



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“REGULACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INVASIÓN DE
CÉLULAS DE MEDULOBLASTOMA POR EXOSOMAS
DERIVADOS DE MACRÓFAGOS”

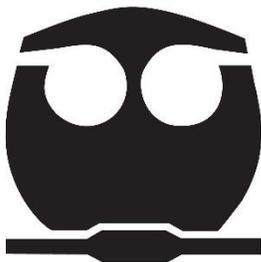
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
“QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO”

PRESENTA

LUIS ANGEL PÉREZ GARCÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE Profesor: **DRA. MIREYA RODRÍGUEZ PENAGOS**

VOCAL Profesor: **DR. ISMAEL MANCILLA HERRERA**

SECRETARIO Profesor: **DRA. MARIA DE LOURDES ÁLVAREZ ARELLANO**

1er. SUPLENTE Profesor: **DRA. MÓNICA BERENICE HERAS CHAVARRÍA**

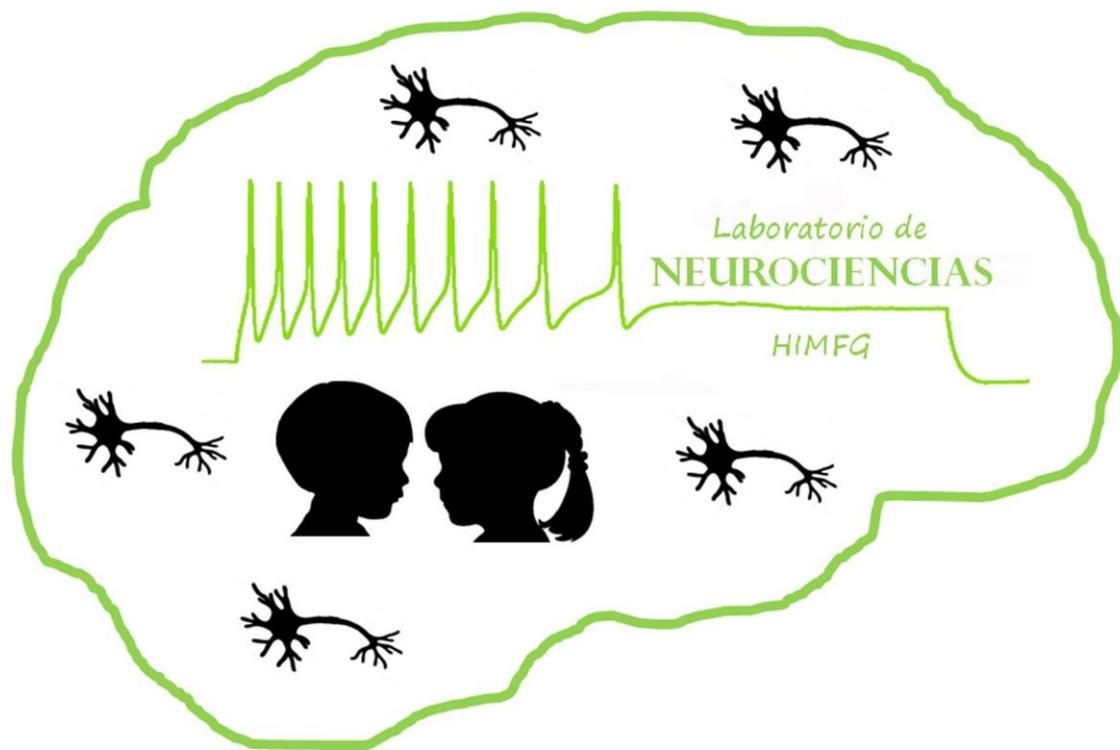
2da. SUPLENTE Profesor: **DRA. MARIANA FLORES TORRES**

ASESOR:

DRA. MARIA DE LOURDES ÁLVAREZ ARELLANO

SUSTENTANTE:

LUIS ANGEL PÉREZ GARCÍA



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Neurociencias perteneciente al Hospital Infantil de México Federico Gómez.

INDICE

I.	Abreviaturas.....	1
II.	Agradecimientos.....	2
III.	Índice de tablas y figuras.	4
IV.	Resumen.....	5
V.	Abstract.....	6
1.	Introducción.....	7
1.1.	Meduloblastomas	7
1.2.	Tratamiento actual de los meduloblastomas	10
1.3.	El sistema inmune	10
1.4.	Los macrófagos	11
1.5.	Polarización de los macrófagos	12
1.6.	Microambiente tumoral y TAMs	14
1.7.	Los exosomas	15
1.8.	miRNAs	18
1.9.	El miRNA-21 y los exosomas derivados de macrófagos	20
1.10.	Los exosomas como moduladores de respuestas	21
2.	Planteamiento del problema.....	23
3.	Hipótesis.....	24
4.	Objetivo general.....	24
5.	Objetivos particulares.....	24
6.	Materiales y métodos.....	24
6.1.	Línea celular DAOY.....	24
6.2.	Línea celular THP-1 y obtención de exosomas.....	24
6.3.	Extracción de proteínas derivadas de exosomas y cuantificación por el método de Bradford.....	25
6.4.	Extracción de RNA proveniente de exosomas.....	25
6.5.	RT y PCR en tiempo real.....	25
6.6.	Ensayo de invasión de Transwell.....	26
6.7.	Análisis estadístico.....	27
7.	Resultados.....	28

7.1. Los exosomas derivados de macrófagos aumentan la tasa de invasión en células Daoy	28
7.2. Los exosomas derivados de macrófagos M0 expresan miRNA-21	28
7.3. El miRNA-21 incrementa la actividad invasiva de las células Daoy	32
8. Discusión	34
9. Conclusiones	39
10.Referencias	39

I. ABREVIATURAS.

- 1. ANOVA.** Análisis de varianza.
- 2. cDNA.** DNA complementario.
- 3. COG.** Children Oncology Group.
- 4. DNA.** Ácido desoxirribonucleico.
- 5. EMEM.** Medio mínimo esencial de Eagle.
- 6. ESM.** Error estándar de la media.
- 7. miRNA.** Micro RNA.
- 8. NK.** Natural Killer.
- 9. OMS.** Organización Mundial de la Salud.
- 10. PBS.** Solución amortiguadora de fosfatos.
- 11. PMA.** 13-acetato de forbol-12-miristato.
- 12. RNA.** Ácido ribonucleico.
- 13. RPMI.** Medio del Instituto Memorial Roswell Park.
- 14. RT-PCR.** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
- 15. SFB.** Suero fetal bovino.
- 16. SNC.** Sistema Nervioso Central.
- 17. TAM.** Macrófago asociado a tumor.

II. AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, así como a la Facultad de Química, por darme la oportunidad de desarrollar mis años de estudiante en sus instalaciones, así como de formar parte de su gran y diversa comunidad.

Agradezco a la Dra. María de Lourdes Álvarez Arellano y al Dr. Juan Carlos Corona Castillo por el apoyo brindado para la realización de ese proyecto en el Laboratorio de Investigación de Neurociencias el Hospital Infantil de México Federico Gómez. Por la instrucción y la guía que me ofrecieron en todo momento, así como la oportunidad de abrirme las puertas de sus trabajos en el laboratorio. Al Dr. Pablo Domínguez López por el soporte para la culminación de este proyecto en la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva del Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 del IMSS, así como en su apoyo al tomar una figura como un segundo tutor para mí en las etapas más complicadas de este trabajo.

Al Dr. Ismael Mancilla Herrera y la Dra. Mireya Rodríguez Penagos, que como parte del jurado revisor se tomaron el tiempo e interés en este proyecto para su revisión, así como para ofrecerme apoyo durante todo el proceso.

A todos los integrantes que forman parte de los laboratorios donde se realizó este proyecto, ya que en su conjunto permitió que este fuera realizado y concluido con éxito.

A mis padres, Luz María y Angel, que, de no ser por su apoyo, este viaje posiblemente siquiera podría haber empezado. A mi hermana Paola, que desde hace mucho nos ha guiado a los tres con su luz en los días más oscuros.

A mis amigos Alan, Brian, Alexis, Estephania, César, Melissa, Atala, Bibiana y Axel, Eduardo, Gerardo, Marcos, Francisco, Adolfo y Rafael por la compañía y el amor siempre. A todos quienes aún están conmigo, y quienes tomaron otro rumbo, porque al final fueron parte de este viaje, y llevo siempre en mi corazón todo lo que me permitieron aprender.

*Para ti, Alondra, que me has llenado de amor y alegría desde el día que llegaste.
Mis éxitos son por ti, y mi vida para ti. Gracias por ser mi motor en este viaje.*

III. Índice de tablas y figuras.

Figura 1. Localización anatómica de los diferentes subtipos de meduloblastoma que pueden desarrollarse en el cerebro.

Figura 2. Esquema general de la actividad de exosomas en el microambiente celular.

Figura 3. Representación del ensayo de invasión en placas de 12 pozos.

Figura 4. El estímulo con exosomas derivados de macrófagos M0 aumenta la capacidad de invasión en células de meduloblastoma.

Figura 5. Los exosomas derivados de macrófagos M0 expresan miRNA-21.

Figura 6. El miRNA-21 incrementa la capacidad de invasión en las células de meduloblastoma.

Tabla 1. Características de macrófagos M1 y M2.

Tabla 2. Descripción general de las características de los cuerpos vesiculares.

IV. Resumen.

El meduloblastoma es una de las principales causas de muerte dentro de la población infantil a nivel mundial y afecta de manera significativa el estilo de vida de los pacientes. La relación que existe entre las células tumorales y los elementos del sistema inmune son clave en el desarrollo de la enfermedad, y aún se comprende poco sobre todos los procesos involucrados entre estos sistemas. Particularmente, el papel de los macrófagos no polarizados o conocidos como M0, ha sido de gran interés debido a su gran variedad de funciones en el organismo y su abundancia en el contexto tumoral. La producción de microvesículas extracelulares, particularmente los exosomas, es un mecanismo de interacción gracias a su variedad en contenido que va desde proteínas hasta ácidos nucleicos como el miRNA-21, un elemento que se ha relacionado en la progresión tumoral.

Con esto en mente, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto *in vitro* de exosomas secretados por macrófagos M0 en la capacidad de invasión de células de meduloblastoma, particularmente la línea celular Daoy. Para esto, se generó un cultivo de monocitos, a los cuales se les indujo su diferenciación hacia macrófagos mediante PMA. A partir del sobrenadante, se purificó y cuantificó a los exosomas y, posteriormente, se determinó el efecto de estos sobre la capacidad de invasión en células Daoy por medio de un ensayo de invasión en placas de 12 pozos. Además, se aisló de estas vesículas miRNA-21 y se identificó su presencia por medio de RT-PCR. Por otro lado, mediante el uso de miRNA-21 sintético, se observó el mismo efecto en las células Daoy.

En conjunto, los resultados mostraron que los exosomas secretados por los macrófagos M0 favorecieron la capacidad de invasión en las células Daoy al observar un incremento en el número de células capaces de degradar la matriz extracelular y atravesar una membrana que funciona como barrera. Esto, con base en lo que se ha reportado en la literatura, sugiere una relación con el contenido de miRNA-21 que existe en dichas vesículas y el aumento en la capacidad de invasión, que se corrobora al observar que el miRNA-21 sintético ejerce la misma respuesta en las células.

V. Abstract

Medulloblastoma is one of the principal causes of infant deceases around the world and it affects significantly into the lifestyle of patients. The relation between tumor cells and the components of immune system are critical in the development of the disease, and it is not fully understood all the process which are related in this relation. Specifically, the non-polarized macrophages, known as the M0 macrophages, have been relevant due to their different functions in the organism and their abundance on the tumoral context. Extracellular microvesicles production, exosomes particularly, are an important mechanism of interaction due to their content which consider proteins and nuclei acids as miRNA-21, an element which has been related into the tumoral progress.

Due to this, the main objective for this work was to determinate the *in vitro* effects of M0 macrophages-derived exosomes in the invasion capability of medulloblastoma cells, specifically the Daoy cell line. For this, we generated a monocyte cell culture, which were induced into their macrophage phenotype by PMA. The exosomes secreted to the cell media were purified and quantified, and then, we determined the exosomal effects to the invasion capability of Daoy cells with a 12-well plate invasion assay. We also purified miRNA-21 from these exosomes and identified the presence of this nuclei acid through RT-PCR. Furthermore, using synthetic miRNA-21 we identified the same effect in these cells.

Together, these results are evidence of the macrophage-derived exosomes effects in the invasion capability of Daoy cells, increasing this ability of the medulloblastoma cell line as we seen as an increasing number of cells which were capable to degrade extracellular matrix and go through this barrier. Thus, and considering the documental information which has been published about this topic, suggest a relation between the miRNA-21 localized in the vesicles and their effect on the Daoy cell line, being corroborated with the assays realized with the synthetic miRNA-21, suggesting the macrophage-derived exosomes role in the tumoral progression and development.

1. Introducción

El cáncer es un padecimiento de alto impacto que ha mostrado un incremento en los últimos años en el número de casos registrados a nivel mundial¹. Este padecimiento se caracteriza por presentar un conjunto heterogéneo de síntomas debido a un crecimiento anormal de células aberrantes que son conocidas como células tumorales. Estas células se caracterizan por tener una alta tasa de proliferación y capacidad de migración, siendo capaces de invadir tejidos adyacentes a partir de la destrucción de barreras fisiológicas como el estroma y matriz extracelular, distribuyéndose a través de la invasión de vasos linfáticos o sanguíneos^{2,3}. El cáncer inicia cuando una población de células anormales comienza a crecer de manera incontrolada, con características basadas en su linaje o grado de diferenciación. Por varios años, estos tumores han sido diagnosticados y clasificados a partir de las características observables al microscopio, sin embargo, en 2016 la OMS implementó nuevos criterios para su correcta identificación como la expresión de genes⁴.

