

Cellular and molecular exosome characterization for using them as diagnostic biomarkers in retinoblastoma

Caracterización celular y molecular de exosomas para su uso como biomarcadores de diagnóstico en retinoblastoma

María de Jesús Orozco-Romero¹, Raúl Borja-Urby², Martha Verónica Ponce-Castañeda³, Noé Durán-Figueroa^{1*}

¹Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biología, Instituto Politécnico Nacional.

²Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías, Instituto Politécnico Nacional.

³Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

*nduranf@ipn.mx

ABSTRACT

Exosomes are small extracellular vesicles essential in intercellular communication; they act as vehicles of broad scope. They travel through body fluids and deliver important messages coded in DNA, RNA and proteins to all cells of the organisms. Message release via exosomes is associated with different pathological conditions including cancer. That is why its potential in diagnostic and therapeutic applications is growing. Here, exosomes were purified from clinical samples from patients with retinoblastoma and healthy individuals as controls. The exosomes recovered were characterized using cryogenic transmission electron microscopy. Moreover, the presence of CD63 and CD81 transmembrane proteins was confirmed using Western blot. This work describes a complete technique to isolate and characterize exosomes from human plasma, to be further used as retinoblastoma diagnostic biomarkers.

Keywords: biomarker, exosome, retinoblastoma.

RESUMEN

Los exosomas son vesículas membranosas extracelulares esenciales en la comunicación intercelular a larga distancia, viajan en los fluidos corporales y entregan mensajes a células

de todo el organismo. La liberación mensajes vía exosomas en forma de DNA, RNA o proteínas está asociado a diferentes condiciones biológicas patológicas, como el cáncer. Debido a esto, el aislamiento y caracterización de exosomas en plasma es clave para su uso como biomarcadores no invasivos de diversas enfermedades. En el presente estudio, se purificaron exosomas a partir de muestras clínicas de pacientes con retinoblastoma y de individuos sanos como controles. Los exosomas recuperados fueron caracterizados a nivel celular por microscopia electrónica de transmisión empleando una técnica de criogenia. Para demostrar la correcta purificación de exosomas se confirmó la presencia de las proteínas transmembranales CD63 y CD81 así como la identificación de microRNAs. En general se describe la purificación y caracterización de exosomas para su posterior uso como biomarcadores de retinoblastoma.

Palabras clave: biomarcadores, exosomas, retinoblastoma.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer comienza con un crecimiento celular anormal que puede invadir partes adyacentes e incluso diseminarse en otros órganos. El origen del cáncer es multifactorial, intervienen elementos como la alimentación, algunos contactos virales, factores hereditarios, ambientales y geográficos. Pese a la recurrencia sintomatológica, hay algunos casos que se desarrollan de forma silenciosa y asintomática (DeSantis *et al.*, 2014).

El cáncer engloba más de un ciento de enfermedades que afectan a todas las poblaciones, edades y estratos sociales; por lo tanto, se le considera un problema de salud pública. En 2012 se le atribuyeron 8.2 millones de muertes y se prevé que en 2020 se registren 15 millones de casos nuevos (Siegel *et al.*, 2015). Anualmente más de 250 mil niños son diagnosticados con cáncer. Entre los ocho tipos más comunes se encuentra el retinoblastoma, un tipo de cáncer pediátrico que afecta a la retina, (American Cancer Society, 2014), se estima que en el mundo 9 mil casos nuevos son diagnosticados cada año (Thériault *et al.*, 2014).

1.1 El retinoblastoma en México

El retinoblastoma es un problema oncológico afecta al 4.3% de la población infantil en México. En menores de un año es la segunda neoplasia más común y constituye la segunda causa de muerte infantil en menores de dos años. La primer manifestación visible es un brillo blanco en la pupila, llamada leucocoria. Entre los síntomas secundarios se presenta la inflamación, posteriormente se genera el glaucoma que ocurre cuando el tumor empuja el diafragma del cristalino (Alvarado-Castillo *et al.*, 2009).

Puede presentarse de forma unilateral o bilateral, puede tener un patrón congénito y/o esporádico (no hereditario). Se estima que la sobrevivencia de los pacientes afectados es mayor al 80%. Sin embargo, la metástasis aparece durante el primer año de diagnóstico. Para los casos metastásicos la sobrevida no supera los seis meses posteriores al diagnóstico (Alvarado-Castillo *et al.*, 2007). Aunque el retinoblastoma no afecta a una gran población en México comparado, por ejemplo con leucemia, si es un excelente modelo de estudio para elucidar los mecanismos celulares, genéticos y bioquímicos que provocan el cáncer (Conkrite *et al.*, 2011).

