



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

SECRECIÓN DE LA CITOCINA TGF- β POR CÉLULAS DE MELANOMA

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

PRESENTA

ANA CAROLINA MOTA LÓPEZ

ASESOR DEL TEMA: DRA. MARINA MACÍAS SILVA (IFC, UNAM)

SUPERVISOR TÉCNICO: Dra. Mitzi Paulina Pérez Calixto (IFC, UNAM)



Ciudad Universitaria, CD.MX.

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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: ORTEGA MUÑOZ RAQUEL

VOCAL: Profesor: TOBON CORNEJO SANDRA

SECRETARIO: Profesor: MACIAS SILVA MARINA

1er. SUPLENTE: Profesor: GARCIA LOZANO ALBERTO

2° SUPLENTE: Profesor: VAZQUEZ MARTINEZ EDGAR RICARDO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR, DEPARTAMENTO DE BIOLÓGIA CELULAR Y
DESARROLLO. LABORATORIO 224 NTE**

ASESOR DEL TEMA: DRA. MARINA MACÍAS SILVA

SUPERVISOR TÉCNICO: Dra. Mitzi Paulina Pérez Calixto

SUSTENTANTE:

ANA CAROLINA MOTA LÓPEZ

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

El presente trabajo se realizó en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la Tutoría de la Dra. Marina Macías Silva en el Instituto de Fisiología Celular y bajo la supervisión técnica de la Dra. Mitzi P. Pérez Calixto. Este trabajo recibió el apoyo financiero del proyecto No. IV200220 de PAPIIT, DGAPA, UNAM.

A los miembros de mi Jurado de examen: Doctora Sandra Tobón Cornejo y M. en C. Raquel Ortega Muñoz, por la revisión y los comentarios sobre mi trabajo.

A la Biol. Marcela Sosa Garrocho, Técnica Académica del laboratorio, por su apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del Taller de Mantenimiento del IFC, UNAM: el Ing. Aurey Lobato Galván y el Ing. Manuel Ortínez Benavides, por su apoyo con el mantenimiento del equipo del laboratorio.

A los miembros de la Unidad de Cómputo del IFC, UNAM, por su apoyo técnico y servicios prestados: M. en C. Gerardo Coello Coutiño, M. en C. Ana María Escalante Gonzalbo, Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo, Ing. Ivett Rosas Arciniega e Ing. Francisco Pérez Eugenio.

Índice

Lista de abreviaturas	7
Glosario	10
Resumen del trabajo	18
Capítulo 1. Introducción	19
1.1 Hipótesis.....	21
1.2 Objetivo General	21
1.3 Objetivos específicos	21
1.4 Metodología de la investigación	22
Capítulo 2. Cáncer	25
2.1 Características del cáncer	26
2.1.1 Señalización proliferativa sostenida	26
2.1.2 Evasión de supresores de crecimiento.....	27
2.1.3 Evasión de la apoptosis	27
2.1.4 Adquisición de inmortalidad replicativa	29
2.1.5 Mutación e inestabilidad genética	29
2.1.6 Inducción de angiogénesis.....	30
2.1.7 Invasión y metástasis	31
2.1.8 Desregularización energética celular.....	32
2.1.9 Evasión de la destrucción por el sistema inmune.....	32
2.1.10 Inflamación promovida por el tumor	33
2.2 Microambiente tumoral.....	34
Capítulo 3. Melanoma	36
Capítulo 4. La citocina TGF- β	46
4.1 Vías de señalización	49
4.2 Ski y SnoN	50
4.3 TGF- β y melanoma.....	51
4.4 Secreción del TGF- β	52
Capítulo 5. Vesículas extracelulares	54
5.1 Biogénesis de las vesículas extracelulares	56
5.2 Liberación de las vesículas extracelulares	59
5.3 Internalización de las vesículas extracelulares en las células blanco	60
5.4 Vesículas extracelulares provenientes de tumores	64

5.5 Vesículas extracelulares y melanoma	67
Capítulo 6. Técnicas de aislamiento y caracterización de EV	72
6.1 Ultracentrifugación	72
6.2 Ultrafiltración	74
6.3 ELISA	74
6.4 Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)	75
6.5 Dispersión dinámica de luz (DLS)	75
6.6 Citometría de flujo	76
6.7 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	76
6.8 Western blot	77
6.9 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)	77
Conclusiones	83
Bibliografía	84

Índice de figuras

Figura 1. Componentes del TME.	35
Figura 2. Daño a queratinocitos y producción de melanina.	37
Figura 3. Clasificación de melanomas: CSD y non-CSD.	39
Figura 4. Patrones histopatológicos de melanoma	40
Figura 5. Estructura del TGF- β	47
Figura 6. Estructura de los receptores TGF- β RI y TGF- β RII.	48
Figura 7. Vías de señalización del TGF- β	50
Figura 8. Biogénesis de los diferentes tipos de vesículas extracelulares.	55
Figura 9. Biogénesis de exosomas.	58
Figura 10. Proteínas presentes en la superficie de las vesículas extracelulares... 61	
Figura 11. Internalización de vesículas extracelulares.....	63
Figura 12. Fusión con la membrana plasmática	64
Figura 13. Modelo propuesto de la vía de secreción de un exosoma portador de TGF- β , a partir de células de melanoma.....	70
Figura 14. Diagrama de flujo del proceso de ultracentrifugación para purificar vesículas extracelulares del tipo exosomas.	73

Índice de tablas

Tabla 1. Mutaciones comunes en el melanoma	45
Tabla 2. Marcadores moleculares para identificar microvesículas y exosomas	56
Tabla 3. Características de las diferentes subpoblaciones de vesículas extracelulares y sus efectos en cáncer.	66
Tabla 4. Exosomas secretados por células de melanoma.....	69
Tabla 5. Principales técnicas para la caracterización biológica y física de vesículas extracelulares	79

Lista de abreviaturas

Akt	Proteína cinasa B
ALIX	Proteína de interacción de muerte celular programada 6
BMP	Proteína morfogénica ósea
BRAF	Homólogo B del oncogén viral del sarcoma murinoRaf
CAF	Fibroblastos asociados a cáncer
CD	Células dendríticas
CDKN1b	Inhibidor 1B de cinasa dependiente de ciclina
CDKN2A	Inhibidor 2A de cinasa dependiente de ciclina
CDK4	Cinasa dependiente de ciclina 4
CDK6	Cinasa dependiente de ciclina 6
CSD	Daño crónico ocasionado por la exposición al sol
Non-CSD	Daño no ocasionado por la exposición al sol
CSPG4	Proteoglicano asociado al melanoma sulfato de condroitina
ECM	Matriz extracelular
EMT	Transición epitelio-mesénquima
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
ESCRT	Complejos de clasificación endosómica necesarios para la maquinaria de transporte
EV	Vesícula extracelular
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GM3	Gangliósidos GM3
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1
HSP70	Proteína de shock térmico de 70 KDa
HSP90	Proteína de shock térmico de 90 KDa
ICAM	Moléculas de adhesión celular

ILV	Vesícula intraluminal
IL-3	Interleucina-3
IL-6	Interleucina-6
KRAS	Homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten 2
LAP	Proteína asociada a latencia
LLC	Complejo latente grande
MAPK	Proteína cinasas activadas por mitógenos
MART-1	Antígeno de melanoma reconocido por las células T
MEK	cinasa activada por mitógeno
MITF	Factor de transcripción asociado con microftalmia
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
MSCs	Células troncales mesenquimales
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
MV	Microvesículas
MVBs	Cuerpos multivesiculares
MWCO	Corte de peso molecular
NRAS	Homólogo del oncogén viral RAS del neuroblastoma
PD-1	Proteína de muerte celular programada 1
PD-L1	Ligando de muerte celular programada 1
PI3K	Fosfatidilinositoil 3 cinasa
PKB	Proteína cinasa B
POMC	Proopiomelanocortina
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
RAF	Protooncogénserina/threonina-proteína cinasa
RB	Proteína del retinoblastoma
RTK	Receptor de tirosina cinasa

SIM	Sustancia inhibidora mülleriana
SLC	Complejo latente pequeño
TF	Factor tisular
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
TME	Microambiente tumoral
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VPS4	Proteína asociada al <i>sorting</i> de proteínas vacuolares 4
VTA1	Homólogo de la proteína VTA1 asociada al <i>sorting</i> de proteínas vacuolares

Glosario

Akt (*protein kinase B PKB*): proteína cinasa de residuos de serina/treonina que actúa en la vía de señalización intracelular PI3K/Akt, involucrada especialmente en la señalización de crecimiento y sobrevivencia celular (Albertset *et al.*, 2014).

ALIX (*PDCD6IP, programmed cell-death 6 interacting protein*): proteína citosólica que participa en el tráfico vesicular, al unirse con las proteínas del complejo ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) (Mahul-Mellieret *et al.*, 2009).

Anexina V: proteína citoplasmática que se une a membranas que exponen fosfolípidos cargados negativamente de una manera dependiente de Ca^{2+} . Se puede unir a fosfatidilserina, por lo cual se puede marcar con fluorescencia y utilizar para para detectar las células apoptóticas (Crowleyet *et al.*, 2016; Linet *et al.*, 2020).

BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*): proteínas que participan en la morfogénesis durante el desarrollo embrionario. También participan en la regulación de las propiedades de las células troncales. Su vía de señalización implica la fosforilación y traslocación al núcleo de las proteínas Smad (1, 5 y 8) (Lizarraga, 2018) .

BRAF (*protooncogen B-raf u homólogo B del oncogen viral del sarcoma murino v-raf*): cinasa de residuos de serina-treonina regulada por RAS y es un activador de la vía de señalización de MAPK. La mutación de este gen se encuentra en varios tipos de cáncer, incluyendo melanoma, adenocarcinoma de colon, carcinoma de tiroides, entre otros (Ritterhouse&Barletta, 2015).

Caveolina-1: principal componente de las caveolas, es una proteína que está involucrada en la endocitosis independiente de receptores, en la mecanotransducción y en la homeostasis de lípidos (van Niel *et al.*, 2018).

CD9 o Antígeno leucocitario MIC 3: proteína involucrada en la migración y agregación plaquetaria; involucrada en la adhesión y movilidad celular, así como en la metástasis (Alvarez *et al.*, 2016).

CD40 (*Cluster of differentiation 40*): traduce señales de activación para macrófagos y linfocitos B que llevan a la secreción de anticuerpos (Alvarez *et al.*, 2016).

CD63 o LAMP-3 (Proteína 3 de membrana asociada a lisosomas): tetraspanina que regula la malignidad en varios tipos de cáncer como el melanoma y el cáncer de mama y sirve como un marcador potencial para la detección del cáncer (Song *et al.*, 2020).

CD81 (Tetraspanina 28): esta proteína es una tetraspanina involucrada en la adhesión celular y en la regulación del crecimiento del linfoma. Promueve la fusión de las células musculares y da soporte para mantener el microtúbulo. Puede estar implicada en la transducción de señales (Alvarez *et al.*, 2016).

CDKN1b: gen que codifica para la proteína p27Kip1, que fue por primera vez caracterizada como un inhibidor del progreso del ciclo celular, por su habilidad de unirse y regular una amplia gama de complejos de cinasas dependientes de ciclina (cyclin-CDK) (Cusan *et al.*, 2018).

CDKN2A: es un gen supresor de tumores que codifica a la proteína p16INK4a. El silenciamiento de este gen está altamente asociado con la regulación alterada del ciclo celular durante la carcinogénesis (Zhao *et al.*, 2016).

CDK4 (*Cyclin-dependent kinase-4*): cinasa dependiente de ciclinas que tiene un papel importante en la proliferación de las células de mamíferos, donde ayuda a impulsar la progresión de las células hacia la fase de síntesis de DNA (Fase S) del ciclo de división celular (Sherret *et al.*, 2016).

CDK6 (*Cyclin-dependent kinase-6*): cinasa dependiente de ciclinas que facilita la progresión de las células a través de la fase G1 temprana del ciclo celular, al formar complejos con las ciclinas de tipo D (D1, D2 y D3) y con CDK4 (Nebenfuehr *et al.*, 2020).

Célula Th1: un tipo de célula T ayudadora que secreta interferón-gamma para ayudar a activar a macrófagos y células B, para cambiar el tipo de anticuerpo que producen (Alberts *et al.*, 2014).

Célula Th2: un tipo de célula T ayudadora que secreta IL-17, que recluta neutrófilos y estimula una respuesta inflamatoria (Alberts et al., 2014).

Citocromo C: componente soluble de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. Es liberado al citosol desde el espacio intermembranal mitocondrial, iniciando la apoptosis (Alberts et al., 2014).

CSPG4 (*Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan*): proteína transmembranal de un solo paso transmembranal, codificada por el cromosoma 15. Se cree que CSPG4 participa en varios procesos de desarrollo y homeostasis en múltiples tipos de células, pues puede activar la señalización de MAPK, PI3K y AKT. Además, se expresa en diferentes tipos de cáncer como el melanoma, la leucemia, el glioma, el cáncer de cabeza y cuello, y los cánceres mesenquimales (Harreret al., 2019).

EMT (*Epithelial-Mesenchymal Transition*): proceso por el cual las células epiteliales adquieren características de un fenotipo mesenquimal y pierden su polaridad y sus contactos célula-célula, lo cual está asociado con el aumento de la capacidad migratoria e invasiva (Sontheimer-Phelpset al., 2019).

ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*): Tipo de proteína cinasa de residuos de serina/treonina. Es una proteína de señalización intracelular que participa en la transducción de señales de los mitógenos. ERK normalmente está localizada en el citoplasma y cuando se activa entra al núcleo para regular la actividad de factores transcripcionales y la expresión genética. Forma parte de la familia de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Guoet al., 2020).

Fas: Receptor transmembranal de muerte que inicia la apoptosis cuando se une a su ligando extracelular (ligando Fas) (Alberts et al., 2014).

FGFs (*Fibroblast growth factors*): Factores de crecimiento que regulan una amplia gama de funciones celulares, incluyendo la migración, proliferación, diferenciación y sobrevivencia. La señalización de los FGFs tiene un papel importante en el desarrollo, metabolismo y homeostasis del tejido. El mal funcionamiento de los receptores FGF se observa en varias enfermedades humanas, como son craneosinostosis congénita y síndromes de enanismo, así

como en la enfermedad renal crónica (ERC), obesidad, resistencia a la insulina y varios tumores (Xie *et al.*, 2020) .

GM3: Gangliósido clasificado como una proteína de membrana con un dominio catalítico en el lado luminal. Los gangliósidos participan en diferentes actividades celulares al formar complejos dinámicos funcionales llamados balsas lípidicas (Inokuchi *et al.*, 2018).

HIF-1 (*Hipoxia Inducible Factor 1*): Regulador transcripcional responsable por la inducción de genes que facilitan la adaptación y la supervivencia de células y del organismo completo de normoxia (21% O₂) a hipoxia (1% O₂) (Ke & Costa, 2006).

Hippo pathway: Vía de señalización conservada evolutivamente que regula varios procesos biológicos, incluyendo el crecimiento celular, el tamaño de órganos y su regeneración (Ma *et al.*, 2019).

HSP70 (*Heat shock protein 70*): Proteína que actúa como chaperona y tiene propiedades citoprotectoras cuando la célula se encuentra bajo estrés. HSP70 también está involucrada en el crecimiento y proliferación celular, y la diferenciación de eritrocitos durante su formación (Kumar *et al.*, 2016).

HSP90 (*Heat shock protein 90*): Chaperona molecular que participa en diversos procesos biológicos que requieren una variedad de mecanismos reguladores coordinados para controlar su actividad. Las proteínas citoplasmáticas Hsp90 son necesarias para una gran cantidad de procesos biológicos, incluida la adaptación al estrés (Prodromou, 2016).

ICAM (*Intra-Cellular Adhesion Molecule*): Ligandos de superficie celular para las integrinas de los leucocitos y son cruciales en la unión de linfocitos y otras células blancas, como las células presentadoras de antígeno (APC) y las endoteliales. Son miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (Murphy & Weaver, 2019).

ILVs (*Intraluminal Vesicles*): vesículas que se encuentran dentro de los cuerpos multivesiculares (MVBs) con un diámetro entre 30-100 nm. Las ILVs son mediadoras en el transporte de las proteínas y lípidos a los lisosomas para su

degradación. Al ser liberadas de manera extracelular, son llamados exosomas (Alenquer & Amorim, 2015; Gruenberg, 2020).

Interleucina-3 (IL-3): citocina para células hematopoyéticas; estimula la formación de colonias en las líneas de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, eritroides, macrófagos y monocítica, pero no en células linfoides (Owen *et al.*, 2014).

Interleucina- 6 (IL-6): citocina que regula las funciones de las células B y T; IL-6 tiene efectos *in vivo* sobre la hematopoyesis. Induce inflamación y la respuesta de fase aguda (Owen *et al.*, 2014).

KRAS (*Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog*): protooncogen que codifica para una pequeña proteína GTPasa, la cual pertenece a la superfamilia de las proteínas RAS. KRAS sirve como sensor para la activación de moléculas de señalización, permitiendo la transmisión de señales de transducción desde la superficie celular hasta el núcleo; afecta diferentes procesos celulares como la diferenciación, crecimiento, quimiotaxis y apoptosis. RAS es uno de los oncogenes más mutados en diferentes tipos de cáncer humano (Liu *et al.*, 2019).

MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*): vía de transmisión de señales que juega un papel importante en varios procesos fisiológicos en las células, tales como el crecimiento, desarrollo, división y muerte celular. Su desregularización conlleva a la metastásis tumoral (Guo *et al.*, 2020).

MART-1 (*Melanoma antigen recognized by T-cells*): proteína citoplasmática que se encuentra en los melanocitos normales de la piel y la retina. También se encuentra en la mayoría de los melanomas (Ohsie *et al.*, 2008)

MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*): representa un factor de transcripción específico de los melanocitos. MITF puede regular múltiples procesos biológicos en las células del melanoma, como la diferenciación, la proliferación, la migración y la senescencia. MITF también ejerce un papel a favor de la supervivencia al activar la expresión de genes antiapoptóticos, incluidos BCL2A1, BCL2 y BIRC7 (Hartman & Czyz, 2015).

mTOR (*Target of Rapamycin*): la versión en mamíferos de la proteína kinasa TOR, involucrada en la señalización celular. Existe en dos complejos multiproteicos funcionalmente diferentes: TORC1 y TORC2 (Alberts *et al.*, 2014).

NF1: es un gen supresor de tumores que codifica para la proteína neurofibromina 1, la cual tiene como función principal subregular la activación de Ras unida a GTP. Por lo tanto, cualquier pérdida de función de neurofibromina, dada por mutaciones en NF1, resulta en la activación prolongada de la vía de señalización RAS/RAF/MAPK y a su vez, en la pérdida del control de crecimiento y en un aumento de la proliferación celular (Philpott *et al.*, 2017).

Notch pathway: vía de señalización crucial en la regulación y desarrollo de la homeóstasis en diferentes tejidos. La actividad anormal de esta vía está relacionada con el inicio y la progresión de varias neoplasias malignas, ya que Notch puede ser oncogénico o supresor de tumores, dependiendo del contexto celular (Nowell & Radtke, 2017).

NRAS (*Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*): es una de las isoformas de la proteína RAS que se expresa en todas las células y forma parte de la vía de señalización de MAPK, la cual contribuye significativamente al desarrollo del melanoma (Dumaz *et al.*, 2019).

p16: proteína supresora de tumores, codificada por el gen CDKN2A. p16 está involucrada en la regulación de dos vías celulares: p53 y RB1. La inactivación genética de p16 frecuentemente se encuentra en los diferentes tipos de cáncer, entre ellos el melanoma (Serra & Chetty, 2018).

p14: proteína supresora de tumores, codificada por el gen CDKN2A. La proteína p14 contrarresta los estímulos oncogénicos inhibiendo la progresión del ciclo celular e induciendo la apoptosis. Teniendo en cuenta que p14 es un supresor de tumores, no es sorprendente que la mayoría de los cánceres humanos, incluyendo el melanoma, se caractericen por la inactivación de p14, principalmente debido a la hipermetilación de su promotor, a deleciones y mutaciones homocigotas (Cilluffo *et al.*, 2020).

p53: gen supresor de tumores que se encuentra mutado en aproximadamente la mitad de los cánceres humanos. Codifica para un regulador transcripcional que es activado por DNA dañado y que se involucra en bloquear el progreso del ciclo celular (Alberts *et al.*, 2014).

PD-1 (*programmed cell death protein 1*): desempeña un papel vital en la inhibición de las respuestas inmunitarias y en la promoción de la auto-tolerancia mediante la modulación de la actividad de las células T, activando la apoptosis de las células T específicas de antígeno e inhibiendo la apoptosis de las células T reguladoras (Han *et al.*, 2020).

PD-L1 (*programmed cell death ligand 1*): proteína transmembranal que se considera un factor co-inhibidor de la respuesta inmune, puede combinarse con PD-1 para reducir la proliferación de células PD-1 positivas, inhibir la secreción de citocinas e inducir apoptosis. PD-L1 también tiene un papel importante en varias neoplasias donde puede atenuar la respuesta inmune del huésped a las células tumorales (Han *et al.*, 2020).

PKB (*protein kinase B*): conocida también como Akt, es una proteína que tiene un papel en el metabolismo celular, el crecimiento, la proliferación y la supervivencia. Su activación está controlada por un proceso de múltiples pasos que involucra PI3K (Hemmings&Restuccia, 2012).

PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog deleted on Chromosome 10*): fosfatasa dual con actividades de fosfatasa de proteínas y de lípidos. PTEN es un regulador crítico del crecimiento y la supervivencia celular, así como del metabolismo. La pérdida de PTEN promueve la tumorigénesis en múltiples órganos (Ma *et al.*, 2019).

Rab GTPasa: GTPasa monomérica de la superfamilia Ras, presente en el citoplasma y en las membranas de los organelos en su estado de unión a GTP. Está involucrada en conferir especificidad en el acoplamiento molecular (Alberts *et al.*, 2014).

Ras: GTPasa monomérica de la superfamilia Ras que ayuda a transmitir las señales de los receptores de superficie celular con actividad de cinasa de residuos de

tirosina (RTK) al núcleo, frecuentemente es activada en respuesta a las señales que estimulan la división celular (Alberts *et al.*, 2014).

RB (Proteína de retinoblastoma): proteína supresora de tumores involucrada en la regulación de la división celular. Está mutada en el cáncer de retinoblastoma, así como en muchos otros tipos de cánceres. En condiciones normales, su actividad regula el ciclo celular de las células eucariotas, al unirse e inhibir a las proteínas E2F y así bloquear la progresión de la replicación del DNA y la división celular (Alberts *et al.*, 2014).

RTKs (Receptor Tyrosine Kinases): juegan un papel importante en el crecimiento celular, la motilidad, la diferenciación y la supervivencia (Paul & Hristova, 2019).

SMAD: factores transcripcionales latentes que son fosforilados y activados por un receptor con actividad de cinasa de residuos de serina/treonina y llevan la señal de la superficie celular al núcleo (Alberts *et al.*, 2014).

TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α): Factor de necrosis tumoral- α . Una citocina proinflamatoria (Alberts *et al.*, 2014).

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor): factor de crecimiento con una importante actividad pro-angiogénica, pues tiene efectos mitogénicos y anti-apoptóticos en las células endoteliales, aumentando la permeabilidad vascular y promoviendo la migración celular (Melincovici *et al.*, 2018).

Wnt: miembro de la familia de proteínas de señalización secretadas que tienen muchos roles diferentes en el control de la diferenciación celular, proliferación y expresión genética en embiones animales y tejidos adultos (Alberts *et al.*, 2014).

WNT/ β -catenin pathway: vía de señalización activada por la unión de la proteína Wnt a sus receptores en la superficie celular. La vía tiene varias ramas: la activación de la rama canónica causa el aumento en la cantidad de β -catenina que entra en el núcleo, donde regula la transcripción de genes que controlan la diferenciación celular y la proliferación. La sobreactivación de esta vía puede llevar al desarrollo de cáncer (Alberts *et al.*, 2014).

Resumen del trabajo

La citocina TGF- β tiene un papel dual en el desarrollo y progresión del melanoma, ya que en las etapas de iniciación del cáncer actúa como un supresor de tumores, mientras que en las fases avanzadas ayuda a las células cancerosas a realizar los procesos de invasión y metástasis.

En el presente trabajo se realizó una investigación bibliográfica sobre los mecanismos de secreción del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) por las células de melanoma, en particular su secreción en vesículas extracelulares. Las vesículas extracelulares están involucradas en la comunicación intercelular y pueden ser clasificadas de acuerdo con su tamaño en: 1) exosomas con un tamaño de 30-150 nm y 2) microvesículas con un tamaño de 100-1000 nm. En el melanoma, se han identificado a los exosomas como el tipo de vesículas secretadas en mayor proporción.

Como resultado del análisis de los artículos de investigación y revisión recabados, se encontró que la citocina TGF- β puede ser portada por proteoglicanos, integrinas y moléculas de adhesión (ICAM), en la superficie de vesículas extracelulares del tipo exosomas, que son secretadas por las células cancerosas, como las de melanoma. Los exosomas secretados por las células de melanoma y portadores de la citocina TGF- β pueden además contener biomoléculas tales como mRNAs, proteínas y DNA. Los exosomas al entrar en contacto con las células no cancerosas en el microambiente tumoral (TME) pueden promover un fenotipo maligno, la supervivencia celular, la degradación de la matriz extracelular y contrarrestar la respuesta inmune, favoreciendo así la progresión de la enfermedad.