1.1 Meduloblastomas

El cerebro es un órgano esencial para el organismo al ser el encargado de que las funciones básicas del organismo se realicen de manera adecuada, regulando además el desarrollo de habilidades cognitivas y motoras, entre otras más. A su vez, es también susceptible de verse afectado por el desarrollo de diversas patologías como las neoplasias debido a factores como la herencia genética o el estilo de vida³.

Para aquellos tumores que se desarrollan en el cerebro o en el SNC, se han identificado diferentes tipos celulares como origen del desarrollo tumoral, encontrándose dentro de estos a los meduloblastomas^{5,6}. Este tipo de tumores se forman a partir de los precursores granulares neuronales, células indiferenciadas que muestran un rápido crecimiento, así como una capacidad importante de metástasis. Se ha identificado que este tipo de tumores inician desde la zona del cuarto ventrículo cerebral y, a través del fluido cráneo-espinal como método de diseminación, las células tumorales son capaces de distribuirse hacia otras zonas

del cerebro y otros tejidos ^{7,8} (Figura 1). Los meduloblastomas se consideran como el tumor más común que se presenta durante la etapa infantil ya que, según la información recopilada en diferentes trabajos y bases de datos, se conoce que existe una incidencia de hasta 4.9 casos por cada millón de niños de hasta 7 años en todo el mundo y en un gran número de casos el pronóstico para estos pacientes es malo. Además, debido a que su desarrollo es primordialmente en el área del cuarto ventrículo, los pacientes muestran un panorama heterogéneo de síntomas durante la enfermedad como torpeza motriz, alteraciones cognitivas, náuseas, vómito, visión borrosa, entre otros⁹.

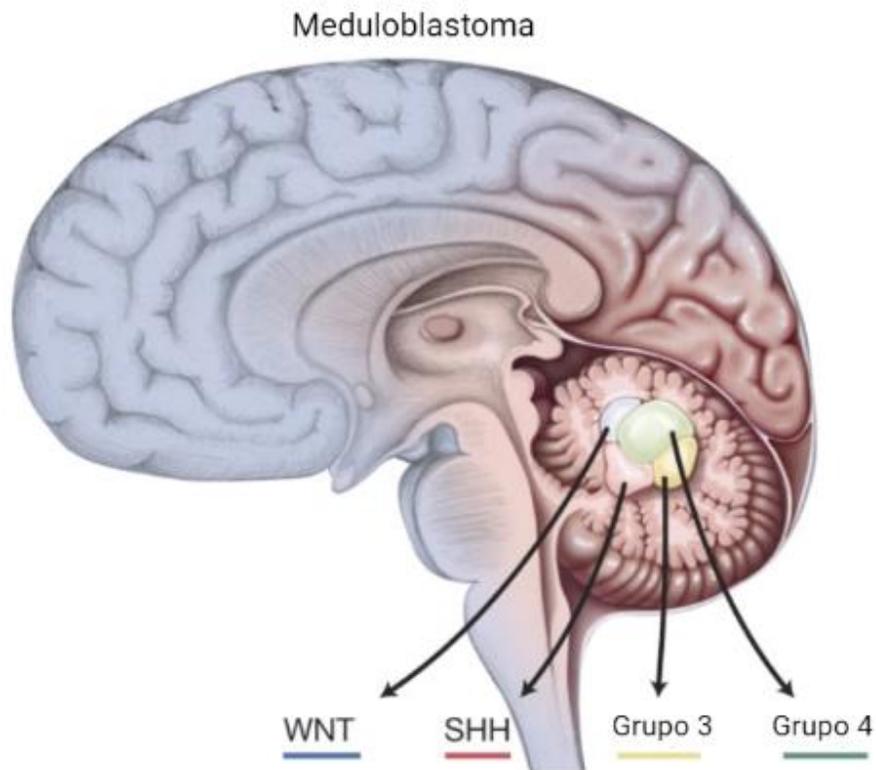


Figura 1. Localización anatómica de los diferentes subtipos de meduloblastoma que pueden desarrollarse en el cerebro. El meduloblastoma es un tipo de cáncer característico en la población infantil que se desarrolla desde las etapas embrionarias, particularmente por células precursoras, localizado en el área del cuarto ventrículo.

Los meduloblastomas se clasifican en cuatro subgrupos, los cuales son identificados a partir de los patrones moleculares que estos presentan, siendo estos clasificados de la siguiente manera: el grupo Wingless (WNT), Sonic Hedgehog (SHH), grupo 3 (Grp3) y grupo 4 (Grp4), cada uno siendo único entre sí gracias a aspectos como las mutaciones particulares, patrones de metilación y características clínicas¹⁰. El subgrupo WNT es el menos común, conformando el 10% del total de todos los diagnósticos. El subgrupo SHH conforma el 30% del total de los diagnósticos, ocurriendo estos en su mayoría durante el periodo de la juventud. El grupo 3 constituye alrededor del 25% de los diagnósticos mientras que el grupo 4 considera un 35% del total, presentándose tanto en el período infantil como de adolescencia^{11,12}.

Dentro de los aspectos moleculares, se ha descrito que los meduloblastomas del subgrupo WNT presentan raramente metástasis, siendo los de mejor pronóstico donde al menos 95% de los pacientes alcanzan una supervivencia de hasta 5 años. Su origen se da por mutaciones en el gen *CTNNB1*, encargado de la producción de β -catenina, la cual comienza a promover la activación de diferentes genes de la vía WNT¹³⁻¹⁵. En el subgrupo SHH, hasta 75% de los pacientes son capaces de alcanzar una supervivencia de hasta 5 años, sin embargo, factores como mutaciones en *MYC* o en *TP53* pueden reducir de manera significativa este periodo de tiempo. Para este subgrupo el gen involucrado es *PTCH1*, el cual es un gen supresor de tumor encargado de producir PTC1, un receptor involucrado en la señalización de las proteínas de la vía SHH y sus homólogas que, al ser bloqueado por efecto de las mutaciones, permite la activación de genes involucrados en la proliferación celular¹⁶⁻¹⁸. Los tumores del grupo 3 se han descrito como aquellos de peor pronóstico debido a que sólo hasta un 50% de los pacientes alcanzan una supervivencia de 5 años, además, este periodo puede verse reducido de acuerdo con los genes que el paciente muestre afectados, debido a que este subgrupo en general muestra diferentes alteraciones cromosómicas. De igual forma, los mecanismos del grupo 4 son poco comprendidos, donde uno de los ejes principales para su identificación es la presencia de isocromosomas 17q. Este subgrupo tiende a tener un pronóstico aceptable, donde 75% de los pacientes alcanzan la

supervivencia de hasta 5 años, sin embargo, alteraciones como la ausencia del cromosoma 11 u otras mutaciones genéticas pueden influir en su agresividad^{19,20}. Los esquemas de tratamiento tradicionales en contra de este padecimiento consideran a la resección quirúrgica, radiación cráneo-espinal y quimioterapia como los tratamientos de primera línea¹⁰, y gracias al conocimiento del perfil genómico de cada subgrupo en particular se ha desarrollado terapia cada vez más especializada para cada uno de estos²¹.

1.2 Tratamiento actual de los meduloblastomas.

El esquema de tratamiento para el meduloblastoma que es utilizado actualmente ha mostrado resultados positivos en la eliminación de la enfermedad y se ha convertido en la estrategia común de combate, sin embargo, se ha identificado que esta trae consigo complicaciones a los pacientes debido a su naturaleza invasiva^{20,22}. Con esto en mente, la investigación médica se ha centrado en conocer a detalle los diferentes mecanismos que el cáncer y el microambiente celular están desarrollando entre sí para brindar opciones que optimicen estos tratamientos. Por ello, el interés del sistema inmune y su papel dentro del desarrollo tumoral ha incrementado durante los últimos años debido a la posibilidad de mejorar los mecanismos de tratamiento a través de estos elementos.

1.3 El sistema inmune

El sistema inmune está encargado de la eliminación de infecciones causadas por agentes patógenos, así como controlar el crecimiento de células anormales en el organismo²³. Esta tarea es realizada por diferentes células y elementos no celulares, los cuales son agrupados para su estudio con base en la naturaleza e intensidad de sus respuestas²⁴. Debido a factores genéticos o ambientales, el desarrollo de células anormales puede verse aumentado y, cuando el número de células tumorales comienza a incrementar de manera significativa, el sistema inmune entra a un estado más activo por lo que se comienza a promover una serie de respuestas que incluye la generación de un ambiente proinflamatorio mediante la producción de citocinas, esto en víspera de incrementar la actividad de defensa de las células por la pérdida de la homeostasis celular. El efecto varía según el tipo

celular del que se está hablando, aumentando la expresión de marcadores moleculares o procesos celulares como la fagocitosis o el aumento en la secreción de mediadores solubles²⁵. Los componentes principales que están involucrados en el combate de las células tumorales son las células T CD8⁺ y las células NK debido a su naturaleza citotóxica, sin embargo, otros componentes celulares también participan de manera activa en el control de estas células anormales^{26,27}.

El desarrollo tumoral en gran medida es controlado durante las etapas iniciales por el sistema inmune, sin embargo, cuando el equilibrio entre estas respuestas se rompe es cuando se considera que el tumor ha conseguido entrar a una etapa donde las respuestas propias no son suficientes y se requiere de un tratamiento^{28,29}. Por ello, el uso de elementos del sistema inmune, así como su optimización o potenciación es una estrategia atractiva en el tratamiento en contra del desarrollo tumoral. Para ello, se ha considerado a células que se encuentran en abundancia en el organismo y que tienen un papel destacado en el montaje de las respuestas inmunes como lo son los macrófagos³⁰.

1.4 Los macrófagos

Los macrófagos son células diferenciadas de monocitos reclutados desde la circulación periférica hacia los tejidos, formando parte de las respuestas inmunes innatas debido a que estas son de las primeras células en ser activadas durante un proceso infeccioso o no infeccioso, participando en conjunto con células epiteliales y fibroblastos como parte de la respuesta inicial³¹. Estas células tienen un papel fundamental dentro del establecimiento de respuestas inmunes al funcionar como puente de diversas señales hacia otros elementos y su alta distribución a lo largo de los diferentes tejidos corporales^{32,33}. El papel de los macrófagos en diferentes procesos se atribuye a su capacidad de adquirir fenotipos que se adaptan a las necesidades según las señales que está censando, iniciando un proceso conocido como polarización³⁴.

1.5 Polarización de los macrófagos

Se ha identificado que los macrófagos pueden adquirir 3 fenotipos, según el tipo de señales que estas células han recibido, cada uno con características identificables. Las células son clasificadas como macrófagos M0, M1 o M2 según el tipo de respuestas que son capaces de producir durante un proceso de infección o durante el combate a las células anormales, así como el tipo de marcadores de superficie que son expresados^{35,36} (Tabla 1).

Los macrófagos M0 son células también llamadas como naive o vírgenes, debido a que este fenotipo se considera que es el que adquieren las células recién infiltradas hacia los tejidos. Allí, los macrófagos reaccionan a los diferentes estímulos presentes en el área y debido a estas señales se diferencian a un fenotipo proinflamatorio o antiinflamatorio. Durante las primeras etapas de un proceso infeccioso o no infeccioso, la erradicación del agente dañino se logra a través de la producción de un ambiente inflamatorio que incrementa la actividad de diferentes células inmunes incluyendo a los macrófagos, particularmente, incrementando su actividad al aumentar la tasa de fagocitosis, producción de citocinas proinflamatorias y presentación de antígenos, siendo este fenotipo conocido como M1. Por otro lado, cuando el agente dañino se ha eliminado, el organismo requiere iniciar procesos de resolución que reparen el tejido dañado por la inflamación. Para ello, se incrementa la producción de citocinas conocidas como antiinflamatorias, las cuales influyen en el perfil de los macrófagos de tal manera que aumenta su capacidad de angiogénesis y linfangiogénesis para la remodelación de los tejidos. Particularmente, cada uno de estos fenotipos cuenta con marcadores de superficie además de secretar mediadores solubles particulares que permiten su identificación (Tabla 1).

Tabla 1. Características de macrófagos M1 y M2.

	Funciones	Marcadores	Citocinas producidas	Referencias
M0	Fagocitosis Presentación de antígeno	CD14 CD16 CCR5	MCP-1	32, 35
M1	Producción de citocinas Fagocitosis Presentación de antígeno Glucólisis Aumento de NADPH oxidasa	CD80 CD86 MHC-II IL-1R TLR2 iNOS SOC3	TNF- α IL-1 β IL-6 IL-12 ROS	37, 38, 39, 40, 41
M2	Linfogénesis Angiogénesis Remodelación de tejidos Respiración mitocondrial Uso de ácidos grasos	CD163 Scavengers CD206 TGM2 IL-1R II	IL-4 IL-10 IL-33 TGF- β Arginasa 1	37, 38, 39, 42, 43

1.6 Microambiente tumoral y TAMs

El microambiente celular es un sistema complejo que está encargado de la regulación positiva o negativa de los diferentes procesos celulares^{44,45}. La composición del microambiente tumoral considera diferentes células del sistema inmune, células del estroma, vasos sanguíneos, matriz extracelular, entre otros⁴⁶. A lo largo del desarrollo tumoral, existe una relación dinámica entre los elementos del microambiente y las células tumorales, facilitando la supervivencia de estas, así como sus propiedades de invasión a los tejidos y metástasis⁴⁷. Esta relación ocurre debido a la necesidad de las células tumorales a sobreponerse a ambientes de hipoxia y de carácter ácido a través de la promoción de angiogénesis para la restauración de los niveles de oxígeno en el área y distribución de nutrientes⁴⁸. Para el desarrollo de su capacidad metastásica, se ha reportado que los tumores utilizan o suprimen las respuestas de múltiples leucocitos, modificando su actividad y evadiendo las respuestas inmunes efectoras. Dentro de este grupo de células, se ha identificado a macrófagos que forman parte de este ambiente y se encargan en gran medida del crecimiento de tumores e invasión a otros tejidos, siendo denominados macrófagos asociados a tumor (TAMs)⁴⁹.

