



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Efecto de exosomas tumorales de cáncer de colon en la inducción y  
expansión de linfocitos T reguladores**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Médico Alberto Chinney Herrera

TUTOR PRINCIPAL

**Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. Martha Robles Flores**  
Facultad de Medicina UNAM

**Dr. Félix Recillas Targa**  
Instituto de Fisiología Celular UNAM

Ciudad de México. Febrero, 2022.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

---

## Agradecimientos

El trabajo presentado a continuación fue posible gracias al apoyo del proyecto FOSSIS 289600 y realizado en el Laboratorio de la Dra. Gloria Soldevila Melgarejo, del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; en conjunto con el Laboratorio de la Dra. Martha Robles Flores, del Departamento de Bioquímica de Facultad de Medicina, UNAM

El alumno Alberto Chinney Herrera fue apoyado durante los estudios de maestría por beca CONACyT con el CVU Número 758111 y complementado con apoyo DGAPA.

Se agradece el apoyo del programa PAPIIT a través del proyecto IV 200220 ya que parte del financiamiento hizo posible la obtención de los datos presentados en esta tesis.

Se agradece el apoyo de financiamiento para la obtención de los datos presentados en esta tesis a través del proyecto 303070 de los Programas Nacionales Estratégicos del CONACyT (PRONACES)

Se agradece el apoyo del “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para la participación en el “XII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Inmunología. Cancún, México. 2018”

Se agradece ampliamente el apoyo técnico en la realización de experimentos a la Dra. María Cristina Castañeda Patlán. del Laboratorio de la Dra. Robles.

También se agradece su apoyo al técnico QFB. Gisela Dupont, IIB, UNAM; al M en C., Oscar Hernández Campos IIB, UNAM; y al QFB. Carlos Castellanos Barba del Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo, UNAM.

---

Se extiende el agradecimiento a mis compañero y amigos del Laboratorio por su apoyo moral y técnico en la realización de este trabajo: M en C. Jacobo Martínez Ríos, a la Dra. Cinthia López Pacheco, al M en C. Arimelek Cortés Hernández, MC Nadyeli Linares, M en C Saúl Arteaga y a la M en C Scarlett Ortega Chávez.

# Contenido

1. Agradecimientos.....	II
2. Contenido .....	IV
3. Abreviaturas .....	VI
4. Índice de Figuras.....	VII
5. Índice de Tablas.....	IX
6. Resumen .....	X
7. Introducción y Antecedentes .....	1
El cáncer de colon.....	1
Microambiente tumoral e infiltrado linfocitario: determinantes en la progresión.....	6
La respuesta inmunológica antitumoral.....	8
Linfocitos T reguladores: Funciones e implicaciones en el Cáncer de Colon.....	10
Exosomas Tumorales: Mediadores de las funciones del linfocito T en Cáncer.....	12
Efecto de los exosomas tumorales en los linfocitos T reguladores. ....	17
8. Planteamiento del Problema .....	20
9. Justificación .....	21
10. Hipótesis .....	22
11. Objetivo General .....	22
12. Objetivos Particulares .....	22
13. Material y Métodos.....	23
Estrategia Experimental .....	23
Líneas celulares de Cáncer de Colon.....	25
Cultivos 3D de Líneas tumorales.....	25
Medición de fenotipo Stem like por Citometría de Flujo.....	26
Obtención de Exosomas por Centrifugación y Exclusión molecular.....	26
Caracterización de Exosomas Tumorales.....	27
Ensayos de Cocultivos de Linfocitos T con Exosomas Tumorales. ....	28
Expansión de linfocitos T reguladores. ....	29

---

Inducción de linfocitos T reguladores.....	30
14. Resultados .....	31
Las líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y T84 forman esferoides en condiciones no adherente de cultivo. ....	31
El cultivo celular en esferoides (3D) enriquece el nicho del fenotipo stem-like (CD44+, CD24-). ....	33
Las Microvesículas provenientes de cultivos 3D (HT-29 y T84) expresan marcadores de exosomas como Alix, CD63 y CD81. ....	34
Los exosomas de las células HT29 y T84 son tomados del medio por los Linfocitos T. ....	36
Generación de Linfocitos T reguladores por exosomas de Cáncer de Colon. ....	38
Los exosomas provenientes de T84 favorecen la proliferación mas no la expresión de FoxP3 y CD25 en la expansión de linfocitos T reguladores. ....	41
15. Discusión .....	44
16. Conclusiones .....	47
17. Perspectivas .....	48
18. Referencias .....	49

---

## Abreviaturas

<b>BF</b>	Bright Field
<b>CD127</b>	Cadena $\alpha$ del receptor para interleucina 7.
<b>CD25</b>	Cadena $\alpha$ del receptor para interleucina 2
<b>CD45RA</b>	Proteína tirosina fosfatasa presente en células naive
<b>CMN</b>	Células mononucleares
<b>Exo</b>	Exosomas
<b>Exo/Cel</b>	Exosomas por célula
<b>Exo/Cel</b>	Exosomas por célula
<b>FoxP3</b>	Factor de Transcripción Forkhead Box 3
<b>MFI</b>	Mean Fluorescence Intensity
<b>NTA</b>	Nanoparticle Tracking Assay
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SFB</b>	Serum Fetal Bovine
<b>Tconv</b>	Linfocito T convencional o naive
<b>TCR</b>	T Cell Receptor
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor Beta
<b>Treg</b>	Linfocito T regulador
<b>WB</b>	Western Blot

---

## Índice de Figuras

Figura 1. Estadios del cáncer de colon de acuerdo con clasificación TNM (tumor, nodos linfáticos, metástasis) .....	2
Figura 2. Clasificación del cáncer de colon según el Consenso Molecular por subtipos. FMCpG: Fenotipo metilado de islas CpG; IC: Inestabilidad cromosómica; IM: Inestabilidad en microsatélites. Modificado de Cervena, K. et al 2020.....	3
<b>Figura 3. Estrategia Experimental.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 4 Estrategia de Aislamiento (Sorting).</b> Estrategia para aislamiento de Linfocitos T reguladores CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>Hi</sup> CD127 <sup>-</sup> y T naive o convencionales CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> , a partir de sangre periférica de donadores sanos. Equipo FACS ARIA I. Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo, IIB, UNAM. ....	29
<b>Figura 5. Cultivo de líneas de cáncer de colon en esferoides (3D).</b> <b>A)</b> Colección de células tumorales de colon y sus diferentes concentraciones iniciales de células para formación de esferoides tumorales a 7 días. <b>B)</b> Se muestra la proliferación celular de líneas HT29 y T84 en condiciones de Adherencia (2D). <b>C)</b> Se muestran el respectivo cultivo en esferoides tumorales (3D). imágenes se tomaron a un aumento 10X y 20X en microscopio invertido Olympus ( Lab Nal Cit). Correcciones: Saturación: 0% Nitidez: 50%.....	31
<b>Figura 6. Viabilidad de Cultivos 2D y 3D de líneas de Cáncer de Colon HT29 y T84.</b> <b>A)</b> Dotplot representativo de viabilidad de líneas tumorales en 2D y 3D; <b>B)</b> % de Viabilidad; Análisis por t student * p<0.05 ; ** p<0.01; de experimentos independientes por duplicado. Entre cultivos 3D HT29 y T84 no hay diferencias significativas de viabilidad. ....	32
<b>Figura 7. Enriquecimiento del fenotipo Stem like (CD44+, CD24-) en cultivos 3D.</b> <b>A.</b> Dotplot representativo de fenotipo CD44/CD24 de líneas tumorales en 2D y 3D; <b>B)</b> Ratio CD44+/CD24+; Análisis por t student * p<0.05 ; ** p<0.01; de experimentos independientes por duplicado. A mayor índice CD44/CD24, se sugiere un nicho mayor para células tumorales stem. ....	33
<b>Figura 8. Cuantificación de Microvesículas por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) en Nanosight.</b> <b>A)</b> HT-29 representativo de concentración y medidas de microvesículas purificadas y concentradas provenientes de sobrenadantes de Esferoides tumorales <b>A)</b> HT29 y <b>B)</b> T84. Representativo de tres lecturas de 30 segundos por fracción. Nanosight NS300. ....	34
<b>Figura 9. Western Blot de Lisado Celular y de Exosomas de HT29 y T84.</b> Se muestra WB para identificar marcadores de exosomas. Tetrastapaninas CD63 y CD81, así como ALIX, molécula esencial en la biogénesis del exosoma. Gel de acrilamida al 10%; 30 µg de proteína; tiempo de exposición 40s. Flecha verde. Se observa banda de Alix en peso molecular predicho de 96 KDa. Además, en lisado celular de T84, se observa una isoforma trunca de la molécula[78]. Flecha roja. Se observa banda de CD63 en peso molecular predicho de 30-60 KDa. La banda más pesada es la forma glicosilada de la proteína, característico en vesículas extracelulares provenientes de células tumorales[79]. Flecha azul. Se observa banda de CD81 en peso molecular predicho de 22-26 KDa. ....	35
<b>Figura 10. Captación de Exosomas por linfocitos T naive y T reguladores.</b> Por Citometría-Confocal se muestra <b>A)</b> Controles de tinción: ST: Sin teñir; CD4+: Solo tinción de CD4; CD4+PKH26: Tinción de CD4 y PKH26 de linfocitos; CD4+ PBS <sup>PKH26</sup> : Tinción de CD4 e incubación con PBS1x teñido con PKH26. <b>B)</b> Captación de exosomas teñidos con PKH26 por linfocitos T naive y T regulador. BF: Campo Claro. Equipo. Amnis® ImageStream®XMk I. ....	37
<b>Figura 11. Efecto de Exosomas Tumorales de Colon en la generación de Linfocitos T Reguladores.</b> <b>A)</b> Estrategia de análisis. <b>B)</b> Dotplot de expresión de CD25 y FoxP3 de T reg cultivadas con concentraciones crecientes de exosomas (2,500; 5,000; 10,000; 20,000; 40,000 /célula) <b>C)</b> Grafica de datos en Incremento Relativo (IR); superior: Números totales y % de Conversión CD25+FoxP3+; inferior: Intensidad Media de	



---

Fluorescencia (MFI) de CD25 y FoxP3. Análisis por ANOVA de 2 vías y prueba por comparaciones múltiples post hoc de Turkey. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; cada punto es promedio de duplicados de experimentos independientes.

..... 40

**Figura 12 Efecto de Exosomas Tumorales de Colon en Linfocitos T Reguladores. A) Estrategia de análisis. B) Dotplot de expresión de CD25 y FoxP3 de T reg cultivadas con concentraciones crecientes de exosomas (5,000; 10,000; 20,000; 40,000 por célula) C) Grafica de datos en Incremento Relativo (IR); superior: Números totales y % de CD25+FoxP3+; inferior: Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de CD25 y FoxP3. Análisis por ANOVA de 2 vías y prueba por comparaciones múltiples post hoc de Turkey. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; cada punto es promedio de duplicados de experimentos independientes. .... 43**

---

## Induce de Tablas

<b>Tabla 1 Efecto de los Exosomas tumorales en células estromales.....</b>	<b>15</b>
<b>Tabla 2 Efecto de exosomas Tumorales en Linfocitos T reguladores.....</b>	<b>19</b>
<b>Tabla 3. Líneas tumorales de Cáncer de Colon.....</b>	<b>25</b>

---

## Resumen

El cáncer de colon es de las principales causas de morbilidad y mortalidad por cáncer en el mundo. El infiltrado inmunológico, por linfocitos T CD3 y CD8, son un factor pronóstico positivo; sin embargo, no es concluyente el efecto de subpoblaciones de linfocitos T CD3, como los T reguladores, que son importantes en la inhibición de la respuesta antitumoral. La interacción entre células tumorales y linfocitos modula la respuesta pro o antitumoral, y los mecanismos intercelulares que la determinan, son objeto de estudio actualmente. La producción de microvesículas extracelulares por las células tumorales, es un novedoso mecanismo de interacción con células no tumorales. Entre las microvesículas tumorales están los exosomas, los cuales están involucrados en el favorecimiento de la metástasis órgano específica e inducción de angiogénesis; en el caso de los linfocitos T y otras células del sistema inmune, su efecto es controversial.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* el efecto de los exosomas producidos por líneas tumorales de colon, en la inducción y expansión de linfocitos T reguladores. Para el abordaje, se generaron cultivos 3D o esferoides de células de cáncer de colon No-metastásico (HT29) y Metastásico (T84). A partir de los sobrenadantes de estos cultivos, se purificaron, cuantificaron y caracterizaron a los exosomas liberados por las células, mediante exclusión por tamaño, *Nano Tracking Assay* y *Western Blot*, respectivamente. Mediante Citometría-Confocal, se evaluó la interacción de los exosomas con los linfocitos T. Finalmente, las microvesículas se cocultivaron con linfocitos T reguladores en un modelo *in vitro* de inducción, a partir de linfocitos T *Naive*; y expansión, a partir de linfocitos T reguladores naturales.

Como resultados, los cultivos 3D fueron homogéneos en viabilidad y favorecieron el enriquecimiento del fenotipo *Stem-like* (*ratio* CD44+/CD24+). Los exosomas obtenidos de sobrenadantes de HT29 tuvieron un diámetro promedio de 129.7 nm, y los provenientes de T84 125.6nm; por WB se evaluaron los marcadores en los exosomas provenientes de HT29, los cuales expresaron ALIX, CD63 y CD81,

---

mientras que los de las T84 solo expresaron ALIX y CD63. Por citometría-confocal, se evidenció cualitativamente la interacción entre exosomas-Linfocitos T (*naive* y reguladores). Mediante los Co-Cocultivos de Exosomas con linfocitos T, se observó que los exosomas de T84 aumentaron significativamente la inducción de linfocitos CD25+FoxP3+, así como la expresión (MFI) de FoxP3, en concentraciones de 40,000 exo/cel y la expresión de CD25 en la concentración de 10,000 exo/cel. Los provenientes de HT-29, solo aumentaron la expresión de FoxP3 en la concentración más alta. Por otro lado, en la expansión, únicamente las microvesículas de las T84, en alta concentración, aumentaron la proporción de la población CD25FoxP3+. Se puede concluir que los exosomas tumorales, son heterogéneos, dependiendo de la célula que los origina, en este caso, se comparó una línea metastásica y una no metastásica. Estos exosomas modifican el fenotipo de linfocitos T reguladores inducidos, en los que aumenta la proporción de linfocitos convertidos a reguladores; mientras que, en los T reg naturales, solo los exosomas tumorales de la línea maligna inducen un efecto en estas células. Como perspectiva, se requieren ensayos de supresión, migración o producción de citocinas para evidenciar el efecto funcional de estos exosomas en los linfocitos T reguladores.

## Introducción y Antecedentes

### El cáncer de colon

#### *Epidemiología.*

El cáncer de colon (CaCo) es la tercera causa de morbilidad por cáncer en humanos en México y el mundo, la incidencia en hombres y mujeres es en proporción 1.5:1, de la misma forma la mortalidad es 25% menor en mujeres [1, 2]; es una patología heterogénea caracterizada por la generación de tejido neoplásico a partir del epitelio de la mucosa (adenocarcinoma) del intestino grueso. Existen diferentes clasificaciones para esta enfermedad:

a) **TNM (tumor, nodos linfáticos, metástasis):** Esta clasificación es la más ampliamente utilizada por las guías médicas internacionales para el diagnóstico, tratamiento y pronóstico del CaCo. Considera la localización del tumor, la cual puede ser en el colon proximal (derecho), distal (izquierdo), o en el recto; la infiltración neoplásica a nódulos linfáticos; y la presencia de metástasis (desarrollo de esta neoplasia en otros órganos) [3]. Con estos parámetros se pueden identificar cuatro diferentes estadios con subetapas que permiten determinar la secuencia del tratamiento para los pacientes. **Figura 1.**

- *Estadio 0:* el cáncer se encuentra in situ, es decir, está limitado a la mucosa.
- *Estadio I:* el cáncer atraviesa la mucosa e invade la capa muscular sin llegar a otros tejidos, ni ganglios.
- *Estadio II:* esta etapa va desde la diseminación en las capas musculares del intestino hasta invasión de peritoneo y/o tejido circunscrito al intestino, sin diseminación a ganglios.
- *Estadio III:* además del tumor en la mucosa intestinal, hay infiltración de las capas musculares, tejido periférico al intestino, de ganglios, sin presencia en otros órganos.
- *Estadio IV:* cualquiera de las etapas anteriores con presencia de metástasis.

