de exosomas de la línea celular MDA-MB-231, las cuales se sembraron en un gel de poliacrilamida al 12%. En el carril (1) se sembró el marcador de alto peso molecular, mientras que en los carriles consecutivos se sembraron 32, 48, 64 μg de proteínas exosomales, respectivamente B) Cambios en la densidad óptica de actina presente en exosomas a diferentes concentraciones, cada uno de los puntos indican la media \pm desviación estándar, (n = 3).

Como se observa en la Figura 22A, la banda correspondiente a la proteína de β -actina, que tiene un peso molecular de 43 kDa, incrementa su intensidad conforme se aumenta la cantidad de μg totales de exosomas. Con ello queda claramente demostrado la presencia de este marcador en los exosomas purificados.

Al realizar el análisis densitométrico de las bandas del western blot (Figura 22B) se observa también esta correlación entre la cantidad de β -actina y los μg totales de exosomas aplicados.

7.3.5 Análisis de varianza de dos vías para los cuatro marcadores estudiados

Posteriormente se hizo una prueba de análisis de varianza de dos vías, con el objetivo de determinar si existen diferencias significativas en la expresión proteica de estos marcadores en la fracción exosomal. Se obtuvo un valor de $p > 0.005$, el cual no es significativo, por lo que se asume que los cuatro marcadores se expresan de manera similar en los exosomas purificados. Sin embargo, y como era de esperarse, se encontró una diferencia significativa cuando se utilizaron diferentes concentraciones de proteínas exosomales aplicadas con una $p < 0.005$.

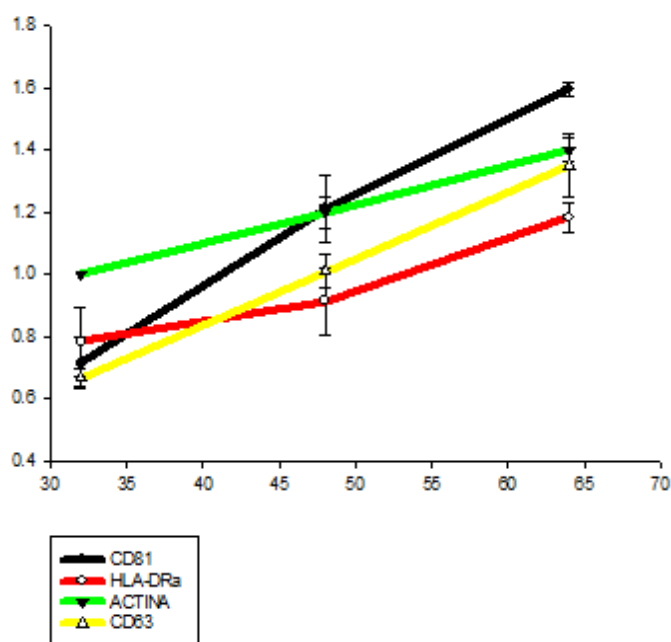


FIGURA 22. Expresión de los cuatro marcadores estudiados de los exosomas. Prueba de análisis de varianza de dos vías para los cuatro marcadores en conjunto.

En resumen mediante western blot se han identificado cuatro marcadores exosomales (CD81, CD63, HLA-DR α , actina) con ello estamos seguros que las vesículas purificadas

mediante el método anteriormente descrito, corresponden a exosomas, los cuales se utilizaron para los experimentos posteriores.

Adicionalmente los exosomas contienen otros tipos de moléculas cargo las cuales provienen de su célula de origen, no obstante, para este trabajo fue importante identificar la presencia y actividad de ciertas enzimas proteolíticas, como furina y metaloproteinasas tanto en células MDA-MB-231 y sus exosomas.

7.4 EXPRESIÓN DE FURINA EN CÉLULAS MDA-MB-231 Y EN SUS EXOSOMAS.

7.4.1 en células.

El anticuerpo utilizado para el análisis de furina nos permitió diferenciar entre las distintas formas de expresión de esta enzima: precursor, activa y soluble, las cuales tienen diferentes pesos moleculares, 110, 98 y 80-82 kDa, respectivamente.

En la Figura 24A y B se muestran los western blots representativos, de las formas de expresión de furina y β -actina, respectivamente, mientras que en el apartado C, se hizo el análisis densitométrico de cada una de las bandas de furina, comparándolo contra la densidad óptica de β -actina.

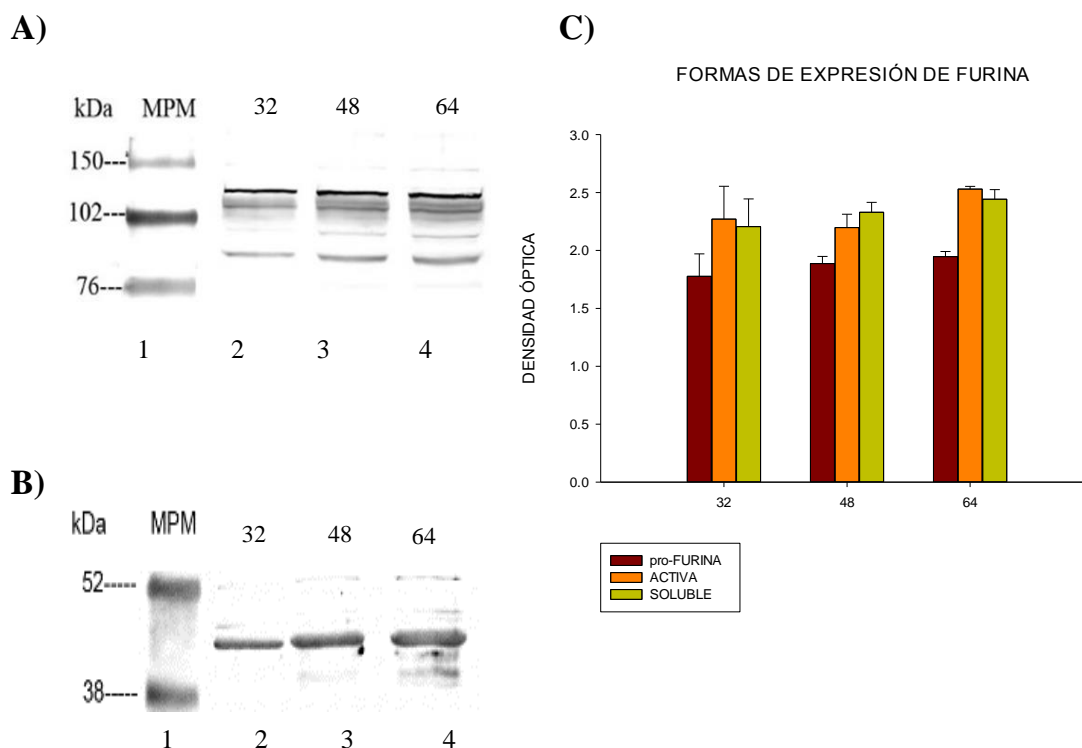


FIGURA 24. Expresión de las formas de furina en las células MDA-MB-231. A) Imagen representativa de Western blot inmunoreactivo de furina, las muestras provienen de de la línea celular MDA-MB-231, las cuales se sembraron en un gel de poliacrilamida al 8.8%. En el carril (1) se sembró el marcador de alto peso molecular, mientras que en los carriles consecutivos se sembraron 32, 48, 64 μ g de proteínas de extractos celulares, respectivamente. B) Imagen de western blot inmunoreactivo a β -actina de las muestras de de A, cuyo peso molecular es de 43 kDa. C) Analisis densitometrico de las formas de expresion de furina en celulas: pro-furina, furina activa y soluble, donde se comparó el promedio de las densidades de las diferentes formas de expresión relacionándolos con los valores de actina. Cada uno de las barras indican el promedio \pm desviación estándar, (n = 3).

Como se muestra la presencia de cada una de las formas de furina no cambia significativamente respecto a los μg de extractos exosomales aplicados Figura 24C.

7.4.2 en exosomas.

En este caso, las muestras utilizadas para estudiar las distintas formas expresadas de la convertasa furina provienen de los extractos exosomales de la línea celular MDA-MB.231, en buffer Laemmli 2X y analizadas mediante la técnica western blot.

El anticuerpo utilizado es el mismo que se usó para los extractos celulares (inciso 7.4.1). Sin embargo, sólo encontramos la expresión de la forma activa de furina de 98 kDa. Este resultado es novedoso ya que no existen datos sobre la presencia de furina activa en exosomas provenientes de líneas celulares tumorales. (Figura 25 A). Y además comprobaría que los exosomas son de origen endocítico o de endosomas de reciclaje.

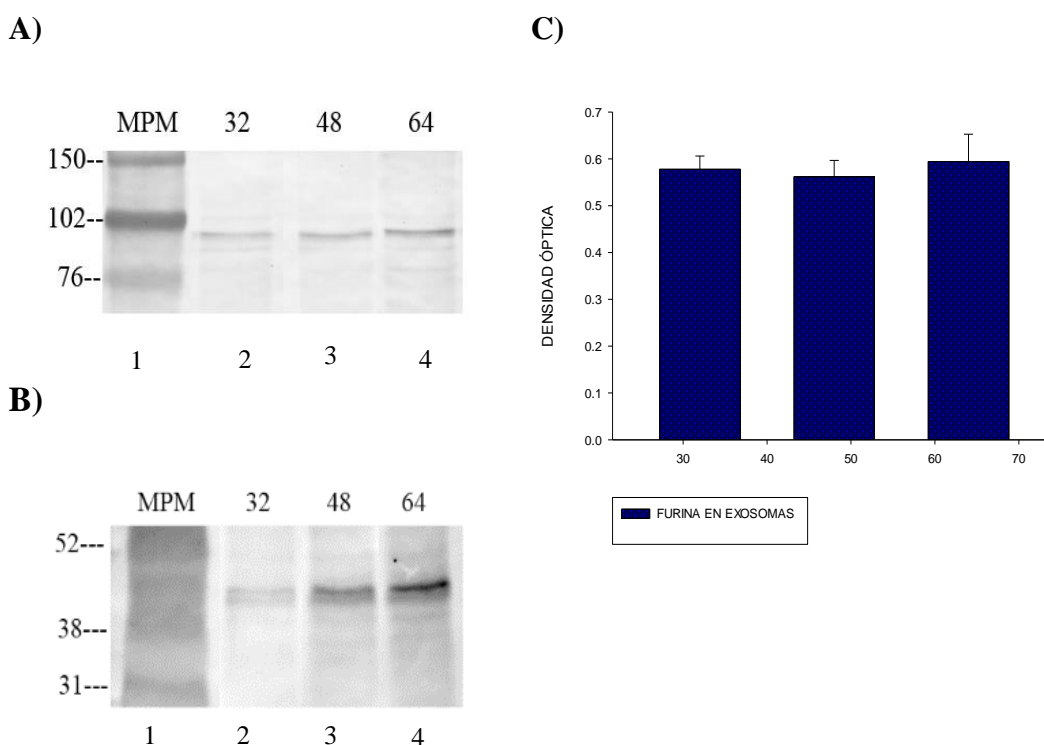


FIGURA 25. Expresión de furina en exosomas. A) Imagen representativa de Western blot inmunoreactivo de furina, las muestras provienen de exosomas de la línea celular MDA-MB-231, las cuales se sembraron en un gel de poliacrilamida al 8.8%. En el carril (1) se sembró el marcador de alto peso molecular, mientras que en los carriles consecutivos se sembraron 32, 48, 64 μg de proteínas exosomales, respectivamente. B) Imagen de western blot inmunoreactivo a β -actina de las muestras de de A, cuyo peso molecular es de 43 kDa. C) Densitometría de la banda de furina activa de 98 kDa en exosomas, a diferentes concentraciones. Cada una de las barras indican la media \pm desviación estándar, (n = 3).

En resumen, mientras que en las células MDA-MB-231 se encuentran tanto furina activa como pro-furina y furina soluble, en los exosomas liberados al medio extracelular por esta misma línea celular sólo se observó la expresión de furina activa de 98 kDa, tal y como se muestra en la Figura 25A. Además, el hecho de que solamente se encontrara esta forma de furina nos indica que la fracción exosomal no se encuentra contaminada con restos celulares ni con el sobrenadante pues no aparecen pro-furina ni la forma soluble. En la Figura 25 B se muestra el western blot inmunoreactivo a β -actina, el cual nos sirvió para comparar la densidad óptica de furina con respecto a actina. No hay cambios significativos respecto a los μ g de extractos exosomales aplicados Figura 25C.

Furina es una enzima que tiene la capacidad de procesar diferentes sustratos, entre los que destacan son algunos miembros de la familia de las metaloproteinasas, los cuales son sintetizados como precursores inactivos, uno de ellos es la MT1-MMP.

7.5 EXPRESIÓN DE MT1-MMP EN CÉLULAS MDA-MB-231 Y EN SUS EXOSOMAS.

7.5.1 en células.