Capítulo 1. Introducción

El melanoma es una tumoración maligna de estirpe neuroectodérmica que se origina en los melanocitos, los cuales se encuentran en la capa basal de la epidermis. La importancia del melanoma radica en que es el cáncer de piel más mortal, pues 1 de cada 24 personas en el mundo puede desarrollar la enfermedad. En México, la incidencia de melanoma es de 1.01 por cada 100,000 habitantes (Lino-Silva *et al.*, 2016). En la última década se han identificado varias vías de señalización que son críticas en la génesis del melanoma y que permiten comprender algunos de sus mecanismos de regulación, entre las que se encuentran: Ras/Raf/MEK/ERK y Ras/PI3K/PTEN/Akt/mTOR, así como la vía de la citocina conocida como factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).

El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) es una citocina multifuncional que comúnmente es expresada por todas las células del cuerpo humano y juega un papel importante en el desarrollo embrionario y en el mantenimiento de la homeostasis celular. La vía de señalización de la citocina TGF- β regula procesos patológicos, como el cáncer; en este caso, el TGF- β tiene un papel dual en la tumorigénesis, ya sea como promotor o bien como supresor de tumores, dependiendo de la etapa del tumor. Los componentes de la vía de señalización del TGF- β son frecuentemente modificados durante la progresión del tumor, por cambios en su expresión o en su actividad. Previamente a la iniciación y durante la progresión tumoral temprana, el TGF- β actúa como un supresor de tumores; sin embargo, en las siguientes fases de la carcinogénesis actúa como promotor tumoral (VanderArk *et al.*, 2018). El conocimiento de los mecanismos a través de los cuales la vía del TGF- β regula la progresión tumoral, el proceso de metástasis y la resistencia a diversos tratamientos, proporciona herramientas para sensibilizar a las células malignas al tratamiento con agentes quimioterapéuticos más eficaces contra el melanoma.

La comunicación intercelular en el microambiente tumoral es muy importante en el desarrollo del cáncer; esta comunicación puede llevarse a cabo por medio de vesículas extracelulares. El TGF- β puede viajar en estas vesículas extracelulares y

así participar en la regulación de las funciones de las diferentes células presentes en un tumor.

Las vesículas extracelulares (EV) provenientes de tumores inducen a las células receptoras hacia un fenotipo promotor del tumor, manteniéndose involucradas en las diferentes etapas del desarrollo del cáncer. Las EV son partículas liberadas por las células, que pueden ser clasificadas de acuerdo con su tamaño en: microvesículas y exosomas. Las microvesículas tienen un diámetro de 100 a 1000 nm y los exosomas van de un rango de 30 a 100 nm de diámetro y juegan un papel importante en la mediación de la comunicación intercelular bajo condiciones fisiológicas y patológicas (Bierie & Moses, 2006).

Al ser las EV de gran relevancia como mediadores clave en la progresión del cáncer, es importante contar con técnicas para su aislamiento y para su caracterización biológica y física. Es posible utilizar parámetros como estructura y morfología, tamaño, propiedades ópticas, densidad y cuantificación de biomoléculas, para así poder lograr su detección a través de marcadores biomoleculares (Xavier *et al.*, 2020). En el presente trabajo, nos hemos centrado en investigar la secreción del TGF- β por medio de exosomas derivados de células de melanoma y su relación con el desarrollo y la progresión del cáncer.

1.1 Hipótesis

La revisión bibliográfica permitirá establecer que los exosomas son un tipo de vesículas extracelulares secretadas por las células de melanoma, los cuales pueden llevar en su carga molecular a la forma latente de la citocina TGF- β , unida a proteínas portadoras aún no identificadas. Al entrar en contacto los exosomas con las células blanco presentes en el microambiente tumoral, la citocina TGF- β es capaz de activar su cascada de señalización y generar respuestas celulares que favorezcan la progresión tumoral.

1.2 Objetivo General

Estudiar los mecanismos de acción y de secreción de la citocina TGF- β por las células de melanoma.

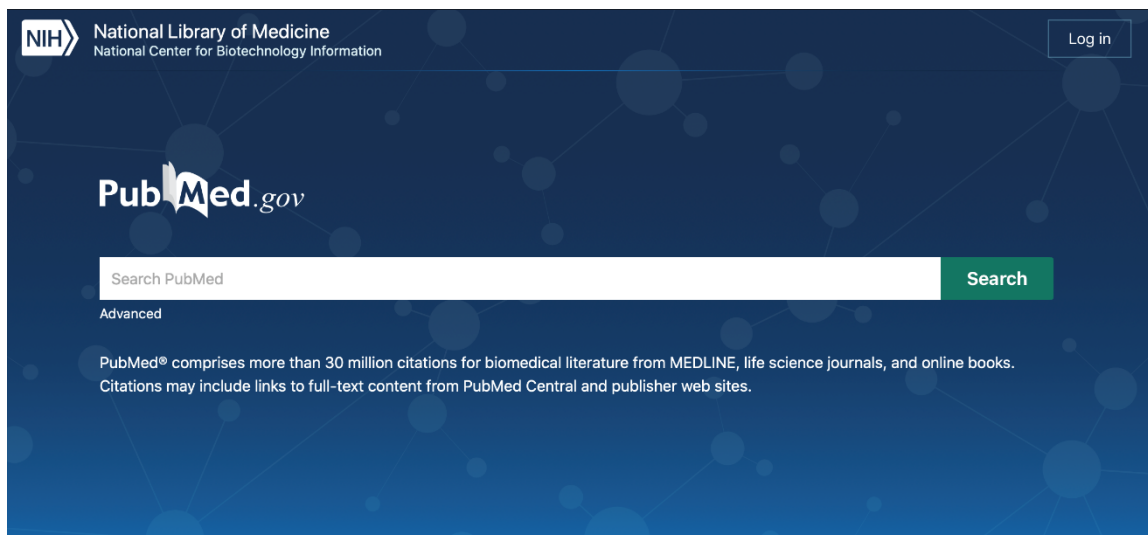
1.3 Objetivos específicos

1. Llevar a cabo una investigación en la literatura científica sobre las características de los exosomas que secretan las células de melanoma.
2. Recopilar información sobre las proteínas portadoras de la citocina TGF- β en vesículas extracelulares secretadas por células de melanoma.
3. Analizar la implicación de las vesículas extracelulares portadoras de la citocina TGF- β en la progresión del melanoma.
4. Describir las metodologías más utilizadas en el aislamiento y caracterización de las vesículas extracelulares secretadas por células cancerosas.

1.4 Metodología de la investigación

La metodología empleada para realizar el presente trabajo contiene las características propias de un trabajo monográfico de actualización, según la UNAM. A continuación, se detallan las etapas del desarrollo de la investigación:

1. Selección y delimitación del tema.
2. Planteamiento de la hipótesis, objetivo general y objetivos específicos.
3. Selección de la información: se realizó una revisión exhaustiva de artículos de investigación y artículos de revisión publicados en revistas especializadas, así como de capítulos de libros, utilizando las bases de datos bibliográficas: Pubmed y ScienceDirect. Las palabras claves que se utilizaron en la búsqueda fueron: *cáncer*, *hallmarks del cáncer*, *melanoma*, *TGF- β* , *TME (Tumor Microenvironment)*, *vesículas extracelulares*, *exosomas*, *técnicas de caracterización de vesículas extracelulares*.



Showing 3169 publications

Filter by journal or book title


 Are you looking for a specific article or book chapter? Use [advanced search](#).

Refine publications by

Domain

 Biochemistry, Genetics and 

 Subdomain 

Publication type

 Journals

 Books

 Textbooks 
 Handbooks

 Reference works

A
ABC Proteins

 From Bacteria to Man
Book • 2003

Academia to Biotechnology

 Career Changes at Any Stage
Book • 2005

Acetylcholine

 An Approach to the Molecular Mechanism of Action
Book • 1973

Achievements in the Life Sciences

 Journal • *Open access*
Acoustic Communication in Birds

 Production, Perception & Design Features of Sounds
Book • 1983

A

B

C

D

E

F

G

H

I

J

K


L

M

N

O

P

 Help improve this page 

4. Planteamiento de la estructura y capitulación del trabajo monográfico: la información más importante se abordó en cuatro secciones: 1) cáncer, 2) la citocina TGF- β , 3) vesículas extracelulares, y 4) técnicas de aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares.

5. Análisis y proceso de selección de la información: La elección de la información se basó en su actualidad y su relevancia; posteriormente, se elaboraron cinco tablas con el fin de resumir la información y facilitar la escritura; en la primera tabla se vació información sobre las principales mutaciones en melanoma, en la segunda tabla se contrastan marcadores biomoleculares de microvesículas y exosomas, en la tercera tabla la información relevante de las características de vesículas extracelulares y sus efectos en el cáncer, en la cuarta tabla se plasmó la información respecto a los exosomas de melanoma, y por último en la quinta tabla se hizo una recopilación de las técnicas estandarizadas para la caracterización de las vesículas extracelulares. También se elaboraron 14 figuras con el *software* de Picktochart, que se describen con mayor detalle en cada capítulo.

6. Organización y redacción del trabajo monográfico de actualización.
7. Revisión y corrección del trabajo.

Capítulo 2. Cáncer

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación de células de forma incontrolada, el cual puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo (OMS, 2018). Las células cancerosas presentan de manera general dos propiedades: 1) la proliferación incontrolada de las células y de sus progenitores, desafiando las limitaciones normales; y 2) la invasión y colonización de otros tejidos. Cuando las células sólo tienen la primera propiedad, forman un tumor benigno debido a que proliferan de manera excesiva, pero se mantienen aglomeradas en una sola masa. Por otro lado, un tumor es maligno cuando las células que lo forman tienen la capacidad de invadir el tejido que lo rodea (Alberts *et al.*, 2014).

Las células de un tumor canceroso pueden llegar a desprenderse del tumor primario y entrar al torrente sanguíneo o a los ganglios linfáticos, donde forman tumores secundarios (metástasis) en diferentes partes del cuerpo (Alberts *et al.*, 2014). El proceso por el cual las células normales se transforman en cancerosas se denomina carcinogénesis. Dicho cambio se deriva por alteraciones en el material genético, es decir, mutaciones, las cuales le confieren a la célula la capacidad de dividirse a mayor velocidad, además su descendencia conserva la mutación (Catherine Sánchez, 2013). Estas mutaciones se denominan “conductoras” por su habilidad de orientar el proceso de tumorigénesis, confiriéndoles ventajas a las células cancerosas respecto a las células normales (Martínez-Jiménez *et al.*, 2020).

Existen varias vías de señalización celular que regulan la expresión de genes del metabolismo y el aumento en la actividad de las enzimas sintetizadas, tales como: PI3K/AKT, MAPK, Hippo, Notch, Wnt, TGF- β /BMP y FGF. Sin embargo, la desregularización de estas vías contribuye a defectos en la transducción de sus señales, suministrando energía para la proliferación celular ilimitada (Dempkeet *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2020). En 2011, Douglas Hanahan y Robert Weinberg, en su artículo titulado: *The Hallmarks of Cancer* (Hanahan & Weinberg, 2011), describieron 10 características (*hallmarks*) del cáncer, que a continuación se describirán brevemente.

2.1 Características del cáncer

2.1.1 Señalización proliferativa sostenida

Las células normales requieren de señales de crecimiento antes de pasar a un estado activo de proliferación. Estas señales son transmitidas a las células por los receptores de membrana que unen a moléculas de señalización, como los factores de crecimiento, los componentes de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés *Extracellular Matrix*) y algunas moléculas de adhesión célula-célula. Ningún tipo de célula normal puede proliferar en la ausencia de estas señales; no obstante, se ha observado que las células cancerosas tienen una baja dependencia de las señales de otras células para su supervivencia, crecimiento y división. Esto se debe a que contienen mutaciones, activantes o inactivantes, en componentes de algunas vías de señalización, como: MAPK, PI3K/AKT y TGF- β , que normalmente responden a dichos estímulos mitogénicos (Alberts *et al.*, 2014).

Además, las células tumorales se duplican aceleradamente, ya que su velocidad de proliferación es mayor a la del tejido normal de origen. Esto se debe a que su ciclo celular y sus puntos de control se encuentran desregulados, activando oncogenes y apagando a genes supresores de tumores (de Vaca *et al.*, 2018). Las células cancerosas pueden mantener la señalización proliferativa a través de la producción de ligandos como los factores de crecimiento, resultando en una estimulación proliferativa autocrina (Hanahan & Weinberg, 2011). Tal es el caso del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el cual tiene efectos anti-proliferativos en las células normales; sin embargo, las células cancerosas evaden estos efectos. En tumores en estado avanzado, la señalización del TGF- β es redirigida a la activación de la programación celular al promover la transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés *Epithelial-Mesenchymal Transition*) y la migración, confiriendo características de alta malignidad a las células cancerosas (Hanahan & Weinberg, 2011).

2.1.2 Evasión de supresores de crecimiento

La evasión de la señalización supresora de crecimiento es una característica importante de las células cancerosas. Para mantener su proliferación, las células cancerosas deben esquivar las múltiples señales que regulan negativamente la proliferación celular. La pérdida del control de los mecanismos de crecimiento, permiten a las células cancerosas adquirir la habilidad de replicarse de una manera ilimitada, así como evadir la apoptosis y la senescencia dirigida por los supresores de tumores (Aminet *al.*, 2015).

Estas alteraciones en las células cancerosas involucran mutaciones en los genes supresores de tumores, como son los que codifican para la proteína asociada a retinoblastoma (RB) y para las proteínas TP53. La proteína RB integra señales extracelulares e intracelulares y decide si una célula debe proceder a través del ciclo celular, mientras que la proteína TP53 recibe señales de sensores de estrés y anomalías que funcionan dentro del sistema operativo intracelular. Además, las células cancerosas en fase avanzada pueden evadir los efectos anti-proliferativos del TGF- β , redirigiendo su señalamiento hacia la activación celular y confiriendo características asociadas a un alto grado de malignidad (Hanahan & Weinberg, 2011).

2.1.3 Evasión de la apoptosis

La muerte celular programada o apoptosis, es un proceso fisiológico de eliminación celular que está estrechamente regulado y caracterizado por una secuencia de cambios morfológicos, tales como: contracción celular, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear y celular, con formación de cuerpos apoptóticos que son engullidos por las células fagocíticas próximas, antes de que se pierda la integridad de la membrana (Pazo-Cid *et al.*, 2012). La maquinaria de apoptosis se puede dividir en: sensores y efectores. Los sensores monitorean el ambiente extracelular e intracelular, en búsqueda de condiciones normales o anormales que les indiquen si la célula debe vivir o morir. El segundo tipo de componentes funcionan como efectores de la muerte apoptótica y son regulados por los sensores.

Algunos ejemplos de inductores de muerte celular son las señales transmitidas por el ligando y el receptor FAS, asimismo, cuando el TNF- α (por sus siglas en inglés *Tumor Necrosis Factor-alpha*) se une a su receptor TNF-R1 (Hanahan & Weinberg, 2011). A diferencia de la necrosis que puede provocar una reacción inflamatoria, la apoptosis remueve las células de una manera silenciosa y paulatina, sin inducir inflamación. La inducción de la apoptosis está mediada principalmente por dos mecanismos: la vía extrínseca y la intrínseca. La vía extrínseca, también conocida como la vía de “receptores de muerte”, inicia cuando un ligando de muerte se une a su receptor en las células blanco y activan la vía de procaspasa 8 a caspasa 8, la cual causa una cascada de proteólisis responsable de la fase de ejecución de la apoptosis. Mientras que la vía intrínseca o mitocondrial, involucra una variedad de estímulos que actúan en múltiples blancos dentro de la célula, culminando en la formación y activación del apoptosoma. Este tipo de vía depende de los factores que son liberados por la mitocondria, como el citocromo C, el cual es un potente catalizador de la apoptosis (D’Arcy, 2019; Hanahan & Weinberg, 2011; Jave-Suárez *et al.*, 2015).

La evasión de la apoptosis es uno de los eventos cruciales que una célula desarrolla durante su proceso tumorigénico. Las células cancerosas son capaces de sobrevivir a niveles altos de estrés y de desequilibrio interno que llevarían a las células normales a apoptosis. Además, las células cancerosas pueden sobrevivir y proliferar en locaciones anormales, lo cual puede ser resultado de su habilidad para producir sus propias señales de supervivencia extracelulares y para suprimir la apoptosis programada (Alberts *et al.*, 2014). Por otra parte, las vías apoptóticas pueden ser alteradas por las células cancerosas de forma transcripcional, traduccional y postraduccional (Goldar *et al.*, 2015). Entre estas vías se encuentra la vía de PI3K-AKT/PKB, la cual transmite señales de supervivencia anti-apoptóticas y puede ser activada por factores extracelulares como la interleucina-3 (IL-3) o por la pérdida del gen supresor de tumores PTEN (Hanahan & Weinberg, 2011).

2.1.4 Adquisición de inmortalidad replicativa

Las células normales tienen un poder replicativo finito, después de haberse replicado durante cierto número de veces dejan de crecer, se dice que entran en un estado de senescencia; sin embargo, las células que tienen la habilidad de multiplicarse sin límite son llamadas inmortalizadas. Las células cancerosas tienen un potencial replicativo ilimitado, para poder generar tumores macroscópicos. Para lograr tener inmortalidad replicativa, las células deben superar dos barreras: la senescencia y el estado de crisis o apoptosis (Hanahan & Weinberg, 2011). La senescencia celular es un estado permanente de arresto del ciclo celular que promueve la remodelación de tejido durante el desarrollo y después de una lesión; además, contribuye al decaimiento del potencial regenerativo y a la función de los tejidos, la inflamación y la tumorigenesis en organismos envejecidos (Hernandez-Segura *et al.*, 2018).

Además, las células cancerosas pueden proliferar indefinidamente, ya que reactivan la producción de telomerasa, permitiendo que la longitud del telómero se mantenga (Alberts *et al.*, 2014). Los telómeros son estructuras especiales de cromatina, que son esenciales para proteger las regiones de la punta de los cromosomas, evitando su recombinación y su degradación; los telómeros están compuestos por secuencias repetidas de TTAGG, las cuales se van perdiendo en cada división celular debido a la replicación lineal incompleta de los cromosomas, esto acorta su tamaño. La telomerasa, es una DNA polimerasa que puede elongar los telómeros. En las células de cáncer, la alta expresión de telomerasa previene el acortamiento de los telómeros y mantiene la viabilidad de la célula (Blasco, 2005).

2.1.5 Mutación e inestabilidad genética

La mayoría de las células cancerosas son genéticamente inestables, es decir que tienen mutaciones que interfieren con la replicación y el mantenimiento del genoma, causando que aumenten la tasa de mutación y que tengan un número anormal de cromosomas (Alberts *et al.*, 2014). Los protooncogenes son un grupo de genes que al ser mutados favorecen que las células normales se transformen en células

cancerosas. Los protooncogenes son genes normales que codifican para proteínas relacionadas con la división celular, la inhibición de la diferenciación celular y la reducción de la muerte celular (Mierke, 2015). Cuando estos genes se encuentran mutados y esta mutación es de tipo dominante, es decir, sólo es necesario que uno de los alelos sufra una mutación para que la proteína que codifica gane funcionalidad, se llaman oncogenes y sus productos se conocen como oncoproteínas (Catherine Sánchez, 2013).

En otros genes, la mutación consiste en la destrucción de su función, lo cual es llamado pérdida de función y es recesiva, es decir que ambas copias del gen deben estar inactivas; su forma normal es llamada gen supresor de tumores. Los protooncogenes codifican para proteínas involucradas en vías de señalización que regulan la supervivencia, así como el crecimiento o la división celular, como por ejemplo están las vías: PI3K-AKT/mTOR e Hippo. Otras proteínas consideradas como supresoras de tumores forman parte de los procesos de reparación del DNA, de la respuesta al daño del DNA y de la modificación de la cromatina, así como las proteínas que regulan el ciclo celular o la apoptosis. Sin embargo, los oncogenes codifican para oncoproteínas, cuya expresión está elevada en el cáncer, causando un aumento en la división celular, suprimiendo la diferenciación celular y bloqueando la muerte celular (Mierke, 2015; Park *et al.*, 2020).

2.1.6 Inducción de angiogénesis

La angiogénesis es el proceso por el cual las células endoteliales de los vasos sanguíneos generan nuevos vasos, para suplir a las células de nutrientes y oxígeno. El comienzo de la angiogénesis de un tumor cancerígeno consiste en la secreción de factores de crecimiento por las células cancerosas al microambiente que las rodea, como por ejemplo el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF, por sus siglas en inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*). Estas moléculas activan la expresión de diferentes genes en las células del microambiente, para producir proteínas promotoras e inductoras del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. La neoangiogénesis ocurre en un tumor de cierto tamaño y aumenta el estado de

malignidad. Un tumor sin un sistema vascular o sin vasos sanguíneos cercanos, dejará de crecer en una fase temprana y en un diámetro de 1-2 mm (Mierke, 2015).

La red vascular tumoral tiene características morfológicas diferentes. Los altos niveles de factores de crecimiento secretados por las células tumorales, entre ellos los miembros de la familia del TGF- β , causan que los vasos sanguíneos sean inmaduros, es decir que no funcionen de manera adecuada. Al mismo tiempo, la conexión entre las células perivasculares con la membrana basal y las células endoteliales se deteriora, causando permeabilidad vascular, lo cual puede ayudar a las células tumorales a entrar al torrente sanguíneo. Por último, los vasos sanguíneos son comprimidos por el crecimiento celular, limitando la perfusión y a su vez causando una disminución en el suministro de oxígeno y nutrientes, resultando en la formación de un microambiente hipóxico; esto favorece la selección de las clonas que pueden resistir estas duras condiciones microambientales (Viallard & Larrivé, 2017).

2.1.7 Invasión y metástasis

Las células cancerosas se propagan al invadir al tejido adyacente al tumor. La invasión es definida como la penetración al tejido normal por células individuales o por un grupo compacto de células tumorales. Los diferentes patrones histológicos de los tumores y el comportamiento observado de las células cancerosas, sugieren diferentes formas de invasión dependiendo del tipo celular, así como diferentes mecanismos inducidos por el microambiente local. Es importante mencionar, que algunos tipos de cáncer progresan a través del proceso EMT, en el cual se presenta una expresión genética pro-invasiva y una señalización celular que debilita la adhesión típica célula-célula. Estudios *in vitro* sugieren que la EMT incrementa la motilidad e invasión celular, por lo tanto, promueve la metástasis (Friedl *et al.*, 2012).

La diseminación de las células cancerosas ocurre a través de una cascada metastásica de invasión, la cual involucra múltiples pasos: la invasión local de las células primarias cancerosas al sistema vascular, como la sangre o los vasos linfáticos (intravasación), su transporte a través de todo el cuerpo por el flujo de los vasos, su acumulación en los microvasos en tejidos distantes, su posibilidad de

transmigración a través del recubrimiento de los vasos (extravasación), la invasión del parénquima del tejido objetivo y la construcción de agregados (*clusters*) celulares que eventualmente pueden crecer a metástasis macroscópicas. Todos los neoplasmas tienen en principio la posibilidad de hacer metástasis, pero no todos lo hacen. Esto está relacionado con el microambiente tumoral, la agresividad de un subtipo de células cancerosas dentro del tumor primario y del inicio de un tratamiento. El potencial metastásico de las células de cáncer depende de sus interacciones con factores homeostáticos que facilitan el crecimiento celular del tumor primario, la supervivencia, la angiogénesis, la invasión y la metástasis (Mierke, 2015).

2.1.8 Desregularización energética celular

Las células tumorales reprograman su metabolismo energético para cubrir sus altas demandas bioenergéticas, para mantener un crecimiento rápido y descontrolado. A diferencia de los tejidos normales, la mayoría de las células cancerosas presentan cambios dependientes de la glucólisis aerobia, lo cual se conoce como efecto Warburg. El aumento de la glucólisis aerobia confiere ventajas proliferativas a las células cancerosas al generar fuentes energéticas, como ATP e intermediarios de carbono para la biosíntesis (Mendiola & Cruz, 2014).

Otra característica del metabolismo de las células cancerosas es la habilidad de adquirir los nutrientes necesarios de un ambiente frecuentemente pobre en ellos y utilizarlos para mantener su viabilidad. Las células cancerosas contienen alteraciones en metabolitos extracelulares e intracelulares, lo cual tiene efectos en la expresión de genes, la diferenciación celular y el microambiente tumoral (Pavlova & Thompson, 2016).

2.1.9 Evasión de la destrucción por el sistema inmune

Las células de los tejidos del cuerpo humano están vigiladas por el sistema inmunológico, el cual es responsable de reconocer y eliminar la mayoría de las células cancerosas iniciales y los tumores nacientes. Sin embargo, las células cancerosas pueden evadir su destrucción por parte del sistema inmunológico. Los

mecanismos de evasión del sistema inmune incluyen: la selección de variantes celulares resistentes a los efectores inmunes y la formación progresiva de un ambiente inmunosupresor dentro del tumor.

Los mecanismos que los tumores explotan para evitar las respuestas inmunológicas incluyen: la presentación de antígenos defectuosa, la presencia de células inmune reguladoras, la desregularización de los mediadores inmunosupresores como son las células T citotóxicas y las células dendríticas, la tolerancia y la desviación inmune. Algunos ejemplos de esto, donde está involucrada la citocina TGF- β , son: la inhibición de la maduración de las células dendríticas, la conversión de las células T CD4⁺ a células T reguladoras supresoras y el cambio en el balance de Th1 a Th2 (Hanahan & Weinberg, 2011; Vinay *et al.*, 2015).

