



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**“Comunicación intercelular mediante vesículas extracelulares en el cáncer:
Implicaciones de la citocina TGF- β ”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. Maria Andrea Lara Salas

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Marina Macias Silva, IFC, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Sandra Cabrera Benítez, Fac. Ciencias, UNAM

Dr. Leonardo Peraza Reyes, IFC, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX., Junio, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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. Este trabajo recibió el apoyo financiero del proyecto No. IV200220 de PAPIIT, DGAPA, UNAM.

A mi asesora de tesis, la Dra. Marina, por su instrucción, comprensión, sus conocimientos invaluable que compartió conmigo para realizar este proyecto y por tener una gran paciencia en todo momento.

A los doctores que también conformaron mi comité tutorial, la Dra. Sandra Cabrera y el Dr. Leonardo Peraza por sus valiosas contribuciones que hacían en cada tutorial, así como al final del proyecto.

A los miembros de mi Jurado de examen: Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo, Dra. Claudia González Espinosa, Dra. Blanca Haydé Ruíz Ordaz, Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez y Dr. José Francisco Torres Quiroz, por la revisión y los comentarios sobre mi trabajo.

Al CONACyT por otorgarme una beca para realizar mis estudios de maestría en Ciencias Bioquímicas.

Al Ing. Bioquímico Pablo Orlando García Díaz por el apoyo en la elaboración de las figuras incluidas en la tesis.

A la Biol. Marcela Sosa Garrocho, Técnica Académica del laboratorio, por su apoyo en el conocimiento de las técnicas básicas de bioquímica, biología celular y molecular.

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.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia por haber estado siempre apoyándome para formarme tanto como ser humano como una persona profesional, de aprender a ser una persona de provecho desde pequeña. Por estar conmigo en cada triunfo, pero en cada derrota también. Por no dejarme caer, levantarme y alentarme a seguir luchando por materializar mis sueños, objetivos y/o metas. Los amo demasiado.

A mis amigos por estar siempre para mí, por ser como mis hermanos y excelentes seres humanos y apoyarme cada que lo necesite. Por escucharme en todo momento y aconsejarme. Los quiero mucho a todos.

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Generalidades sobre el cáncer	6
1.1.1 Cáncer colorrectal	7
1.1.1.1 Epidemiología del cáncer colorrectal	7
1.1.1.2 Etiología	8
1.1.1.3 Vías moleculares del cáncer colorrectal	9
1.1.1.4 Influencia de las aberraciones genéticas en el cáncer colorrectal	11
1.2 Generalidades sobre el TGF- β	14
1.2.1 TGF- β latente: mecanismos conocidos de secreción y de activación	15
1.2.1.1 Procesamiento del TGF- β y su activación	15
1.2.2 Componentes de la vía de señalización del TGF- β y su mecanismo de acción	18
1.2.2.1 Las proteínas SMAD	18
1.2.2.2 Los receptores del TGF- β	20
1.2.2.3 Vía de señalización canónica del TGF- β	22
1.2.2.4 Vías de señalización no canónicas del TGF- β	24
1.2.2.5 El papel dual de la citocina TGF- β en el desarrollo del cáncer	24
1.2.2.5.1 Señalización de la citocina TGF- β : un actor emergente en la progresión del cáncer	24
1.2.2.5.2 Señalización del TGF- β en células cancerosas y estromales	25
1.2.2.6 Acciones del TGF- β en el cáncer colorrectal	28
1.2.2.6.1 Vía de señalización del TGF- β en las células de cáncer colorrectal	28

1.2.2.6.1.1 Mutación del receptor de tipo II del TGF- β en las células de cáncer colorrectal	28
1.2.2.6.1.2 Mutaciones y deleciones de la proteína SMAD4 en células de cáncer colorrectal	30
1.2.2.6.1.3 Vías de señalización no canónicas del TGF- β en el cáncer colorrectal	32
1.3 Generalidades sobre las vesículas extracelulares	33
1.3.1 Composición de las vesículas extracelulares	35
1.3.1.1 Contenido proteico	35
1.3.1.2 Contenido lipídico	36
1.3.1.3 Contenido de ácidos nucleicos	36
1.3.2 Biogénesis de las vesículas extracelulares	36
1.3.2.1 Biogénesis de los exosomas	37
1.3.2.2 Biogénesis de las microvesículas	40
1.3.2.3 Modificación de las proteínas de la carga molecular para su selección exosomal	44
1.3.2.4 El equilibrio entre la degradación y la secreción de vesículas almacenadas en cuerpos multivesiculares	45
1.3.2.5 Dirigiendo a los cuerpos multivesiculares hacia la membrana plasmática para su secreción	47
2. ANTECEDENTES DIRECTOS	48
3. JUSTIFICACIÓN	49
4. HIPÓTESIS	49
5. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS PARTICULARES	50
6. METODOLOGÍA	50
7. RESULTADOS	51
7.1 Secreción de la citocina TGF- β en vesículas extracelulares de células cancerosas	51
7.2 Expresión de los componentes de la vía de señalización del TGF- β en las líneas celulares de cáncer colorrectal SW480 y SW620	54
7.3 Acciones de la citocina TGF- β en las líneas celulares de cáncer colorrectal SW480 y SW620	61

7.4 Efecto de fármacos en los componentes de la vía del TGF- β en las líneas celulares de cáncer colorrectal SW480 y SW620	63
7.5 Vesículas extracelulares secretadas por las líneas celulares de cáncer colorrectal SW480 y SW620	65
7.6 Las células SW480 y SW620 como modelo biológico para estudiar la biogénesis de las vesículas extracelulares cargadas con la citocina TGF- β	71
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	72
9. PERSPECTIVAS	76
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

ABREVIATURAS

ADAM10	Proteína 10 que contiene el dominio de desintegrina y metaloproteinasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
Akt	Proteína cinasa B
Alk	Cinasas de tipo activina
APC	Poliposis adenomatosa coli
ARRDC1	Proteína 1 que contiene al dominio arrestina
ARF6	Factor 6 de ADP ribosilación
ATP	Adenosín trifosfato
ATPasa	Adenosina trifosfatasa
BMP	Proteína Formado de Hueso
BRAF	Homólogo B1 del oncogen viral del sarcoma murino v-raf
CCR	Cáncer colorrectal
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas
CIMP	Fenotipo metilador de islas CpG
CIN	Inestabilidad cromosómica
Co-Smad	Smad común
C-terminal	Región carboxilo terminal
E-cad	Cadherina E
EE	Endosoma temprano
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Factor de crecimiento epidérmico
ECM	Extracellular Matrix
EMT	Transición epitelio-mesénquima
EpCAM	Molécula de adhesión de las células epiteliales
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
ESCRT	Complejo de selección endosomal necesario para el transporte
EV	Vesículas extracelulares
FKBP12	Proteína de unión a FK506
GDF	Factores de diferenciación y crecimiento
GPI	Glucosilfosfatidilinositol
GSK-3	Glucógeno sintasa cinasa 3
GTP	Guanosín trifosfato

GTPasa Guanosina trifosfatasa
HIF Factor inducible por hipoxia
HSC70 Proteína análoga de choque térmico de 71 kDa
IFN- γ Interferón gamma
ILV Vesículas intraluminales
I-Smad Smads inhibitoras
ITGA6 Integrina alfa-6
JNK Cinasas del extremo N-terminal de c-Jun
K-RAS Kristen Ras
LAP Péptido asociado a latencia
LLC Gran complejo latente
LOH Pérdida de heterocigosidad
LTBP Proteínas que se unen al TGF- β latente
MAPK Proteína cinasa activada por mitógenos
MART1 Antígeno 1 de melanoma reconocido por las células T
ECM Matriz extracelular
MHC Complejo principal de histocompatibilidad
MH1 Dominio de homología 1 de Mad
MH2 Dominio de homología 2 de Mad
miRNA micro RNA
MIS Sustancia inhibidora Muleriana
MLCK Cinasas de la cadena ligera de miosina
MLH1 Mutador L homólogo 1
MMP Metaloproteasa
MMR Reparación de errores de emparejamiento
mRNA RNA mensajero
MSH2 Mutador S homólogo 2
MSH6 Mutador S homólogo 6
MSI Inestabilidad de microsatélites
MV Microvesícula
MVB Cuerpos multivesiculares
NES Señal de exportación nuclear
NK Asesina natural
NLS Señal de localización nuclear

N-terminal Región amino terminal

PI3K Fosfoinositol-3-cinasa

PLD Fosfolipasa D

PMS1 Segregación posmeiótica aumentada 1

PTEN Homóloga de fosfatasa y tensina

PTM Modificación postraducciona

RAF Homólogo del gen raf viral (v-raf)

RER Retículo endoplásmico rugoso

RNA Ácido ribonucleico

R-Smad Smad activada por receptor

SAD Dominio de activación de Smad

SNARE Receptores de proteína de fijación soluble del factor sensible a *N*-etilmaleimida

SAPK Proteínas cinasas activadas por estrés

SARA Smad anclada para la activación del receptor

SBE Elemento de unión a Smad

SDC-CTF Fragmento C-terminal de sindecano

SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SLC Complejo dimérico latente

Smurf Factor relacionado a la ubiquitinación de Smad

SNARE Receptores de proteína de fijación soluble del factor sensible a *N*-etilmaleimida

SUMO Pequeño modificador asociado con ubiquitina

TβRI Receptor de tipo 1 del TGF-β

TβRII Receptor de tipo 2 del TGF-β

TEM Transición epitelio-mesenquima

TGF-β Factor transformante de crecimiento β

TGN Red Trans-Golgi

TNF-α Factor de necrosis tumoral alfa

TP53 Proteína tumoral 53

Tregs Linfocitos T reguladores

TSG-101 Proteína 101 del gen de susceptibilidad tumoral

VAMP Proteínas de membrana asociadas a vesículas

Vps4 Proteína 4 de selección vacuolar

WNT Sitio de integración relacionado con Wingless

RESUMEN

El Factor de crecimiento transformante β (TGF- β) es una citocina con múltiples efectos biológicos, tanto en condiciones de homeostasis como en diversas patologías, incluido el cáncer colorrectal (CCR). En estadios tempranos del CCR, esta citocina ejerce efectos antitumorales, pero en etapas avanzadas promueve la progresión tumoral. Las líneas celulares de cáncer colorrectal que provienen de un mismo paciente, SW480 (tumor primario) y SW620 (tumor metastásico), sintetizan y secretan esta citocina, así como también expresan a los componentes de su vía de señalización, con excepción de SMAD4. De manera interesante, se han encontrado a algunos componentes de esta vía de señalización en unas partículas implicadas en la comunicación intercelular llamadas vesículas extracelulares (EV, del inglés *Extracellular Vesicles*), que pueden ser secretadas por diversas células cancerosas en el microambiente tumoral. En el presente trabajo se tomaron como modelo de estudio a las células SW480 y SW620, se caracterizaron los niveles de expresión de los componentes de la vía del TGF- β en estas células y se encontró que las células SW480 y SW620 secretan EV. Además, se describió la composición de tales vesículas y se evaluaron los efectos biológicos que ejercen sobre varias células blanco. Al final, se propone, para estas células, un modelo hipotético del mecanismo de secreción de EV que llevan en su carga molecular al ligando TGF- β , así como a los correceptores betaglicano y endoglina.

ABSTRACT

Transforming growth factor β (TGF- β) is a cytokine with multiple biological effects, both under homeostasis conditions and in various pathologies, including colorectal cancer (CRC). In early stages of CRC, this cytokine exerts antitumor effects but in advanced stages it promotes tumor progression. Colorectal cancer cell lines from the same patient, SW480 (primary tumor) and SW620 (metastatic tumor), synthesize and secrete this cytokine, as well as express components of its

signaling pathway but not SMAD4. Interestingly, some components of this signaling pathway have been found in particles involved in intercellular communication called extracellular vesicles, which can be secreted by various cancer cells in the tumor microenvironment. In the present work, the SW480 and SW620 cells were taken as a study model, and the expression levels of the components of the TGF- β pathway in these cells are described. SW480 and SW620 cells secrete extracellular vesicles; their composition and the biological effects that exert on various target cells are characterized. At the end, a hypothetical model of the secretion mechanism of extracellular vesicles that carry the TGF- β ligand, as well as the betaglycan and endoglin co-receptors in their molecular charge is proposed for these cells.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades sobre el cáncer

“Cáncer” es un término que designa a un gran grupo de enfermedades que podrían afectar a cualquier parte del organismo. Asimismo, para referirse a esos padecimientos también se le denominan “neoplasias” o “tumores malignos”. Una característica determinante del cáncer es la proliferación no controlada de las células anormales que se propagan más allá de su sitio de origen y pueden invadir zonas adyacentes o extenderse hacia otros órganos, mediante un proceso que se denomina “metástasis”. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer (WHO., 2018).

Las células normales o sanas realizan funciones específicas en el cuerpo y su crecimiento se encuentra regulado por un mecanismo bioquímico complejo. Las células cancerosas crecen de manera independiente de las vías de control de la división celular debido a mutaciones genéticas en estas células (SEER., 2020).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo (WHO., 2018), lo que representa un estimado de casi 10 millones de muertes en el año 2020 (Globocan, 2020). Los tipos de cáncer más comunes en los hombres son los de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado, mientras que para las mujeres los más comunes son los de mama, colorrectal, pulmón, cervical y de tiroides (WHO., 2018). En el caso de los niños, los principales tipos de cáncer son el cáncer en la sangre (leucemias), cáncer en el cerebro y cáncer en los ganglios linfáticos (linfomas) (Yoo. K., y Shin, H., 2003).

El cáncer se genera por una serie de mutaciones sucesivas en los genes que controlan el crecimiento celular, de manera que tales mutaciones modifican las funciones de las células transformadas. Los compuestos químicos tienen un papel evidente en la inducción de mutaciones genéticas y en la generación de células cancerosas. Adicionalmente, el tabaco involucra a varios compuestos químicos carcinogénicos que van hasta el pulmón (Aizawa, K., *et al.*, 2016). De manera interesante, los componentes químicos del ambiente con propiedades cancerígenas influyen de forma directa o indirecta en el citoplasma y el núcleo celular y producen desórdenes genéticos y mutaciones (Antwi, S., *et al.*, 2015). La

radiación, las bacterias y los virus son otros factores que contribuyen a la carcinogénesis, el cual es un proceso presente en aproximadamente el 7% de todos los tipos de cáncer (Parkin, D., 2006). En general, las alteraciones celulares que conducen al desarrollo del cáncer afectan la homeostasis celular y ocasionan la disfunción de proteínas codificadas por genes vitales. Dicha disfunción se refleja en el ciclo celular y resulta en una proliferación anormal (Seto, M., Honma, K., y Nakagawa, M., 2010). Las proteínas codificadas por los protooncogenes son responsables del crecimiento y división celular en condiciones normales, pero debido a mutaciones genéticas, estos protooncogenes se transforman en oncogenes, contribuyendo al proceso de transformación celular (Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R., y Canaani, E., 1985). Además, la falla en la expresión de los genes supresores de tumores también ocasiona una división celular incontrolada (Matlashewski, G., *et al.* 1984). Finalmente, los genes que codifican para proteínas y enzimas con propiedades reparadoras del DNA, también contribuyen a la progresión del cáncer al encontrarse afectados o mutados (Wei, Q., Li, L., y Chen, D., 2007).

Además de las mutaciones en los genes, también la epigenética tiene un papel importante en el cáncer. La epigenética es un campo emergente de la ciencia que estudia los cambios hereditarios causados por la activación y desactivación de los genes, sin ningún cambio en la secuencia del DNA del organismo. Así, la epigenética implica modificaciones químicas, como la metilación del DNA, las modificaciones químicas de las histonas y los cambios en el posicionamiento de los nucleosomas, fenómenos que ejercen un papel importante en la carcinogénesis (Alvarez, E., *et al.*, 2008; Portela, A., y Esteller, M., 2010). Las células cancerosas se caracterizan por una disminución en la metilación del DNA, se estima que hay aproximadamente una reducción del 5 al 6% en la cantidad total de 5-metil citosina en el genoma de tales células (Goelz, S., Vogelstein, B., Hamilton, S., Feinberg, A., 1985).

1.1.1 Cáncer colorrectal

1.1.1.1 Epidemiología del cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los tipos de cáncer más común alrededor del mundo, con entre uno y dos millones de casos nuevos diagnosticados anualmente, lo que convierte al CCR en el tercer cáncer más común y la cuarta causa más común de muerte asociada con el cáncer, con 700 mil muertes por año, siendo superado solamente por el cáncer de pulmón, el cáncer de hígado y el cáncer de estómago. El CCR es el segundo cáncer más común en las mujeres (9.2%) y el tercero en hombres (10%) y sigue en aumento (Stewart, B. y Wild, C., 2014; Arnold, M., *et al.* 2017; Bray, F., *et al.*, 2018).

1.1.1.2 Etiología

Las mutaciones en determinados genes pueden ocasionar la aparición de CCR, como sucede en otros tipos de cáncer. Tales mutaciones pueden hacerse presentes en oncogenes, genes supresores de tumores y genes asociados con los mecanismos de reparación del DNA, como ya se mencionó anteriormente. Según el origen de la mutación, los carcinomas colorrectales pueden ser clasificados en esporádicos, hereditarios y familiares. Las mutaciones puntuales, las cuales aparecen durante toda la vida, no están relacionadas con síndromes heredados y solo afectan a las células individuales y a su descendencia. A los tipos de cáncer que provienen de mutaciones puntuales se les conoce con el nombre de cánceres esporádicos y representan al 70% de todos los tipos de CCR. La patogenia molecular del cáncer esporádico es heterogénea, puesto que las mutaciones pueden estar dirigidas a diferentes genes. No obstante, aproximadamente el 70% de los casos de CCR siguen una sucesión específica de mutaciones que posteriormente se traduce en una secuencia morfológica particular, iniciando con la formación de un adenoma y finalizando en el estado de carcinoma. La primera mutación ocurre en la proteína poliposis adenomatosa coli (codificada por el gen *APC*, del inglés *Adenoma poliposis coli*), un polipéptido con actividad de supresor de tumores. La mutación de *APC* lleva a la formación de adenomas no malignos, también denominados pólipos. Después, ocurren mutaciones en *KRAS*, *TP53* y finalmente en *DCC* (Fearon, E., y Vogelstein, B., 1990).

Los tipos de cáncer hereditarios representan solamente el 5% de todos los casos de CCR. Esos tipos de cáncer son ocasionados por mutaciones hereditarias que afectan a uno de los alelos del gen mutado, lo cual denota que una mutación puntual en el otro alelo desencadenará la aparición de la célula tumoral y, después, el carcinoma. Con la finalidad de generar una clasificación más precisa de los tipos de cáncer hereditarios, se han establecido dos grupos, a saber, las formas de poliposis y no poliposis. Principalmente, la variante de poliposis implica a la poliposis adenomatosa familiar (FAP, del inglés *Familial Adenomatous Polyposis*) que se caracteriza por la generación de una gran cantidad de pólipos potencialmente malignos en el colon (Lynch, H., y de la Chapelle., A., 2003). Por el contrario, el CCR hereditario sin poliposis (HNPCC) está asociado con mutaciones en los mecanismos de reparación del DNA. La principal causa de HNPCC es el síndrome de Lynch, que es ocasionado por mutaciones hereditarias en uno de los alelos que codifican a proteínas de reparación como MSH2, MLH1, MLH6, PMS1 y PMS2. El síndrome de Lynch puede ser encontrado en el 2 – 3 % de todos los casos de CCR y, por consiguiente, se trata del síndrome más común en el grupo de HNPCC (Lynch, H., y de la Chapelle., A., 2003; Umar, A., *et al.*, 2004). El CCR de tipo familiar representa aproximadamente el 25% de todos los casos y también es ocasionado por mutaciones hereditarias, aunque no son clasificados como cánceres hereditarios por sí mismos, puesto que no pueden incorporarse en ninguna variante de cáncer hereditario (Stoffel, E., y Kastanos, F., 2014).

1.1.1.3 Vías moleculares del cáncer colorrectal

Una característica fundamental que subyace al CCR es la inestabilidad genómica. Los mecanismos patogénicos que llevan a esta situación pueden ser incluidos en tres vías distintas, las cuales son: inestabilidad cromosómica (CIN, del inglés *Chromosomal Instability*), inestabilidad de microsatélites (MSI, del inglés *Microsatellite Instability*) y el fenotipo metilador de islas CpG (CIMP, del inglés *CpG Island Methylator Phenotype*).

La vía de la CIN, que también se le considera como la vía clásica puesto que representa la causa del 80% al 85% de todos los casos de CCR (Grady, W., y

Carethers, J., 2008), se caracteriza por desequilibrios en el número de cromosomas, lo cual conduce a tumores aneuploídicos y pérdida de heterocigosidad (LOH, del inglés *Loss of heterocigosity*). Los mecanismos subyacentes a la CIN abarcan alteraciones en la segregación de los cromosomas, disfunción de los telómeros y respuesta al daño del DNA, que dañan a genes críticos encargados de codificar a proteínas implicadas en el mantenimiento de la función celular como son APC, TP53, KRAS y PI3K, entre otros. Las mutaciones en APC causan la translocación de β -catenina al núcleo y promueven la transcripción de genes involucrados en la tumorigénesis e invasión, mientras que las mutaciones en *KRAS* y *PI3K* provocan una activación constante de MAP cinasas, incrementando la proliferación celular. Por último, las mutaciones con pérdida de función del gen TP53, que codifica para la proteína p53, ocasionan una entrada de forma incontrolada al ciclo celular (Pino, M., y Chung, D., 2010).

La vía de inestabilidad de microsatélites es ocasionada por un fenotipo hipermutable debido a la pérdida de los mecanismos de reparación del DNA. La capacidad para reparar repeticiones en tándem (repeticiones de dos a cinco pares de bases) o cadenas cortas de DNA se encuentra reducida en aquellos tumores con inestabilidad de microsatélites; por ende, las mutaciones tienden a estar acumuladas en dichas regiones. Tales mutaciones pueden afectar a las regiones no codificantes, así como a los microsatélites codificantes. Los tumores se desarrollan cuando se alteran los marcos de lectura de los oncogenes o de los genes supresores de tumores codificados en los microsatélites. La pérdida de expresión de los genes de reparación de errores de emparejamiento (MMR, del inglés *Mismatch Repair*) puede ser debida a sucesos espontáneos (hipermetilación del promotor) o mutaciones germinales como las que son encontradas en el síndrome de Lynch. Estos tumores son principalmente diploides y tienen menos LOH. Los genes mutados en tumores con inestabilidad de microsatélites incluyen a *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* y *PMS2* (Boland, C., y Goel, A., 2010). De manera general, los tumores MSI tienen un mejor pronóstico en comparación con los tumores esporádicos (Umar, A., *et al.*, 2004).

Otra característica común del CCR es la inestabilidad epigenética, la cual es responsable del fenotipo metilador de islas CpG. La característica principal de los tumores CIMP es la hipermetilación de los promotores de oncogenes, lo que provoca el silenciamiento genético y la pérdida de expresión proteica. Los cambios genéticos y epigenéticos no son exclusivos del CCR, y los dos mecanismos cooperan en su desarrollo, encontrándose frecuentemente más eventos de metilación que mutaciones puntuales (Lao, V., y Grady, W., 2011). Un ejemplo del efecto combinado de la genética y la epigenética en el proceso de desarrollo del CCR es la existencia de mutaciones en *BRAF*, así como la inestabilidad de microsatélites en muchos tumores CIMP (Weisenberger, D., *et al.*, 2006).