Para analizar las formas de expresión de la metaloproteinasa transmembranal de tipo 1, se hicieron extractos en buffer Laemmli 2X de las células y fueron sometidos a western blot, con el objetivo de demostrar, si las células expresaban todas las formas ya descritas de MT1-MMP.

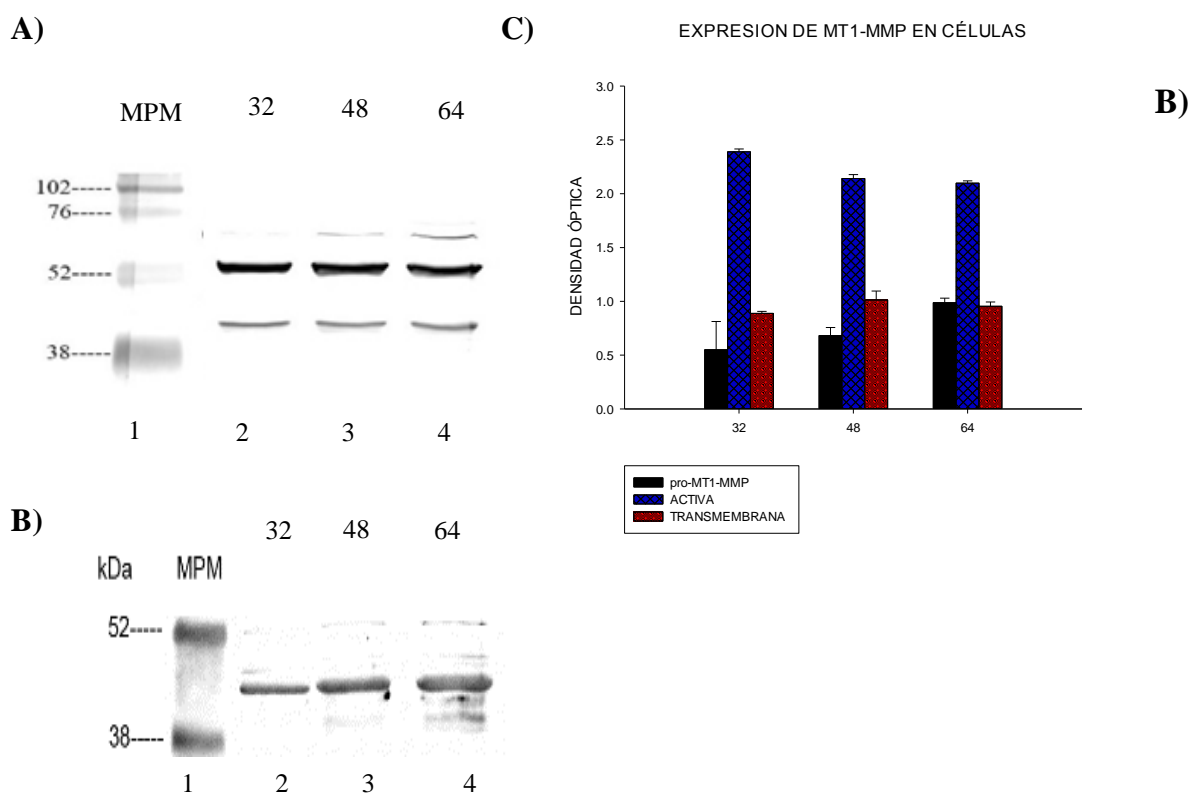


FIGURA 26. Expresión de las formas de MT1-MMP en las células MDA-MB-231. A)

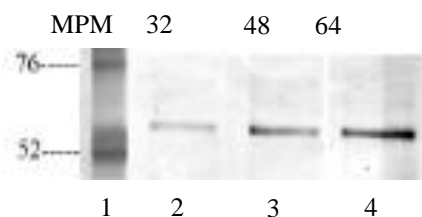
Imagen representativa de Western blot inmunoreactivo de MT1-MMP, las muestras provienen de la línea celular MDA-MB-231, las cuales se sembraron en un gel de poliacrilamida al 12 %. En el carril (1) se sembró el marcador de alto peso molecular, mientras que en los carriles consecutivos se sembraron 32, 48, 64 µg de proteínas de extractos celulares, respectivamente **B)** Imagen de western blot inmunoreactivo a β -actina de las muestras de A, cuyo peso molecular es de 43 kDa. **C)** Análisis densitométrico de las bandas de MT1-MMP a diferentes concentraciones. Cada una de las barras corresponden a la media \pm desviación estándar, (n = 3).

La Figura 26 A, corresponde a un western blot representativo, donde se muestra la presencia de las tres formas de MT1-MMP, las cuales corresponden a pro-MT1-MMP (precursor), la forma activa y el fragmento transmembrana con pesos moleculares de 64, 55 y 43 kDa, respectivamente. Cabe recordar que el fragmento transmembrana de 43 kDa es inactivo pues ha sufrido un procesamiento proteolítico donde pierde su sitio catalítico. En la Figura 26B se muestra el western blot inmunoreactivo a β -actina, el cual nos sirvió para comparar la densidad óptica de cada una de las formas de expresión de MT1-MMP con respecto a actina. En la Figura 26 C, se muestra un análisis comparativo de las formas de expresión de MT1-MMP, presente en las células MDA-MB-231, donde se puede observar que la forma activa se encuentra mayormente expresada en cada una de las concentraciones analizadas.

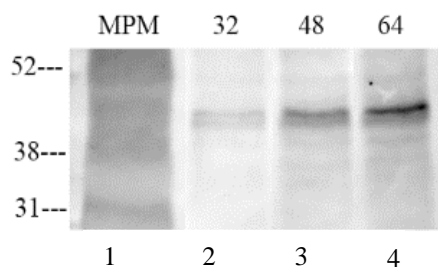
7.5.2 en exosomas.

MT1-MMP es una metaloproteinasas de tipo transmembranal, que puede ciclar entre la membrana plasmática y los compartimentos endocíticos. La expresión de esta metaloproteinasas ha sido ampliamente estudiada en células; no obstante, en vesículas la información es muy escasa, es por ello que decidimos investigar las formas de expresión de MT1-MMP en los exosomas purificados. Para ello los extractos exosomales en buffer Laemmli 2X se analizaron mediante western blot a diferentes concentraciones de proteínas, donde claramente demostramos la presencia de MT1-MMP en su forma activa (Figura 27 A).

A)



B)



C)

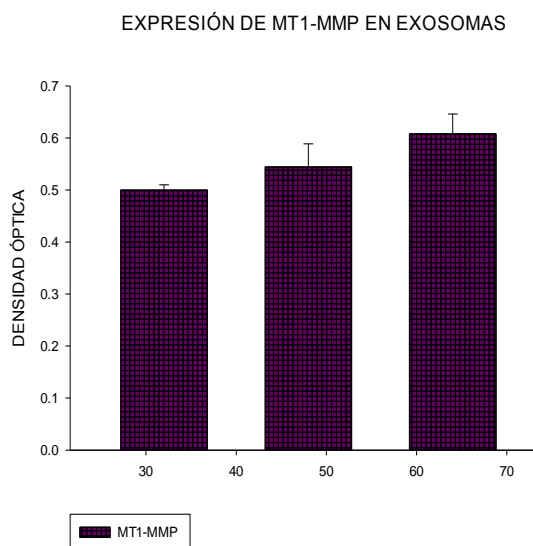


FIGURA 27. Expresión de las formas de MT1-MMP en exosomas. A) Se sembraron extractos de exosomas en un gel al 12%; en el carril 1 se sembró el marcador de alto peso molecular, mientras que en los carriles consecutivos se colocaron 32, 48, 64 µg de proteínas de extractos exosomales B) Imagen de western blot inmunoreactivo a β -actina de las muestras de A, cuyo peso molecular es de 43 kDa C) Análisis densitométrico de las bandas de MT1-MMP a diferentes concentraciones. Cada una de las barras corresponden a la media \pm desviación estándar, (n = 3).

El demostrar MT1-MMP activa de 55 kDa en los exosomas, resulta muy interesante, ya que el papel de estas nano-vesículas no sólo se reduce a actuar como mensajeros intercelulares, sino también como vesículas que pudieran estar modificando el medio ambiente extracelular. Se conoce que MT1-MMP se caracteriza por tener como sustratos a distintas glicoproteínas de la MEC, por lo cual puede actuar en la degradación de componentes de la misma. No conforme con ello se decidió estudiar si existen también algunas otras MMPs expresadas en los exosomas, ejemplo de ello es la MMP2.

Además, en la Figura 27A solamente se encontró MT1-MMP en su forma activa lo nos indica de que la fracción exosomal no se encuentra contaminada con restos celulares ni con el sobrenadante pues no aparecen pro-MT1-MMP ni la forma transmembranal.

7.6 Expresión de MMP-2 mediante Zimografía en gelatina.

La zimografía es una técnica simple, con un enfoque funcional para el análisis de la actividad proteolítica en células y extractos de tejidos, fue introducida hace más de 30 años por Heussen y Dowdle, la cual es usada para analizar la actividad de las gelatinasas activas (MMP2 y MMP9) con pesos moleculares de 62 y 92 kDa, respectivamente. La zimografía involucra la separación electroforética de proteínas bajo condiciones desnaturizantes pero no reductoras, a través de un gel de acrilamida co-polimerizado con gelatina. La zimografía ofrece varias ventajas en comparación con otras técnicas ya que no requiere el uso de materiales caros como anticuerpos, y además permite detectar en el mismo gel la presencia y la función de ciertas MMPs en base a su peso molecular.

Para esta tesis se utilizaron extractos exosomales provenientes de las células MDA-MB-231, los cuales se analizaron mediante zimografía, donde se identificaron a MMP2 activa de 62 kDa y a pro-MMP2 en su forma precursora de 72 kDa. Sin embargo no se identificó a MMP9 en las muestras analizadas (Figura 28).

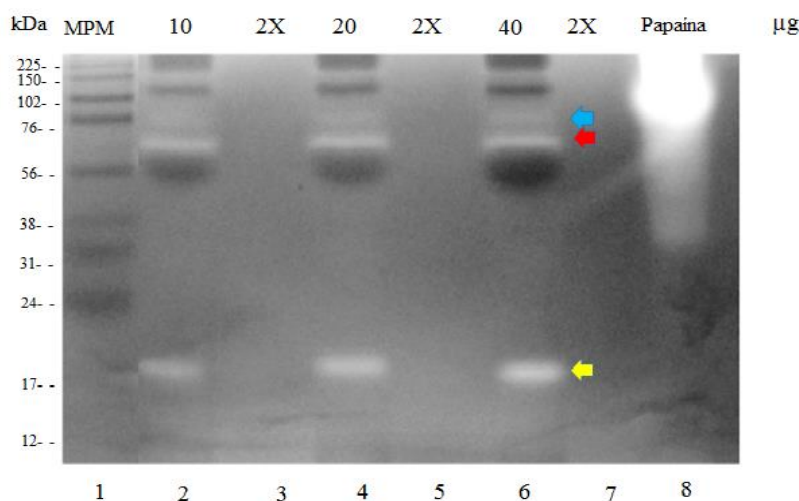


FIGURA 28. Zimografía de exosomas liberados y purificados de la línea celular MDA-MB-231.

Los extractos se hicieron en buffer Laemmli modificado 2X, bajo condiciones no reductoras. Con un gel al 10% y 0.2 mg/ml de gelatina de piel de cerdo. Con (◀) se muestra a la pro-MMP-2, (▶) MMP-2 activa. Por otra parte, se observa una banda con actividad gelatinasa con un peso molecular aproximado 20 kDa (◀). En el carril 1 se sembró el marcador de alto peso molecular, mientras que en los carriles 2, 4 y 6 se sembraron 10, 20 y 40 µg de exosomas, respectivamente; en los carriles 3, 5 y 7 sólo se sembró el buffer Laemmli 2X (buffer de carga) en los cuales no se observa ninguna banda de degradación. En el carril 8 se colocaron 10 µg de papaína como control positivo. (n=3).

Como puede observarse las bandas de degradación de la gelatina se tornan más intensas a medida que se aumenta la concentración de exosomas aplicados (Comparar carril

2 vs 4 y 6). Con estos resultados verificamos que estas nanovesículas presentan MMP2 en su forma activa así como en su forma precursora.

Cabe resaltar que para el desarrollo de esta tesis se tuvo que montar el ensayo de zimografía en exosomas, ya que no se había realizado con anterioridad en el Laboratorio de Bioquímica Celular.

7.6.1 Inhibición de la zimografía en gelatina.

Para realizar la inhibición de la degradación de gelatina, se utilizaron tres distintos inhibidores: EDTA (ácido etilendiamino tetracético) 10 mM, bestatina 100 μ M y TLCK (N-alfa-tosil-L-lisinil-clorometilcetona) 10 μ M, los cuales fueron añadidos al buffer donde se incubó el gel, con su respectivo inhibidor de manera independiente.