2.1.10 Inflamación promovida por el tumor

La inflamación es un proceso que involucra la activación, el reclutamiento y la acción de la inmunidad innata y la adaptativa; este proceso es equitativamente importante en la reparación, la regeneración y la remodelación de tejidos (Greten & Grivennikov, 2019). La inflamación puede contribuir al desarrollo de varias características del cáncer, ya que sus efectores son importantes para el ambiente local. En algunos tipos de cáncer las condiciones inflamatorias se presentan antes de que los cambios malignos ocurran, es decir, estas condiciones aumentan el riesgo de desarrollar cáncer; esto se conoce como la vía extrínseca.

En cambio, en otros tipos de cáncer, un cambio oncogénico induce al microambiente inflamatorio que promueve el desarrollo de tumores; esta vía se conoce como intrínseca; en este caso, la inflamación puede suplir de moléculas bioactivas al microambiente tumoral. Las biomoléculas involucradas en este proceso son los factores de crecimiento, los de supervivencia, los promotores de angiogénesis y las enzimas extracelulares que facilitan la invasión y la metástasis; además de inducir la activación de la EMT (Hanahan & Weinberg, 2011; Mantovani *et al.*, 2008).

2.2 Microambiente tumoral

El microambiente tumoral (TME por sus siglas en inglés *Tumor Microenvironment*) es el ambiente extracelular en el que el tumor existe en el cuerpo humano, el cual incluye: los vasos sanguíneos, los fibroblastos, las células inmunitarias, las células inflamatorias provenientes de la médula ósea, los linfocitos y la matriz extracelular (Wang *et al.*, 2018); es donde ocurre la interacción entre las células malignas y las no transformadas (Balkwill *et al.*, 2012). El constante reclutamiento de las células sanas en conjunto con las necesidades metabólicas de las células cancerosas influye en la dinámica del metabolismo del tumor durante las fases del desarrollo del cáncer (Anastasiou, 2017). La evolución, estructura y actividad de las células en el TME tiene muchas similitudes con el proceso de inflamación y la sanación de heridas (Balkwill *et al.*, 2012).

La composición y estructura del TME depende del tipo de cáncer y de los pacientes; sin embargo, algunas células y características son comunes. En la Figura 1 se muestran los componentes celulares más relevantes y su función en el microambiente tumoral. El principal componente son las células endoteliales, las cuales tienen un papel importante en el desarrollo del tumor y en la protección de este, ya que llevan a cabo la formación de nuevos vasos sanguíneos. Sin embargo, los vasos resultantes tienen un lumen desequilibrado, resultando en filtraciones, desequilibrio del flujo de sangre, en la oxigenación y en la entrega de nutrientes y medicamentos al TME (Balkwill *et al.*, 2012). Después se encuentran las células inmunológicas, como los granulocitos, los linfocitos y los macrófagos; estas células están involucradas en la respuesta inmune de la inflamación promovida por el tumor. Por último, se encuentran los fibroblastos asociados al cáncer (CAF por sus siglas en inglés *Cancer Associated Fibroblasts*), los cuales permiten que las células cancerosas migren del tumor primario al torrente sanguíneo para realizar metástasis (Pathania & Challagundla, 2021).

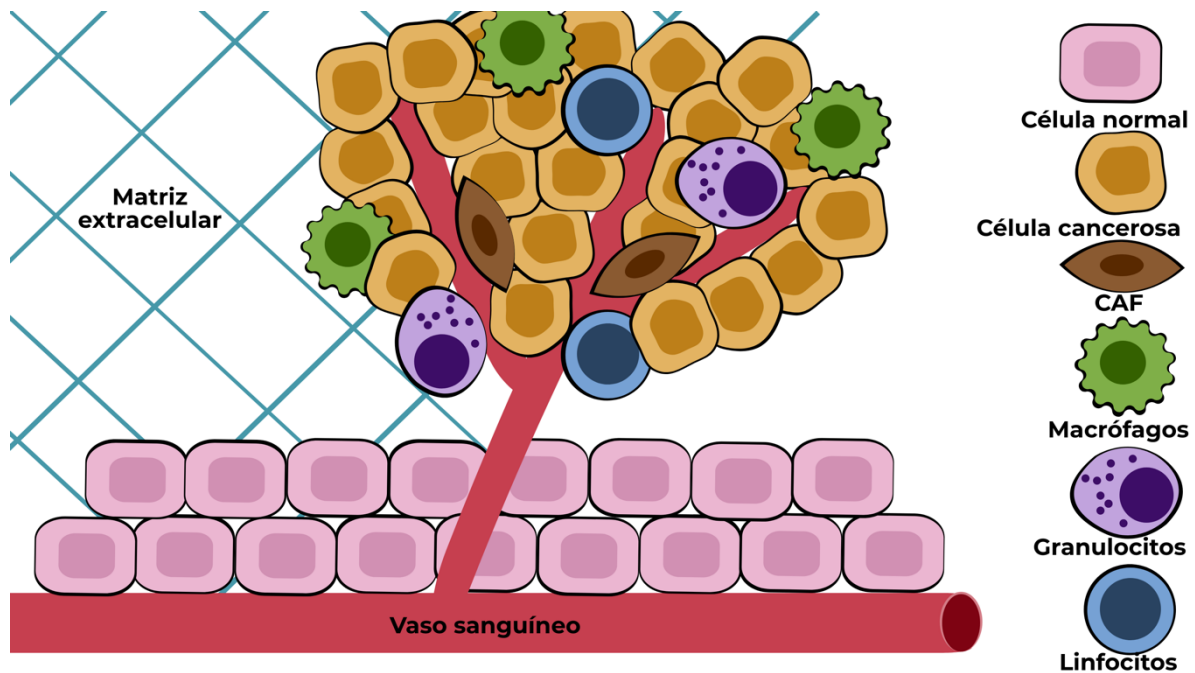


Figura 1. Componentes del TME. El microambiente tumoral (TME) consiste en células inmunes como son los linfocitos, los granulocitos y los macrófagos; así como de células estromales como los CAFs. La interacción entre las células del TME y las células endoteliales permite la regulación de la tumorigénesis y la progresión del cáncer.

El microambiente tumoral es reconocido como uno de los principales factores para el estudio de la progresión del cáncer. Además, contribuye a la resistencia a fármacos por parte de la enfermedad. La iniciación, el desarrollo y el progreso de los tumores es altamente dependiente de las interacciones entre las células cancerosas y las no malignas, dentro del microambiente tumoral. El tumor puede interactuar con el microambiente al emitir señales extracelulares, ya que las células cancerosas secretan varios factores como son las citocinas, quimiocinas, metabolitos y proteínas inhibitoras del crecimiento o promotoras del crecimiento. De esta manera, las células cancerosas logran reprogramar el microambiente hacia un ambiente favorable para el tumor e inducir la tolerancia inmunológica periférica (Balkwill *et al.*, 2012; Pathania & Challagundla, 2021; Shurin & Keskinov, 2016).

Capítulo 3. Melanoma

El melanoma es una enfermedad heterogénea, con mecanismos patógenos complejos, como consecuencia de alteraciones genéticas específicas dentro de varias vías moleculares funcionales, incluyendo a MAPK, RB, PI3K y P53. Se puede definir como una neoplasia maligna de los melanocitos, los cuales son células productoras de pigmento, de origen neuroectodérmico y son responsables de la coloración de la piel, los ojos y el pelo. El melanoma cutáneo es uno de los cánceres más comunes en adultos jóvenes en el rango de edad de 20-29 años. El área más común donde se presenta el melanoma son las extremidades, seguido de la cabeza y el cuello. El Melanoma Acral lentiginoso y el melanoma nodular son los más prevalentes en México, los cuales no están asociados con la exposición al sol (Aris, 2009; Lino-Silva *et al.*, 2016; G. Palmieri *et al.*, 2015; Schadendorf *et al.*, 2015).

La principal función de los melanocitos es proveer de melanina a los queratinocitos, los cuales son células predominantes en la epidermis y entre sus funciones se encuentran la formación de una barrera mecánica, la defensa inmunológica contra patógenos y la prevención de la pérdida de agua (Gniadecki, 1998). Los queratinocitos utilizan la melanina, molécula compleja que dispersa y absorbe la radiación UV, para proteger sus núcleos del daño al DNA inducido por la radiación UV (Shain & Bastian, 2016). La proliferación y producción de pigmento por parte de los melanocitos es estimulada cuando los queratinocitos presentan dicho daño en su núcleo. Los queratinocitos secretan a la hormona estimulante de los melanocitos (α MSH, por sus siglas en inglés *Melanocyte Stimulating Hormone*), la cual se une al receptor de melanocortina 1 (MC1R) expresado en los melanocitos, induciendo la síntesis de melanina (Figura 2). Por lo tanto, los melanocitos son de gran importancia en la respuesta celular a los rayos UV, ya que protegen a las células de la piel de un potencial daño al DNA (Shain & Bastian, 2016)).

Por otra parte, los melanocitos secretan un tipo especial de orgánulo llamado melanosoma, que mide aproximadamente 500 nm de diámetro. Son uno de los principales sitios de producción de melanina y por lo tanto son el organelo de mayor protección contra exposiciones dañinas. Como se muestra en la Figura 2, los melanosomas son producidos en los melanocitos mediante un complejo

mecanismo, regulado a nivel genético y proteico en respuesta a varios estímulos. Además, los melanosomas son transferidos directamente desde los melanocitos a los queratinocitos y parcialmente a través de citofagocitosis (Khan *et al.*, 2020).

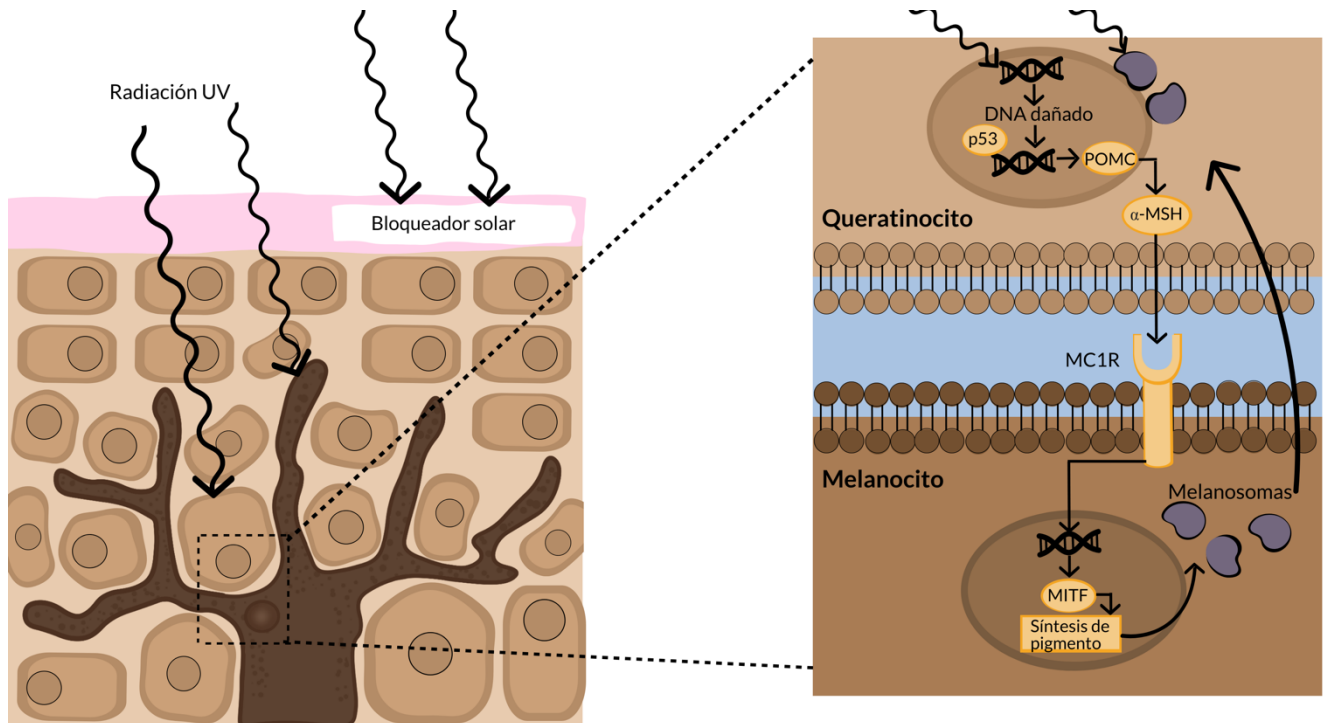


Figura 2. Daño a queratinocitos y producción de melanina. La radiación UV de una longitud de onda de aproximadamente 315-400 nm puede ocasionar daño al DNA en los queratinocitos, lo cual induce al gen p53 que estimula transcripcionalmente la expresión de POMC (proopiomelanocortina). Los queratinocitos procesan a la POMC de manera post-transcripcional y entonces secretan a la hormona estimulante de melanocitos alfa (α -MSH), la cual estimula al receptor de melanocortina 1 (MCR1) presente en los melanocitos. Esto causa la señalización de la vía de AMP cíclico, estimulando al factor de transcripción asociado con microftalmia (MITF) a sintetizar un pigmento dentro de los melanosomas. Por último, estos organelos son translocados a los queratinocitos para proteger su núcleo contra los daños ocasionados por la radiación UV. Imagen adaptada de (Schadendorf *et al.*, 2015).

El melanoma se puede clasificar de acuerdo con el grado de exposición al sol, es decir, si fue ocasionado por daño crónico por el sol o no (CSD o non-CSD, por sus siglas en inglés *Chronically Sun-Damaged*) (Figura 3). Los melanomas CSD surgen en la piel que muestra señales de exposición a la radiación UV a largo plazo. Dicha exposición causa un cambio degenerativo de las fibras elásticas de la dermis, lo cual se conoce como elastosis solar. Este tipo de melanomas ocurren principalmente en la cabeza, los hombros y en la superficie dorsal de las extremidades distales del cuerpo, en individuos mayores a 55 años. Además,

presentan alta carga de mutaciones en los genes BRAF (del inglés *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*), NRAS (del inglés *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*) y neufibromina (NF1, por sus siglas en inglés *Neurofibromatosis Type 1 Protein*). En cambio, los melanomas non-CSD se presentan en la zona del tronco y en las extremidades proximales de individuos menores de 55 años, que no muestran elastosis solar. Este tipo de melanoma está asociado con mutaciones en BRAF (Palmieri *et al.*, 2015; Shain & Bastian, 2016).

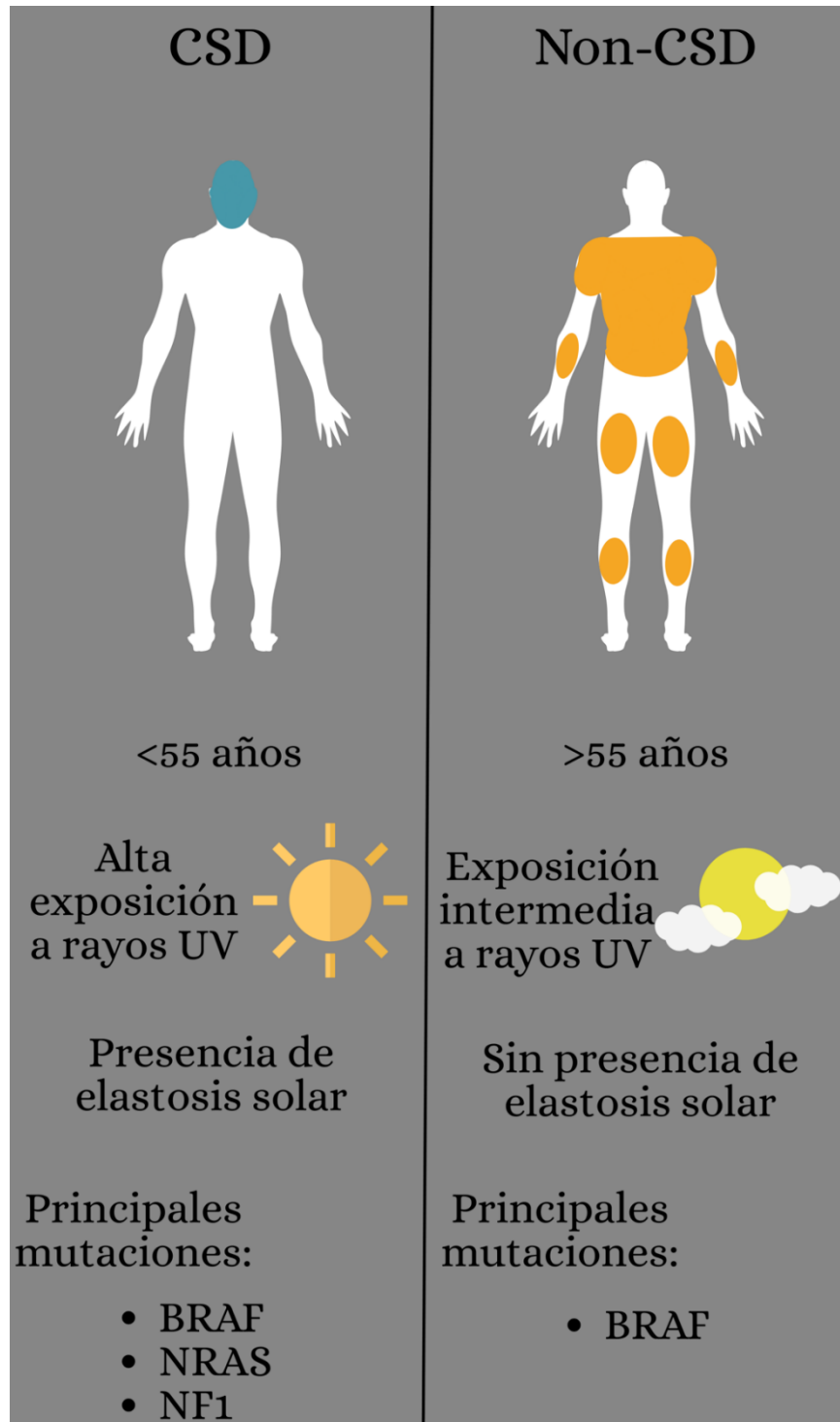


Figura 3. Clasificación de melanomas: CSD y non-CSD. Los melanomas causados por la exposición al sol difieren en aspectos clínicos, histopatológicos y moleculares. Los melanomas CSD (*chronically sun-damaged*) se localizan principalmente en la zona de la cabeza y el cuello, se presentan en personas menores a 55 años y son causados por una alta exposición a la radiación UV, lo cual ocasiona que los pacientes presenten elastosis solar. Por otra parte, los melanomas non-CSD se localizan en zonas con exposición solar media, como son las extremidades y el tronco; se presentan en personas mayores de 55 años y tienen una carga mutacional menor. Imagen adaptada de Shainet *al*, 2016.

El melanoma también se puede clasificar de acuerdo con el patrón de crecimiento del tumor, teniendo cuatro subtipos histopatológicos principales (Figura 4). El tipo más común es el melanoma de extensión superficial, el cual representa el 70% de los cánceres de melanoma y se caracteriza por un crecimiento radial u horizontal, con melanocitos organizados en nidos o de manera solitaria, mostrando un patrón pagetoide, es decir irregular (Figura 4a). El segundo tipo más común es el melanoma nodular. Según la sociedad canadiense de cáncer, el melanoma nodular constituye de un 15 a 20% de los casos de melanoma, el cual tiene un crecimiento vertical (Figura 4b). Un tercer tipo de melanoma es el lentigo maligno que tiene células que se dispersan en la unión dermoepidérmica o en estructuras complementarias de la piel, como son las uñas y los pelos en los seres humanos; además, muestra signos de daño crónico por radiación UV (Figura 4c). Por último, el melanoma acral lentiginoso constituye menos del 5% de los melanomas cutáneos y se caracteriza por tener células presentes como unidades solitarias a lo largo de la unión dermoepidérmica (Figura 4d) (Schadendorf *et al.*, 2015).

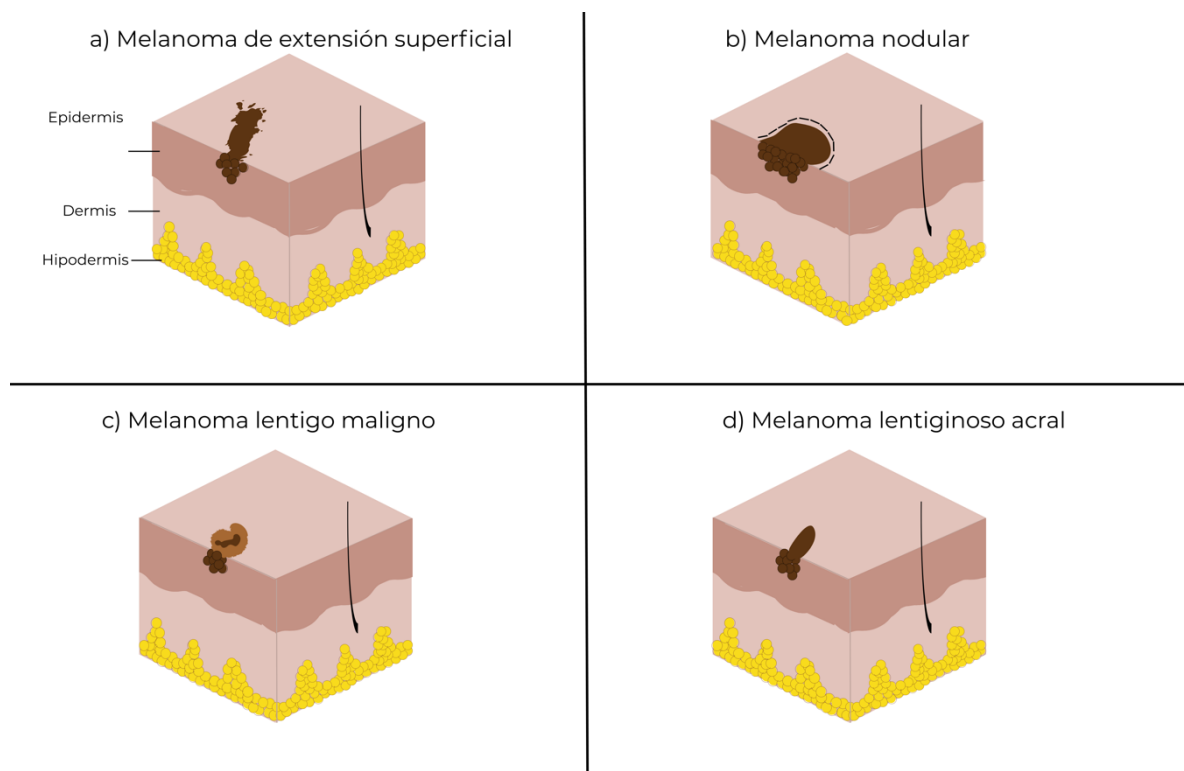


Figura 4. Patrones histopatológicos de melanoma. a) El melanoma de extensión superficial es descrito como una mancha asimétrica que tiene bordes irregulares. b) El melanoma nodular comienza como un lunar con superficie elevada y crece verticalmente. c) El melanoma lentigo maligno surge como un lunar de estructura irregular, conforme pasan los años crece y cambia

de color. d) El melanoma acral-lentiginoso aparece como una mancha irregular en las palmas de las manos o de los pies y también puede cambiar de coloración.

La transformación de melanocitos a melanoma requiere una compleja interacción entre eventos exógenos y endógenos. La primera fase consiste en que un melanocito normal adquiera una mutación conductora que lleva a una hiperplasia melanocítica y al desarrollo de un *nevo*. En esta etapa se cuenta con una baja carga de mutaciones y un bajo número de alteraciones. La siguiente fase es la expansión, donde el *nevo* melanocítico progresa a una lesión intermedia y posteriormente a un melanoma *in situ*. La lesión intermedia también se conoce como *nevo* displásico, el cual se define como una mancha café de al menos 5 mm de diámetro y que posee al menos dos de las siguientes características: pigmentación variable, así como asimetría y/o bordes irregulares. El *nevo* displásico muestra mayor carga de mutaciones que un *nevo* común (Eddy *et al.*, 2020; Schadendorf *et al.*, 2015; Shain & Bastian, 2016).

En cambio, el melanoma *in situ* se define como la proliferación de melanocitos con núcleos agrandados que crecen en un patrón irregular dentro de la epidermis. Esta etapa puede persistir por varios años antes de volverse un melanoma invasivo, indicando que el crecimiento invasivo requiere alteraciones genéticas adicionales; se piensa que esto se necesita para superar la dependencia del microambiente tumoral de la epidermis. Una vez que las células dejan el epitelio de la epidermis y entran al tejido mesenquimal subyacente como la dermis, el melanoma primario entra a la fase invasiva y se convierte en melanoma maligno. Esta fase se caracteriza por una alta carga mutacional y un aumento en las copias de las alteraciones (Eddy *et al.*, 2020; Shain & Bastian, 2016).