1.1.1.4 Influencia de las aberraciones genéticas en el cáncer colorrectal

Las técnicas de análisis del genoma permiten identificar una gran cantidad de aberraciones genómicas involucradas en el CCR. Por lo tanto, a pesar de que las mutaciones son la principal alteración genómica, a menudo también se localizan varios cambios y translocaciones cromosómicas en el CCR. Todas esas aberraciones afectan vías de señalización importantes (WNT, MAPK/PI3K, TGF- β) y algunas funciones intracelulares (regulación del ciclo celular y de *TP53*) (Willett, C., *et al.*, 2012) (**Figura 1**).

La vía WNT tiene un papel muy importante en la diferenciación de las células troncales y en el crecimiento celular. Por ende, las alteraciones en esta vía pueden inducir la formación de tumores. Las alteraciones de la vía WNT en el CCR también se relacionan con la presencia de uniones celulares estrechas debilitadas, lo que lleva a una adhesión celular reducida y, por consiguiente, promueve la migración y la metástasis (Brocardo, M., y Henderson, B., 2008). La principal aberración genómica en el CCR relacionada con la vía WNT son las mutaciones en *APC*, aunque muchas otras alteraciones también pueden estar involucradas con esta vía. Adicionalmente, no son exclusivas las alteraciones genómicas en la vía WNT y los tumores que tienen mutaciones en *APC* también pueden exhibir otras alteraciones en común (Willett, C., *et al.*, 2012). La β -catenina, un cofactor transcripcional que también participa en la vía WNT, por lo

general no es de utilidad para el pronóstico, porque comúnmente está sobreexpresada en el CCR (Herzig, D., y Tsikitis, V., 2015). No obstante, la sobreexpresión de c-MYC que ocurre por la activación de la vía WNT, se considera un marcador para la metástasis y un buen factor de pronóstico asociado con la supervivencia (Rennoll, S., y Yochum, G., 2015).

Las rutas de MAPK y PI3K están implicadas en la supervivencia y la proliferación celular. Por lo tanto, las alteraciones que afectan a estas vías proporcionan ventajas proliferativas a las células tumorales. Las mutaciones en *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* (*PI3K*) son del tipo más común encontrado en el CCR. A pesar de que las mutaciones en *PIK3CA* también son una característica habitual en el CCR, la relación entre *PIK3CA* y el CCR no está tan bien establecida como las que implican a *BRAF* o *KRAS*. Sin embargo, cabe mencionar que las mutaciones de *PIK3CA* se asocian con un peor pronóstico cuando son acompañadas de mutaciones de *KRAS* (Rosty, C., *et al.*, 2013).

La vía de señalización del TGF- β , a su vez, juega un papel fundamental en procesos celulares importantes como la diferenciación, el crecimiento y la apoptosis. No obstante, las mutaciones esporádicas en el TGF- β y en los componentes de su vía no son particularmente usuales en el CCR, por lo que no son importantes como marcadores para pronóstico (Herzig, D., y Tsikitis, V., 2015). Sin embargo, las modificaciones en los cromosomas que contienen a genes que codifican para componentes de la vía del TGF- β están firmemente ligados a la vía CIN en el CCR. La pérdida de 18q es una de las principales aberraciones genómicas asociadas con la vía del TGF- β en el CCR (Sarli, L., *et al.*, 2004). El brazo q del cromosoma 18 (18q) codifica para dos importantes genes supresores de tumores conocidos como *SMAD2* y *SMAD4*, cuya pérdida ocasiona que las células tumorales puedan evadir a la apoptosis y que haya una desregulación del ciclo celular. Los estudios actuales demuestran que hay una correlación débil entre un pronóstico desfavorable/tasas de supervivencia más cortas y la pérdida del 18q (Popat, S., y Houlston, R., 2005; Popat, S., *et al.*, 2007).

Por último, *TP53* es uno de los genes supresores de tumores más importantes, con una función importante en los puntos de control del ciclo celular, debido a que regula diversos genes que participan en la detención del ciclo celular, así como en el sistema de reparación del DNA y en la apoptosis, por lo que su pérdida puede promover la progresión del tumor al permitir una proliferación en exceso. La pérdida de la región 17q-*TP53*, que codifica a p53, es un evento frecuente en el CCR, puesto que juega un papel en la sucesión clásica de adenoma hacia carcinoma (Munro, A., Lain, S., y Lane, D., 2005).

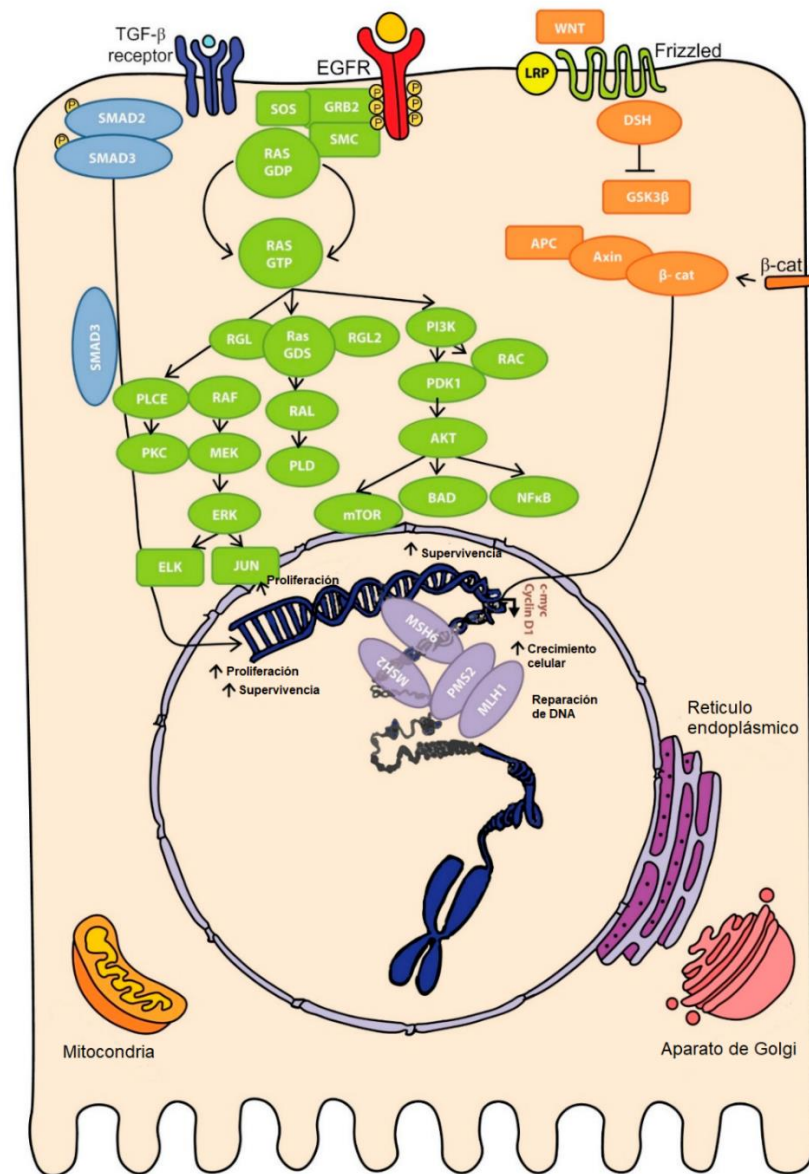


Figura 1. Vías moleculares involucradas en la carcinogénesis colorrectal.

Las mutaciones que afectan a las proteínas implicadas en las vías WNT (naranja), MAPK/PI3K (verde), TGF- β /SMAD (azul) o de reparación del DNA (púrpura) pueden mejorar la supervivencia y proliferación celular, promoviendo de tal manera el crecimiento tumoral y comenzando la carcinogénesis. Las líneas que tienen como punta a una flecha indican la activación de proteínas, mientras que aquellas líneas con punta de barra representan la inhibición de proteínas. Tomado de Mármol, I., *et al.*, 2017

1.2 Generalidades sobre el TGF- β

Las células son capaces de comunicarse mediante proteínas que se encuentran asociadas a la membrana plasmática o moléculas que son secretadas, las cuales pueden controlar la proliferación, la diferenciación, el metabolismo y el comportamiento de las células blanco. Las quimiocinas, citocinas, hormonas y factores de crecimiento secretados interactúan con receptores ubicados en la superficie de las células blanco localizadas a distancias grandes o cortas. El último caso implica a la comunicación paracrina entre células vecinas, o bien, la autocrina, en donde los mensajeros secretados por una célula actúan sobre ella misma dentro de una población celular.

Entre las citocinas y factores de crecimiento que se secretan, la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , del inglés *Transforming Growth Factor beta*) ha captado mucha atención por sus múltiples funciones a nivel celular y en el desarrollo embrionario, así como por su importante rol en muchas patologías, incluyendo al cáncer (Derynck, R., y Miyazono, K., 2017). Las proteínas pertenecientes a la familia del TGF- β se secretan y funcionan como heterodímeros u homodímeros (Morikawa, M., Derynck, R., y Miyazono, K., 2016). La familia del TGF- β está conformada por 33 miembros identificados en humano, que codifican a las isoformas del TGF- β , a las proteínas formadoras de hueso (BMP, del inglés *Bone Morphogenetic Proteins*), a los factores de diferenciación y crecimiento (GDF, del inglés *Growth and Differentiation Factors*), las activinas, las inhibinas, nodal y la sustancia inhibidora Muleriana (MIS, del inglés *Mullerian Inhibiting Substance*) (Derynck, R., y Miyazono, K., 2008).

Muchas proteínas de la familia del TGF- β inducen la proliferación celular, aunque con frecuencia de manera modesta en comparación con otros factores de crecimiento y de manera dependiente del tipo y contexto celular. Sin embargo, el TGF- β inhibe intensamente a la proliferación de diversos tipos celulares, entre ellos las células hematopoyéticas, las inmunes, las endoteliales y las epiteliales (Zhang, Y., Alexander, P., y Wang., X., 2017). Lo más evidente es la gran cantidad de efectos que tiene la familia del TGF- β sobre la diferenciación celular, puesto que los miembros de esa familia controlan la diferenciación de todas las células en muchos pasos del desarrollo. Aparte de estos efectos, estos factores llevan a cabo muchas funciones celulares adicionales, como el inducir o proteger contra la muerte celular, regulan el metabolismo, inducen la expresión de proteínas de la matriz extracelular (ECM, del inglés *Extracellular Matrix*), regulan la motilidad y la invasión celular (Derynck, R., y Miyazono, K., 2017; Morikawa, M., Derynck, R., y Miyazono, K., 2016).

También se han estudiado de forma extensa a las proteínas de la familia del TGF- β , debido a su función en la enfermedad y se presta más atención a las funciones del TGF- β 1 en el cáncer, especialmente en los carcinomas (Massagué, J., 2008; Ikushima, H., y Miyazono, K. 2010; Seoane, J., y Gomis, R. 2017) y en la fibrosis (Kim, K., Sheppard, D., y Chapman, A., 2018). Además, el TGF- β promueve la angiogénesis y suprime al sistema inmune, lo cual contribuye a sus efectos pro-tumorigénicos (Massagué, J., 2012).

1.2.1 TGF- β latente: mecanismos conocidos de secreción y de activación

1.2.1.1 Procesamiento del TGF- β y su activación

El TGF- β se traduce inicialmente como una pro-proteína de aproximadamente 100 kilodaltones que contiene tanto al factor de crecimiento como al péptido asociado a la latencia (LAP, del inglés *Latency Associated Peptide*), generando de tal manera el complejo pequeño latente (SLC, del inglés *Small Latent Complex*). Esta pro-proteína se sintetiza en el retículo endoplásmico, donde se dimeriza y se pliega. Dentro del retículo endoplásmico, el pro-TGF- β dimérico está unido a una sola proteína que se une al TGF- β latente llamada LTBP

(del inglés *Latent TGF- β Binding Protein*), mediante un par de enlaces disulfuro entre LTBP y LAP y formando el gran complejo latente (LLC, del inglés *Large Latent Complex*) (**Figura 2**) (Saharinen, J., Taipale, J., y Keski-Oja, J., 1996). Posteriormente, el pro-péptido (LAP) se escinde de la citocina madura en el trans-Golgi por acción de la enzima furina o por enzimas de tipo furina (Hyytiainen M., Penttinen, C., y Keski-Oja, J., 2004).

A TGF- β 1 precursor



B TGF- β 1 small latent complex (SLC)



C TGF- β 1 large latent complex (LLC)

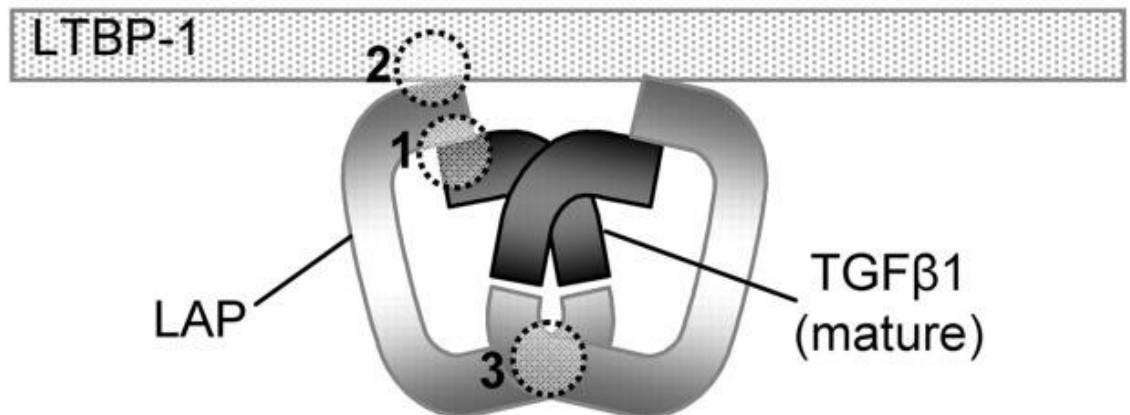


Figura 2. Formación del LLC.

A) El TGF- β 1 se sintetiza a partir de una proteína precursora más grande, que comprende un péptido señal (SP, del inglés *Signal Peptide*), LAP y un dominio maduro C-terminal. B) Durante el ensamblaje, dos precursores de TGF- β 1 se unen de forma covalente en sitios dentro del factor de crecimiento maduro y LAP para formar el SLC. C) Posteriormente, el SLC se une a los LTBP para formar el LLC. Los estudios han indicado que el montaje y la estabilidad de la LLC se rigen por tres regiones clave en LAP (1–3). Tomado de Walton, K., et al., 2010

Las proteínas LTBP pueden tener una función semejante a la de una chaperona para el pro-TGF- β , mejorando su plegamiento y secreción (Miyazono, et al., 1991). Sin LTBP, las cisteínas en LAP que se unen a LTBP pueden formar enlaces disulfuro incorrectos y este complejo se puede degradar en el interior de la célula (Brunner, A., et al., 1989). Una vez secretado el complejo latente, la LTBP puede unirse a varias fibras de la ECM que secuestran al TGF- β latente hasta que es liberado por uno de varios mecanismos potenciales, liberando a la citocina madura (Robertson, I., y Rifkin, D., 2016).

Los mecanismos de activación del TGF- β latente se han estudiado ampliamente para la isoforma TGF- β 1. La proteína LAP contiene un bucle rico en prolina denominado lazo de latencia, que encapsula al péptido monomérico TGF- β 1, manteniendo así al TGF- β 1 en una forma inactiva (Shi, M., et al., 2011). El LAP de las isoformas TGF- β 1 y - β 3 contienen una secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), la cual se trata del motivo de reconocimiento para las integrinas, mientras que las LTBP anclan el complejo del TGF- β latente a la ECM (Annes, J., et al., 2004). Los estudios biológicos y estructurales demuestran que la tensión molecular mediada por el estiramiento físico entre la interacción TGF β -LAP-integrina en la superficie celular y el anclaje de LTBP en la ECM, es la responsable de la liberación del TGF- β 1 activo del complejo del TGF- β 1 latente (Dong, X., et al., 2017). Los complejos latentes del TGF- β también se activan por otros mecanismos, como son la escisión proteolítica de los LAP, por cambios de pH, por la radiación ionizante, el calor y por la acción de la trombospondina-1 (Robertson, I., y Rifkin, D., 2016).

1.2.2 Componentes de la vía de señalización del TGF- β y su mecanismo de acción

1.2.2.1 Las proteínas Smad

Hasta ahora, han sido caracterizadas ocho proteínas SMAD de mamíferos y se dividen en tres subgrupos funcionales: las SMADS que son activadas por receptor (R-SMADs 1, 2, 3, 5 y 8), el mediador común SMAD (Co-SMAD 4) y las SMADS inhibitoras (I-SMADs 6 y 7) (Eppert, K., *et al.*, 1996).

Los ligandos de la familia del TGF- β presentan actividades dependiendo del contexto, principalmente regulando la expresión génica mediante la activación de las proteínas R-SMAD. Como mediadores importantes de la señalización del TGF- β , diversas formas de regulación se enfocan en las proteínas SMAD por su capacidad de regular la intensidad, duración y especificidad de la señal (Massagué, J., 2012). Las proteínas R-SMADs y Co-SMADs contienen a dos dominios muy conservados que se conocen como dominios de homología de Mad 1 (MH1) y MH2 (**Figura 3**). El dominio MH1 amino-terminal incluye señales de localización nuclear (NLS) y una estructura de horquilla β que es indispensable para la unión con el DNA (**Figura 3**). Por otra parte, el dominio MH2 del carboxilo contiene a la estructura del *loop* L3, lo cual especifica la interacción de los R-SMADs con los receptores del tipo I, lo que provoca la fosforilación del motivo SSXS en el carboxilo terminal de las R-SMADs por la cinasa del receptor tipo I (Figura 3). El dominio MH2 de SMAD4 cuenta con un *loop* L3 (Lo, R., *et al.*, 1998), pero no contiene el motivo SSXS carboxilo terminal y no es fosforilado por el receptor tipo I (**Figura 3**). La fosforilación de la R-SMAD provoca su asociación con el dominio MH2 de SMAD4. El complejo heteromérico de Smads, el cual consiste en un trímero de dos R-SMADs y una SMAD4, se transloca al núcleo y se une al DNA mediante el dominio MH1 (Massagué, J., 2012). Una vez en el núcleo, el dominio MH2 interactúa con diversos factores nucleares y regula la expresión génica modulando la transcripción (Moustakas, A., y Heldin, C. 2009; Weiss, A. y Attisano, L., 2013).

Los dominios MH1 y MH2 están unidos por una región enlazadora (*linker*), la cual no está conservada entre las proteínas SMAD. Las regiones enlazadoras

de las R-SMADs tienen muchos residuos de prolina y serina que son fosforilados por cinasas, como, por ejemplo, la cinasa 3 de la glucógeno sintetasa (GSK-3, del inglés *Glycogen Synthetase Kinase-3*), las cinasas dependientes de ciclina (CDK, del inglés *Cyclin-Dependent Kinase*) y las MAPK. La fosforilación de la R-SMAD en la región *linker* controla su localización nuclear y establece áreas de acoplamiento para moduladores positivos y negativos de las R-SMAD en el núcleo (Massagué, J., 2012).

La tercera clase de proteínas Smad contiene a las I-SMAD, las cuales antagonizan la vía de señalización del TGF- β (**Figura 3**). A diferencia de las R-SMAD, las I-SMAD que comprenden a las SMAD6 y SMAD7, carecen de un dominio MH1 y del motivo SSXS, pero tienen un dominio MH2 conservado y regulan negativamente a la transducción de señales (**Figura 3**). La SMAD7 trabaja como un inhibidor general de todos los TGF- β y, por otro lado, la SMAD6 bloquea preferencialmente la vía de señalización por BMP (Moustakas, A., y Heldin, C., 2009; Massagué, J., 2012; Weiss, A. y Attisano, L., 2013).

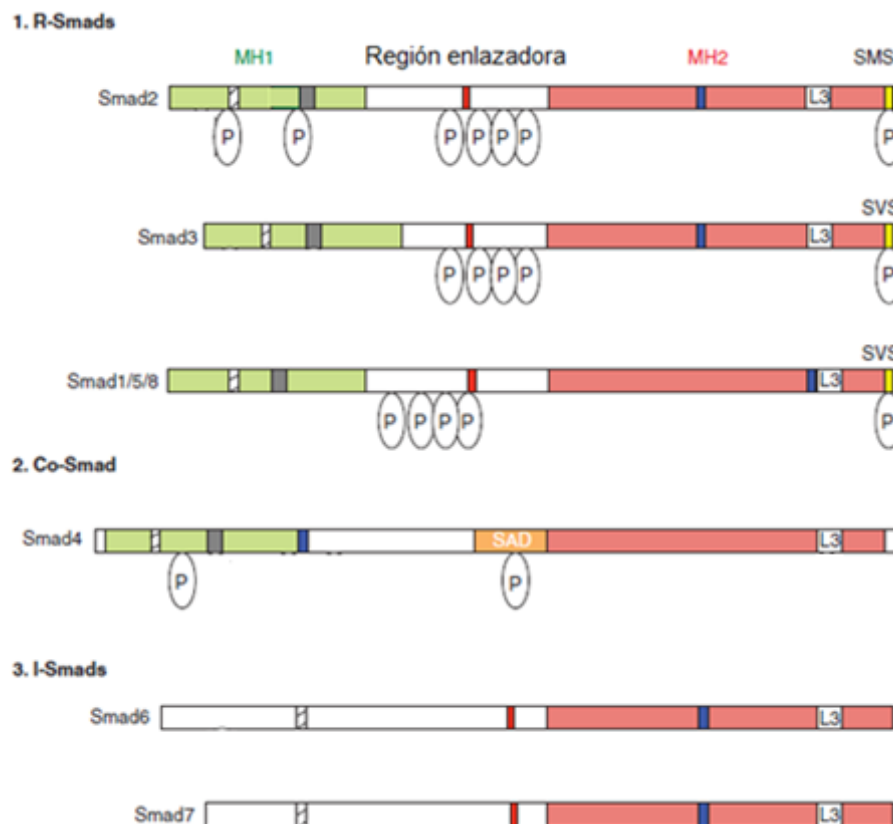


Figura 3. La familia de las proteínas SMAD.

Ilustraciones esquemáticas de las ocho proteínas SMAD humanas divididas en 1) SMAD reguladas por receptor (R-SMAD), 2) SMAD común (Co-SMAD), y 3) SMAD inhibidora (I-SMAD). Los dominios conservados de homología de amino terminal de Mad 1 (MH1) y carboxilo terminal MH2 están indicados como recuadros de color verde y rojo, respectivamente. Se muestra la señal de localización nuclear (NLS, en cuadro sombreado), el único inserto en el dominio MH1 de la SMAD2, la horquilla β en el dominio MH1 que se une al DNA (caja de color negro), el motivo de prolina-tirosina (PPXY) (cuadro rojo) en el dominio enlazador que es reconocido por las proteínas pertenecientes a la familia Smurf, el dominio de activación de SMAD (SAD, caja naranja) que está localizado en el borde del enlazador del MH2 de la SMAD4, la señal de exportación nuclear (NES, caja azul) y el loop L3 del dominio MH2 (caja blanca). Los residuos de serina carboxilo terminal en el motivo SXS que son fosforilados por los dominios de cinasa de los receptores tipo I están mostrados en la caja amarilla. P, fosforilación de treonina o serina. Tomado de Hata, A., y Guang, Y., 2016.