El proceso que se llevó a cabo para determinar la inhibición de la degradación de gelatina, fue el siguiente: se utilizaron 10 μ g de extractos exosomales los cuales fueron utilizados bajo condiciones no reductoras ni desnaturizantes, con el objetivo de mantener a sus enzimas funcionales. El carril que tenía la condición control se incubó solo con buffer de incubación, mientras que en los carriles consecutivos se colocaron los 10 μ g de exosomas y para inhibir la degradación, se colocó cada inhibidor en el buffer de reacción a la concentración mencionada. Con el inhibidor de EDTA hubo una gran disminución de la intensidad de las bandas de degradación. Mientras que con los siguientes inhibidores hubo una disminución moderada.

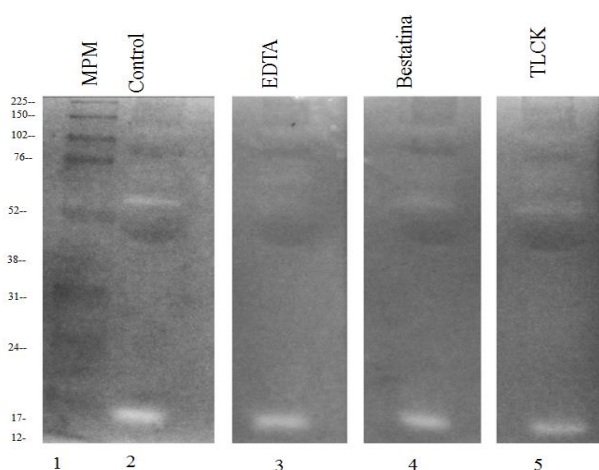


FIGURA 29. Inhibición de la degradación de gelatina: en el carril 1 se sembró el marcador de alto peso molecular, en el 2 se colocó la muestra control, mientras que en los carriles consecutivos se sembraron las muestras las cuales fueron tratadas con su respectivo inhibidor. (n=3).

7.8 DEGRADACION DE COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.

7.8.1 Degradación de fibronectina

La matriz extracelular es una red estructural compleja que rodea a las células, la cual está conformada por una variedad de fibras de colágeno, además de glicoproteínas especializadas, como fibronectina y laminina, estas proteínas son responsables de mantener la organización de la MEC.

La degradación de los componentes de la MEC en un tejido normal es un proceso organizado y muy regulado. Sin embargo, durante procesos patológicos como en el cáncer, las células tumorales son capaces de invadir el tejido que les rodea ya que tienen la habilidad de degradar la MEC, esto es debido a un aumento en la actividad proteolítica, causado por el incremento de expresión y secreción de proteasas. Es por ello que decidimos estudiar el papel proteolítico de los exosomas provenientes de las células MDA-MB-231 sobre fibronectina, ya que anteriormente demostramos la presencia de enzimas en su forma activa en estas vesículas y por lo tanto decidimos demostrar que las mismas son funcionales. Para ello se procedió como se describe en el apartado metodológico (6.3) y una vez que se obtuvieron los pellets de exosomas se re-suspendieron en el mismo buffer. En estas condiciones nos aseguramos que los exosomas y sus enzimas se encontraran funcionales, ya que hasta aquí no se utilizaron agentes reductores ni desnaturizantes.

Tales exosomas se incubaron a diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1, 5 μ gs) con 1 μ g de fibronectina por 24 horas en agitación constante a 37° C, posteriormente se detuvo la reacción con el agregado del buffer Laemmli 2X y se hicieron los extractos por separado en cada una de la muestras.

Para determinar si las enzimas proteolíticas existentes en los exosomas eran capaces de producir fragmentos de degradación de la fibronectina, se utilizó la técnica de western blot, con el uso de un anticuerpo contra fibronectina. La Figura 26A muestra dos fragmentos de degradación de aproximadamente 150 y 76 kDa. Dichas bandas se hacen más intensas a medida que se aumenta la concentración de exosomas funcionales aplicados. Mientras que en la muestra control, la cual no se ha incubado con exosomas estas bandas no se detectan. La Figura 30B muestra el análisis densitométrico de las bandas de degradación de fibronectina, donde ya a tan bajas cantidades de exosomas se producen los fragmentos de degradación anteriormente mencionados.

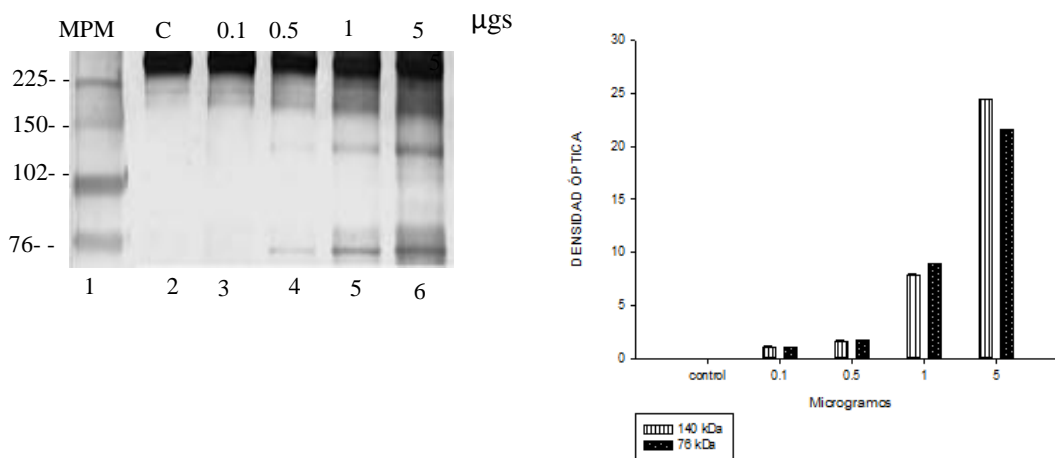


FIGURA 30. Curva de degradación de fibronectina por los exosomas A) Western blot representativo de la degradación de 1 µg fibronectina incubada en buffer de reacción con diferentes cantidades de exosomas completos. Carril 1) Marcador de alto peso molecular, Carril 2) Control (fibronectina sin exosomas); Carriles 3, 4, 5, 6 contienen 0.1 µg, 0.5 µg, 1 µg y 5 µg de exosomas, buffer de reacción y 1 µg de fibronectina, respectivamente. De cada una de las incubaciones de fibronectina y exosomas se hicieron los extractos correspondientes y se sometieron a western blot. B) Análisis densitométrico de los fragmentos de fibronectina, utilizando diferentes concentraciones de exosomas, cada una de las barras indican la media \pm desviación estándar, (n = 3).

Además se detectó en este western blot un barrido de degradación de la molécula de fibronectina, la cual está conformada por dos cadenas polipeptídicas de 250 kDa cada una, que se hace más notorio al comparar el carril 2 (control) vs 3 y 4, y más aún con los carriles 5 y 6 (Figura 30 A).

En conclusión los exosomas provenientes de la línea celular MDA-MB-231 son capaces de degradar fibronectina, la cual está implicada en procesos tales como adhesión e interacción célula-MEC, por lo tanto ambos procesos se ven comprometidos durante su degradación, lo cual facilitaría la migración y/o invasión tumoral.

7.8.2 Degradación de laminina-1.

La laminina es una glicoproteína que forma parte de la lámina basal, la cual es una barrera que separa compartimentos tisulares. Esta membrana basal es perdida o penetrada por las células tumorales durante la invasión y la metástasis. Liotta y colaboradores en el 2000, por inmunohistoquímica con un antisuero que reconoce la laminina 1, demostraron una discontinuidad en la membrana basal en tumores malignos no así en tumores benignos. La fragmentación o ausencia de estructuras de la membrana basal visto en tumores malignos es debido a la degradación proteolítica de la misma (Patarroyo et al., 2002).

En base a lo descrito nos propusimos investigar el papel de los exosomas provenientes de células altamente invasivas MDA-MB-231, y demostrar si ellos, que contienen las enzimas anteriormente analizadas, tienen la capacidad de degradar laminina-1. Por lo cual, se recolectaron los exosomas y se incubaron por 24 h con 1 μ g de laminina-1 en agitación constante a 37°C.

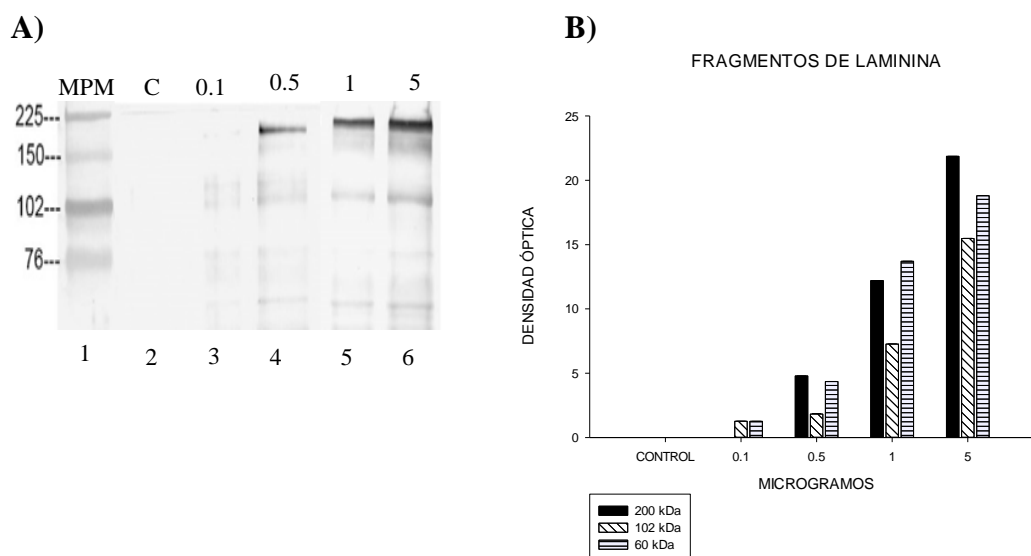


FIGURA 31. Curva de degradación de laminina. **A)** Se sembraron las muestras de la incubación de 1 μ g de laminina y diferentes cantidades de exosomas completos en un gel al 7,5%. Carril **1)** Marcador de alto peso molecular, Carril **2)** Control (laminina sin exosomas); Carriles **3, 4, 5, 6)** contienen 0.1 μ g, 0.5 μ g, 1 μ g y 5 μ g de exosomas, buffer de reacción y 1 μ g de laminina, respectivamente. De cada una de las incubaciones de laminina y exosomas se hicieron los extractos correspondientes y se sometieron a western blot. **B)** Análisis densitométrico de los fragmentos de laminina, utilizando diferentes concentraciones de exosomas, cada una de las barras indican el promedio \pm desviación estándar, (n = 3).

La Figura 31 A muestra las bandas de degradación de laminina con pesos moleculares de 200, 110 y 60, respectivamente. Dichas bandas de degradación se evidencian a partir del uso

de 0.1 μg de exosomas, y aumentan su intensidad a mayores cantidades de exosomas utilizados, en la misma figura no se observa a laminina esto se debe a que es una proteína muy grande de aproximadamente 800 kDa, por lo tanto no es capaz de migrar en el gel durante la electroforesis, tal resultado también fue observado por Horejs cristine y colaboradores en el 2014.

El análisis densitométrico de estas moléculas indica que existe un aumento en el procesamiento proteico de laminina por parte de los exosomas, cuando se aumenta la concentración de exosomas aplicados.

7.9. INHIBICIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE COMPONENTES DE LA MEC.

7.9.1 Inhibición de la degradación de fibronectina.

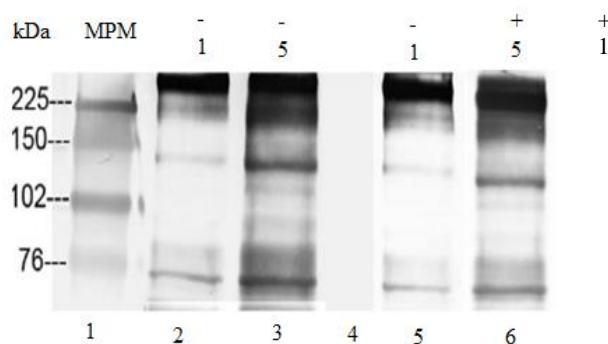
Para inhibir la degradación de fibronectina, se utilizó, Bestatina 100 μM , EDTA 10 mM los cuales son inhibidores de las metaloproteinasas, y TLCK 10 μM para inhibir la actividad la serin proteasa furina. Las concentraciones utilizadas de cada uno de los inhibidores corresponden a la CE50, las cuales ya han sido ampliamente reportadas por otros autores (Yoneda et al., 1991; Liang et al., 2014; Gogly et al., 1998).

7.9.2 Inhibición de la degradación de fibronectina con EDTA 10 mM.

El proceso que se llevó a cabo para determinar la inhibición de la degradación de fibronectina, fue el siguiente: se utilizaron dos concentraciones 1 y 5 μg de exosomas frescos, los cuales se incubaron con 1 μg fibronectina, ambas muestras corresponden al grupo control; mientras que para el grupo de tratamiento se utilizaron tanto los exosomas y la fibronectina a las concentraciones anteriormente mencionadas, más el inhibidor correspondiente.