En condiciones normales, y al considerar el perfilamiento de los macrófagos como células encargadas de la protección y eliminación de agentes dañinos, estas células se encuentran de manera abundante en el estroma y están programadas para realizar funciones efectoras en contra de los tumores como lo son cambios sobre los arreglos de colágeno que complican la diseminación tumoral, así como arreglos sobre la matriz extracelular que sostiene y regula su localización celular⁵⁰. Inicialmente, estas células llegan a la zona tumoral por efecto de señales de quimiocinas que promueven su infiltración al área tumoral desde los vasos sanguíneos derivados de monocitos típicos y, una vez que estas han llegado al área, tienden a responder a los cambios en el ambiente entrando en un proceso de polarización a fenotipos M1. Sin embargo, diferentes componentes del microambiente inducen cambios de este fenotipo hacia el M2⁵¹.

A pesar de esta tendencia, se ha observado que la población de macrófagos en la zona tumoral es mayoritariamente heterogénea, mostrando una plasticidad importante a nivel funcional y expresando marcadores de ambos fenotipos⁵². En general, los estudios que se han presentado acerca de la relación entre los tumores y los macrófagos muestran su papel al tener un fenotipo M1 o M2, sin embargo, los mecanismos que los macrófagos naive o M0 están presentando como parte del microambiente tumoral han sido poco estudiado, por lo tanto, este trabajo pretende brindar nuevo conocimiento con respecto al tema, particularmente a través de los mecanismos de comunicación celular que estas células pueden presentar, siendo uno de los más importantes la secreción de moléculas tales como citocinas o factores de crecimiento, los cuales van en compartimentos que son secretados por estas células llamados exosomas⁵³.

1.7 Los exosomas

La comunicación celular es un proceso esencial para el desarrollo de todas las funciones fisiológicas que el organismo lleva a cabo. Entre las diferentes estrategias que la célula cuenta para comunicarse están la secreción de factores solubles, citocinas y quimiocinas, además de la comunicación directa entre dos células al interactuar mediante ligandos y receptores⁵³. Adicional a estos, se ha descrito que las células son capaces de secretar componentes en vesículas, las cuales, pueden viajar y entregar el mensaje correspondiente a otras células. Estos mecanismos son resultado de cambios en el microambiente que van desde el aumento de cierto tipo de factores solubles o cambios en el estado de pH, por mencionar algunos⁵⁴. Particularmente, la secreción de vesículas es un mecanismo de comunicación que ha ido adquiriendo relevancia durante los años recientes debido al gran número de procesos de importancia biológica en los que está involucrado. Las vesículas extracelulares son secretadas a partir de segmentos de la membrana plasmática o de organelos intracelulares, las cuales son excretadas hacia el microambiente. Estas vesículas, a partir de características tales como el tamaño y el contenido, pueden clasificarse como cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas (Tabla 2). Los exosomas son el tipo de vesículas que han destacado en tiempos recientes

por su papel dentro de la comunicación celular. La secreción de exosomas es un mecanismo de comunicación celular que ocurre al ser internalizados en células adyacentes donde, al liberar su contenido, este es capaz de influir en la expresión de genes, interaccionar con diferentes proteínas, influyendo en diversos procesos celulares que van desde la proliferación, promoción de señales o apoptosis, por mencionar algunos⁵⁵. Los exosomas son un tipo de vesículas que son producidas a partir de la segmentación de la membrana de organelos como los lisosomas o endosomas, a partir de lo cual aspectos como su contenido también es establecido siendo internalizado con base en el tipo celular, estímulo recibido, entre otras. Este contenido, en general, destaca por presentar una heterogeneidad importante en el tipo de moléculas que son internalizadas para ser secretadas, derivando así en la diversidad de señales que pueden ser producidas en las células, esto por efecto del tipo de célula que les da origen así como las señales a las que están respondiendo^{56,57}. El proceso de comunicación entre células es regulado de manera dependiente a la cantidad de unión de estas vesículas a las células a través de su internalización. Al ingresar a la célula y liberar el contenido, se considera que existe un intercambio de la información que transmite la célula original⁵⁸. Los exosomas se han convertido en un blanco de interés dentro de la investigación biomédica debido a su papel en el desarrollo tumoral debido a la liberación de su contenido^{59,60}. Los exosomas se han identificado como compartimentos de proteínas, elementos transponibles, DNA mitocondrial y genómico, miRNAs, entre otros. Este tipo de vesículas están presentes en la sangre, orina, fluido cerebroespinal, entre otros líquidos corporales y el contenido de los exosomas es dependiente del linaje celular de origen, el cual es agrupado y empaquetado en endosomas, los cuales, al madurar son transformados en cuerpos vesiculares de entre 30 y 100 nm para posteriormente ser movilizados hacia la membrana plasmática, donde son liberados como exosomas⁶¹. Estos compartimentos son capaces de actuar de manera local al entrar en contacto con células adyacentes o, por otro lado, ingresar a circulación y distribuirse a otras zonas corporales⁶² (Figura 2). Gracias a estas propiedades, es que se ha documentado su potencial como herramienta no sólo de diagnóstico sino además de tratamiento⁶³.

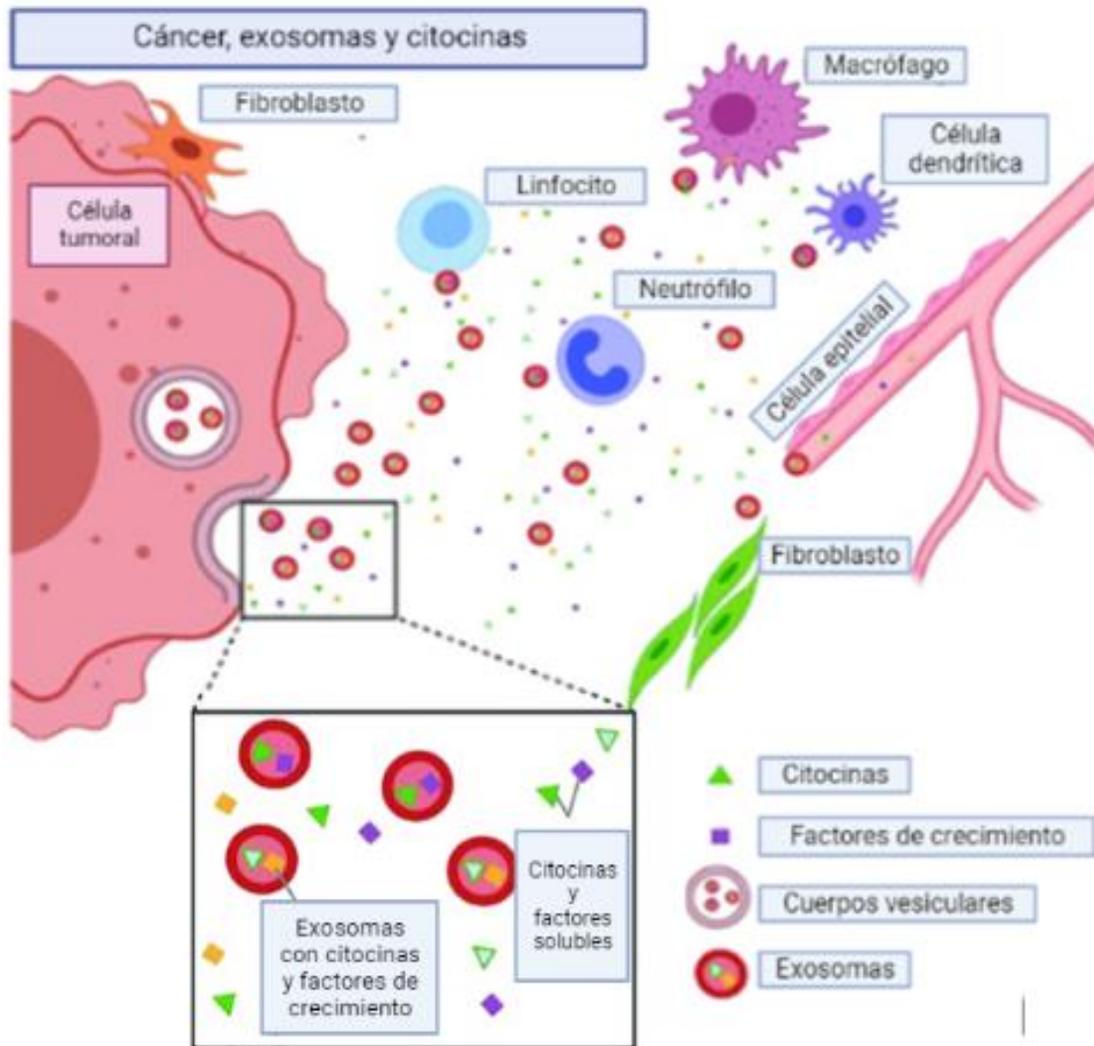


Figura 2. Esquema general de la actividad de exosomas en el microambiente celular. Se ha descrito que el papel fundamental de los exosomas es actuar como un medio de comunicación entre diferentes células a través de su secreción hacia el microambiente celular, esto a través de su contenido que puede ser diferentes citocinas o factores de crecimiento por mencionar algunas. Además, se ha observado que este tipo de interacciones ocurren también en el contexto tumoral, siendo así una forma en la que el cáncer se desarrolla y modifica la actividad de diferentes elementos del sistema inmune⁸⁶.

Tabla 2. Descripción general de las características de los cuerpos vesiculares.

	Tamaño (diámetro)	Marcadores	Referencias.
Exosomas	30 – 150 nm	ESCRT, Alix, TSG101, HSC70, HSP90 β , CD63, CD9 y CD81.	64,65
C. apoptóticos	100 nm – 1 μ m	Proteínas asociadas a la membrana como tetraspaninas. Desechos celulares.	66,67
Microvesículas	50 nm – 5 μ m	Proteínas marcadoras del núcleo, mitocondria y del retículo endoplasmático.	68,69

1.8. miRNAs

Desde su descubrimiento en 1993⁷⁰, y a raíz de diferentes trabajos sobre este tema, el papel de los fragmentos cortos de RNA ha sido cada vez más evidente debido a su importancia en una gran variedad de procesos biológicos como la regulación de genes involucrados en diferentes funciones celulares. Estos fragmentos pequeños de RNA han sido denominados como microRNAs (miRNAs como abreviación) y son fragmentos con una longitud en promedio de 22 nucleótidos, además de contar con la característica de ser elementos no codificantes⁷¹. Estos segmentos de RNA suprimen la expresión de diferentes genes de manera directa al reprimir el proceso de traducción o mediante la degradación del RNA mensajero⁷².

Se ha descrito que, además, los miRNAs cuentan con la característica de ejercer efecto en una gran variedad de procesos, formando así una red compleja de interacciones entre los diferentes fragmentos de miRNAs participantes, generando procesos de sinergismo o de competencia⁷³. Para llevar a cabo su función en la represión de la expresión de genes, los miRNAs hacen uso de un complejo de proteínas que sirven como soporte para el apareamiento de las secuencias. El

primero de estos sistemas es una serie de proteínas que son pertenecientes a la familia Argonauta, las cuales permiten la formación del sistema RISC (por sus siglas en inglés, RNA-Induced Silencing Complexes). Por otro lado, el segundo elemento que este sistema requiere es una serie de endonucleasas que intervenga durante los procesos de maduración de las secuencias de los miRNA, donde destaca Dicer, una RNAsa III de tipo endonucleasa que realiza cortes en RNAs de doble cadena para formar secuencias competentes para su unión con el RNA blanco⁷⁴. Este mecanismo de silenciamiento de genes por parte de los miRNA se considera que es dependiente al contexto celular debido a que en diferentes casos se observa que la represión de los genes se da de manera específica entre especies o tejidos. Los miRNAs han sido identificados en diferentes procesos celulares como lo es el crecimiento y desarrollo celular, desarrollo neuronal, cardiogénesis, balance de fluidos, entre otros. Además, alteraciones en la actividad de este tipo de material nuclear se ha relacionado como parte importante para el desarrollo de procesos infecciosos y no infecciosos como enfermedades autoinmunes, desórdenes metabólicos, padecimientos genéticos o desarrollo de diferentes tipos de cáncer⁷⁵.