1.2.2.2 Los receptores del TGF- β

Los miembros de la familia del TGF- β realizan su señalización por medio de la unión a receptores localizados en la membrana plasmática. Los miembros que conforman a esta familia de receptores tienen características estructurales semejantes tanto a las cinasas de serina/treonina como de tirosina; de hecho, se trata de cinasas de especificidad dual, aunque a la familia se le llama con mayor frecuencia receptores con actividad de cinasa de residuos de serina y treonina (Lawler, S., *et al.* 1997; Manning, G., *et al.*, 2002). Esta familia es muy pequeña en los mamíferos, con solamente 12 miembros, a diferencia de la familia de 58 miembros de los receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK, del inglés *Receptor Tyrosine Kinase*) (Heldin, C., *et al.*, 2014). La unión de un miembro de la familia del TGF- β induce el ensamblaje de un complejo heterotetramérico de dos receptores de tipo I y dos del tipo II. Existen siete receptores del tipo I y cinco receptores del tipo II en humanos; los miembros individuales de la familia del TGF-

β se unen en combinaciones características de receptores de tipo I y II. Los receptores cuentan con dominios extracelulares ricos en cisteína bastante pequeños, un dominio transmembranal, un dominio yuxtramembranal y un dominio intracelular con actividad de cinasa. La oligomerización inducida por el ligando de los receptores del tipo I y II, causa que el receptor de tipo II fosforile al receptor de tipo I en una zona del dominio yuxtramembranal que es rica en residuos de glicina y serina, llamada el dominio GS, lo que promueve la activación de su dominio de cinasa. Una vez que los receptores de tipo I son activados, fosforilan a miembros de la familia R-SMAD; por ende, TGF- β , activina y nodal por lo general inducen la fosforilación de SMAD2 y SMAD3, mientras que las BMP provocan la fosforilación de las SMAD1, SMAD5 y SMAD8 (Feng, X., y Derynck, R., 2005). En la Figura 4 se muestra cómo es que están estructurados los receptores del tipo I y II para los miembros de la familia del TGF- β .

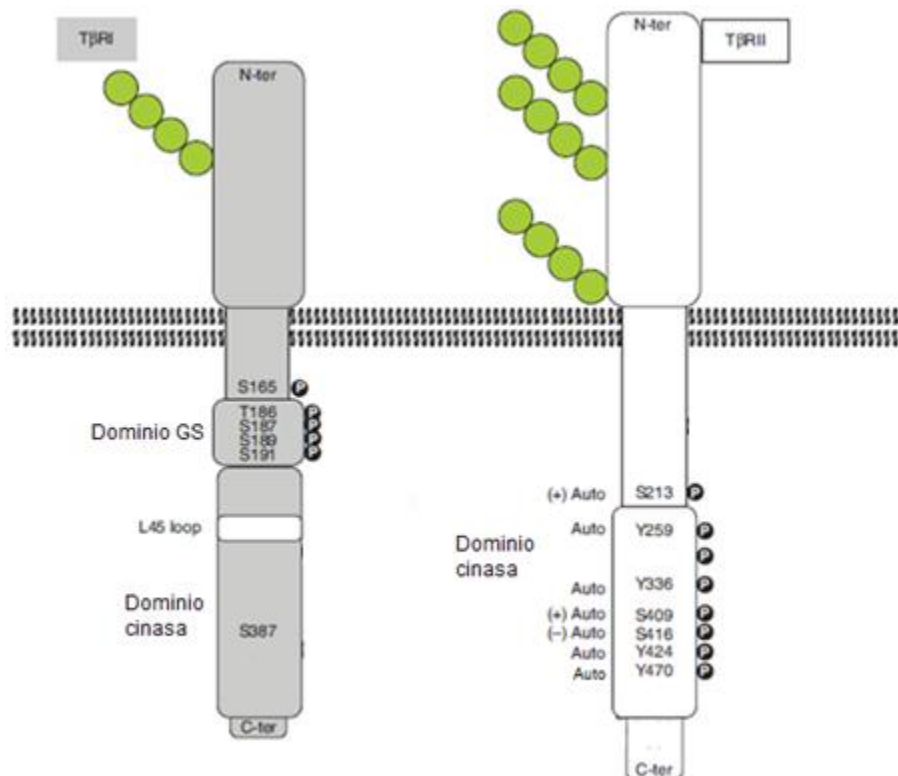


Figura 4. Representaciones esquemáticas de las características de los receptores de tipo 1 y 2 para el TGF- β , T β RI y T β RII. Se muestran motivos estructurales, así como restos con modificaciones postraduccionales. Las cadenas

de círculos representadas en color verde se tratan de glicosilaciones ligadas a N; los círculos negros con una “P” blanca son los sitios de fosforilación (autofosforilación del receptor; para otras cinasas indicadas: los signos de + y – representan el impacto, ya sea positivo o negativo, en la actividad cinasa del receptor). El T β RI también se autofosforila en los residuos de serina/treonina y tirosina, aunque no se conocen con exactitud sus ubicaciones (no se muestra). N-ter, amino terminal; C-ter, carboxilo terminal. Tomado de Henrik, C., y Moustakas, A., 2016.

1.2.2.3 Vía de señalización canónica del TGF- β

La vía de señalización del TGF- β , desde los receptores hasta el núcleo, está mediada predominantemente por la fosforilación de las proteínas Smad, que son mediadores citoplasmáticos que están conservados evolutivamente y que funcionan como factores transcripcionales (**Figura 5**) (Massagué, J., y Chen., Y., 2000).

En respuesta al TGF- β , el T β RI fosforila a SMAD2 y SMAD3 en el motivo SXS del extremo carboxilo terminal del dominio MH2. Luego, las R-SMAD fosforiladas se asocian con la Co-SMAD, o sea, con la SMAD4 y el complejo se transloca al núcleo en donde ejerce sus efectos transcripcionales. La SMAD4 únicamente se traslada al núcleo cuando están en un complejo con las R-SMAD, mientras que las SMAD2 y SMAD3 activadas por el ligando pueden translocarse hacia el núcleo de una forma independiente de SMAD4.

Así, los complejos R-SMAD/SMAD4 pueden actuar como factores de transcripción, uniéndose de manera directa al DNA o en asociación con otras proteínas de unión al DNA (Massagué, J., y Chen., Y., 2000). Tanto las R-SMADs, como las Co-SMADs, establecen una unión con el DNA a través de sus dominios MH1, los cuales reconocen una secuencia específica de 5 pares de bases (5'-CAGAC-3'), también llamada elemento de unión a SMAD (SBE, del inglés *Smad Binding Element*), que ha sido identificada en muchos promotores de genes que responden al TGF- β , pero tal unión es muy débil, de muy baja afinidad y poco selectiva (Lutz, M., y Knaus, P., 2002). Al estar asociadas con varias biomoléculas

de unión al DNA, las SMAD pueden obtener interacciones selectivas de gran afinidad con el DNA afín. El rol transactivador de las SMAD se le ha atribuido a su dominio MH2. Las SMAD deben reclutar a factores adicionales con el fin de activar en su totalidad la transcripción de sus genes blanco, como, por ejemplo, reclutan diversos factores de transcripción y cofactores transcripcionales (Massagué, J., y Chen., Y., 2000).

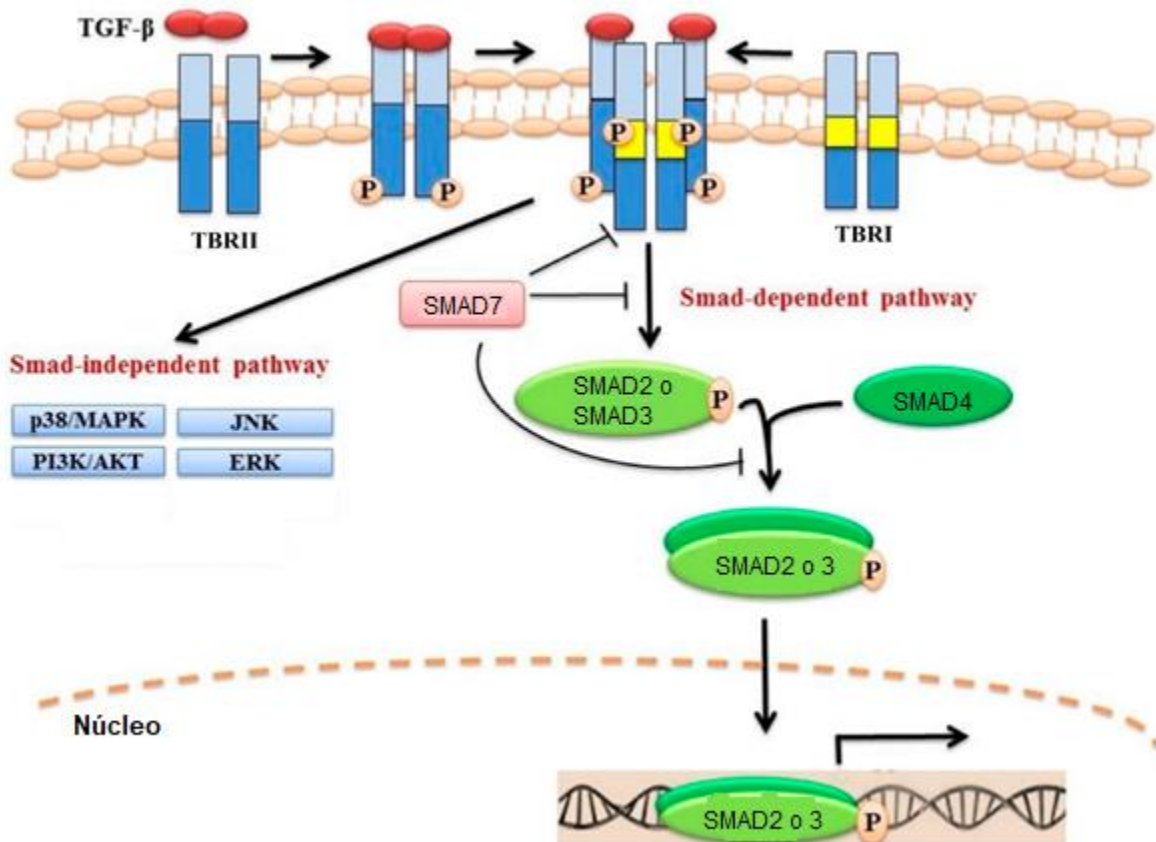


Figura 5. La vía de transducción de señales por medio de las proteínas SMAD. Una vez que el TGF-β se une al TβRII, éste último fosforila al TβRI que a su vez fosforila a las proteínas SMAD2 y SMAD3. Las R-SMADs que están activadas se unen a la SMAD4 y se translocan hacia el núcleo para fungir como factores de transcripción, controlados por un equilibrio entre coactivadores transcripcionales o correpresores. La proteína SMAD7 se une al TβRI activado, impidiendo la fosforilación de las R-SMAD, o bien, recluta a las ubiquitin ligasas, Smurf1 y Smurf2, para promover la degradación proteosomal de los complejos de receptores. Tomado de Velapasamy, S., *et al.*, 2018

1.2.2.4 Vías de señalización no canónicas del TGF- β

Existe evidencia de que el TGF- β tiene la capacidad de activar a otras vías de señalización, de manera paralela a las SMAD, como, por ejemplo, la vía de PI3K y la vía clásica de las MAPKs, entre otras. Al parecer, la activación de estas vías es más importante en los efectos del TGF- β que están relacionados con la regulación del proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés *Epithelial-Mesenchymal Transition*). En determinados tipos celulares, ciertas MAPKs, comprendiendo a las cinasas activadas por estrés como SAPK/JNK, las cinasas reguladas por señales extracelulares como Erk1 y Erk2 y la cinasa PI3K, también son activadas por el TGF- β (**Figura 5**) (Derynck, R., y Zhang, Y., 2003), regulando varias respuestas celulares, como, por ejemplo, la diferenciación, la apoptosis, la angiogénesis, la supervivencia y la EMT (Zhang, Y., 2017).

1.2.2.5 El papel dual de la citocina TGF- β en el desarrollo del cáncer

1.2.2.5.1 Señalización de la citocina TGF- β : un actor emergente en la progresión del cáncer

La activación de la vía de señalización del TGF- β provoca el arresto del ciclo celular en células sanas y en células cancerosas en un estadio temprano del cáncer, lo cual sugiere que esta vía desempeña un papel muy importante en la supresión de tumores. No obstante, en muchos tipos de cáncer se observa una expresión elevada del TGF- β y la activación de la señalización intracelular iniciada por los receptores del TGF- β (Massague, J., 2008). La activación de esta vía en las células cancerosas puede inducir la EMT, en la que las células epiteliales pierden su polaridad apicobasal y su adhesión célula-célula y adquieren características de células mesenquimales móviles (Nieto, M., *et al.*, 2016). La adquisición transitoria de un estado mesenquimatoso es clave para la migración de las células tumorales, pero no para el crecimiento metastásico en sí mismo (Beerling, E., *et al.*, 2016). Además de su importancia en la migración, la EMT también se ha asociado con la resistencia a la quimioterapia (Fischer, K., *et al.*, 2015; Zheng, X., *et al.*, 2015) y con la evasión de la vigilancia del sistema inmune por parte de las células tumorales (Akalay, I., *et al.*, 2013). El TGF- β es producido,

con frecuencia, en grandes cantidades por las células tumorales y estromales y, a su vez, también puede estimular la tumorigénesis al promover la angiogénesis y suprimir el sistema inmunológico. Esto sugiere que la progresión del cáncer ocasiona el cambio en la señalización del TGF- β , de supresor de tumores a promotor de tumores (Akhurst, R., y Hata, A., 2012).

1.2.2.5.2 Señalización del TGF- β en células cancerosas y estromales

En general, las células cancerosas evitan los efectos citostáticos/ apoptóticos del TGF- β , a través de la mutación de actores clave a lo largo de su vía de señalización. El receptor T β RII se encuentra frecuentemente mutado en las células del CCR de un subgrupo de pacientes con metilación o mutación de genes que codifican para las proteínas de reparación de errores de apareamiento [pacientes con inestabilidad de microsatélites (MSI)] (Fearon, E., 2011). De forma interesante, en algunos CCR con MSI, las células con el receptor tipo II mutado siguen respondiendo al TGF- β (de Miranda, N., *et al.*, 2015). Se han reportado mutaciones inactivadoras en el gen *SMAD2* en el carcinoma hepatocelular, el CCR y el cáncer de pulmón (Yakicier, M., *et al.*, 1999). Las mutaciones inactivadoras en el gen *SMAD4* se encuentran en el CCR y en el carcinoma hepatocelular, y *SMAD4* se elimina en un alto porcentaje en el cáncer de páncreas. Cabe mencionar que, en las células cancerosas con mutaciones en las SMAD, la señalización independiente de las SMAD, todavía puede activarse tras la unión de la citocina TGF- β a su receptor (Mu, Y., *et al.*, 2012). Vermeulen y colegas demostraron que un subtipo de pacientes con CCR con mal pronóstico se caracteriza por una alta expresión de TGF- β (De Sousa, F., *et al.*, 2013).

Los tumores que han perdido componentes de la vía principal, como los receptores del TGF- β , tienen una ventaja de crecimiento, pero pueden no ser muy invasivos (Gryfe, R., *et al.*, 2000). Los tumores avanzados, como, por ejemplo, los melanomas, los gliomas y el cáncer de mama, han retenido la vía del TGF- β /SMAD intacta, pero se vuelven selectivamente resistentes a los efectos citostáticos del TGF- β al adquirir mutaciones en los protooncogenes que codifican para componentes de las vías de PI3K/AKT, RAS/MAPK o de p53 (Massague, J.,

2008). En estos tumores, la vía alterada del TGF- β /SMAD es utilizada con la finalidad de promover la EMT, la invasión y la metástasis. Los represores transcripcionales de la expresión de E-cadherina, como SNAIL y SLUG que median la EMT, pueden ser inducidos en estos tumores por el TGF- β de una manera dependiente de las SMAD (Moustakas, A., y Heldin, C., 2016). Además, la señalización del TGF- β independiente de SMADs y la activación de protooncogenes pueden colaborar para fomentar la progresión tumoral.

El TGF- β también juega un papel importante en la regulación de las células del estroma en el microambiente tumoral (**Figura 6**). El TGF- β tiene potentes efectos inmunosupresores sobre las células de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa, incluidas las células dendríticas, los macrófagos, las células asesinas naturales (NK, del inglés *Natural Killer*) y los linfocitos T CD4+ y CD8+. Además, el TGF- β estimula la diferenciación hacia células T reguladoras inmunosupresoras (Chen, W., y ten Dijke, P., 2016). Junto con la interleucina-6 (IL-6), el TGF- β promueve la diferenciación de las células T auxiliares CD4+ productoras de IL-17 y de las células T citotóxicas CD8+ (Flavell, R., *et al.*, 2010). La interferencia de la señalización del TGF- β puede promover la inmunidad antitumoral. En la leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B), las células tumorales expresan TGF- β que inhibe la función de las células NK y así las células tumorales pueden evadir la vigilancia inmunitaria (Rouce, R., *et al.*, 2016). El TGF- β también puede contribuir a la supresión de tumores indirectamente, al afectar la producción de citocinas por las células tumorales. La inactivación de la señalización del TGF- β por la delección de SMAD4 en los linfocitos T conduce a tumores gastrointestinales en ratones (Kim, B., *et al.*, 2006).

La angiogénesis tumoral asegura un crecimiento tumoral sostenible y una mejor difusión de los nutrientes y la eliminación de los productos de desecho. El TGF- β también puede tener efectos estimulantes o inhibidores sobre el crecimiento de los vasos sanguíneos tumorales, dependiendo del contexto celular (Pardali, E., *et al.* 2010). El efecto estimulante del TGF- β está mediado por la activación del receptor de tipo I llamado ALK1 y por el correceptor endogлина que

se expresan de manera selectiva principalmente en las células endoteliales (de Vinuesa, A., *et al.*, 2016).

Los fibroblastos asociados al cáncer (CAF, del inglés *Cancer Associated Fibroblasts*) son el tipo de célula más abundante en el microambiente de muchos tipos de tumores. La eliminación del receptor T β RII (Tgfbr2) en los CAF conduce a una neoplasia intraepitelial de próstata y al carcinoma de células escamosas en modelos de ratón (Bhowmick, N., *et al.*, 2004).

Como resultado de diversos estudios se sugirió que los pacientes con CCR que contienen CAF que exhiben una alta actividad de la vía TGF- β , son propensos a desarrollar lesiones metastásicas (Calon, A., *et al.*, 2015). La activación de la señalización del TGF- β también puede diferenciar a las células troncales mesenquimales estromales (MSC, del inglés *Mesenchymal Stem Cell*) en miofibroblastos, los cuales secretan proteínas de la ECM y a factores de crecimiento fibrogénicos, para apoyar el crecimiento tumoral (De Wever, O., *et al.*, 2008).

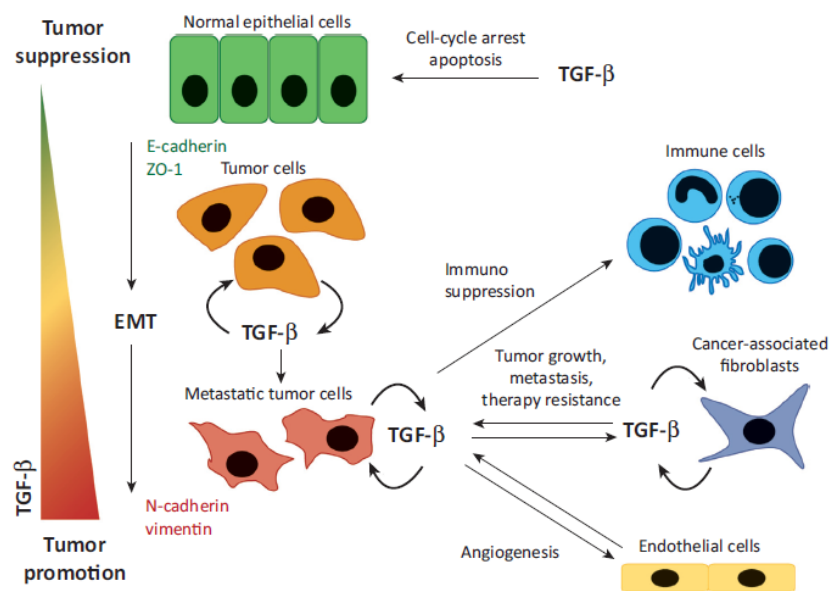


Figura 6. Regulación de células no cancerosas y del microambiente por el TGF- β .

El TGF- β es un actor importante en la progresión del cáncer y lo expresan las células del estroma, incluidos los CAF y las células tumorales. El TGF- β tiene una gran cantidad de efectos y en las células normales induce la detención del ciclo

celular y/o la apoptosis. Sin embargo, su expresión se incrementa en cánceres en estadios tardíos y aquí puede estimular la EMT. En este proceso morfológico, el TGF- β induce un cambio de expresión de algunos marcadores epiteliales y mesenquimales y promueve la formación de fibras de estrés de actina que reemplazan al citoesqueleto de actina cortical. Se cree que la EMT fomenta la migración e invasión de las células tumorales y también juega un papel fundamental en conferir resistencia a la quimioterapia. Además, el TGF- β puede contribuir a la progresión del tumor estimulando la evasión inmunitaria y promoviendo la angiogénesis. Tomado de Colak, S., y Dijke, P., 2017

1.2.2.6 Acciones del TGF- β en el cáncer colorrectal

La vía de señalización de la citocina TGF- β inhibe el crecimiento epitelial en tejidos normales, mientras que promueve la proliferación celular en el cáncer avanzado (Principe, D., *et al.*, 2014). Este fenómeno se conoce como la paradoja del TGF- β , la cual es dependiente del contexto celular y complica la comprensión del papel de la señalización del TGF- β en la biología del cáncer. Como efecto sobre las células epiteliales del colon, la señalización del TGF- β provoca una reducción de la proliferación celular, junto con la promoción de la diferenciación y la apoptosis (Massague, J., Seoane, J., y Wotton, D., 2005). Además de su efecto sobre las células epiteliales, el TGF- β desempeña funciones protectoras contra los antígenos bacterianos luminales al suprimir a las células inmunitarias intestinales en el estroma e inducir la tolerancia inmunitaria (Batlle, R., *et al.*, 2019). Por lo tanto, la interrupción de la señalización del TGF- β en el colon provoca la progresión del tumor, no solo a través de la transformación de las células epiteliales, sino también mediante las interacciones entre el tumor y el estroma (Ogawa, R., *et al.*, 2019).

1.2.2.6.1 Vía de señalización del TGF- β en las células de cáncer colorrectal

1.2.2.6.1.1 Mutación del receptor de tipo II del TGF- β en las células de cáncer colorrectal

Es frecuente encontrar mutaciones del *TGFBR2* en el cáncer colorrectal, en tumores que albergan MSI (Markowitz, S., *et al.*, 1995). Las células de cáncer colorrectal que tienen MSI y llevan un sistema deficiente de MMR (dMMR), albergan una expresión silenciosa de genes de este sistema gracias a mutaciones en *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* o a la hipermetilación del promotor de *MLH1* (Vasen, H., *et al.*, 2013; Rubenstein, J., *et al.*, 2015). El síndrome de Lynch es un síndrome de cáncer hereditario autosómico dominante que porta mutaciones de la línea germinal de uno de estos 4 genes MMR, lo que resulta en el desarrollo de muchos tipos de cánceres, incluidos el colorrectal, el de endometrio, de ovario, gástrico, de intestino delgado, de páncreas y del tracto urotelial (Tamura, K., *et al.*, 2019). El síndrome de Lynch representa aproximadamente el 3% de los tipos de CCR, mientras que aproximadamente el 12-15% de los CCR con MSI es esporádico, como resultado de la hipermetilación del promotor *MLH1* (Haraldsdottir, S., *et al.*, 2016). De manera interesante, también el *TGFBR2* es uno de los genes afectados por un sistema deficiente de MMR (de Miranda, N., *et al.*, 2015). Sin embargo, según diversos estudios con ratones, la mutación del *TGFBR2* sí tiene el potencial de transformar a las células epiteliales normales del colon en células malignas (Takeda, H., *et al.*, 2019).