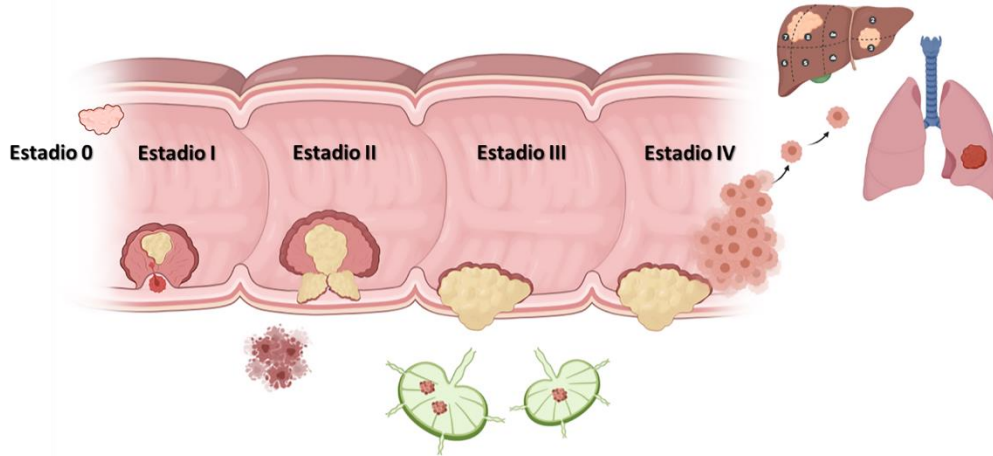


Figura 1. Estadios del cáncer de colon de acuerdo con clasificación TNM (tumor, nodos linfáticos, metástasis)

b) **Expresión genética:** Inicialmente se buscó establecer una asociación entre la supervivencia de los pacientes y alteraciones genéticas, desde mutaciones específicas en KRAS, BRAS, hasta otras modificaciones más complejas como la inestabilidad cromosómica, la inestabilidad en microsatélites o los patrones de metilación determinados. Sin embargo, desde 2015 [4] se ha propuesto un consenso molecular para clasificar de manera integral a los pacientes, no solo considerando las alteraciones mencionadas, además se pueden identificar la expresión de genes asociados a vías metabólicas o relacionadas a subpoblaciones específicas de cada subtipo de tumor, por lo que para el establecimiento de este consenso se analizó la información genética de los tumores de 4151 pacientes [4, 5]. A continuación, se describen los subgrupos de esta clasificación. **Figura 2.**

- **CMS1 (Consenso molecular subtipo 1):** representa ~14% de los casos de CaCo, predomina la inestabilidad en microsatélites, expresión de genes asociados a la respuesta inmunológica.
- **CMS2 (Consenso molecular subtipo 2):** también conocido como canónico, representa ~ 37% de los casos, muestra sobre expresión de genes de origen epitelial, y genes asociados a la activación de la vía WNT y MYC.

- **CMS3 (Consenso molecular subtipo 3):** conocido como metabólico, representa ~13% de casos, evidencia desregulación metabólica, así como sobreexpresión de genes epiteliales.
- **CMS4 (Consenso molecular subtipo 4):** o mesenquimal, ~23% de casos, predominante en expresión de TGF- $\beta$ , genes asociados a la invasión del estroma y angiogénesis.

De forma interesante, algunos pacientes evaluados para realizar esta clasificación muestran un perfil intermedio entre uno y otro consenso, lo que se interpreta como una posible fase de transición entre un grupo y otro. Aunque la clasificación molecular tiene por objetivo ayudar a delinear la conducta terapéutica, sigue siendo controversial su aplicación práctica debido, en parte, al considerable costo de realizar este análisis y a la falta de convenio entre los diferentes tratamientos disponibles.


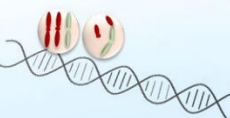
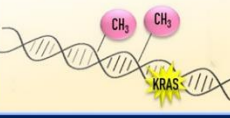

Subtipo	Incidencia	Características moleculares	Localización	Otras características
CMS1 Subtipo IMS o inmunológico	14 %	 <b>FMCPG:</b> Alto <b>IC:</b> Bajo <b>IM:</b> Alto	Colon Proximal (derecho)	↑ Expresión de genes asociados a infiltrado inmunológico y reparación de DNA. Mal pronóstico después de recaídas de la enfermedad. Hipermutaciones.
CMS2 Subtipo canónico	37 %	 <b>FMCPG:</b> Negativo <b>IC:</b> Alto <b>IM:</b> estable	Colon distal (izquierdo) + Recto	Expresión de genes asociados a la diferenciación epitelial, activación de WNT y MYC
CMS3 Subtipo metabólico	13 %	 <b>FMCPG:</b> Bajo <b>IC:</b> Bajo <b>IM:</b> Estable <b>Mutación:</b> KRAS	Colon (localización inespecífica)	Desregulación metabólica
CMS4 Subtipo mesenquimal	23 %	 <b>FMCPG:</b> Negativo <b>IC:</b> Alto <b>IM:</b> Estable	Colon distal (izquierdo) + Recto	↑TGF- $\beta$ , Genes asociados a la transformación epitelio mesénquima, angiogénesis. Peor sobrevida global y mal pronóstico posterior a recaídas.

Figura 2. Clasificación del cáncer de colon según el Consenso Molecular por subtipos. FMCPG: Fenotipo metilado de islas CpG; IC: Inestabilidad cromosómica; IM: Inestabilidad en microsatélites. Modificado de Cervena, K. et al 2020

---

c) **Infiltrado inmunológico:** En el consenso mencionado antes, se realizó una observación significativa, el CMS1 que se asocia a una respuesta inmunológica activa (no se determina si es antitumoral o no) tiene un mejor pronóstico respecto al CMS4, en el que predomina la expresión de TGF $\beta$  y la supervivencia global es la más baja respecto al resto de subtipos. Sin embargo, cuando el paciente recibe tratamiento inicial para reducir o remover el tumor y posteriormente reaparece el mismo (recaída), en grupos comparables, el CMS1 tiene peor pronóstico que el CMS4. Esto coincide con una línea de investigación paralela, desarrollada desde 2006, en la que se asocia el tipo de infiltrado de linfocitos T con el pronóstico del paciente y se conoce como Inmunoscore, el cual fue validado como un consenso internacional para la clasificación del CaCo.

La supervivencia de un paciente con CaCo se puede estimar con métodos estadísticos como el de Ederer I, II o el de estimación de Hakulinen, con los que se analiza de manera retrospectiva, la supervivencia estratificada por tiempo de vida y por edad [6]. Conocer la información anterior permite establecer intervenciones terapéuticas para cada grupo de pacientes, así como el establecimiento de los puntos de corte para determinar la supervivencia relativa en cada persona. De acuerdo con las guías de tratamiento del CaCo como la NCCN y ASCO, la probabilidad de que un paciente viva 5 años, a partir del diagnóstico de CaCo, es de ~ 65%. Esta supervivencia a 5 años puede variar entre el 90 y el 50%, dependiendo de la etapa inicial de la enfermedad, el tipo histológico de cáncer y otras variables clínicas [7, 8].

#### *Tratamiento del cáncer de colon y sus limitaciones.*

El tratamiento del cáncer de colon está directamente relacionado con el estado de desarrollo de la enfermedad al momento del diagnóstico. En etapas tempranas (Estadio 0 y 1) el tratamiento es predominantemente quirúrgico; en etapas localmente avanzadas y avanzadas (Estadio 2 a 3), además de la cirugía, se considera el uso de quimioterapia neoadyuvante (antes de la cirugía) o adyuvante (después de la cirugía) con antimetabolitos como 5-fluorouracilo o capecitabina, adicionalmente se puede utilizar radioterapia localizada en la región del tumor. En etapa metastásica (Estadio 4), la estrategia de tratamiento dependerá del progreso



---

de la enfermedad, principalmente incluye técnicas no invasivas puesto que no se ha observado beneficio en sobrevida y calidad de vida respecto a las medidas quirúrgicas [9, 10].

Respecto al uso de quimioterapia, existen diferentes esquemas de uso combinado. Hasta la fecha se encuentran en discusión la prescripción más eficiente y segura para esta enfermedad, por los efectos adversos en intestino, sistema nervioso, corazón, hígado y riñón, así como la probabilidad de inducir resistencia farmacológica [11, 12]. En el caso de la radioterapia, además de ser controversial el momento más adecuado para su aplicación, presenta efectos secundarios como la inducción de dolor crónico, trastornos de motilidad, así como pérdida de función del intestino [13]. Como alternativas de tratamientos más recientes y dirigidos a los procesos específicos de la progresión tumoral contamos con el uso de anticuerpos monoclonales, también conocidos como medicamentos biológicos. Existen 3 principales grupos de biológicos para esta enfermedad: a) los inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico anti-EGFR (Cetuximab, panitumumab), un receptor que promueve la proliferación celular y se sobre- expresa en CaCo [14, 15], este biológico tiene la desventaja de no mejorar la sobrevida en pacientes cuando su tumor presenta mutaciones en KRAS, NRAS o BRAF, para evitar esta situación se requiere hacer una selección muy específica de pacientes sin las mutaciones mencionadas [16]. También existen los anticuerpos antiangiogénicos Anti-VEGF (bevacizumab, ramucirumab), que reducen la proliferación tumoral por inhibición de la neovascularización; sin embargo, en cohortes recientes de pacientes se ha identificado que hasta un 15% de los pacientes con esta enfermedad son resistentes a este tratamiento o que no mejoran su sobrevida respecto al tratamiento convencional. Un tercer grupo, son los anticuerpos inhibidores de puntos de regulación del sistema inmune, anti-CTLA4 y anti-PD1 (ipilimumab, pembrolizumab), estos biológicos tiene por objetivo favorecer la respuesta antitumoral de los linfocitos T, al igual que con los anticuerpos anti-VEGF y anti-EGFR, se requieren estudios prospectivos para determinar en las mejores condiciones de aplicación (dosis/frecuencia) para estas opciones terapéuticas.

---

## Microambiente tumoral e infiltrado linfocitario: determinantes en la progresión

### *El cáncer como proceso biológico*

El cáncer, microscópicamente, implica la aparición de células transformadas o neoplásicas, las cuales acumulan mutaciones genéticas que promueven, entre otras funciones celulares: a) aumento de la proliferación celular; b) atenuación de señales inhibitorias del desarrollo celular; c) resistencia a la apoptosis; d) modificación de su metabolismo celular (de aerobio a anaerobio); e) ganancia de funciones: transición epitelio-mesénquima, inducción de inflamación (p.ej. por citocinas, DAMPs), de angiogénesis y del fenotipo tipo troncal (*stem-like*) en células tumorales[17].

Las alteraciones celulares mencionadas conducen a un fenómeno llamado heterogeneidad clonal, es decir se generan grupos de células con fenotipos y genotipos variados que coexisten en el tumor, y entre los cuales, las diferentes mutaciones brindan desde ventajas metabólicas hasta resistencia a la apoptosis para continuar su proliferación. Algunos autores han propuesto lo anterior como un proceso microevolutivo [17-19] ya que estas células neoplásicas, además de acumular mutaciones, se logran asociar a células estromales e inmunológicas por: contacto directo, modificación del estroma (p. ej. acidificación del medio, aumento de colágeno tipo I) y por producción de factores solubles como factores de crecimiento, citocinas, microvesículas y otras. Lo anterior, favorece la división de funciones como la transformación de leucocitos, fibroblastos y adipocitos del tejido asociado al tumor, generando un tejido nuevo, adaptable y con capacidad de generar migración específica de las células cancerosas del sitio primario a otros órganos (proceso metastásico) [20].

---

### *Microambiente tumoral*

Actualmente el cáncer se concibe como un “nuevo tejido” o una forma de organización tisular y a su composición se le denomina el microambiente tumoral. Los elementos que forman el microambiente tumoral son: a) Células tumorales; b) Células estromales; c) Matriz extracelular d) Células del sistema inmune; e) Moléculas solubles [20].

### *Infiltrado Inmunológico en cáncer.*

El infiltrado de células inmunológicas es de interés en el cáncer por su doble participación en el proceso tumoral, participa tanto en la progresión como en la respuesta antitumoral; en diferentes enfermedades como el cáncer de mama, de pulmón y de colon, se ha podido establecer una relación entre el tipo de infiltrado celular inmunológico y la sobrevida de los pacientes. En especial se han asociado un mejor pronóstico con la presencia de linfocitos T citotóxicos, como los CD8 intratumorales, sin embargo, el infiltrado tumoral es complejo y se encuentran otras poblaciones leucocitarias como linfocitos T CD4 efectores, T reguladores, *Natural Killer* (NK), Macrófagos y granulocitos. Recientemente, por análisis de secuenciación de célula única, de las diferentes poblaciones celulares del infiltrado inmunológico en distintos tipos de cáncer, se reconocieron perfiles de infiltrado celular que permite la progresión tumoral, entre los que tenemos: el enriquecimiento de macrófagos tipo M2, aumento de linfocitos T reguladores y de células supresoras derivadas de precursores mieloides, así como la persistencia de linfocitos Th2 Th17 y disminución de infiltrado de linfocitos CD8, NK y Th1. Aun no se conoce a profundidad la cinética de infiltración de los tumores en todos los tipos de enfermedad, puesto que depende de las características específicas del tejido en el cual se origina el tumor. Además, se desconocen las características del microambiente tumoral que permitan el enriquecimiento o no de las poblaciones celulares mencionadas, en alguna localización tumoral en particular. Por ejemplo, en cáncer de mama existen tanto macrófagos M1 como M2, los primeros se localizan en la parte peritumoral y los segundos hacia el centro del tumor; en este mismo tipo de patología, se ha identificado la infiltración de linfocitos que expresan un determinado perfil de receptores de quimiocinas y que son reclutados a localizaciones específicas del

---

---

tumor y que en algunos casos se asocian al pronóstico de la enfermedad [20], esto se traduce en que el microambiente tumoral no es solo de sostén, si no que modula al tejido extratumoral, incluyendo a los leucocitos infiltrantes del tumor, para favorecer la progresión de la enfermedad [20, 21].

En 2018, en el banco de tumores TCGA (The Cancer Genome Atlas) [22] se estudió la firma inmunológica de 10,000 tumores de diferentes orígenes tisulares (33 tipos), identificando 6 principales grupos de respuestas inmunológicas: a) *Similar a cicatrización de herida*: Como el cáncer de colon, de pulmón y de cáncer de mama, se encuentra elevada la expresión de genes asociados a angiogénesis y aumento de linfocitos Th2; b) *Con predominio en expresión de genes asociados a IFN*: como cáncer gástrico, de ovario, hepático y cervical, predomina una alta proporción de macrófagos M2/M2, alta señalización de CD8 y gran diversidad de repertorio de TCR; c) *Inflamatoria*: como cáncer de próstata, páncreas y tiroides, se encuentra elevada la expresión de genes Th17 y Th1, la proliferación tumoral es baja o moderada, así como baja aneuploidía y alteraciones somáticas; d) *Depletada en linfocitos*: como cáncer hepático, adrenocortical y feocromocitoma, con una firma enriquecida en genes Th1 suprimidos y una alta respuesta de macrófagos M2; e) *Inmunológicamente atenuada*: como los gliomas, también exhiben baja infiltración de linfocitos y alta de macrófagos M2 y baja proliferación tumoral; f) *Dominante en TGFβ*: un pequeño grupo de tumores mixtos sin predominio de alguno en particular, expresan una marcada firma de genes asociados a TGFβ y alto infiltrado de linfocitos Th 1 y 2.

La respuesta inmunológica antitumoral.

*Inmunovigilancia e Inmunoedición.*

La teoría de la inmunovigilancia, descrita desde la década de 1960 por Mac Burnet y Thomas Lewis, plantea que el sistema inmune constantemente censa la aparición de tejido neoplásico y lo puede eliminar con facilidad mediante leucocitos, posteriormente se describió la importante contribución de los linfocitos CD8 y NK en la respuesta antitumoral. Lo anterior, se demostró con el rechazo de células neoplásicas que se implantaban en ratones inmunocompetentes; además de una

---

---

mejor eliminación tumoral cuando se agregaban compuestos inmunogénicos como toxinas, a los implantes tumorales en ratones [23]. Lo que no se explicaba era por qué no en todos los casos de xenoimplantes el rechazo era efectivo, y en otros casos la inflamación inducía mayor proliferación tumoral. Más recientemente, a principios de los 2000, se comparó el rechazo de implante de células malignas provenientes de ratones inmunocompetentes o inmunodeficientes con cáncer y de forma muy interesante se observó que las células cancerosas provenientes de ratones inmunodeficientes eran más susceptibles a la eliminación que aquellas que provenían de ratones inmunocompetentes [24, 25]. Esto sugirió que el sistema inmune debería mediar la progresión tumoral y que posiblemente había una transición entre su rol antitumoral y su participación en la progresión puesto que, en los experimentos descritos previamente, se observaría mayor rechazo tumoral, cuando las células neoplásicas de ratones inmunodeficientes eran transferidas a un ratón inmunocompetente y posteriormente a un tercer ratón receptor. Lo anterior se planteó como la teoría de la Inmunoedición, la cual considera que la respuesta antitumoral se caracteriza por infiltración de linfocitos citotóxicos y células fagocíticas como macrófagos M1. Los linfocitos citotóxicos participan en una primera fase, conocida como de Eliminación; sin embargo, las células tumorales logran inducir tolerancia, por factores solubles como citocinas y por células como los linfocitos T reguladores, estableciendo una fase de Equilibrio entre el sistema inmune y el tumor. Finalmente, las células tumorales desarrollan funciones como la transición epitelio-mesénquima y la expresión de receptores para quimiocinas, para lograr migrar a un órgano de forma específica, también llamada fase de Escape [23, 26, 27].

El infiltrado leucocitario en el cáncer es variable de acuerdo con el tejido donde se origina el tumor, a la heterogeneidad clonal y a la antigenicidad, entre otras características. En específico, el infiltrado linfocitario tumoral (ILT) es crucial para la progresión o remisión de la enfermedad. En pacientes con cáncer de colon existe una correlación entre mayor sobrevida y un ILT enriquecido en linfocitos CD8 (*Inmunoscore*) [28-31]. No se comprenden todos los mecanismos por los que existe la diferencia de infiltrado de estas células y de otros linfocitos citotóxicos, entre los

---

diferentes grupos tumorales; sin embargo, los linfocitos T reguladores son mediadores importantes de este grupo celular [32, 33].

Linfocitos T reguladores: Funciones e implicaciones en el Cáncer de Colon.