Los miRNA, además, cuentan con la capacidad de distribuirse a través de una gran variedad de fluidos extracelulares. Se ha observado que estos son capaces de viajar en el plasma y suero, fluido cerebroespinal, saliva, leche materna, orina, lágrimas, entre otros más. Esta característica le brinda la capacidad de involucrarse en diferentes procesos de comunicación endócrina. La manera en que estos viajan es mediante vesículas como exosomas, microvesículas o cuerpos apoptóticos, así también pueden estar asociados a diferentes proteínas, principalmente la proteína AGO2, considerando además que el método a través del cual estos viajan resulta ser dependiente del miRNA en sí mismo, así como del tipo celular a partir del cual provienen⁷⁶. Con esto en mente, diferentes trabajos han indagado sobre el papel de los exosomas y su contenido en miRNAs no sólo como efectores de diferentes respuestas celulares, sino también como una herramienta para utilizarse como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico, particularmente en el contexto tumoral al ser parte del desarrollo de nichos pre-metastásicos, de organotropismo metastásico y de resistencia a las terapias⁷⁷. Así, el papel que estos miRNA están

desempeñando sobre los diferentes procesos celulares ha resultado ser de utilidad para la comprensión de los mecanismos involucrados en el desarrollo de padecimientos de alto impacto como lo es el cáncer. Entre estos, han sido varios los miRNAs que se han estudiado a fondo, dentro de los cuales uno que destaca es el miRNA-21-5p. Este es uno de los primeros miRNA en ser identificado y relacionado con diferentes procesos tanto metastásicos como no metastásicos debido a su influencia sobre los genes encargados de la producción de proteínas como PDCD4. Debido a su influencia sobre mecanismos como la proliferación celular, apoptosis o angiogénesis, el miRNA-21 se ha propuesto como un elemento que participa en el progreso tumoral al secretarse por medio de vesículas como lo son los exosomas⁷⁸.

1.9. El miRNA-21 y los exosomas derivados de macrófagos

La relación entre los miRNA y los exosomas es de particular interés debido a que se considera que existe una relación entre la compartimentalización de estos fragmentos con el estado de la célula de origen, lo cual influye en el efecto a producir. Particularmente, el caso del miRNA-21 ha sido estudiado por diferentes razones, siendo la principal su papel como promotor de respuestas protumorales, influyendo de manera activa en el desarrollo de este padecimiento⁷⁹.

También, la diversidad de efectos que el miRNA-21 puede ejercer sobre células tumorales y del sistema inmune hace que su estudio sea de interés. Por ejemplo, se ha considerado que la expresión de miRNA-21 en exosomas derivados de macrófagos difiere entre los fenotipos M0, M1 y M2, modificando así también sus efectos sobre las respuestas celulares del sistema inmune como las cancerosas⁸⁴. Además, se ha identificado que la relación entre las células tumorales y las células adyacentes resulta bidireccional y es que en ambos casos la comunicación celular es clave para la promoción de respuestas en ambos lados, lo que influye de manera importante en el tipo de respuesta celular⁸⁵. Con esta premisa, se resalta la necesidad de comprender los procesos bajo los cuales la comunicación celular entre estos sistemas se lleva a cabo ya que este proceso de intercambio de información se ha documentado en diferentes trabajos como un punto clave dentro del desarrollo

tumoral. Es sabido que el contenido exosomal puede ser modificado frente a ciertos estímulos, sin embargo, el escenario donde los macrófagos recién han logrado infiltrarse desde la circulación y el efecto sobre su contenido, particularmente de miRNA-21 continúa siendo un tema poco claro.

1.10. Los exosomas como moduladores de respuestas.

La secreción de los exosomas como mecanismo de comunicación es un punto de estudio importante y atractivo debido a su papel en el establecimiento de diversas respuestas en diferentes patologías incluyendo el cáncer^{80,81}. Así, es importante destacar el papel positivo que los exosomas pueden mostrar para la terapia antitumoral por efecto a su estrecha relación con los tumores y las células inmunes. Un ejemplo es la característica mostrada por los exosomas derivados de las células dendríticas, donde la administración de vesículas con antígenos específicos de células tumorales puede inducir respuestas por parte de linfocitos⁸².

Los exosomas derivados de macrófagos son capaces de liberar diferentes proteínas, lípidos y material genético al entrar en contacto con las células blanco, influyendo en su actividad y función. Considerando esto, es importante mencionar que, la naturaleza del contenido y los efectos que estos pueden presentar sobre las células objetivo son dependientes del estado de los macrófagos y si existe alguna influencia del microambiente sobre estos⁸⁴. Se ha descrito que, en un modelo animal de neuritis autoinmune, la administración de exosomas derivados de macrófago que mostraron una polarización hacia el perfil M1 incrementó la proporción e intensidad de INF- γ por parte de linfocitos T CD4⁺, mientras que los exosomas provenientes de macrófagos M2 mostraron un efecto depletor sobre la cantidad de linfocitos activados presentes⁸⁵. Por otro lado, se encontró que el efecto de los exosomas derivados de macrófagos M1 es capaz de incrementar la producción de IL-17 en la zona de los nódulos linfáticos, estimulando la producción de respuestas de linfocitos de perfil Th17. En otro estudio, se obtuvieron exosomas provenientes de macrófagos M1 y M2 y se evaluaron sus efectos sobre células 4T1 (células de cáncer mamario murino) así como RAW264.7 (macrófagos murinos)⁸². En estos ensayos se determinó que la captación de exosomas derivados de macrófagos M1

incrementó la activación de la vía de señalización NF- κ B en macrófagos no diferenciados de manera dosis dependiente, favoreciendo la generación de un estado proinflamatorio. Por otro lado, ensayos de co-cultivo entre las células cancerosas y los macrófagos previamente estimulados mostraron comportamientos diferentes, donde aquellos macrófagos estimulados con exosomas M1 aumentaron la producción de citocinas como IL-6 o IL-2, mientras que aquellos estimulados con exosomas M2 fomentaron un aumento en la generación de citocinas como IL-4 e IL-10. Además, se realizó la evaluación de un modelo tumoral gástrico, identificando que en el contexto tumoral existe un aumento en la polarización de los macrófagos hacia los fenotipos M2, promoviendo la migración tumoral tanto *in vitro* como *in vivo*⁸³, siendo los exosomas provenientes de estos macrófagos esenciales para la promoción en los mecanismos de invasión y proliferación tumoral al aumentar la tasa de activación de vías como PI3K / Akt.

Los macrófagos son una parte esencial del microambiente tumoral debido al catálogo de respuestas que este tipo de células es capaz de proporcionar. La actividad de los macrófagos previo a esta estimulación, es decir que aún se consideran vírgenes o M0, es una perspectiva que no se ha evaluado con profundidad, y sabiendo que estas células cuentan con el potencial proinflamatorio al derivar de un linaje del sistema inmune encargado de la activación de estas respuestas, su papel dentro de la promoción de ciertos estímulos puede resultar interesante para estudiar.

La función de los exosomas como eje clave dentro de los procesos de comunicación celular es un punto de partida interesante para comprender la complejidad de los procesos neoplásicos, así como de respuestas inmunes. En este sentido, y considerando el papel que los macrófagos ajenos al contexto tumoral tienen para el combate a esta enfermedad, la comprensión del papel los exosomas y su influencia en el desarrollo de las células cancerosas puede brindar una nueva ventana de ideas para el entendimiento de estos sistemas biológicos. Particularmente, el uso de exosomas en tumores cerebrales y del sistema nervioso central ha sido una opción altamente atractiva debido a la problemática situación que un tumor en una

zona tan delicada implica. Por ello se han descrito diferentes estudios con respecto al potencial que este tipo de terapias pudiese presentar en los pacientes, sobre todo en los infantes, debido a que la reducción en la tasa de terapias de alto riesgo es uno de los objetivos primordiales dentro del campo de la investigación básica y clínica.

2. Planteamiento del problema

El meduloblastoma es un cáncer agresivo característico en la población infantil que por sus características moleculares y la zona inicial de desarrollo lo convierte en un problema de salud importante. A su vez, las terapias que se ofrecen normalmente implican un riesgo importante durante el ciclo de la enfermedad debido a los métodos tan invasivos que son requeridos para hacer frente de manera efectiva al desarrollo tumoral. Finalmente, a pesar de sobrellevar la terapia, los efectos resultantes sobre la integridad de los pacientes son sumamente negativos, afectando de manera significativa su calidad de vida debido al daño sobre las habilidades motoras o cognitivas que se pueden presentar. Por esto, la comprensión del papel que diferentes componentes del organismo pueden estar presentando durante el crecimiento tumoral es una ventana de oportunidades no sólo para identificar las interacciones que se están presentando, sino que permite idear nuevas formas de atacar a la enfermedad. El uso de componentes del sistema inmune como estrategia adyuvante a la terapia principal ha demostrado tener un potencial significativo dentro del tratamiento de diversas patologías, por lo que el aprovechar las características de las células inmunes o por el contrario, identificar su comportamiento como promotor del desarrollo tumoral, son un atractivo tema dentro de la investigación en la biología del cáncer. Así, pueden ser considerados como un pilar importante en el establecimiento de la comunicación entre los macrófagos M0 y las células tumorales por su naturaleza y función dentro del proceso de la comunicación celular, por lo que la comprensión de este proceso puede brindar la oportunidad de proponer ideas que brinden un mejor combate al desarrollo de los meduloblastomas en los pacientes.

3. Hipótesis

Los exosomas provenientes de macrófagos M0, así como el miRNA-21 incrementarán la capacidad de invasión de las células de meduloblastoma.

4. Objetivo general

Determinar el efecto *in vitro* de exosomas derivados de macrófagos M0 y miRNA-21 sintético sobre la capacidad invasiva de células de meduloblastoma Daoy.

5. Objetivos particulares.

Obtener los exosomas derivados de macrófagos M0 a través mediante un kit comercial.

Determinar la expresión de miRNA-21 en los exosomas derivados de macrófagos.

Determinar el efecto de exosomas derivados de macrófagos y de miRNA-21 sintético sobre la capacidad de invasión de las células de meduloblastoma.

6. Materiales y métodos

6.1 Línea celular Daoy.

Células Daoy de meduloblastoma cerebelar desmoplásico (ATCC HBT-186) se cultivaron en medio EMEM complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) a 37°C a 5% de CO₂.

6.2. Línea celular THP-1 y obtención de exosomas.

Células THP-1 monocíticas (ATTC TIB-202) se cultivaron en medio RPMI con 10% de SFB y 1% de L-Glutamina. Al tener una confluencia de 90% mínimo se adicionó PMA (Sigma Aldrich P1585-5MG) tal que se tuviera una concentración de 200 ng/mL y se incubó a 37 °C con 5% de CO₂ por 24 horas. Transcurrido este tiempo se considera que las células han logrado diferenciarse hacia macrófagos M0, considerando lo presentado en la literatura⁸⁷. Posteriormente, se sometió a un proceso de centrifugación sucesiva para obtener los exosomas. El proceso inicia con 1500 rpm durante 5 minutos, después se centrifuga a 3000 rpm por 20 minutos y finalmente se centrifuga a 17000 rpm por 1 hora a 4°C. Se descarta el

sobrenadante y el botón obtenido se resuspende en 200 μL de PBS que se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. La identificación de exosomas se realizó mediante micrografías en un microscopio electrónico de transmisión.

6.3. Extracción de proteínas derivadas de exosomas y cuantificación por el método de Bradford

Se realiza una determinación de la cantidad de proteína que contiene los exosomas mediante el método de Bradford. Para esto se tomó 100 μL de la muestra y se adicionó 50 μL de buffer de lisis para la ruptura de los exosomas y liberar el contenido de estos. Utilizando el reactivo de Bradford, se realizó una curva de calibración mediante espectrofotometría con la finalidad de determinar la concentración de proteína presente en la muestra y este dato se utilizó como referencia para los ensayos de invasión con exosomas.

6.4. Extracción de RNA proveniente de exosomas.

Para el aislamiento de miRNA proveniente de los exosomas se usó el kit Total Exosome RNA Kit Isolation. Se usó 200 μL de muestra, se le agregó solución desnaturalizante 2X, se mezcló y luego de 5 minutos se agregó mezcla de ácido fenólico – cloroformo. Se mezcló por vórtex un minuto y se centrifugó a 10000 x g por 5 minutos. Conservando la fase acuosa, se agregó etanol al 100% y se mezcló. En un tubo recolector, esta mezcla se centrifugó a 10000 x g por 15 segundos, después se agregó 700 μL de solución de lavado 1, se centrifugó a 10000 x g por 15 segundos y se agregó dos veces 500 μL de solución de lavado 2, centrifugando a 10000 x g por un minuto. Finalmente se agrega 100 μL de solución de elución y se conserva a -20°C .

6.5. RT y PCR en tiempo real

Para la síntesis de cDNA a partir del RNA extraído de los exosomas derivados de macrófagos M0 se utilizó el kit miRNA. El programa utilizado para la RT-PCR sintetizado en el termociclador fue de un ciclo inicial de 30 minutos a $16\text{ }^{\circ}\text{C}$, después 30 minutos a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 minutos a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un último ciclo de un minuto a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Una vez obtenido el cDNA se procedió a la amplificación de miRNA-21. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real se realizó en el equipo AriaMX Real – Time PCR System. En la amplificación se utilizó como control endógeno a RNU48 ya que es un ncRNA que cuenta con una expresión estable tanto en condiciones normales, así como tumorales⁸⁸. Las condiciones para la amplificación fue 1 ciclo en un periodo de 2 minutos a 50°C, después 1 ciclo en un periodo de 10 minutos a 95°C, después 40 ciclos en un periodo de 15 segundos y se redujo la temperatura progresivamente hasta los 60°C, considerando en este punto el fin de la amplificación.

6.6. Ensayo de invasión de Transwell

Para este ensayo se agregó matriz extracelular (Corning #354234) en insertos con una membrana porosa de 8 µm de diámetro en cada poro, y se incubó durante al menos 30 minutos a 37°C. Paralelo a esto se realiza un conteo de células con ayuda de una cámara de Neubauer. Al solidificarse la matriz extracelular, se colocó un volumen tal que se tuvieran 200,000 células DAOY y se llevó a un volumen total de 300 µL con medio EMEM sin SFB. En el pozo se adicionaron 500 µL de medio EMEM con o sin SFB según corresponda. Para la realización del ensayo el estímulo se colocó en los insertos considerando las condiciones del experimento a realizar, siendo estos la adición de exosomas o miRNA-21 sintético según el caso. Para reforzar los resultados respecto al efecto de miRNA-21 sobre las células tumorales, se adicionó en conjunto un antagonista de la secuencia para determinar el efecto sobre las células cuando la actividad del miRNA-21 es eliminada. La placa se incubó durante 24 h a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente, las membranas se retiraron de los insertos y se tiñeron con cristal violeta, realizando la toma de fotografías para hacer un conteo de células y el análisis estadístico pertinente.