Aunque la alta respuesta inmune en el CCR es el resultado de la carga de neoantígenos tumorales causada por la hipermutación, la ausencia de T β RII también puede promover directamente la inflamación en el microambiente tumoral del CCR. La deficiencia del *TGFBR2* en un modelo de adenoma intestinal de ratón con delección de *APC* aumentó la carga inflamatoria y promovió la progresión tumoral a través de la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), de interleucina-8 (IL-8) y del TGF- β 1, así como la supresión de citocinas antiinflamatorias como IL-10 e interferón (IFN)- γ , lo que resultó en una mayor infiltración de la población de granulocitos CD11b+Gr1+ en el microambiente tumoral (**Figura 7**) (Principe, D., *et al.*, 2016). Además, la alteración del *TGFBR2* en combinación con la inflamación en el colon provoca un CCR invasivo, a través de la infiltración de macrófagos asociados a tumores (TAM, del inglés *Tumor-associated macrophages*) (Oshima, H., *et al.*, 2015).

La inactivación del TGFBR2 en células de CCR contribuye al fenotipo maligno a través de múltiples vías como Wnt/ β -catenina, Hippo y MAPK (Morris, S., *et al.*, 2017). La activación de la vía Wnt/ β -catenina y la ausencia del *TGFBR2* en un modelo de ratón promovió la proliferación de células de CCR (Miguchi, M., *et al.*, 2016).

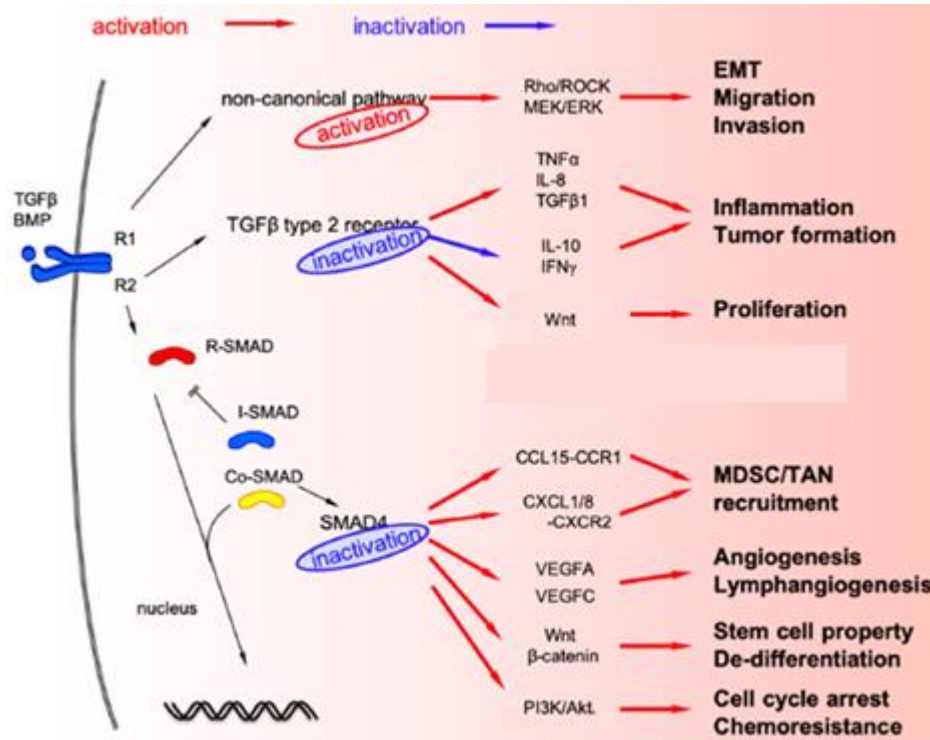


Figura 7. Alteración de TGF- β en células de cáncer colorrectal.

La ausencia o inactivación del TBR11 en células de CCR ocasiona la sobre-expresión y regulación negativa en la expresión de varias biomoléculas que se generan en el entorno inmunológico y contribuyen a que se produzca inflamación. Asimismo, se activa la vía de señalización de Wnt para promover la proliferación. Por otro lado, la ausencia de SMAD4 induce la sobre-expresión de quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento, así como la activación de las vías Wnt, PI3K, Rho/ROCK y MEK/ERK que contribuyen a la progresión tumoral. Tomado de Itatanai, Y., Kawada, K., y Sakai, Y., 2019.

1.2.2.6.1.2 Mutaciones y deleciones de la proteína SMAD4 en células de cáncer colorrectal

La LOH es una de las características comunes de la carcinogénesis que hace que las células cancerosas pierdan genes supresores de tumores y adquieran un fenotipo maligno. El cromosoma 18q21 se ve afectado con frecuencia por LOH en los tumores en el CCR sin alteraciones en los microsatélites o sin MSI. Existe una gran cantidad de genes en esta región cromosómica, incluidos *SMAD2*, *SMAD4* y *DCC* que pueden contribuir a formar un fenotipo maligno de CCR. Entre los genes del cromosoma 18q21, *SMAD4* es el gen supresor de tumores establecido y la pérdida de *SMAD4* altera la señalización de la vía canónica del TGF- β , debido a que se trata de un factor de transcripción relevante para la señalización (Weinberg, R., 2013).

SMAD4 es uno de los genes impulsores clave que contribuyen a la progresión y metástasis del CCR (Huang, D., *et al.*, 2018). En consecuencia, la pérdida de *SMAD4*, junto con la mutación de *APC* en las células epiteliales intestinales, causa un fenotipo invasivo maligno en modelos de ratón (Kitamura, T., *et al.*, 2007). La pérdida de expresión de la proteína *SMAD4* se encuentra aproximadamente en un 20-40% de los tipos de CCR humanos (Ogawa, R., *et al.*, 2019).

La pérdida de *SMAD4* en las células de cáncer colorrectal promueve la regulación positiva de la quimiocina CCL15 en tales células, para reclutar células supresoras derivadas de mieloides (MDSC, del inglés *Myeloid Derived Supressor Cells*) a través de su receptor CCR1+ (Zhao, M., Mishra, L., y Deng, C., 2018). Las células CRC deficientes en *SMAD4* también producen al ligando de quimiocina con motivo C-X-C, CXCL1/8, para reclutar a su correspondiente receptor CXCR2+ en neutrófilos asociados a tumores (TAN, del inglés *Tumor-associated neutrophils*) (Ogawa, R., *et al.*, 2019). Estos resultados sugieren que la delección de *SMAD4* en el CCR hace que tanto el fenotipo de las células cancerosas como el microambiente tumoral cambien hacia un fenotipo de cáncer más agresivo.

La señalización del TGF- β juega un papel muy importante en la angiogénesis en el microambiente tumoral (Itatani, Y., *et al.*, 2018). *SMAD4* también puede regular la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular, (VEGF)-A y VEGF-C, el cual es relevante para la angiogénesis y la

linfangiogénesis tumoral. Por lo tanto, la falta de SMAD4 induce la regulación positiva de estos factores angiogénicos, lo que da como resultado la promoción de la angiogénesis y la linfangiogénesis en el CCR (Li, X., *et al.*, 2017). La señalización del TGF- β también juega un papel crítico en la diferenciación de las células epiteliales. La pérdida de SMAD4 promueve la expresión de β -catenina y la pérdida simultánea de SMAD4 y la activación de Wnt en el epitelio intestinal desencadenan la adquisición de características de células troncales y conducen a la desdiferenciación y a la formación rápida de adenomas en el epitelio intestinal (Perekatt, A., *et al.*, 2018).

La quimiorresistencia también es una propiedad importante del fenotipo maligno de las células cancerosas y la pérdida de SMAD4 es un biomarcador predictivo para la quimioterapia basada en el 5-fluorouracilo (5-FU) (Zhang, B., *et al.*, 2014). La deficiencia de SMAD4 activa a PI3K/Akt para atenuar la detención del ciclo celular en G1/2, proporcionando resistencia a la quimioterapia basada en 5-FU (Zhang, Y., Alexander, P., y Wang, X., 2017).

1.2.2.6.1.3 Vías de señalización no canónicas del TGF- β en el cáncer colorrectal

La alteración de las vías del TGF- β no canónicas, así como de las canónicas, es frecuente en el CCR. Aunque la pérdida de SMAD4 puede conducir al bloqueo de la señalización canónica del TGF- β , altera la señalización de BMPs a través de una vía no canónica, para promover la metástasis del CCR a través de la activación de la vía Rho/ROCK, lo que conduce a la EMT, la migración y la invasión (Voorneveld, P., *et al.*, 2014). La pérdida de SMAD4 también activa vías alternativas como MEK/ERK para promover la migración y la invasión (Ai, X., *et al.*, 2013).

Cabe mencionar que los mensajeros químicos que son capaces de activar a las distintas vías de señalización relevantes en la intercomunicación celular en el microambiente tumoral, no solamente se les ha encontrado libres o en forma soluble en el medio extracelular, sino que algunos informes han reportado la expresión de, por ejemplo, factores de crecimiento o de otros mediadores solubles

en unas estructuras denominadas vesículas extracelulares (EV, del inglés *Extracellular Vesicles*). Algunos ejemplos son la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (Zhang, H., *et al.*, 2006), el factor de crecimiento de fibroblastos (Claudia, S., Carolin, S., y Walter, N., 2008) y el factor de crecimiento epidérmico (Sanderson, M., *et al.*, 2008), entre otros.

1.3 Generalidades sobre las vesículas extracelulares

La comunicación célula-célula es un elemento fundamental en el desarrollo de los organismos y en la conservación de la homeostasis, asegurando respuestas eficientes y rápidas a las amenazas o alteraciones dentro del ambiente que rodea a las células del organismo. Más allá de la señalización típica mediante el contacto célula-célula y la exposición a factores solubles, tales como mediadores inflamatorios, citocinas, hormonas y metabolitos, la comunicación intercelular también son generada por medio de la liberación celular de EV. Esta modalidad de comunicación cuenta con el potencial de proporcionar una variedad particular de mensajes a las células que detectan a las EV, en un nivel que va más allá de la señalización del factor soluble, puesto que las EV pueden transportar una gama de moléculas bioactivas, receptores de superficie e información genética, por ejemplo, RNA mensajeros y micro-RNAs reguladores (They, C., Zitvogel, L., y Amigorena, S., 2002; Ratajczak, J., *et al.*, 2006; Valadi, H., *et al.*, 2007; Kahlert C, *et al.*, 2014). El contenido de las EVs que es capaz de alterar la función de otras células varía dependiendo del tipo celular y de las condiciones fisiológicas y patológicas particulares que existen al momento del empaquetado y la secreción de las EV (Raposo, G., y Stoorvogel, W., 2013).

Las EV son mediadoras de la comunicación intercelular y están implicadas tanto en procesos fisiológicos normales como son la lactancia, la función neuronal y la respuesta inmunológica (Admyre, C., *et al.*, 2007), como también están involucradas en condiciones patológicas tales como las enfermedades neurodegenerativas (Vella, L., *et al.*, 2007), las enfermedades hepáticas (Masyuk, A., Masyuk, T., y Larusso, N., 2013) y el cáncer (Mathivanan, S., Ji, H., y Simpson, R., 2010).

La liberación de las EV es un proceso conservado evolutivamente desde las bacterias y las *arqueas* hasta las células eucariotas (Deatherage, B. y Cookson, B., 2012). Las EV están conformadas por una membrana con bicapa lipídica y son secretadas por muchos tipos de células y, por ende, pueden ser localizadas en sobrenadantes de cultivos de tejidos, así como en fluidos biológicos como son la saliva, la leche materna, la sangre, el fluido cerebroespinal y la ascitis maligna (Kalra, H., Drummen, G., y Mathivanan, S., 2016). El diámetro de las EV va de los 30 a los 1000 nanómetros. De acuerdo con el conocimiento que se tiene en la actualidad sobre su biogénesis, las EV se clasifican principalmente en: exosomas y microvesículas (Thery, C., *et al.* 2006) (**Figura 8**). No obstante, las microvesículas y exosomas, que tienen características semejantes, son difíciles de separar a pesar de los esfuerzos para caracterizarlas y aislarlas con base en su morfología, tamaño, densidad y composición de lípidos y proteínas (Andaloussi, S., Mager, I., Breakefield, X., y Wood, M., 2013; Raposo, G., y Stoorvogel, W., 2013).

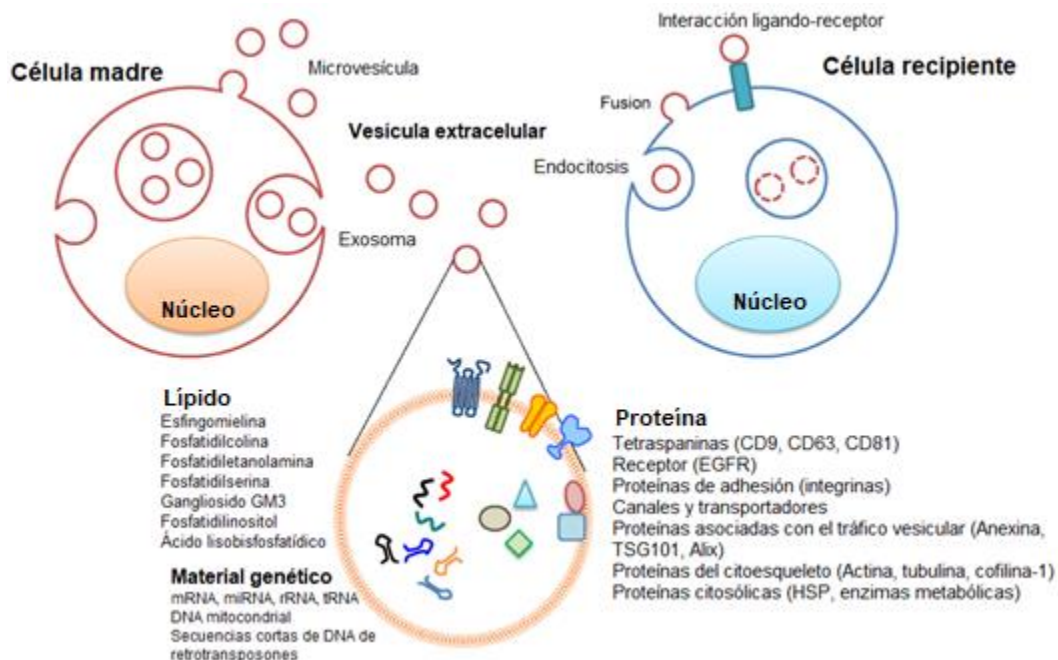


Figura 8. Comunicación intercelular por medio de EV.

Los EV se clasifican en microvesículas y exosomas, según su biogénesis. Tales EV tienen la capacidad para interactuar con las células receptoras a través de interacciones ligando – receptor, fusión e internalización mediante

macropinocitosis o endocitosis mediada por receptores. Tomado de Jin, Y., Youn, O., & Song, Y., 2014.

Los exosomas se pueden originar inicialmente a partir de la invaginación de las membranas plasmáticas; posteriormente, se forma un endosoma temprano el cual debe madurar hacia un endosoma tardío que se denomina cuerpo multivesicular (MVB, del inglés *Multivesicular Bodies*), el cual contiene vesículas intraluminales (ILV, *Intraluminal Vesicle*) (Raposo, G., y Stoorvogel, W., 2013). Los exosomas liberados son vesículas homogéneas, que tienen un diámetro aproximado que va de 40 a 100 nanómetros, con una densidad de 1.13 a 1.19 g/mL. Los exosomas incluyen proteínas endosomales, tales como: tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), Alix y TSG101 (proteína 101 del gen de susceptibilidad tumoral), las cuales se utilizan como marcadores de exosomas (Simons, M., y Raposo, G., 2009). La liberación de los exosomas proporciona un mecanismo de comunicación intercelular y las funciones particulares de estas EV dependerá de la célula de la cual provengan y de su composición (Zhang, W., *et al.*, 2018).

Las microvesículas, a las que también se le denomina ectosomas, micropartículas o vesículas provenientes de la membrana plasmática, son creadas a partir de la membrana plasmática por brotación externa y fisión. El diámetro de las microvesículas se encuentra entre 100 y 1000 nanómetros, y su densidad se encuentra entre 1.25 y 1.30 g/mL (Muralidharan, V., Clancy, J., Sedgwick, A., & D'Souza, C., 2010).

1.3.1 Composición de las vesículas extracelulares

1.3.1.1 Contenido proteico

Los estudios proteómicos de las EV de varios orígenes sugieren un mecanismo de selección controlado de proteínas, en lugar de que ocurra un empaquetamiento aleatorio de las proteínas, puesto que las EV de distintos tipos de células incluyen proteínas vesiculares comunes. Dichas proteínas vesiculares comunes están principalmente implicadas en la estructura de las vesículas, la biogénesis y el tráfico: los complejos de selección endosomal necesarios para el

transporte (Alix y TSG101), tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81), proteínas de choque térmico (Hsp60, 70 y 90), integrinas, anexinas, proteínas del citoesqueleto (actinas, cofilina-1, moesina y tubulinas), proteínas ribosómicas y enzimas metabólicas (Choi, D., *et al.*, 2013) (**Figura 8**). Por lo general, las proteínas localizadas en el citoplasma y en la membrana plasmática se empaquetan en las EV, en comparación con las proteínas en las mitocondrias y en el núcleo (Raimondo, F., *et al.*, 2011; Choi, D., *et al.*, 2012). Por lo tanto, las EV pueden contener proteínas comunes, así como también proteínas específicas procedentes de la célula que las produjo.

1.3.1.2 Contenido lipídico

Se sabe que los lípidos de las EV tienen un papel importante en la estabilidad, rigidez, función y fusión intracelular, y en los mecanismos de gemación de las EV. Los lípidos de la membrana (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, gangliósido GM3 y esfingomielina), ácido lisobisfosfatídico y prostaglandinas (E2, F2, J2 y D2) son elementos lipídicos de las EV (Subra, C., *et al.*, 2010). A pesar de que las proporciones específicas de estos lípidos varían dependiendo de la célula de origen, generalmente las EV están enriquecidas en colesterol, esfingomielina, fosfatidilserina y GM3 (Subra, C., *et al.*, 2007) (**Figura 8**).

1.3.1.3 Contenido de ácidos nucleicos

Han sido reportadas cantidades significativas de mRNA y miRNA vesiculares utilizando enfoques como la secuenciación y los microarreglos. La transferencia horizontal de mRNA y miRNA a través de vesículas puede llevar a la reprogramación epigenética de las células receptoras (Valadi, H., *et al.*, 2007; Skog, J., *et al.* 2008). Adicionalmente, además de mRNA y miRNA, las EV también contienen tRNA, rRNA, secuencias cortas de DNA de retrotransposones y DNA mitocondrial (Kogure, T., *et al.*, 2011) (**Figura 8**).

1.3.2 Biogénesis de las vesículas extracelulares

1.3.2.1 Biogénesis de los exosomas

Un mecanismo fundamental para la regulación y la degradación de los receptores de la membrana plasmática es por medio de su endocitosis y su tráfico hacia un MVB, los cuales, después pueden fusionarse con el lisosoma, con la finalidad de mediar la degradación de proteínas (Woodman, P., y Futter, C., 2008). Sin embargo, por lo menos una subpoblación de MVB también tiene la capacidad de fusionarse con la membrana plasmática, lo cual resulta en la liberación de las vesículas intraluminales como exosomas. Hay varios modelos que se han sugerido como mecanismo para la formación de las ILV. Investigaciones iniciales en levadura demostraron un rol para las proteínas del complejo de selección endosomal necesario para el transporte (ESCRT, del inglés *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) (Hurley, J., 2010). Aunque la maquinaria de ESCRT ha sido estudiada principalmente por su papel en la distribución (*sorting*) endosómica y la degradación de proteínas que son ubiquitinadas, también ha estado involucrada en la mediación de la invaginación de la membrana (Davies, B., Lee, J., Oestreich, A., y Katzmann, D., 2009; Metcalf, D., y Isaacs, A., 2010). A través de sus dominios que interactúan con la ubiquitina, el ESCRT-0 reúne proteínas ubiquitinadas para la entrega a los MVB (Raiborg, C., y Stenmark, H., 2002). Después, ESCRT-0 recluta a ESCRT-I a la membrana endosómica, que a su vez recluta a los miembros restantes de la maquinaria: ESCRT-II y ESCRT-III (Katzmann, D., Babst, M., y Emr, S., 2001; Babst, M., Katzmann, D., Snyder, W., Wendland, B., y Emr, S., 2002). A través de la creación de filamentos poliméricos mediados por ESCRT-III, la invaginación de la membrana da como resultado la formación de ILV (Wollert, T., Wunder, C., Lippincott, J., y Hurley, J., 2009). De hecho, existen diversos estudios que apoyan el papel de la maquinaria ESCRT para la formación de exosomas. El estudio proteómico de los exosomas ha demostrado la presencia de la maquinaria de ESCRT en el interior de los exosomas, y la eliminación de los elementos clave de la maquinaria de ESCRT puede suprimir la formación de ILV y, por consiguiente, la liberación de los exosomas (Tamai, K., *et al.*, 2010), a pesar de que esto sea específico o dependa del tipo celular (Stuffers, S., Sem. W., Stenmark, H., y Brech, A., 2009). Sin

embargo, diferentes estudios sugieren que hay mecanismos independientes de ESCRT para la biogénesis de MVB y la liberación de exosomas.

En las líneas celulares oligodendrogiales, la formación de los exosomas se encuentra impulsada por la producción de ceramida, en vez de la maquinaria de ESCRT (Trajkovic, K., *et al.*, 2008). Stuffers y colaboradores encontraron que la depleción de subunidades específicas de los cuatro complejos ESCRT no inhibía del todo la formación de MVB (Stuffers, S., Sem. W., Stenmark, H., & Brech, A., 2009). Asimismo, se ha propuesto un mecanismo que es independiente de los ESCRT y la ceramida. En las investigaciones de van Niel y sus colegas se encontró que la tetraspanina CD63, que está presente en exosomas en gran abundancia, contribuye a la distribución del cargo y la generación de ILV (van N., *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado que CD81 se encarga de mediar la distribución del cargo de los ligandos de tetraspanina, aunque la eliminación de esta tetraspanina no parece modificar la morfología de MVB o la secreción de exosomas (Perez D., *et al.*, 2013). Estas diferentes observaciones sugieren que el mecanismo para la biogénesis del exosoma y la distribución de proteínas podría ser específico del tipo de célula o propio para diversas subpoblaciones de MVB dentro de una célula.

Una vez que los MVB ya están formados, tienen la capacidad de fusionarse con lisosomas para mediar la degradación del cargo (Woodman, P., y Futter, C., 2008) o bien, con la membrana plasmática, un proceso que está mediado por el citoesqueleto, GTPasas pequeñas, y la maquinaria de fusión (Colombo M., Raposo G., y Théry C., 2014). Entre las GTPasas que están implicadas en la exocitosis de ILV, diferentes GTPasas RAB, las cuales son parte de la superfamilia de Ras GTPasas, se han identificado en los exosomas, como, por ejemplo, RAB5, RAB11, RAB27 y RAB35. (Savina A., Vidal M., y Colombo M., 2002; Hsu C., *et al.*, 2010; Ostrowski M., *et al.*, 2011). A pesar de que las RAB GTPasas se han visto involucradas en el tráfico y fusión de los MVB, su papel en el proceso aún se encuentra bajo investigación y probablemente dependa del tipo de célula, así como del estado fisiológico o patológico de la célula, como ya se mencionó.