*Origen y función de los linfocitos T reguladores.*

Existen diversas subpoblaciones de leucocitos reguladores, entre ellos los linfocitos T reguladores, que los podemos dividir de acuerdo con su origen. Existen los linfocitos T reguladores Tímicos, Centrales o Naturales (nTreg), lo cuales se generan en el timo. Son linfocitos que sobreviven el punto de control de la selección negativa e inducen establemente el fenotipo CD25+ FoxP3+[34]. Una vez que son generados, migran a los órganos linfoides secundarios y/o a tejidos específicos de acuerdo con la expresión de integrinas; por ejemplo, la expresión de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  y del receptor de quimiocinas CCR9, inducen una migración específica (*homing*) a intestino. También existen los Treg inducidos (iTreg); estos linfocitos surgen a partir de T *naïve* o T convencionales que posterior a su migración del Timo a periferia (órganos linfoides secundarios como bazo o ganglio, o tejido específico), son diferenciados por estímulos del microambiente (IL2 en altas concentraciones, TGF $\beta$  y Ácido Retinoico, entre otros) y estimulados vía CTLA4 por una Célula Presentadora de Antígeno (APC). Esta estimulación induce la expresión del fenotipo CD25+ FoxP3+ que, a diferencia de los T reguladores centrales, es una expresión menos estable y dependiente de la persistencia de las señales del microambiente que las induce. Un aspecto importante de los linfocitos T reguladores, es la especificidad de su TCR o lo que se conoce como repertorio antigénico de reconocimiento. Algunos grupos de investigación sugieren que los repertorios de reconocimiento antigénico entre los iTreg y los nTreg son diferentes, mientras que hay más evidencia que sugiere que se traslapan [35]. Existen otras poblaciones de linfocitos reguladores que no expresan el marcador FoxP3 como los Tr1, que son linfocitos muy importantes en el mantenimiento de la tolerancia de la mucosa intestinal, los cuales no se abordarán en este trabajo por tratarse de una población de células naturales diferentes a los Treg FoxP3+[36, 37].

---

### *Diversidad de los linfocitos T reguladores en Intestino.*

En el intestino, al ser uno de los órganos que más se expone a antígenos del exterior, es muy importante mantener la tolerancia por parte de la respuesta inmune, razón por la cual es uno de los principales sitios con presencia de linfocitos T reguladores. Al mismo tiempo se requiere tener otros subtipos de linfocitos T para mantener la protección y restricción a microorganismos de la microbiota fisiológica y patológica. Lo anterior se traduce en un muy heterogéneo infiltrado de linfocitos T. Se ha descrito que en porciones proximales del intestino, como el duodeno e íleon, predominan la presencia de los linfocitos T reguladores inducidos FoxP3<sup>+</sup> RORYT<sup>-</sup> (~40% en intestino delgado ; ~10% en intestino grueso; porcentaje de las T reg infiltrantes) que reconocen antígenos de la dieta, mientras que en porciones más distales, como la porción inicial del intestino grueso, predomina la presencia de linfocitos T reguladores inducidos FoxP3<sup>+</sup> RORYT<sup>+</sup> (~35% en intestino delgado; ~65% en intestino grueso; porcentaje de las Treg infiltrantes) que reconocen antígenos de la microbiota. A lo largo del colon, los nTreg son una población menos abundante (~20% en intestino delgado; ~15% en intestino grueso; porcentaje de las T reg infiltrantes) [38]. Los mecanismos por los que se mantiene la tolerancia son similares: mediadores solubles: producción de citocinas anti-inflamatorias como IL10, IL35, TGFβ, Gramzimas, producción de adenosina por ectoenzimas (CD39/73), entre otros; y señales de contacto: expresión de PD1, CTLA4 GITR y LAG3, entre otros. Sin embargo, los linfocitos Treg inducidos dependen de que el microambiente no favorezca otra población Th, como en el caso de los Th17 que también expresan el factor de transcripción RORYT<sup>+</sup> y se inducen en presencia de TGFβ, como los iTreg, con la diferencia de que los Th17 requieren del estímulo adicional de IL6. Esto ilustra que no solo es cuestión de tener la infiltración por linfocitos Treg, además debe existir el microambiente que favorezca este fenotipo [39]. Cabe señalar que esta heterogeneidad de infiltrado linfocitario podría ser parte de la explicación de la progresión diferencial del CCR, cuando se presenta en el colon derecho o izquierdo, como se mencionó en la epidemiología de esta enfermedad (el CCR derecho o proximal es de peor pronóstico)[3].

---

### *El cáncer de colon y los linfocitos T reguladores.*

Como se mencionó, en el cáncer de colon es fundamental el tipo de Infiltrado linfocitario, parecería plausible que los linfocitos reguladores fueran los responsables de favorecer la transición de la respuesta antitumoral a la pro tumoral, ya que algunos trabajos muestran que la expresión de FoxP3 y/o los T reguladores en CCR se relaciona con un peor pronóstico [40, 41]. Otros estudios proponen el fenómeno contrario, mediante la inhibición del proceso inflamatorio que favorece la proliferación de células tumorales [42]. Para comprender esta paradoja es importante recordar que también se ha reportado que la expresión de FoxP3 puede ser “ectópica”, es decir, se puede expresar en células tumorales y a pesar de haber una explicación o función derivada de la expresión de esta molécula en las células tumorales, se ha podido correlacionar con un mal pronóstico en los pacientes [43]. Por otro lado, la expresión de FoxP3 puede estar presente, pero en baja intensidad. En la población de T reguladores infiltrantes de tumor, se ha identificado una población Treg FoxP3<sup>lo</sup> inducida, probablemente, por un microambiente con citocinas pro-inflamatorias como IL12, que en combinación con TGFβ da como producto un infiltrado de linfocitos Treg no supresores, que se relaciona con una peor sobrevida del paciente con CCR [44].

### **Exosomas Tumorales: Mediadores de las funciones del linfocito T en Cáncer.**

#### *Biogénesis y función de los exosomas: un mecanismo de comunicación intercelular*

Los exosomas son vesículas extracelulares con doble membrana lipídica de entre 50-150 nm de diámetro. La biogénesis de estas vesículas ocurre a partir de la porción intraluminal del endosoma, que se procesa hasta convertirse en el cuerpo multivesicular y posteriormente en microvesículas, entre ellas los exosomas [45, 46].

La membrana endosomal, está enriquecida en ceramidas y proteínas del complejo ESCRT 0 y I (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) que forman microdominios de membrana con proteínas ubiquitinadas. Los complejos ESCRT



---

colaboran en la integración de los elementos que contendrá el exosoma y que pueden ser de un origen diverso: a) proteico como citocinas, factores de transcripción y moléculas de señalización; b) material genético: micro RNA y otros RNA no codificantes. Existe un mecanismo de cargo independiente (aunque no excluyente) de ESCRT, en el que participan las tetraspaninas como CD63, CD81 y CD9, que realizan una función parecida a ESCRT I, delimitan la membrana y acarrear el contenido de la vesícula. Las tetraspaninas han funcionado como marcadores distintivos de los exosomas, es probable que exista heterogeneidad en la expresión de estas moléculas en la superficie del exosoma y esto se pueda relacionar a su tipo de contenido. El complejo ESCRT II y III, junto con moléculas accesorias como ALIX, TSG101 y Flotillina, realizan la escisión de la membrana endosomal, protegen la membrana de daños y dan la forma final al exosoma durante la maduración del cuerpo multivesicular, para finalmente ser transportadas a la membrana celular que las liberará al intersticio [46-49].

Una vez liberados los exosomas al exterior celular, estas vesículas se difunden y pueden ser captadas por diversas células, lo que complica el estudio de sus efectos. Entre los principales mecanismos de captación se han identificado los siguientes: a) por fagocitosis; b) fusión membranal; y c) mediada por receptores específicos como integrinas. En general, los exosomas tienen una función en la comunicación intercelular, puesto que el contenido varía de acuerdo al estado transcripcional de la célula que lo produce; por ejemplo, células expuestas a hipoxia producen exosomas que favorecen la migración de células endoteliales y subsecuentemente, la producción de moléculas pro-angiogénicas [48].

---

### *Rol de los exosomas en cáncer*

En cáncer, los exosomas tienen una participación relevante en la progresión tumoral como se refiere en la *Tabla 1*, debido a que regulan procesos celulares como la transición epitelio-mesénquima y la migración dirigida de las células tumorales. En otros casos particulares como en el cáncer de mama, se han demostrado que sus exosomas tienen tropismo órgano-específico como al Hígado o Pulmón (mediado por integrinas), que son sitios a donde posteriormente se favorecerá la infiltración de células tumorales (metástasis) [50]. En otros estudios, hay evidencia de que la intensidad con la que los exosomas inducen ciertos fenómenos como la migración, está relacionada con la malignidad de las células tumorales de las que provienen, así los exosomas derivados de células más agresivas o metastásicas inducen mayores cambios respecto a los que provienen de células no metastásicas.

<i>Origen de los exosomas tumorales</i>	Proceso tumoral	Célula blanco	Mecanismos identificados	Referencia
<i>Cáncer de Vejiga</i>	<b>Transición Epitelio-Mesénquima</b>	Uroepitelio	Disminución de E-Cadherina y translocación de $\beta$ -Catetina. Transferencia de miRNA 99a y 137	[51, 52]
<i>Cáncer de colon</i>		HUVEC (Células endoteliales no tumorales)	Activación de vía RhoA/Rock	[53]
<i>Cáncer de pulmón</i>		HBEC (Células epiteliales bronquiales)	Expresión de Vimentina	[54]
<i>Cáncer hepático</i>		MHCC97H	Activación de Rab27a/MAPK/ERK	[55]
<i>Cáncer de pulmón</i>	<b>Invasión</b>	16HBE	Transferencia de miRNA 200, miRNA 10a	[56]
<i>Cáncer de mama</i>		MCF7; MDA-MB-231	Sobre expresión de Rab27b. Disminución de adherencia por miRNA 105	[57]
<i>Cáncer de próstata</i>		Fibroblastos	Disminución de E-Cadherina. Aumento de $\alpha$ -SMA	[58]
<i>Cáncer Hepático</i>	<b>Metástasis órgano específica</b>	HUVEC	Expresión de integrinas vía SMAD3	[59]
<i>Cáncer Gástrico</i>		SGC7901	Sobre expresión de HGF y c-Met por transferencia de miR-26	[60]

**Tabla 1** Efecto de los Exosomas tumorales en células estromales.

---

En el caso del efecto de los exosomas en células estromales, también se tiene información sobre el reclutamiento o inducción de fenotipos de las células asociadas al tumor como los fibroblastos, los adipocitos y por supuesto las células del sistema inmune, como macrófagos, y linfocitos T. En los linfocitos T CD8, los exosomas tumorales suelen inducir apoptosis [61], mientras que en los linfocitos T reguladores favorecen su expansión y/o promueven la expresión de marcadores asociados a su función supresora [62]; sin embargo, en el cáncer de colon este es un efecto poco estudiado a pesar de ser una de las localizaciones con mayor densidad de estos leucocitos [63].

Entre los elementos contenidos en los exosomas, están los micro RNA (miRNA), que son secuencias cortas de RNA de 19-24 nucleótidos no codificantes y tienen principalmente una función reguladora de la expresión de los RNAs codificantes. Además del tamaño, una diferencia entre el RNA mensajero y los miRNAs, es que estos últimos son resistentes a cambios de pH, temperatura, incluso radiación UV, por lo que pueden ser transportados al intersticio sin degradarse. Al estar contenidos en microvesículas, se convierten en un mecanismo de comunicación y regulación celular que la farmacología convencional no considera como blanco terapéutico de manera rutinaria [64, 65].

En el cáncer de colon se han caracterizado algunos miRNAs asociados a distintas etapas de la enfermedad como miR-10a, miR-17, miR 155, entre otros [66-68]; sin embargo, no se han documentado a detalle los mecanismos que desencadenan la sobre-expresión de estos miRNAs, así como su efecto puntual en la función de los leucocitos específicos como los linfocitos T reguladores y el rol que podrían desarrollar durante la progresión tumoral. Se ha estudiado *in vitro*, que la respuesta de las células tumorales a hipoxia, citocinas inflamatorias, o las condiciones de cultivo (en adherencia o suspensión), podría modular el perfil de los miRNAs y de otras biomoléculas encontrados al interior de los exosomas que producen, por ejemplo, en células tumorales de pulmón, al exponerse a condiciones de hipoxia en cultivo, el contenido de mir23-a (miRNA inductor de angiogénesis) en los exosomas producidos aumenta [69]; los exosomas de células de glioblastoma muestran mayor

---

inducción de angiogénesis al cultivarse en hipoxia o cultivos 3D [70]. Como antecedente en nuestro laboratorio, se observó un mayor efecto angiogénico provocado por los exosomas de cáncer de mama, cuando se obtienen de cultivos 3D o esferoides, con respecto a su cultivo en adherencia (manuscrito en proceso de publicación).

Por la importancia de estos últimos antecedentes, se plantea utilizar cultivos 3D para el estudio de los exosomas, puesto que hay evidencia que muestra un comportamiento celular con más similitudes a un modelo *in vivo* que los clásicos cultivos en adherencia y que podrían modificar el contenido de los exosomas y por tanto su función; principalmente existen 3 aspectos importantes: 1) Existe un gradiente tanto de nutrientes como de oxígeno. 2) Los cultivos 3D tiene una polarización celular más típica de un tumor *in vivo*, secundaria a la producción de matriz extracelular y al tipo de uniones intercelulares establecidas en el esferoide. 3) El enriquecimiento del transcriptoma expresado por las células cuando se cultivan en modelos 3D [71-73] .

### Efecto de los exosomas tumorales en los linfocitos T reguladores.

La evidencia anterior, contrasta los diferentes efectos de los exosomas tumorales sobre diversos tipos celulares. Otro factor importante es la capacidad de captación de microvesículas, que parece ser diferente entre cada tipo celular. En el caso específico de las células de sistema inmunológico se ha documentado este fenómeno. Entre diferentes subpoblaciones de linfocitos T, los linfocitos T reguladores son los más eficientes captando microvesículas [74]. También se sugiere que en el caso de los Treg, la señalización posterior a la captación del exosoma por la membrana celular es probablemente más importante que la incorporación del exosoma como tal.

---

A diferencia del efecto citotóxico en los T CD8+ por las microvesículas de leucemia y de cáncer de ovario, entre otros, mencionado anteriormente, los exosomas tumorales de ovario, cabeza y cuello tienen un efecto opuesto en cocultivos *ex vivo* con T reguladores, en los que se favorece su proliferación o expansión; se mantienen marcadores de estos linfocitos como FoxP3+ CTLA4+, Granzima B, entre otros, y favorecen su capacidad supresora. Por otro lado, estas Microvesículas Tumorales tuvieron la capacidad de inducir células T reguladoras a partir de cocultivos con linfocitos T convencionales. En este estudio, se planteó como probable mecanismo la presencia de TGFβ en las microvesículas y por la disminución del efecto observado cuando se utilizan anticuerpos bloqueantes del receptor de TGFβ o cuando se utilizan microvesículas de células dendríticas en lugar de tumorales; cabe señalar que una de las deficiencias importantes de este estudio fue utilizar cultivos de células tumorales adherentes y no libres de Suero Fetal Bovino [62]. Posteriormente se corroboró el efecto de exosomas de cultivos primarios de tumor nasofaríngeo (cabeza y cuello) en el aumento de la expansión de T reguladores, además de demostrar en ratones humanizados y *ex vivo* la capacidad de estas vesículas de inducir quimiotaxis en células T reguladores CCR6+, mediante su cargo de CCL20 [75].

En un análisis más detallado sobre el efecto de exosomas de tumores de cabeza y cuello sobre los T reguladores, se identificó por análisis de expresión de mRNAs, que los exosomas son responsables del aumento de la transcripción de FoxP3 y aunque no fue selectivo el aumento de otros mRNAs en específico, si lo hizo con mRNAs relacionados con vías de inhibición como CD39, PDL1, IL10, entre otros. Otro hallazgo interesante fue que el efecto descrito de los exosomas sobre linfocitos T, es mayor cuando los linfocitos se encuentran en reposo y no en estado de activación [76], aún cuando la capacidad de captación de exosomas no se ve afectada por esta variable de activación/reposo del linfocito Treg [74].

---

<b>ORIGEN TUMORAL DE EXOSOMAS</b>	<b>EFEECTO EN CÉLULAS Treg</b>	<b>REFERENCIAS</b>
Cabeza y cuello	Inducen y expanden Treg, con capacidad supresora	[62]
Nasofaringeo	Reclutan T reg y promueven su expansión. Reclutan T naive, median su conversión a Treg (CD25, FOXP3). Aumento en niveles de IL-10 Y TGF-B1.	[75]
Cabeza y cuello	Induce cambios en perfiles genéticos en Treg: vía CD39/CD73	[77]

***Tabla 2 Efecto de exosomas Tumorales en Linfocitos T reguladores***

---

## Planteamiento del Problema

Existe una clara relación entre el tipo de infiltrado tumoral de linfocitos T con la sobrevida del paciente con CCR, mediante el *Inmunoscore*. A pesar de ello, se desconoce ampliamente cómo ocurre la transición de este tipo de infiltrado, de una respuesta antitumoral hacia una que permite la progresión tumoral (inmunoedición). En general, los linfocitos T reguladores son esenciales en la progresión del cáncer; sin embargo, en el CCR su participación es controversial, por su heterogeneidad *in situ*, y la complejidad de su estudio *ex vivo* en pacientes con esta patología, ya que las poblaciones inducidas, dependen en gran medida de su microambiente.

Por otra parte, se ha reportado la capacidad tumoral (glioblastoma, mama, cabeza y cuello) de moderar la actividad de los linfocitos T mediante la liberación de microvesículas, aunque se desconoce si los exosomas de cáncer de colon tienen algún impacto en esta población de linfocitos.

Por lo anterior, en este trabajo se estudió el efecto *in vitro* de los exosomas provenientes de líneas celulares de colon metastásico y no metastásico, en la inducción y en la expansión de linfocitos T reguladores.