Por último, los melanomas se consideran metastásicos cuando sus células se han esparcido más allá del sitio del tumor primario y han colonizado otros tejidos. Para lograr esto, las células de melanoma atraviesan por el proceso de EMT, descrito anteriormente, y el cual les permite volverse células invasivas a través de los tejidos y entrar al torrente sanguíneo. Cuando se encuentran en circulación, las células del melanoma migran a un órgano blanco, normalmente empiezan por los ganglios linfáticos cercanos al tumor primario. Este proceso está mediado por la quimiotaxis a través de las uniones ligando-receptor específicas de las quimiocinas. Cabe

mencionar que solo del 20 al 40% de los melanomas surgen de *nevus* y siguen la trayectoria antes mencionada. El resto de los melanomas aparecen a partir *de novo*; sin embargo, este tipo de melanomas puede surgir de lesiones clínicamente indetectables, las cuales es probable que sigan la misma trayectoria (Eddy *et al.*, 2020; Shain & Bastian, 2016).

Como ya se mencionó anteriormente, los principales factores de riesgo causantes del melanoma son la exposición a la radiación solar y la predisposición genética. De todos los cánceres humanos, el melanoma es el que más porta mutaciones (Eddy *et al.*, 2020). Ciertas mutaciones son consideradas mutaciones conductoras, las cuales probablemente inician la transformación melanocítica, así como los primeros pasos de la formación de un tumor, el progreso y la diseminación de la enfermedad. Las alteraciones genéticas en el melanoma ocurren en moléculas como: BRAF, NF1, NRAS, entre otras. Dichas mutaciones causan una activación inapropiada en las vías de señalización de MAPK, RB, PI3K y P53. La activación anormal de estas vías promueve el crecimiento del tumor y la resistencia a fármacos (Hood, 2019; Palmieri *et al.*, 2015).

El gen BRAF proporciona instrucciones para fabricar una proteína que ayuda a transmitir señales químicas desde fuera de la célula hasta el núcleo de la célula. Esta proteína es parte de una vía de señalización conocida como la vía RAS/MAPK, que controla varias funciones celulares importantes. La vía RAS/MAPK específicamente regula el crecimiento y la división (proliferación) de las células, así como procesos por los cuales las células maduran para llevar a cabo funciones celulares específicas como la diferenciación, el movimiento (migración o metástasis en el caso de las células tumorales) y la apoptosis. En los melanocitos, BRAF induce la activación de la cinasa MEK, que activa al efector final de la cascada, la cinasa ERK (de Vaca *et al.*, 2018; Palmieri *et al.*, 2015).

Las mutaciones en BRAF típicamente ocurren en pacientes jóvenes, están menos asociadas con el daño UV y están presentes en melanomas localizados en áreas de la piel que no son expuestas al sol de manera crónica. Este gen está mutado en aproximadamente 50% de los casos, siendo el remplazo de ácido glutámico por valina en el codón 600, la mutación más prevalente. A pesar de esto, ha sido

demostrado que la mutación en BRAF está presente en los nevos comunes, sugiriendo que su activación es necesaria pero no suficiente para desarrollar melanoma (Palmieri *et al.*, 2015, 2018).

RAS es una superfamilia de proteínas GTPasas pequeñas que regulan el crecimiento celular, la supervivencia y la diferenciación, que juegan un papel importante en transmitir la señalización de los receptores RTK a varias vías de señalización río abajo, en particular a MAPK y PI3K. Estas proteínas G pequeñas se encuentran unidas a la membrana citoplasmática y se dividen en tres isoformas específicas de tejido: HRAS, KRAS y NRAS. La mutación en NRAS es la más detectada entre este grupo, con un 20-25% de los casos. Dicha mutación ocurre por la sustitución de glutamina por leucina en el codón Q61 y rara vez se encuentra presente en los nevos melanocíticos benignos, al menos que sean congénitos. En comparación con BRAF, los pacientes con la mutación NRAS tienden a ser mayores, con patrones de exposición crónica a UV, las lesiones se localizan en las extremidades y tienen mayor nivel de mitosis (Muñoz-Couselo *et al.*, 2017; G. Palmieri *et al.*, 2018; Vanni *et al.*, 2020).

NF1 es un gen que codifica para la proteína citoplasmática neurofibromina 1, que está involucrada en la vía RAS, como un supresor de tumores a través de su actividad de GAP (por sus siglas en inglés, *GTPase-activating protein*) que convierte RAS-GTP activo a RAS-GDP inactivo. Esta mutación está presente en alrededor del 10-15% de los melanomas. Los melanomas con mutación de NF1, presentan señales marcadas de mutaciones ocasionadas por la exposición a UV. Además, la pérdida de función de NF1 ha sido relacionada con un aumento en la resistencia a los inhibidores de BRAF y MEK (Palmieri *et al.*, 2018; Vanni *et al.*, 2020).

El gen CDKN2A (por sus siglas en inglés, *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*) es un supresor de tumores y codifica para dos proteínas: p16 y p14, que funcionan como inhibidores de la progresión de G1, a través de diferentes mecanismos. La proteína p16 bloquea la progresión de G1, al unirse con CDK4 y CDK6; esta unión evita la interacción con ciclinas D y la fosforilación de la proteína RB; en consecuencia, p16 afecta la progresión del ciclo celular. La inactivación de p16 se debe a deleciones o mutaciones o por mecanismos epigenéticos, como la metilación

de su gen. La alteración de este supresor de tumores está relacionada con la progresión de la enfermedad, ya que no se encuentra en los *nevus* pero sí en el tumor primario y aumenta en los melanomas metastásicos (Palmieri *et al.*, 2015, 2018; Vanni *et al.*, 2020).

PTEN es un gen que codifica para la enzima fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa que regula negativamente la vía de señalización PI3K, la cual incluye a efectores como las proteínas AKT y mTOR. Esta vía de señalización es un fuerte regulador del crecimiento y la supervivencia del melanoma. La delección o inactivación de PTEN resulta en una activación constitutiva de AKT; la combinación de ambos estímulos resulta en el crecimiento aberrante de las células neoplásicas, con adquisición de la resistencia a apoptosis. Por otra parte, las mutaciones en PTEN normalmente coexisten con las mutaciones en BRAF, sugiriendo que la activación tanto de MAPK como de PI3K son necesarias para el progreso del melanoma. En cambio, la mutación en PTEN y la mutación en NRAS son mutuamente excluyentes, ya que NRAS puede activar la cascada de PI3K de manera independiente (Palmieri *et al.*, 2015; Vanni *et al.*, 2020).

Por último, se encuentra el gen supresor de tumores TP53, el cual es conocido como el “guardián del genoma”, ya que ayuda a prevenir que las células se dividan de manera descontrolada y promueve la apoptosis. La pérdida de función en TP53 se reporta como un evento tardío en el desarrollo del melanoma (Vanni *et al.*, 2020).

En la tabla 1 se muestra un resumen de las mutaciones más comunes en el melanoma antes mencionadas.

Tabla 1. Mutaciones comunes en el melanoma. Resumen de los genes mutados en el melanoma. Se indica la vía de señalización en donde participan, el tipo de mutación presente, la clasificación del melanoma que ocasiona, el % de incidencia en los casos y la fase del desarrollo en la que aparecen (Kaufman *et al*, 2016; Shain *et al*, 2016; Vanniet *et al*, 2020).

Gen	Vía	Tipo de mutación	Clasificación	% de incidencia	Fase
BRAF	MAPK	Ganancia de función (activación)	CSD	50	Iniciación
NRAS			Non-CSD		
NF1		Pérdida de función (delección)	CSD	15-30	
CDKN2A	RB	Gen hipermetilado (inactivación)	CSD	50	Progresión
PTEN	P13K	Pérdida de función (inactivación)	Non-CSD		
TP53	p53	Ganancia de función (amplificación)	CSD	1.3	Progresión avanzada

Las células de melanoma expresan y secretan altos niveles de TGF- β , el cual puede señalar a través de las vías que se encuentran alteradas en esta enfermedad. Esta citocina funciona como supresora de tumores bajo condiciones normales y en células premalignas. Sin embargo, las células cancerosas llegan a evadir dichos efectos y a utilizar al TGF- β a su conveniencia, es decir para iniciar la evasión inmune, así como promover la producción de factores de crecimiento, la diferenciación hacia un fenotipo invasivo y la diseminación metastática (Massagué, 2008; Perrot *et al.*, 2013).

Capítulo 4. La citocina TGF- β

El TGF- β representa una familia evolutivamente conservada de factores polipéptidos secretados, que regulan muchas funciones de señalamiento que controlan múltiples procesos celulares como la diferenciación, la proliferación y la motilidad específica de tejido o de células. La familia del TGF- β en humanos incluye 33 genes que codifican para citocinas secretadas. Los miembros de esta familia tienen diferentes nombres basados en la historia de su identificación molecular, la cual incluye a las activinas, a las proteínas morfogénicas óseas (BMPs, por sus siglas en inglés *Bone Morphogenetic Proteins*), los factores de diferenciación de crecimiento (GDFs, por sus siglas en inglés *Growth Differentiation Factor*), la sustancia inhibidora mülleriana (MIS, por sus siglas en inglés *Mullerian Inhibiting Substance*) y los TGF- β s (Tzavlaki & Moustakas, 2020).

En mamíferos se han descrito 3 isoformas del TGF- β : 1, 2 y 3; codificadas por 3 genes independientes. El TGF- β -1 es la isoforma más abundante en células y tejidos, además de ser el más regulado en casos como respuestas al estrés, daño tisular o en enfermedades inducidas por oncogenes. Los principales reguladores de la expresión *in vivo* del TGF- β son cambios en los niveles de hormonas esteroides, daño celular, estrés o infecciones virales o de parásitos (Sosa-Garrocho & Macías-Silva, 2004).

El TGF- β es sintetizado por ribosomas unidos al retículo endoplasmático rugoso de la mayoría de las células, donde la eliminación del péptido señal N-terminal permite el plegamiento de la proteína, la glicosilación y el procesamiento en pasos biosintéticos subsecuentes, durante el transporte del retículo endoplasmático al aparato de Golgi. El plegamiento del TGF- β está íntimamente conectado a la formación de enlaces disulfuro intermoleculares, dos en la región N-terminal que posteriormente se convierten en un predominio largo y otro en la región C-terminal que después será el ligando maduro corto, resultando en una dimerización obligatoria del ligando sin procesar (Tzavlaki & Moustakas, 2020).

En la Figura 5 se muestra la estructura del TGF- β secretado en forma de complejo dimérico (SLC por sus siglas en inglés, *Small LatentComplex*) o terciario (LLC por

sus siglas en inglés, *Large Latent Complex*). El primero, es un pequeño complejo dimérico latente que consiste de la proteína asociada a la latencia o LAP (por sus siglas en inglés, *Latency-Associated Protein*) y el TGF- β maduro, un precursor que contiene sitios de glucosilación en el extremo amino. A este complejo se le considera latente porque la proteína LAP evita la unión del TGF- β secretado a sus receptores. Por otra parte, el complejo terciario consta de la proteína de unión al TGF- β latente o LTBP (por sus siglas en inglés, *Latent-TGF- β Binding Protein*) que se une covalentemente a la proteína LAP. La proteína LTBP es importante para la secreción del TGF- β debido a que dirige a la citocina a la matriz extracelular, en donde queda almacenada hasta su activación. Para la activación del TGF- β se necesita una modificación postraducciona, que consta en el procesamiento proteolítico en el sitio RXXR del precursor, cortado por la endoproteasa furina. Aunque se realiza este corte, el TGF- β maduro sigue asociado de manera no covalente a LAP, como se muestra en la Figura 5 (Neel *et al.*, 2012; Sosa-Garrocho & Macías-Silva, 2004).

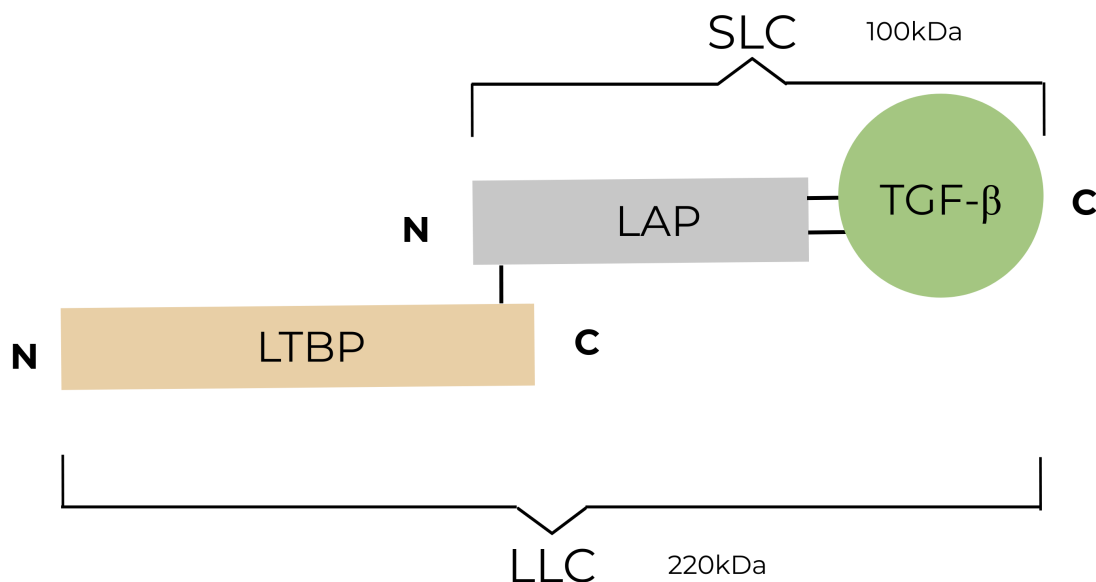


Figura 5. Estructura del TGF- β . El TGF- β es secretado en forma de un complejo, conformado por el TGF- β maduro (dímero) unido a la proteína LAP (dímero), este complejo se denomina SLC (100kDa). A este complejo latente se une covalentemente la proteína LTBP (proteína de unión al TGF- β latente), formando el complejo latente grande (LLC) de 220 kDa de tamaño. Imagen adaptada de Sosa-Garrocho & Macías-Silva, 2004.

Los receptores para los ligandos de la familia del TGF- β son proteínas transmembranales, específicos y contienen una mayor fosforilación en los residuos

de serina y treonina que en los de tirosina. Existen dos principales receptores que son mediadores de las señales de las tres isoformas del ligando, T β R-II y T β R-I (ALK5) (Figura 6); estos receptores presentan un dominio extracelular capaz de unir al ligando, una región transmembranal y un dominio citoplásmico con actividad de cinasa de residuos de serina y treonina. La diferencia entre los dos receptores es que el tipo II es una cinasa constitutivamente activada y el receptor tipo I es activado por el tipo II a través de una fosforilación (Sosa-Garrocho & Macías-Silva, 2004).

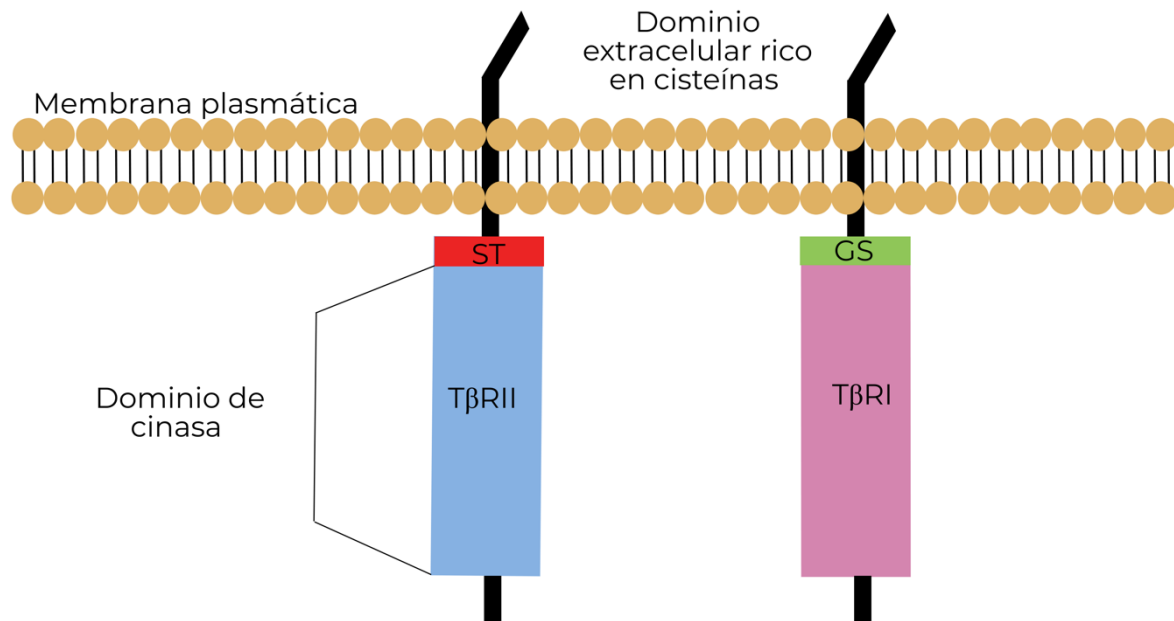


Figura 6. Estructura de los receptores TGF- β RI y TGF- β RII. En la región intracelular cerca de la membrana plasmática, el receptor T β RI contiene una región rica en glicina y serina llamada dominio GS, que está asociado con su activación por transfosforilación; en cambio, el receptor T β RII contiene un dominio de cinasa de residuos de serina y treonina que puede fosforilar al T β RI en el dominio GS, durante la transducción de señales, activando la región cinasa del T β RI. Ambos receptores tienen dominios extracelulares que unen al ligando (Wang *et al*, 2020). Imagen adaptada de Sosa-Garrocho & Macías-Silva, 2004.

Los tres receptores de TGF- β se encuentran en balsas lipídicas y en dominios de la membrana plasmática libres de balsas lipídicas, en donde se internalizan rápidamente a través de endocitosis mediada por clatrina o caveolina. La internalización dependiente de clatrina promueve la vía canónica, mediante el incremento de la translocación nuclear de una proteína llamada SMAD2 y por lo tanto la activación de la señalización río abajo. En cambio, la internalización mediada por caveolina involucra el complejo de receptores/SMAD7/SMURF1/2. Los

receptores T β Rs se están reciclando constantemente en la ausencia de ligandos y la unión de ligandos los dirige hacia su degradación, pero únicamente a los receptores heterodiméricos (T β RI/T β RII). Por otra parte, los receptores homodiméricos (T β RI/T β RI o T β RII/T β RII) se reciclan regresando a la membrana plasmática. La endocitosis no solo dirige la degradación o el reciclaje de los T β Rs, sino que también es necesaria para la activación río abajo de las vías canónica y no canónica de señalización del TGF- β (VanderArk *et al.*, 2018).

4.1 Vías de señalización

La vía de señalización canónica del TGF- β empieza con su unión al receptor tipo II, el cual fosforila al receptor tipo I y activa su función como cinasa (Figura 7). El coreceptor llamado betaglicano (T β RIII) funciona al unirse al TGF- β y lo transfiere a sus receptores de señalamiento, T β RI y T β RII. El T β RI activado, fosforila el motivo de serina SXS del complejo R-Smad (Smad2/3), el cual forma complejos con Smad4. En este paso se pueden unir las proteínas Ski y SnoN al complejo de Smads e inhibir su translocación al núcleo. En cambio, si los heterocomplejos se logran translocar al núcleo, pueden asociarse con cofactores específicos, regulando la expresión genética, que lleva a la supresión de tumores, es decir a la inhibición de crecimiento y de la apoptosis, así como a la prevención de la inmortalización; sin embargo, en condiciones patológicas pueden promover el desarrollo tumoral al favorecer procesos que incluyen la EMT, la migración, la invasión y la metástasis (Busse & Keilholz, 2011; Neel *et al.*, 2012).

Los complejos TGF- β -receptores también pueden señalizar por medio de vías no canónicas, ya sea por medio de un proceso de fosforilación o interacción directa. El TGF- β puede activar a las vías de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y de las MAP cinasas, incluyendo ERKs y p38 (Figura 7); además, puede activar la vía de Rho-GTPasas. Estas vías no canónicas promueven varios efectos biológicos, como es la EMT, la inhibición del crecimiento celular, la migración y la invasión de las células. Se puede generar una intercomunicación (del inglés, *cross-talk*) entre estas vías no canónicas con la vía de las Smad, para potencializar o antagonizar la señalización del TGF- β (Busse & Keilholz, 2011; Zhang, 2009).

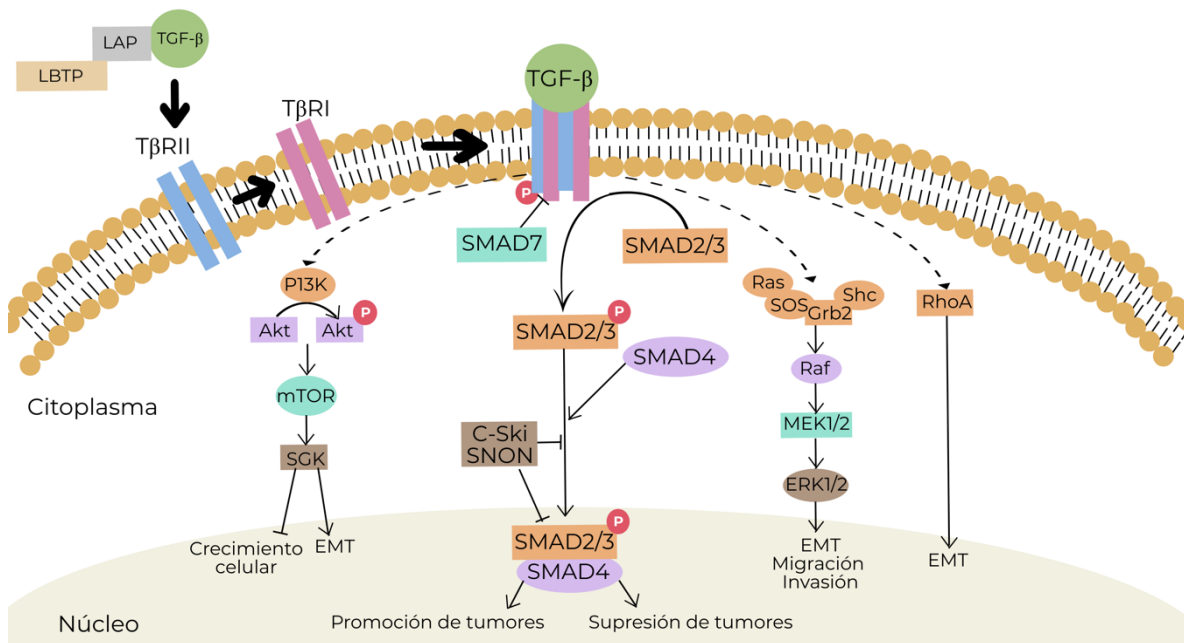


Figura 7. Vías de señalización del TGF-β. El TGF-β puede realizar su señalización por la vía canónica, es decir activando a la familia de las proteínas Smad, que son factores transcripcionales, lo cual conlleva tanto a la promoción como supresión de tumores, dependiendo del contexto celular. Además, el TGF-β puede activar a otras vías de señalización no canónicas, que se le conoce como *crossstalk* o comunicación cruzada. Entre estas vías se encuentran: PI3K/Akt, Rho-GTPasas y MAPKs, cuyos efectos también dependen del contexto celular.

4.2 Ski y SnoN

Las proteínas Ski y SnoN son miembros de la familia Ski, los cuales se expresan en todos los tejidos adultos en cantidades bajas. Pueden regular la diferenciación de diferentes estirpes celulares, especialmente aquellas en linajes neurales y musculares. No tienen actividades catalíticas, por lo tanto, funcionan a través de interacciones con otros componentes celulares. La función descrita más importante de Ski y SnoN es la regulación negativa de la señalización del TGF-β, al unirse a las proteínas Smad y actuar como correpresores transcripcionales. Interactúan simultáneamente con las R-Smad (Smad reguladas por el receptor) Smad2/3, a través de su región N-terminal y con la Co-Smad (Smad4), a través de su dominio tipo SAND, causando el bloqueo de la habilidad de los complejos de Smad de activar la transcripción de los genes blanco del TGF-β (Deheuninck & Luo, 2009).

4.3 TGF- β y melanoma

Como se mencionó anteriormente, el TGF- β tiene un papel dual en el cáncer. En las células cancerosas en etapas tempranas, la activación de la vía induce un potente arresto del ciclo celular, lo cual sugiere que el TGF- β juega un papel importante en la supresión de tumores. Sin embargo, conforme avanza el cáncer, el TGF- β se vuelve un promotor de tumores; su expresión elevada, así como mutaciones o deleciones en sus receptores, se asocian con la migración celular, la resistencia a la quimioterapia y la evasión a la vigilancia inmune (Colak & ten Dijke, 2017; Gu & Feng, 2018).

En el caso del melanoma, se puede observar un papel importante del TGF β en su desarrollo y progresión (Figura 8). Las isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 son expresadas en algunos melanocitos normales y casi uniformemente en los *nevi* y melanomas. Las células de melanoma expresan y secretan altos niveles de TGF- β que tienen efectos autocrinos, promueven la activación del TGF- β latente por medio de proteasas y favorecen el reclutamiento de células que secretan TGF- β en el microambiente tumoral, como son los fibroblastos del estroma. El TGF- β ejerce un efecto citostático en la etapa temprana del tumor; posteriormente, su actividad cambia a un promotor tumoral en melanomas avanzados, en donde induce la transición a un fenotipo más agresivo, favoreciendo la invasión y la angiogénesis. Además, el TGF- β inhibe la proliferación y la activación de algunas células inmunes, pues permite que las células del melanoma evadan las acciones inmunosupresoras, generando y manteniendo un nicho para el tumor (Hussein, 2005; Perrot *et al.*, 2013).