Por otro lado, se ha demostrado que la maquinaria de fusión, que implica a los receptores (SNARE) de la proteína de fijación soluble del factor sensible a *N*-etilmaleimida (SNAP), regula la secreción de los exosomas. Las proteínas SNARE crean complejos entre las proteínas vesiculares v-SNARE (proteínas de membrana asociadas a vesículas o VAMP) y las proteínas t-SNARE (la “t” significa “target”, que en español quiere decir “blanco”) de la membrana celular (Zylbersztein K., y Galli T., 2011). En la figura 9 se muestra la biogénesis de los exosomas.

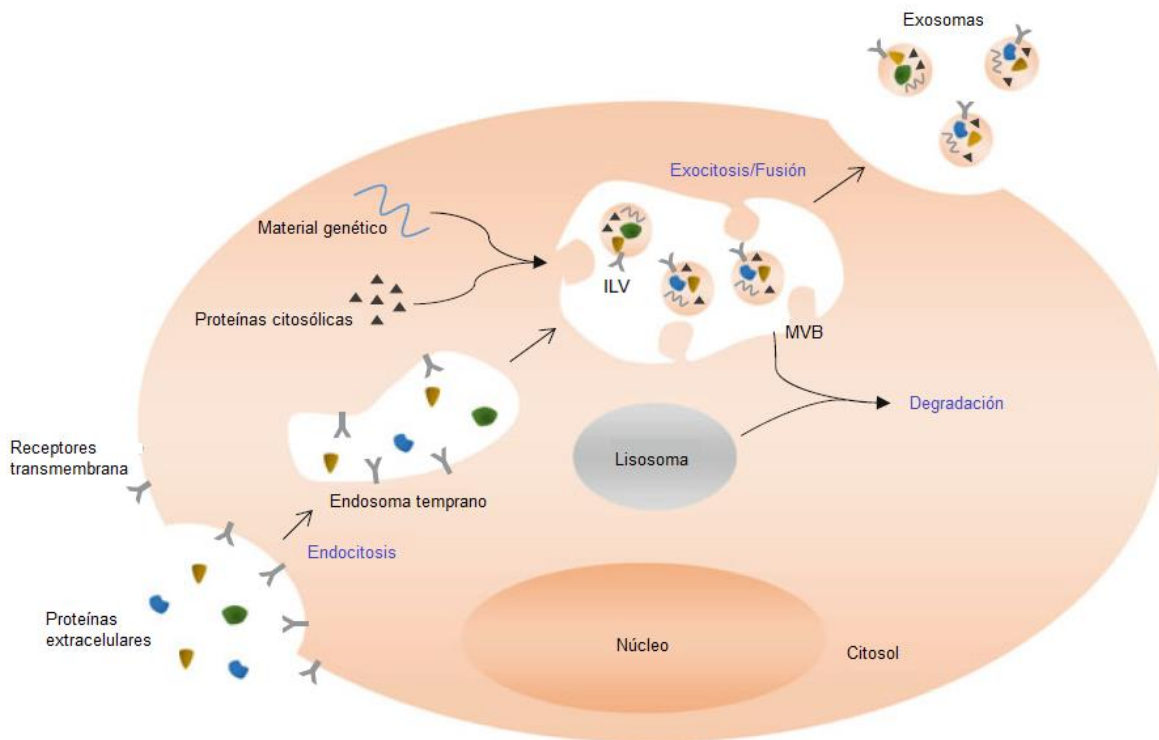


Figura 9. Biogénesis de los exosomas.

Las proteínas extracelulares y los receptores transmembrana son endocitados por un endosoma temprano. Los endosomas tempranos maduran o se convierten en endosomas tardíos y pequeñas vesículas intraluminales (ILV) son acumuladas en su lumen al brotar de la membrana interna de los endosomas tardíos, lo que ocasiona el secuestro de material genético y elementos del citosol. Los MVB se fusionarán con los lisosomas, lo que causará la degradación de su contenido, o con la membrana plasmática, un procedimiento que implica a las proteínas SNARE y a las RAB GTPasas, lo cual provocará la liberación de ILV denominados

“exosomas” en el entorno extracelular. Tomado de Carrière J., Barnich N., & Nguyen H., 2016

1.3.2.2 Biogénesis de las microvesículas

Las microvesículas son generadas a través de la gemación hacia el exterior de la membrana plasmática e involucra procesos notoriamente distintos en comparación con la biogénesis de los exosomas (Cocucci, E., Racchetti, G., y Meldolesi, J., 2009). Por lo general, estas vesículas son de mayor tamaño en comparación con los exosomas, con cierta superposición en sus distribuciones de tamaño, y las microvesículas tienen composiciones que carecen de muchas de las características endosómicas que están en los exosomas.

La formación de microvesículas en la membrana plasmática implica principalmente a los constituyentes de la membrana y su reordenamiento, el citoesqueleto y a las proteínas involucradas en la abscisión de la membrana. Luego de que sucede la nucleación (**Figura 10**), la interacción entre la membrana plasmática y las proteínas del citoesqueleto se pierde progresivamente, tanto por un incremento local de Ca^{2+} del citosol, como por enzimas que degradan las proteínas que inducen el desmontaje del citoesqueleto (por ejemplo, calpaínas activadas por calcio). De esta manera, se produce una deslaminación inicial de la membrana plasmática del citoesqueleto cortical. Simultáneamente, las translocasas de lípidos, enzimas que participan en el intercambio de lípidos entre la cara interna y externa de la bicapa lipídica de la membrana para conservar la asimetría de la membrana, participan para provocar cambios dentro de la bicapa que promueven la gemación y la abscisión de la membrana. En particular, se induce la externalización del fosfolípido fosfatidilserina, que normalmente está establecido exclusivamente en la cara interna de la membrana plasmática y es trasladado activamente a dicha cara para impedir su externalización (la externalización de fosfatidilserina induce la fagocitosis y la coagulación sanguínea, entre otros eventos celulares). A pesar de que se ha dicho que las escramblasas inactivas (Bever, E., y Williamson, P., 2010), que son translocasas lipídicas bidireccionales que disminuyen la asimetría lipídica, son activadas por un aumento

de Ca^{2+} citosólico que está claramente relacionado con la ruptura del citoesqueleto y la gemación de la membrana plasmática, su identidad exacta y su papel en la externalización de fosfatidilserina durante la gemación de la membrana se mantiene elusivo. De igual manera, una translocasa unidireccional impulsada por ATP, la flopasa, se encarga de la translocación de fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana, lo cual impulsa la inducción de la curvatura de la membrana plasmática y, por consiguiente, la formación de vesículas (**Figura 10B**). Concomitantemente, la actividad de la flipasa se atenúa por el ingreso de iones Ca^{2+} libres (Daleke, D., 2003).

Independientemente de si están o no involucradas las flopasas, escramblasas, o ambas, la traslocación unidireccional de fosfatidilserina a la parte exterior produce un desequilibrio estructural dentro de la bicapa lipídica. Como resultado, la bicapa sobresale hacia la dirección de la cara exterior (**Figura 10B**). Si la actividad de las translocasas es lo suficientemente elevada, la curvatura generada en sí misma podría ser suficiente para que se induzca la fisión vesicular (Devaux, P., Herrmann, A., Ohlwein, N., y Kozlov, M., 2008). No obstante, dado que la desestabilización enzimática de las interacciones membrana plasmática-citoesqueleto parece ser un evento importante, se han involucrado a las proteínas que favorecen la contracción del citoesqueleto, para ayudar en la formación y abscisión de las vesículas. En especial, se ha afirmado que el factor 6 de ADP ribosilación (ARF6, del inglés *ADP-Ribosylation Factor 6*), una proteína de unión a GTP, ejerce un papel en la secreción de las microvesículas (Muralidharan, V., *et al.*, 2009). Como se presenta en la **Figura 10B**, ARF6 comienza una cascada de señalización activando a la fosfolipasa D (PLD). La hidrólisis de la fosfatidilcolina por la PLD activada por ARF produce ácido fosfatídico unido a la membrana, que simultáneamente recluta a la cinasa regulada por señales extracelulares, como ERK, y biomoléculas que afectan a la curvatura de la vesícula. Paso seguido, ERK fosforila a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), que a su vez fosforila a la cadena ligera de la miosina (MLC) y conduce a la contracción de actomiosina y al consecuente desprendimiento de la microvesícula.

Mientras que los complejos ESCRT están relacionados con procesos que se llevan a cabo en endosomas y en la biogénesis de los exosomas, los integrantes de la maquinaria ESCRT tienen funciones fundamentales en los mecanismos asociados a la membrana plasmática, como la gemación de virus y la citocinesis. De hecho, algunas investigaciones han demostrado que los componentes de la maquinaria ESCRT pueden realizar un papel clave en la biogénesis de las microvesículas en la membrana plasmática. Nabhan y colegas demostraron que la gemación de la membrana plasmática está impulsada por la interacción de la subunidad TSG101 de ESCRT-I con el motivo tetrapéptido PSAP de la proteína 1 que contiene al dominio arrestina (ARRDC1); el dominio amino terminal de arrestina de ARRDC1 dirige la focalización de la membrana plasmática (Nabhan, J., *et al.*, 2012). TSG101 se recluta hacia la membrana plasmática desde su origen endosómico y junto con Alix puede estar involucrado en las últimas fases de la gemación y fisión de vesículas (Rauch, S., y Martin, J., 2011). Por último, ESCRT-III y la ATPasa Vps4 (proteína 4 de selección vacuolar) se reclutan y ensamblan para permitir el desprendimiento de la microvesícula y el reciclaje de la maquinaria de producción de vesículas.

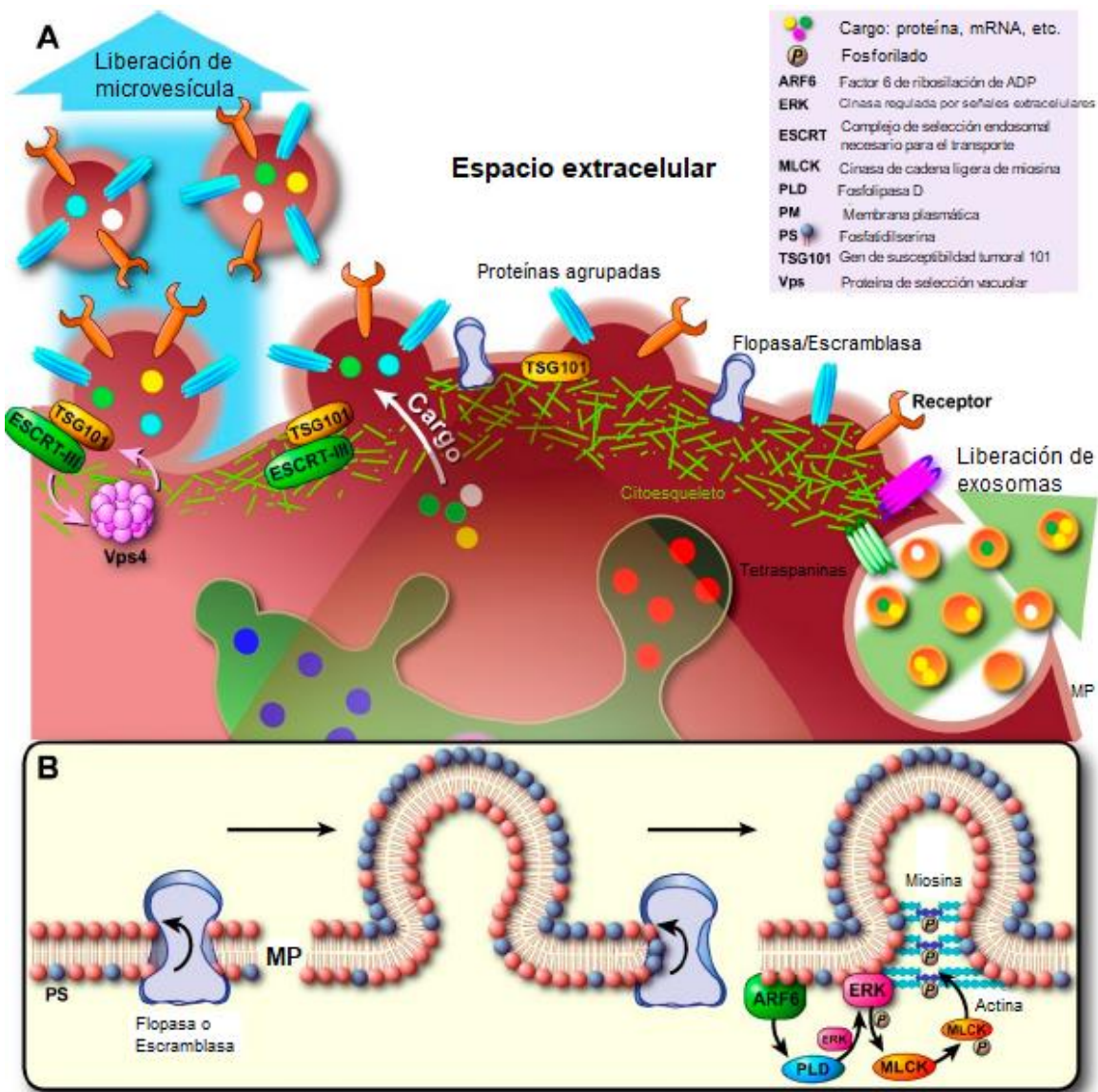


Figura 10. Biogénesis y secreción de microvesículas.

A) La nucleación inicial en la membrana plasmática empieza con la agrupación de lípidos y proteínas transmembrana en dominios diferentes. Las proteínas reclutadas y asociadas a la membrana plasmática, como las tetraspaninas, pueden estar implicadas en la selección de componentes semejante a la selección exosomal. Adicionalmente, la liberación/acumulación de Ca^{2+} y la activación de enzimas provocan la degradación de los componentes citoesqueléticos. La invaginación hacia afuera es impulsada por la externalización de fosfatidilserina por translocasas específicas (flopasa, escramblasa). A medida que el citoesqueleto se desintegra de manera local y se convierte más transitable, las

proteínas del citosol y el material genético se seleccionan en el lumen. Generalmente se cree que la gemación y el desprendimiento suceden por medio del modelo que está propuesto en el panel B), en donde la gemación involucra el comienzo de una cascada de señalización por parte de ARF6 mediante la activación y reclutamiento de PLD/Erk y la fosforilación de MLCK. Esto conduce a la contracción de actomiosina y el desprendimiento de la microvesícula. Alternativamente, existe evidencia que sugiere que TSG101 reclutado promueve la translocación de ESCRT-III a la membrana plasmática, lo que al mismo tiempo resulta en un ensamblaje en espiral cónico (iniciador de la gemación) y, finalmente, la constricción por parte de ATPasa Vps4 del anillo de espirales formados de ESCRT-III en el cuello de la gemación conduce a escisión y el desprendimiento de la membrana, como se muestra en el panel A). Tomado de Kalra, H., Drummen, G., y Mathivanan, S., 2016

1.3.2.3 Modificación de las proteínas de la carga molecular para su selección exosomal

Puesto que las proteínas del cargo molecular son las principales reclutadoras de las biomoléculas encargadas de los mecanismos de selección en los MVB, cualquier modificación de las proteínas del cargo destinadas a la liberación exosomal puede ser un factor determinante para su selección y liberación en los exosomas. Un regulador fundamental en la selección de proteínas exosomales es su modificación postraducciona (PTM). Diversas PTM pueden competir para determinar el destino de la misma proteína en la carga molecular (Moreno, O., Villarroya, C., y Sánchez, F., 2014). Una de las PTM principales es la ubiquitinación, la cual consiste en unir restos de ubiquitina a residuos de lisina presentes en el dominio citoplasmático de una proteína transmembranal, o bien, presentes y accesibles en proteínas solubles. El papel de la ubiquitinación en la clasificación de las proteínas de la carga en las ILV que están destinadas a la degradación lisosomal, se ha estudiado de forma extensa e involucra el reconocimiento de las proteínas de la carga que están ubiquitinadas (como, por ejemplo, EGFR, MHC-II) por el mecanismo ESCRT. Adicionalmente, el

MHC-II ubiquitinado se dirige hacia los MVB que se encuentran destinados para la degradación lisosomal y son clasificados en MVB, probablemente por medio de un mecanismo que es dependiente de la maquinaria ESCRT. Por otro lado, el MHC-II que no está ubiquitinado puede secretarse en exosomas y la selección para ILV involucra la incorporación de la proteína CD9 presente en las membranas, posiblemente de una forma independiente de ESCRT (Buschow S., *et al.*, 2009). Este conjunto de estudios consolida la noción de que los mecanismos dependientes e independientes de ESCRT se encuentran relacionados con la liberación de exosomas y con la degradación en los lisosomas, respectivamente.

Otras modificaciones postraduccionales que podrían ser importantes para la incorporación de proteínas en los exosomas son: la sumoilación, que consiste en la adición de SUMO, una pequeña proteína modificadora relacionada con ubiquitina (Villarroya, C., *et al.*, 2013); la oxidación de los aminoácidos metionina y tirosina (Surgucheva, I., Sharov, V., y Surguchov, A., 2012); la fosforilación (Valapala, M., y Vishwanatha, J., 2011); y la glicosilación (Moreno, O., Villarroya, C., y Sánchez, F., 2014). Finalmente, se ha demostrado que la ISGilación, la adición de la proteína pequeña similar a la ubiquitina llamada ISG15, regula de manera negativa la liberación de exosomas (Villarroya, C., *et al.*, 2016), aunque en realidad actuaría sobre el mecanismo de distribución y el destino del MVB más que sobre las propias proteínas de la carga molecular.

Cabe esperar que el reclutamiento y la contribución de estas distintas vías de distribución en la biogénesis de los exosomas dependan no solamente de la PTM o del procesamiento de la proteína que será distribuida, sino también del tipo de célula, la homeostasis celular y de las condiciones patológicas.

1.3.2.4 El equilibrio entre la degradación y la secreción de vesículas almacenadas en cuerpos multivesiculares

El principal destino de un MVB es fusionarse con los lisosomas y degradar su contenido. Por consiguiente, los MVB deben impedir su degradación lisosomal con la finalidad de poder liberar a los ILV como exosomas. Este paso se trata de un punto de control crítico especialmente relevante en diversas patologías.

Los mecanismos que evitan la degradación lisosómica en favor de la secreción de los exosomas proporcionan un punto de control poderoso para la regulación de la biogénesis exosomal, pero todavía no se conocen bien los detalles (Eitan, E., *et al.*, 2016). Como fue mencionado con anterioridad, la selección independiente y dependiente de ESCRT parece dirigir a los MVB hacia la secreción o degradación lisosomal, respectivamente. La ISGilación de TSG101 (Villarroya, C., *et al.*, 2016) inhibe la secreción de exosomas, mientras que las mutaciones que alteran a la ISGilación incrementan la secreción de exosomas. Tal regulación se ve contrarrestada por la fusión de MVB con lisosomas, estableciendo el primer mecanismo que podría determinar el destino de un MVB: la fusión con un lisosoma o con la membrana plasmática. También apoya la noción de que las primeras subunidades de la maquinaria ESCRT podrían utilizarse en MVB de secreción y degradación (Guix, F., *et al.*, 2017).

¿Cómo puede un mecanismo particular de distribución actuar sobre la motilidad y el transporte polarizado, controlando el destino y la función de una subpoblación de MVB? Varios subconjuntos de endosomas destinados, respectivamente, a la degradación y secreción, podrían asociarse exclusivamente con mecanismos de distribución dependientes e independientes de la maquinaria ESCRT. De forma alternativa, las vías de distribución dependientes e independientes de ESCRT podrían trabajar juntas en el mismo MVB, y la abundancia de una determinada proteína en una carga o su PTM promoverá el reclutamiento de un mecanismo de distribución sobre otro y decidirá el destino del MVB. Finalmente, como se ha observado en algunas células especializadas como los melanocitos, la distribución de la carga molecular que es independiente y la que es dependiente de ESCRT podría trabajar de forma secuencial, actuando primero el primer mecanismo, mientras que aquellas proteínas de la carga sobre las cuales actúa el mecanismo dependiente de ESCRT, se secuestran en una capa de clatrina en la membrana limitante de los MVB. Por lo tanto, solo aquellos MVB en los cuales participó el mecanismo independiente de ESCRT podrían ser secretados.. El tipo celular y su estado de maduración serían importantes, como se muestra por ejemplo, para el caso de las células dendríticas que emplean

diferentes mecanismos de selección según su etapa de maduración y para los reticulocitos que hacen uso de diferentes mecanismos para la secreción de exosomas durante su maduración en eritrocitos (Mobius, W., *et al.*, 2003).

1.3.2.5 Dirigiendo a los cuerpos multivesiculares hacia la membrana plasmática para su secreción

Independientemente de su destino, los MVB deben ser transportados, antes de fusionarse con los lisosomas o con la membrana plasmática. Este paso proporciona un punto de control final para la biogénesis de los exosomas. De manera general, el transporte intracelular de organelos requiere asociación con el citoesqueleto, junto con la acción de motores moleculares y GTPasas pequeñas, y su fusión involucra proteínas SNARE (Jahn, R., y Scheller, R. 2006; Granger, E., McNee, G., Allan, V., y Woodman, P. 2014).

Varias proteínas RAB han estado involucradas en la secreción de exosomas. La GTPasa RAB11 es conocida principalmente por su rol en el reciclaje de proteínas cargo de endosomas tempranos hacia la membrana plasmática (Savina A., Vidal M., y Colombo M., 2002). Se ha observado la participación de la RAB35 en la secreción de exosomas de oligodendrocitos primarios (Frühbeis, C., *et al.*, 2013). En otro estudio se mostró que el silenciamiento de RAB2b, RAB5a, RAB9a, RAB27a y RAB27b redujo la secreción de CD63, CD81 y MHC-II en exosomas (Ostrowski M., *et al.*, 2011). Finalmente, RAB7 ha estado implicado en la secreción de exosomas de sintenina-ALIX por las células MCF-7 (Baietti, M., *et al.*, 2012). El hecho de que las proteínas RAB de endosomas tempranos y tardíos tengan un papel en la secreción de exosomas sugiere que, según el tipo de célula, se utilizan diferentes subpoblaciones de MVB, que se originan en endosomas tempranos o de reciclaje, o en endosomas tardíos para liberar ILV como exosomas. De forma alternativa, la participación de tantas proteínas RAB que actúan sobre los diversos compartimentos que cruzan la vía endosómica, confirmaría la interdependencia de los diferentes pasos que controlan la vía endosómica en la regulación de la biogénesis del exosoma.

La importancia del citoesqueleto está respaldada por la ubicación específica de la liberación de exosomas en la membrana plasmática. La secreción polarizada de exosomas sugiere que las células no liberarían exosomas en toda su superficie, sino que usarían transporte polarizado para dirigir la secreción hacia una ubicación precisa en la membrana plasmática. La red de microtúbulos, que contribuye a la organización intracelular general y a la polarización de los compartimentos intracelulares, es de primordial importancia para transportar los MVB, en coordinación con los motores moleculares, al sitio de secreción. RAB7 es un regulador clave de la motilidad de los MVB, debido a que también favorece el transporte de endosomas tardíos hacia los lisosomas (Wang, T., Ming, Z., Xiaochun, W., y Hong, W., 2011). Esto dependerá del estado ubiquitinado de Rab7 (Song, P., Trajkovic, K., Tsunemi, T., y Krainc, D., 2016) y la presencia de colesterol en la membrana limitante de los MVB (Rocha, N., *et al.*, 2009).

El citoesqueleto de actina también afecta la liberación de exosomas, porque es necesario para el acoplamiento y la fusión de los MVB con la membrana plasmática (Sinha, S., *et al.*, 2016). La liberación de Ca²⁺ en el citoplasma es importante porque activa a proteínas SNARE involucradas en la fusión de MVB a la membrana plasmática (Verweij, F., *et al.*, 2018). Este último punto de control determina el destino del exosoma, ya que orientará la secreción de los MVB hacia el exterior (Buschow S., *et al.*, 2009).