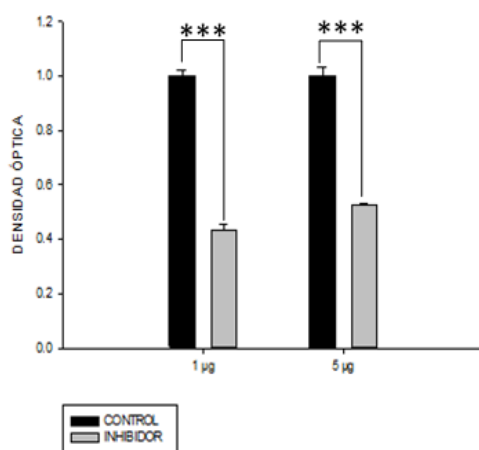
La Figura 32A muestra un western blot representativo de la inhibición de la degradación de fibronectina con el agregado de EDTA 10 mM durante la reacción. Se observa una disminución de la intensidad de los fragmentos de 150 y 76 kDa con 1 y 5 μg de exosomas comparando con sus respectivos controles (Figura 27 A, carriles 5 vs 2 y 6 vs 3, respectivamente).

A)



B)

Fragmento de 76 kDa



C)

Fragmento de 150 kDa

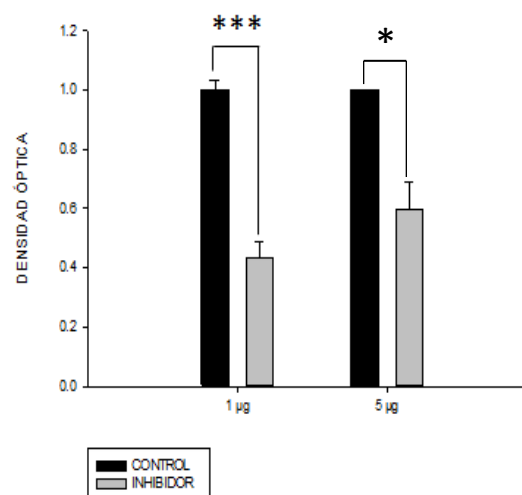


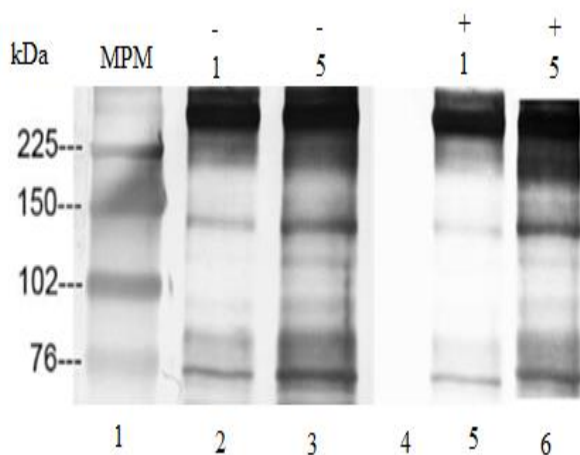
FIGURA 32. Inhibición de la degradación de fibronectina con EDTA 10mM. A) Western blot representativo de la inhibición de la degradación de fibronectina, donde se muestran tanto los grupos control (carriles 2 y 3) y el tratado con el inhibidor (carriles 5 y 6). **B)** Análisis densitométrico del fragmento de 76 kDa, los *** señalan una diferencia significativa con una $p < 0.001$. Cada una de las barras indican el promedio \pm desviación estándar, ($n = 3$). **C)** Análisis densitométrico del fragmento de 150 kDa, los *** señalan una diferencia significativa con una $p < 0.01$, y * con un valor de $p < 0.05$. Cada una de las barras indican el promedio \pm desviación estándar, ($n = 3$).

El análisis densitométrico nos muestra que el fragmento de 76 kDa disminuyó un 58% con respecto al control por la presencia de EDTA 10 mM y utilizando 1 µg de exosomas completos en la reacción, arrojando una significancia con una $p < 0.001$. Mientras que al utilizar 5 µg de exosomas completos la proteólisis de fibronectina y con el inhibidor bajó en un 47 %, con una $p < 0.05$, con respecto a su control (Figura 32 B).

Para el fragmento de fibronectina de 150 kDa, el agregado de EDTA 10 mM durante la reacción produjo una disminución del 57% con respecto al control para 1 μ g de exosomas completos con una $p < 0.01$. Por otro lado, cuando se utilizaron 5 μ g de estas nanovesículas se obtuvo una inhibición de la degradación de 41.5 %, con un valor de $p < 0.05$, comparando con el control sin el agregado del inhibidor (Figura 32 C).

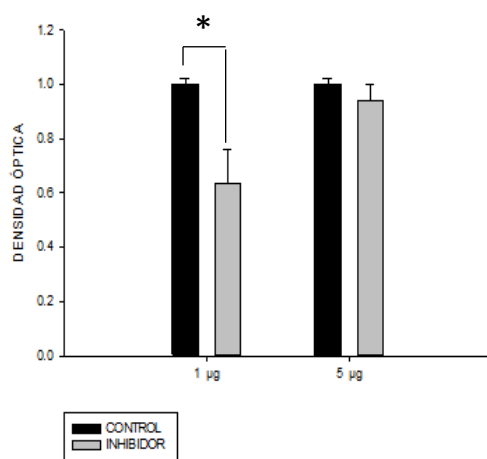
7.9.3 Inhibición de la degradación de fibronectina con Bestatina 100 μ M.

A)



B)

Fragmento de 76 kDa



C)

Fragmento de 150 kDa

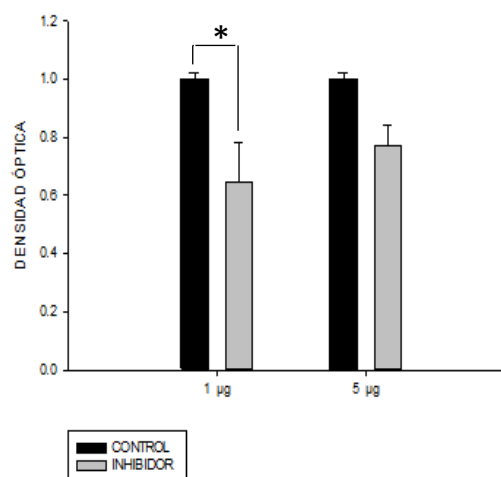


FIGURA 33. Inhibición de la degradación de fibronectina con Bestatina 100 μ M. A) Western blot significativo, en el cual se muestran tanto los grupos control (carriles 2 y 3) y con tratamiento de Bestatina (carriles 5 y 6). B) Análisis densitométrico del fragmento de 76 kDa, el * señala una diferencia significativa con una $p < 0.05$. Cada una de las barras indican el promedio \pm desviación estándar, ($n = 3$). C) Análisis densitométrico del fragmento de 150 kDa, el * señala una diferencia significativa con una $p < 0.05$. Cada una de las barras indican el promedio \pm desviación estándar, ($n = 3$).

La Figura 33 A muestra un western blot representativo de la inhibición de la degradación de fibronectina con el agregado de Bestatina 100 μM durante la reacción. Se observa una disminución de la intensidad de los fragmentos de 150 y 76 kDa, la cual es más notoria cuando se utiliza 1 μg de exosomas que cuando se usaron 5 μg de los mismos comparando cada uno con sus respectivos controles (Figura 28 A, carriles 5 vs 2 y 6 vs 3, respectivamente).

La Figura 33 B corresponde al análisis densitométrico del fragmento de degradación de fibronectina de 76 kDa, donde se comparó el tratamiento de bestatina 100 μM contra el control. Para 1 μg de exosomas completos se obtuvo una disminución de la proteólisis del 35% con respecto al control, la cual tiene un efecto significativo con una $p < 0.05$, mientras que cuando se utilizaron 5 μg de exosomas completos no se observa un decremento de la degradación que sea significativo.

Para el análisis densitométrico del fragmento de degradación de fibronectina de 150 kDa, para 1 μg de exosomas completos y bajo el tratamiento con Bestatina 100 μM se obtuvo una inhibición de la proteólisis del 37% con respecto al control con $p < 0.05$; mientras que cuando se utilizaron 5 μg de exosomas no se encontró una diferencia significativa de la inhibición de la degradación de fibronectina (Figura 33 C).

7.9.4 Inhibición de la degradación de fibronectina con TLCK 10 μ M.

Para estudiar el efecto producido indirectamente por la acción de furina sobre su proteína sustrato MT1-MMP que pudiera estar interviniendo en la degradación de fibronectina, se utilizó el inhibidor de serin-proteasas TLCK 10 μ M, con 1 μ g de exosomas.

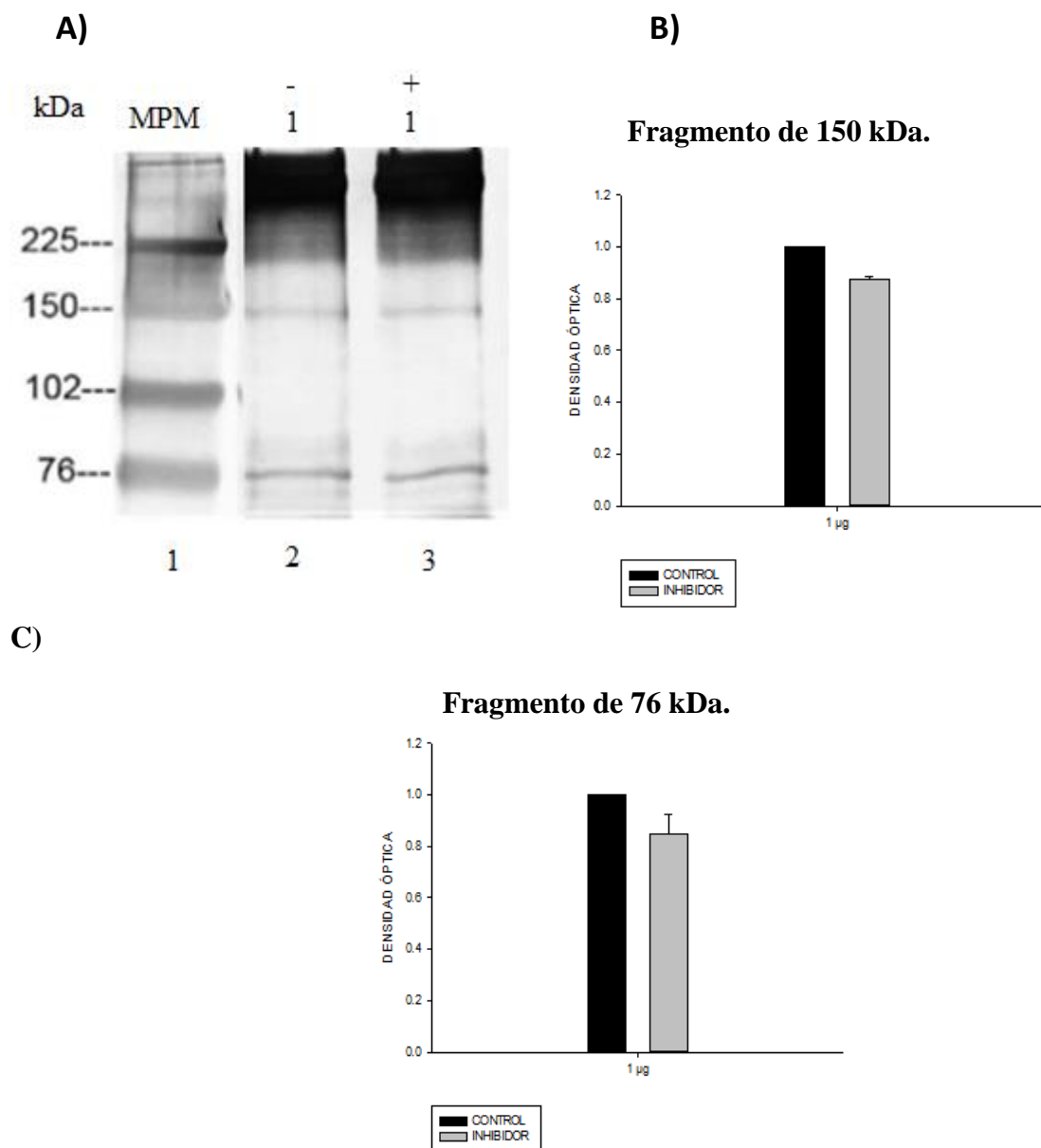


FIGURA 34. Inhibición de la degradación de fibronectina con TLCK 10 μ M. **A)** Western blot representativo de la inhibición de la degradación de fibronectina, en el cual se utilizó 1 μ g de exosomas los cuales se incubaron bajo dos condiciones, con y sin el inhibidor TLCK (carriles 2 y 3, respectivamente). **B)** Análisis densitométrico de la banda de 76 kDa. Cada una de las barras indican el promedio \pm desviación estándar, (n = 3). **C)** Análisis densitométrico de la banda de 150 kDa. Cada una de las barras indican el promedio \pm desviación estándar, (n = 3).