---

## Justificación

El CCR es la tercera neoplasia más frecuente en ambos sexos en el mundo y representa un problema de salud pública, por carecer de una terapia blanco efectiva. Los linfocitos T reguladores son candidatos idóneos como objeto de estudio de la disrupción y transición de la respuesta antitumoral en colon porque: a) son uno de los leucocitos más abundantes en la mucosa del colon, además de que son un grupo heterogéneo y algunos grupos tiene plasticidad celular dependiendo del microambiente; b) una de sus funciones principales es inducir tolerancia inmunológica a antígenos específicos, atenuando las respuestas inflamatorias exacerbadas; y c) Son esenciales en la fase de escape tumoral para hacer la metástasis. Como se mencionó anteriormente, la célula tumoral tiene diferentes mecanismos para reconfigurar su microambiente local y a distancia. Uno de los mecanismos más particulares, es a través de microvesículas, porque puede contener desde material genético regulador, hasta proteínas funcionales que se protegen de las condiciones del medio y se han documentado sus diversos efectos en linfocitos T. Por los antecedentes descritos, justificamos nuestro interés en analizar el efecto de los exosomas tumorales de cáncer de colon en dos tipos diferentes de cultivo *ex vivo* de linfocitos reguladores, en particular en su inducción y expansión.

---

## Hipótesis

*Los exosomas provenientes de células tumorales de colon metastásico favorecerán la inducción y expansión de linfocitos T reguladores.*

## Objetivo General

*Evaluar in vitro el efecto de exosomas producidos por líneas tumorales de colon en la inducción y expansión de linfocitos T reguladores.*

## Objetivos Particulares

1. Evaluar la formación de esferoides de líneas tumorales de colon HT29 y T84 por enriquecimiento de fenotipo *stem-like*.
2. Obtención y caracterización de exosomas producidos por esferoides de líneas tumorales de colon HT29 y T84.
3. Evaluar *ex vivo* la generación de linfocitos T reguladores CD25+ FoxP3+ a partir de co-cultivos de linfocitos T *naive* con exosomas tumorales de colon.
4. Evaluar *ex vivo* la expansión *in vitro* de linfocitos T reguladores en presencia de exosomas tumorales de colon.

---

## Material y Métodos

### Estrategia Experimental

**Etapas 1.** Se estableció un modelo de cultivo 3D de células de CaCo a partir de cultivos adherentes de líneas celulares de referencia: HT 29; SW480; SW620; T84; CoN-112, que corresponden a etapas de tumor primario y tumor metastásico de esta enfermedad. Para confirmar un adecuado cultivo 3D se evaluaron por citometría de flujo la expresión de los marcadores CD24 y CD44.

**Etapas 2.** A partir de los sobrenadantes de los cultivos 3D, se obtuvo un purificado de vesículas extracelulares por centrifugaciones secuenciales, ultrafiltración y exclusión por tamaño, la suspensión obtenida de exosomas, se cuantificó por *Nanosight* para realizar el WB y los cocultivos con linfocitos T reguladores.

**Etapas 3.** Se caracterizaron los exosomas obtenidos, por Western Blot se detectó la presencia de tetraspaninas: TSG 101, CD63, CD81, como marcadores de exosomas.

**Etapas 4.** Para evaluar el efecto de los exosomas en Linfocitos T reguladores se plantea un co-cultivo de linfocitos T reguladores, en condiciones de expansión, con exosomas provenientes de diferentes líneas tumorales de Colon, tanto metastásica como no metastásica.

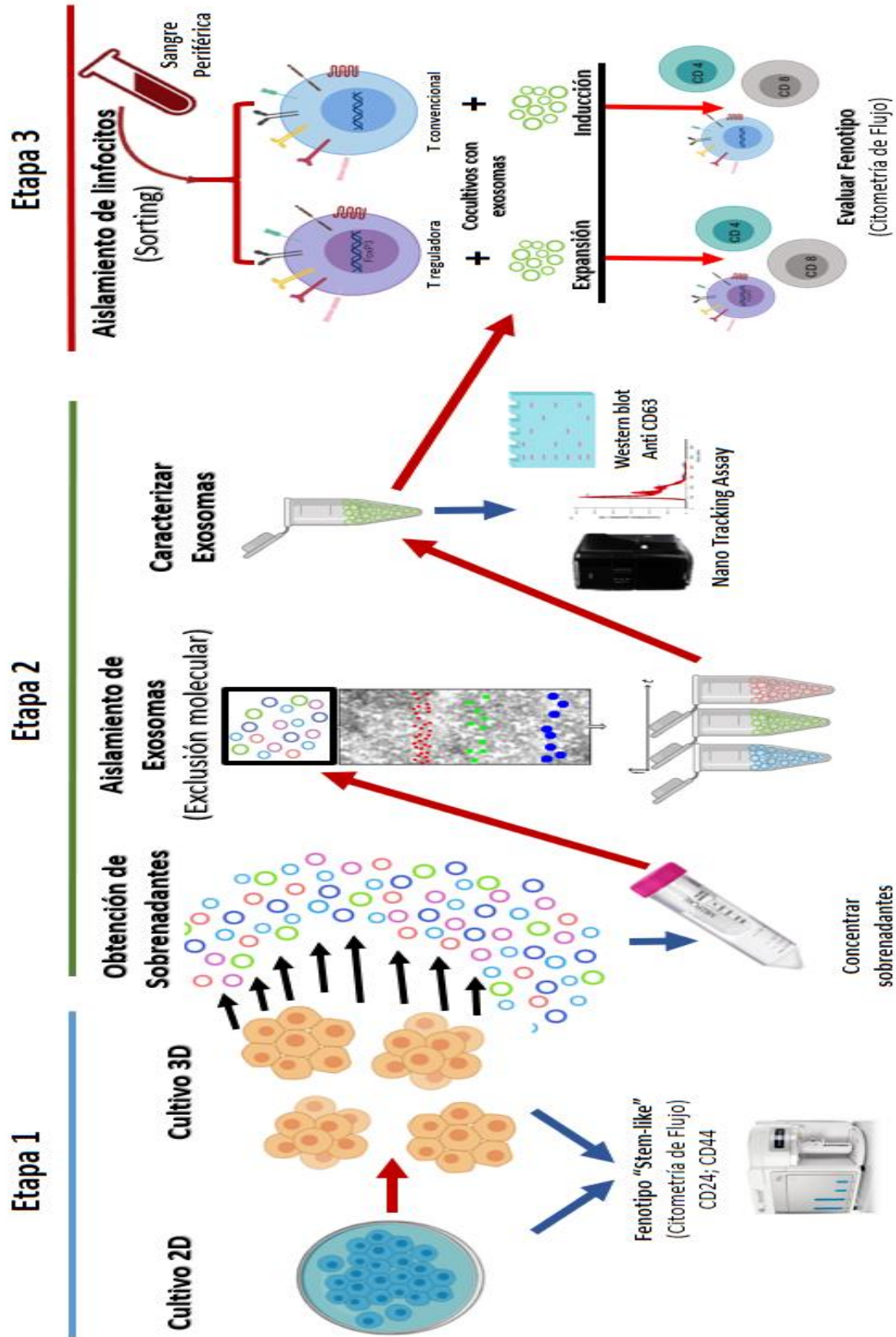


Figura 3. Estrategia Experimental.

---

## Líneas celulares de Cáncer de Colon.

Se utilizaron las líneas tumorales de colon: SW480, SW620, HT29, T84 y la línea no tumoral de colon CoN 112, provistas amablemente por el laboratorio de la Dra. Martha Robles, Facultad de Medicina UNAM, quien las obtuvo del banco *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville). Las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM o DMEM/F12 Ham's (GIBCO) suplementado con: Suero Fetal Bovino al 10% (GIBCO); Penicilina (100 U/ml)/ Estreptomina (100 µg/ml) (GIBCO); y mantenidas en una incubadora bajo una atmósfera húmeda, CO<sub>2</sub> al 5% y a 37°C.

Línea Celular	Enfermedad	Procedencia	Medio de cultivo
CCD-112 CoN	No tumoral	22 semanas de gestación	DMEM C/SFB 10%
SW480	Adenocarcinoma	Caucásico de 51 años	DMEM C/SFB 10%
SW620	Adenocarcinoma, Metastásico a Ganglio Linfático	Caucásico de 50 años	DMEM C/SFB 10%
HT-29	Adenocarcinoma	Caucásico de 44 años	DMEM C/SFB 10%
T84	Carcinoma metastásico a pulmón	Caucásico de 72 años	DMEM/F12 C/SFB 10%

**Tabla 3. Líneas tumorales de Cáncer de Colon.**

## Cultivos 3D de Líneas tumorales

De cada línea celular cultivada en placas adherentes, con confluencia al 80-90%, se realiza separación celular de placa de cultivo con TripLE Express 500 µL (Gibco) y 500 µL de PBS EDTA 1x (5mM), posterior al conteo celular, se utilizan 350,000 células por placa de cultivo no adherente de 100 mm de diámetro. Se utiliza medio de cultivo DMEM/F12 (GIBCO 50:50) complementado con B27 2x (GIBCO), rhEGF (*recombinant Human Endothelial Growth Factor*) (eBioscience) 20 ng/mL. No se utiliza Suero Fetal Bovino. Se cultiva a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, incubadora húmeda, durante 7 días.

---

## Medición de fenotipo Stem like por Citometría de Flujo.

Previo a un lavado con PBS 1x, se despegaron las células de cultivos 2D y se disgregaron células de cultivo 3D con PBS 1x con EDTA/TripLE express (50:50) por 5 min a 37 °C, posteriormente al conteo, se realizó una tinción extracelular en una placa de 96 pozos con los siguientes marcadores: Zombie Nir (Marcador de Viabilidad); CD24 (Biolegend, PeCy7,1:400); CD44 (Biolegend, FITC, 1:400); durante 20 min a 4°C, protegido de la luz. Se realizaron 2 lavados con 500uL de PBS 1x y se realizó la fijación con 150 µL de paraformaldehído (PFA) al 2% en PBS durante 5 min, se lavó el PFA 2 veces con PBS 1x. Para la lectura en el citómetro, se diluye cada muestra en 500 µL. La lectura se realizó en el citómetro *Next Attune* (Applied Biosystems).

## Obtención de Exosomas por Centrifugación y Exclusión molecular.

### *Centrifugación*

Posterior a la obtención de los medios condicionados de los cultivos 3D, se realiza una centrifugación a 3000 rpm, para descartar células y detritus celulares. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 9,500 rpm durante 30 min a 4°C; este sobrenadante se vertió en tubo concentrador de 30,000 KDa de 15 mL (Merk Millipore) para centrifugar a 3100 x g durante 30 min. El volumen obtenido se aforó a 1,5 mL con PBS 1x y este último sobrenadante se utilizó para realizar la exclusión por tamaño.

### *Exclusión molecular*

Preparar una columna con una jeringa de 10 mL, con filtro de nylon y llave de tres vías en horadación de salida, en el interior, se colocó sepharosa CL-2B (Sigma Aldrich Merk, 60-200nm de diámetro) hasta la marca de 10mL; lavar 3 veces con PBS 1x y verter el medio condicionado de los cultivos celulares 3D. A partir de la integración del medio a la sefarosa, se obtuvieron fracciones de 500uL (hasta 20 fracciones). Si se conoce la fracción en la que se encuentran los exosomas, o vesículas extracelulares de interés, se colectan esas fracciones y se juntan en un

---

tubo de filtración de 30 KDa de 2 mL para concentrar la muestra por centrifugación a 3100 x g durante 30 min. Este último concentrado retenido contendrá las vesículas de interés.

## Caracterización de Exosomas Tumorales

### ***Nanotracking Assay***

Posterior a la obtención de las diferentes fracciones de separación del concentrado de sobrenadante por columna de sefarosa, se toman 10  $\mu$ L de cada fracción concentrada y se diluyen en proporción 1:1000 con PBS 1x filtrado (0.22 $\mu$ m). Previa limpieza del contador de nanopartículas *Nanosight* NS300, se realiza lectura de cada fracción en las siguientes condiciones: 3 lecturas de 30 segundos de cada fracción; lectura de PBS 1x o el diluyente utilizado para lectura de vesículas; lectura preliminar de H<sub>2</sub>O MiliQ para verificar la limpieza de la cámara de lectura. Una vez analizada la concentración y tamaño de partículas de cada fracción se eligieron aquellas fracciones con la mayor concentración de partículas con diámetro de entre 100 y 150nm. En el caso de este modelo experimental, se identificaron las fracciones 6-9 como las ideales para obtener exosomas en el sobrenadante de cada línea celular utilizada.

### ***Western Blot***

Los exosomas concentrados fueron lisados en Buffer RIPA 5X, posteriormente la proteína fue cuantificada por el método de Bradford, con una curva estándar de BSA y se utilizaron 30  $\mu$ g de proteína total para separar en un gel SDS PAGE al 10%, seguido de una electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa, la cual fue bloqueada con 5% p/v de leche en polvo baja en grasa e incubada con el anticuerpo primario específico: anti-CD63 (1:1000), Anti-CD81 (1:1000), y Anti-Alix (1:1000), toda la noche a 4°C en agitación. La detección fue realizada con un anticuerpo secundario acoplado a HRP (*horseradish peroxidase*) y *SuperSignal Kit* (Pierce).

---

Ensayos de Cocultivos de Linfocitos T con Exosomas Tumorales.

### **Aislamiento de linfocitos T reguladores**

#### *Obtención de células mononucleares de sangre periférica*

Mediante una técnica aséptica se obtienen 40 mL de sangre periférica humana por venopunción de la vena cubital y se almacena en un tubo heparinizado (BD, Vacutainer). La sangre se diluye 1:1 con PBS 1x y se prepara un gradiente 1:4 (sangre: Ficoll) con Ficoll Paque Plus (GE, Healthcare); posterior a la centrifugación (2,600 rpm; 30 min, sin freno) se obtiene la interfaz con las células mononucleares (CMN). Estas células se lavan 2 veces con PBS 1x (se centrifuga a 1 500 rpm, por 5 min); posteriormente se verifica la viabilidad y se cuenta con una tinción de azul de tripano, en cámara de Neubauer, finalmente se ajustan a la concentración de tinción de  $10 \times 10^6$  células/100  $\mu$ L en PBS 1x.

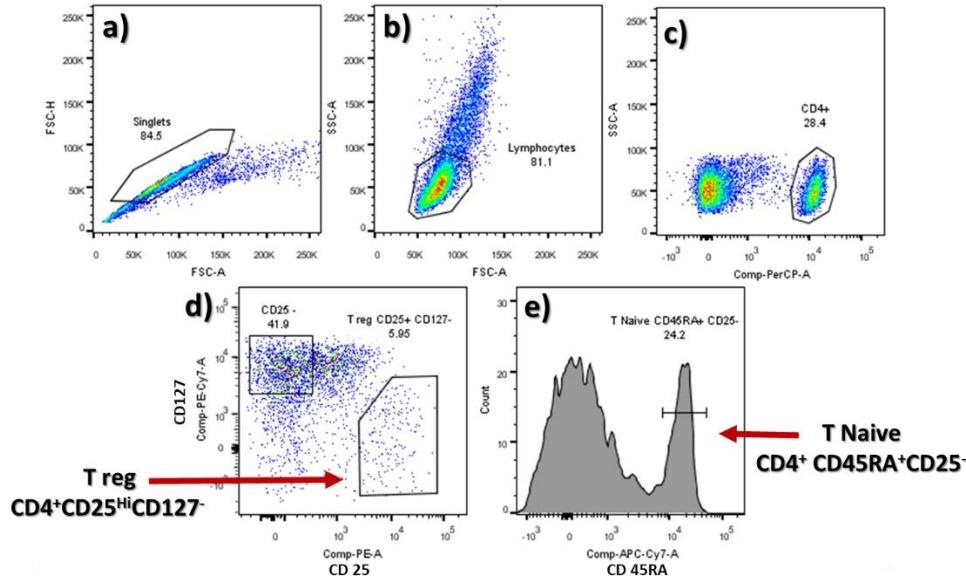
### **Purificación de Linfocitos T *Naive* (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>) y linfocitos T reguladores (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>Hi</sup>CD127<sup>-</sup>).**

Se realizó una tinción extracelular en células mononucleares con marcadores: CD45 RA (APC Fire 750; 1:400); CD4 (PerCp Cy 5.5; 1:150); CD127 (PeCy7; 1:400); CD25 (Pe; 1:60) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS 1x y se prepararon en concentración de  $15 \times 10^6$  células/mL para *sorting* en equipo FACS Aria I (láser Rojo/ Azul) (BD, Bioscience).

### **Estrategia de Aislamiento (*Sorting*)**

Posterior a la calibración del equipo y a la lectura de los controles de compensación se realizó el aislamiento (*sorting*) de los linfocitos T reguladores por marcadores: CD4<sup>+</sup>; CD127<sup>-</sup>, CD25<sup>hi</sup>. Los linfocitos T *Naive*: CD45 RA<sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup>; CD127<sup>lo</sup> CD25<sup>-</sup>. Estos linfocitos se recuperan en medio RPMI con SFB al 20% y se lavan 1 vez con PBS1x.





**Figura 4 Estrategia de Aislamiento (Sorting).** Estrategia para aislamiento de Linfocitos T reguladores  $CD4+CD25^{Hi}CD127^-$  y T naive o convencionales  $CD4+CD45RA+CD25^-$ , a partir de sangre periférica de donadores sanos. Equipo FACS ARIA I. Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo, IIB, UNAM.