El diagnóstico del retinoblastoma ocurre en estadios intermedios-avanzados de la enfermedad. Reportes previos sugieren que el retraso del diagnóstico predice el grado de invasión extraocular del tumor y consiguiente los casos metastásicos (Ramírez-Ortiz *et al.*, 2014). Debido al tiempo perdido entre la etapa asintomática y el diagnóstico, hace que el tratamiento clínico sea la cirugía con la consecuente remoción de uno o los dos ojos (enucleación). Para contrarrestar esto, se requiere el desarrollo e implementación de métodos de diagnóstico tempranos no invasivos o mínimamente invasivos.

1.2 El uso de biomarcadores en oncología

Los biomarcadores son indicadores de estados o condiciones fisiológicas. Pueden ser útiles para determinar la propensión a alguna enfermedad, evaluar su progresión, o bien, comprobar la eficacia de algún tratamiento. El potencial de los biomarcadores ofrece ventajas al área oncológica, entre las que se destaca una detección temprana en enfermedades asintomáticas. Otro de los beneficios es la disminución de dolor al aplicar métodos no invasivos durante la toma de muestras. Es por ello que identificar biomarcadores resulta una herramienta invaluable para la evaluación clínica (Ajit, 2012).

Hoy en día, entre los biomarcadores más novedosos y trascendentales están las microvesículas y su contenido en forma de microRNAs. Las vesículas más ampliamente estudiadas son los exosomas cuyos diámetros oscilan entre 30-140 nm (Skog *et al.*, 2008). Los exosomas viajan a través de distintos fluidos biológicos para llevar un mensaje a las células receptoras (Wiklander *et al.*, 2015). Una vez que llegan a su destino final y son reconocidos por las células receptoras, se fusionan en su membrana plasmática para liberar su contenido, entregando así mensajes íntegros y funcionales a la célula blanco (Valadi *et al.*, 2007).

1.3 El rol de los exosomas en el cáncer

La relevancia de los exosomas en el cáncer aumentó al demostrarse que llevaban en su interior diferentes RNAs, microRNAs y proteínas involucrados en el desarrollo y angiogénesis tumoral (Melo *et al.*, 2015; Taylor & Gercel-Taylor, 2014). Recientemente se descubrió que los exosomas participan de forma activa durante la metástasis provocando la formación de un microambiente celular que inicia la colonización de órganos específicos como pulmón, dicho de otro modo, son la señal de detonación de metástasis (Hoshino *et al.*, 2015).

Otro elemento clave sobre el estudio de exosomas fue la identificación de “oncomirs”, es decir, microRNAs que funcionan como genes oncológicos. Actualmente se usan a los microRNAs de exosomas como biomarcadores. Por ejemplo en cáncer de ovario a partir del suero de cuatro pacientes con diferentes estadios patológicos, se identificó un grupo de ocho microRNAs con niveles de expresión similares en todos los estadios (Taylor & Gercel-Taylor, 2014). Otro caso es melanoma, dónde se identificó la presencia de tres microRNAs a partir de exosomas aislados de dos líneas celulares tumorales (Xiao *et al.*, 2012).

Por lo tanto, nuestro objetivo fue demostrar la presencia de exosomas en plasma de pacientes con retinoblastoma y caracterizar celular y molecularmente a los exosomas para determinar que moléculas son transportadas, con la hipótesis de que esto permitirá conocer el mecanismo de transporte de moléculas involucradas en la metástasis.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Aislamiento de exosomas del plasma

Muestras de plasma de pacientes con retinoblastoma se descongelaron y el volumen de trabajo fue de 500 μ l. Las muestras se centrifugaron a 2000 g durante 20 min para eliminar cualquier célula. Luego, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo para centrifugarse a 10000 g durante 20 min para remover cualquier residuo celular. En seguida, el sobrenadante se recuperó y se mezcló en buffer PBS en una proporción 1:1, se homogenizó con vórtex. A continuación, se añadió el reactivo Total Exosome Isolation Kit (Invitrogen, Thermo Fisher, EUA) en una proporción 1:5, se mezcló hasta formar una solución homogénea. Las muestras se incubaron en hielo durante 10 min, después se centrifugaron a temperatura ambiente a 10000 g durante 10 min. El sobrenadante se desechó, mientras que el botón que contiene los exosomas fue resuspendido en PBS. La suspensión fue almacenada a -20° C. La concentración de exosomas se relaciona indirectamente con la concentración de proteínas de la muestra por ensayo de Bradford.