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

En el año 2015, Rong y colegas demostraron que el TGF- β presente en exosomas de dos líneas celulares de cáncer de mama, como MDA-MB-231 y BT-474, fue capaz de suprimir la respuesta inmune, puesto que inhibió la proliferación de esplenocitos (Rong, L., Li, R., Li, S., y Luo, R., 2015).

En el año 2016, Yamada y colaboradores observaron que dos líneas celulares de cáncer colorrectal, DLD-1 y WiDr, secretaron EV que contenían al ligando TGF- β 1; además observaron que al incubar a estas vesículas con células Jurkat, se produjo la alteración fenotípica de tales células, promoviendo que

adquirieran varias características de linfocitos T reguladores (Yamada, N., *et al.*, 2016).

En el año 2019, Shelke y colaboradores encontraron que el TGF- β 1 se encuentra asociado a las membranas de los exosomas secretados por células cebadas, a través de proteoglicanos de superficie sensibles a la heparinasa, el TGF- β 1 puede ser disociado del exosoma en condiciones ácidas y pasa de la forma latente a la activa e induce la migración de células mesenquimales *in vitro* a través de la señalización vía SMAD2 (Shelke, G., *et al.*, 2019).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, se sabe que diversas células, tanto sanas como transformadas, tienen la capacidad de secretar a la citocina TGF- β . Se sabe que el TGF- β puede ser secretado por las células cancerosas en forma soluble o en EV, ocasionando diversos efectos biológicos sobre sus células blanco, con el fin de contribuir con la comunicación intercelular y la progresión tumoral. En el CCR, las células cancerosas son capaces de secretar a la citocina TGF- β para contribuir a la progresión del cancer en etapas avanzadas, pero sus mecanismos de secreción están poco estudiados. Por lo tanto, esta investigación teórica se llevó a cabo con la finalidad de apoyar y contribuir a la investigación sobre las EV secretadas por las células de cáncer colorrectal, SW480 y SW620, que contengan a la citocina TGF- β y a alguna biomolécula portadora de este ligando. La importancia de este estudio reside en aumentar la comprensión de los mecanismos de secreción de esta citocina al medio extracelular por las células de CCR.

4. HIPÓTESIS

Las células de cáncer colorrectal SW480 (línea de tumor primario) y SW620 (línea metastásica) provenientes de un mismo paciente, son capaces de secretar diferencialmente a la citocina TGF- β , en cuanto a cantidad y mecanismos de secreción, es decir en forma soluble o en EV. La línea metastásica SW620 secreta una mayor cantidad de TGF- β en EV.

5. OBJETIVOS

Objetivo general:

Investigar las diferencias que existen en cuanto a la secreción de la citocina TGF- β en las células de cáncer colorrectal provenientes de un tumor primario y de uno metastásico.

Objetivos Particulares:

Objetivo 1: Investigar sobre los mecanismos conocidos de secreción de la citocina TGF- β por las células cancerosas, en general.

Objetivo 2: Investigar sobre los mecanismos de secreción del ligando TGF- β en las células de cáncer de colon SW480 (tumor primario) y SW620 (metastásicas).

Objetivo 3: Investigar los niveles de expresión y la funcionalidad de la vía de señalización del TGF- β en las células de cáncer de colon SW480 (tumor primario) y SW620 (metastásicas).

Objetivo 4: Con la información bibliográfica analizada, elaborar un modelo hipotético sobre el mecanismo de secreción de la citocina TGF- β en EV por las células SW480 y SW620.

6. METODOLOGÍA

6.1 Selección de la información: se hizo una búsqueda en profundidad de artículos de revisión e investigación empleando como buscadores a: PubMed, NCBI y ScienceDirect.

6.2 Estructuración de la tesis teórica: la información recolectada fue distribuida en varias secciones: generalidades sobre el cáncer, cáncer colorrectal, la citocina TGF- β y las EV.

6.3 Análisis y selección de la información: se extrajo información importante de los artículos de investigación recolectados y relacionados con la expresión del TGF- β en las EV de células cancerosas, la expresión de los componentes de la vía de

señalización del TGF- β en las células SW480 y SW620, los efectos funcionales de la citocina TGF- β en células de cáncer colorrectal, el efecto de fármacos sobre las células de cáncer colorrectal a través de la vía del TGF- β , la proteómica de las EV secretadas por ambas líneas celulares de cáncer colorrectal y el análisis de la presencia del TGF- β o de alguna biomolécula portadora de esta citocina en las EV. Esta información fue dispuesta en las diferentes secciones de los resultados, así como también se elaboraron tablas y figuras con el fin de complementar la información escrita en cada sección. Las figuras fueron realizadas con el programa Adobe Illustrator.

6.4 Organización y redacción de la tesis teórica, incluyendo un modelo hipotético del mecanismo de secreción del TGF-beta por las células de CCR.

6.5 Escritura de un artículo de revisión en español, con fines de divulgación.

7. RESULTADOS

7.1 Secreción de la citocina TGF- β en vesículas extracelulares de células cancerosas

La secreción de EV en el microambiente tumoral es muy importante para la comunicación intercelular y para la progresión tumoral. Por lo tanto, nos enfocamos primero en investigar si había evidencia de la secreción del TGF- β en EV por diferentes tipos de células cancerosas. En la **Figura 11** y en la **tabla I** se muestra la información encontrada. Los exosomas secretados por células de mesotelioma y líneas celulares humanas de cáncer de próstata, PC3 y LNCAP, expresan en su superficie al betaglicano unido al TGF- β 1 latente (Webber, J., *et al.*, 2010). Los exosomas derivados de la línea celular de melanoma humano A375, de células de cáncer gástrico humano SCG7901 y de células de sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico, contienen también en su carga molecular al TGF- β . No obstante, en estos estudios no se determinó si el TGF- β estaba en el interior de las vesículas o en su superficie, o bien, si se encontraba en la forma latente o activa o si estaba siendo portado por alguna biomolécula (Gu, J., *et al.*, 2012; Yen, E., *et al.*, 2017; Döchler, M., *et al.*, 2019).

Los exosomas y microvesículas provenientes de suero de pacientes con leucemia mieloide aguda contienen a la citocina TGF- β 1 asociada a la membrana. Los exosomas contienen al pro-péptido LAP-TGF- β y a la citocina TGF- β , madura, mientras que se encontró que las microvesículas contiene solo a la citocina madura. Sin embargo, en estos estudios tampoco se determinó cuál molécula estaba portando a las diferentes formas de la citocina (Szczepanski, M., *et al.*, 2011; Hong, C., *et al.*, 2014).

De manera interesante se encontró al receptor de tipo II para TGF- β , T β RII, en exosomas aislados de fibroblastos estromales aislados de pacientes con carcinoma de células escamosas oral. Sin embargo, en esta investigación no se estudió si el receptor estaba en el interior o en la superficie de los exosomas (Languino, L., *et al.*, 2016).

Los exosomas obtenidos de las líneas celulares de cáncer de vejiga RT4, T24 o SW1710 contienen a LAP-TGF- β en su interior. (Ringuette, C., *et al.*, 2018). Las EVs derivadas de las células de cáncer de páncreas humano, L3.6pl, contienen al TGF- β 1, pero se desconoce si esta en el interior de las vesículas o en su superficie, o si esta en la forma latente o activa (Zhao, J., *et al.*, 2019).

Los hallazgos descritos mostraron que algunas células cancerosas generan EVs que contienen al TGF- β , el cual fue presentado a varias células blanco de una forma biológicamente disponible, ya que fue capaz de activar a la vía de señalización TGF- β /SMAD, ocasionando diversos efectos biológicos dependiendo de la célula diana; estos efectos indujeron la progresión tumoral.

En conjunto, los datos de estos estudios demuestran el papel fisiológico de las EVs como un medio de disseminación de biomoléculas dentro del medio extracelular, como son los factores de crecimiento y otros mediadores solubles, teniendo la capacidad de modular las funciones de varias células y estableciendo de tal manera un mecanismo de comunicación intercelular.

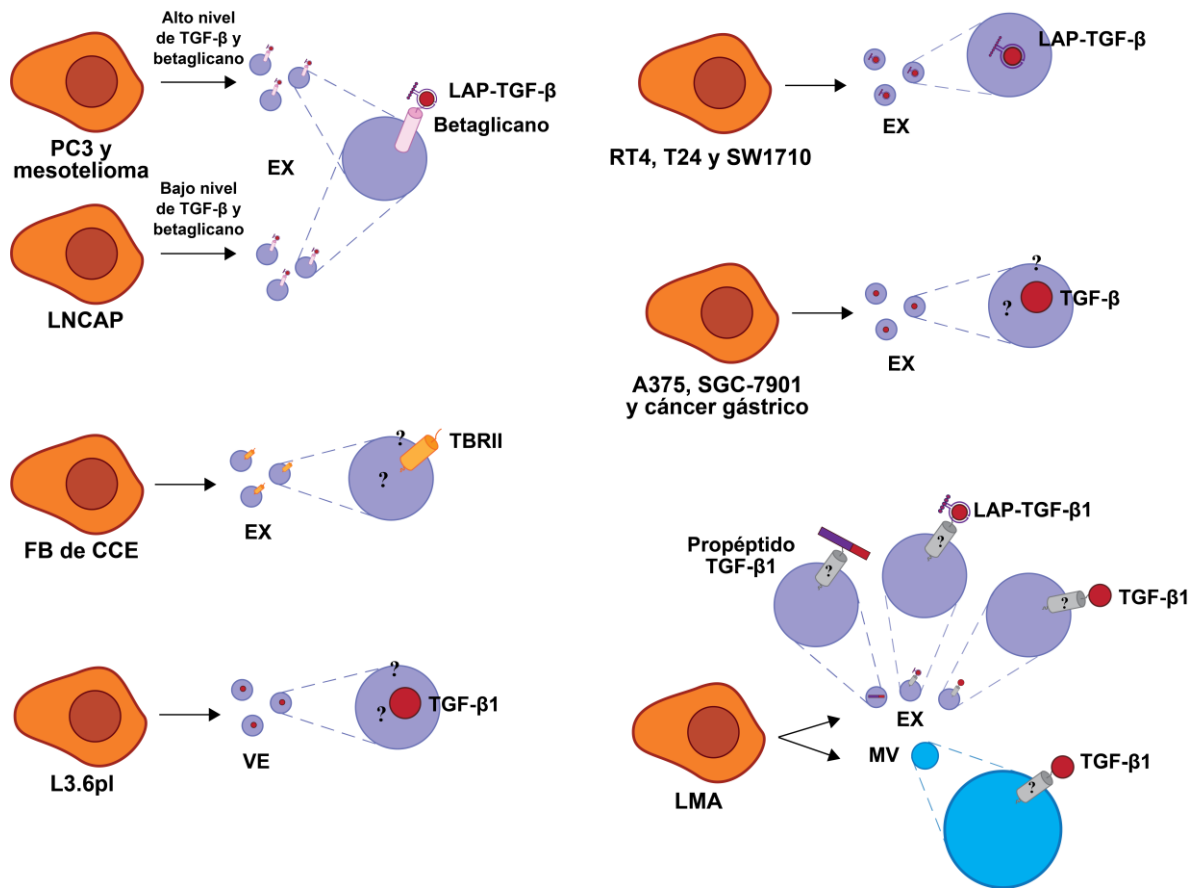


Figura 11. EVs secretadas por células de diversos cánceres que contienen al ligando de TGF- β y/o algún componente de su vía de señalización.

Diversas líneas celulares de diferentes tipos de cáncer son capaces de expresar a TGF- β (en diferentes formas) o a algún componente de su vía de señalización en EVs. Los signos de interrogación “?” indican que no se sabe si el receptor de tipo II o el TGF- β se encuentra en la superficie o en el interior de la vesícula, así como tampoco se sabe si la molécula de TGF- β estaba asociada a LAP o en estado maduro.

Tabla 1. Efectos biológicos sobre células blanco ocasionados por las EV portadoras de TGF- β y secretadas por diversas líneas celulares de cáncer

Célula secretora de EVs	Célula blanco	Efecto biológico que ejerce el TGF- β encontrado en EVs
Células de mesotelioma y células de cáncer de próstata, PC3	Fibroblastos primarios	Diferenciación hacia miofibroblasto y expresión positiva de α -SMA (Webber, J., <i>et al.</i> , 2010)

Células de cáncer gástrico humano, SGC7901	Células troncales mesenquimales de cordón umbilical humano	Activación de SMAD 2/3 Diferenciación hacia fibroblastos asociados a cáncer Aumentos en los niveles de proteína FAP, α -SMA, N-cadherina y vimentina Migración (Gu, J., <i>et al.</i> 2012)
Blastos de pacientes con leucemia mieloide aguda	Células humanas Natural Killer aisladas de sangre periférica de individuos sanos	Regulación positiva de SMAD 1/5/8 Inhibición de NKG2D (Szczepanski, M., <i>et al.</i> , 2011; Hong, C., <i>et al.</i> , 2014)
Fibroblastos primarios estromales de carcinoma de células escamosas	Queratinocitos primarios de carcinoma de células escamosas	Aumento de los niveles de T β RII Fosforilación de SMAD2 (Languino, L., <i>et al.</i> , 2016)
Células de sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico	Linfocitos T vírgenes obtenidos de sangre periférica	Diferenciación hacia linfocito T regulador y expresión positiva de CD25, CTLA-4 y FoxP3 (Yen, E., <i>et al.</i> , 2017)
Células de cáncer de vejiga RT4, T24 o SW1710	Fibroblastos humanos sanos provenientes de biopsias de vejiga de pacientes pediátricos	Activación de la vía de señalización TGF- β /SMAD Diferenciación hacia fibroblastos asociados a cáncer y expresión de α -SMA, FAP y Galectina (Ringuette, C., <i>et al.</i> , 2018)
Línea celular de melanoma humano, A375	Células humanas mononucleares de sangre periférica diferenciadas en células dendríticas	Regulación negativa de la expresión de las moléculas MHC de clase I y II, así como también de CD40 y CD86 (Düchler, M., <i>et al.</i> , 2019)
Células de cáncer de páncreas humano, L3.6pl	Células humanas Natural Killer, NK92	Incremento en el nivel de fosforilación de SMAD2/3 Disfunción celular (Zhao, J., <i>et al.</i> , 2019)

7.2 Expresión de los componentes de la vía de señalización del TGF- β en las líneas celulares de cáncer colorrectal SW480 y SW620.

Ya se ha demostrado y reportado en la literatura que algunas células provenientes de CCR, son capaces de expresar y secretar a la citocina TGF- β . En el estudio realizado por Jiang y colaboradores, encontraron que la línea celular de cáncer colorrectal, HCT116, expresó y secretó altos niveles de la citocina (Jiang, Z., *et al.* 2019). En otro estudio, hecho por Ayinde y colegas, encontraron que la línea celular de cáncer colorrectal RKO, fue capaz de sintetizar y expresar al TGF- β (Ayinde, O., Wang, Z., y Griffin, M. 2017). De manera interesante, en la investigación de Yamada y colaboradores, encontraron que dos líneas celulares

de cáncer colorrectal, DLD-1 y WiDr, fueron capaces de expresar y secretar al TGF- β en EVs (Yamada, N., *et al.* 2016).

La línea celular SW480 proviene del epitelio de colon humano, la cual se encuentra dentro de la clasificación de CMS4 (Berg, K., *et al.*, 2017) y se estableció a partir de un adenocarcinoma primario de colon, mientras que la línea celular SW620 también deriva del epitelio de colon humano, se encuentra dentro de la clasificación de CMS4 (Berg, K., *et al.*, 2017) y se estableció a partir de un adenocarcinoma de colon de un sitio metastásico (ganglio linfático). Esta línea se obtuvo de una metástasis del mismo tumor del que se derivó la línea SW480 (*American Type Culture Collection*, 2020). Ambas líneas, SW480 y SW620, son positivas para la expresión de oncogenes como c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, myb, sis y fos (*American Type Culture Collection*, 2020); además, expresan varios genes importantes como el del TGF- β ; por lo tanto, estas líneas celulares se usan para estudiar los efectos de la ruta del TGF- β sobre el crecimiento celular (MERCK, 2020). Cabe mencionar que, aunque estas células cuenten con las mismas alteraciones genéticas, tienen una morfología distinta.

De acuerdo con un informe previo (Hewitt, R., *et al.*, 2000), las células SW480 tienen una morfología epitelial con una estrecha unión intercelular, mientras que las células SW620 tienen una apariencia de fibroblastos (Hewitt, R., *et al.*, 2000; Ji, H., *et al.*, 2013). Además, las células SW620 en comparación con las células SW480 exhiben una expresión elevada de la oncoproteína Met relacionada con la invasión y la metástasis (Stein, U., *et al.*, 2009). Por otro lado, las células SW480 expresan un mayor nivel de glucoproteína CD44 de superficie celular, implicada en la adhesión y migración celular (Kim, H., *et al.*, 2004). De acuerdo con reportes previos (Hewitt, R., *et al.*, 2000; Ji, H., *et al.*, 2013), las células SW480 muestran una mayor capacidad migratoria y adhesiva, mientras que las SW620 muestra una capacidad invasiva y un crecimiento proliferativo independiente del anclaje relativamente mayor. Por lo tanto, las células SW480 y SW620 muestran características compatibles con la etapa temprana (primaria) y tardía (metastásica) del cáncer, respectivamente. Tanto las células SW480 como

las SW620 cuentan con inestabilidad cromosómica; sin embargo, la diferencia epigenética que se presente entre estas células es que las células SW620 tienen el fenotipo metilador de islas CpG, pero no las células SW480 (Ahmed, D., et al., 2013).

Uno de nuestros objetivos principales es estudiar los mecanismos de secreción de la citocina TGF- β en EV por las células de CRC. En la **tabla 2** y en las **Figuras 12** y **13** se resume la información recabada sobre la vía de señalización del TGF- β en las células SW480 y SW620. Adicionalmente, en cada esquema se muestran las vías de señalización no canónicas que se activan en tales líneas celulares, según los diversos estudios que se han realizado.

Tabla 2. Expresión de los componentes de la vía de señalización del TGF- β en las líneas celulares SW480 y SW620

Ligandos	Línea celular SW480	Línea celular SW620
TGF- β	Alta concentración (2.50 ± 0.12 ng/mL) (de la Mare, A., Jurgens, T., y Edkins, A., 2017)	Alta concentración (2.12 ± 0.05 ng/mL) (de la Mare, A., Jurgens, T., y Edkins, A., 2017)
Ligandos inactivos		
LAP-TGF- β intracelular	Menor concentración en comparación con la línea celular SW620 (de la Mare, A., Jurgens, T., y Edkins, A., 2017; Gasior, K., et al. 2019)	Alta concentración (de la Mare, A., Jurgens, T., y Edkins, A., 2017)
LAP-TGF- β extracelular	Alta concentración (Lu, M., et al., 2002)	No se ha reportado en la literatura
Receptores		
T β RI	Receptor funcional y expresión elevada (de la Mare, A., Jurgens, T., y Edkins, A., 2017)	Receptor funcional y expresión elevada (de la Mare, A., Jurgens, T., y Edkins, A., 2017)
T β RII	Receptor funcional y expresión elevada (de la Mare, A., Jurgens, T., y Edkins, A., 2017)	Receptor funcional y expresión elevada (de la Mare, A., Jurgens, T., y Edkins, A., 2017)
T β RIII	Receptor funcional y expresión elevada (Gatza, C., et al., 2011)	Receptor funcional y expresión elevada (Gatza, C., et al., 2011)
Endogлина	La expresa (Li, P., et al., 2014)	No se ha reportado en la literatura
BMPRIA	Expresión normal y es funcional	No se ha reportado en la

	(Beck, S., <i>et al.</i> , 2006)	literatura
BMPR2	Expresión normal y es funcional (Kodach, L., <i>et al.</i> , 2008)	No se ha reportado en la literatura
Proteínas SMAD		
SMAD1/pSMAD1	La expresa y es funcional (Gatza, C., <i>et al.</i> , 2011)	La expresa y es funcional (Gatza, C., <i>et al.</i> , 2011)
SMAD2/pSMAD2	La expresa y es funcional (de la Mare, A., Jurgens, T., y Edkins, A., 2017)	La expresa en mayor proporción que la línea SW480 y es funcional (de la Mare, A., Jurgens, T., y Edkins, A., 2017)
SMAD3/pSMAD3	La expresa y es funcional (de la Mare, A., Jurgens, T., y Edkins, A., 2017)	La expresa en mayor proporción que la línea SW480 y es funcional (de la Mare, A., Jurgens, T., y Edkins, A., 2017)
SMAD4	No la expresa (Papageorgis, P., <i>et al.</i> , 2011; Gatza, C., <i>et al.</i> , 2011; de la Mare, A., Jurgens, T., y Edkins, A., 2017)	No la expresa (Papageorgis, P., <i>et al.</i> , 2011; Gatza, C., <i>et al.</i> , 2011; de la Mare, A., Jurgens, T., y Edkins, A., 2017)
SMAD5/pSMAD5	La expresa y es funcional (Gatza, C., <i>et al.</i> , 2011)	La expresa y es funcional (Gatza, C., <i>et al.</i> , 2011)
SMAD7	La expresa (Qin, F., <i>et al.</i> , 2020)	No se ha reportado en la literatura
SMAD9/pSMAD9	La expresa y es funcional (Gatza, C., <i>et al.</i> , 2011)	La expresa y es funcional (Gatza, C., <i>et al.</i> , 2011)
Vías de señalización independientes de las SMAD		
p38	Activación (Gatza, C., <i>et al.</i> 2011)	Activación (Papageorgis, P., <i>et al.</i> , 2011; Gatza, C., <i>et al.</i> 2011)
Erk1/2	Activación (Ayinde, O., Wang, Z., y Griffin, M. 2017)	Activación (Papageorgis, P., <i>et al.</i> , 2011)
PI3K	Activación (Yan, W., Liu, Z., Yang, W. y Wu, G., 2018).	Activación (Yan, W., Liu, Z., Yang, W. y Wu, G., 2018).
ROCK1	No se ha reportado en la literatura	Activación (Asiri, A., <i>et al.</i> , 2019).

Con los resultados obtenidos, se infiere que la vía de señalización del TGF- β es funcional, tanto en la línea celular de cáncer colorrectal SW480, como en la SW620; además, estas células responden al ligando TGF- β y son capaces de sintetizar y secretar a dicho ligando en concentraciones elevadas, aunque la línea celular SW480 es capaz de secretar un poco más de cantidad (aproximadamente

2.5 ng/mL) en comparación con la línea celular SW620 (aproximadamente 2 ng/mL), pero la línea celular SW620 cuenta con más TGF- β citosólico, en comparación con la línea celular SW480. No obstante, al encontrarse mutado o ausente un componente de la vía, en este caso la proteína SMAD4, además de la sobreexpresión de los receptores de tipo I, II y III para el TGF- β , y de la expresión de endoglin (que solo se estudió en las células SW480), se observa una activación de las vías de señalización no canónicas, independientes de las proteínas SMAD, como, por ejemplo, p38, Erk1/2, PI3K y ROCK (esta vía para el caso de las células SW620), ocasionando que se produzcan diversos efectos celulares relacionados con la progresión y mantenimiento del cáncer colorrectal, como son: EMT, proliferación, migración, invasión, inhibición de la apoptosis y resistencia a la inhibición del crecimiento. Sin embargo, el aumento de los niveles de las proteínas SMAD2/3, tanto a nivel nuclear como citoplasmático, en las células SW620, podría indicar que la vía puede estar constitutivamente activa en la línea celular derivada de metástasis.