### Expansión de linfocitos T reguladores.

Con los linfocitos T reguladores aislados, posteriormente al lavado con PBS 1x se realiza una tinción con un marcador para evaluar su proliferación, el *Cell Tracer Violet* (CTV; 1:1000), durante 12 min en incubación a 37°C y agitación a 150 rpm; luego se lavó con PBS 1x y se incubó en PBS 1x a 37 °C durante 15 min, posteriormente se contaron las células en la cámara de Neubauer y se cultivaron 15,000 células por condición en medio Optimizer (Gibco) suplementado. Previamente se preparan estas condiciones de cultivo: a) Condiciones óptimas: IL2 500 UI/mL; Perlas de activación recubiertas con anti-CD3/anti-CD28 en concentración 1:1 y b) Condiciones Subóptimas: IL2 300 UI/mL; Perlas de activación recubiertas con anti-CD3/anti-CD28 en concentración 1:2. Incubar a 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda durante 4 días, resuspender el cultivo cada 24 h para la activación homogénea de perlas. Al día 5 retirar las perlas de activación con imán y renovar el medio de cultivo solo con IL2, cultivar durante 48 h (reposo) y evaluar el fenotipo.

---

### Inducción de linfocitos T reguladores.

Con linfocitos T *naive* aislados, posteriormente al lavado con PBS 1 x se realizó una tinción con un marcador para evaluar proliferación: *Cell Tracer Violet* (CTV; 1:1000) durante 12 min en incubación a 37°C y agitación a 150 rpm; lavar con PBS 1x e incubar en PBS 1x a 37°C durante 15 min, posteriormente contabilizar en cámara de Neubauer y cultivar 20,000 células por condición en medio *Optimizer* (Gibco) suplementado. Previamente se preparan estas condiciones de cultivo: a) Óptima con TGFβ: IL2: 300 UI/mL; Perlas de activación recubiertas con anti-CD3/anti-CD28 en concentración 1:1; TGFβ: 1ng/mL. b) Subóptima con TGFβ: IL2: 50 UI/mL; Perlas de activación recubiertas con anti-CD3/anti-CD28 en concentración 1:10; TGFβ: 1ng/mL. c) Óptima sin TGFβ y d) Subóptima sin TGFβ. Incubar a 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda durante 4 días, resuspender el cultivo cada 24 h para una activación homogénea de las perlas. Al día 5 retirar las perlas de activación con imán para evaluar el fenotipo por Citometría de Flujo.

### Fenotipo de los Linfocitos T

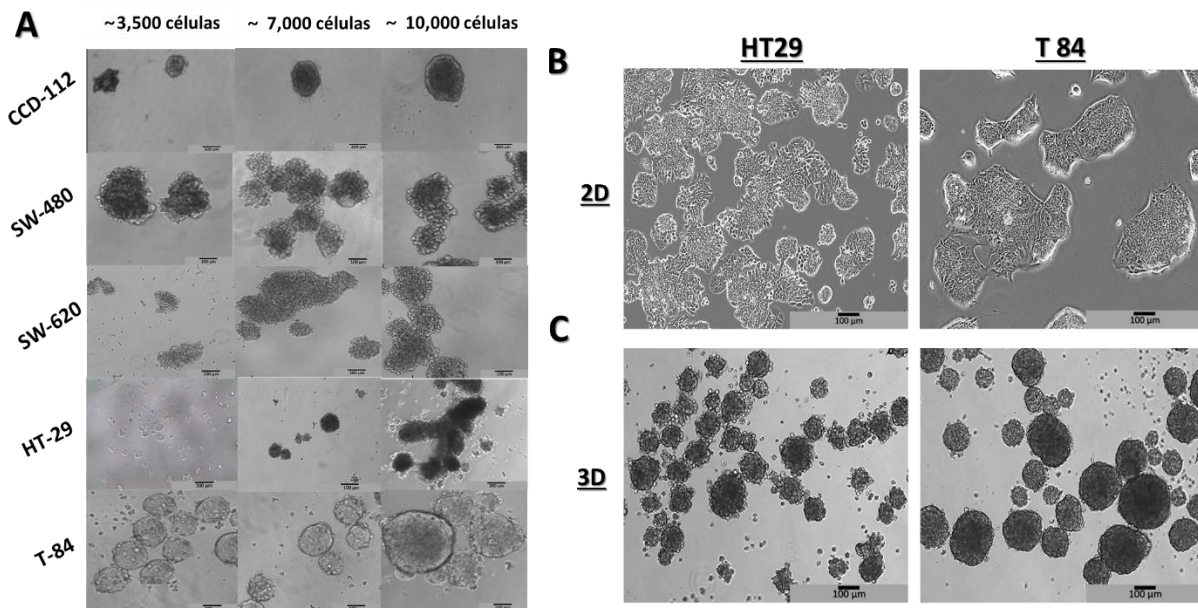
Los linfocitos T obtenidos de cultivo, se lavan con PBS 1x y se realiza tinción extracelular con marcadores: Viabilidad (Aqua Zombie), CD4 (Pe Dazzle 595, 1:400), CD25 (Pe, 1:80), FoxP3 (AF647, 1:50). Posteriormente realizar una tinción intracelular para FoxP3, para esta, realizar primero permeabilización y fijación con kit Tonbo (Bioscience) durante 1 h, lavar con el buffer de lavado incluido en el Kit, realizar la incubación con anti-FoxP3 durante 30 min, lavar 2 veces con buffer de lavado y diluir en 200 uL para la lectura en el citómetro *Next Attune* (Applied Biosystems) (láser Rojo/Azul/Violeta/Amarillo).

---

## Resultados

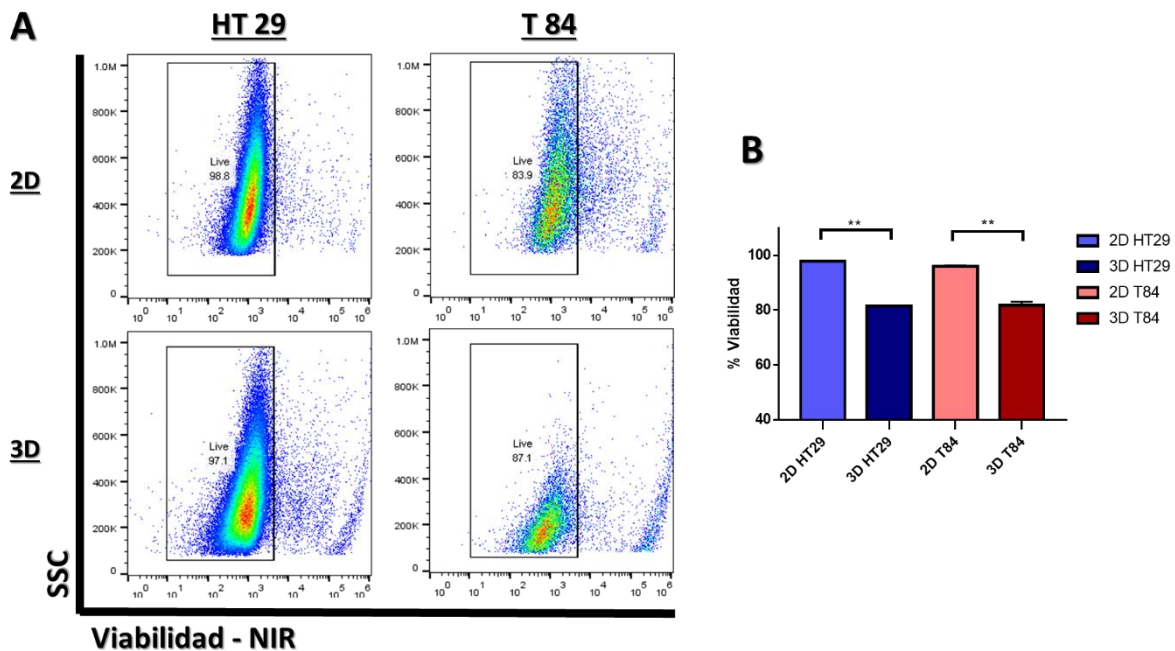
Las líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y T84 forman esferoides en condiciones no adherente de cultivo.

En primer lugar, se evaluó la capacidad de formar esferoides de diferentes líneas celulares de cáncer de colon, de tumor primario: SW480 y HT29; de tumor metastásico: SW620 y T84. El tamaño y la homogeneidad de esferoides depende de la cantidad de células por área (placas de 100 mm de diámetro) cultivadas inicialmente y del tiempo de cultivo, por lo que se probaron diferentes concentraciones de cada línea celular. Aunque todas formaron esferoides, se eligieron las líneas HT29 y T84, puesto que su morfología epitelial en cultivo adherente es similar, y nos permitió comparar entre una línea No-Metastásica (HT29) y una Metastásica (T84). Los esferoides de HT29 miden 100-200 nm y los de T84



**Figura 5. Cultivo de líneas de cáncer de colon en esferoides (3D). A) Colección de células tumorales de colon y sus diferentes concentraciones iniciales de células para formación de esferoides tumorales a 7 días. B) Se muestra la proliferación celular de líneas HT29 y T84 en condiciones de Adherencia (2D). C) Se muestran el respectivo cultivo en esferoides tumorales (3D). imágenes se tomaron a un aumento 10X y 20X en microscopio invertido Olympus ( Lab Nal Cit). Correcciones: Saturación: 0% Nitidez: 50%.**

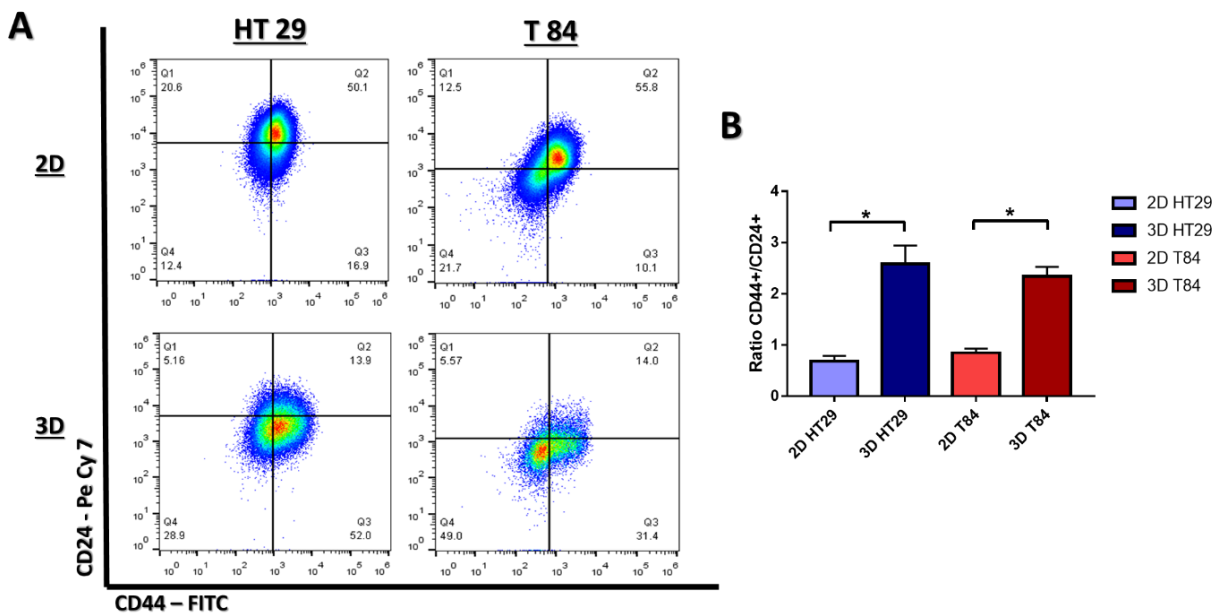
150-350nm, para ambas líneas el tiempo de cultivo fue de 7 días y a diferencia de las SW480 y SW620, no forman agregados celulares irregulares o de gran tamaño. Para corroborar la integridad de los esferoides formados por las líneas tumorales, se midió la viabilidad por citometría de flujo. Se identificó una disminución significativa de viabilidad entre el cultivo 2D y 3D de 15%; sin embargo, fue un resultado esperado, debido a que el núcleo de los esferoides se someta a hipoxia, y el gradiente de nutrientes generado por la agrupación celular favorece la apoptosis de las capas celulares más internas.



**Figura 6. Viabilidad de Cultivos 2D y 3D de líneas de Cáncer de Colon HT29 y T84. A) Dotplot representativo de viabilidad de líneas tumorales en 2D y 3D; B) % de Viabilidad; Análisis por t student \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; de experimentos independientes por duplicado. Entre cultivos 3D HT29 y T84 no hay diferencias significativas de viabilidad.**

El cultivo celular en esferoides (3D) enriquece el nicho del fenotipo stem-like (CD44+, CD24-).

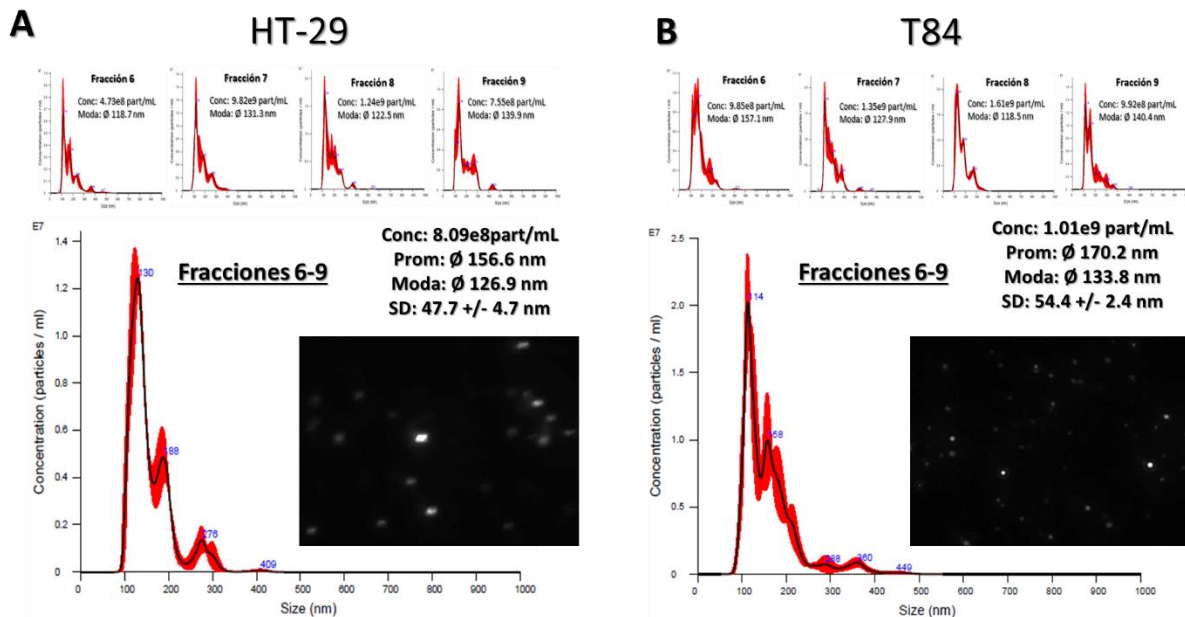
Otra característica que evaluamos para validar la formación de esferoides fue el enriquecimiento del nicho celular con el fenotipo *stem-like*, por su relevancia documentada en la formación de tumores en modelos *in vivo*. Por tal motivo, el fenotipo de este nicho celular, en este trabajo, lo definimos como un enriquecimiento de la expresión de la glicoproteína CD44, esencial para la migración e invasión y una disminución de la integrina CD24, necesaria para la adhesión celular. Para evaluar estos marcadores, analizamos la relación entre la expresión de CD44+/CD24+, el aumento de esta proporción se traduce en una mayor probabilidad de tener células tumorales formadoras de tumor [78]. En este caso, ambas líneas celulares aumentaron significativamente su proporción de CD44+/CD24+ cuando se cultivaron en 3D y la proporción entre ambos esferoides fue similar. Por lo que ambas líneas fueron favorables para obtener y comparar el efecto de sus microvesículas.



**Figura 7.** Enriquecimiento del fenotipo Stem like (CD44+, CD24-) en cultivos 3D. **A.** Dotplot representativo de fenotipo CD44/CD24 de líneas tumorales en 2D y 3D; **B)** Ratio CD44+/CD24+; Análisis por t student \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; de experimentos independientes por duplicado. A mayor índice CD44/CD24, se sugiere un nicho mayor para células tumorales stem.

Las Microvesículas provenientes de cultivos 3D (HT-29 y T84) expresan marcadores de exosomas como Alix, CD63 y CD81.

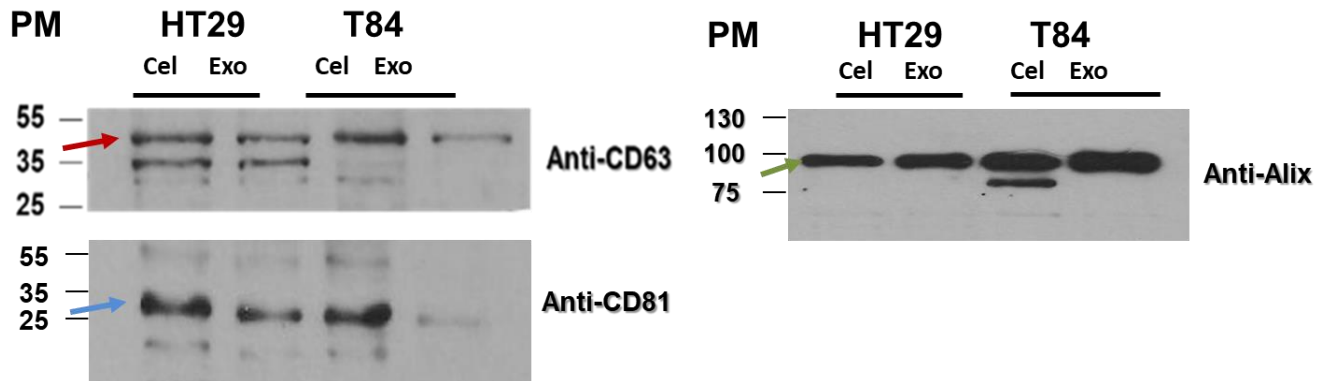
A partir de los medios condicionados de cultivos 3D, se realizó el aislamiento de las microvesículas (se muestra un experimento representativo de fracciones utilizadas 6-9; cuadros superiores Figura 6), obteniendo un concentrado de 60-90  $\mu\text{L}$  de cada línea. En seguida, se cuantificó el concentrado de microvesículas por *Nanotracking Assay* en *Nanosight* y obtuvimos que los exosomas provenientes de la línea HT-29 miden, en promedio, 129.7 nm y de la línea T84 miden 125.6 nm. Las concentraciones promedio de microvesículas fueron: para HT-29  $1.8 \times 10^9$  partículas/mL y para T84  $1.14 \times 10^9$  partículas/mL.