2.2 Microscopía Electrónica de Transmisión por Criogenia

Los exosomas se observaron a través de microscopía electrónica de transmisión implementando una técnica criogénica (Cryo-TEM) con un sistema dosis mínima (MDS). Usando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM2100. Para la caracterización morfológica de las poblaciones de exosomas, se vitrificaron las muestras en una rejilla de carbono Lacey dentro del dispositivo Gatan CryoplungeTM3. Después de la transferencia, la muestra se congeló por inmersión en etano líquido, para su crio-preservación se mantiene en nitrógeno líquido hasta su observación en el microscopio. Con un soporte criogénico especial (Mo. 914) se transfirió al Gatan para mantener la temperatura de la muestra hasta -170° C durante la observación. Las micrografías fueron adquiridas a 80 kV, de excitación débil, la dosis de radiación menor de 4 pA/cm² bajo condiciones altamente desenfocadas para obtener una mejor imagen de las poblaciones. Todas las imágenes fueron grabadas por una cámara CCD acoplada (Ultrascan XP, Gatan, USA) y procesadas en Micrografía Digital.

2.4 Inmunotransferencia

Los exosomas aislados de plasma se mezclaron con amortiguador Laemli, fueron calentados a baño María por 5 min y cargados en geles SDS-PAGE. Se utilizó el marcador de peso molecular Protein Precision Plus (Bio-Rad, USA) y se corrió a 100 V durante 1,5 h. Se transfieren en una membrana Immun-Blot PVDF (Bio-Rad, USA) durante 50 min a 18V utilizando Trans-Blot Cell Semi transferencia en seco (Bio-Rad, USA). En seguida se bloquean las membranas con tampón de PBS, 0,1% de Tween 20 y 5% de Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad, USA) toda la noche. Después, las membranas se lavaron 4 veces por 5 min usando tampón de lavado (PBST 0,1%). Las membranas se incubaron durante 1 hora con su respectivo anticuerpo primario recién preparado: CD63 con dilución 1:5,000 (ab8219, Abcam), CD9 con dilución 1:10,000 (ab2215, Abcam), CD81 con dilución 1:10,000 (ab35026). Posteriormente, las membranas se lavaron para continuar con la incubación del anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano HRP con dilución 1:15,000 (ab97420, Abcam). Inmediatamente, las membranas se lavaron y se revelaron con Clarity Western Blotting Substrato (Bio-Rad, USA) y se visualizaron mediante el Sistema de ChemiDoc (Bio-Rad, USA).

2.5 Purificación de RNA a partir de exosomas

Los exosomas purificados fueron transferidos a tubos libres de RNAsas. El volumen se ajustó a 200 μ l con tampón de PBS. Para la extracción del ARN se usó el kit Total Exosome RNA Isolation kit (Invitrogen, USA). Para lisar los exosomas se añadieron 200 μ l de solución desnaturizante y se agitó por 5 min en vórtex. Luego, las muestras se incubaron en hielo durante 5 min. Inmediatamente se añadió a las muestras 400 μ l ácido-fenol: cloroformo, se mezclaron por agitación durante 60 segundos. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 5 min a 13000 g a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se transfirieron a un tubo libre de RNAsas. A la fase acuosa se le añadió 1,25 volúmenes de etanol absoluto, estas soluciones fueron filtradas y recuperada en los tubos colectores. Finalmente, el RNA se eluyó tres veces con 20 μ l de agua DEPC. La concentración se midió por espectrofotometría con Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA)

2.6 Iniciadores de microRNAs tipo Stem-Loop

Los iniciadores fueron diseñados considerando una estructura sintética conservada Stem-Loop que forma una horquilla. La especificidad de los iniciadores tipo Stem-Loop RT para cada microRNA es conferida por seis nucleótidos (nt) en la orientación final 3', mismos que son complementarios al microRNA maduro.