En la Figura 34 A sólo se observa una ligera baja en la intensidad de los fragmentos de 76 y 150 kDa correspondientes a la degradación de fibronectina en presencia del inhibidor TLCK. Esto se corrobora al realizar el análisis densitométrico de las bandas de 76 y 150 kDa, donde el efecto de la presencia de TLCK redujo la degradación de fibronectina en un 13 y 11.5%, respectivamente, los cuales no fueron significativos.

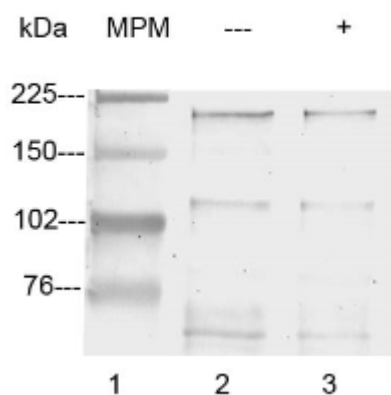
7.10 Inhibición de la degradación de laminina.

Para la inhibición de la degradación de laminina por las enzimas proteolíticas que contienen los exosomas, se utilizaron los tres tratamientos con inhibidores que se usaron anteriormente y a las mismas concentraciones en el buffer de reacción. Se analizó por separado cada uno de los efectos producidos por cada inhibidor.

7.10.1 Inhibición de la degradación de laminina con EDTA 10 mM.

En la Figura 30A se observa el western blot representativo. En el carril 2 se muestran las bandas de degradación de laminina en la condición control; dando pesos moleculares de 200, 110 y 60 kDa; mientras que en el carril consecutivo se observan las bandas de degradación en las cuales se utilizó como inhibidor EDTA. Al comparar el carril 2 vs 3, se encuentra que la intensidad de las bandas correspondientes a los tres fragmentos de degradación son menos intensas que en el control (Figura 35 A). Es decir que, la presencia del inhibidor EDTA en la reacción indujo una menor proteólisis de laminina por parte de las metaloproteinasas que se encuentran en los exosomas.

A)



B)

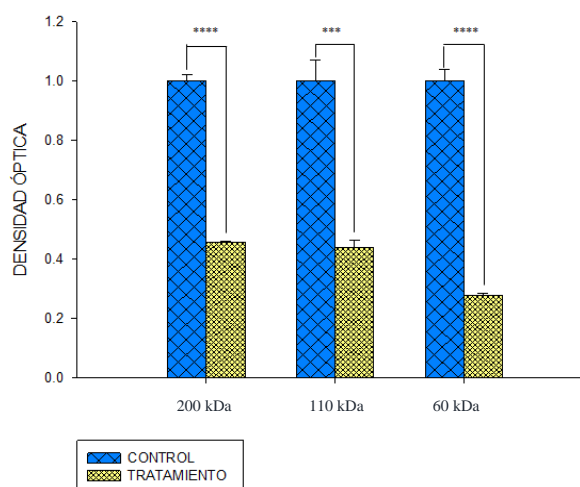


FIGURA 35. Inhibición de la degradación de laminina por EDTA 10 mM. A) Western blot representativo de la inhibición de la degradación de laminina, carril 1: marcador de peso molecular; carril 2 y 3: 1µg de laminina, 1µg de exosomas completos en buffer de reacción, sin y con EDTA 10 mM, respectivamente. B) Análisis densitométrico de las bandas de degradación del western blot de A. Cada una de las barras indican el promedio \pm desviación estándar, (n = 3). Los **** revelan una significancia con una $p < 0.0001$.

En la Figura 35 B se hizo el análisis densitométrico para cada uno de estos fragmentos para las dos condiciones de tratamiento antes mencionadas. Se observa una inhibición de la degradación de laminina por la presencia de EDTA en la reacción, del 54%, 56% y 72% para

los fragmentos de 200, 110 y 60 kDa, respectivamente. Dicha inhibición es significativa para los tres fragmentos con una $p < 0.0001$.

7.10.2 Inhibición de la degradación de laminina con Bestatina 100 μM .

Como hemos visto hasta ahora los exosomas estudiados son capaces de degradar laminina y su efecto proteolítico es inhibido significativamente cuando se utilizó EDTA. El siguiente objetivo fue estudiar el efecto inhibitorio de Bestatina sobre la actividad proteolítica de los exosomas. La Figura 36 A muestra los resultados obtenidos por el western blot, donde se observa que la presencia de Bestatina a una concentración final de 100 μM en la reacción disminuye los niveles de los fragmentos de 200, 110 y 60 kDa.

Al realizar el análisis densitométrico de dichas bandas de la Figura 30A y comparando con las bandas controles se corrobora que la Bestatina es capaz de disminuir de manera significativa la proteólisis de laminina y en consecuencia se observa una disminución de los fragmentos con pesos moleculares de 200, 110, 60 kDa en un porcentaje de 38, 54, y 64 %, respectivamente, con respecto a la condición control (Figura 30 B). Además, la disminución de la degradación de laminina por parte de las enzimas exosomales fue significativa para todas las bandas analizadas con una $p < 0.0001$ (Figura 36 B).

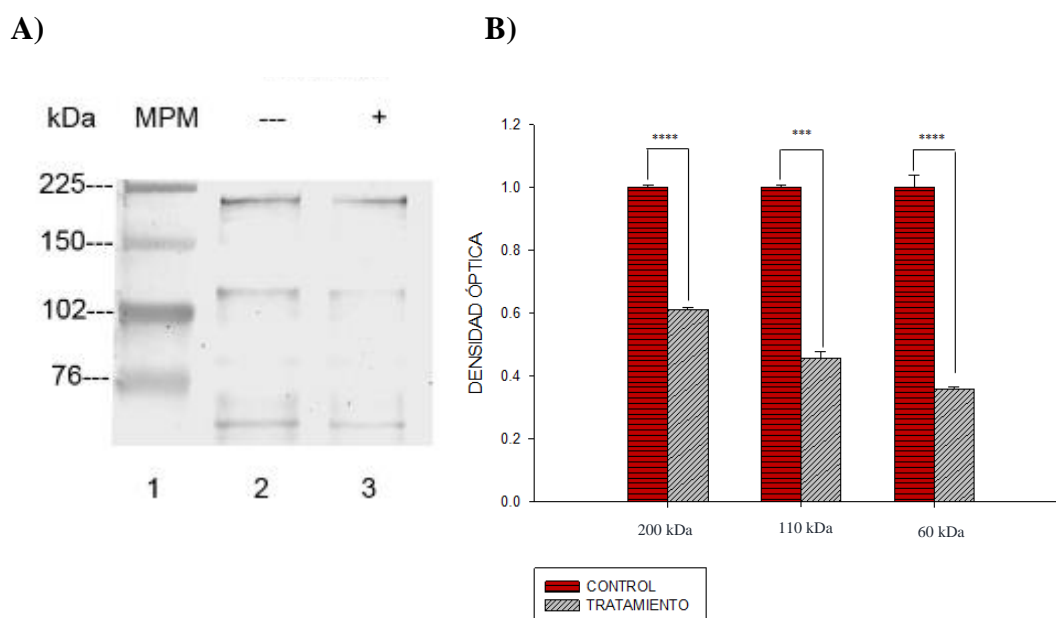


FIGURA 36. Inhibición de la degradación de laminina con Bestatina 100 μM . A) Western blot representativo de la inhibición de la degradación de laminina-1 en presencia de Bestatina, carril 1: marcador de peso molecular; carril 2 y 3: 1 μg de laminina, 1 μg de exosomas completos en buffer de reacción, sin y con Bestatina 100 μM , respectivamente. B) Análisis densitométrico de la bandas de degradación del western blot de A. Cada una de las barras indican el promedio \pm desviación estándar, (n = 3).

7.10.3 Inhibición de la degradación de laminina con TLCK 10 μ M.

Por último se investigó si la degradación de laminina por las enzimas exosomales era también impedida por TLCK el cual es un inhibidor específico para las serin-proteasas, en este caso para furina.

El western blot que se muestra en la Figura 37 A revela una marcada disminución del fragmento de 200 kDa con respecto al control (comparar carril 2 vs 3), mientras que para los otros de 110 y 60 kDa no se observan grandes cambios en la intensidad de sus bandas. Estos resultados se correlacionan con la densitometría de las bandas de este western blot (Figura 32B). Para el fragmento de 200 kDa de peso molecular hubo una disminución del 89% con respecto a la condición control; mientras que para los fragmentos de pesos moleculares de 110 kDa y de 60 kDa dicha disminución fue del 11% y 10%, respectivamente. La disminución de la degradación de la banda de mayor peso molecular fue significativa con una $p < 0.0001$, mientras que para las dos últimas, no se encontraron cambios significativos entre la condición control y la del tratamiento (Figura 37 B).

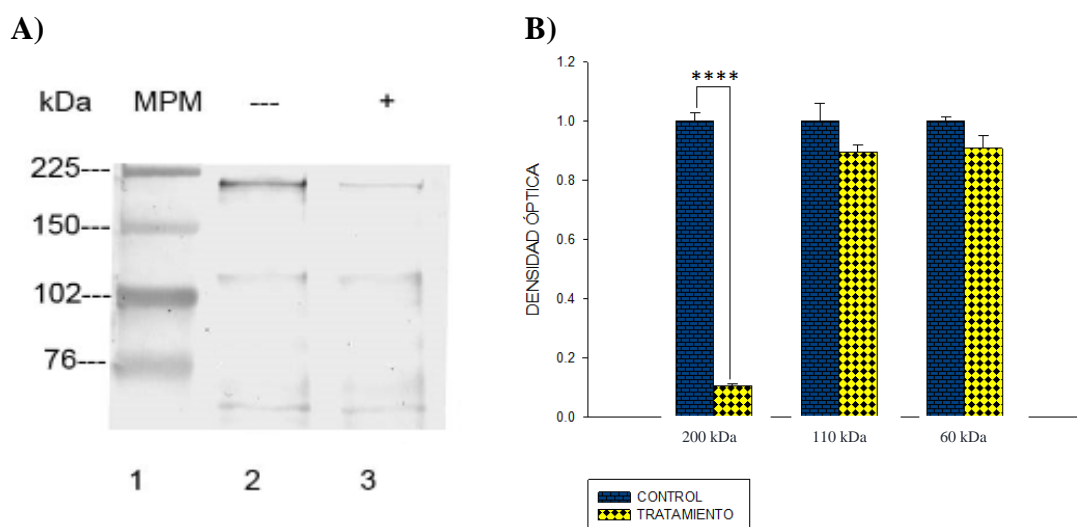


FIGURA 37. Inhibición de la degradación de laminina por TLCK 10 μ M . A) Western blot representativo de la inhibición de la degradación de laminina-1, carril 1: marcador de peso molecular, carril 2 y 3: 1 μ g de laminina, 1 μ g de exosomas completos en buffer de reacción, sin y con TLCK 10 μ M, respectivamente. **B)** Análisis densitométrico de las bandas del western blot de A. Cada una de las barras indican el promedio \pm desviación estándar, (n = 3). Los **** indican una $p < 0.0001$.

8. DISCUSIÓN.

Los exosomas fueron inicialmente descritos hace más de 30 años por Rose Johnstone, como vesículas secretadas exclusivamente por los reticulocitos (glóbulos rojos inmaduros), en aquel tiempo se les consideró como vesículas cuya función era descartar componentes moleculares indeseados por las células (Frydrychowicz et al., 2015). No obstante en la última década, la investigación en este campo ha sido muy sobresaliente, ya que se ha demostrado que diferentes tipos celulares, incluyendo a las **células tumorales**, son capaces de liberar exosomas (Kahlert & Kalluri, 2013). Estos últimos tienen un rol importante en la comunicación intercelular ya que contienen moléculas de su célula de origen, por ejemplo: lípidos, material genético, y proteínas, los cuales son transportados a otras células blanco receptoras, donde ejercen su función, ya sea generando cambios en la señalización celular e induciendo así una modificación del estado fisiológico de la célula blanco. Generalmente están relacionados con procesos fisiológicos normales, aunque también se les ha asociado un papel importante en distintas enfermedades, por ejemplo en el cáncer de mama. (Villagrasa et al., 2014).

Las células tumorales tienden a liberar exosomas, los cuales favorecen a la progresión tumoral, la proliferación, la migración, la angiogénesis y la evasión inmune, (Villagrasa et al. 2014), y con nuestros estudios hemos demostrado que también promueven la **degradación de los componentes de la MEC**, como será detallado más adelante.