**Figura 8. Cuantificación de Microvesículas por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) en Nanosight.** A) HT-29. Superior, se muestra concentración y dimensiones de microvesículas presentes en fracciones 6-9 provenientes de sobrenadantes de Esferoides tumorales; Inferior, se muestra concentrado de fracción 6-9 de HT-29 B) T84. Superior, se muestra concentración y dimensiones de microvesículas presentes en fracciones 6-9 provenientes de sobrenadantes de Esferoides tumorales; Inferior, se muestra concentrado de fracción 6-9. Representativo de tres lecturas de 30 segundos por fracción. Nanosight NS300.



150µL de concentrado de fracciones 6-9 obtenidos a partir de los sobrenadantes cada línea, se lisaron en buffer RIPA 5x para obtener *el extracto de proteína, la cual, una vez cuantificada se procesó para realizar Western Blot* y determinar la expresión de marcadores de exosomas. En ambas microvesículas se identificó la expresión de ALIX (molécula que participa en la biogénesis de exosomas) y CD63 (tetraspanina), marcadores de exosomas (Figura 7). Sin embargo, es interesante que solo las vesículas provenientes de las HT29 expresaran CD81, esto concuerda con lo reportado en la literatura sobre la heterogeneidad en la expresión de tetraspaninas en los exosomas.

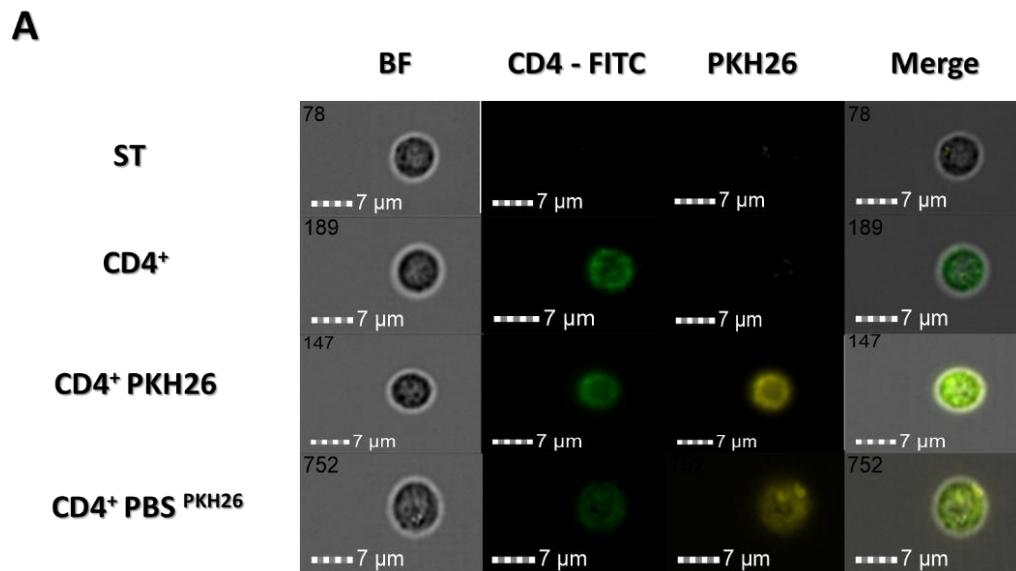


**Figura 9. Western Blot de Lisado Celular y de Exosomas de HT29 y T84.** Se muestra WB para identificar marcadores de exosomas. Tetraspaninas CD63 y CD81, así como ALIX, molécula esencial en la biogénesis del exosoma. Gel de acrilamida al 10%; 30 µg de proteína; tiempo de exposición 40s. Flecha verde. Se observa banda de Alix en peso molecular predicho de 96 KDa. Además, en lisado celular de T84, se observa una isoforma trunca de la molécula[79]. Flecha roja. Se observa banda de CD63 en peso molecular predicho de 30-60 KDa. La banda más pesada es la forma glicosilada de la proteína, característico en vesículas extracelulares provenientes de células tumorales[80]. Flecha azul. Se observa banda de CD81 en peso molecular predicho de 22-26 KDa.

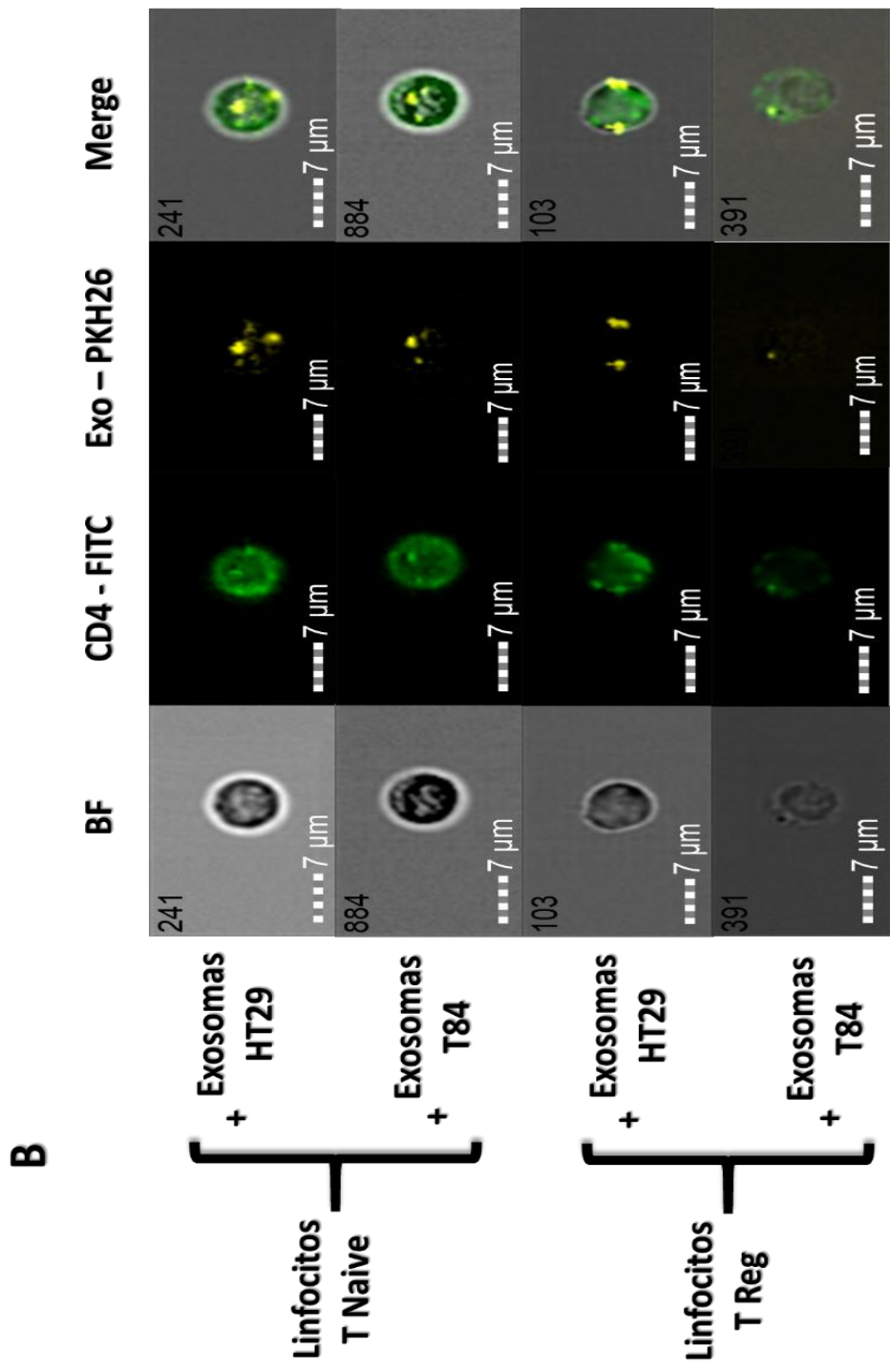
---

Los exosomas de las células HT29 y T84 son tomados del medio por los Linfocitos T.

Como se mencionó en los antecedentes, existen diversos mecanismos propuestos sobre cómo las células pueden tomar los exosomas del medio extracelular y se recalcó la importancia de la señalización inducida a través de la membrana celular, respecto a la internalización como ocurre en otras células. En consecuencia, para evidenciar la captación de las microvesículas, estas se tiñeron con el colorante lipofílico PKH26 y fueron co-cultivadas e incubadas con linfocitos T naive y T reguladores en la proporción más alta (40,000 exosomas/ célula T) a 37°C por 4 h, posteriormente, se analizó por Citometría-Confocal y documentamos que los exosomas de ambas líneas tumorales son tomados por los linfocitos T (Figura 8).







**Figura 10. Captación de Exosomas por linfocitos T naive y T reguladores.** Por Citometría-Confocal se muestra **A)** Controles de tinción: ST: Sin teñir; CD4+: Solo tinción de CD4; CD4+PKH26: Tinción de CD4 y PKH26 de linfocitos; CD4+ PBS<sup>PKH26</sup>: Tinción de CD4 e incubación con PBS1x teñido con PKH26. **B)** Captación de exosomas teñidos con PKH26 por linfocitos T naive y T regulador. BF: Campo Claro. Equipo. Amnis® ImageStream®XMk I.

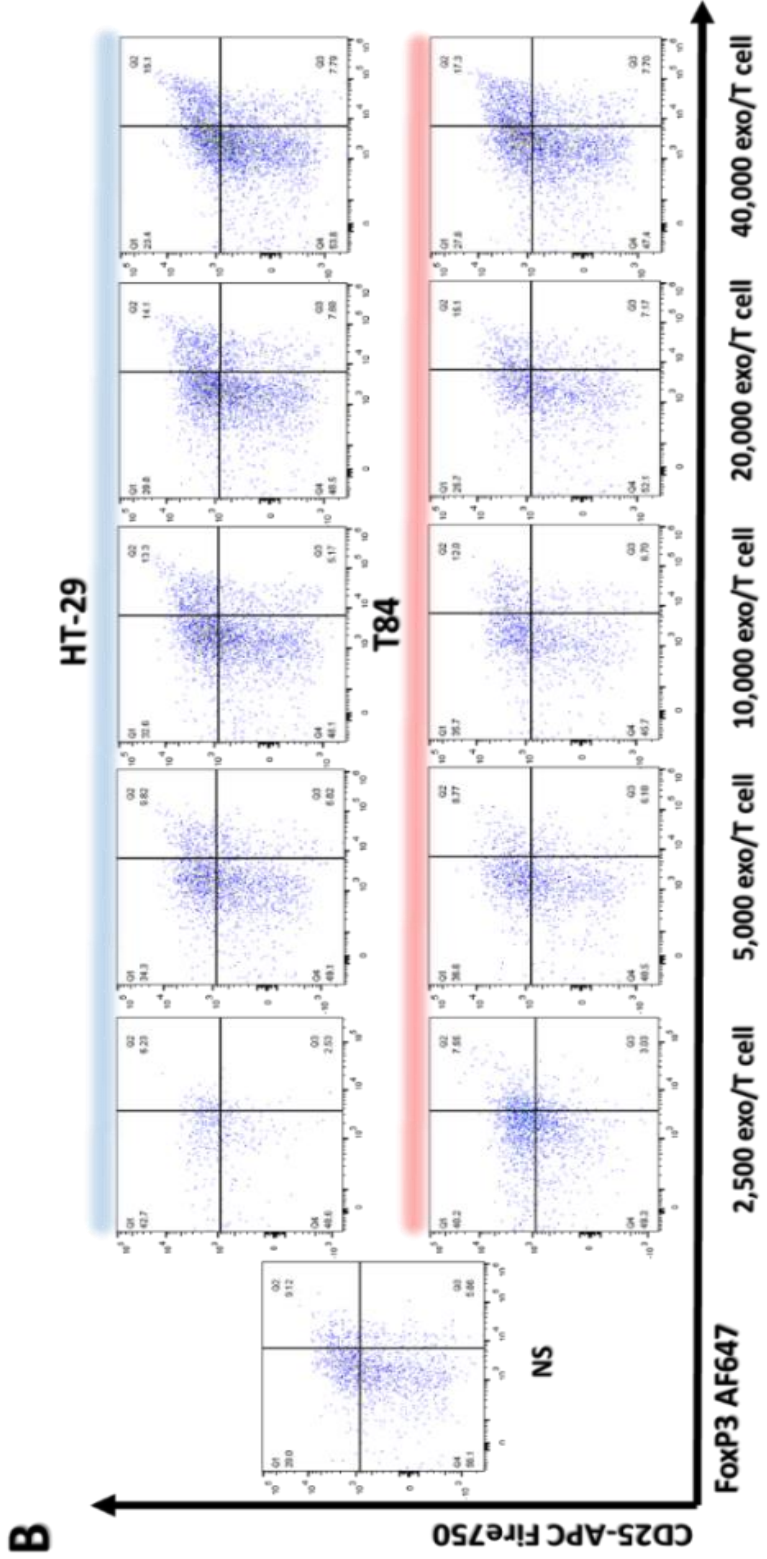
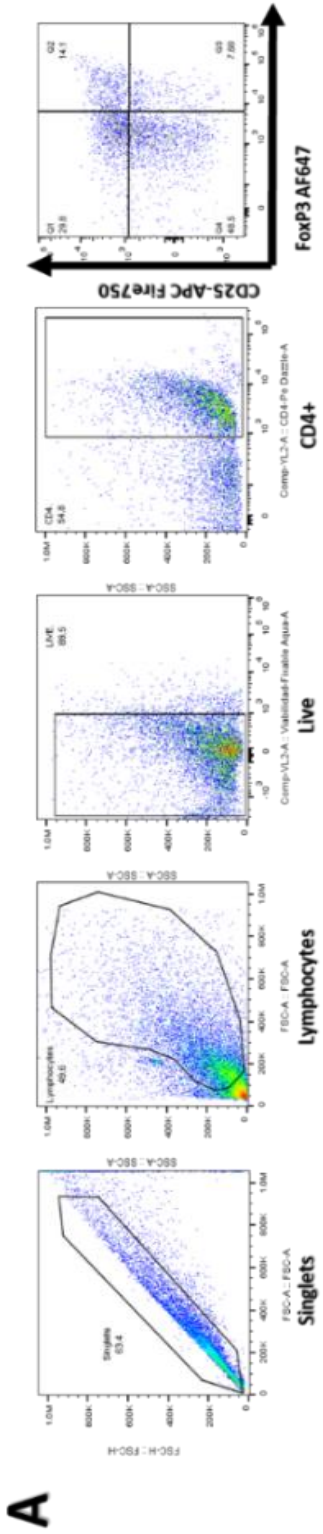
---

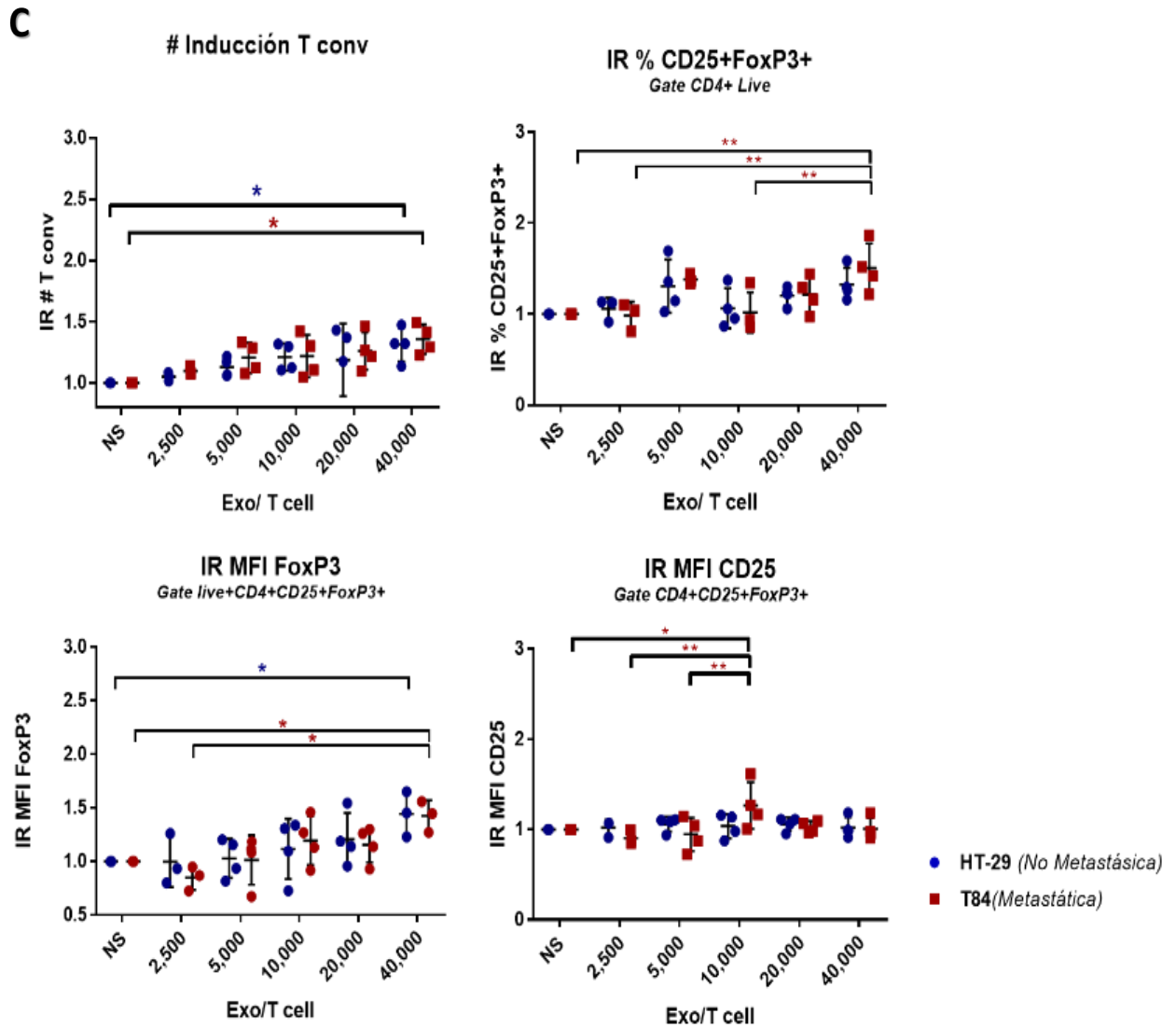
## Generación de Linfocitos T reguladores por exosomas de Cáncer de Colon.