Otro efecto importante del TGF- β sobre las células del microambiente tumoral, es la promoción de la EMT, un proceso por el cual las células epiteliales adquieren características de células tipo mesenquimales. Durante la EMT, las células tumorales inhiben la transcripción de genes epiteliales, como E-cadherina y keratina, además aumentan la regulación de la transcripción de los genes mesenquimales (Vimentina y N-cadherina) para regular múltiples señales en el TME, de tal manera que las células obtienen la habilidad para la migración y la invasión. Existen varias metaloproteinasas como MMP-3, MMP-9, MMP-14 y MMP-

2, que ayudan a este proceso, donde destaca principalmente la MMP-9. Los altos niveles de esta metaloproteinasa han sido asociados con una alta incidencia de la metástasis. También ha sido demostrado que el TGF- β promueve la EMT a través de la sobre-regulación de MMP-9 (Li *et al.*, 2020).

Cabe destacar que en este tipo de cáncer, los niveles de las proteínas Ski y SnoN aumentan drásticamente durante la progresión del tumor. Al mismo tiempo, la proteína Ski pasa de sólo tener una localización nuclear, a una localización tanto nuclear como citoplasmática en la etapa de invasión y una localización citoplasmática en los melanomas metastásicos. Ski puede suprimir la señalización del TGF- β mediante tres mecanismos: 1) El primero es mediante su asociación con Smad2, Smad3 y Smad4, causando su represión. 2) Un segundo mecanismo involucra una asociación entre Ski/Smad en el citoplasma, lo cual previene una translocación nuclear en respuesta a la activación por el TGF- β . Finalmente, 3) Ski puede tener como blanco a la vía de la proteína de retinoblastoma (RB), mediante su asociación directa con esta o reprimiendo indirectamente la inducción de p21 por las Smads (Hussein, 2005).

Se ha sugerido que la alta expresión de Ski en el melanoma, puede resultar en una vía de señalización inactiva del TGF- β y en una falta de actividad como supresor de tumores por parte de esta citocina. Sin embargo, en 2011, el grupo de Javelaud, analizó la correlación entre los niveles de Ski y de SnoN con la señalización del TGF- β ; el grupo concluyó que aún con altos niveles de estas oncoproteínas, la vía de señalización del TGF- β es funcional. Además, Ski es eficientemente degradado por la activación de la vía de señalización del TGF- β , a través de Arkadia, una ligasa E3 de ubiquitina que se asocia con Ski a través de Smad2 y Smad3, para mediar su ubiquitinación y su degradación por el proteosoma. Estas dos condiciones pueden jugar un papel importante en la progresión maligna de estas células cancerosas (Deheuninck & Luo, 2009; Javelaud *et al.*, 2011).

4.4 Secreción del TGF- β

El TGF- β puede ser secretado al exterior de la célula por medio de vesículas extracelulares, como microvesículas o exosomas. Por una parte, se piensa que el

TGF- β puede estar presente dentro del exosoma; esto fue mostrado en un experimento en donde trataron exosomas provenientes de cáncer de vejiga con la proteínasa K, la cual es una enzima que puede degradar al TGF- β , pero no puede penetrar a través de la bicapa lipídica de los exosomas; por lo cual se observó poca degradación del TGF- β . En cambio, cuando primero se permeabilizaron las membranas de los exosomas con Triton X-100 y después agregaron la proteínasa K, se observó una disminución notable en los niveles de la proteína TGF- β . Con estos datos indicaron que la mayoría de las proteínas TGF- β se localizan dentro de los exosomas (Goulet *et al.*, 2018).

Por otra parte, se cree que el TGF- β puede encontrarse asociado a algunas de las proteínas presentes en la superficie de los exosomas, como son las integrinas, las cuales tienen la función de guiarlos hacia tejidos específicos. Estas proteínas pueden ayudar en su activación por las células blanco, para poder activar la vía de señalización de la citocina. LAP tiene un motivo RGD que permite que la subunidad αV integrina se una y libere la forma activa del TGF- β , causando que aumente la concentración del TGF- β en el microambiente y se puede unir a sus receptores presentes en dicha célula (Shimaoka *et al.*, 2019). La forma latente del TGF- β también puede estar unida a la superficie de los exosomas, por medio de cadenas de glicanos, en específico por la heparina y el heparán sulfato; en el momento en el que se separa del exosoma se convierte en TGF- β activo (Shelkeet *et al.*, 2019). En el siguiente capítulo se abordará con mayor detalle el tema de las vesículas extracelulares, dándole mayor énfasis a los exosomas.

Capítulo 5. Vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (EV) están formadas por una membrana de bicapa lipídica y son portadoras de moléculas biológicamente activas. Las EV son generadas y secretadas por todos los tipos de células, como un mecanismo para la comunicación intercelular, ya que pueden tener blancos locales o distantes y ejecutar funciones biológicas definidas. Las EV secretadas por las células son altamente heterogéneas en tamaño, contenido, composición de membrana, biogénesis y más importante en su función biológica (Latifkar *et al.*, 2019; Margolis & Sadovsky, 2019).

Las EV se pueden clasificar de acuerdo con su tamaño y su biogénesis (Figura 8): los exosomas derivan de vías endolisosomales, que involucran la formación de vesículas intraluminales dentro de cuerpos multivesiculares (MVBs, por sus siglas en inglés *Multivesicular Bodies*). Los exosomas son la población más heterogénea de EV y su tamaño, según algunos autores (Latifkar *et al.*, 2019; Xavier *et al.*, 2020) se encuentra en un rango aproximado de 30-100 nm. Por otra parte, las microvesículas (MVs) que tienen un diámetro aproximado entre 100 nm y 1000 nm, son directamente secretadas por gemación de la membrana plasmática de las células. Por último, la formación de los cuerpos apoptóticos ocurre durante la descomposición de la membrana celular de las células apoptóticas y tienen un diámetro aproximado de 1-5 μm (Latifkar *et al.*, 2019; Margolis & Sadovsky, 2019; Xavier *et al.*, 2020).

Durante su biogénesis, las EV podrían capturar selectivamente proteínas, lípidos, RNAs o incluso DNA, los cuales se podrían volver parte de la membrana o del contenido de la vesícula extracelular; por lo cual su contenido refleja su origen y les da el potencial como biomarcadores. Su encapsulación les da mayor estabilidad, más vida media, mayor resistencia a la degradación y mayor capacidad de viajar grandes distancias (Latifkar *et al.*, 2019; Xavier *et al.*, 2020). La cantidad del material contenido dentro de la EV es extremadamente pequeña, al igual, el número de vesículas que llevan biomoléculas a ciertas poblaciones celulares es reducido, por lo cual se asume que las células receptoras tienen herramientas de reconocimiento altamente específicas y eficientes (Margolis & Sadovsky, 2019).

Las vesículas extracelulares tienen la habilidad de transferir su carga a las células receptoras y a los órganos que están protegidos por una barrera fisiológica (Xavier *et al.*, 2020). Se sugiere que diferentes tipos de células utilizan vías específicas para promover la entrada de las EV a las células, para un subsecuente procesamiento intracelular. Esto puede involucrar vías de endocitosis o fusión de las EV con la membrana plasmática de las células. Aunque la entrada a la célula por parte de las EV podría no ser obligatoria para poder desarrollar sus funciones. La unión a cierta molécula en la superficie de la membrana podría ser suficiente para disparar una cascada de reacciones que alteren la fisiología de la célula. Además, las “órdenes” que llevan las EV podrían venir no solo de las células de origen sino también de la microbiota (Margolis & Sadovsky, 2019).

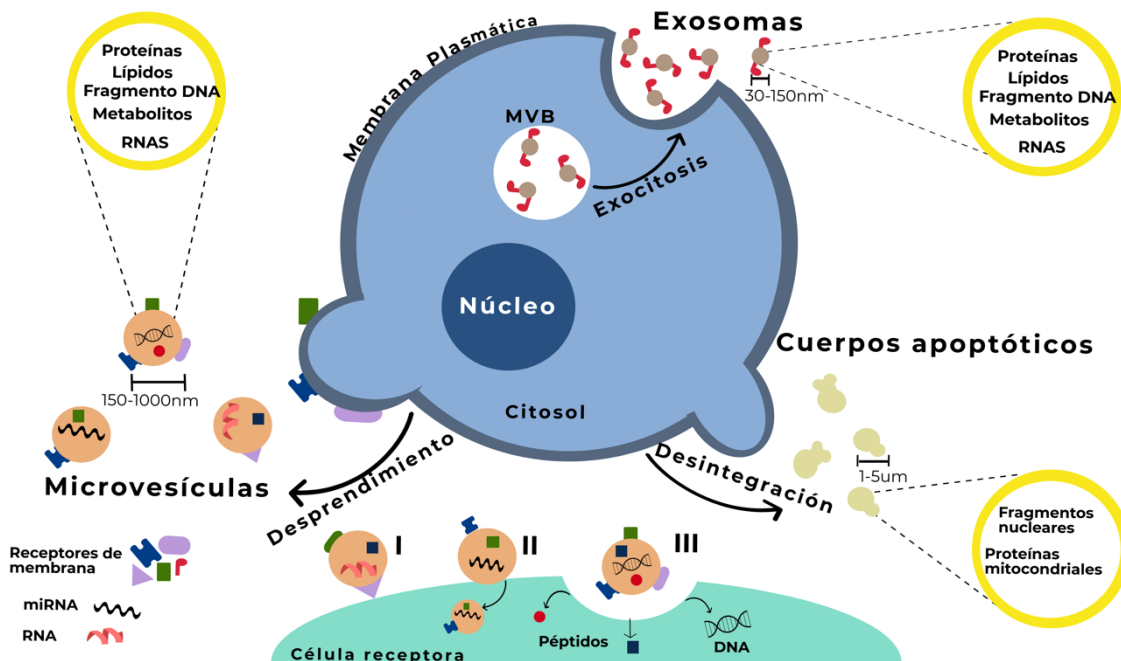


Figura 8. Biogénesis de los diferentes tipos de vesículas extracelulares. Las EV se pueden clasificar por su biogénesis. Primero se tienen a los exosomas que se forman por la exocitosis de cuerpos multivesiculares y tienen un diámetro de entre 30 y 150 nm. Entre su contenido se encuentran proteínas, lípidos, fragmentos de DNA, metabolitos y RNAs. Las microvesículas, se forman por una gemación de la membrana plasmática y posteriormente se desprenden al espacio extracelular; tienen un tamaño entre 150-1000 nm y su contenido es similar al de los exosomas. Por último, se tienen a los cuerpos apoptóticos, que se forman por la desintegración de la membrana plasmática de las células apoptóticas; son las EV con mayor tamaño (1-5 µm) y contienen fragmentos nucleares y proteínas mitocondriales. Las EV pueden ser aceptadas por una célula receptora para transferir su cargamento.

Tabla 2. Marcadores moleculares para identificar microvesículas y exosomas. Existen algunos marcadores que ayudan a diferenciar a las microvesículas y los exosomas a nivel molecular, pues su tamaño es similar y se debe utilizar otro parámetro para discriminar entre estos tipos de vesículas extracelulares (Jadli et al., 2020; Surman et al., 2019).

Microvesículas	Exosomas
<ul style="list-style-type: none"> ● CD40 ● Selectinas ● MMP ● Integrinas ● Ezrina ● Anexina V ● TF (<i>Tissue Factor</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> ● CD63 ● CD9 ● CD81 ● HSP70 ● HSP90 ● ALIX ● Rab5a/b ● LAMP1 (<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>) ● TSG101 (<i>Tumor susceptibility gene 101</i>)

5.1 Biogénesis de las vesículas extracelulares

Las microvesículas se forman cuando la membrana genera una gemación o brote hacia el exterior. Primero, se requiere que se lleven a cabo varios rearrreglos dentro de la membrana plasmática, como son algunos cambios en los componentes lípidicos y en la composición de las proteínas, así como cambios en los niveles de Ca^{2+} .

La maquinaria enzimática dependiente de los niveles de Ca^{2+} dirige los rearrreglos en la asimetría de los fosfolípidos de la membrana, que causan un doblamiento físico de esta y un restructuramiento del citoesqueleto de actina. Un ejemplo del funcionamiento de este tipo de maquinaria, es el cambio de la fosfatidilserina de la monocapa lipídica interior a la superficie celular. Este tipo de maquinaria incluye a las translocasas de aminofosfolípidos, a las escramblasas y a la calpaína, las cuales favorecen el desprendimiento de la membrana y la formación de microvesículas (van Niel *et al.*, 2018).

La biogénesis de exosomas es un proceso biológico de múltiples pasos que está regulado por varias vías de señalización (Figura 9). Primero se inicia con la formación de los endosomas tempranos, mediante una invaginación de la membrana, seguida de la formación de los endosomas tardíos por una segunda invaginación de la membrana endosomal generando vesículas intraluminales (ILV,

por sus siglas en inglés *Intraluminal Vesicles*). Los endosomas tardíos son identificados como MVBs, los cuales pueden fusionarse con los lisosomas para dirigir su carga a degradación o seguir la vía endocítica para la secreción de exosomas. En el proceso de endocitosis, las proteínas de superficie de la membrana plasmática son trasladadas a la membrana interna de las vesículas endocíticas. Posteriormente en el retículo endoplasmático, la membrana plasmática de los MVBs junto con el cargo que ya fue aislado, se clasifica y proceden al complejo de Golgi hacia vesículas intraluminales. Por último, los MVBs se fusionan con la membrana plasmática y las ILVs son liberadas como exosomas (Jadli *et al.*, 2020).

Existen dos tipos de mecanismos por los cuales las proteínas son clasificadas para la biogénesis de exosomas, los cuales incluyen a las vías dependientes e independientes de ESCRT (por sus siglas en inglés *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) (Figura 9). Los ESCRTs son una familia de proteínas que se asocia en cuatro complejos sucesivos (ESCRT-0, -I, -II y III) en la membrana de los MVBs para regular los cargos hacia la formación de ILVs (Mathieu *et al.*, 2019). Esta maquinaria también incluye proteínas asociadas, como son VPS4, VTA1 y ALIX. La maquinaria de ESCRT actúa en varios pasos: ESCRT-0 facilita la formación de agrupamientos (*clusters*) de cargos transmembranales, para la transferencia y posterior reclutamiento de demás complejos proteicos ESCRT a la membrana endosomal. ESCRT-I y ESCRT-II son responsables de la gemación de la membrana endosomal. Posteriormente, la invaginación de la membrana y la formación de las vesículas intraluminales es facilitado por ESCRT-III, logrando el desprendimiento y la fisión de dichas vesículas. Este mecanismo es conocido como la vía ESCRT canónica (Jadli *et al.*, 2020; van Niel *et al.*, 2018).

Cabe mencionar que las proteínas accesorias tienen un papel importante en la disociación y reciclado de la maquinaria ESCRT. Por otro lado, la vía ESCRT canónica puede ser interceptada por la proteína sintenina-1, la cual, al unirse al dominio citosólico de sindecanos, recluta a la proteína ALIX (por sus siglas en inglés, *ALG-2 interacting protein*), que en conjunto con los componentes ECRT-I/II/III permite la formación de ILVs. En este contexto, la proteína sintenina parece ser un regulador potencial de la intercomunicación (del inglés *crosstalk*) entre el reciclado endocítico y la elección de los blancos endosomales, es decir el *targeting*

endosomal de las potenciales cargas exosomales. Cabe mencionar que diferentes vías actúan en paralelo o incluso juntas para promover la liberación de exosomas (Juan & Fürthauer, 2018; Mathieu *et al.*, 2019; van Niel *et al.*, 2018).

Los exosomas también se pueden formar de manera independiente de los complejos ESCRT (Figura 9). La familia de las ceramidas son moléculas que están compuestas de al menos una esfingosina y un ácido graso, unidos por un enlace amino. Las ceramidas permiten la generación de subdominios membranales que imponen una curvatura negativa espontánea en la membrana. Por otra parte, se tiene a la familia de las tetraspaninas, las cuales son proteínas que forman cúmulos denominamos agrupamientos (*clusters*) y plataformas dinámicas de membrana con diferentes proteínas transmembranales y citosólicas, para formar microdominios. Las tetraspaninas también regulan las rutas intercelulares de las cargas moleculares hacia los MVBs (van Niel *et al.*, 2018).

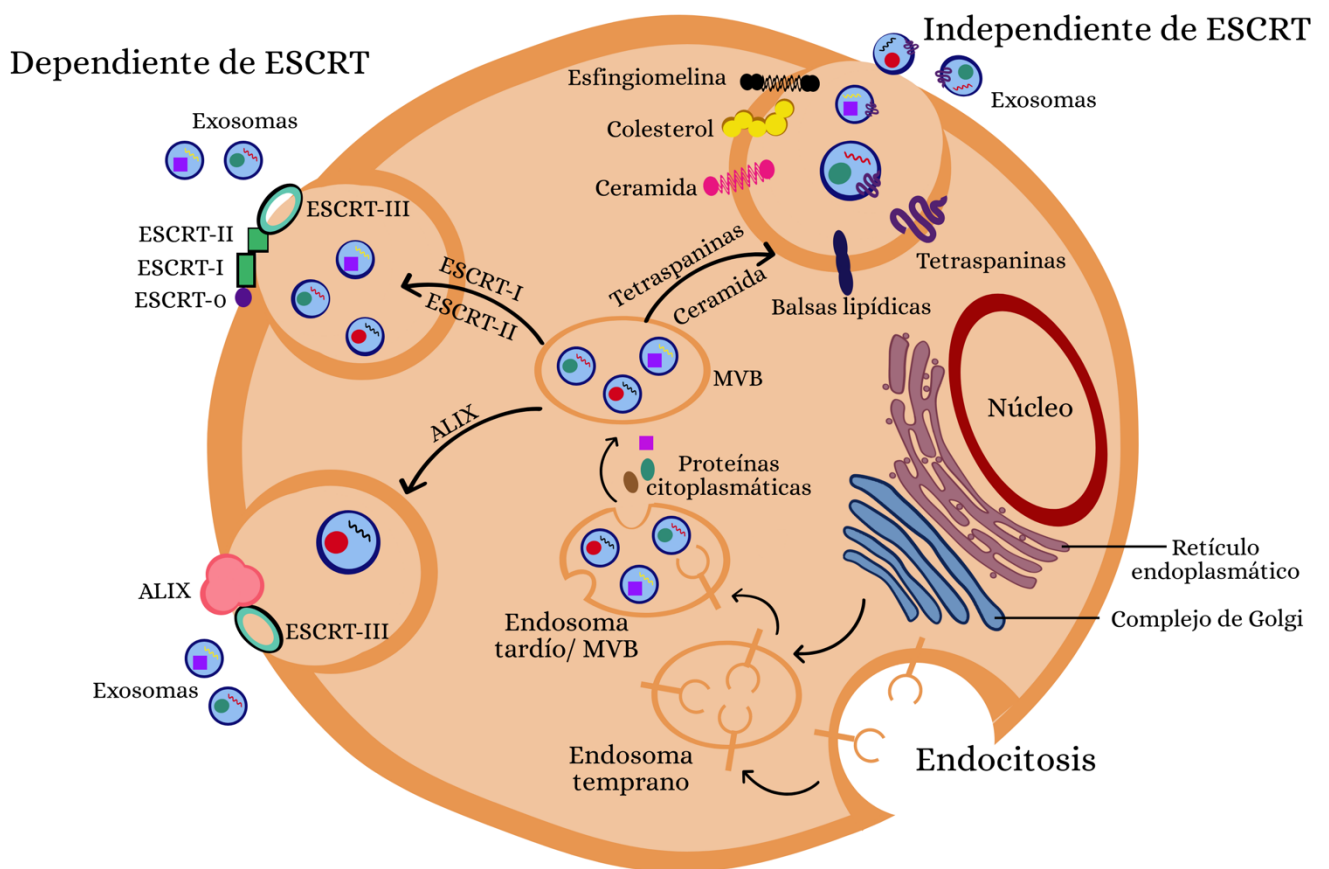


Figura 9. Biogénesis de exosomas. La formación de exosomas empieza con la creación del endosoma temprano por un proceso de endocitosis y posteriormente del endosoma tardío o cuerpo multivesicular (MVB), que contiene vesículas intraluminales (ILVs) formadas por la

invaginación de la membrana endosomal. En este punto es donde la biogénesis de los exosomas puede ocurrir por dos vías: la primera es la vía dependiente de la maquinaria ESCRT, es decir de los complejos proteicos ESCRT-0 al ESCRT-III, los cuales están involucrados en varios pasos hasta la liberación de los exosomas. Esta vía puede ser dividida por las proteínas ALIX y sintenina-1 para liberar los exosomas de otra manera. Por último, la segunda vía es independiente de ESCRT, en donde participan principalmente las ceramidas y las tetraspaninas. Imagen adaptada de Jadli *et al.*, 2020.

5.2 Liberación de las vesículas extracelulares

Como ya se mencionó anteriormente, para llevar a cabo la liberación de los exosomas se necesita la fusión de los MVBs con la membrana plasmática. Los mecanismos para dicha liberación dependen del tipo celular de origen, pero pueden ser ampliamente clasificados como constitutivos o inducibles. Dentro de las vías constitutivas, se encuentran las que son mediadas por las proteínas G heterotriméricas, la proteína cinasa D y las proteínas Rab-GTPasas. Por otra parte, la secreción de exosomas puede ser inducida por varios estímulos físicos, químicos y biológicos, como un bajo pH, daño del DNA, aumento en el Ca^{2+} intracelular, hipoxia y estimulación por LPS. A continuación, se profundizará en el rol de las proteínas Rab-GTPasas (Jadli *et al.*, 2020).

Las proteínas Rab de la familia de GTPasas pequeñas tienen un rol importante y bien establecido en la transferencia de las vesículas entre compartimientos intracelulares, además de estar implicadas en el tráfico de los MVB a la membrana para la liberación de exosomas. Un ejemplo de esto es la proteína Rab27, que tiene dos homólogos Rab27a y Rab27b, los cuales actúan en el acoplamiento de los MVBs a la membrana plasmática para promover su fusión y, por lo tanto, aumentar la secreción de exosomas. Estas isoformas también tienen una función por separado: Rab27b regula la motilidad de los MVBs hacia la membrana y Rab27a está involucrada en el rearrreglo del citoesqueleto de actina, al momento del acoplamiento (van Niel *et al.*, 2018). También es importante mencionar que después del desprendimiento de una vesícula extracelular, se requiere una polimerización de actina en la cara interna de la membrana plasmática, seguida de la contracción del citoesqueleto de actina; este proceso es dirigido por la proteína RhoA-GTPasa. Por lo que, para continuar con la liberación subsecuente de exosomas, es necesario la

despolimerización de la actina cortical, permitiendo que los MVBs se acoplen a la membrana plasmática (Mathieu *et al.*, 2019).

5.3 Internalización de las vesículas extracelulares en las células blanco

Una vez que han sido liberadas, las EV llegan a las células receptoras y pueden entregar su contenido para provocar una respuesta funcional y promover cambios fenotípicos, que afectarán el estado fisiológico o patológico de la célula blanco. La especificidad de la célula blanco es muy probable que sea determinada por las interacciones entre las proteínas de la superficie de las EV y los receptores de la membrana plasmática de las células receptoras. Algunos mediadores de estas interacciones son las tetraspaninas, las integrinas, los lípidos, las lectinas, los proteoglicanos de heparán sulfato y los componentes de la matriz extracelular (Figura 10) (Mathieu *et al.*, 2019; van Niel *et al.*, 2018).

Las integrinas presentes en las EV pueden interactuar con moléculas de adhesión como son: las ICAMs (del inglés *Inter-Cellular Adhesion Molecules*), las cuales son miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas que están involucradas en la inflamación, respuesta inmune y en la señalización intercelular; las integrinas también pueden interactuar con las proteínas de la matriz extracelular, como son la fibronectina y la laminina, lo cual ha sido demostrado en exosomas; y las tetraspaninas, que también interactúan con las integrinas para promover el acoplamiento y la aceptación de los exosomas por las células receptoras (van Niel *et al.*, 2018).

Los proteoglicanos de heparán sulfato y las lectinas también están presentes tanto en las EV como en las células blanco, contribuyendo al proceso de acoplamiento. Una vez que las vesículas extracelulares se han acoplado, pueden transmitir información a las células receptoras, actuando en la superficie celular sin liberar su contenido. Esto se lleva a cabo mediante un acoplamiento en la membrana plasmática, seguida de la activación de los receptores de superficie y una cascada de señalización (Mathieu *et al.*, 2019; van Niel *et al.*, 2018).