El trabajo experimental de la presente Tesis, se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica Celular del Instituto de Fisiología BUAP, se utilizaron exosomas secretados por la línea celular MDA-MB-231. Estas células provienen de un adenocarcinoma de mama, las cuales poseen un fenotipo invasivo y altamente metastásico. Además, esta línea celular es una de las más utilizadas para el estudio experimental *in vitro* del cáncer de mama ya que presentan un crecimiento extraordinariamente rápido en medios de cultivo poco enriquecidos. Para recolectar los exosomas de las células mencionadas, se utilizó el método descrito por Raposo G. y Cols 1996. Sin embargo, se hicieron algunas modificaciones con la finalidad de aumentar la secreción de exosomas al medio extracelular, tal mecanismo de liberación, requiere del transporte y fusión de los MVBs con la membrana plasmática, aunque el proceso exacto no ha sido totalmente dilucidado. En el 2003 Savina y colaboradores demostraron, que las células K562 tienden a liberar una mayor cantidad de exosomas cuando

son incubadas con el ionóforo A23187, debido a que la secreción de los mismos, es un mecanismo calcio dependiente (Kharaziha et al., 2012). En base a lo anterior se procedió a experimentar tres métodos distintos ya reportados incubando a las células con el ionóforo, donde demostramos que la incubación de las células con una concentración del A23187 de 5 μM por 24 horas nos permitió obtener una mayor concentración de proteínas lo cual se correlaciona con un aumento de la liberación de exosomas de un 114% con respecto a la condición control. Estos datos concuerdan con los reportados por Sabina y colaboradores en 2003.

Los otros dos métodos no fueron tan efectivos (Soo et al., 202; Koumangoye et al., 2011). Es por ello que para el desarrollo experimental de esta Tesis, se utilizó el método de 24 horas con ionóforo 5 μM .

Por otra parte para asegurarnos que el aumento intracelular de calcio no producía daño en las células bajo tratamiento, se llevó a cabo un análisis de citotoxicidad mediante el ensayo de MTT. Dicha técnica es quizá la más utilizada ya que permite determinar la cantidad de células vivas, debido a que las células metabólicamente activas son capaces de reducir MTT a formazan, la cantidad de este último es proporcional al número de células en buen estado (Mosmann et al, 1983). Mediante este ensayo demostramos que no hay un efecto citotóxico con las concentraciones de ionóforo y los tiempos utilizados, ya que no encontramos cambios significativos cuando se comparó cada uno de los tratamientos con su respectivo control. De tal manera, hasta ahora hemos comprobado que el método descrito por Savina y colaboradores fue el que nos permitió purificar de manera eficaz una mayor cantidad de exosomas y sin daño celular.

Hasta la fecha se han identificado más de 4500 proteínas presentes en exosomas de diferentes tipos celulares (Mathivanan et al., 2010), y de diferentes organismos, es importante mencionar que estas vesículas no contienen un arreglo proteico al azar, en lugar de ello contienen un específico grupo de proteínas provenientes de la membrana plasmática, de la vía endocítica y citosol.

Las proteínas citosólicas incluyen a las proteínas del citoesqueleto como actina ya que son importantes para la fusión con la membrana plasmática. Los exosomas también son enriquecidos con las tetraspaninas CD63 y CD81 (Mathivanan et al., 2010). En conjunto

forman parte de los marcadores moleculares exosomales, debido a que se encuentran comúnmente expresadas en todos los tipos de exosomas, independientemente de su célula de origen. (Mathivanan et al., 2010; Braicu et al., 2015; Frydrychowicz et al., 2015)

Uno de los objetivos planteados fue demostrar la expresión de marcadores específicos en los extractos exosomales. Este paso fue crucial, ya que con ello se corrobora que después de las centrifugaciones diferenciales y ultra-centrifugación el pellet obtenido corresponde a exosomas purificados que presentan los marcadores β -actina, CD63, CD81 y HLA-DR α , usando la metodología de western blot; y que los mismos no se encuentran contaminados con algún tipo de otras vesículas o restos celulares (Asfar et al., 2012). Otros grupos de investigación, utilizando la misma metodología de purificación de exosomas han obtenido resultados similares (Yang et al., 2013; Koumangoye et al., 2011; Soo et al., 2012).

Las células tumorales se caracterizan por una alta expresión de proteínas en su membrana plasmática como: furina y MMPs, en comparación con las células normales (Ohuchi, 1997). Por lo tanto como las células MDA-MB-231 son de origen tumoral era de esperarse que ambas proteínas fueran detectadas en los extractos celulares, mediante western blot, y evidentemente los datos obtenidos demuestran la expresión de las distintas formas de estas enzimas. Estos resultados concuerdan con los reportados por Jean et al., 1998; Bassi et al., 2003; Sato 1994; Poincloux et al., 2011.

Furina es una enzima que presenta una distribución ubicua y que tiene una gran importancia para el procesamiento proteolítico de diversos sustratos, la molécula intacta de pro-furina tiene un peso molecular alrededor de 110 kDa, después de su síntesis es transportada hacia el RE donde pierde el péptido señal y el clivaje del péptido señal para generar una enzima activa de 98 kDa, esta forma de expresión es susceptible a un proceso de derivación de ectodominios, que genera la forma soluble con un peso molecular de 80-82 kDa (Creemers et al., 1995).

Nosotros identificamos las tres formas de expresión de furina en muestras provenientes de las células MDA-MB-231, mediante la técnica de western blot, las cuales son: pro-furina, furina madura y la forma soluble con pesos moleculares de 110, 98 y 80-82 kDa, respectivamente. Pero en los exosomas liberados por éstas, utilizando los mismos anticuerpos y trabajando las muestras de manera similar, solo se encontró la forma activa de 98 kDa. Lo cual resulta muy interesante ya que nos indica que existe un importante proceso

de selección de proteínas cargo en los exosomas y que dicha forma activa de furina es de origen endocítico. Adicionalmente podemos concluir que las muestras de exosomas analizadas no presentan contaminación con algunas otras vesículas o fragmentos celulares, de ser así se observaría el mismo patrón de la expresión celular de esta convertasa.

La sobreexpresión de furina se correlaciona con el aumento en el procesamiento de una gran variedad de sustratos que de manera directa o indirecta participan en procesos como la invasión y la metástasis. Entre tales sustratos procesados por furina sobresalen: TGF- β 1, IGF-1 y algunos miembros de las MMPs (Siegfried et al., 2003).

Las MMPs pertenecen a una familia de endopeptidasas dependientes de Zn y Ca²⁺, éstas juegan un papel importante en varios procesos pato-fisiológicos como: remodelación tisular, migración, invasión tumoral y degradación de la MEC. Las MMPs son sintetizadas y secretadas como enzimas latentes (pro-MMPs), muchas de las cuales son procesadas extracelularmente a su forma activa. Por otra parte la expresión de las MMPs de tipo transmembranal (MT-MMP) las cuales se encuentran ancladas a la membrana como MT1-MMP pertenece a este último grupo, y es una enzima muy estudiada debido a que potencia la invasión tumoral y participa en la remodelación de la MEC (Shimoda & Khokha, 2013; Poincloux et al., 2011).

MT1-MMP es expresada como un precursor inactivo, denominado pro-MT1-MMP, con un peso molecular de 64 kDa y es procesado intracelularmente por furina en el TGN, posteriormente a ello se puede encontrar la forma activa, MT1-MMP, en la membrana plasmática con un peso molecular de 55 kDa. Distintos procesos se han desarrollado para controlar la cantidad de MT1-MMP activa en la membrana plasmática tales como: 1. Procesamiento autocatalítico, y 2. Internalización de MT1-MMP (Uekita et al., 2001, Osenkowski et al.2001). 1. El procesamiento autocatalítico da como resultado dos fragmentos de 20 y 43 kDa, el primero de ellos es soluble, mientras que el segundo se queda anclado a la membrana plasmática (Hakulinen et al., 2008).

2. La internalización de MT1-MMP es un mecanismo que permite regular la expresión de esta enzima en la membrana celular. Dicho mecanismo es dependiente de clatrina y dinamina, y se requiere de la integridad de al menos 20 aa en el dominio citoplasmático, en particular de un motivo dileucina que funciona como un sitio de alta afinidad para AP-2 o complejo adaptador de clatrina (Poincloux et al., 2011). Por lo tanto

una vez internalizada MT1-MMP es colocalizada con marcadores de distintos compartimentos endocíticos, incluyendo endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas (Remacle et al., 2003; Hakulinen et al., 2008).

Los endosomas tardíos participan en la biogénesis de las exosomas, por lo cual se podría encontrar a MT1-MMP en la membrana de estas nanovesículas. Uno de los objetivos del presente trabajo fue investigar las formas de expresión de MT1-MMP tanto en las células MDA-MB-231 como en sus exosomas. Como era de esperarse, encontramos las tres formas de expresión de MT1-MMP: pro-MT1-MMP de 64 kDa, activa de 55 kDa y el fragmento transmembranal de 43 kDa, pero lo sobresaliente de nuestro trabajo es que solo encontramos la forma activa de 55 kDa en los exosomas. Este resultado coincide con lo reportado por Hakulinen y colaboradores en el 2008. Ellos detectaron a MT1-MMP activa en los exosomas provenientes de las células de melanoma humano (G361) mediante al uso de western blot. Sin embargo también reportan una banda inespecífica de aproximadamente 75 kDa, la cual no fue detectada en nuestras muestras de exosomas provenientes de la línea celular MDA-MB-231.

Por lo tanto podemos decir que durante la internalización de MT1-MMP y su reciclaje en los compartimentos endocíticos, ésta es seleccionada como molécula cargo en los exosomas.

MT1-MMP activa de 55 kDa, es capaz de digerir diferentes moléculas de la MEC así como también de activar a algunas MMPs como MMP2, mediante el procesamiento proteolítico del prodominio de sus proteínas sustrato (Itoh et al., 2015).

Varios grupos de investigadores han estudiado el mecanismo de activación de pro-MMP2 de 72 kDa, mediante la homodimerización de MT1-MMP, este complejo se forma por el dominio hemopexina y de transmembrana, en el cual una de las moléculas de MT1-MMP es inhibida por TIMP-2 que se une al sitio catalítico, mientras que proMMP-2 tiene afinidad por el lado carboxilo terminal del inhibidor, dando como resultado un complejo ternario: MT1-MMP(2), pro-MMP2 y TIMP-2, entonces la molécula de MT1-MMP que se encuentra libre, es capaz de remover el prodominio y activar a MMP-2 con un peso molecular de 62 kDa (Itoh et al., 2015). Por lo tanto la generación de la forma activa ocurre de manera concomitante con una disminución del peso molecular y la exposición del sitio activo (Itoh et al., 2015).

La MMP-2 o gelatinasa B, ha sido extensamente estudiada debido a su asociación con la invasión tumoral y metástasis, se sabe que su expresión y actividad son elevadas en muchos tumores malignos humanos y se correlacionan con la progresión tumoral (Itoh et al., 2015; Stoica et al., 2014; Egeblad et al., 2002.). MMP2 y MMP9 se descubrieron inicialmente como colagenasas tipo IV debido a su capacidad para hidrolizar a este último, el cual es uno de los principales componentes de la lámina basal y una importante barrera estructural para la invasión (Tanzer et al., 2006). Ambas enzimas pueden escindir una variedad de proteínas de la MEC pero son extremadamente eficientes para la degradación de colágeno tipo 1 (gelatina) y en consecuencia se denominan gelatinasas. Para demostrar su actividad en muestras biológicas, se desarrolló una técnica llamada zimografía, la cual permite detectar la actividad gelatinolítica, en geles copolimerizados con acrilamida y gelatina (Snoek-van et al., 2005). Una importante ventaja que nos ofrece, es que permite identificar tanto a MMP-2 y MMP-9 así como también de sus formas pro-MMP, en la misma prueba a partir de una sola muestra biológica.

Con base a lo anterior se decidió montar la técnica de zimografía en el Laboratorio, con la finalidad de investigar si los exosomas provenientes de la línea celular MDA-MB-231 contienen actividad gelatinolítica. Para ello se prepararon extractos exosomales, en los cuales no se utilizaron agentes reductores, ni se hirvieron las muestras para evitar la desnaturalización de las mismas. Así encontramos que los extractos exosomales contienen como proteínas cargo a la MMP-2 de 62 kDa y a su forma pro-MMP2 de 72 kDa. Este resultado es importante ya que con ello pudimos demostrar su presencia y además que tales enzimas tienen actividad gelatinolítica. Además, observamos que a mayor cantidad de extractos exosomales sembrados mayor es la intensidad de las bandas de degradación de gelatina.

Por otra parte, también detectamos una banda de aproximadamente 20 kDa. Este fragmento en los extractos exosomales podría corresponder al dominio catalítico de MMP-2, el cual pudo haberse generado durante el tiempo de incubación; ya que no hay ninguna MMP reportada hasta ahora con actividad gelatinolítica con tal peso molecular. De manera similar, en el 2007 Christian y colaboradores trabajando con células THP-1 y mediante zimografía, identificaron la MMP-9 de 92 kDa y una banda de degradación con un peso molecular de 35 kDa, donde tal fragmento sugieren los autores, presumiblemente se debe al

dominio catalítico de MMP-9, ya que éste contiene repeticiones tipo fibronectin II, el cual es muy importante para la unión a gelatina, y además el sitio de unión a zinc el cual es crucial para su actividad proteolítica de la enzima.