Para evaluar el efecto de los exosomas obtenidos en la formación de linfocitos T reguladores o en su conversión, utilizamos linfocitos T *naive* o convencionales aislados por *sorting* con el fenotipo CD4+CD25-CD45RA+; y para estudiar el efecto sobre Linfocitos T reguladores en la Expansión, utilizamos Tregs con fenotipo CD4+CD25+CD127-. Los resultados obtenidos de los diferentes Cocultivos se normalizaron por Incrementos Relativos (IR) para comparar los resultados entre pacientes.

Para evaluar el efecto de los Exosomas de CaCo en la generación de linfocitos T reg, se cultivaron Linfocitos T *naive* (20,000 células) en presencia de diferentes concentraciones de exosomas tumorales (2500, 5000, 10 000, 20 000 por linfocito T) de las dos líneas celulares. Al cuarto día de cocultivo, se evaluó por citometría de flujo, la expresión de marcadores de linfocitos T reguladores CD25 y FoxP3.

Al analizar el número de células, observamos que en ambas líneas aumenta con la concentración, aunque apenas es significativo para las concentraciones más altas de exosomas de ambas líneas tumorales. Cuando analizamos por el porcentaje de la población que expresó CD25+ FoxP3, observamos que solo los exosomas de T84, en la concentración más alta (40,000 Exo/Cel), inducen un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del porcentaje de esta población, resulta interesante que hay una tendencia a aumentar la población, desde concentraciones más bajas (5,000 exosomas por célula). En cuanto a la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) podemos notar que CD25 incrementa su expresión con los Exosomas de T84 desde 2,500 Exo/célula ( $p < 0.01$ ), mientras que FoxP3 solo lo hace desde 40,000 Exo/Célula ( $p < 0.05$ ), esto podría tratarse del efecto que tienen los exosomas en la activación del linfocito T, además de inducir la generación de linfocitos T reguladores. Cabe recordar que se trata de linfocitos T *naive* en condiciones subóptimas de conversión.





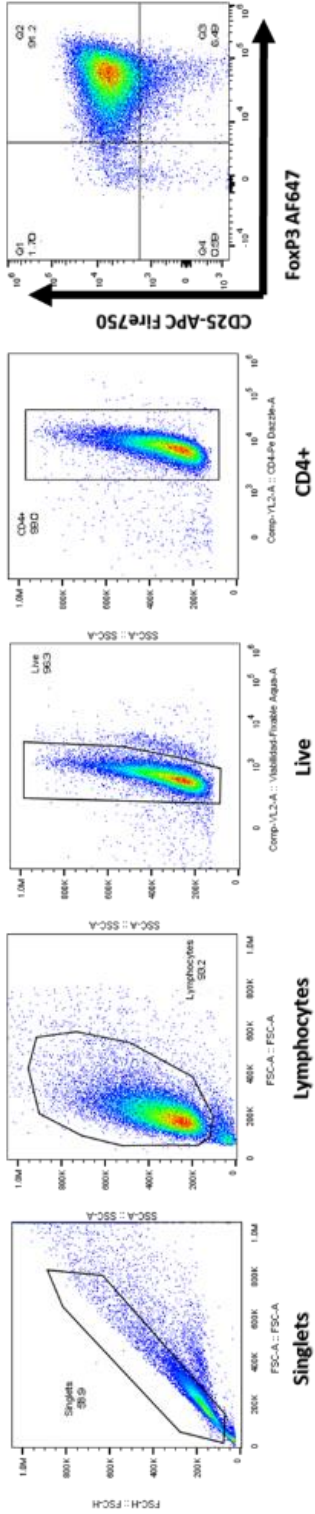
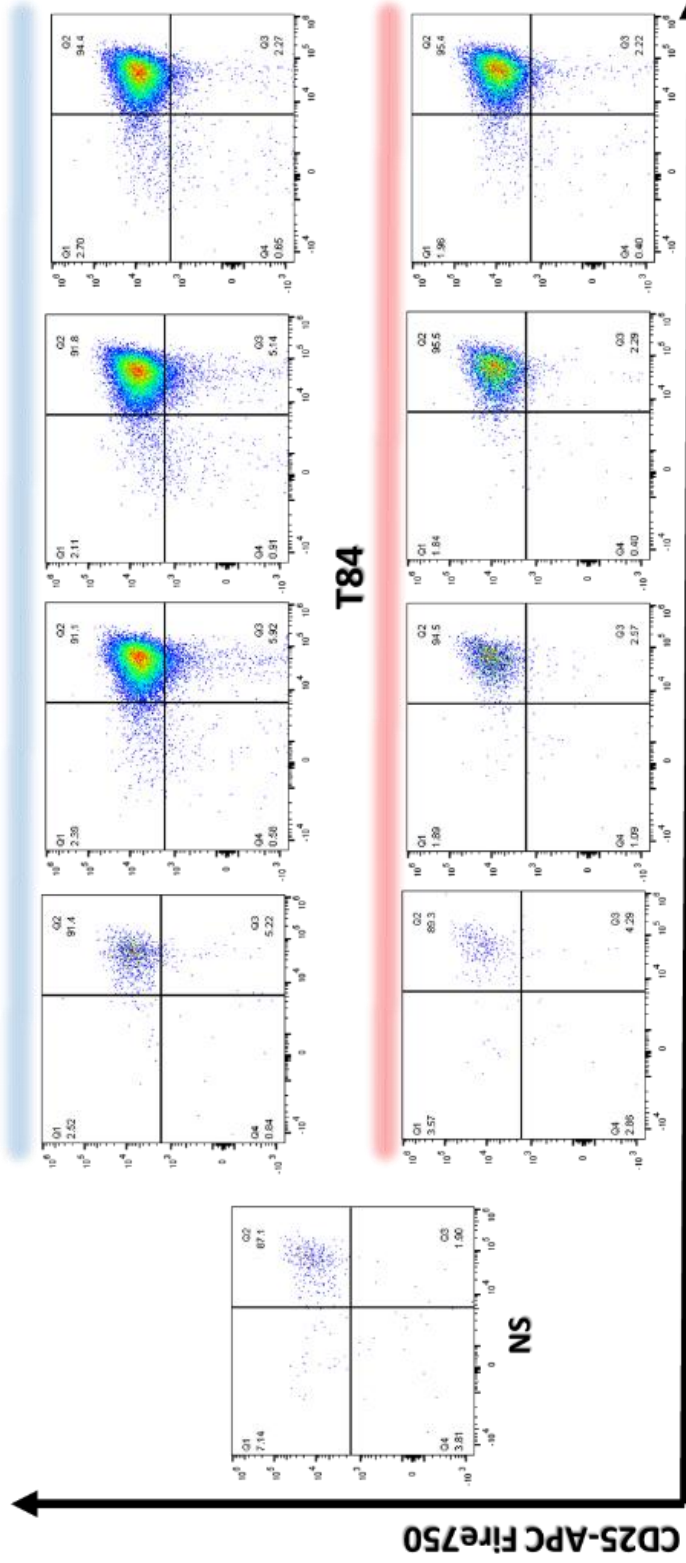
**Figura 11. Efecto de Exosomas Tumorales de Colon en la generación de Linfocitos T Reguladores.** **A)** Estrategia de análisis. **B)** Dotplot de expresión de CD25 y FoxP3 de T reg cultivadas con concentraciones crecientes de exosomas (2,500; 5,000; 10,000; 20,000; 40,000 /célula) **C)** Grafica de datos en Incremento Relativo (IR); superior: Números totales y % de Conversión CD25+FoxP3+; inferior: Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de CD25 y FoxP3. Análisis por ANOVA de 2 vías y prueba por comparaciones múltiples post hoc de Turkey. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; cada punto es promedio de duplicados de experimentos independientes.

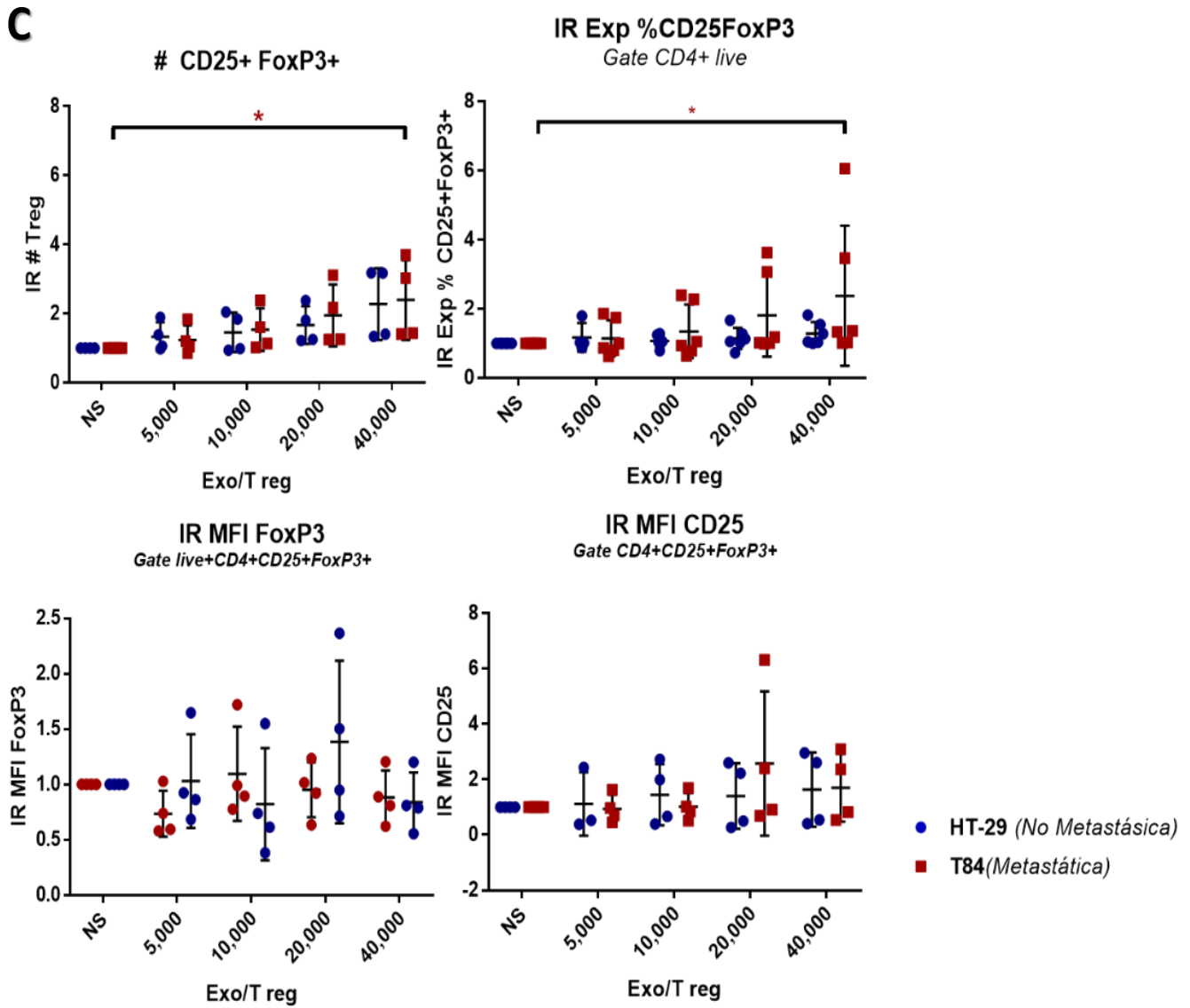
---

Los exosomas provenientes de T84 favorecen la proliferación mas no la expresión de FoxP3 y CD25 en la expansión de linfocitos T reguladores. Otro grupo de linfocitos T tratados con exosomas fueron los linfocitos T reguladores CD25<sup>Hi</sup>CD127- aislados *ex-vivo* de sangre periférica, los cuales se cultivaron (15,000 células) por 7 días, con diferentes proporciones de Exosomas (5,000; 10,000; 20,000 y 40,000 Exosomas/Célula) de las líneas HT-29 y T84. Se analizó el incremento relativo en números totales, obteniendo un aumento significativo, solo en el caso de los linfocitos tratados con la proporción más alta de exosomas de T84 (\* p<0.05), mientras que con los exosomas de HT29, aunque tienden al aumento de acuerdo con la concentración, este no es significativo. Por otra parte, cuando se analizó a los Incrementos relativos de los % de la población CD25+FoxP3+, únicamente los exosomas de T84 en alta concentración (40,000/cel) inducen un aumento significativo comparado con los de HT29 que no inducen un incremento en las diferentes concentraciones.

A diferencia de la Inducción, cuando analizamos el índice de fluorescencia media de FoxP3+ y CD25+, no encontramos cambios en la expresión de estos marcadores asociado al tratamiento con ninguno de los exosomas tumorales de colon.

Con estos resultados podemos hacer notar que los exosomas tumorales de colon metastásico favorecen la proliferación de los linfocitos T durante la expansión de los linfocitos T reguladores; sin embargo, no favorecen el aumento en la expresión de marcadores importantes para las funciones supresoras de estos linfocitos como CD25 y FoxP3. Se requerirá realizar esta prueba con exosomas provenientes de otros subtipos tumorales de colon para corroborar que el efecto observado se asocie al grado de malignidad de la línea tumoral.

**A****B****HT-29**



**Figura 12 Efecto de Exosomas Tumorales de Colon en Linfocitos T Reguladores. A) Estrategia de análisis. B) Dotplot de expresión de CD25 y FoxP3 de T reg cultivadas con concentraciones crecientes de exosomas (5,000; 10,000; 20,000; 40,000 por célula) C) Grafica de datos en Incremento Relativo (IR); superior: Números totales y % de CD25+FoxP3+; inferior: Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de CD25 y FoxP3. Análisis por ANOVA de 2 vías y prueba por comparaciones múltiples post hoc de Turkey. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; cada punto es promedio de duplicados de experimentos independientes.**

---

## Discusión

En el presente trabajo investigamos el efecto que tienen los exosomas tumorales de colon no metastásico (HT29) y metastásico (T84) sobre dos tipos diferentes de linfocitos T reguladores: los inducidos y los centrales, por su controversial participación en este tipo de cáncer.

En primera instancia establecimos un cultivo 3D o de esferoide tumoral a partir de líneas celulares de colon, con el enriquecimiento del fenotipo *stem-like* CD44+/CD24-, lo que se traduce en una adecuada adaptación de la célula tumoral a la organización del esferoide, también se refleja en su aumentada capacidad para formar tumores *in vivo*. Además, revela la importancia de que exista un gradiente de nutrientes y de hipoxia para favorecer la división de funciones de las células tumorales. Esto fue muy importante porque los cultivos 3D tiene mayor similitud, transcripcionalmente, a los tumores *in vivo*, que los cultivos convencionales adherentes. Por si fuera poco, las células en cultivos 3D aumentan su producción de exosomas y el contenido es más diverso. En nuestro caso, nos limitamos a vesículas extracelulares de un rango determinado de tamaño, no pudimos profundizar en investigar la participación de otro tipo de vesículas extracelulares, que en su conjunto se les conoce como Oncosomas, los cuales podrían impactar en la biología de las células T.

Al aislar vesículas extracelulares del tipo exosoma, por su tamaño (inferiores a 150 nm) y la expresión de tetraspaninas (CD63 y CD81) y ALIX, identificamos una clara heterogeneidad de estas y pese a que no pudimos esclarecer el contenido de los exosomas, podemos hipotetizar que su contenido será diferente y sería un interesante objeto de estudio para identificar el mecanismo molecular subyacente sobre el efecto que tienen en los linfocitos T reguladores o en otras poblaciones celulares, en las que se ha descrito su función. Por ejemplo, se ha identificado que algunas células de cáncer de colon son capaces de inhibir la proliferación de células Jurkat a través de TGF $\beta$  contenido en microvesículas. Aunque se desconoce si las microvesículas de HT29 y T84 contienen TGF $\beta$ , sería interesante explorar este



---

mecanismo como probable responsable de nuestros hallazgos [81], ya que los exosomas de colon tienen mayor efecto en la inducción que en la expansión.