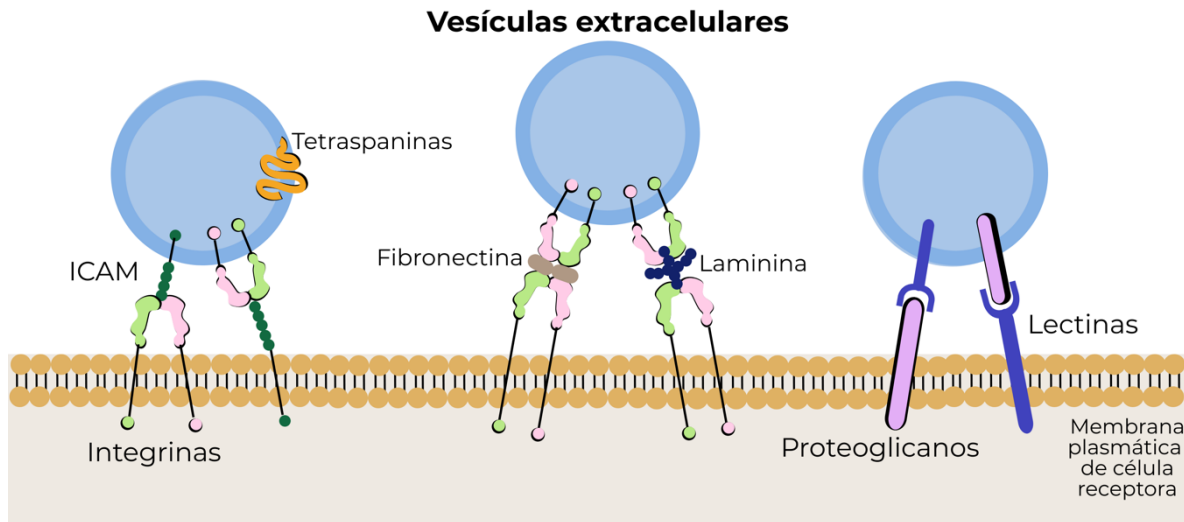


Figura 10. Proteínas presentes en la superficie de las vesículas extracelulares. Las vesículas extracelulares son portadoras de proteínas de membranas como son las integrinas, tetraspaninas, moléculas de adhesión (ICAM), proteoglicanos, lectinas y proteínas de la matriz extracelular (fibronectina y laminina), las cuales permiten hacer un acoplamiento molecular con la célula receptora. Este acoplamiento permite la presentación de antígenos y la inducción de cascadas de señalización, como es la del TGF- β . Imagen adaptada de van Niel *et al.*, 2018.

Otra posibilidad es que la vesícula entre a la célula aceptora, lo cual pasa por un proceso de endocitosis como son la mediada por clatrina o caveolina, la fagocitosis, la micropinocitosis (Figura 11), o la fusión de la vesícula con la membrana plasmática (Figura 12). Por último, está el paso de la aceptación del contenido entregado a la célula receptora. Estos procesos son complejos y dependen del origen de la vesícula extracelular y de la identidad y origen de la célula receptora. Además de que todos estos mecanismos están bajo estudio, ya que la manera exacta de como ocurren aún no ha sido establecida (Mathieu *et al.*, 2019; van Niel *et al.*, 2018).

Los mecanismos de endocitosis controlan la composición de lípidos y proteínas de la membrana plasmática, regulando la manera en que las células interactúan con su medioambiente. Este proceso genera pequeñas vesículas de membrana que transportan en su carga varias moléculas hacia el citoplasma de la célula. Primero se mencionará el mecanismo de fagocitosis, el cual puede internalizar material opsonizado, es decir, marcado con opsoninas (anticuerpos, fibronectinas, lectinas de unión a manosa y lactadherina). Dicho material, como son las bacterias y las EVs, es internalizado mediante la formación de invaginaciones en la membrana

celular (Doherty & McMahon, 2009; Jadli *et al.*, 2020; Kaksonen & Roux, 2018; Rosales & Uribe-Querol, 2017).

Otro mecanismo es la macropinocitosis, caracterizado por el arrugamiento o *ruffling* de la membrana plasmática envolviendo una región del medio extracelular y seguido de una completa internalización de dicha región, generando vesículas endocíticas y macropinosomas. La macropinocitosis es mediada por una cascada de señalización en donde participa la familia de Rho-GTPasas, las cuales facilitan la formación de las protuberancias extracelulares impulsadas por los filamentos de actina. En los exosomas, este tipo de endocitosis depende de la función intercambiadora de Na^+/H^+ , la actina, el colesterol, la dinamina y un pH bajo (Doherty & McMahon, 2009; Jadli *et al.*, 2020).

Por otra parte, se encuentra la endocitosis mediada por clatrina (CME, por sus siglas en inglés *Clathrin-Mediated Endocytosis*), que es un proceso que involucra la interacción entre los ligandos en la superficie exosomal y los receptores específicos presentes en la membrana plasmática (Figura 11). La carga molecular se concentra en las regiones de la membrana plasmática que se encuentran recubiertas de las proteínas que se movilizaron desde el citosol. El ensamblaje del revestimiento promueve el doblamiento de la membrana, transformando la membrana plasmática plana a una fosa recubierta de clatrina. Una vez que se lleva a cabo el reconocimiento ligando-receptor, se forma la vesícula alrededor de la carga y por lo tanto es selectivamente endocitada. Para la formación de estas vesículas endocíticas recubiertas de clatrina, participan alrededor de 50 proteínas citosólicas, aparte de la clatrina. Una vez internalizadas, las vesículas experimentan un proceso en donde se les retira el revestimiento de clatrina, para poder fusionarse con el endosoma y transferir las cargas moleculares (Jadli *et al.*, 2020; Kaksonen & Roux, 2018).

El último mecanismo de endocitosis que se abordará es el dependiente de caveolina, la cual es una proteína con microdominios ricos en colesterol (Figura 11). Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática, cuya morfología es otorgada por la caveolina que se incrusta en la cara interna de la membrana, formando un bucle en forma de horquilla, sus extremos N- y C-terminal están

expuestos hacia el citoplasma. El mecanismo exacto por el cual se internalizan a las EV podría diferir entre los tipos de células liberadoras y receptoras, pero en general se cree que los caveosomas, es decir, las vesículas intracelulares con pH neutro tienen gran variedad en sus ciclos de vida y en sus habilidades para fusionarse entre ellas y con otros organelos (Doherty & McMahon, 2009; Jadli *et al.*, 2020).

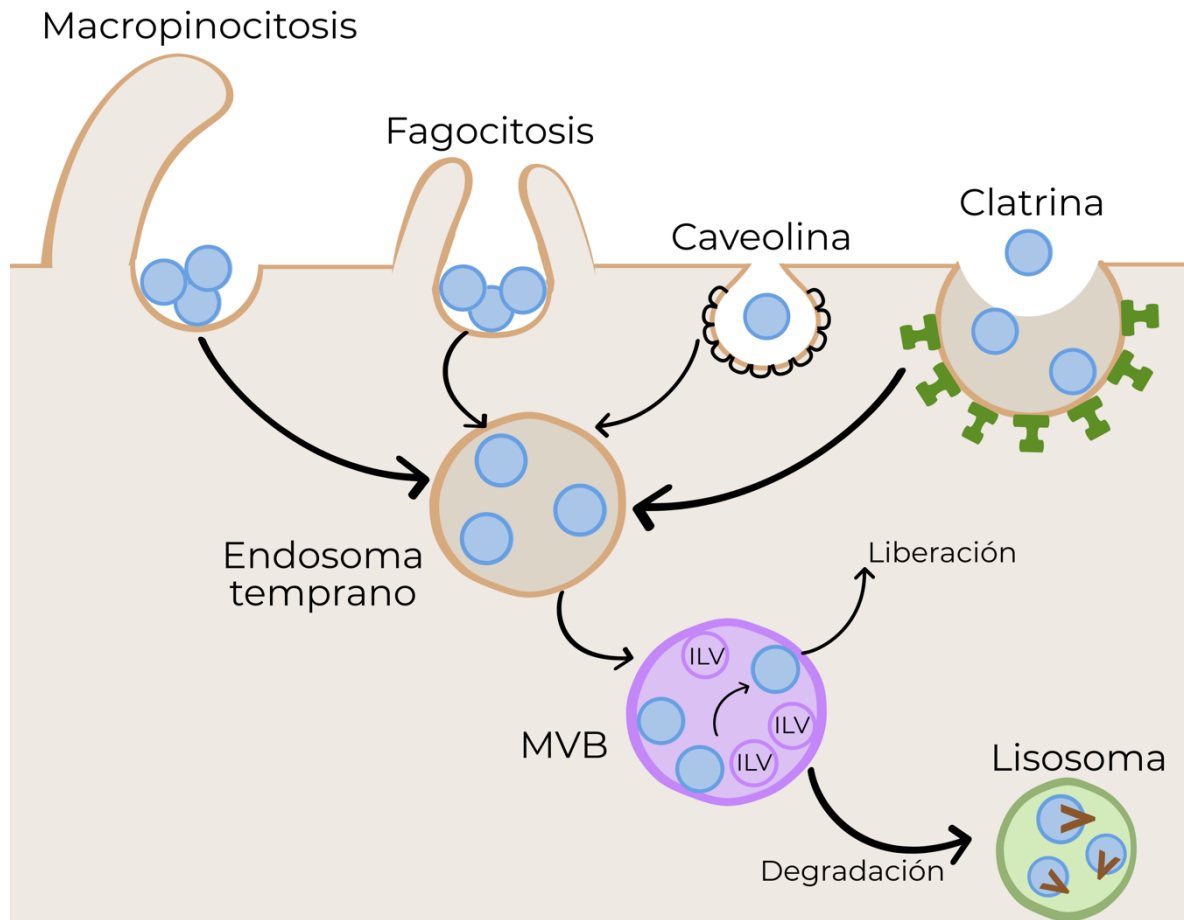


Figura 11. Internalización de vesículas extracelulares. Las EVs son internalizadas por las células receptoras y fusionadas con los compartimentos intracelulares y pueden desprender su cargamento por la vía endosomal, donde se van a degradación o son recicladas y liberadas de nuevo. Los diferentes tipos de internalización son: macropinocitosis, fagocitosis y endocitosis mediada por caveolina o clatrina (Gurung *et al.*, 2021). Imagen adaptada de van Niel *et al.*, 2018.

Como ya se mencionó anteriormente, las EV también pueden ser aceptadas por las células receptoras por procesos no endocíticos, como es la fusión (Figura 12). En este mecanismo la membrana de las EV se fusiona con la membrana plasmática de la célula, causando que se libere el contenido intraluminal al citoplasma de la célula receptora. Aparte de transferir las moléculas de la carga, la fusión también permite

el intercambio de las proteínas y los lípidos transmembranales. Existen varias proteínas que participan de manera importante en este proceso como son Rab, Sec1/Munc-18, Lamp-1 y SNAREs (Jadli *et al.*, 2020; van Niel *et al.*, 2018).

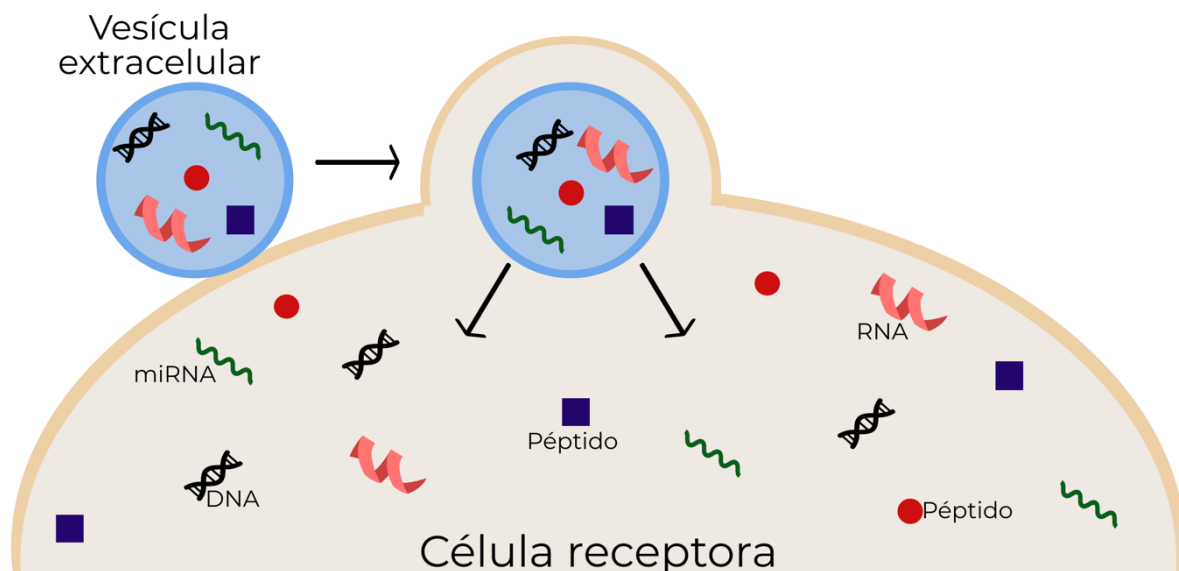


Figura 12. Fusión con la membrana plasmática. Las vesículas extracelulares también pueden ser internalizadas mediante su fusión con la membrana plasmática de la célula receptora, en donde liberan su contenido directamente al citosol para activar algún tipo de señalización, dependiendo del contexto celular. Imagen adaptada de Gurunget *al*, 2021.

5.4 Vesículas extracelulares provenientes de tumores

Las EV han sido asociadas con el desarrollo de enfermedades como el cáncer y la metástasis, de enfermedades cardiovasculares y en la regulación de hipertrofia miocárdica, en la obesidad, y con enfermedades neurológicas (Margolis & Sadovsky, 2019). Las MVs y los exosomas generados por células de un cáncer altamente agresivo, pueden ser transferidas a células de cáncer menos malignas y les provee un mecanismo potencial para estimular su crecimiento, sobrevivencia y migración, confiriendo un comportamiento más agresivo y promoviendo la expansión del tumor (Latifkar *et al.*, 2019).

Las EVs provenientes de tumores tienen un papel importante en las características del cáncer, interfiriendo con su desarrollo y con su resistencia a fármacos. Una de sus características es la activación de receptores RTK y su señalamiento proliferativo (río abajo), a través de vías como: MAPK/ERK, PI3K/AKT y WNT. Esta

activación puede ser autocrina o paracrina y provee a las células tumorales de ventajas proliferativas (Xavier *et al.*, 2020). También se ha sugerido que las EV ayudan a formar el microambiente tumoral, diferencian a las células troncales mesenquimales a miofibroblastos, activan a las células endoteliales para formar vasos sanguíneos y reclutan a fibroblastos hacia el tumor. Todo esto resulta en la producción de factores de crecimiento y de proteínas de matriz extracelular, combinados con un alto suministro de sangre, lo que se vuelve crítico para mantener el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales (Latifkar *et al.*, 2019).

El contenido de las EVs provenientes de cáncer puede incluir RNA no codificante que induce la expresión de la telomerasa en los fibroblastos y en otras clonas de células mutadas, permitiendo que las células troncales con un fenotipo canceroso adquieran inmortalidad replicativa. Además, es posible que contengan fragmentos mutados de DNA y oncoproteínas, que al transferirse a otras células cancerosas aumenta la inestabilidad genómica y genera una alta diversidad genética. Por otra parte, las EVs pueden contener MMPs que cuando se internalizan en las células de cáncer, activan el proceso de EMT; esto induce la invasión de células tumorales y la metástasis a órganos distantes. Al mismo tiempo las EVs provenientes de cáncer actúan en los tejidos distantes para aumentar la expresión de integrinas y establecer un “nicho” pre-metastásico (Xavier *et al.*, 2020).

En la siguiente tabla 3, se encuentra de una manera resumida la información sobre cada tipo de EV y sus efectos en el cáncer.

Tabla 3. Características de las diferentes subpoblaciones de vesículas extracelulares y sus efectos en cáncer.

Tipos	Características	Efecto en cáncer	Referencia
Microvesículas (MVs)	<ul style="list-style-type: none"> ● Diámetro relativamente grande entre 200 y 2000nm. ● Generadas en la membrana plasmática de las células. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Su producción aumenta en células dañadas. ● Generadas por cáncer altamente agresivo y pueden ser transferidas a un cáncer menos maligno, lo cual provee un mecanismo para estimular el crecimiento, supervivencia y migración. ● Ayudan a formar el microambiente tumoral, diferencian células troncales mesenquimales a miofibroblastos, activan a las células endoteliales para formar vasos sanguíneos y reclutan fibroblastos hacia el tumor. 	(Margolis&Sadovsky, 2019)
Exosomas	<ul style="list-style-type: none"> ● Diámetro entre 30 -100 nm. ● Derivadas de membranas plasmáticas lumbales de cuerpos multivesiculares y liberadas constitutivamente a través de la fusión con la membrana celular. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Tienen un papel importante en el <i>crosstalk</i> entre el tumor primario y las células de tejidos distantes, conduciendo a la metástasis de órganos distantes. ● Contiene factores que promueven la formación del nicho metastásico, mediante la reprogramación de células derivadas de la médula ósea (BMDCs) hacia un fenotipo pro-metastásico y pro-vasculogénico, a través de la regulación de la oncoproteína MET. ● Las proteínas RAB involucradas en la secreción de exosomas son altamente expresadas en líneas celulares con altos niveles de secreción de exosomas (RAB1A, RAB5B, RAB7, RAB27A). ● La coexpresión de TYRP2 y MET en exosomas predicen la progresión de la enfermedad. 	(Peinado <i>et al.</i> , 2012)

5.5 Vesículas extracelulares y melanoma

Las células de melanoma manipulan su microambiente para permitir el crecimiento y la metástasis a través de interacciones celulares directas, y mediante la liberación indirecta de factores solubles y EVs. Los factores solubles incluyen factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y otras moléculas (Hood, 2019). Ha sido demostrado que específicamente en melanoma, las EVs tienen un papel muy importante en la progresión del tumor y en la habilidad de aumentar la capacidad migratoria de las células, así como en modular la respuesta inmune y la angiogénesis (Bollard *et al.*, 2020).

La población de EVs más estudiada en melanoma son los exosomas, los cuales tienen una carga molecular de proteínas, RNA y DNA. En su superficie, llevan diferentes proteínas de membrana como las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81, comúnmente denominadas "marcadores exosomales" (Hofmann *et al.*, 2020). También se pueden expresar caveolina-1 y GM3 que son marcadores de balsas lipídicas o *lipid rafts*, los cuales participan en el proceso de metástasis y progresión del cáncer. Por último, se encuentran los antígenos de melanoma: CSPG4, Mart-1 y Met72, que ayudan a confirmar el origen del exosoma (Hood, 2019; Surman *et al.*, 2019).

Los exosomas regulan muchas funciones implicadas en la proliferación de las células cancerosas. En el caso de la promoción de tumorigénesis, los exosomas transmiten la sobre-expresión de miRNA-222. En melanoma, esta molécula de miRNA inhibe la expresión de los genes p27 y CDKN1B, resultando en la activación de la vía PI3K/AKT, transmitiendo esta característica a las células receptoras. Por otra parte, la característica que tienen los exosomas como promotores de neo-angiogénesis, se las otorga las moléculas inmunomoduladoras que llevan como cargamento, entre las cuales se encuentran IL-6, VEGF y MMPs (Bollard *et al.*, 2020; Tucci *et al.*, 2018).

Las MMPs también participan en la invasión por parte de las células tumorales a tejidos saludables, ya que promueven la degradación de la ECM, permitiendo que dichas células crucen los vasos sanguíneos o linfáticos. Los exosomas también han

sido detectados en los ganglios linfáticos centinelas, en donde preparan un nicho pre-metastásico favorable para la llegada de las células de melanoma. Estos exosomas utilizan proteasas que degradan la ECM, además del TNF- α , el VEGF y HIF-1(*Hipoxia Inducible Factor 1*) (Khan *et al.*, 2020; Tucci *et al.*, 2018).

Los exosomas de células de melanoma también participan en el escape de la respuesta inmune, ya sea de manera directa o indirecta. La modulación directa sucede a través de la inhibición de las células inmunitarias efectoras, como ocurre en respuesta a las señales inhibitoras o pro-apoptóticas relacionadas con la expresión de PD-L1. En cambio, la vía indirecta ocurre mediante la estimulación de las células regulatorias, involucrando el aumento del receptor PD-1 en la superficie de las células tumorales, como MSCs, lo cual restringe la activación de las células T (Mannavola *et al.*, 2019).

En la Tabla 4 se muestran los efectos asociados a los exosomas secretados por melanoma.

Tabla 4. Exosomas secretados por células de melanoma

	Efecto	Referencia
1	<ul style="list-style-type: none"> ● Pueden contener gran variedad de mRNAs que causan la invasión tumoral, promueven la metástasis y la supervivencia celular, transmiten tumorigenicidad. ● Promueven la angiogénesis y la coagulación, por lo que. aumenta el estado de malignidad. ● Regulan la función de las células inmunes. 	Hood, 2019
2	<ul style="list-style-type: none"> ● Estimulan la proliferación de células de cáncer. ● Son mediadoras en la activación de la EMT. ● Inducen la formación del nicho pre-metastásico. ● Promueven la degradación de la ECM. ● Modulan las funciones múltiples del sistema inmune, en especial, contrarrestan la respuesta inmune anti-melanoma. 	Surmanet <i>al.</i> , 2019
3	<ul style="list-style-type: none"> ● Son mediadores del comportamiento de invasión, promoviendo el progreso metastásico. ● Activan el señalamiento pro-inflamatorio y reprograman la habilidad de los fibroblastos y astrocitos para reclutar a las células inmunes. 	Lahav <i>et al.</i> , 2019
4	Promueven la tumorigenicidad y el progreso de la enfermedad.	Hofmannet <i>al.</i> , 2020

Como se mencionó en el capítulo anterior, una de las moléculas que portan los exosomas es el TGF- β , la cual se puede encontrar dentro del exosoma o transportado en alguna de las proteínas de membrana como lo muestra la Figura 13. Las biomoléculas libres como algunas citocinas pueden unir a los receptores presentes en la membrana de las células blanco. En el contexto del cáncer, la célula receptora puede ser cualquiera que se encuentre en el microambiente tumoral, en donde el exosoma puede también ser internalizado en la célula, por la formación de un endosoma. Además, se ha reportado que existen concentraciones en picogramos de TGF- β en la superficie de las EVs, lo cual contribuye a la señalización río abajo, como es la vía de activación de las SMAD (Shelke *et al.*, 2019).

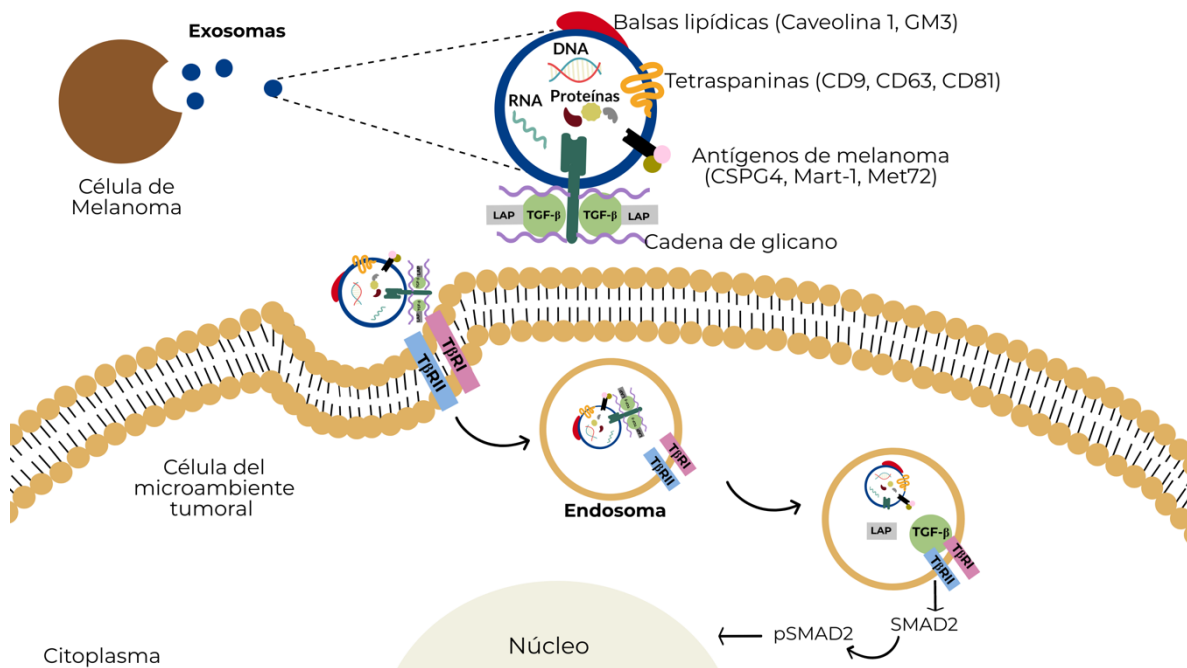


Figura 13. Modelo propuesto de la vía de secreción de un exosoma portador de TGF- β , a partir de células de melanoma. Las células de melanoma secretan exosomas, los cuales tienen varios tipos de proteínas de superficie. Algunas de estas proteínas son marcadores moleculares para poder identificar que efectivamente se trata de un exosoma y que provienen de melanoma. Otras proteínas, como es el caso de los proteoglicanos con heparan sulfato, pueden servir para portar la forma latente de la citocina TGF- β . Una vez que el exosoma es liberado al microambiente tumoral, puede ser endocitado por cualquier célula blanco que se encuentre en dicho espacio, formando un endosoma. Si en la membrana de la célula receptora se encuentran los receptores del TGF- β , empieza la señalización de dicha vía por medio de la activación de las proteínas Smad. Imagen adaptada de Shelke *et al.*, 2019.

En los últimos años, los exosomas han obtenido gran interés como blancos terapéuticos y de diagnóstico, dada su capacidad para portar muchos de los moduladores biológicos de enfermedades inflamatorias, autoinmunes y cáncer. Las biopsias líquidas están emergiendo como una alternativa útil a las biopsias de tejido convencionales. Este nuevo tipo de biopsias proveen un enfoque no invasivo para la detección y medición en tiempo real de biomarcadores de cáncer mediante una extracción simple de sangre, así como su análisis en otros fluidos biológicos como la orina y la saliva. Por lo tanto, el aislamiento y la caracterización de las vesículas extracelulares son una herramienta de gran relevancia para propósitos de diagnóstico y pronóstico del melanoma (Khan *et al.*, 2020; Mannavola *et al.*, 2019). En el siguiente capítulo se hablará sobre algunas de estas técnicas.