Por otra parte también se hizo la inhibición de la degradación de gelatina, en el cual se utilizaron 10 μ gs de proteínas exosomales más los siguientes inhibidores: EDTA (ácido etilendiamino tetracético) 10 mM, Bestatina 100 μ M y TLCK (N-alfa-tosil-L-lisil-clorometilcetona) 10 μ M, los cuales fueron añadidos al buffer donde se incubó el gel, con su respectivo inhibidor de manera independiente.

Las MMPs son enzimas calcio dependientes, por lo que al utilizar el quelante de calcio EDTA, se observó que las bandas de degradación producidas por la actividad de pro-MMP2 y de MMP2, detectadas mediante la zimografía, disminuyen su intensidad con respecto a la condición control.

Por otra parte también utilizamos Bestatina, ya que en base a trabajos de Yoneda y colaboradores en 1991 y de Liang en el 2014, donde utilizan este inhibidor en estudios sobre diferentes líneas celulares como SN12M y MG63, en los que demuestran que la presencia de Bestatina disminuye la actividad gelatinolítica en dichas células. Esto se debe a un decremento de la activación de las MMPs, y una disminución de la expresión de la MMP-2. En este trabajo de Tesis, a nivel exosomal encontramos una moderada inhibición de la degradación de gelatina con 10 μ g de proteínas exosomales, utilizando Bestatina 100 μ M.

Adicionalmente se usó TLCK como inhibidor de furina, y se obtuvieron resultados similares a los observados cuando se utilizó Bestatina. Por lo tanto podemos concluir que furina exosomal podría participar directamente o indirectamente en la degradación de gelatina, aunque se encuentre expresada en exosomas de las células tumorales MDA-MB-231.

La degradación de la MEC es un prerrequisito para la adquisición del fenotipo invasivo (Arya et al, 2006). Estudios en líneas celulares tumorales indican que la capacidad invasiva de las células se correlacionan con la actividad de las MMPs. Éstas se encuentran mayormente expresadas en los invadopodios, los cuales son protuberancias de la membrana plasmática que se forman por re-arreglos de los microfilamentos de actina, y juegan un rol fundamental en la invasión tumoral, ya que promueven la intravasación al torrente sanguíneo y vasos linfáticos así como también una extravasación a sitios secundarios, por lo que son

capaces de degradar la MEC en repetidas ocasiones (Arya et al.,2006). Esto es debido a que en dichas estructuras se encuentra un aumento en la expresión de enzimas proteolíticas, y por otra parte se ha demostrado que en los invadopodios es precisamente el sitio de acoplamiento para la liberación de exosomas (Hoshino et al.,2013).

La mayoría de los trabajos publicados a la fecha sobre la participación de los exosomas en el cáncer, se han centrado en el estudio de estas vesículas cuya función es modular la comunicación entre las células tumorales y el estroma. No obstante, nosotros decidimos estudiar la participación de los exosomas sobre la degradación de la MEC en base a lo descrito; ya que al igual que las células, hemos demostrado que estas vesículas también contienen enzimas proteolíticas en su forma de expresión activa.

Para investigar el rol de los exosomas sobre componentes de la MEC, se prepararon las muestras bajo condiciones no reductoras ni desnaturalizantes, cabe resaltar que para estos experimentos siempre se utilizaron diferentes cantidades de exosomas frescos, los cuales fueron incubados con: fibronectina y laminina. Cada una de manera independiente.

La fibronectina y laminina son glicoproteínas que tienen dominios de contacto con las células y la MEC, además forman parte de la lámina basal e intervienen en procesos como la proliferación, la migración, y la diferenciación (Ekblom & Timpl, 1996).

Fibronectina es una glicoproteína conformada por dos subunidades con peso molecular de 250 kDa cada una, unidas por puentes disulfuro en el extremo carboxilo terminal, la cual tiene importantes funciones en la adhesión e interacción entre la MEC y la célula, por lo tanto durante su degradación tales procesos se ven comprometidos (Ekblom & Timpl, 1996). Es por ello que nos propusimos investigar si los exosomas estudiados hasta ahora tienen la capacidad de degradar esta glicoproteína. Se encontró que los exosomas degradan fibronectina de una manera dosis-dependiente, pues la presencia de los distintos fragmentos de degradación de 150 y 76 kDa aumentaban conforme se incrementaba la concentración de los exosomas aplicados.

Laminina-1 es una glicoproteína con un peso molecular de 800 kDa que se encuentra presente en tejidos tumorales, y es uno de los principales componentes de la lámina basal, su degradación es clave para procesos de invasión y metástasis, los cuales son llevados a cabo por las células tumorales. No obstante nosotros estudiamos la actividad proteolítica de las

enzimas presentes en los exosomas sobre esta glicoproteína. Nuestros resultados indican que las enzimas exosomales son capaces de degradar a laminina, ya que durante el proceso de incubación de las muestras y su posterior análisis mediante western blot pudimos identificar tres fragmentos de degradación de 200, 110 y 60 kDa respectivamente, de los cuales a mayor concentración de exosomas se correlacionaba con una mayor degradación de laminina.

La presencia de fragmentos de degradación de laminina es muy importante ya que se ha demostrado que estos exponen sitios críticos con actividad biológica, los cuales contribuyen a la migración, diseminación metastásica y supervivencia de las células tumorales, y curiosamente tales efectos no se observan en la molécula intacta (Adair-Kirk & Senior, 2008; Kikkawa et al., 2013). Además otros autores sugieren que el fragmento de 60 kDa detectado es procesado por MMP-2 (Horejs et al., 2014).

Para inhibir la degradación de fibronectina y laminina, se utilizaron: Bestatina 100 μ M, EDTA 10 mM para inhibir la actividad de las metaloproteinasas, y TLCK 10 μ M para inhibir a las serin-proteasas. Las concentraciones utilizadas de cada uno de los inhibidores corresponden a la CE50, las cuales ya han sido ampliamente reportadas por otros autores (Yoneda et al., 1991; Liang et al., 2014; Gogly et al., 1998).

Durante el análisis de datos se cuantificó la disminución de la degradación de cada uno de los fragmentos de fibronectina de 150 y 76 kDa producidos por las enzimas exosomales a dos concentraciones 1 y 5 μ gs. Para la primera cantidad de exosomas se lograron disminuir de manera significativa los fragmentos de degradación con un porcentaje de 57 y 58%, respectivamente; mientras que cuando se utilizó EDTA con 5 μ gs de enzimas exosomales, se obtuvo una disminución significativa de ambos fragmentos de un 41.5 y 47 %, respectivamente.

Cuando se utilizó Bestatina para inhibir la actividad proteolítica de las enzimas exosomales sobre la fibronectina solo encontramos un efecto significativo cuando se utilizaron 1 μ g de las muestras analizadas, y un porcentaje de disminución del 37 y 35% de los fragmentos de 150 y 76 kDa, respectivamente. Sin embargo al utilizar 5 μ gs de enzimas exosomales no obtuvimos un efecto significativo.

Por otra parte al utilizar el inhibidor TLCK no observamos efectos significativos aun utilizando concentraciones menores de enzimas exosomales, por lo tanto podemos inferir que las serin proteasas no participan activamente sobre la degradación de fibronectina.

Posteriormente utilizamos los mismos inhibidores para disminuir la actividad proteolítica de los exosomas sobre la laminina, donde se obtuvieron tres fragmentos de degradación de 200, 110 y 60 kDa, tales fragmentos se ven disminuidos cuando se utilizó tanto EDTA como Bestatina. Para el primer inhibidor obtuvimos una disminución de cada uno de los fragmentos con un porcentaje del 54%, 56% y 72, respectivamente, tal inhibición de la degradación resultó ser significativa. Con el uso de Bestatina a la misma concentración ya mencionada. se obtuvo una disminución del 38, 54, y 64 %, de los fragmentos analizados de 200, 110 y 60 kDa, respectivamente.

Por lo tanto podemos concluir que EDTA resultó ser más eficaz ya que logró inhibir de manera significativa, la degradación de las enzimas proteolíticas sobre los componentes de la MEC tales como laminina y fibronectina tanto para 1 y 5 µg de muestras aplicadas, mientras que bestatina solo logró inhibir de manera significativa cuando se utilizó 1 µg.

Finalmente el inhibidor TLCK resultó ser el menos eficaz en la inhibición de la degradación de fibronectina, ya que no obtuvimos un efecto inhibitor significativo. La principal función de furina para este caso es activar a MT1-MMP la cual se lleva a cabo a nivel celular, por lo tanto aunque inhibamos a furina de forma irreversible, MT1-MMP ya se está expresando en su forma activa de 55 kDa a nivel exosomal y no hay expresión de pro-MT1-MMP. Sin embargo cuando se utilizó este inhibidor en la degradación de laminina, éste logró disminuir el fragmento de degradación de 200 kDa, y esto es debido a que laminina es susceptible al clivaje tanto por las serin proteasas como las MMPs. (Wells, Gaggar, & Blalock, 2015)

En base a los resultados obtenidos demostramos que los exosomas de las células MDA-MB-231, expresan enzimas proteolíticas en su forma activa como furina y MMPs, y evidentemente hemos comprobado que tienen la habilidad de degradar gelatina, laminina, y fibronectina. La actividad proteolítica de estas enzimas se ve disminuida por EDTA y Bestatina.

En conclusión, podemos decir que los exosomas no solo actúan como mensajeros intercelulares como lo han postulado muchos autores, sino también y en base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pueden considerar como vesículas con la capacidad de degradar componentes de la MEC, y sugerir que antes de la ruptura de la MEC por las células tumorales, podría existir una degradación de ésta por los exosomas liberados, participando así en los procesos de migración e invasión tumoral.

9. CONCLUSIONES.

- El método más eficaz para obtener una mayor cantidad de exosomas es mediante el uso del ionóforo de calcio a una concentración 5 μM con un tiempo de incubación por 24 horas.
- La concentración del ionóforo de calcio utilizado no produjo daño celular durante el tiempo de tratamiento.
- Los exosomas purificados expresan los marcadores específicos, tales como: actina, CD63, CD81, HLA-DR α .
- Las células MDA-MB-231 expresan: pro-furina, furina y furina soluble de 110, 98 y 80-82 kDa, respectivamente; mientras que los exosomas liberados por esta línea celular solo expresan furina activa de 98 kDa.
- Las células MDA-MB-231 expresan: pro-MT1-MMP, MT1-MMP y su segmento transmembranal de 64, 55 y 43 kDa, respectivamente; mientras que en los exosomas liberados por esta línea celular solo expresan MT1-MMP activa de 55 kDa.
- Los exosomas provenientes de la línea celular MDA-MB-231 expresan pro-MMP2 de 72 kDa y MMP-2 de 62 kDa. Ambas formas de expresión tienen actividad gelatinolítica.
- Los exosomas provenientes de la línea celular MDA-MB-231 tienen la capacidad de degradar glicoproteínas de la MEC, como fibronectina originando fragmentos de 150 y 76 kDa.
- Los exosomas provenientes de la línea celular MDA-MB-231 tienen la capacidad de degradar glicoproteínas de la MEC, como laminina la cual es clivada en tres fragmentos de 200, 110 y 60 kDa.
- El inhibidor EDTA 10 mM es el más efectivo en disminuir la degradación de gelatina, fibronectina y laminina promovida por las enzimas exosomales.
- El inhibidor Bestatina 100 μM es efectivo en disminuir la degradación de gelatina, fibronectina y laminina ocasionada por las enzimas proteolíticas de los exosomas.
- El inhibidor TLCK no fue efectivo para disminuir la acción proteolítica de las enzimas exosomales sobre fibronectina, sin embargo logró disminuir la degradación del fragmento de 200 kDa de laminina de manera significativa.