En un estudio realizado por Papageorgis y colaboradores, se mostró un aumento de la activación de las vías MEK-Erk y p38-MAPK mediada por TGF- β , combinada con la pérdida de SMAD4 (Papageorgis, P., *et al.*, 2011). En sus estudios también encontraron que la inactivación de SMAD4 en las células de cáncer de colon mejoran sus propiedades migratorias e invasivas, en acuerdo con un informe previo que muestra que la restauración de la expresión de SMAD4 revirtió el fenotipo invasivo de las células de cáncer de páncreas (Duda, D., *et al.*, 2003).

En un estudio llevado a cabo por Yan y colaboradores, la reexpresión de SMAD4 inhibió la migración e invasión celular en las células SW480 y SW620, que es independiente de la vía canónica de TGF- β . La reexpresión de Smad4 aumentó la expresión de E-cadherina (E-cad) y disminuyó la expresión de Vimentina (Vim) y de la metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9). La restauración de SMAD4 da como resultado una marcada disminución de Vim al inhibir p-AKT, pero aumentó significativamente la expresión de E-cad por la vía de AKT en células SW480 de cáncer de colon. Se obtuvo el mismo fenómeno en células SW620 de cáncer de

colon después de la reexpresión estable de SMAD4 (Yan, W., Liu, Z., Yang, W. y Wu, G., 2018).

En otro estudio realizado por Asiri y colegas, encontraron que en las células SW620, la estimulación con TGF- β 1 se asoció con un aumento en los niveles de expresión de las proteínas ROCK1, Src, Snail y N-cadherina, mientras que la expresión de E-cadherina se inhibió. La migración celular, la invasión y la proliferación aumentaron cuando las células se trataron con TGF- β 1 (la proteína recombinante humana) en comparación con el control no tratado (Asiri, A., *et al.*, 2019).

Estas investigaciones indican que existen diferencias clave en la vía de señalización del TGF- β entre estas dos líneas celulares de CCR. En particular, la línea celular de tumor primario presentó un nivel más alto del TBR11, mientras que la línea celular metastásica mostró un nivel más alto de la citocina en el citoplasma. El hallazgo de que las células SW620 expresen un nivel más bajo del TBR11 en comparación con las células SW480, concuerda con la información reportada en donde se ha demostrado que un nivel bajo de los receptores, tanto receptor de tipo I como de tipo II, se correlaciona con la progresión de la enfermedad (Fukai, Y., *et al.*, 2003) y niveles elevados de TGF- β 1, se correlacionan con un incremento en la metástasis y la invasión (Elliott, R., y Blobe, G., 2005). Así mismo, las mutaciones o deleciones de SMAD4 también se han correlacionado directamente con la metástasis del CCR. Diversos estudios han sugerido que la pérdida del cromosoma 18q es un evento muy importante durante la carcinogénesis o progresión del CCR y que la proteína supresora de tumores, la SMAD4, es el blanco principal para la inactivación (Fearon, E., y Vogelstein, B., 1990; Thiagalingam, S., *et al.*, 1996). Se ha reportado que la ausencia de esta SMAD elimina de forma selectiva solamente el efecto supresor de tumores de la vía del TGF- β , lo que provoca que esta citocina active preferentemente a las vías de señalización independientes de las SMAD, las cuales contribuyen al mantenimiento y progresión tumoral (Zhang, B., *et al.*, 2010).

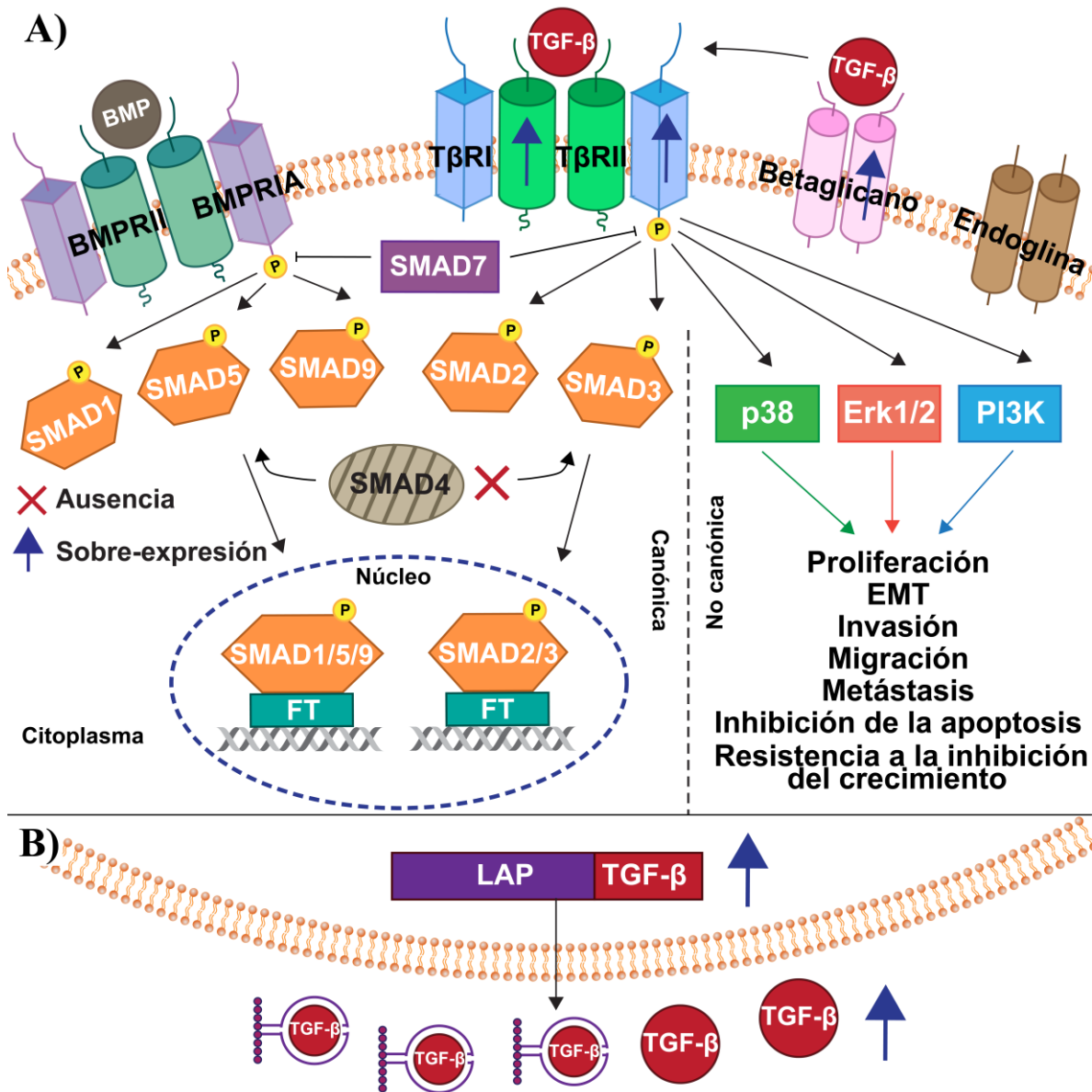


Figura 12. La vía de señalización de la citocina TGF- β en la línea celular de cáncer colorrectal SW480

A) Vías canónicas y no canónicas del TGF- β . Se muestra cuáles componentes de la vía canónica se expresan, así como aquellas vías no canónicas que se activan cuando estas células son tratadas con TGF- β . **B)** Secreción de TGF- β . Esta citocina se encuentra en su forma latente tanto a nivel de citoplasma, como en su forma secretada, así como en su forma madura en el medio extracelular. Las flechas azules indican que el componente está sobreexpresado y las "x" rojas indican que en el componente indican que está ausente.

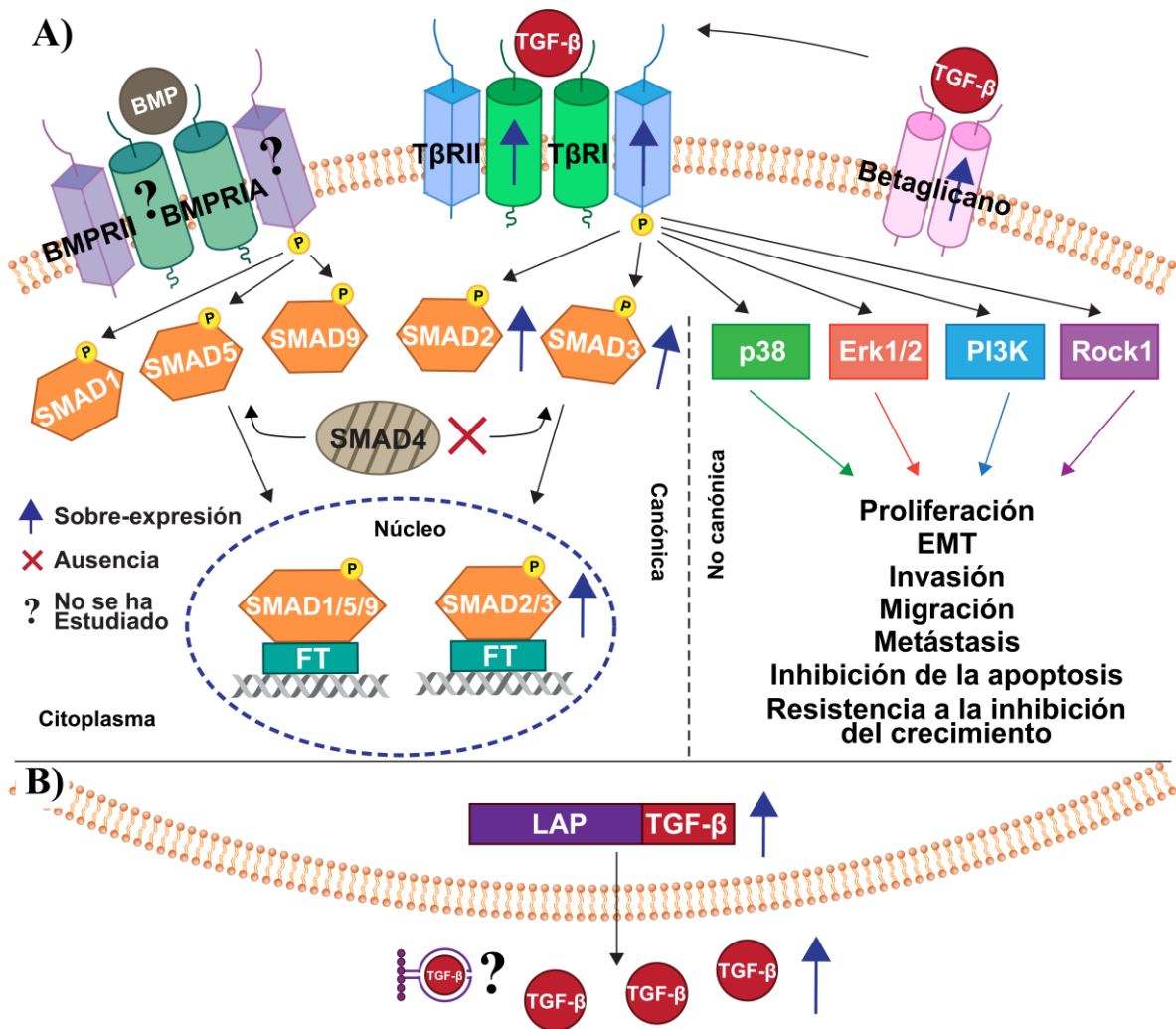


Figura 13. La vía de señalización de la citocina TGF-β en la línea celular de cáncer colorrectal SW620

A) Vías canónicas y no canónicas del TGF-β. Se muestra cuáles componentes de la vía canónica se expresan, así como aquellas vías no canónicas que se activan cuando estas células son tratadas con TGF-β. **B)** Secreción de TGF-β. Esta citocina se encuentra en su forma latente tanto a nivel de citoplasma, así como en su forma madura en el medio extracelular. Las flechas azules indican que el componente está sobreexpresado, las franjas rojas con una “x” en el componente indican que está ausente y “?” indica que no se ha estudiado al componente.

7.3 Acciones de la citocina TGF-β en las líneas celulares de cáncer colorrectal SW480 y SW620.

Las líneas celulares de cáncer colorrectal SW480 y SW620 son responsivas a los efectos protumorales de la citocina TGF- β , ya que su vía de señalización es funcional, por lo cual se ha encontrado que al incubar a estas células con la citocina, se indujeron la migración, la inhibición del arresto celular, la EMT y la expresión de diversos factores de transcripción (Gatza, C., *et al.* 2011; Ayinde, O., Wang, Z., y Griffin, M. 2017; Yan, W., Liu, Z., Yang, W. y Wu, G. 2018; Asiri, A., *et al.* 2019; Zhang, L., *et al.*, 2019; Zhu, S., *et al.* 2019; Li, Q., *et al.*, 2020; Xiao, J., *et al.*, 2020) (**Figura 14**). De manera interesante, se ha encontrado que al comparar la vía canónica del TGF- β 1 entre estas líneas celulares, las cuales tienen perfiles de mutación idénticos, se ha sugerido que esta vía puede estar constitutivamente activa en las células SW620 y no en las células SW480 (de la Mare, A., Jurgens, T., y Edkins, A., 2017).

La ausencia de SMAD4 en los tumores podría inhibir específicamente el efecto supresor tumoral del TGF- β , sin modificar sus actividades promotoras tumorales, actuando por lo tanto para provocar que las células tumorales estimuladas con TGF- β adquieran un fenotipo más agresivo (Levy, L., y Hill, Caroline., 2005).

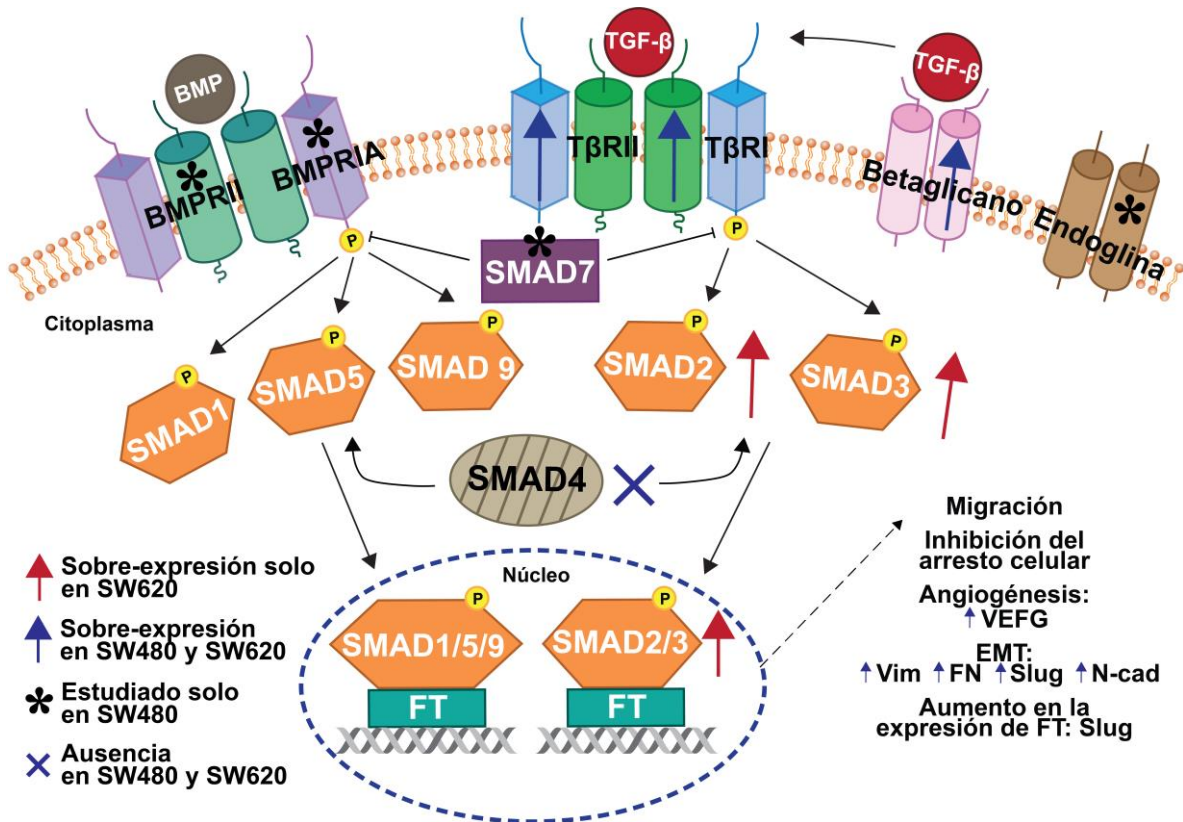


Figura 14. La vía de señalización canónica del TGF-β y sus efectos biológicos en las líneas celulares de cáncer colorrectal SW480 y SW620

La citocina TGF-β ejerce varios efectos biológicos a través de la vía dependiente de las SMADs en las células SW480 y SW620. Estos efectos incluyen la migración, la inhibición del arresto del ciclo celular, la angiogénesis, la EMT y el aumento en la expresión de factores de transcripción (FT). La flecha hacia arriba indica sobre-expresión del componente, las “x” indican ausencia del componente y los “?” indican que no se ha estudiado el componente. Las flechas y “x” azules aplican para ambas líneas celulares SW480 y SW620, las flechas y “?” rojos aplican para la línea celular SW620 y “*” indica que aplican para la línea celular SW480.

7.4 Efecto de fármacos en los componentes de la vía del TGF-β en las líneas celulares de cáncer colorrectal SW480 y SW620.

En algunos de los artículos analizados se usaron algunos fármacos para regular la vía del TGF-β, dada la relevancia que tienen sus acciones pro-tumorales. La información recabada se resume en la **tabla 3**.

Tabla 3. Efecto de fármacos en los componentes de la vía del TGF- β en las líneas celulares de cáncer colorrectal SW480 y SW620

Fármaco	Blanco molecular	Línea celular SW480	Línea celular SW620
Celastrol (Jiang, Z., <i>et al.</i> , 2019)	Potencial acción terapéutica en el cáncer (Lin, L., <i>et al.</i> 2015). Modula la expresión de citocinas proinflamatorias (He, W., <i>et al.</i> , 1998) y la supresión de EMT (Lin, L., <i>et al.</i> 2015). Algunos de sus efectos regulan al TGF- β , en la EMT.	No se estudió el efecto de este fármaco en esta línea celular.	Inhibió los niveles de expresión de TGF- β , T β RI, T β RII y Smad2.
MnTE-2-PyP (Yang, Y., <i>et al.</i> , 2019)	Suprime el crecimiento tumoral a través de efectos antiangiogénicos a nivel de la vasculatura tumoral (Rabbani, Z., <i>et al.</i> , 2009). Puede revertir el proceso de EMT por medio de la vía del TGF- β .	En presencia de TGF- β recombinante, suprimió los niveles de expresión de pSMAD2/3.	No se estudió el efecto de este fármaco en esta línea celular.
Honokiol (Li, Q., <i>et al.</i> , 2020)	Efectos antitumorales, antioxidantes, antivirales y antiinflamatorios (Banik, K., <i>et al.</i> , 2019). Este estudio se centró en dilucidar los efectos de la HNK en la expresión del TGF- β 1 en el cáncer de colon.	No se estudió el efecto de este fármaco en esta línea celular.	Aumentó la expresión de TGF- β 1. No afectó la expresión de pSMAD1/2/3/5/9. En presencia de BMP7 recombinante, aumentó la expresión de TGF- β 1.
PEITC (isotiocianato de fenetilo) (Xiao, J., <i>et al.</i> , 2020)	PEITC se dirige a múltiples proteínas y suprime los eventos que promueven el cáncer, como la proliferación celular, la apoptosis y la metástasis (Aggarwal, M., <i>et al.</i> , 2019). En el trabajo se estudió el efecto de PEITC sobre la metástasis de CCR asociada con EMT (esto a través de la vía del TGF- β).	Disminuyó los niveles de TGF- β 1 y p-SMAD2/3. En presencia de TGF- β 1 recombinante, disminuyó los niveles de TGF- β 1 y p-SMAD2/3.	No se estudió el efecto de este fármaco en esta línea celular.

Todos los fármacos empleados en los diferentes estudios con las líneas celulares de cáncer colorrectal, SW480 y SW620, son capaces de inhibir, alterar o

modular a diversas vías de señalización, así como a biomoléculas y genes que se encuentran relacionados con la proliferación celular, el crecimiento celular, la apoptosis, la angiogénesis, la migración, la invasión y la inflamación, así como también son capaces de regular procesos relacionados con las células cancerosas como son la metástasis y la progresión tumoral, entre otros. Por tales razones, se utilizaron estos fármacos en las células antes mencionadas, para evaluar si eran capaces o no de combatir al cáncer colorrectal y lo que se encontró fue que cada fármaco provocó una respuesta en dichas células al alterar, ya sea a algún componente de la vía de señalización del TGF- β o algún proceso tumoral.

El celastrol regula negativamente la expresión de Snail, inhibiendo así la EMT inducida por el TGF- β 1 en las células MDCK y A549 (Kang, H., *et al.*, 2013). En fibroblastos colorrectales y prostáticos normales se observó el efecto del fármaco MnTE-2-PyP sobre las proteínas SMAD2/3 (Kosmacek, E., *et al.* 2016). El honokiol inhibe la EMT en cáncer colorrectal actuando sobre la vía del TGF- β /SMAD (Avila-Carrasco, L., *et al.*, 2019). En otro estudio, el PEITC promovió una fuerte inhibición de la metástasis al bloquear la vía TGF- β /SMAD2, lo cual conduce a la inhibición de la expresión de genes relacionados con la metástasis en células HeLa (Zhang, L., *et al.*, 2014).

7.5 Vesículas extracelulares secretadas por las líneas celulares de cáncer colorrectal SW480 y SW620.

Durante la investigación se encontraron varios artículos enfocados en el estudio de las EV secretadas por las células SW480 y SW620. Los datos reportados están resumidos en la **tabla 4** y en las **Figuras 15, 16 y 17**.

Tabla 4. Efectos biológicos sobre células blanco ocasionados por las EV secretadas por las líneas celulares de cáncer colorrectal SW480 y SW620.

Célula blanco	EV de la línea celular SW480	EV de la línea celular SW620
Monocito	Contacto temprano – día 1: polarización mixta a Macrófago M1/M2 con secreción de Il-10, además de expresión de CD206 y	Contacto temprano – día 1: polarización mixta a Macrófago M1/M2 con secreción de Il-10, además de expresión de

	HLA-DR. Contacto tardío – día 6: secreción de intermediario de oxígeno reactivo, TNF, IL-12, además de expresión de CD86 y exhibir citotoxicidad (Baj, M., <i>et al.</i> , 2016).	CD206 y HLA-DR. Contacto tardío – día 6: secreción de intermediario de oxígeno reactivo, TNF, IL-12, además de expresión de CD86 y exhibir citotoxicidad (Baj, M., <i>et al.</i> , 2016).
Monocito THP1	Incremento en la proliferación, aumento en la expresión de CXCL10 y secreción de TNF- α e IL-1 β (Popēna, I., <i>et al.</i> , 2018).	Incremento en la proliferación (Popēna, I., <i>et al.</i> , 2018).
Macrófago M0	Incremento de la proliferación, aumento en la expresión de CD14 y CXCL10 (Popēna, I., <i>et al.</i> , 2018).	Ligera citotoxicidad, aumento en la expresión de CD14, CXCL10 y secreción de IL-6, IL-23 e IL-10 (Popēna, I., <i>et al.</i> , 2018).
Macrófago M1	Disminución en la expresión de HLA-DR (Popēna, I., <i>et al.</i> , 2018).	Ligera citotoxicidad (Popēna, I., <i>et al.</i> , 2018).
Macrófago M2	Disminución de la expresión de HLA-DR (Popēna, I., <i>et al.</i> , 2018).	Aumento en la secreción de IL-23 (Popēna, I., <i>et al.</i> , 2018).
Fibroblasto neoHFF	Activación de fibroblastos en fibroblastos similares a fibroblastos asociados a cáncer. Expresión elevada de proteínas pro-angiogénicas (IL-8, RAB10, NDRG1) y pro-proliferativas (SA1008, FFPS) (Rai, A., <i>et al.</i> , 2018).	Activación de fibroblastos en fibroblastos similares a fibroblastos asociados a cáncer. Regulación positiva de los reguladores proinvasivos de la protrusión de la membrana (PDLIM1, MYO1B) y la secreción elevada de proteínas remodeladoras de la matriz (MMP11, EMMPRIN, ADAM10) (Rai, A., <i>et al.</i> , 2018).
CRC SW480	Las EV hipóxicas derivadas de esta línea celular estimularon la motilidad e invasividad de las células SW480 (Endzelins, E., <i>et al.</i> , 2018).	No se estudió el efecto de estas EVs sobre esta línea celular (Endzelins, E., <i>et al.</i> , 2018).
CRC SW620	No se estudió el efecto de estas EVs sobre esta línea celular (Endzelins, E., <i>et al.</i> , 2018).	Las EV hipóxicas derivadas de esta línea celular no tuvieron efecto significativo sobre las células SW620 (Endzelins, E., <i>et al.</i> , 2018).