Los iniciadores utilizados en la PCR fueron diseñados considerando su orientación. Para el iniciador "adelante", se tomaron 8 nucleótidos complementarios a la secuencia del microRNA maduro en dirección 5'. Para el iniciador "reverso" se consideró una secuencia complementaria de 18 nucleótidos conservados del iniciador sintético Stem-Loop en dirección 3' (Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007). La secuencia de los iniciadores se muestra en la tabla 1

Tabla 1. Secuencias de los iniciadores de microRNAs tipo Stem-Loop

Nombre	Secuencia (5'-3')	Núm. de nt	Nombre del microRNA
125b-5p RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCA ATTCAGTTGAGCACTGGTA	44	hsa-miR-125b-5p
125b-5p F	CAGGCTTCTCCCAACCCTTGATC	26	
155-5p RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCA ATTCAGTTGAGACCCCTAT	44	hsa-miR-155-5p
155-5p F	CGGACTTTAATGCTAATCGTGAT	23	
21-5p RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCA ATTCAGTTGAGTCAACATC	44	hsa-miR-21-5p
21-5p F	CGTCAGTAGCTTATCAGACTGAT	24	
142-5p RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCA ATTCAGTTGAGAGTAGTGC	44	hsa-miR-142-5p
142-5p F	CGACGTCATAAAGTAGAAAGCAC	23	
URP	TGGTGTCGTGGAGTCG	16	

2.7 Identificación de microRNAs provenientes de exosomas

A partir del ARN purificado de los exosomas se realizó una Stem-Loop RT-PCR (Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007). En tubos libre de nucleasas se añadieron 0,5 µl del mix 10 mM dNTP (R1121, Thermo Scientific Fisher), 11,5 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de ARN molde (50 ng/µl). Las muestras se calentaron a 65 °C durante 5 min y se incubaron en hielo durante 2 min. En seguida, a cada muestra se añadió 1 µl del iniciador específico para los microRNAs (miR-21, miR-155, miR-142 y miR-125b), 4 µl del tampón enzimático M-MuLV (New England Biolabs, USA), 2 µl de 0,1 M DTT (Affymetrix, USA), 0,1 µl de RNAsa out (40 unidades/µl) (Invitrogen) y 0,2 µl de la transcriptasa inversa M-MuLV (New England Biolabs, USA). La reacción de retrotranscripción (RT) se realizó en un volumen total de 20 µl a 16 °C durante 30 min, seguido por 60 ciclos (30 °C por 30 s, 42 °C por 30 s y 50 °C durante 1 s), finalmente se inactivó la enzima a 85 °C por 5 min. El cDNA producto de la RT se conservó a 4 °C.

La PCR se realizó con 14 µl de agua estéril, 2 µl de producto de RT, 1 µl del iniciador derecho (10 mM), 1 µl del iniciador reverso universal (10 mM), 2 µl de la mezcla maestra Taq 5X (New England Biolabs, USA). Las reacciones se amplificaron durante 30 ciclos (95 °C por 15 s, la temperatura media (Tm) por 15 s y 68 °C por 30 s). Los productos de PCR se conservaron a 4 °C. Se analizó la presencia de los miRNAs con una electroforesis en geles de agarosa al 2.5%, se visualizaron mediante el Sistema de ChemiDoc (Bio-Rad, USA).

3. RESULTADOS

En la investigación clínica la cantidad de plasma que puede adquirirse por cada paciente representa un problema cuando se trata de infantes o de pacientes graves. Como primer paso de este trabajo, se determinó que un volumen mínimo de 500 µL fué suficiente para evaluar la presencia de exosomas en todas las muestras usadas.

Una vez realizada la purificación y para confirmar la presencia, forma y distribución de tamaños de los exosomas provenientes del plasma de pacientes con retinoblastoma y de individuos sanos, las muestras fueron observadas por Cryo-TEM. En la figura 1 se muestra la forma redonda y cóncava característica de los exosomas. Encontrando dos poblaciones principales, uno con diámetros que oscilan entre 30 a 110 nm (Figura 1A) y otra con 100 a 195 nm diámetro (Figura 1B). En la micrografía se observan como lunares suspendidos

entre el espacio de la rejilla de carbón, además se distingue con facilidad la doble membrana que envuelve y da estructura a los exosomas.