10. BIBLIOGRAFIA.

- Adair-Kirk, T. L., & Senior, R. M. (2008). Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(6-7), 1101–1110.
- Angosto, M. C., & Álvarez-gómez, J. Á. (2010). revisión Metaloproteinasas , matriz extracelular y cáncer, 76(1), 59–84.
- Arya, M., Bott, S. R., Shergill, I. S., Ahmed, H. U., Williamson, M., & Patel, H. R. (2006). The metastatic cascade in prostate cancer. *Surgical Oncology*, 15(3), 117–128.
- Asfar S Azmil., Bin Bao., Fazlul H Sarkar (2012). NIH Public Access. *Changes*, 29(6), 997–1003.
- Ayoubi T. A. Creemers J.W. Roebroek A.J. Van de Ven W.J. (1994) Expression of the dibasic proprotein processing enzyme furin is directed by multiple promoters. *J Bio Chem*, 269, 9298.
- Bassi, D. E., Mahloogi, H., Al-Saleem, L., De Cicco, R. L., Ridge, J. a., & Klein-Szanto, A. J. P. (2001). Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines. *Molecular Carcinogenesis*, 31(4), 224–232.
- Bassi D, Mahloogi H, Lopez De Cicco R, Klein-Szanto A (2003). Increased furin activity enhances the malignant phenotype of human head and neck cancer cells. *Am J Pathol*; 162: 439-47.
- Bosman FT, Stamenkovic. (2003). Functional structure and composition of the extracelular matrix. *J Phatol*, 200(4):423-8.
- Braicu, C., Tomuleasa, C., Monroig, P., Cucuianu, a, Berindan-Neagoe, I., & Calin, G. a. (2015). Exosomes as divine messengers: are they the Hermes of modern molecular oncology? *Cell Death and Differentiation*, 22(1), 34–45
- Creemers J, Vey M, Schafer W, et al. (1995) Endoproteolytic cleavage of its propeptide is a prerequisite for efficient transport of furin out of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*; 270: 2695-702.

- Coppola, J. M., Bhojani, M. S., Ross, B. D., & Rehemtulla, A. (2008). A small-molecule furin inhibitor inhibits cancer cell motility and invasiveness. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 10(4), 363–370.
- Daves, M. H., Hilsenbeck, S. G., Lau, C. C., & Man, T.-K. (2011). Meta-analysis of multiple microarray datasets reveals a common gene signature of metastasis in solid tumors. *BMC Medical Genomics*, 4(1), 56.
- Dimov, I., Jankovic Velickovic, L., & Stefanovic, V. (2009). Urinary exosomes. *TheScientificWorldJournal*, 9, 1107–1118.
- Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression, 2(march).
- Eklom, P & Timpl, R.(1996). The laminins. Harwood Academic Publishers, New York.
- Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance (2010). *Journal of Cell Science.*;123(24):4195-4200. doi:10.1242/jcs.023820.
- Frydrychowicz, M., Kolecka-Bednarczyk, a., Madejczyk, M., Yasar, S., & Dworacki, G. (2015). Exosomes - Structure, Biogenesis and Biological Role in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Scandinavian Journal of Immunology*, 81(1), 2–10.
- Février, B., & Raposo, G. (2004). Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(4), 415–421.
- Gemma L Bourne, David J Grainger (2011) Development and characterisation of an assay for furin activity. *Journal of Immunological Methods*.364, 101-108.
- Gogly, B., Groult, N., Hornebeck, W., Godeau, G., & Pellat, B. (1998). Collagen zymography as a sensitive and specific technique for the determination of subpicogram levels of interstitial collagenase. *Analytical Biochemistry*, 255(2), 211–6.
- Guo, L., & Guo, N. (2015). Exosomes: Potent regulators of tumor malignancy and potential bio-tools in clinical application. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*.
- Hadler-Olsen, E., Fadnes, B., Sylte, I., Uhlin-Hansen, L., & Winberg, J. O. (2011). Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS Journal*, 278(1), 28–45.

- Hakulinen, J., Sankkila, L., Sugiyama, N., Lehti, K., & Keski-Oja, J. (2008). Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105(5), 1211–1218.
- Hannafon, B. N., & Ding, W. Q. (2013). Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 14240–14269.
- Hoshino, D., Kirkbride, K., Costello, K., Clark, E., Sinha, S., Grega-Larson, N., Weaver, A. (2013). Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell Reports*, 5(5), 1159–1168.
- Itoh, Y. (2015). Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biology*.
- Jean, F., Stella, K., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Reason, a J., & Thomas, G. (1998). alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), 7293–7298.
- Kahlert, C., & Kalluri, R. (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *Journal of Molecular Medicine*, 91(4), 431–437.
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 16(9), 582–598.
- Kharaziha, P., Ceder, S., Li, Q., & Panaretakis, T. (2012). Tumor cell-derived exosomes: A message in a bottle. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1826(1), 103–111.
- Kikkawa, Y., Hozumi, K., Katagiri, F., Nomizu, M., Kleinman, H. K., & Koblinski, J. E. (2013). Laminin-111-derived peptides and cancer. *Cell Adhesion & Migration*, 7(1), 150–256.
- Koumangoye, R. B., Sakwe, A. M., Goodwin, J. S., Patel, T., & Ochieng, J. (2011). Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading. *PLoS ONE*, 6(9).
- Kular, J. K., Basu, S., & Sharma, R. I. (2014). The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering*, 5(0).

- Kumar, V., Behera, R., Lohite, K., Karnik, S., & Kundu, G. C. (2010). P38 Kinase Is Crucial for Osteopontin-Induced Furin Expression That Supports Cervical Cancer Progression. *Cancer Research*, 70(24), 10381–10391.
- Labat-Robert, J. (2003). Age-dependent remodeling of connective tissue: Role of fibronectin and laminin. *Pathologie Biologie*, 51(10), 563–568.
- Liang, W., Gao, B., Xu, G., Weng, D., Xie, M., & Qian, Y. (2014). Possible contribution of aminopeptidase N (APN/CD13) to migration and invasion of human osteosarcoma cell lines. *International Journal of Oncology*, 45(6), 2475–2485.
- Lin, I.-H., Chen, D.-T., Chang, Y.-F., Lee, Y.-L., Su, C.-H., Cheng, C. Hsu, M.-T. (2015). Hierarchical Clustering of Breast Cancer Methylomes Revealed Differentially Methylated and Expressed Breast Cancer Genes. *Plos One*, 10(2), e0118453.
- Liotta LA, Kohn EC (2001) The microenvironment of the tumour–host interface. *Nature* 411:375–379
- Mason, S. D., & Joyce, J. a. (2011). Proteolytic networks in cancer. *Trends in Cell Biology*, 21(4), 228–237.
- Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2010). Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, 73(10), 1907–1920.
- Mazzone M, Baldassarre M, Beznoussenko G, et al (2004). Intracellular processing and activation of membrane type I matrix metalloprotease depends on its partitioning into lipid domains. *J Cell Sci*, 117: 6275-87.
- Mollaie, H., Safaralizadeh, R., & Pouladi, N. (2017). A brief review of exosomes and their roles in cancer. *Meta Gene*, 11, 70–74.
- Molloy, S. S., Bresnahan, P. a., Leppla, S. H., Klimpel, K. R., & Thomas, G. (1992). Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *Journal of Biological Chemistry*, 267(23), 16396–16402.
- Nuti E, Tuccinardi T, Rosello A (2007). Matrix metalloproteinase inhibitors: new challenges in the era of post broad-spectrum inhibitors. *Curr Pharm Des*; 13: 2087-100.
- Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M., & Okada, Y. (1997). Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Digests Interstitial Collagens and Other Extracellular Matrix Macromolecules *, 272(4), 2446–2451.

- Ortega J.(2016). Expresión y liberación de furina de las formas de furina durante la diferenciación celular y la activación de macrofagos con LPS. Tesis de licenciatura IF. BUAP.
- Osenkowski, P., Toth, M., & Fridman, R. (2004). Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-Matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *Journal of Cellular Physiology*, 200(1), 2–10. <http://doi.org/10.1002/jcp.20064>.
- Palazzolo, G., Albanese, N. N., Di Cara, G., Gyga, D., Vittorelli, M. L., & Pucci-Minafra, I. (2012). Proteomic analysis of exosome-like vesicles derived from breast cancer cells. *Anticancer Research*, 32(3), 847–860.
- Manuel Patarroyo, , Karl Tryggvason, , Ismo Virtanen (2002)Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis *Seminars in Cancer Biology*, Volume 12, Issue 3
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63.
- Peinado, H., Lavotshkin, S., & Lyden, D. (2011). The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: Old sayings and new thoughts. *Seminars in Cancer Biology*.
- Poincloux, R., Lizárraga, F., & Chavrier, P. (2009). Matrix invasion by tumour cells : a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia.
- Rabinowits, G., Gerçel-Taylor, C., Day, J. M., Taylor, D. D., & Kloecker, G. H. (2009). Exosomal MicroRNA: A Diagnostic Marker for Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*, 10(1), 42–46.
- 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.
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383.

- Rejendran, L., Honsho, M., Zahn, T. R., Keller, P. et al (2006) Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 11172-11177.
- Remacle AG, Rozanov DV, Fugere M, Day R, Strongin AY (2006). Furin regulates the intracellular activation and the uptake rate of cell surface-associated MT1-MMP. *Oncogene*, 25: 5648-55.
- Ries, C., Pitsch, T., Mentele, R., Zahler, S., Egea, V., Nagase, H., & Jochum, M. (2007). Identification of a novel 82 kDa proMMP-9 species associated with the surface of leukaemic cells: (auto-)catalytic activation and resistance to inhibition by TIMP-1. *The Biochemical Journal*, 405(3), 547–558.
- Savina, A., Furlán, M., Vidal, M., & Colombo, M. I. (2003). Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(22), 20083–20090.
- Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, et al (1994) A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 370:61-5.
- Seiki M (2003). Membrane -Type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *cancer lett* 194, 1-11.
- Shimoda, M., & Khokha, R. (2013). Proteolytic factors in exosomes. *Proteomics*, 13(10-11), 1624–1636.
- Sieffert D,(1997). Constitutive and regulated expression of vitronectin. *Histol. histopathol.* 12:787-797.
- Siegfried G, Basak A, Cromlish JA, Benjannet S, Marcinkiewicz J, Chretien M, Seidah NG, Khatib AM (2003). The secretory protein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest* 111, 1723-1732.
- Singh, P., Carraher, C., & Schwarzbauer, J. (2012). Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix, 397–419. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
- Snoek-van Beurden, P. a M., & Von Den Hoff, J. W. (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques*, 38(1), 73–83.

- Soo, C. Y., Song, Y., Zheng, Y., Campbell, E. C., Riches, A. C., Gunn-Moore, F., & Powis, S. J. (2012). Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells. *Immunology*, 136(2), 192–197.
- Sounni N, Baramova E, Munaut C, et al (2002). Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in A2058 melanoma cells is associated with MMP-2 activation and increased tumor growth and vascularization. *Int J Cancer*; 98: 23-8.
- Stoica, G. (2014). *Tumors of the Central Nervous System, Volume 13, 13*.
- Tamkovich, Tutanov, & Laktionov, (2016) . Exosomes: Generation, structure, transport, biological activity, and diagnostic application. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 10(3), 163–173.
- Tanaka, N., Kyuuma, M., & Sugamura, K. (2008). Endosomal sorting complex required for transport proteins in cancer pathogenesis, vesicular transport, and non-endosomal functions. *Cancer Science*, 99(7), 1293–1303.
- Tanikawi K, Fukamachi H, Komori K, Ohtake Y, Nonaka T, Sakamoto T et al.(2007) Stroma- derived matrix metalloproteinases (MMP)-2 promotes membrana type 1-MMP dependent tumor growth in mice. *Cancer Res.* 67: 4311-9
- Tanzer, M. L. (2006). Current concepts of extracellular matrix. *Journal of Orthopaedic Science*, 11(3), 326–331
- Taylor, N. a, Van De Ven, W. J. M., & Creemers, J. W. M. (2003). Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(10), 1215–1227.
- Thomas G (2012). Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol cell biol* 3, 997–1003.
- Théry, C. (2011). Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *Biology Reports*, 33410(July), 15–3.
- Toth M, Sohail A, Mobashery S, Fridman R (2006) MT1-MMP shedding involves and ADAM and is independent of its location in lipid rafts. *Biochem Biophys Res commun* 350;377-384.

- Villagrasa, A., Álvarez, P. J., Osuna, A., Garrido, J. M., Aránega, A., & Rodríguez-Serrano, F. (2014). Exosomes Derived from Breast Cancer Cells, Small Trojan Horses? *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 19(3-4), 303–313.
- Vindrola O. Rapid cleavage of the endogenous PC3 pro-segment and slow conversion to 74 and 66 kDa proteins in AtT-20 cells (1994). *Neuropeptides*; 27: 109-20.
- Wells, J. M., Gaggar, A., & Blalock, J. E. (2015). MMP generated matrikines. *Matrix Biology*, 44-46, 122–129.
- Yang, L., Wu, X.-H., Wang, D., Luo, C.-L., & Chen, L.-X. (2013). Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 8(4), 1272–8. <http://doi.org/10.3892/mmr.2013.1634>
- Yoneda, J., Saiki, I., Fujii, H., Abe, F., Kojima, Y., & Azuma, I. (1992). Inhibition of tumor invasion and extracellular matrix degradation by ubenimex (bestatin). *Clinical & Experimental Metastasis*, 10(1), 49–59.
- Yu, D. D., Wu, Y., Shen, H. Y., Lv, M. M., Chen, W. X., Zhang, X. H., Zhao, J. H. (2015). Exosomes in development, metastasis and drug resistance of breast cancer. *Cancer Science*, 106(8), 959–964.
- Zollinger, A. J., & Smith, M. L. (2016). Fibronectin, the extracellular glue. *Matrix Biology*.