Capítulo 6. Técnicas de aislamiento y caracterización de EV

La liberación de las EV al espacio extracelular permite que sean recuperadas de los cultivos celulares o en su caso, de las muestras de biopsias líquidas. Uno de los mayores obstáculos para poder utilizar a los exosomas ampliamente, es la falta de métodos de aislamiento estandarizados. Los procedimientos de aislamiento permiten que las vesículas extracelulares se concentren y sean separadas de agregados proteicos, lipopartículas y de detritos celulares, con diferentes rendimientos (van Niel *et al.*, 2018). En este trabajo se describirán a continuación las técnicas de ultracentrifugación, ultrafiltración y ELISA.

6.1 Ultracentrifugación

La ultracentrifugación, también conocida como la centrifugación diferencial, es el método mayormente utilizado para aislar las EVs. Este acercamiento explota la diferencia de tamaños entre las células, las subpoblaciones de EVs y las proteínas. Esta técnica es el estándar de oro para el aislamiento de exosomas, que involucra varios pasos secuenciales de centrifugación a velocidades de centrifugado altas (>100,000g); no necesita que la muestra sea pre-tratada, se requiere poca experiencia técnica y es económicamente accesible. Dos inconvenientes de la centrifugación diferencial es la baja tasa de recuperación de exosomas y el largo tiempo de operación (aprox. 5 h) (Contreras-Naranjo *et al.*, 2017; Doyle & Wang, 2019; Lucchetti *et al.*, 2019; J. Wang *et al.*, 2021).

En la figura 14 se muestra un protocolo para aislar EVs a partir de medios condicionados (MC) obtenidos de los cultivos celulares mantenidos *in vitro*. Este método consta de 5 pasos de ultracentrifugación: la primera centrifugación diferencial se realiza a 300xg por 10 min, para poder separar a las células presentes en el MC, las cuales se quedan en el pellet formado. Posteriormente, se aumenta la velocidad a 2,000xg por 30 min, separando el pellet que contiene las células muertas. La siguiente ultracentrifugación se realiza a 10,000xg por otros 30 min, con la finalidad de separar los detritos celulares contenidos en el pellet. Es importante mencionar que en todos los pasos se conserva al sobrenadante. A continuación, se realiza el cuarto paso de centrifugación diferencial, a 100,000xg por 70 min, en

donde se conserva el pellet, pues contiene a las vesículas extracelulares, más proteínas contaminantes. Finalmente, se hace la última ultracentrifugación a las mismas condiciones que el paso anterior, agregando un lavado con solución salina de PBS (por sus siglas en inglés *Phosphate-Buffer Solution*), y se obtienen las EV aisladas (Théry *et al.*, 2002).

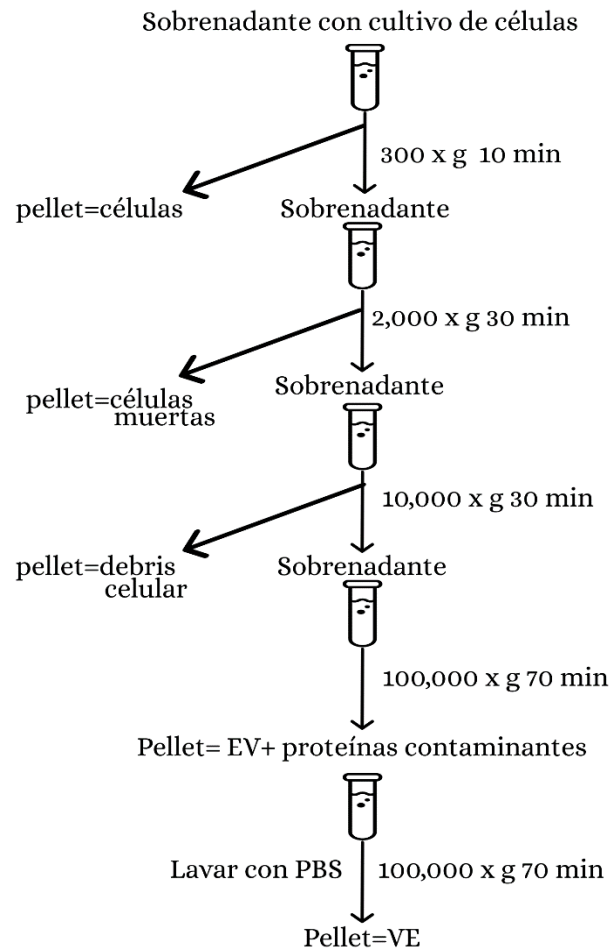


Figura 14. Diagrama de flujo del proceso de ultracentrifugación para purificar vesículas extracelulares del tipo exosomas. Este procedimiento se adaptó del protocolo de Théry *et al.* para el laboratorio 224 NTE del IFC, en donde en el segundo paso se agregaron 20 min al tiempo de ultracentrifugación. Después de las tres primeras ultracentrifugaciones, los pellets se desechan pues contienen células vivas, células muertas y debris celulares, respectivamente. El sobrenadante se mantiene para los pasos subsiguientes. En los últimos dos pasos, se conserva el pellet que contiene a los exosomas y se desecha al sobrenadante.

6.2 Ultrafiltración

La ultrafiltración es una de las técnicas más comunes, basadas en la separación por tamaño para el aislamiento de exosomas. El fundamento de esta técnica es el mismo que el de la filtración en membrana convencional, en donde la separación de las partículas se basa en el tamaño de poro de un filtro o membrana con fibras huecas de corte de peso molecular (MWCO, por sus siglas en inglés molecular weight cut off) de 500 kDa. Las partículas que son más grandes que el MWCO del filtro son retenidas y las partículas más pequeñas que el MWCO pasan a través del filtro. El método de ultrafiltración requiere menor tiempo para llevarse a cabo comparado con el método de ultracentrifugación y no requiere instrumentos especiales. Sin embargo, las partículas y los exosomas se pueden deformar por la fuerza cortante que ejerce la membrana (Doyle & Wang, 2019).

6.3 ELISA

La técnica de ELISA (por sus siglas en inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) es un ensayo en el cual un anticuerpo, con afinidad específica por el antígeno de interés, es inmovilizado en la superficie de un microplato; en este caso el anticuerpo es contra un antígeno presente en la superficie de la vesícula extracelular. La muestra que contiene EVs, es expuesta al pozo que contiene el anticuerpo inmovilizado y las vesículas que contienen el antígeno son inmovilizadas en el microplato para promover las interacciones antígeno-anticuerpo. El contenido de la muestra y las EVs que no son capturadas, son lavadas y las vesículas inmovilizadas pueden ser detectadas utilizando otro anticuerpo marcado. Esta técnica aún no es tan utilizada en el ámbito clínico, ya que la muestra necesita un pretratamiento por ultracentrifugación o ultrafiltración (Doyle & Wang, 2019).

Después de realizar el aislamiento por alguna de las técnicas arriba mencionadas, se debe proceder a la caracterización de las EV obtenidas. Actualmente, existen dos tipos de métodos para realizar dicha caracterización: métodos físicos y métodos químicos/bioquímicos. Los primeros proporcionan información acerca del tamaño de la partícula o la concentración. Los métodos que se describirán más adelante

incluyen: análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA, por sus siglas en inglés *Nanoparticle Tracking Analysis*), citometría de flujo, dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés *Dynamic Light Scattering*) y microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés *Transmission Electron Microscopy*). Por otra parte, los métodos bioquímicos proporcionan información acerca del contenido de las vesículas aisladas. Algunas técnicas empleadas son Western blot y Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR por sus siglas en inglés *Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction*).

6.4 Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)

Es un método basado en la habilidad de rastrear el movimiento Browniano en una suspensión de partículas, obteniendo como información el tamaño promedio y la distribución de tamaños de las vesículas extracelulares presentes en la muestra, incluyendo exosomas. El análisis de NTA es más adecuado para muestras polidispersas. Las ventajas de este método incluyen: la habilidad de medir partículas cuyo diámetro es de hasta 30 nm de tamaño; el ensayo es realizado en fase líquida, por lo cual no hay cambios en las EVs estudiadas. Además, la preparación de la muestra es fácil y rápida, y la medición se lleva a cabo en pocos minutos. Por último, las muestras pueden ser recuperadas después de que la medición haya sido realizada (Szatanek *et al.*, 2017).

6.5 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La técnica de DLS se basa en el análisis de las fluctuaciones de la intensidad de la dispersión de la luz por nanopartículas, después de ser iluminadas con un rayo láser. Las fluctuaciones son causadas por el movimiento Browniano de las partículas en la solución. La velocidad Browniana de las partículas está relacionada con el radio hidrodinámico, por lo cual se asume que todas las partículas son esferas y así esta técnica puede medir moléculas o nanopartículas con un radio en el rango de nanómetros, lo cual es suficiente para detectar exosomas. Provee una determinación adecuada para muestras monodispersas, pero la información se vuelve ambigua en el caso de muestras polidispersas (Rupert *et al.*, 2017).

6.6 Citometría de flujo

Es una técnica que utiliza las señales de dispersión y de fluorescencia emitidas por una partícula individual al ser incidida por un láser, mientras pasa a través de una boquilla. La citometría es una de las técnicas más utilizadas para analizar las EVs, pues tiene la habilidad de determinar el origen celular de cada EV. La dispersión frontal (FSC, por sus siglas en inglés *Forward Scatter*) puede ser utilizada para determinar la estructura y el índice de refracción de las EV, así como la dispersión lateral (SSC, por sus siglas en inglés *Side Scatter*) provee información de estructuras más pequeñas o sobre la granularidad de las estructuras internas (Rupert *et al.*, 2017; Szatanek *et al.*, 2017).

La fluorescencia emitida por las vesículas marcadas con fluorocromos puede ser usada para determinar su tamaño, ya que la intensidad de fluorescencia es proporcional a su superficie. La citometría de flujo tiene varias ventajas, como un alto rendimiento y que permite una rápida medición de las EVs suspendidas en el fluido. Además, si las EVs presentan antígenos en su superficie es posible cuantificarlas o clasificarlas utilizando anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos. Por otra parte, tiene la limitación de no diferenciar las cuentas de calibración y las EV, ya que estas emiten poca intensidad de la señal de dispersión. También es difícil poder detectar vesículas extracelulares pequeñas como son los exosomas (Rupert *et al.*, 2017; Szatanek *et al.*, 2017).

6.7 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

TEM utiliza electrones en lugar de fotones para crear una imagen con resolución de nanómetros. Es una técnica bien establecida y útil para proveer información sobre el tamaño, la estructura y la forma de las EVs. La TEM no requiere que la muestra sea conductiva y ultradelgada, ya que pueden ser observada directamente. Sin embargo, las muestras deben estar fijadas y deshidratada antes de realizar la medición. Adicionalmente, esta técnica se realiza al vacío, por lo cual se pueden dañar las vesículas y afectar su tamaño y morfología (Lucchetti *et al.*, 2019; Szatanek *et al.*, 2017).

6.8 Western blot

El principio detrás de esta técnica involucra la unión por afinidad de un antígeno (proteína blanco) y un anticuerpo que reconoce específicamente dicho antígeno. El Western blot o inmunoblot es una de las metodologías más comunes para el análisis de EV, dado su uso relativamente fácil, su amplia accesibilidad y su habilidad para detectar proteínas internas y de superficie (Doyle & Wang, 2019; Lucchetti *et al.*, 2019).

Después de la desnaturalización, las proteínas son separadas por SDS-PAGE (por sus siglas en inglés *SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Los poros que se mantienen abiertos en la membrana son llenados con proteína de leche sin grasa y después expuestos al anticuerpo contra el antígeno de interés. Posteriormente, la membrana es expuesta a un anticuerpo secundario, el cual reconoce específicamente al anticuerpo inicial (primario). El segundo anticuerpo está marcado con un fluorocromo o enzimas, como es la peroxidasa de rábano, para poder ser detectado (Doyle & Wang, 2019).

Sin embargo, esta técnica no es tan deseable para la cuantificación de las EVs, debido a que la especificidad y la reproducibilidad están limitadas a la calidad del anticuerpo utilizado. Aunado a esto, las muestras de vesículas se deben lisar, y las proteínas son desnaturalizadas y reducidas durante la preparación de la muestra, por lo que ya no se pueden utilizar para pasos o experimentos subsecuentes (Doyle & Wang, 2019; Lucchetti *et al.*, 2019).

6.9 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

La RT-PCR es un método en el que una secuencia de RNA actúa como molde para la transcriptasa reversa, el resultado es un DNA monocatenario que sirve como molde para el PCR y los *primers* (oligonucleótidos) contra las regiones codificantes conocidas de mRNA, van a optimizar la reacción para analizar un transcrito de interés. La RT-PCR utiliza moléculas reporteras para monitorear la producción de la amplificación de los productos durante cada ciclo de la reacción de PCR. Este

método de RT-PCR de punto final cuantifica los niveles de mRNAs en muestras biológicas. Entre sus ventajas se encuentran: sensibilidad, amplio rango dinámico, potencial para un alto rendimiento, así como una detección semi-cuantitativa (Bachman, 2013; Bustin *et al.*, 2005; Huggett *et al.*, 2005).

A continuación, se muestra la Tabla 5, en donde se resumieron los fundamentos de las principales técnicas de caracterización física y biológica para las EV. Se utilizaron los parámetros de estructura y morfología, tamaño, propiedades ópticas, densidad y la presencia de ciertas biomoléculas. En cada técnica se indica su principio de medición, así como sus principales ventajas.

Tabla 5. Principales técnicas para la caracterización biológica y física de vesículas extracelulares

Parámetro	Técnica	Principio de medición	Ventajas	Referencia
Estructura y morfología	Microscopía Electrónica de transmisión (TEM)	Obtención de imágenes por electrones	Diferentes variantes, las cuales proporcionan información biológica. Discriminación adecuada para diferentes tipos de vesículas de acuerdo con la morfología. La muestra no debe ser conductora ni ultradelgada, respecto a la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).	Klanget <i>al.</i> , 2013; Lässer, 2013; Pisitkunet <i>al.</i> , 2004
	Microscopía de Fuerza atómica (AFM)	Medición de interacción entre la punta del cantiliver y la muestra	Da información adicional de propiedades mecánicas y químicas. El equipo se puede operar en varios modos para obtener imágenes topográficas complementarias.	Eaton & West, 2010; Rooset <i>al.</i> , 2010; Vorselenet <i>al.</i> , 2013, 2015
	Dispersión de rayos X en ángulo bajo (SAXS)	Detección de la dispersión de rayos X en ángulos pequeños	Proporciona información estructural a escala nanométrica.	Bouwstraet <i>al.</i> , 1993; Castorphet <i>al.</i> , 2010
	Dispersión dinámica de luz (DLS)	Análisis de las fluctuaciones de la intensidad de dispersión de las partículas en el movimiento browniano.	Determina con precisión el tamaño de muestras monodispersas y se ajustan los datos de dispersión en el caso de muestras polidispersas.	Agarwalet <i>al.</i> , 2015; Atayet <i>al.</i> , 2011; Palmieriet <i>al.</i> , 2014;

Tamaño				Petersenet <i>al.</i> , 2014
	Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)	Rastrea el movimiento browniano de las partículas en dispersión o en modo de fluorescencia	Se puede cuantificar el número de partículas en solución, después de estimar el volumen de muestra. El análisis de datos es más sencillo y adecuado para muestras polidispersas que DLS.	Dragovicet <i>al.</i> , 2011; Gardineret <i>al.</i> , 2013;. Pol <i>et al.</i> , 2010
	Detección de pulso resistivo	Mide el cambio en la conductancia a través de un poro sensor al pasar una partícula		Laneet <i>al.</i> , 2015
	Citometría de flujo	Mide la intensidad de la dispersión o la fluorescencia de las partículas iluminadas por un láser	Adecuado para muestras polidispersas. "Fácil" manejo de muestra. El análisis se puede amplificar para determinar el contenido biológico de las VE.	Pol <i>et al.</i> , 2012; Vorauer-Uhlet <i>al.</i> , 2000

Propiedades ópticas	Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)	Mide la intensidad de dispersión de partículas individuales y se correlaciona con el tamaño determinado por NTA		Gardineret <i>al.</i> , 2014; van der Pol <i>et al.</i> , 2014
Densidad	Densidad de gradiente	El material flota a una densidad igual a la del medio circundante	Separación precisa de los tipos de vesículas según la densidad	Aalbertset <i>al.</i> , 2012; Hristovet <i>al.</i> , 2004; Théryet <i>al.</i> , 2002
	Resonador de canal suspendido	El cambio de la frecuencia de resonancia al pasar una vesícula es relacionado con la masa de la vesícula	Se puede determinar la densidad de flotación de una VE de manera individual	Grimsley & Nick Pace, 2003; Olcumet <i>al.</i> , 2014
Cuantificación de biomoléculas	Espectroscopía de luz Ultravioleta visible (UV-vis)	Las soluciones de proteína se cuantifican mediante la absorción de luz de residuos aromáticos.		Sedmaket <i>al.</i> , 1977
	Colorimetría	Absorbancia de un complejo coloreado y la proteína, mediante una curva de calibración con soluciones de concentración conocida de la proteína.	Técnica accesible, de bajo costo.	Smith <i>et al.</i> , 1985; Xiaoet <i>al.</i> , 2012

Detección selectiva utilizando marcadores biomoleculares específicos				
Parámetro	Técnica	Principio	Ventaja	Referencia
Cuantificar y comparar la presencia de proteínas o RNAs específicos, asociados a las proteínas o RNA en muestras que contienen EVs	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)	Retranscribir una hebra o cadena de RNA presente en la muestra, mediante el cambio cíclico de temperaturas y así determinar la expresión de cierta proteína secretada por la muestra.	Método cualitativo y cuantitativo de alta sensibilidad y especificidad.	Wieckowskiet <i>al.</i> , 2009
	Western blotting Método más común para caracterizar proteínas en VE	Separación de proteínas mediante electroforesis en gel y su identificación mediante la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática o fluorescencia.	Método semicuantitativo que permite tomar fotografías para presentar los resultados.	Wieckowskiet <i>al.</i> , 2009
	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)	Separación de proteínas mediante electroforesis.		Théryet <i>al.</i> , 2018
	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	El antígeno se inmoviliza y se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable (como color).	Es un método cuantitativo que determina la cantidad exacta de analito en la muestra.	Théryet <i>al.</i> , 2018

Conclusiones

- Las células de melanoma secretan exosomas, los cuales pueden ser portadores de la citocina TGF- β .
- Los exosomas secretados por las células de melanoma contienen diferentes biomoléculas como: mRNAs, proteínas, DNA y otras moléculas, que ayudan a promover la metástasis, la tumorigenicidad, la supervivencia celular, la degradación de la matriz extracelular y pueden contrarrestar la respuesta inmune; todo esto causa la progresión de la enfermedad.
- Las proteínas presentes en la superficie de los exosomas, portadoras de la citocina TGF- β pueden ser: proteoglicanos, integrinas y moléculas de adhesión (ICAM).
- Los efectos del TGF- β dependen del contexto celular; en células cancerosas participa en la promoción del desarrollo de tumores, en el proceso de angiogénesis, en la transición al fenotipo de cáncer más agresivo y en la supervivencia celular.
- Existen múltiples y diversos métodos para la caracterización y aislamiento de las vesículas extracelulares, dependiendo del parámetro que se quiera estudiar se escogerá la técnica.

Bibliografía

1. Aalberts, M., van Dissel-Emiliani, F. M. F., van Adrichem, N. P. H., van Wijnen, M., Wauben, M. H. M., Stout, T. A. E., & Stoorvogel, W. (2012). Identification of Distinct Populations of Prostatomes That Differentially Express Prostate Stem Cell Antigen, Annexin A1, and GLIPR2 in Humans1. En [SS1] *Biology of Reproduction* (Vol. 86, Número 3). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095760>
2. Agarwal, K., Saji, M., Lazaroff, S. M., Palmer, A. F., Ringel, M. D., & Paulaitis, M. E. (2015). Analysis of Exosome Release as a Cellular Response to MAPK Pathway Inhibition. En *Langmuir* (Vol. 31, Número 19, pp. 5440–5448). <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00095>
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
4. Alenquer, M., & Amorim, M. J. (2015). Exosome Biogenesis, Regulation, and Function in Viral Infection. *Viruses*, 7(9), 5066–5083. <https://doi.org/10.3390/v7092862>
5. Alvarez, M. E. G., del Carmen Jiménez, M., & Garcés, M. E. (2016). *Inmunología Molecular, Celular y Traslacional*. Lippincott Williams & Wilkins.
6. Amin, A. R. M. R., Karpowicz, P. A., Carey, T. E., Arbiser, J., Nahta, R., Chen, Z. G., Dong, J.-T., Kucuk, O., Khan, G. N., Huang, G. S., Mi, S., Lee, H.-Y., Reichrath, J., Honoki, K., Georgakilas, A. G., Amedei, A., Amin, A., Helferich, B., Boosani, C. S., ... Shin, D. M. (2015). Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. *Seminars in Cancer Biology*, 35 Suppl, S55–S77. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.005>
7. Anastasiou, D. (2017). Tumour microenvironment factors shaping the cancer metabolism landscape. *British Journal of Cancer*, 116(3), 277–286. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.412>
8. Aris, M. (2009). Origen del melanocito normal y maligno. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 43(3), 333–337. <https://www.redalyc.org/pdf/535/53516747007.pdf>

9. Atay, S., Gercel-Taylor, C., Kesimer, M., & Taylor, D. D. (2011). Morphologic and proteomic characterization of exosomes released by cultured extravillous trophoblast cells. En *Experimental Cell Research* (Vol. 317, Número 8, pp. 1192–1202). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.01.014>
10. Bachman, J. (2013). Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods in Enzymology*, 530, 67–74. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6>
11. Balkwill, F. R., Capasso, M., & Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 23), 5591–5596. <https://doi.org/10.1242/jcs.116392>
12. Bierie, B., & Moses, H. (2006). TGF- β and cancer. En *Cytokine & Growth Factor Reviews* (Vol. 17, Números 1-2, pp. 29–40). <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.09.006>
13. Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews. Genetics*, 6(8), 611–622. <https://doi.org/10.1038/nrg1656>
14. Bollard, S. M., Casalou, C., Goh, C. Y., Tobin, D. J., Kelly, P., McCann, A., & Potter, S. M. (2020). Circulating Melanoma-Derived Extracellular Vesicles: Impact on Melanoma Diagnosis, Progression Monitoring, and Treatment Response. *Pharmaceuticals*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/ph13120475>
15. Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., Bras, W., & Talsma, H. (1993). Small angle X-ray scattering: possibilities and limitations in characterization of vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 64(1-3), 83–98. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(93\)90059-c](https://doi.org/10.1016/0009-3084(93)90059-c)
16. Busse, A., & Keilholz, U. (2011). Role of TGF- β in melanoma. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(12), 2165–2175. <https://doi.org/10.2174/138920111798808437>
17. Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. En *Journal of Molecular Endocrinology* (Vol. 34, Número 3, pp. 597–601). <https://doi.org/10.1677/jme.1.01755>
18. Castorph, S., Riedel, D., Arleth, L., Sztucki, M., Jahn, R., Holt, M., & Salditt, T. (2010). Structure parameters of synaptic vesicles quantified by small-angle

- x-ray scattering. *Biophysical Journal*, 98(7), 1200–1208. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.12.4278>
19. Catherine Sánchez, N. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553–562. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(13\)70659-X](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70659-X)
 20. Cilluffo, D., Barra, V., & Di Leonardo, A. (2020). P14ARF: The Absence that Makes the Difference. *Genes*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/genes11070824>
 21. Colak, S., & Ten Dijke, P. (2017). Targeting TGF- β Signaling in Cancer. *Trends in Cancer Research*, 3(1), 56–71. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.11.008>
 22. Contreras-Naranjo, J. C., Wu, H.-J., & Ugaz, V. M. (2017). Microfluidics for exosome isolation and analysis: enabling liquid biopsy for personalized medicine. En *Lab on a Chip* (Vol. 17, Número 21, pp. 3558–3577). <https://doi.org/10.1039/c7lc00592j>
 23. Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., & Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(11). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087288>
 24. Cusan, M., Mungo, G., De Marco Zompit, M., Segatto, I., Belletti, B., & Baldassarre, G. (2018). Landscape of CDKN1B Mutations in Luminal Breast Cancer and Other Hormone-Driven Human Tumors. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 393. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00393>
 25. D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. En *Cell Biology International* (Vol. 43, Número 6, pp. 582–592). <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
 26. Deheuninck, J., & Luo, K. (2009). Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF-beta signaling. *Cell Research*, 19(1), 47–57. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.324>
 27. Dempke, W. C. M., Fenchel, K., Uciechowski, P., & Chevassut, T. (2017). Targeting Developmental Pathways: The Achilles Heel of Cancer? *Oncology*, 93(4), 213–223. <https://doi.org/10.1159/000478703>