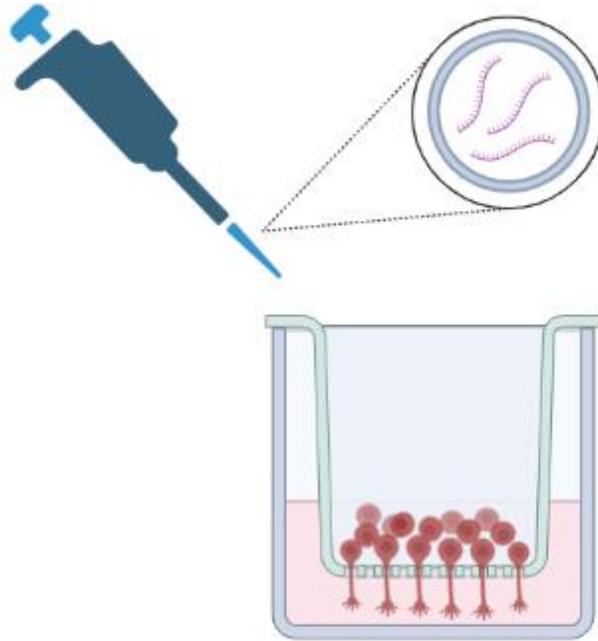


Figura 3. Representación del ensayo de invasión en placas de 12 pozos.

Esquema general del procedimiento para los ensayos de invasión. En un inserto con una membrana porosa previamente acondicionado con una capa de matriz extracelular se coloca un número conocido de células de meduloblastoma que son estimuladas con exosomas. Pasadas 24 h se retira el medio de suspensión y la matriz, se retira la membrana y se realiza el conteo del número de células que atravesaron esta membrana, esto con apoyo de un microscopio.

6.7. Análisis estadístico.

Para los ensayos de migración realizados tanto con exosomas derivados de macrófagos M0, así como miR21 sintético y Antagomir se realizó una prueba ANOVA de una vía con prueba de Dunnett con una $p < 0.05$.

Estas pruebas estadísticas fueron realizadas haciendo uso del programa estadístico en GraphPad Prism 8.

7. Resultados.

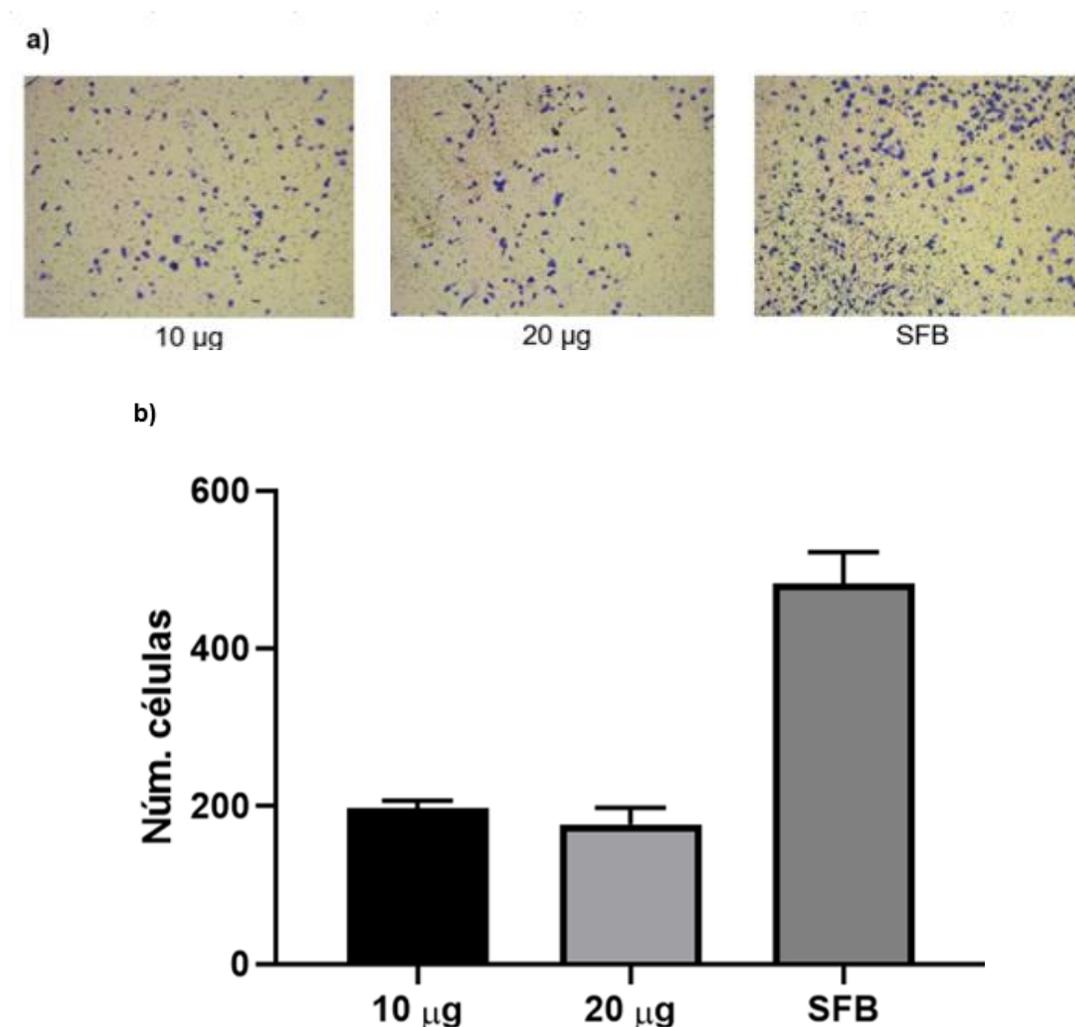
7.1. Los exosomas derivados de macrófagos aumentan la capacidad de invasión en células Daoy

Inicialmente, se determinó la cantidad a utilizar de exosomas de macrófagos M0 para los ensayos de invasión. Para esto, se comparó entre un estímulo de 10 y 20 μg (valores de proteína total usado como referencia) de exosomas sobre la capacidad de invasión en las células de meduloblastoma. No se observó una diferencia significativa en el efecto de ambas concentraciones con respecto a un control al que se le adicionó 20 μg de exosomas derivados de SFB (Figura 4a, 4b), por lo que se decidió usar 10 μg de exosomas de macrófagos M0 para los ensayos posteriores. Con esta consideración, se realizó la evaluación del efecto de los exosomas sobre las células Daoy. Para este ensayo se comparó el efecto de los exosomas en las células con respecto a un control negativo, donde a estas células no se les adicionó algún estímulo, así como un control positivo con exosomas derivados de SFB. En este ensayo, se observó un aumento estadísticamente significativo sobre la capacidad de invasión en estas células al comparar el estímulo con exosomas de macrófagos M0 con respecto al control negativo, esto debido al aumento en el número de células contadas en los diferentes campos de visión revisados en el microscopio. (Figura 4c, 4d). El número de experimentos elegido es 3 debido a que, en líneas celulares, este número se considera suficiente para presentar robustez estadística, siendo presentado en diferentes trabajos relacionados al tópico⁸⁹.

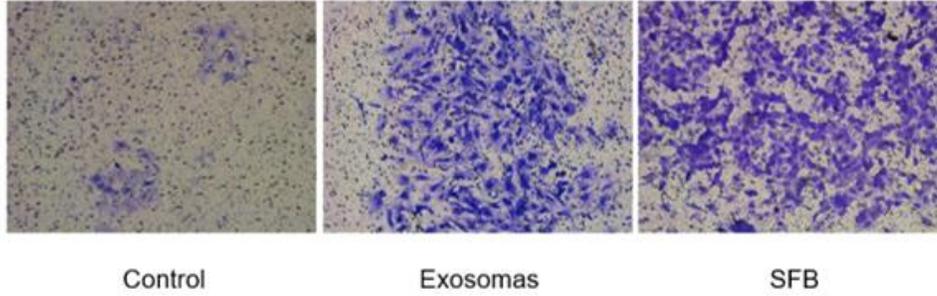
7.2. Los exosomas derivados de macrófagos M0 expresan miRNA-21

Al considerar los resultados observados con exosomas derivados de macrófagos, se determinó que uno de los elementos presentes en estas vesículas es clave para el aumento de la capacidad de invasión. Previamente, se ha descrito a los miRNAs como reguladores de diversos procesos celulares y, particularmente, el miRNA-21 se ha relacionado en diferentes trabajos dentro del contexto tumoral en distintas líneas celulares, incluyendo así también los antecedentes que lo caracterizan como un oncomiRNA. Así, para identificar la expresión de miRNA-21 en los exosomas

derivados de macrófagos, se realizó una PCR en tiempo real para esta determinación, usando como control a RNU48, un gen constitutivo común para la amplificación. La gráfica obtenida muestra la detección de señal de fluorescencia correspondiente a ambos elementos, lo que se traduce como una expresión de miRNA-21 en los exosomas aislados. Al representar en un segundo gráfico el número de ciclos a partir del cual se detectó una señal de fluorescencia correspondiente al gen, se observó que en promedio esto tomó 29 ciclos, un valor que representa una expresión importante de miRNA-21 en estas vesículas, resultados que son validados por la determinación así también de RNU48 (Figura 5a, 5b). El número de ensayos realizados para esta determinación fueron 2 debido a que estos experimentos tienen la finalidad de evidenciar la presencia de miRNA-21 en las vesículas más no de hacer una cuantificación de este.



c)



d)

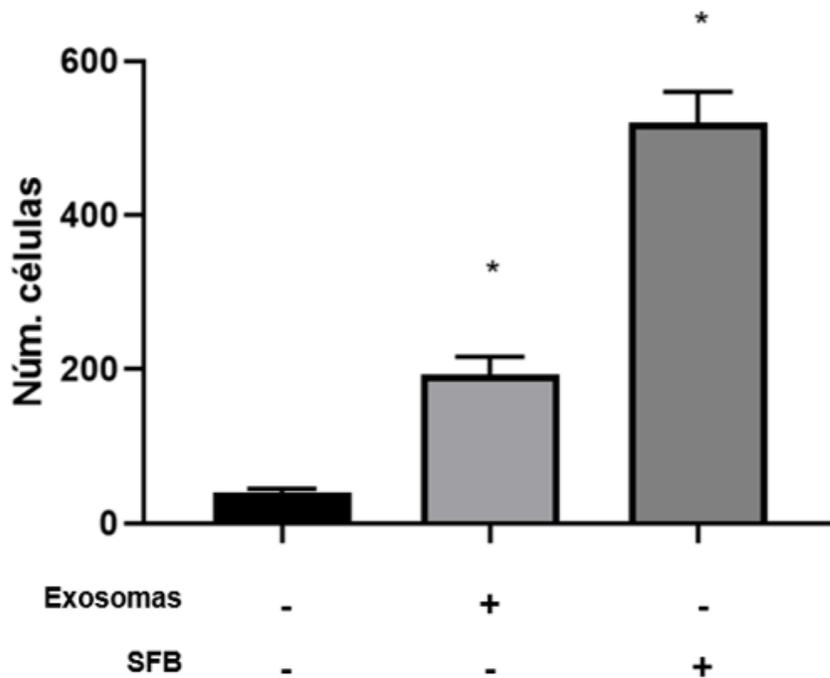
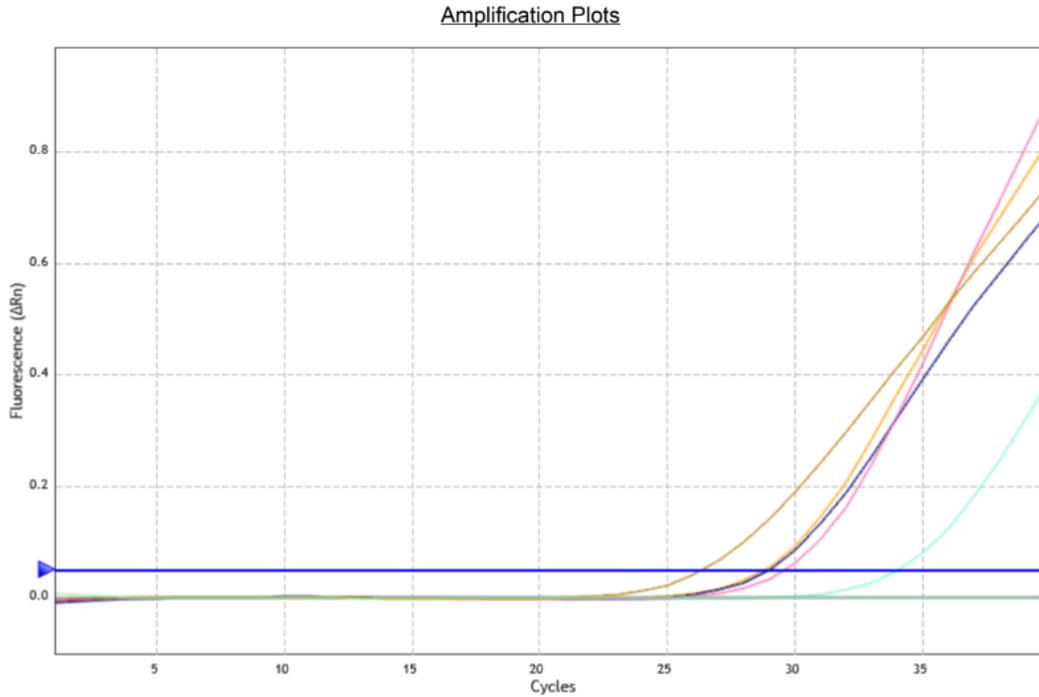