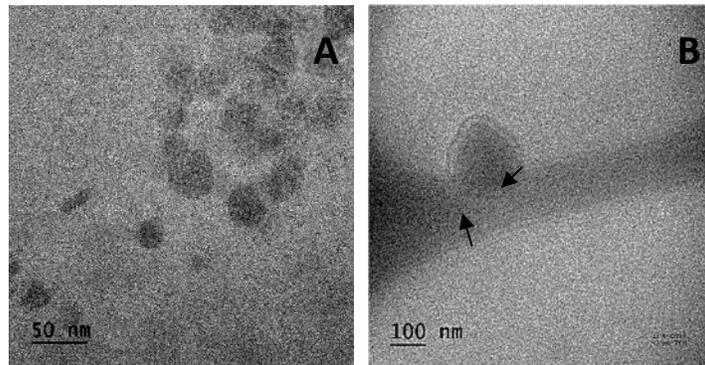


Fig. 1. Micrografías electrónicas de transmisión. Imágenes representativas que muestran la estructura y tamaños de los exosomas purificados a partir de plasma. A: Conjuntos de exosomas con tamaños de entre 39 y 113 nm. B: Exosomas con diámetros superiores a 100 nm, las flechas señalan su membrana.

Los exosomas tienen una combinación única de proteínas y lípidos que permiten su reconocimiento por parte de las células receptoras. Aprovechando la presencia de proteínas transmembranales de la familia de tetraspaninas específicas de los exosomas, es posible su identificación por medio de Western blot.

Para corroborar la identidad bioquímica de los exosomas en las figuras 2A y 2B se muestra el perfil proteico de los exosomas purificados de plasma. Para comprobar la identidad celular de los exosomas, se detectaron por inmunotransferencia los marcadores transmembranales

CD63, CD81 los cuales se ven en las figuras 2C y 2D respectivamente, en cada caso se uso un anticuerpo monoclonal para el reconocimiento primario de cada proteína. La presencia de estas proteínas confirma la integridad de los exosomas recuperados a partir de plasma de pacientes y controles.

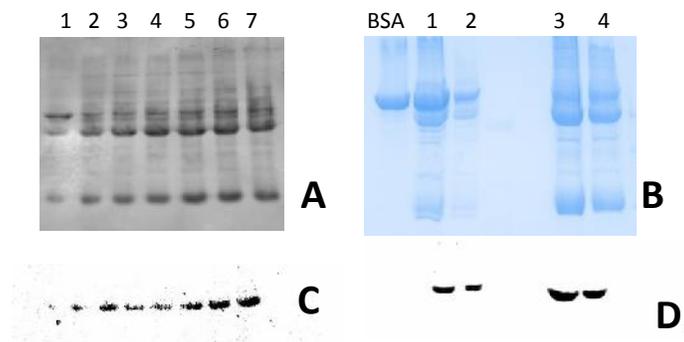


Fig. 2 Inmunotransferencia. A Perfil proteico de exosomas aislados del plasma de individuos sanos (líneas 1 al 7). B Perfil proteicos de exosomas recuperados de pacientes (líneas 1, 2), y de controles sanos (líneas 3, 4), BSA como control negativo. C) Revela la presencia de CD63 en exosomas. D) Indica la presencia de CD81 en exosomas.

Uno de los métodos más simples y rápidos para evidenciar que los exosomas llevan un mensaje es mediante la detección de microRNAs, RNAs y/o proteínas. De acuerdo a la literatura reciente sobre identificación de miRNAs en exosomas (Taylor & Gercel-Taylor, 2014), se evaluó la presencia de algunos de ellos mediante la técnica de stem-loop RT-PCR. Evaluamos la presencia de los microRNAs 21, 155, 142 y 125b. En la figura 3A y 3B se demuestra la presencia de los miR-21 y miR-142 en exosomas de pacientes y controles. El miR-155 sólo está presente en exosomas pacientes (Figura 3C) y el miR-125b está ausente en los exosomas de pacientes y controles (Figura 3D). Con lo cual se evidencia la diversidad del contenido de los exosomas provenientes de plasma de individuos con condiciones fisiológicas distintas.