28. de Vaca, R. P.-C., Cárdenas-Cárdenas, E., Mondragón-Terón, P., & Solís, A. A. E.-V. (2018). Biología molecular del cáncer y las nuevas herramientas en oncología. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 22(4), 171–181. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=79146>
29. Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 857–902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>
30. Doyle, L. M., & Wang, M. Z. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
31. Dragovic, R. A., Gardiner, C., Brooks, A. S., Tannetta, D. S., Ferguson, D. J. P., Hole, P., Carr, B., Redman, C. W. G., Harris, A. L., Dobson, P. J., Harrison, P., & Sargent, I. L. (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7(6), 780–788. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.04.003>
32. Dumaz, N., Jouenne, F., Delyon, J., Mourah, S., Bensussan, A., & Lebbé, C. (2019). Atypical BRAF and NRAS Mutations in Mucosal Melanoma. *Cancers*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/cancers11081133>
33. Eaton, P., & West, P. (2010). *Atomic Force Microscopy*. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199570454.001.0001>
34. Eddy, K., Shah, R., & Chen, S. (2020). Decoding Melanoma Development and Progression: Identification of Therapeutic Vulnerabilities. *Frontiers in Oncology*, 10, 626129. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.626129>
35. Friedl, P., Locker, J., Sahai, E., & Segall, J. E. (2012). Classifying collective cancer cell invasion. *Nature Cell Biology*, 14(8), 777–783. <https://doi.org/10.1038/ncb2548>
36. Gardiner, C., Ferreira, Y. J., Dragovic, R. A., Redman, C. W. G., & Sargent, I. L. (2013). Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. En *Journal of Extracellular Vesicles* (Vol. 2, Número 1, p. 19671). <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.19671>

37. Gardiner, C., Shaw, M., Hole, P., Smith, J., Tannetta, D., Redman, C. W., & Sargent, I. L. (2014). Measurement of refractive index by nanoparticle tracking analysis reveals heterogeneity in extracellular vesicles. En *Journal of Extracellular Vesicles* (Vol. 3, Número 1, p. 25361). <https://doi.org/10.3402/jev.v3.25361>
38. Gniadecki, R. (1998). Regulation of keratinocyte proliferation. *General Pharmacology*, 30(5), 619–622. [https://doi.org/10.1016/s0306-3623\(97\)00419-9](https://doi.org/10.1016/s0306-3623(97)00419-9)
39. Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., & Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 16(6), 2129–2144. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.6.2129>
40. Goulet, C. R., Bernard, G., Tremblay, S., Chabaud, S., Bolduc, S., & Pouliot, F. (2018). Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into Cancer-Associated Fibroblasts through TGF β Signaling. En *Molecular Cancer Research* (Vol. 16, Número 7, pp. 1196–1204). <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-17-0784>
41. Greten, F. R., & Grivennikov, S. I. (2019). Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*, 51(1), 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>
42. Grimsley, G. R., & Nick Pace, C. (2003). Spectrophotometric Determination of Protein Concentration. En *Current Protocols in Protein Science* (Vol. 33, Número 1). <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0301s33>
43. Gruenberg, J. (2020). Life in the lumen: The multivesicular endosome. *Traffic*, 21(1), 76–93. <https://doi.org/10.1111/tra.12715>
44. Guo, Y.-J., Pan, W.-W., Liu, S.-B., Shen, Z.-F., Xu, Y., & Hu, L.-L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(3), 1997–2007. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>
45. Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., & Baruteau, J. (2021). The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 19(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00730-1>

46. Gu, S., & Feng, X.-H. (2018). TGF- β signaling in cancer. En *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (Vol. 50, Número 10, pp. 941–949). <https://doi.org/10.1093/abbs/gmy092>
47. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
48. Han, Y., Liu, D., & Li, L. (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American Journal of Cancer Research*, *10*(3), 727–742. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32266087>
49. Harrer, D. C., Dörrie, J., & Schaft, N. (2019). CSPG4 as Target for CAR-T-Cell Therapy of Various Tumor Entities-Merits and Challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(23). <https://doi.org/10.3390/ijms20235942>
50. Hartman, M. L., & Czyz, M. (2015). MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *72*(7), 1249–1260. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1791-0>
51. Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F. (2012). PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(9), a011189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011189>
52. Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*, *28*(6), 436–453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>
53. Hofmann, L., Ludwig, S., Vahl, J. M., Brunner, C., Hoffmann, T. K., & Theodoraki, M.-N. (2020). The Emerging Role of Exosomes in Diagnosis, Prognosis, and Therapy in Head and Neck Cancer. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Número 11, p. 4072). <https://doi.org/10.3390/ijms21114072>
54. Hood, J. L. (2019). Natural melanoma-derived extracellular vesicles. *Seminars in Cancer Biology*, *59*, 251–265. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.06.020>
55. Hristov, M., Erl, W., Linder, S., & Weber, P. C. (2004). Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. En *Blood* (Vol. 104, Número 9, pp. 2761–2766). <https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3614>

56. Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. En *Genes & Immunity* (Vol. 6, Número 4, pp. 279–284). <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>
57. Hussein, M. R. (2005). Transforming growth factor-beta and malignant melanoma: molecular mechanisms. *Journal of Cutaneous Pathology*, 32(6), 389–395. <https://doi.org/10.1111/j.0303-6987.2005.00356.x>
58. Inokuchi, J.-I., Inamori, K.-I., Kabayama, K., Nagafuku, M., Uemura, S., Go, S., Suzuki, A., Ohno, I., Kanoh, H., & Shishido, F. (2018). Biology of GM3 Ganglioside. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 156, 151–195. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.10.004>
59. Jadli, A. S., Ballasy, N., Edalat, P., & Patel, V. B. (2020). Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake. En *Molecular and Cellular Biochemistry* (Vol. 467, Números 1-2, pp. 77–94). <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03703-z>
60. Javelaud, D., van Kempen, L., Alexaki, V. I., Le Scolan, E., Luo, K., & Mauviel, A. (2011). Efficient TGF- β /SMAD signaling in human melanoma cells associated with high c-SKI/SnoN expression. En *Molecular Cancer* (Vol. 10, Número 1). <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-2>
61. Jave-Suárez, L. F., Ratkovich-González, S., Olimón-Andalón, V., & Aguilar-Lemarro, A. (2015). Modulación de la apoptosis por el virus del papiloma humano. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(2), S200–S205. <https://www.redalyc.org/pdf/4577/457744942013.pdf>
62. Juan, T., & Fürthauer, M. (2018). Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles. En *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 74, pp. 66–77). <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.08.022>
63. Kaksonen, M., & Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 19, Número 5, pp. 313–326). <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132>
64. Ke, Q., & Costa, M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Molecular Pharmacology*, 70(5), 1469–1480. <https://doi.org/10.1124/mol.106.027029>
65. Khan, A. Q., Akhtar, S., Prabhu, K. S., Zarif, L., Khan, R., Alam, M., Buddenkotte, J., Ahmad, A., Steinhoff, M., & Uddin, S. (2020). Exosomes:

- Emerging Diagnostic and Therapeutic Targets in Cutaneous Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23).
<https://doi.org/10.3390/ijms21239264>
66. Klang, V., Valenta, C., & Matsko, N. B. (2013). Electron microscopy of pharmaceutical systems. *Micron*, 44, 45–74.
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.07.008>
67. Kumar, S., Stokes, J., 3rd, Singh, U. P., Scisum Gunn, K., Acharya, A., Manne, U., & Mishra, M. (2016). Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer Letters*, 374(1), 156–166.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.056>
68. Lahav, T. G., Adler, O., Zait, Y., Shani, O., Amer, M., Doron, H., Abramovitz, L., Yofe, I., Cohen, N., & Erez, N. (2019). Melanoma-derived extracellular vesicles instigate proinflammatory signaling in the metastatic microenvironment. En *International Journal of Cancer* (Vol. 145, Número 9, pp. 2521–2534). <https://doi.org/10.1002/ijc.32521>
69. Lane, R. E., Korbie, D., Anderson, W., Vaidyanathan, R., & Trau, M. (2015). Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing. *Scientific Reports*, 5, 7639.
<https://doi.org/10.1038/srep07639>
70. Lässer, C. (2013). Identification and Analysis of Circulating Exosomal microRNA in Human Body Fluids. En *Methods in Molecular Biology* (pp. 109–128). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-453-1_9
71. Latifkar, A., Hur, Y. H., Sanchez, J. C., Cerione, R. A., & Antonyak, M. A. (2019). New insights into extracellular vesicle biogenesis and function. En *Journal of Cell Science* (Vol. 132, Número 13).
<https://doi.org/10.1242/jcs.222406>
72. Lino-Silva, L. S., Domínguez-Rodríguez, J. A., Aguilar-Romero, J. M., Martínez-Said, H., Salcedo-Hernández, R. A., García-Pérez, L., Herrera-Gómez, Á., & Cuellar-Hubbe, M. (2016). Melanoma in Mexico: Clinicopathologic Features in a Population with Predominance of Acral Lentiginous Subtype. *Annals of Surgical Oncology*, 23(13), 4189–4194.
<https://doi.org/10.1245/s10434-016-5394-x>

73. Lin, Y.-C., Chipot, C., & Scheuring, S. (2020). Annexin-V stabilizes membrane defects by inducing lipid phase transition. *Nature Communications*, *11*(1), 230. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14045-w>
74. Liu, P., Wang, Y., & Li, X. (2019). Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, *9*(5), 871–879. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.03.002>
75. Lizarraga, V. G. (2018). *BMPs como diana terapéutica en la fibrosis hepática* [UNIVERSIDAD COMPLUTENSE]. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/VICTORIA%20GONZALEZ%20LIZARRAGA.pdf>
76. Lucchetti, D., Fattorossi, A., & Sgambato, A. (2019). Extracellular Vesicles in Oncology: Progress and Pitfalls in the Methods of Isolation and Analysis. *Biotechnology Journal*, *14*(1), e1700716. <https://doi.org/10.1002/biot.201700716>
77. Mahul-Mellier, A.-L., Strappazon, F., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Béal, D., Torch, S., Hemming, F., Petiot, A., Verna, J.-M., Fraboulet, S., & Sadoul, R. (2009). Alix and ALG-2 make a link between endosomes and neuronal death. *Biochemical Society Transactions*, *37*(Pt 1), 200–203. <https://doi.org/10.1042/BST0370200>
78. Mannavola, F., D'Oronzo, S., Cives, M., Stucci, L. S., Ranieri, G., Silvestris, F., & Tucci, M. (2019). Extracellular Vesicles and Epigenetic Modifications Are Hallmarks of Melanoma Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010052>
79. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, *454*(7203), 436–444. <https://doi.org/10.1038/nature07205>
80. Margolis, L., & Sadovsky, Y. (2019). The biology of extracellular vesicles: The known unknowns. *PLoS Biology*, *17*(7), e3000363. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000363>
81. Martínez-Jiménez, F., Muiños, F., Sentís, I., Deu-Pons, J., Reyes-Salazar, I., Arnedo-Pac, C., Mularoni, L., Pich, O., Bonet, J., Kranas, H., Gonzalez-Perez, A., & Lopez-Bigas, N. (2020). A compendium of mutational cancer

- driver genes. *Nature Reviews. Cancer*, 20(10), 555–572.
<https://doi.org/10.1038/s41568-020-0290-x>
82. Ma, S., Meng, Z., Chen, R., & Guan, K.-L. (2019). The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. *Annual Review of Biochemistry*, 88, 577–604.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111829>
83. Massagué, J. (2008). TGF β in Cancer. *Cell*, 134(2), 215–230.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>
84. Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, 21(1), 9–17.
<https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
85. Melincovici, C. S., Boşca, A. B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mişu, C., Istrate, M., Moldovan, I. M., Roman, A. L., & Mişu, C. M. (2018). Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine de Morphologie et Embryologie*, 59(2), 455–467.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30173249>
86. Mendiola, A. V., & Cruz, I. S. (2014). Metabolismo energético y cáncer. *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 17(2), 108–113.
<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=58781>
87. Mierke, C. T. (2015). Initiation of a neoplasm or tumor. En *Physics of Cancer* (pp. 1–54). IOP Publishing: Bristol, UK.
<https://iopscience.iop.org/chapter/978-0-7503-1134-2/bk978-0-7503-1134-2ch1.pdf>
88. Muñoz-Couselo, E., Adelantado, E. Z., Ortiz, C., García, J. S., & Perez-García, J. (2017). NRAS-mutant melanoma: current challenges and future prospect. *OncoTargets and Therapy*, 10, 3941–3947.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S117121>
89. Murphy, K., & Weaver, C. (2019). *Inmunología de Janeway*. Manual Moderno.

90. NCI. (2016). Antígeno MART-1. Departamento de Salud y Servicios Humanos. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/antigeno-mart-1>
91. Nebenfuhr, S., Kollmann, K., & Sexl, V. (2020). The role of CDK6 in cancer. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 147(11), 2988–2995. <https://doi.org/10.1002/ijc.33054>
92. Neel, J.-C., Humbert, L., & Lebrun, J.-J. (2012). The dual role of TGFβ in human cancer: from tumor suppression to cancer metastasis. *International Scholarly Research Notices*, 2012. <https://downloads.hindawi.com/archive/2012/381428.pdf>
93. Nowell, C. S., & Radtke, F. (2017). Notch as a tumour suppressor. *Nature Reviews. Cancer*, 17(3), 145–159. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.145>
94. Ohsie, S. J., Sarantopoulos, G. P., Cochran, A. J., & Binder, S. W. (2008). Immunohistochemical characteristics of melanoma. *Journal of Cutaneous Pathology*, 35(5), 433–444. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.2007.00891.x>
95. Olcum, S., Cermak, N., Wasserman, S. C., Christine, K. S., Atsumi, H., Payer, K. R., Shen, W., Lee, J., Belcher, A. M., Bhatia, S. N., & Manalis, S. R. (2014). Weighing nanoparticles in solution at the attogram scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), 1310–1315. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318602111>
96. OMS (2018). Cáncer. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
97. Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., & Kuby, J. (2014). *Kuby inmunología: séptima edición*. McGraw Hill Educación.
98. Palmieri, G., Colombino, M., Casula, M., Manca, A., Mandalà, M., Cossu, A., & Italian Melanoma Intergroup (IMI). (2018). Molecular Pathways in Melanomagenesis: What We Learned from Next-Generation Sequencing Approaches. *Current Oncology Reports*, 20(11), 86. <https://doi.org/10.1007/s11912-018-0733-7>

99. Palmieri, G., Ombra, M., Colombino, M., Casula, M., Sini, M., Manca, A., Paliogiannis, P., Ascierto, P. A., & Cossu, A. (2015). Multiple Molecular Pathways in Melanomagenesis: Characterization of Therapeutic Targets. *Frontiers in Oncology*, 5, 183. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00183>
100. Palmieri, V., Lucchetti, D., Gatto, I., Maiorana, A., Marcantoni, M., Maulucci, G., Papi, M., Pola, R., De Spirito, M., & Sgambato, A. (2014). Dynamic light scattering for the characterization and counting of extracellular vesicles: a powerful noninvasive tool. En *Journal of Nanoparticle Research* (Vol. 16, Número 9). <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2583-z>
101. Park, J. H., Pyun, W. Y., & Park, H. W. (2020). Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. *Cells*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/cells9102308>
102. Pathania, A. S., & Challagundla, K. B. (2021). Exosomal Long Non-coding RNAs: Emerging Players in the Tumor Microenvironment. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 23, 1371–1383. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.09.039>
103. Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*, 23(1), 27–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
104. Pazo-Cid, R.A., et al. (2012). Apoptosis, cáncer & Co. *Rev Int Grupos Invest Oncol.* 2012;1(1):23-28.
105. Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B. A., Callahan, M. K., Yuan, J., Martins, V. R., Skog, J., Kaplan, R. N., ... Lyden, D. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine*, 18(6), 883–891. <https://doi.org/10.1038/nm.2753>
106. Perrot, C. Y., Javelaud, D., & Mauviel, A. (2013). Insights into the Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway in Cutaneous Melanoma. *Annals of Dermatology*, 25(2), 135–144. <https://doi.org/10.5021/ad.2013.25.2.135>

107. Petersen, K. E., Manangon, E., Hood, J. L., Wickline, S. A., Fernandez, D. P., Johnson, W. P., & Gale, B. K. (2014). A review of exosome separation techniques and characterization of B16-F10 mouse melanoma exosomes with AF4-UV-MALS-DLS-TEM. En *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Vol. 406, Número 30, pp. 7855–7866). <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8040-0>
108. Philpott, C., Tovell, H., Frayling, I. M., Cooper, D. N., & Upadhyaya, M. (2017). The NF1 somatic mutational landscape in sporadic human cancers. *Human Genomics*, 11(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40246-017-0109-3>
109. Pisitkun, T., Shen, R.-F., & Knepper, M. A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), 13368–13373. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403453101>
110. Pol, E. V. A. N. D. E. R., Van Der Pol, E., Hoekstra, A. G., Sturk, A., Otto, C., Van Leeuwen, T. G., & Nieuwland, R. (2010). Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. En *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (Vol. 8, Número 12, pp. 2596–2607). <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.04074.x>
111. Pol, E. V. D., Van Der POL, E., Van GEMERT, M. J. C., Sturk, A., Nieuwland, R., & Van LEEUWEN, T. G. (2012). Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. En *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (Vol. 10, Número 5, pp. 919–930). <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04683.x>
112. Pol, E. van der, van der Pol, E., Coumans, F. A. W., Sturk, A., Nieuwland, R., & van Leeuwen, T. G. (2014). Refractive Index Determination of Nanoparticles in Suspension Using Nanoparticle Tracking Analysis. En *Nano Letters* (Vol. 14, Número 11, pp. 6195–6201). <https://doi.org/10.1021/nl503371p>
113. Prodromou, C. (2016). Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochemical Journal*, 473(16), 2439–2452. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160005>

114. Ritterhouse, L. L., & Barletta, J. A. (2015). BRAF V600E mutation-specific antibody: A review. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 32(5), 400–408. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2015.02.010>
115. Roos, W. H., Bruinsma, R., & Wuite, G. J. L. (2010). Physical virology. En *Nature Physics* (Vol. 6, Número 10, pp. 733–743). <https://doi.org/10.1038/nphys1797>
116. Rosales, C., & Uribe-Querol, E. (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. En *BioMed Research International* (Vol. 2017, pp. 1–18). <https://doi.org/10.1155/2017/9042851>
117. Rupert, D. L. M., Claudio, V., Lässer, C., & Bally, M. (2017). Methods for the physical characterization and quantification of extracellular vesicles in biological samples. *Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects*, 1861(1 Pt A), 3164–3179. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.07.028>
118. Schadendorf, D., Fisher, D. E., Garbe, C., Gershenwald, J. E., Grob, J.-J., Halpern, A., Herlyn, M., Marchetti, M. A., McArthur, G., Ribas, A., Roesch, A., & Hauschild, A. (2015). Melanoma. *Nature Reviews. Disease Primers*, 1, 15003. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.3>
119. Sedmak, J. J., James Sedmak, J., & Grossberg, S. E. (1977). A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. En *Analytical Biochemistry* (Vol. 79, Números 1-2, pp. 544–552). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90428-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90428-6)
120. Serra, S., & Chetty, R. (2018). p16. *Journal of Clinical Pathology*, 71(10), 853–858. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2018-205216>
121. Shain, A. H., & Bastian, B. C. (2016). From melanocytes to melanomas. *Nature Reviews. Cancer*, 16(6), 345–358. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.37>
122. Shelke, G. V., Yin, Y., Jang, S. C., Lässer, C., Wennmalm, S., Hoffmann, H. J., Li, L., Gho, Y. S., Nilsson, J. A., & Lötvall, J. (2019). Endosomal signalling via exosome surface TGF β -1. En *Journal of Extracellular Vesicles* (Vol. 8, Número 1, p. 1650458). <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1650458>

123. Sherr, C. J., Beach, D., & Shapiro, G. I. (2016). Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer Discovery*, 6(4), 353–367. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0894>
124. Shimaoka, M., Kawamoto, E., Gaowa, A., Okamoto, T., & Park, E. J. (2019). Connexins and Integrins in Exosomes. *Cancers*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/cancers11010106>
125. Shurin, M. R., & Keskinov, A. A. (2016). Dendritic Cells in the Tumor Microenvironment. En *Encyclopedia of Immunobiology* (pp. 499–511). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374279-7.17014-6>
126. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. En *Analytical Biochemistry* (Vol. 150, Número 1, pp. 76–85). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
127. Song, Z., Mao, J., Barrero, R. A., Wang, P., Zhang, F., & Wang, T. (2020). Development of a CD63 Aptamer for Efficient Cancer Immunochemistry and Immunoaffinity-Based Exosome Isolation. *Molecules*, 25(23). <https://doi.org/10.3390/molecules25235585>
128. Sontheimer-Phelps, A., Hassell, B. A., & Ingber, D. E. (2019). Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nature Reviews. Cancer*, 19(2), 65–81. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0104-6>
129. Sosa-Garrocho, M., & Macías-Silva, M. (2004). *EL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA*. http://www3.uacj.mx/ICB/redcib/Documents/REB_DOC/2004/03/2004_105_3-11Marcela_Sosa-Garrocho.pdf
130. Surman, M., Stępień, E., & Przybyło, M. (2019). Melanoma-Derived Extracellular Vesicles: Focus on Their Proteome. *Proteomes*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/proteomes7020021>
131. Szatanek, R., Baj-Krzyworzeka, M., Zimoch, J., Lekka, M., Siedlar, M., & Baran, J. (2017). The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Número 6, p. 1153). <https://doi.org/10.3390/ijms18061153>

132. Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J.-M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
133. Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews. Immunology*, 2(8), 569–579. <https://doi.org/10.1038/nri855>
134. Tucci, M., Mannavola, F., Passarelli, A., Stucci, L. S., Cives, M., & Silvestris, F. (2018). Exosomes in melanoma: a role in tumor progression, metastasis and impaired immune system activity. *Oncotarget*, 9(29), 20826–20837. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24846>
135. Tzavlaki, K., & Moustakas, A. (2020). TGF- β Signaling. *Biomolecules*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/biom10030487>
136. Vander Ark, A., Cao, J., & Li, X. (2018). TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling. *Cellular Signalling*, 52, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.09.002>
137. van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
138. Vanni, I., Tanda, E. T., Dalmaso, B., Pastorino, L., Andreotti, V., Bruno, W., Boutros, A., Spagnolo, F., & Ghiorzo, P. (2020). Non-BRAF Mutant Melanoma: Molecular Features and Therapeutical Implications. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 172. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00172>
139. Viallard, C., & Larrivée, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, 20(4), 409–426. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>

140. Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., Lichtor, T., Decker, W. K., Whelan, R. L., Kumara, H. M. C. S., Signori, E., Honoki, K., Georgakilas, A. G., Amin, A., Helferich, W. G., Boosani, C. S., Guha, G., Ciriolo, M. R., Chen, S., ... Kwon, B. S. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, 35 Suppl, S185–S198. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.004>
141. Vorauer-Uhl, K., Wagner, A., Borth, N., & Katinger, H. (2000). Determination of liposome size distribution by flow cytometry. En *Cytometry* (Vol. 39, Número 2, pp. 166–171). [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0320\(20000201\)39:2<166::aid-cyto10>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(20000201)39:2<166::aid-cyto10>3.0.co;2-m)
142. Vorselen, D., Roos, W. H., van Loon, J. J. W. A., & Wuite, G. J. L. (2013). Role of Mechanical Properties of Cell Mediated Vesicles in Membrane Fusion. En *Biophysical Journal* (Vol. 104, Número 2, p. 620a). <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.3431>
143. Vorselen, D., van Dommelen, S. M., van Loon, J. J. W. A., Schiffelers, R. M., Roos, W. H., & Wuite, G. J. L. (2015). Mechanics of Extracellular Vesicles from Red Blood Cells. En *Biophysical Journal* (Vol. 108, Número 2, p. 242a). <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.11.1343>
144. Wang, J.-J., Lei, K.-F., & Han, F. (2018). Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(12), 3855–3864. https://doi.org/10.26355/eurrev_201806_15270
145. Wang, J., Xiang, H., Lu, Y., & Wu, T. (2021). Role and clinical significance of TGF- β 1 and TGF- β R1 in malignant tumors (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 47(4). <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4888>
146. Wieckowski, E. U., Visus, C., Szajnik, M., Szczepanski, M. J., Storkus, W. J., & Whiteside, T. L. (2009). Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8⁺ T lymphocytes. *Journal of Immunology*, 183(6), 3720–3730. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900970>

147. Xavier, C. P. R., Caires, H. R., Barbosa, M. A. G., Bergantim, R., Guimarães, J. E., & Vasconcelos, M. H. (2020). The Role of Extracellular Vesicles in the Hallmarks of Cancer and Drug Resistance. *Cells* , 9(5). <https://doi.org/10.3390/cells9051141>
148. Xiao, D., Ohlendorf, J., Chen, Y., Taylor, D. D., Rai, S. N., Waigel, S., Zacharias, W., Hao, H., & McMasters, K. M. (2012). Identifying mRNA, microRNA and protein profiles of melanoma exosomes. *PloS One*, 7(10), e46874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046874>
149. Xie, Y., Su, N., Yang, J., Tan, Q., Huang, S., Jin, M., Ni, Z., Zhang, B., Zhang, D., Luo, F., Chen, H., Sun, X., Feng, J. Q., Qi, H., & Chen, L. (2020). FGF/FGFR signaling in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 181. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00222-7>
150. Zhang, Y. E. (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Research*, 19(1), 128–139. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.328>
151. Zhao, R., Choi, B. Y., Lee, M.-H., Bode, A. M., & Dong, Z. (2016). Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16INK4a) in Cancer. *EBioMedicine*, 8, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.017>