Figura 4. El estímulo con exosomas derivados de macrófagos M0 aumenta la capacidad de invasión en células de meduloblastoma. a) Imágenes representativas de la comparación en la cantidad de exosomas. b) Cuantificación de los resultados obtenidos (Promedio \pm ESM. * corresponde a $p < 0.05$ ($n = 3$)). c) Imágenes representativas del efecto de exosomas sobre la capacidad de invasión. d) Cuantificación de los resultados \pm ESM. * corresponde a $p < 0.05$ ($n = 3$)

a)



b)

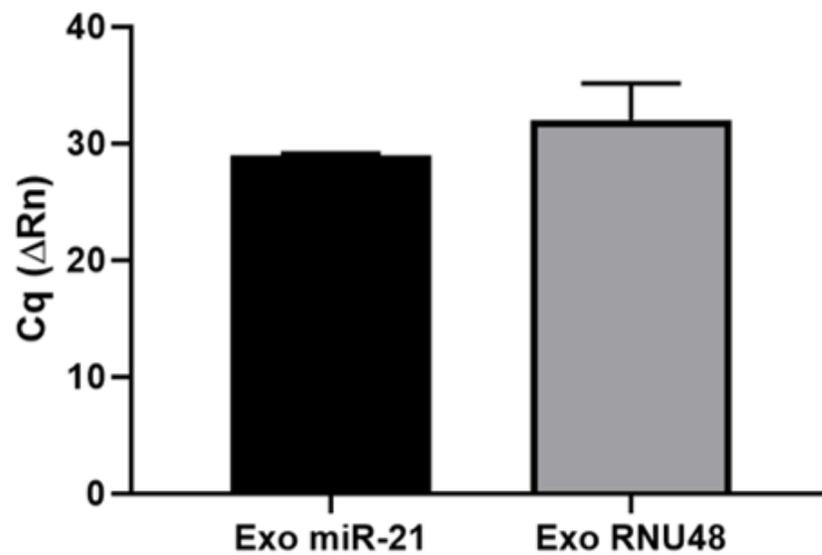
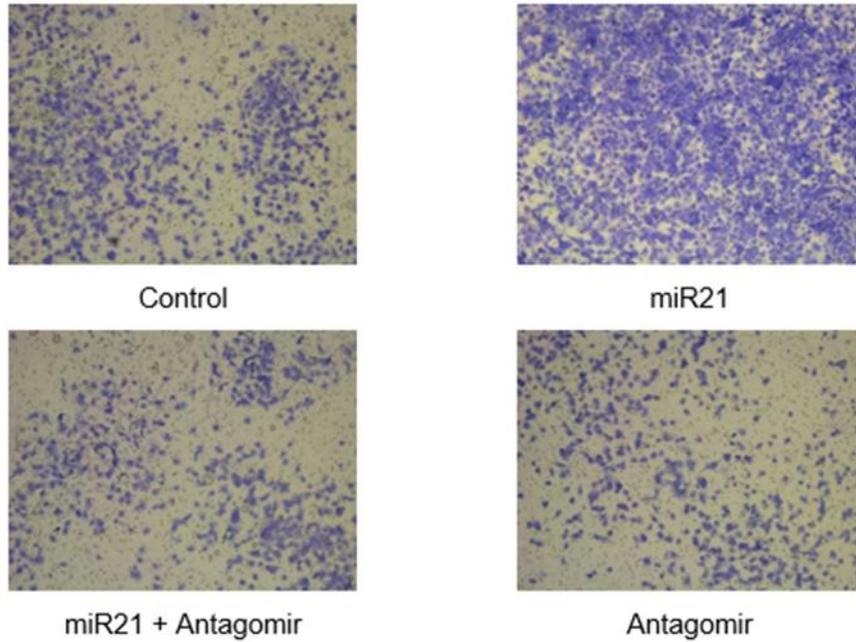


Figura 5. Los exosomas derivados de macrófagos M0 expresan miRNA-21. a) Gráfico representativo de la detección de fluorescencia al realizar la RT-PCR, mostrando la presencia de miRNA-21 en la muestra de exosomas analizada. b) Representación gráfica del número de ciclos requerido para la detección con respecto la línea base. Los gráficos presentan promedio \pm DE (n = 2).

7.3. El miRNA-21 incrementa la actividad invasiva de las células Daoy.

Hasta el momento, los resultados obtenidos identificaron que la estimulación de células de meduloblastoma con exosomas derivados de macrófagos M0 incrementó su capacidad invasiva. Además, en estas vesículas se caracterizó la expresión de miRNA-21 como uno de los elementos contenidos en dichas vesículas. Por ello, se decidió determinar el efecto de este miRNA sobre la capacidad invasiva de las células. Para ello, se realizaron ensayos de invasión donde el estímulo proporcionado a las células fue a partir de una concentración de 100 nM de miRNA-21 sintético. Adicionalmente, con la finalidad de evidenciar la capacidad de miRNA-21 de incrementar la característica invasiva de las células, se realizó la comparación del efecto al agregar un antagonista de miRNA-21 (Antagomir) en mayor concentración (150 nM) de manera conjunta, así como por separado. Con base en estos resultados, se determinó que la estimulación con miRNA-21 de las células de meduloblastoma incrementa de manera significativa la capacidad de invasión, efecto que se ve reducido al agregar antagonista en los ensayos correspondientes (Figura 6). Por otro lado, este resultado identificó que la administración de únicamente antagonista de miRNA-21 reduce la capacidad de invasión de las células con respecto al control, esto por efecto de la expresión endógena de las células para el miRNA-21 (Figura 5a, 6b). En conjunto, estos resultados muestran evidencia del papel de los exosomas derivados de macrófagos M0 en el incremento de la capacidad de invasión en las células de meduloblastoma, debido a la expresión de miRNA-21 en las vesículas, el cual es secretado por los macrófagos y al interaccionar con las células tumorales es internalizado, desencadenando una serie de señales que tienen como efecto cambios en la regulación de los procesos de invasión, provocando un aumento en el número de células que adquieren las capacidades necesarias para atravesar la matriz extracelular y que se reflejan como tumores de mayor agresividad. El número de experimentos elegido es 3 debido a que, en líneas celulares, este número se considera suficiente para presentar robustez estadística, siendo presentado en diferentes trabajos relacionados al tópico⁸⁹.

a)



b)

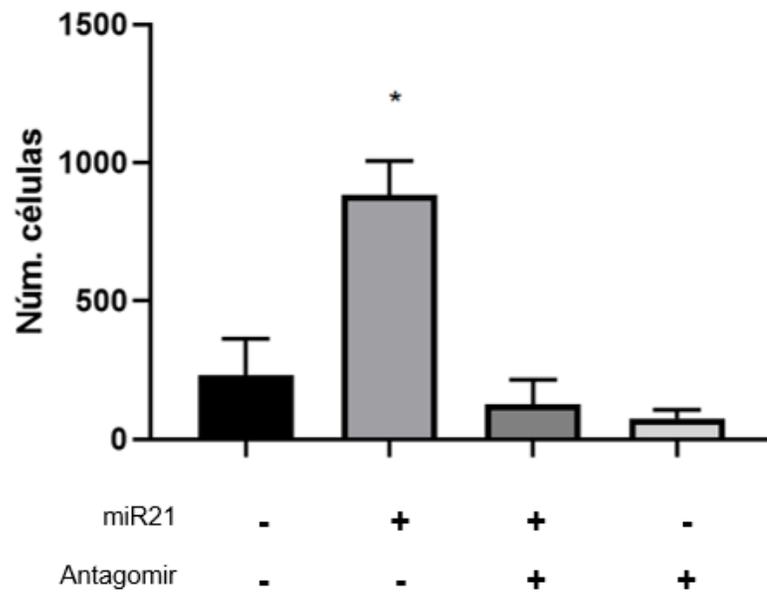


Figura 6. El miRNA-21 incrementa la capacidad de invasión en las células de meduloblastoma. El miR21 incrementa la capacidad de invasión en células Daoy. a) Imágenes representativas de los ensayos realizados usando miR21 y Antagomir. b) Cuantificación de los resultados obtenidos. Los gráficos presentan promedio \pm ESM. * corresponde a $p < 0.05$ ($n \geq 3$).

8. Discusión

El cáncer y su estudio ha sido un tema importante en tiempos recientes y, además, el uso del sistema inmune como terapia adyuvante ha resultado en un aumento en la supervivencia de los pacientes^{9,12}. Particularmente, el uso de macrófagos M0 ha sido de interés debido a su abundancia y a las funciones dentro del microambiente celular que desempeñan, en específico a través de su comunicación con otras células mediante exosomas^{57,59}. Este trabajo tiene como objetivo identificar el papel de estas vesículas con respecto al desarrollo de las células tumorales y su efecto en la capacidad de invasión de los meduloblastomas.

Se ha descrito que los macrófagos al ser células multifuncionales, según el contexto que enfrentan, el tipo de respuestas que son capaces de promover es diferente, siendo influenciadas posteriormente por el microambiente para sufrir cambios en su fenotipo. Por esta razón es que los macrófagos M0 han estado en constante controversia ya que el papel que muestran frente al desarrollo tumoral es altamente heterogéneo, y a pesar de formar parte de la familia del sistema inmune, que daría la expectativa de ofrecer un comportamiento proinflamatorio, existen diferentes trabajos que han evidenciado su potencial protumoral. En este trabajo se identificó que, para el caso de los meduloblastomas, la secreción de los exosomas por parte de macrófagos sin diferenciarse brinda una mejora en los mecanismos de invasión que, de manera inicial, se traducen como un aumento en su capacidad de invasión (Figura 3). Estos resultados se corroboran con lo observado en diferentes líneas de cáncer donde el contenido exosomal es capaz de aumentar otro tipo de características como vías de señalización o síntesis de proteínas relacionadas en la migración e invasión celular⁹⁰. El ambiente tumoral es altamente dinámico y la proporción celular está en constante cambio, donde la población de los macrófagos no es la excepción. Particularmente, la población de macrófagos M2 ha adquirido gran interés por sus funciones dentro de la angiogénesis³⁸, sin embargo, la presencia de macrófagos M0 existe, y este fenotipo ejerce su propio efecto sobre el tumor. Se ha identificado que el panorama general de la población de los macrófagos es cambiante a través del tiempo, siendo en las etapas iniciales el

momento donde existe la tasa más importante de macrófagos M1, sin embargo, conforme el tumor va adquiriendo las capacidades para influir sobre el microambiente celular y sus componentes, esta población es modificada, observando un aumento en el perfil hacia un fenotipo M2⁹¹. Por otro lado, los macrófagos M0 son una población significativa en todo momento, ya que la tasa de recambio es rápida y constante⁹². En las fases iniciales de la inflamación, el número de células efectoras incrementa para aumentar la respuesta de defensa, lo cual incluye a los macrófagos M0 y, además, estas células también muestran una mejora en su habilidad de autorrenovación⁹³. Este aumento constante en la población de macrófagos M0 permite pensar que su papel en la señalización durante el desarrollo tumoral desde las etapas tempranas no es indiferente, ya que la comunicación que tiene con los componentes celulares puede ser crítico para el desarrollo de la enfermedad. Además, es importante considerar que la influencia de las señales a las que se enfrentan estas células proviene desde su etapa de infiltración como monocitos, ya que se ha observado que, durante ciertos contextos como la inflamación aguda o crónica, el tipo de respuestas que los macrófagos M0 muestran es diferente⁹⁴, haciendo de este un eje de investigación interesante. Adicional a esto, se tiene el antecedente que la comunicación celular es dinámica entre las células a partir del tipo de señales que son requeridas, lo cual influye también en el grado en el que estas son producidas. Por lo tanto, la posibilidad que en el contexto tumoral exista un incremento en la expresión de miRNA-21 por algún tipo de molécula efectora durante esta infiltración, podría ser una de las justificaciones sobre el aumento de la capacidad de invasión de las células tumorales gracias a las señales de los macrófagos M0.

La biogénesis de los exosomas involucra el empaquetamiento de moléculas durante este proceso celular. Como parte de esto, se ha reportado la compartimentalización de miRNAs, los cuales están involucrados en la regulación de diferentes mecanismos celulares⁷⁸. El miRNA-21 se ha descrito como un elemento particularmente relacionado en los procesos de inflamación y desarrollo tumoral. Así, en este trabajo se identificó la expresión de miRNA-21 en exosomas derivados de macrófagos M0 (Figura 4), y en concordancia con lo que se ha descrito en la

literatura^{95,97}, asumimos que este miRNA promueve la capacidad de invasión de las células de meduloblastoma. Desde esta perspectiva, los resultados brindan un panorama nuevo dentro de la relación de los macrófagos y el meduloblastoma ya que, en su mayoría, la descripción de las interacciones que estos dos sistemas celulares llevan a cabo ocurre durante o posterior al fenómeno de diferenciación hacia el perfil M2. Sin embargo, para este caso, el uso de macrófagos naive o M0 ofreció a las células un incremento de sus capacidades invasivas. Los macrófagos M0 son células en constante renovación y la dinámica de cambio es un eje importante en la alta densidad que estas células presentan, por ello, la señalización previa a su infiltración puede brindar un panorama interesante de estudio dentro del tema de la comunicación celular que existe entre estos sistemas. La infiltración de monocitos desde la periferia es un proceso que involucra la transición de diferentes marcadores y moléculas en las células, ya que de manera dependiente al contexto que enfrentan estos pueden modificar su perfil, esto observado en diferentes modelos donde, dependiendo de sus características, estas células pueden ofrecer desde respuestas inflamatorias rápidas o tardías⁹². Adicional a esto, la programación de las células cambia de manera constante conforme el microambiente celular se va involucrando en la promoción de las respuestas, por ello, se considera que este conjunto de etapas influye de manera significativa en que los macrófagos efectúan sus señales, explicando así el tipo de procesos que son promovidos.