Fig. 3 Gel de agarosa. Los productos de PCR de miRNAs presentes en exosomas de pacientes y controles. A) miR-21, B) miR-142, C) miR-155 y D) miR-125b. Línea 1 corresponde al marcador de peso molecular, línea 2 y 3 al producto amplificado de pacientes y controles respectivamente. Líneas 4 y 5 a los controles negativos de la reacción.

DISCUSIÓN

Se han encontrado exosomas en una amplia variedad de fluidos biológicos que incluyen orina, saliva, leche materna y plasma (An *et al.*, 2015) . Sin embargo, no se había precisado el volumen mínimo de muestra necesaria para hacer la caracterización celular y molecular de exosomas. En este trabajo se demostró que 500 μ L son suficientes para aislar una cantidad suficiente de exosomas para poder hacer su caracterización. Aunque con menor volumen es posible purificar exosomas, la obtención de estos a partir de una cantidad inferior a 500 μ L no alcanzaría para realizar las pruebas mínimas de caracterización, las cuales son al menos 1) Perfil de proteínas totales mediante SDS-PAGE, 2) Western Blot para detectar presencia de proteínas transmembranales, 3) Microscopia Electrónica para demostrar el tamaño y forma de los exosomas y, 4) Purificación de RNA para demostrar la presencia de miRNAs. Por lo tanto, con un volumen de 500 μ L es posible purificar la cantidad necesaria y suficiente para realizar todas las pruebas de caracterización bioquímica y celular.

Por otra parte, en años recientes se han empleado otras técnicas de microscopia de alta resolución e incluso la implementación de costosos equipos que permiten la cuantificación

precisa de exosomas (Wiklander *et al.*, 2015). En este trabajo, se propone la técnica de Cryo-TEM como una alternativa viable en la caracterización de los exosomas. Asimismo, sugerimos el uso del software ImageJ para el análisis cuantitativo de la distribución de tamaños. Aunque el análisis de imágenes puede hacerse con cualquier programa, la ventaja de ImageJ es que es de libre acceso y ha sido ampliamente usado para el análisis de fotomicrografías fluorescentes y de campo claro, en el estudio de tejidos por inmunohistoquímica y análisis tridimensional de imágenes (Hartig, 2013). La combinación Cryo-TEM e ImageJ nos permitió identificar poblaciones, observar estructura y morfología de exosomas de una forma rápida y precisa.

Adicionalmente al análisis microscópico, un paso clave para la caracterización de exosomas es la identificación de proteínas transmembranales, se confirmó por inmunotransferencia la identidad de los exosomas recuperados con los marcadores específicos CD63 y CD81 previamente reportados (Théry *et al.*, 2006). Estos marcadores CD63 y CD81 juegan un rol fundamental durante proceso de transporte y distribución de los exosomas, además de coadyuvar en el reconocimiento por parte de la célula receptora (Pols & Klumperman, 2009).

Los exosomas son vesículas secretadas activamente por la gran mayoría de las células humanas, estas vesículas llevan mensajes en forma de RNA, DNA y proteínas. Tal mensaje, es capaz de modificar el fenotipo de una célula receptora; así por ejemplo, se ha demostrado que en los exosomas puede viajar la señal de metástasis (Soung *et al.*, 2016). Una manera de demostrar que este mensaje esta integro en los exosomas purificados, es la identificación mediante RT-PCR de microRNAs. Nuestros resultados indican que el contenido de los exosomas provenientes de plasma de pacientes y controles, tiene diferencias cualitativas; por tanto, un trabajo futuro será realizar un ensayo exhaustivo mediante tecnologías de masivas de secuenciación para analizar la totalidad del RNA de exosomas de pacientes y controles. Con nuestras evidencias podemos sugerir que conocer el perfil completo de las moléculas transportadas por exosomas de pacientes y contrastarla con los controles respectivos, puede dar información veraz y útil en para su uso en el diagnóstico temprano de retinoblastoma.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo del proyecto CONACyT-Salud No. 201388 y SIP-IPN-20152018 para NDF. MJOR agradece a CONACyT-México y BEIFI-IPN por la beca proporcionada. Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional y el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías (CNMN) del IPN. Un especial agradecimiento al evaluador del manuscrito, sus observaciones fueron importantes para la mejora de la versión final del trabajo.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Ajit, S. K. (2012). Circulating microRNAs as biomarkers, therapeutic targets, and signaling molecules. *Sensors*, 12(12), 3359–3369. <http://doi.org/10.3390/s120303359>
- Alvarado-Castillo, B., Campos-Campos, L. E., & Villavicencio-Torres, A. (2007). Prevalencia de retinoblastoma del 2002 al 2006 en una unidad médica de alta especialidad. *Revista Mexicana de Oftalmología*, 81(6), 336–339.
- Alvarado-Castillo, B., Campos-Campos, L. E., & Villavicencio-Torres, A. (2009). Características clínicas y metastásicas en retinoblastoma. *Revista Medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 47(2), 151–156. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2009/im092h.pdf>
- American Cancer Society. (2014). *Cancer Facts & Figures 2014*. Cancer facts and figures Retrieved from <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf>
- An, T., Qin, S., Xu, Y., Tang, Y., Huang, Y., Situ, B., Zheng, L. (2015). Exosomes serve as tumour markers for personalized diagnostics owing to their important role in cancer metastasis. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(4), 27522. <http://doi.org/10.3402/jev.v4.27522>
- Conkrite, K., Sundby, M., Mukai, S., Michael Thomson, J., Mu, D., Hammond, S. M., & MacPherson, D. (2011). mir-17~92 cooperates with RB pathway mutations to promote