Con los resultados de este trabajo podemos concluir también, que los exosomas de cáncer de colon No Metastásico (HT29) y Metastásico (T84) tienen un efecto diferencial entre los linfocitos T reguladores centrales y los que estudiamos en la inducción (iTreg). En el caso de los iTreg, observamos que se incrementa la expresión tanto de CD25 como de FoxP3 de manera dependiente de la dosis y aunque tienen una tendencia parecida entre los exosomas provenientes de líneas No metastásica y Metastásica, solo en el caso de estos últimos, existe un favorecimiento significativo de la conversión en dosis alta. Recordemos que los linfocitos T reguladores inducidos son la mayor proporción de linfocitos infiltrantes de la mucosa intestinal en particular de la región del colon. Siguiendo este orden de ideas, podríamos considerar que la función de los exosomas tiene que ver con la modulación de las células T inducidas en general, es decir, favorecer la plasticidad celular de las células infiltrantes de la mucosa. Se requerirán más experimentos para demostrar esta idea y sería de sumo interés identificar el efecto en otras poblaciones reguladoras, como los linfocitos Tr1 o células mieloides supresoras.

Es controversial el modelo de inducción de linfocitos T reguladores por las condiciones de cultivo subóptimas de conversión, por lo que se requerirían futuros experimentos que asemejen las condiciones *in vivo* de la mucosa intestinal.

En el caso de la expansión, resultó interesante ver que no se afectará la expresión ni de FoxP3 ni de CD25. Aunque es controversial el rol de los linfocitos T reguladores en el cáncer de colon, diversos estudios señalan la asociación entre una alta expresión de FoxP3 y un mejor pronóstico o sobrevida del paciente con CRC [82]; sin embargo, no hay información clara sobre las células que expresan este marcador y sería de gran importancia conocerlo, porque la proporción y estabilidad con la que se expresa por linfocitos iTreg y nTreg es diferente.

Un factor muy importante que no se pudo considerar en este estudio es el efecto de la hipoxia en la fisiología del linfocito T, cabe señalar que el intestino, durante su

---

trayecto, no solo cambia la concentración y frecuencia de microbiota. También cambian las condiciones de pH y concentración de oxígeno. Basalmente el colon es un tejido en hipoxia fisiológica ( $PO_2$ , mmHg <10) [83], por lo que las vías que regulan la proliferación y apoptosis, como la vía WNT/ $\beta$ -Catenina [84] y HIF, entre otras, se encuentra diferencialmente expresadas respecto a las que utilizamos en este trabajo; sin embargo, es una buena aproximación sobre el efecto de las vesículas extracelulares, ya que en un proceso tumoral o inflamatorio es de vital importancia el tráfico leucocitario, ya sea de la circulación como tal o al ganglio drenante, sitio en donde los linfocitos no se someten a las mismas condiciones hipóxicas.

---

## Conclusiones

- Los esferoides tumorales de cáncer de colon metastásico y no metastásico producen exosomas heterogéneos en cuanto a marcadores CD63, CD81 y Alix.
- Los exosomas tumorales de colon metastásico y no metastásico son captados por linfocitos T reguladores y T *naive*.
- Los exosomas de cáncer de colon metastásico y no metastásico tiene un efecto diferencial en la Inducción y Expansión de linfocitos T reguladores.
- Los exosomas de cáncer de colon metastásico favorecen la inducción y expansión de linfocitos T reguladores. En la inducción favorecen la expresión de CD25 y FoxP3, mientras que en la Expansión no.

---

## Perspectivas

Deben realizarse ensayos de Inducción y Expansión con exosomas provenientes de otras líneas tumorales que representen otros subtipos tumorales, para corroborar que el efecto que tienen sobre los linfocitos T depende del grado de malignidad, más allá de la concentración.

Así como se determinó que existe la heterogeneidad de marcadores de exosomas en las vesículas purificadas, se debería determinar el contenido proteico y de material genético regulador (como miRNAs, LncRNA), para conocer los mecanismos subyacentes que participan en la regulación del fenotipo de linfocitos T, entre los marcadores interesantes están: mir-10, mir-17, mir-21, mir155, mir200, TGF $\beta$ , Wnt3a, entre otros.

Además de los marcadores de linfocitos T reguladores (CD25, FoxP3) se deben analizar marcadores que se relacionen con la función supresora como PD1, CTLA4 y Lag3; además de marcadores asociados a la migración del linfocito, pues como hemos descrito en los antecedentes, la localización de los linfocitos es de suma importancia en la interacción que tienen con las células tumorales y en otras células asociadas (fibroblasto, macrófagos).

En el caso de los linfocitos T reguladores que fueron favorecidos por los exosomas tumorales, sería conveniente corroborar su efecto en ensayos funcionales como de supresión.

---

## Referencias

1. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
2. Dekker, E., et al., *Colorectal cancer*. Lancet, 2019. **394**(10207): p. 1467-1480.
3. Dekker, E., et al., *Colorectal cancer*. The Lancet, 2019. **394**(10207): p. 1467-1480.
4. Guinney, J., et al., *The consensus molecular subtypes of colorectal cancer*. Nat Med, 2015. **21**(11): p. 1350-6.
5. Cervena, K., et al., *Methylation-Based Therapies for Colorectal Cancer*. Cells, 2020. **9**(6).
6. Cleries, R., et al., *Cálculo de la supervivencia relativa. Comparación de métodos de estimación de la supervivencia esperada*. Gaceta Sanitaria - GAC SANIT, 2006. **20**: p. 325-331.
7. El-Shami, K., et al., *American Cancer Society Colorectal Cancer Survivorship Care Guidelines*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(6): p. 428-55.
8. Romanus, D., et al., *Concordance with NCCN colorectal cancer guidelines and ASCO/NCCN quality measures: An NCCN institutional analysis*. Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN, 2009. **7**: p. 895-904.
9. Gupta, N., S.S. Kupfer, and A.M. Davis, *Colorectal Cancer Screening*. JAMA, 2019. **321**(20): p. 2022-2023.
10. Benson, A.B., et al., *NCCN Guidelines Insights: Colon Cancer, Version 2.2018*. J Natl Compr Canc Netw, 2018. **16**(4): p. 359-369.
11. Vera, R., et al., *Current controversies in the management of metastatic colorectal cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2015. **76**(4): p. 659-77.
12. Xie, Y.H., Y.X. Chen, and J.Y. Fang, *Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer*. Signal Transduct Target Ther, 2020. **5**(1): p. 22.
13. Kim, J.H., *Controversial issues in radiotherapy for rectal cancer: a systematic review*. Radiat Oncol J, 2017. **35**(4): p. 295-305.
14. Bray, S.M., et al., *Genomic characterization of intrinsic and acquired resistance to cetuximab in colorectal cancer patients*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 15365.
15. Misale, S., et al., *Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer*. Nature, 2012. **486**(7404): p. 532-536.
16. Sepulveda, A.R., et al., *Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline Summary From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and American Society of Clinical Oncology*. J Oncol Pract, 2017. **13**(5): p. 333-337.
17. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
18. Sánchez Alvarado, A., *Cellular Hyperproliferation and Cancer as Evolutionary Variables*. Current Biology, 2012. **22**(17): p. R772-R778.
19. Horne, S.D., S.A. Pollick, and H.H.Q. Heng, *Evolutionary mechanism unifies the hallmarks of cancer*. 2015. **136**(9): p. 2012-2021.
20. Binnewies, M., et al., *Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy*. Nature Medicine, 2018. **24**(5): p. 541-550.
21. Pagès, F., et al., *Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored*. Oncogene, 2010. **29**(8): p. 1093-1102.
22. Thorsson, V., et al., *The Immune Landscape of Cancer*. Immunity, 2018. **48**(4): p. 812-830 e14.

- 
23. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion*. Science, 2011. **331**(6024): p. 1565-1570.
  24. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion*. 2011. **331**(6024): p. 1565-1570.
  25. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The Three Es of Cancer Immunoediting*. 2004. **22**(1): p. 329-360.
  26. Mittal, D., et al., *New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape*. Current opinion in immunology, 2014. **27**: p. 16-25.
  27. Mascaux, C., et al., *Immune evasion before tumour invasion in early lung squamous carcinogenesis*. Nature, 2019. **571**(7766): p. 570-575.
  28. Mlecnik, B., et al., *The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis*. Science Translational Medicine, 2016. **8**(327): p. 327ra26-327ra26.
  29. Galon, J., et al., *Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1960-1964.
  30. Salama, P., et al., *Tumor-Infiltrating FOXP3+ T Regulatory Cells Show Strong Prognostic Significance in Colorectal Cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(2): p. 186-192.
  31. Zeitoun, G., et al., *The Immunoscore in the Clinical Practice of Patients with Colon and Rectal Cancers*. Chirurgia (Bucur), 2019. **114**(2): p. 152-161.
  32. Maby, P., A. Corneau, and J. Galon, *Phenotyping of tumor infiltrating immune cells using mass-cytometry (CyTOF)*. Methods Enzymol, 2020. **632**: p. 339-368.
  33. Galon, J. and D. Bruni, *Tumor Immunology and Tumor Evolution: Intertwined Histories*. Immunity, 2020. **52**(1): p. 55-81.
  34. Luu, M., U. Steinhoff, and A. Visekruna, *Functional heterogeneity of gut-resident regulatory T cells*. Clinical & translational immunology, 2017. **6**(9): p. e156-e156.
  35. Russler-Germain, E.V., S. Rengarajan, and C.S. Hsieh, *Antigen-specific regulatory T-cell responses to intestinal microbiota*. Mucosal immunology, 2017. **10**(6): p. 1375-1386.
  36. Zhang, B., et al., *Circulating and Tumor-Infiltrating Myeloid-Derived Suppressor Cells in Patients with Colorectal Carcinoma*. PLOS ONE, 2013. **8**(2): p. e57114.
  37. Chen, J. and Z. Chen, *The effect of immune microenvironment on the progression and prognosis of colorectal cancer*. Medical Oncology, 2014. **31**(8): p. 82.
  38. Tanoue, T., K. Atarashi, and K. Honda, *Development and maintenance of intestinal regulatory T cells*. Nature Reviews Immunology, 2016. **16**(5): p. 295-309.
  39. Tanoue, T., K. Atarashi, and K. Honda, *Development and maintenance of intestinal regulatory T cells*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(5): p. 295-309.
  40. Sinicrope, F.A., et al., *Intraepithelial Effector (CD3<sup>+</sup>)/Regulatory (FoxP3<sup>+</sup>) T-Cell Ratio Predicts a Clinical Outcome of Human Colon Carcinoma*. Gastroenterology, 2009. **137**(4): p. 1270-1279.
  41. Shang, B., et al., *Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis*. Scientific Reports, 2015. **5**(1): p. 15179.
  42. deLeeuw, R.J., et al., *The Prognostic Value of FoxP3+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Cancer: A Critical Review of the Literature*. Clinical Cancer Research, 2012. **18**(11): p. 3022.
  43. Kim, M., et al., *Expression of Foxp3 in Colorectal Cancer but Not in Treg Cells Correlates with Disease Progression in Patients with Colorectal Cancer*. PLOS ONE, 2013. **8**(1): p. e53630.
  44. Saito, T., et al., *Two FOXP3(+)/CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers*. Nat Med, 2016. **22**(6): p. 679-84.
  45. Mathieu, M., et al., *Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication*. Nat Cell Biol, 2019. **21**(1): p. 9-17.
-

- 
46. Kalluri, R. and V.S. LeBleu, *The biology and function and biomedical applications of exosomes*. Science, 2020. **367**(6478): p. eaau6977.
  47. Colombo, M., et al., *Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 24): p. 5553-65.
  48. El Andaloussi, S., et al., *Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities*. Nature Reviews Drug Discovery, 2013. **12**(5): p. 347-357.
  49. van Niel, G., G. D'Angelo, and G. Raposo, *Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2018. **19**(4): p. 213-228.
  50. Hoshino, A., et al., *Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis*. Nature, 2015. **527**(7578): p. 329-335.
  51. Franzen, C.A., et al., *Urothelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition after exposure to muscle invasive bladder cancer exosomes*. Oncogenesis, 2015. **4**: p. e163.
  52. Baumgart, S., et al., *Exosomes of invasive urothelial carcinoma cells are characterized by a specific miRNA expression signature*. Oncotarget, 2017. **8**(35): p. 58278-58291.
  53. Schillaci, O., et al., *Exosomes from metastatic cancer cells transfer amoeboid phenotype to non-metastatic cells and increase endothelial permeability: their emerging role in tumor heterogeneity*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 4711.
  54. Rahman, M.A., et al., *Lung cancer exosomes as drivers of epithelial mesenchymal transition*. Oncotarget, 2016. **7**(34): p. 54852-54866.
  55. Chen, L., et al., *HCC-derived exosomes elicit HCC progression and recurrence by epithelial-mesenchymal transition through MAPK/ERK signalling pathway*. Cell Death Dis, 2018. **9**(5): p. 513.
  56. Tang, Y.T., et al., *Alterations in exosomal miRNA profile upon epithelial-mesenchymal transition in human lung cancer cell lines*. BMC Genomics, 2018. **19**(1): p. 802.
  57. Harris, D.A., et al., *Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0117495.
  58. Ramteke, A., et al., *Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules*. Mol Carcinog, 2015. **54**(7): p. 554-65.
  59. Fu, Q., et al., *Primary tumor-derived exosomes facilitate metastasis by regulating adhesion of circulating tumor cells via SMAD3 in liver cancer*. Oncogene, 2018. **37**(47): p. 6105-6118.
  60. Zhang, H., et al., *Exosome-delivered EGFR regulates liver microenvironment to promote gastric cancer liver metastasis*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15016.
  61. Maybruck, B.T., et al., *Tumor-derived exosomes induce CD8(+) T cell suppressors*. J Immunother Cancer, 2017. **5**(1): p. 65.
  62. Szajnik, M., et al., *Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg)*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11469.
  63. Yamada, N., et al., *Colorectal cancer cell-derived extracellular vesicles induce phenotypic alteration of T cells into tumor-growth supporting cells with transforming growth factor- $\beta$ 1-mediated suppression*. Oncotarget, 2016. **7**(19): p. 27033-27043.
  64. Temoche-Diaz, M.M., et al., *Distinct mechanisms of microRNA sorting into cancer cell-derived extracellular vesicle subtypes*. eLife, 2019. **8**: p. e47544.
  65. Schwarzenbach, H. and P.B. Gahan, *MicroRNA Shuttle from Cell-To-Cell by Exosomes and Its Impact in Cancer*. Non-coding RNA, 2019. **5**(1): p. 28.
  66. Lu, L.F., et al., *Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 80-91.
-

- 
67. Yang, H.Y., et al., *MicroRNA-17 Modulates Regulatory T Cell Function by Targeting Co-regulators of the Foxp3 Transcription Factor*. *Immunity*, 2016. **45**(1): p. 83-93.
  68. Jeker, L.T., et al., *MicroRNA 10a marks regulatory T cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e36684.
  69. Hsu, Y.L., et al., *Hypoxic lung cancer-secreted exosomal miR-23a increased angiogenesis and vascular permeability by targeting prolyl hydroxylase and tight junction protein ZO-1*. *Oncogene*, 2017. **36**: p. 4929.
  70. Kucharzewska, P., et al., *Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013. **110**(18): p. 7312-7317.
  71. Zanoni, M., et al., *3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 19103.
  72. Paullin, T., et al., *Spheroid growth in ovarian cancer alters transcriptome responses for stress pathways and epigenetic responses*. *PLoS One*, 2017. **12**(8): p. e0182930.
  73. Boo, L., et al., *MiRNA Transcriptome Profiling of Spheroid-Enriched Cells with Cancer Stem Cell Properties in Human Breast MCF-7 Cell Line*. *Int J Biol Sci*, 2016. **12**(4): p. 427-45.
  74. Muller, L., et al., *Human tumor-derived exosomes (TEX) regulate Treg functions via cell surface signaling rather than uptake mechanisms*. *Oncoimmunology*, 2017. **6**(8): p. e1261243.
  75. Mrizak, D., et al., *Effect of nasopharyngeal carcinoma-derived exosomes on human regulatory T cells*. *J Natl Cancer Inst*, 2015. **107**(1): p. 363.
  76. Muller, L., et al., *Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 20254.
  77. Schuler, P.J., et al., *Human CD4+ CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells*. *Clin Exp Immunol*, 2014. **177**(2): p. 531-43.
  78. Li, W., et al., *Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 13856.
  79. Lopes-Rodrigues, V., et al., *ALIX protein analysis: storage temperature may impair results*. *Journal of Molecular and Clinical Medicine*, 2019. **2**: p. 29.
  80. Vinod, R., et al., *Nanoparticle-Aided Detection of Colorectal Cancer-Associated Glycoconjugates of Extracellular Vesicles in Human Serum*. *International journal of molecular sciences*, 2021. **22**(19): p. 10329.
  81. Yamada, N., et al., *Colorectal cancer cell-derived extracellular vesicles induce phenotypic alteration of T cells into tumor-growth supporting cells with transforming growth factor- $\beta$ 1-mediated suppression*. *Oncotarget*, 2016. **7**(19).
  82. Kuwahara, T., et al., *Intratumoural-infiltrating CD4 + and FOXP3 + T cells as strong positive predictive markers for the prognosis of resectable colorectal cancer*. *British Journal of Cancer*, 2019. **121**(8): p. 659-665.
  83. Zheng, L., C.J. Kelly, and S.P. Colgan, *Physiologic hypoxia and oxygen homeostasis in the healthy intestine. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2015. **309**(6): p. C350-C360.
  84. van Loosdregt, J., et al., *Canonical Wnt Signaling Negatively Modulates Regulatory T Cell Function*. *Immunity*, 2013. **39**(2): p. 298-310.
-