Por otro lado, diferentes antecedentes han presentado al miRNA-21 como un regulador en los procesos de proliferación celular, apoptosis y migración en diversas líneas de cáncer, por lo que el comportamiento de este segmento en los exosomas puede esperarse ser el mismo. La estimulación con miRNA-21 sintético se realizó con la finalidad de determinar su efecto como promotor de la invasión celular, resultando en un aumento en el número de células que fueron contadas al realizar la toma de fotografías. De manera inicial, la idea que se presenta es que las células están adquiriendo una mayor capacidad de degradación de la matriz extracelular debido a que es la variable que podemos asumir está viéndose modificada en las células por efecto del miRNA-21, sin embargo, esto es algo que requiere de mayor

revisión ya que el miRNA-21 es conocido por estar involucrado en la regulación de diferentes moléculas y procesos, lo que se requiere de un estudio más detallado para que se pueda responder con total certeza a la interrogante de las razones o elementos que específicamente están involucrados en el incremento de la capacidad de invasión de las células de meduloblastoma. Por otro lado, para estos experimentos se utilizó una concentración de 100 nM debido a que esta cifra se ha identificado en otros trabajos realizados en el laboratorio que ofrece una respuesta celular viable. Particularmente, la cuantificación de las moléculas que son encapsuladas en los exosomas está reportada como un valor relativo con respecto a un control⁷⁸, esto debido a que es importante recordar que el empaquetamiento de las moléculas en estas vesículas no es un proceso que pueda considerarse como constante o estandarizable, ya que son diferentes las variables que están involucradas en la biogénesis de los exosomas, sin embargo, como parte de este trabajo, se identificó la expresión en particular del miRNA-21 en las vesículas, reforzando la idea de que este elemento está teniendo una función o actividad en la promoción de respuestas y que, de estudiarse a mayor detalle, se puede obtener información interesante que pueda responder sobre interrogantes como cuál es la influencia del tiempo en la expresión de este miRNA o de los estímulos de citocinas o ligandos en particular que están participando en el desarrollo tumoral y/o el montaje de las respuestas de inflamación en estas vesículas secretadas.

Además, se agregó un antagonista para corroborar que este efecto sobre las células ocurrió por la adición de miRNA-21, observando que el bloqueo de su función provocó una disminución en el número de células invasivas (Figura 5). Es sabido que el mecanismo de los miRNA se basa en la unión de regiones específicas en los genes blanco, afectando la expresión de estos o modificando la traducción de proteínas, afectando la regulación de diferentes procesos en el cáncer⁷⁵. Como oncomiRNA, se ha descrito que entre los diferentes blancos de miRNA-21 está TPM1⁹⁸ o PDCD4⁹⁶, el primero encargado de la regulación de la expresión de E-cadherina así como metaloproteasas, mientras que el segundo está involucrado con la vía P3K/Akt, una vía de señalización que se encarga de procesos celulares como el rearrreglo del citoesqueleto y la producción de proteasas, siendo así genes que

son clave en el desarrollo celular, por lo que la internalización de miRNA-21 a estas células puede disminuir la expresión de estas proteínas y traducirse en el efecto observado en estos experimentos. Además, la evaluación del efecto en la capacidad de invasión de las células al usar únicamente el antagonista como estímulo, reduce la capacidad de invasión de las células con respecto al control, un fenómeno que ocurre debido a que se ha documentado la capacidad de expresar este miRNA por parte de los meduloblastomas⁹⁹, mostrando la relación de esta secuencia con las células tumorales para la promoción de este tipo de respuestas así como su incremento al recibir mayor cantidad de estímulo por medio de los exosomas.

Estos resultados no sólo brindan un panorama nuevo sobre la relación entre los macrófagos y las células tumorales, sino que provee de nuevas perspectivas en el tópico, ya que diversos trabajos en el tema han presentado un enfoque bajo el contexto de macrófagos con una polarización hacia un fenotipo tanto M1 como M2, sin embargo, nosotros aquí evidenciamos la relevancia de los macrófagos M0 como parte de la dinámica tumoral al tener un papel importante dentro de los procesos de comunicación que le confieren características benéficas a estas células como lo es el incremento de la capacidad invasiva de las células a través miRNA-21 derivado de exosomas de macrófagos M0. Esto adicionalmente brinda una opción más para la implementación del conocimiento en la clínica al ser un tema importante dentro del desarrollo de terapias ya que es bien sabido que uno de los atractivos actuales en el combate a los tumores es el control de la comunicación celular por exosomas, así como la regulación de su contenido.

Es importante mencionar que a futuro en el laboratorio donde se realizó este trabajo se pretende determinar los efectos que la polarización de los macrófagos puede brindar tanto al contenido exosomal como a la promoción de respuestas sobre las células de meduloblastomas, sin embargo, estos resultados son un pilar importante para la comprensión de la relación estas células, ofreciendo así la oportunidad de expandir estos conocimientos y brindar más opciones al tratamiento de esta enfermedad que es crítica dentro de la población infantil no sólo en México sino en todo el mundo.

9. Conclusiones

Los macrófagos son capaces de producir y secretar al microambiente exosomas que, de entre los diferentes elementos de su contenido, se encuentra el miRNA-21. Estos exosomas, al encontrarse con células de meduloblastoma son capaces de ingresar a estas y, al depositar su contenido, se promueve su capacidad invasiva, siendo una situación que es revertida cuando la señalización de esta secuencia de nucleótidos es bloqueada haciendo uso de un antagonista específico. El estudio de este tema requiere de experimentar con otras variables como el tiempo o estímulos a las células involucradas, sin embargo, es un tema interesante que responde diferentes preguntas con respecto a la interacción entre las células de meduloblastomas y los macrófagos M0, ofreciendo información que puede ser utilizada como parte de la mejora de la terapia actual para el padecimiento.

10. Referencias

1. Shegokar, Ranjita & Sawant, Sampada. (2014). Cancer research and therapy: Where are we today? 2. 02048. 10.14319/ijcto.0204.8.
2. Mathur, Garima. (2015). cancer: an overview. Academic Journal of Cancer Research. 8. 01-09. 10.5829/idosi.ajcr.2015.8.1.9336.
3. Anand, P (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. Pharm. Res. 25 (9): 2097-116.
4. Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G. et al. (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol 131, 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
5. Roy, Sudipta & Bandyopadhyay, Samir. (2018). Brain Tumor Classification and Performance Analysis. Int. Jour. Eng. Sci. Comp. Vol. 6
6. Ramkissoon LA, Horowitz PM, Craig JM, Ramkissoon SH, Rich BE, Schumacher SE, McKenna A, Lawrence MS, Bergthold G, Brastianos PK et al (2013) Genomic analysis of diffuse pediatric low-grade gliomas identifies

recurrent oncogenic truncating rearrangements in the transcription factor MYBL1. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:8188–8193.

7. Tsui, K., Gajjar, A., Li, C., Srivastava, D., Broniscer, A., Wetmore, C., Kun, L. E., Merchant, T. E., Ellison, D. W., Orr, B. A., Boop, F. A., Klimo, P., Ross, J., Robison, L. L., & Armstrong, G. T. (2015). Subsequent neoplasms in survivors of childhood central nervous system tumors: risk after modern multimodal therapy. *Neuro-oncology*, 17(3), 448–456.
8. Sonabend, A. M., Ogden, A. T., Maier, L. M., Anderson, D. E., Canoll, P., Bruce, J. N., & Anderson, R. C. (2012). Medulloblastoma: challenges for effective immunotherapy. *Journal of neuro-oncology*, 108(1), 1–10.
9. Mahapatra, S., & Amsbaugh, M. J. (2021). Medulloblastoma. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
10. Asifur Rahman (November 5th, 2018). Medulloblastoma, Brain Tumors - An Update, Amit Agrawal, Luis Rafael Moscote-Salazar, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.76783.E
11. Shrestha, S., Morcavallo, A., Gorrini, C., & Chesler, L. (2021). Biological Role of MYCN in Medulloblastoma: Novel Therapeutic Opportunities and Challenges Ahead. *Frontiers in oncology*, 11, 694320.
12. Liu, X., Ding, C., Tan, W., & Zhang, A. (2020). Medulloblastoma: Molecular understanding, treatment evolution, and new developments. *Pharmacology & Therapeutics*, 107516.
13. Zurawel, R. H., Chiappa, S. A., Allen, C., & Raffel, C. (1998). Sporadic medulloblastomas contain oncogenic beta-catenin mutations. *Cancer research*, 58(5), 896–899.
14. Northcott, P. A., Jones, D. T., Kool, M., Robinson, G. W., Gilbertson, R. J., Cho, Y. J., Pomeroy, S. L., Korshunov, A., Lichter, P., Taylor, M. D., & Pfister, S. M. (2012). Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nature reviews. Cancer*, 12(12), 818–834.

15. Jones, D. T., Jäger, N., Kool, M., Zichner, T., Hutter, B., Sultan, M., Cho, Y. J., Pugh, T. J., Hovestadt, V., Stütz, A. M., Rausch, T., Warnatz, H. J., Ryzhova, M., Bender, S., Sturm, D., Pleier, S., Cin, H., Pfaff, E., Sieber, L., Wittmann, A., ... Lichter, P. (2012). Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature*, 488(7409), 100–105.
16. Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulous, P. G., Gailani, M. R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Unden, A. B., Gillies, S., Negus, K., Smyth, I., Pressman, C., Leffell, D. J., Gerrard, B., Goldstein, A. M., Dean, M., Toftgard, R., Chenevix-Trench, G., Wainwright, B., ... Bale, A. E. (1996). Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*, 85(6), 841–851.
17. Johnson, R. L., Rothman, A. L., Xie, J., Goodrich, L. V., Bare, J. W., Bonifas, J. M., Quinn, A. G., Myers, R. M., Cox, D. R., Epstein, E. H., Jr, & Scott, M. P. (1996). Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5268), 1668–1671.
18. Oliver, T. G., Grasfeder, L. L., Carroll, A. L., Kaiser, C., Gillingham, C. L., Lin, S. M., Wickramasinghe, R., Scott, M. P., & Wechsler-Reya, R. J. (2003). Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), 7331–7336.
19. Cho, Y. J., Tsherniak, A., Tamayo, P., Santagata, S., Ligon, A., Greulich, H., Berhoukim, R., Amani, V., Goumnerova, L., Eberhart, C. G., Lau, C. C., Olson, J. M., Gilbertson, R. J., Gajjar, A., Delattre, O., Kool, M., Ligon, K., Meyerson, M., Mesirov, J. P., & Pomeroy, S. L. (2011). Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(11), 1424–1430.

20. Khatua, S., Song, A., Citla Sridhar, D., & Mack, S. C. (2018). Childhood Medulloblastoma: Current Therapies, Emerging Molecular Landscape and Newer Therapeutic Insights. *Current neuropharmacology*, 16(7), 1045–1058.
21. Northcott, P. A., Korshunov, A., Witt, H., Hielscher, T., Eberhart, C. G., Mack, S., Bouffet, E., Clifford, S. C., Hawkins, C. E., French, P., Rutka, J. T., Pfister, S., & Taylor, M. D. (2011). Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(11), 1408–1414. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.4324>
22. Mueller, S., & Chang, S. (2009). Pediatric brain tumors: current treatment strategies and future therapeutic approaches. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 6(3), 570–586.
23. Austin, M., Kluger, H. (2020). Targeting Innate Immunity to Treat Cancer. *Cancers*, MDPI. 2(12), 2723.
24. Nicholson L. B. (2016). The immune system. *Essays in biochemistry*, 60(3), 275–301. <https://doi.org/10.1042/EBC20160017>
25. Pardoll D. (2015). Cancer and the Immune System: Basic Concepts and Targets for Intervention. *Seminars in oncology*, 42(4), 523–538. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2015.05.003>
26. Gajewski, T. F., Schreiber, H., & Fu, Y. X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature immunology*, 14(10), 1014-1022.
27. Heger, Lukas & Hofer, Thomas & Bigley, Venetia & Jolanda, I & Vries, M & Dalod, Marc & Dudziak, Diana & Ziegler-Heitbrock, Loems. (2020). Subsets of CD1c + DCs: Dendritic Cell Versus Monocyte Lineage. *Frontiers in Immunology*. 11. 2575. 10.3389/fimmu.2020.559166.
28. Lambrecht, B. N., & Hammad, H. (2009). Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity*, 31(3), 412–424.

29. Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410(6832), 1107–1111.
30. Mantovani, A., Allavena, P., Marchesi, F., & Garlanda, C. (2022). Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nature reviews. Drug discovery*, 21(11), 799–820. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00520-5>
31. Jafarzadeh, A., Nair, A., Jafarzadeh, S., Nemati, M., Sharifi, I., & Saha, B. (2021). Immunological role of keratinocytes in leishmaniasis. *Parasite immunology*, e12870. Advance online publication.
32. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Capra, D. J. (2001). *Immunobiology* (p. 600). UK: Garland Science: Taylor & Francis Group.
33. Epelman, S., Lavine K., Randolph, G. (2014) Origin and Function of Tissue Macrophages. *Immunity Reviews*, 41(1), 21 – 35
34. Parisi, L., Gini, E., Baci, D., Tremolati, M., Fanuli, M., Bassani, B., Farronato, G., Bruno, A., & Mortara, L. (2018). Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *Journal of immunology research*, 2018, 8917804.
35. Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5966), 656–661.
36. Wang, Y., Smith, W., Hao, D., He, B., & Kong, L. (2019). M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds. *International Immunopharmacology*, 70, 459–466.
37. Medzhitov R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203):428–35
38. Gordon S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3(1):23–35

39. MacMicking, J. D., North, R. J., LaCourse, R., Mudgett, J. S., Shah, S. K., & Nathan, C. F. (1997). Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(10), 5243-5248.
40. Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., ... & Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14-20.
41. Bosurgi, L., Cao, Y. G., Cabeza-Cabrerizo, M., Tucci, A., Hughes, L. D., Kong, Y., ... & Rothlin, C. V. (2017). Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science*, 356(6342), 1072-1076.
42. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, 25(12), 677-686.
43. Bio-Rad (30 de Julio 2021). Mini-review: Macrophage Polarization. Obtenido de: <https://www.bio-rad-antibodies.com/macrophage-polarization-minireview.html>
44. Vigetti, D., Gotte, M., Pavao, M., Theochartis, A. (2013) Cellular Microenvironment in Human Pathologies. *BioMed Research International*. Vol 2013. Article ID 946958
45. Sun, Y., Chen, C. S., & Fu, J. (2012). Forcing stem cells to behave: a biophysical perspective of the cellular microenvironment. *Annual review of biophysics*, 41, 519–542. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155306>
46. Arneth B. (2019). Tumor Microenvironment. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 56(1), 15. <https://doi.org/10.3390/medicina56010015>
47. Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., Gong, Z., Zhang, S., Zhou, J., Cao, K., Li, X., Xiong, W., Li, G., Zeng, Z., & Guo, C. (2017). Role

- of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8(5), 761–773. <https://doi.org/10.7150/jca.17648>
48. Emami Nejad, A., Najafgholian, S., Rostami, A. et al. (2021) The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell Int* 21(62) <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01719-5>
49. Henze, A. T., & Mazzone, M. (2016). The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages. *The Journal of clinical investigation*, 126(10), 3672–3679. <https://doi.org/10.1172/JCI84427>
50. Hu, W., Li, X., Zhang, C., Yang, Y., Jiang, J., & Wu, C. (2016). Tumor-associated macrophages in cancers. *Clinical & translational oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 18(3), 251–258. <https://doi.org/10.1007/s12094-015-1373-0>
51. Cheng, H., Wang, Z., Fu, L., & Xu, T. (2019). Macrophage Polarization in the Development and Progression of Ovarian Cancers: An Overview. *Frontiers in oncology*, 9, 421. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00421>
52. Pan, Y., Yu, Y., Wang, X., & Zhang, T. (2020). Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Frontiers in immunology*, 11, 583084. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583084>
53. Ratajczak, M. Z., Ratajczak, D., & Pedziwiatr, D. (2016). Extracellular Microvesicles (ExMVs) in Cell-to-Cell Communication: A Role of Telocytes. *Advances in experimental medicine and biology*, 913, 41–49. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1061-3_3
54. Takeya, M., & Komohara, Y. (2016). Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: friend or foe?. *Pathology international*, 66(9), 491–505. <https://doi.org/10.1111/pin.12440>

55. Aliotta, J. M., Pereira, M., Johnson, K. W., de Paz, N., Dooner, M. S., Puente, N., Ayala, C., Brilliant, K., Berz, D., Lee, D., Ramratnam, B., McMillan, P. N., Hixson, D. C., Josic, D., & Quesenberry, P. J. (2010). Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription. *Experimental hematology*, 38(3), 233–245.
56. Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., & Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature cell biology*, 10(5), 619–624.
57. Candela, M. E., Geraci, F., Turturici, G., Taverna, S., Albanese, I., & Sconzo, G. (2010). Membrane vesicles containing matrix metalloproteinase-9 and fibroblast growth factor-2 are released into the extracellular space from mouse mesoangioblast stem cells. *Journal of cellular physiology*, 224(1), 144–151.
58. Cocucci, E., Racchetti, G., Podini, P., & Meldolesi, J. (2007). Enlargeosome traffic: exocytosis triggered by various signals is followed by endocytosis, membrane shedding or both. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 8(6), 742–757.
59. Saberianpour, S. (2020) Role of Macrophages in Vascular Regeneration. *Multidisciplinary Cardiovascular Annals* 12(1): e106056
60. Liu, H., Liu, S., Qiu, X., Yang, X., Bao, L., Pu, F., Liu, X., Li, C., Xuan, K., Zhou, J., Deng, Z., Liu, S., & Jin, Y. (2020). Donor MSCs release apoptotic bodies to improve myocardial infarction via autophagy regulation in recipient cells. *Autophagy*, 16(12), 2140–2155.
61. Chen Han, Cong Zhang, Hengxiao Wang & Lianmei Zhao (2021) Exosome-mediated communication between tumor cells and tumor-associated macrophages: implications for tumor microenvironment, *Oncolmmunology*, 10:1
62. Tamkovich, Svetlana & Tutanov, Oleg & Laktionov, Pavel. (2016). Exosomes: Generation, structure, transport, biological activity, and diagnostic application.

Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.
10. 163-173. 10.1134/S1990747816020112.

63. ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/>. Acceso el 20 de junio de 2021.
64. Borges, F. T., Reis, L. A., & Schor, N. (2013). Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 46(10), 824–830.
65. Tauro, B. J., Greening, D. W., Mathias, R. A., Ji, H., Mathivanan, S., Scott, A. M., & Simpson, R. J. (2012). Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods (San Diego, Calif.)*, 56(2), 293–304.
66. Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology*, 200(4), 373–383.
67. Østergaard, O., Nielsen, C. T., Iversen, L. V., Jacobsen, S., Tanassi, J. T., & Heegaard, N. H. (2012). Quantitative proteome profiling of normal human circulating microparticles. *Journal of proteome research*, 11(4), 2154–2163.
68. Wickman, G., Julian, L., & Olson, M. F. (2012). How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell death and differentiation*, 19(5), 735–742.
69. Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., & Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(12), 7309–7318.
70. Lee, R., Feinbaum, R., Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementary to *lin-14*. *Cell*. 75(1), 843-854.

71. Brien, O., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C. (2018) Overview of iroRNA Biogenesis. Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers Endocrinology*. 402(9)
72. Shyu, A. B., Wilkinson, M. F., & van Hoof, A. (2008). Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *The EMBO journal*, 27(3), 471–481. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601977>
73. Anglicheau, D., Muthukumar, T., & Suthanthiran, M. (2010). MicroRNAs: small RNAs with big effects. *Transplantation*, 90(2), 105–112. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181e913c2>
74. Dexheimer, P., Cochella, L. (2020) MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Front. Cell. Dev. Biol.* 409(8).
75. Conti, I., Varano, G., Simioni, C., Laface, I., Milani, D., Rimondi, E., & Neri, L. M. (2020). miRNAs as Influencers of Cell-Cell Communication in Tumor Microenvironment. *Cells*, 9(1), 220. <https://doi.org/10.3390/cells9010220>
76. Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I., & Illei, G. G. (2012). The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PloS one*, 7(3), e30679.
77. Bhome, R., Del Vecchio, F., Lee, G. H., Bullock, M. D., Primrose, J. N., Sayan, A. E., & Mirnezami, A. H. (2018). Exosomal microRNAs (exomiRs): Small molecules with a big role in cancer. *Cancer letters*, 420, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.02.002>
78. Sun, L. H., Tian, D., Yang, Z. C., & Li, J. L. (2020). Exosomal miR-21 promotes proliferation, invasion and therapy resistance of colon adenocarcinoma cells through its target PDCD4. *Scientific reports*, 10(1), 8271. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65207-6>
79. Jenike, A. E., & Halushka, M. K. (2021). miR-21: a non-specific biomarker of all maladies. *Biomarker research*, 9(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s40364-021-00272-1>

80. Wang, Y., Zhao, M., Liu, S., Guo, J., Lu, Y., Cheng, J., & Liu, J. (2020). Macrophage-derived extracellular vesicles: diverse mediators of pathology and therapeutics in multiple diseases. *Cell death & disease*, 11(10), 924.
81. Du, T., Yang, C. L., Ge, M. R., Liu, Y., Zhang, P., Li, H., Li, X. L., Li, T., Liu, Y. D., Dou, Y. C., Yang, B., & Duan, R. S. (2020). M1 Macrophage Derived Exosomes Aggravate Experimental Autoimmune Neuritis via Modulating Th1 Response. *Frontiers in immunology*, 11, 1603.
82. Wang, P., Wang, H., Huang, Q., Peng, C., Yao, L., Chen, H., Qiu, Z., Wu, Y., Wang, L., & Chen, W. (2019). Exosomes from M1-Polarized Macrophages Enhance Paclitaxel Antitumor Activity by Activating Macrophages-Mediated Inflammation. *Theranostics*, 9(6), 1714–1727.
83. Zheng, P., Luo, Q., Wang, W., Li, J., Wang, T., Wang, P., Chen, L., Zhang, P., Chen, H., Liu, Y., Dong, P., Xie, G., Ma, Y., Jiang, L., Yuan, X., & Shen, L. (2018). Tumor-associated macrophages-derived exosomes promote the migration of gastric cancer cells by transfer of functional Apolipoprotein E. *Cell death & disease*, 9(4), 434.
84. Zhou, J., Li, X., Wu, X., Zhang, T., Zhu, Q., Wang, X., Wang, H., Wang, K., Lin, Y., & Wang, X. (2018). Exosomes Released from Tumor-Associated Macrophages Transfer miRNAs That Induce a Treg/Th17 Cell Imbalance in Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer immunology research*, 6(12), 1578–1592. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0479>
85. Cui, H., He, Y., Chen, S., Zhang, D., Yu, Y., & Fan, C. (2019). Macrophage-Derived miRNA-Containing Exosomes Induce Peritendinous Fibrosis after Tendon Injury through the miRNA-21-5p/Smad7 Pathway. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 14, 114–130. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.11.006>
86. Benjamin, S, Koroleva, M, Allen, C, Ernstoff, M & Shu SL (2021) Co-Isolation of Cytokines and Exosomes: Implications for Immunomodulation Studies. *Front. Immunol.* 12:638111. doi: 10.3389/fimmu.2021.638111

87. Park, E. K., Jung, H. S., Yang, H. I., Yoo, M. C., Kim, C., & Kim, K. S. (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 56(1), 45–50. <https://doi.org/10.1007/s00011-007-6115-5>
88. Torres, A., Torres, K., Wdowiak, P., Paszkowski, T., & Maciejewski, R. (2013). Selection and validation of endogenous controls for microRNA expression studies in endometrioid endometrial cancer tissues. *Gynecologic oncology*, 130(3), 588–594. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.06.026>
89. Yang, S., Zhang, X., Sun, Y., Shi, J., Jiang, D., Wang, J., Liu, Y., Hu, C., Pan, J., Zheng, L., & Yang, K. (2020). MicroRNA-362-3p Inhibits Migration and Invasion via Targeting BCAP31 in Cervical Cancer. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 107. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00107>
90. Yan, W., & Jiang, S. (2020). Immune Cell-Derived Exosomes in the Cancer-Immunity Cycle. *Trends in cancer*, 6(6), 506–517. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.02.013>
91. Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *The Journal of experimental medicine*, 210(10), 1977–1992. <https://doi.org/10.1084/jem.20131199>
92. Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., & Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5838), 666–670.
93. Davies, L. C., Rosas, M., Smith, P. J., Fraser, D. J., Jones, S. A., & Taylor, P. R. (2011). A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. *European*

- journal of immunology, 41(8), 2155–2164.
<https://doi.org/10.1002/eji.201141817>
94. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of immunology* (Baltimore, Md: 1950), 164(12), 6166–6173.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>
95. Wu, Y. R., Qi, H. J., Deng, D. F., Luo, Y. Y., & Yang, S. L. (2016). MicroRNA-21 promotes cell proliferation, migration, and resistance to apoptosis through PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in esophageal cancer. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(9), 12061–12070. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5074-2>
96. Liu, C., Tong, Z., Tan, J., Xin, Z., Wang, Z., & Tian, L. (2019). MicroRNA-21-5p targeting PDCD4 suppresses apoptosis via regulating the PI3K/AKT/FOXO1 signaling pathway in tongue squamous cell carcinoma. *Experimental and therapeutic medicine*, 18(5), 3543–3551.
97. Wang, S., Jia, J., Liu, D., Wang, M., Wang, Z., Li, X., Wang, H., Rui, Y., Liu, Z., Guo, W., Nie, J., & Dai, H. (2019). Matrix Metalloproteinase Expressions Play Important role in Prediction of Ovarian Cancer Outcome. *Scientific reports*, 9(1), 11677. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47871-5>
98. Wang, J., Tang, C., Yang, C., Zheng, Q., & Hou, Y. (2019). Tropomyosin-1 Functions as a Tumor Suppressor with Respect to Cell Proliferation, Angiogenesis and Metastasis in Renal Cell Carcinoma. *Journal of Cancer*, 10(10), 2220–2228. <https://doi.org/10.7150/jca.28261>
99. Grunder, E., D'Ambrosio, R., Fiaschetti, G., Abela, L., Arcaro, A., Zuzak, T., Ohgaki, H., Lv, S. Q., Shalaby, T., & Grotzer, M. (2011). MicroRNA-21 suppression impedes medulloblastoma cell migration. *European journal of cancer* (Oxford, England: 1990), 47(16), 2479–2490.