retinoblastoma. *Genes and Development*, 25(16), 1734–1745. <http://doi.org/10.1101/gad.17027411>

DeSantis, C. E., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Siegel, R. L., Stein, K. D., Kramer, J. L., Jemal, A. (2014). Cancer treatment and survivorship statistics , 2014. CA: A Cancer Journal of Clinicians., 64(4), 252–71. <http://doi.org/10.3322/caac.21235>.

Hartig, S. M. (2013). Basic image analysis and manipulation in ImageJ. In *Current Protocols in Molecular Biology* (pp. 1–12). <http://doi.org/10.1002/0471142727.mb1415s102>

Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Lyden, D. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 1–19. <http://doi.org/10.1038/nature15756>

Melo, S. A., Luecke, L. B., Kahlert, C., Fernandez, A. F., Gammon, S. T., Kaye, J., Kalluri, R. (2015). Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*, 523(7559), 177–182. <http://doi.org/10.1038/nature14581>

Pols, M. S., & Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental Cell Research*, 315(9), 1584–1592. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.09.020>

Ramírez-Ortiz, M. A., Ponce-Castañeda, M. V., Cabrera-Muñoz, M. L., Medina-Sansón, A., Liu, X., & Orjuela, M. A. (2014). Diagnostic delay and socio-demographic predictors of stage at diagnosis and mortality in unilateral and bilateral retinoblastoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(9), 1199–1216. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.07.011>.Innate

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics , 2015 . CA: A Cancer Journal for Clinicians, 65(1), 21254. <http://doi.org/10.3322/caac.21254>.

Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Curry, W. T., & Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, 10(12), 1470–1476. <http://doi.org/10.1038/ncb1800>

Soung YH, Nguyen T, Cao H, Lee J, Chung J. (2016). Emerging roles of exosomes in cancer invasion and metastasis. *BMB Rep.* 49(1):18-25. <http://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.1.239>

Taylor, D. D., & Gercel-Taylor, C. (2014). Exosomes-Associated microRNAs as diagnostic marker. United States.

Thériault, B. L., Dimaras, H., Gallie, B. L., & Corson, T. W. (2014). The genomic

landscape of retinoblastoma: A review. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 42(1), 33–52. <http://doi.org/10.1111/ceo.12132>

Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. In *Current protocols in cell biology* / editorial board, Juan S. Bonifacino (Vol. Chapter 3, p. Unit 3.22). <http://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–659. <http://doi.org/10.1038/ncb1596>

Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., & Hellens, R. P. (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 3(1), 12. <http://doi.org/10.1186/1746-4811-3-12>

Wiklander, O. P. B., Nordin, J. Z., O’Loughlin, A., Gustafsson, Y., Corso, G., Mäger, I., Andaloussi, S. El. (2015). Extracellular vesicle *in vivo* biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 26316. <http://doi.org/10.3402/jev.v4.26316>

Xiao, D., Ohlendorf, J., Chen, Y., Taylor, D. D., Rai, S. N., Waigel, S., McMasters, K. M. (2012). Identifying mRNA, microRNA and protein profiles of melanoma exosomes. *PloS One*, 7(10), e46874. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0046874>