En la **tabla 4** y en las **Figuras 15 y 16** se muestran los diferentes efectos biológicos ocasionados por tales EV de células de cáncer colorrectal sobre distintas células.

Los resultados de estas investigaciones muestran que las EVs derivadas de las células de CCR, SW480 y SW620, desempeñan un papel fundamental en la facilitación de la carcinogénesis a través de la regulación de la inmunidad, la proliferación, la angiogénesis, la motilidad, la invasión y la metástasis, al influir en las propiedades de diferentes células blanco, como son: monocitos, macrófagos, fibroblastos e inclusive con las mismas líneas celulares de CCR. Estas evidencias destacan la importancia y el impacto que las Evs generan en la comunicación célula-célula en el microambiente tumoral del CCR.

En la **Figura 17** se muestran a las proteínas que se tienen en común los exosomas provenientes de las células SW480 y de las SW620, pero también se presentan a aquellas que son únicas de cada subpoblación de estas vesículas, tal y como se reportaron en los estudios proteómicos realizados en estas EVs. Lo mismo ocurre para el caso de las microvesículas secretadas por tales células. Estos estudios proteómicos demuestran que estas subpoblaciones de EVs tienen sus propias firmas de proteínas que distinguen a una subpoblación de otra, ya que estas EVs están enriquecidas con biomoléculas con funciones biológicas correspondientes con sus respectivos estadios en la carcinogénesis colorrectal (Choi, D., *et al.*, 2012; Ji, H., *et al.*, 2013; Suwakulsiri, W., *et al.*, 2019).

Como un dato interesante, en la tesis de maestría (datos no publicados) elaborada por Liu Lin en la Universidad de Melbourne, Australia (2015), se estudió la secreción de exosomas portadores de la citocina TGF- β y se encontró que la línea celular metastásica SW620 produjo niveles más altos de TGF- β en exosomas, en comparación con la línea celular SW480 de tumor primario, dichos niveles fueron medidos a través de la técnica de ELISA. Dado el papel del TGF- β en la progresión del cáncer, los niveles diferenciales de TGF- β en exosomas entre la célula cancerosa altamente metastásica y la línea celular de tumor primario, se sugiere que los niveles de TGF- β en exosomas reflejan el potencial metastásico de las células tumorales (Liu, L., Tesis del 2015). Sin embargo, a la fecha no hay datos publicados de la presencia de TGF- β en las EVs derivadas de las células SW480 o SW620.

La importancia de estos estudios radica en que aumenta la comprensión de la función patológica de las EVs en los procesos tumorales, como, la proliferación, invasión y metástasis, y proporciona biomarcadores útiles y diseño de terapias específicas para el cáncer colorrectal (Choi, D., *et al.*, 2012; Ji, H., *et al.*, 2013; Suwakulsiri, W., *et al.*, 2019).

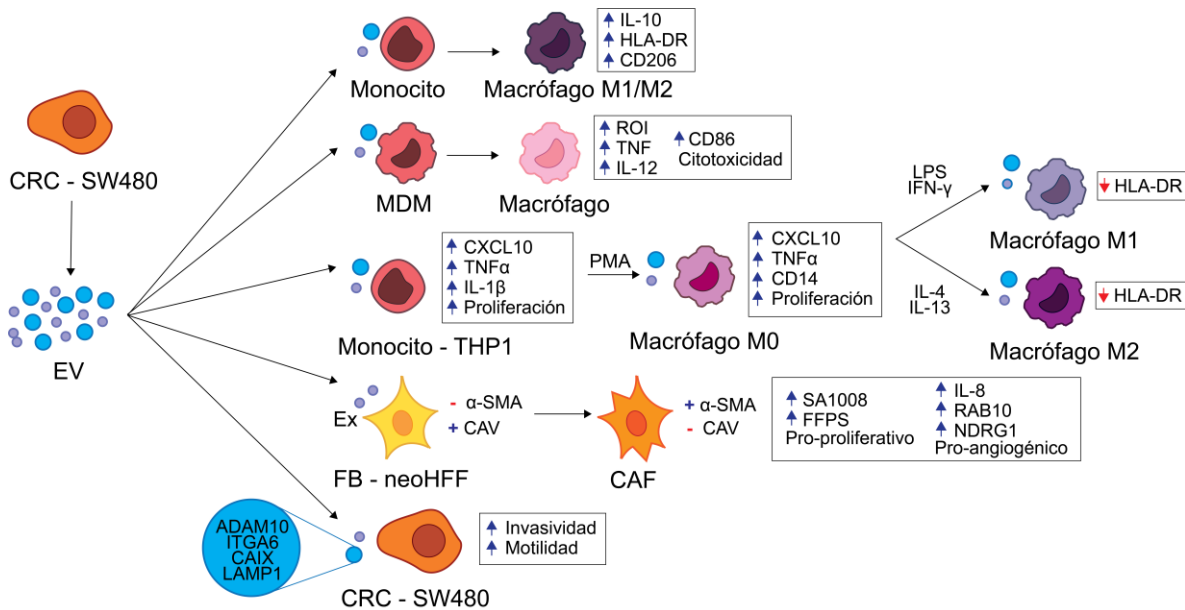


Figura 15. EVs secretadas por la línea de cáncer colorrectal SW480.

Respuestas biológicas de células diana inducidas por EVs. Las EVs de la línea celular SW480 derivada de un tumor primario de CCR ocasionan la sobreexpresión de diferentes moléculas en varias células blanco, lo cual genera varias respuestas biológicas relacionadas con el establecimiento y progresión del cáncer en esas células blanco. Las EVs incubadas con las células SW480, provocaron invasividad y motilidad en dichas células. Las flechas azules apuntando hacia arriba indican sobre-expresión, mientras que las flechas rojas apuntando hacia abajo indican una regulación negativa en la expresión.

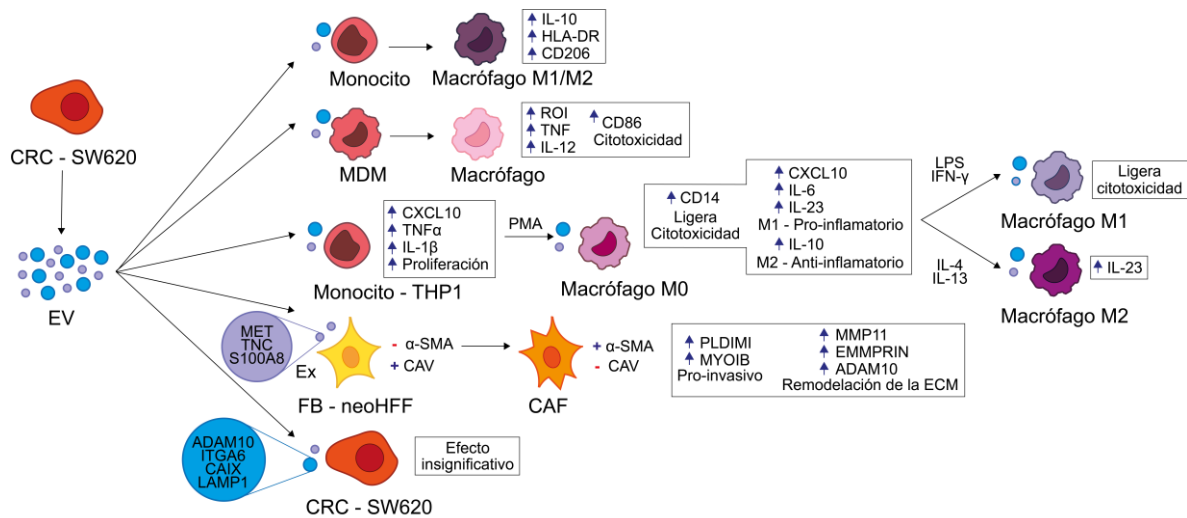
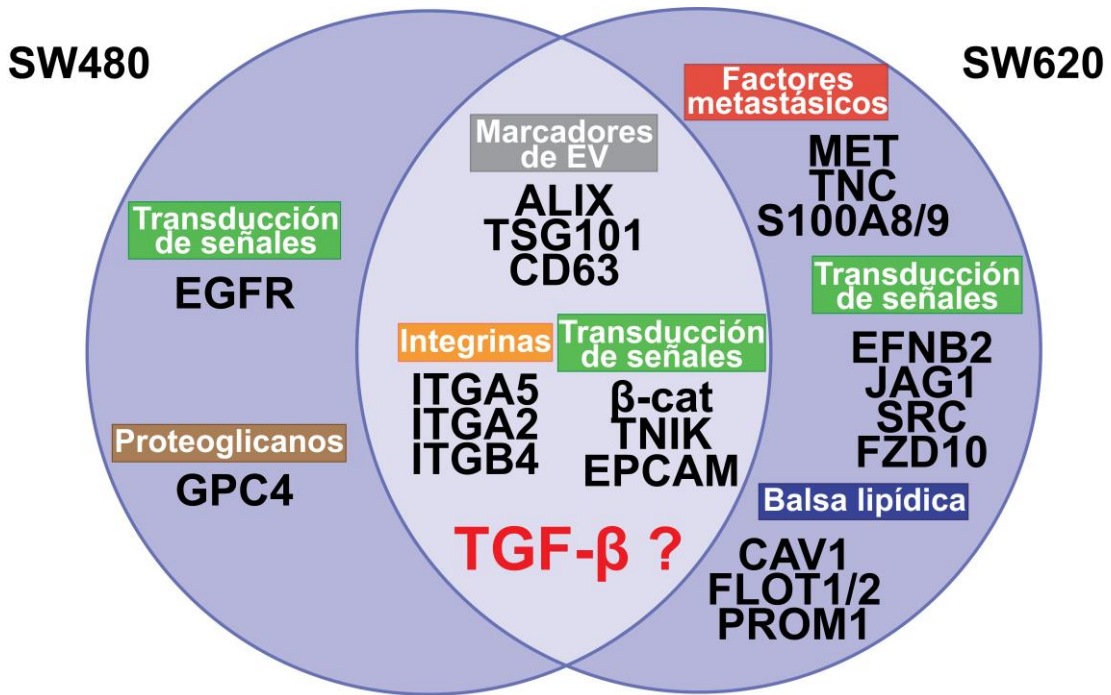
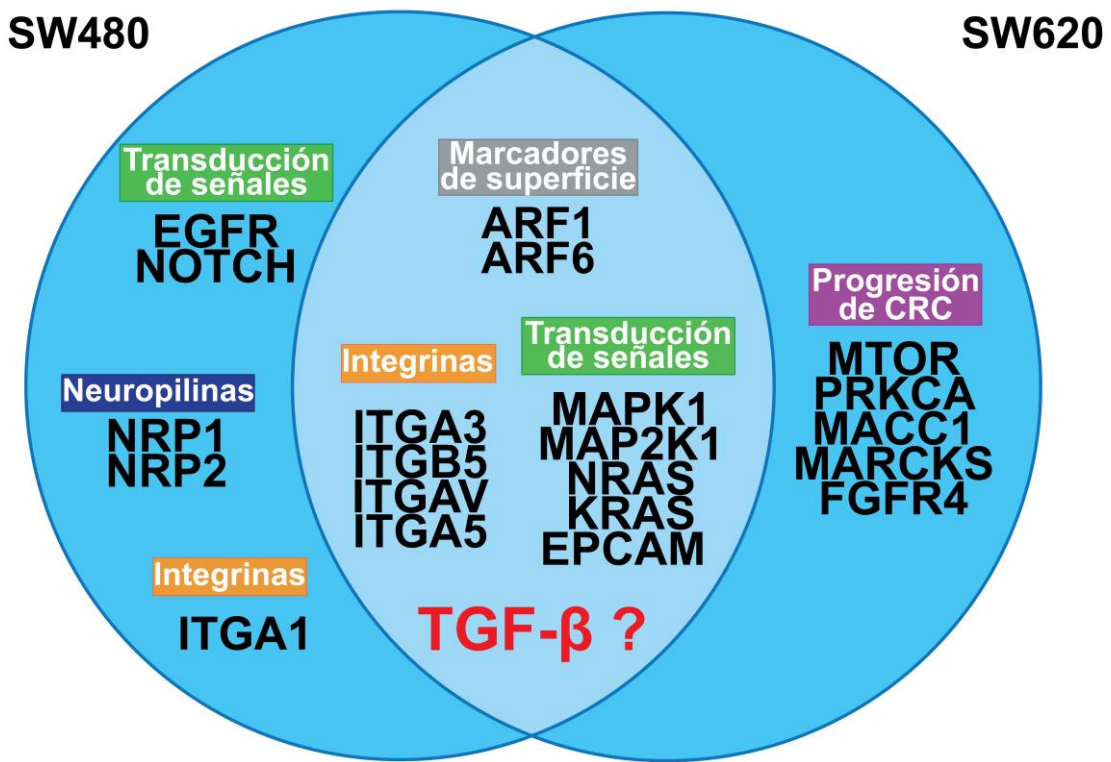


Figura 16. EVs secretadas por la línea de cáncer colorrectal SW620.

Respuestas biológicas de células diana inducidas por EVs. Las EVs de la línea celular SW620 derivada de un tumor metastásico de CCR ocasionan la sobreexpresión de distintas moléculas en diversas células blanco, lo cual produce diversos efectos biológicos asociados con la metástasis y progresión tumoral en las células blanco. Las EV que fueron incubadas con las células SW620, no provocaron ningún efecto significativo. Las flechas azules apuntando hacia arriba indican sobre-expresión, mientras que las flechas rojas apuntando hacia abajo indican una regulación negativa en la expresión.



Exosoma



Microvesícula

Figura 17. Carga molecular de exosomas y microvesículas secretados(as) por las líneas celulares SW480 y SW620.

En los exosomas, se muestran aquellas biomoléculas que se expresan en ambas líneas celulares, pero también se presentan aquellas que son únicas para cada línea celular. Lo mismo sucede con las microvesículas. El TGF- β está indicado en rojo y con signos “?” porque aun no se ha reportado en artículos de investigación si está contenido en exosomas de estas líneas celulares.

7.6 Las células SW480 y SW620 como modelo biológico para estudiar la biogénesis de las vesículas extracelulares cargadas con la citocina TGF- β

Hasta el momento, no se ha reportado en la literatura la presencia del TGF- β , ni de algún componente de su vía de señalización en EVs provenientes de las células SW480 y SW620, pero se sabe que estas células si son capaces de expresar a la citocina y a los correceptores betaglicano y endogлина (hasta el momento solo se ha reportado la expresión de este componente para las células SW480). Por lo que se hipotetiza que estas EVs podrían portar en su carga molecular a la citocina TGF- β , pero ésta molécula podría encontrarse unida a los correceptores antes mencionados, en la superficie de tales EVs. Además, es posible que los correceptores tengan alguna PTM, como la N-glicosilación, que dirija su distribución hacia EVs. En la **Figura 18** se muestra un modelo hipotético de secreción de la citocina por medio de estas EVs provenientes de células de CRC.

Para comprobar el modelo hipotético mediante un estudio experimental de estas EVs y comprobar que entre su carga molecular se encuentran las biomoléculas antes mencionadas como el TGF- β y sus correceptores, se propone emplear las siguientes técnicas de laboratorio:

- 1) Aislamiento de las EVs por medio de ultracentrifugación diferencial del medio condicionado obtenido de las células SW480 y SW620.
- 2) Identificación de biomarcadores de EVs (TSG101, Alix, CD63), así como de TGF- β y sus correceptores en EVs, a través de Western Blot.

- 3) Caracterización de EVs por medio de su observación morfológica por microscopia electrónica de transmisión y análisis de distribución de tamaño por rastreo de nanopartículas.
- 4) Cuantificación del TGF- β y de sus correceptores en las EVs mediante ELISA o citometría de flujo, antes y después de transfectar a las células con siRNA dirigidos hacia betaglicano y endogлина.
- 5) Tratamiento de las células SW480 y SW620 con tunicamicina, castanospermina o kifunensina (inhibidores de la N-glicosilación) y posteriormente realizar la identificación de los correceptores en las EVs a través de Western Blot.

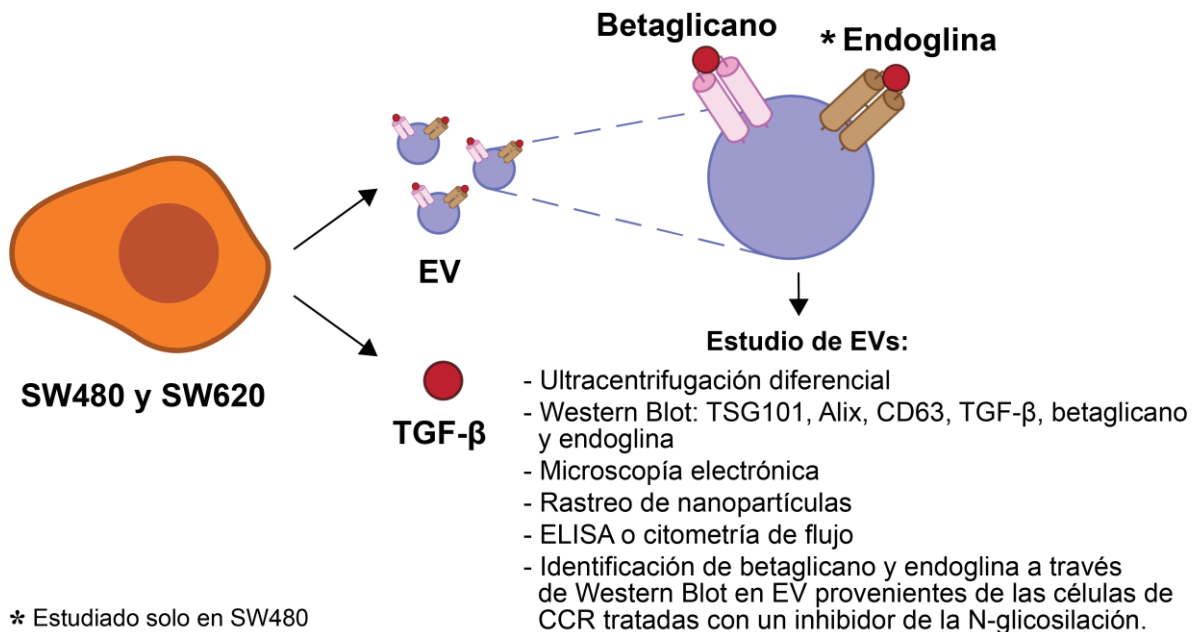


Figura 18. Modelo hipotético de secreción de TGF- β mediante EVs provenientes de las células SW480 y SW620

Las células SW480 y SW620 son capaces de secretar a la citocina TGF- β en forma soluble y en la superficie de EVs, pero en este último caso, siendo portada por biomoléculas, como betaglicano y endogлина. Las metodologías mencionadas y propuestas aquí son las que comúnmente se utilizan para el análisis de EVs.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El TGF- β es una de las citocinas reguladoras más importantes en el desarrollo del cáncer. Esta biomolécula cuenta con un papel pleiotrópico dependiendo del contexto celular. Durante la carcinogénesis, las células de cáncer colorrectal pierden la sensibilidad a los efectos supresores de tumores por parte del TGF- β , lo cual ocasiona un cambio en su actividad supresora de tumores hacia una actividad promotora de tumores y esto es resultado de la pérdida de la SMAD4, así como por otras alteraciones genéticas en las células de cáncer colorrectal, SW480 y SW620. Esto conduce al crecimiento de las células cancerosas, la invasión, la EMT, la metástasis y la evasión de la vigilancia del sistema inmune, además de que se activan vías de señalización independientes de las SMAD que contribuyen con la progresión tumoral. Esta citocina puede ejercer dichos efectos biológicos encontrándose de forma soluble en el medio extracelular o contenida en EVs. Se ha visto que el TGF- β , encontrado en EVs provenientes de varias células de diferentes tipos de cáncer, es capaz de activar la vía de señalización dependiente de las Smad, ejerciendo de tal manera diversos efectos biológicos sobre varias células diana y relacionados con la tumorigénesis.

Las EVs generadas por las células cancerosas y su carga molecular funcionan como una forma de comunicación intercelular, ya que pueden transferirse a otras células cancerosas, así como a células sanas lo cual provoca que las células receptoras experimenten cambios fenotípicos que promueven diferentes aspectos de la progresión del cáncer, como favorecer el crecimiento y la supervivencia celular, lo cual contribuye a la remodelación del microambiente tumoral e incrementa la actividad invasiva y metastásica de las células cancerosas.

8.1 Las células SW480 y SW620 como modelo biológico para estudiar la biogénesis de las EV cargadas con la citocina TGF- β

Existe clara evidencia sobre la presencia de la citocina TGF- β en EVs provenientes de diferentes tipos de células cancerosas (Gu., J., *et al.* 2012; Szczepanski, M., *et al.*, 2011; Hong, C., *et al.*, 2014; Languino, L., *et al.*, 2016; Yamada, N., *et al.*, 2016; Yen, E., *et al.*, 2017; Ringuette, C., *et al.*, 2018; Döchler,

M., *et al.*, 2019; Zhao, J., *et al.*, 2019) y que esta citocina puede ser portada por biomoléculas, como el betaglicano (Webber, J., *et al.*, 2010) y proteoglicanos de heparan sulfato (Shelke, G., *et al.* 2019), sobre la superficie de EVs. Además, se sabe que las células SW480 y SW620 son capaces de sintetizar y secretar al TGF- β (Lu, M., *et al.*, 2002; de la Mare, A., Jurgens, T., y Edkins, A., 2017; Gasior, K., *et al.* 2019), así como de expresar a biomoléculas portadoras, como el betaglicano (Gatza, C., *et al.*, 2011) y la endoglina (solo en SW480) (Li, P., *et al.*, 2014); sin embargo, hasta el momento no se ha reportado la presencia del TGF- β en dichas EV (Choi, D., *et al.*, 2012; Ji, H., *et al.*, 2013; Suwakulsiri, W., *et al.*, 2019), por lo tanto en esta tesis se propuso un modelo hipotético en donde el TGF- β podría ser encontrado en EV provenientes de las células SW480 y SW620 y en las cuales ésta citocina podría estar unida a los correceptores de la superfamilia del TGF- β , como el betaglicano o la endoglina.

Cabe mencionar que hay que tener en cuenta que se pueden presentar problemas técnicos en la detección del TGF- β en las EVs. En estudios previos, en los análisis proteómicos de EVs provenientes de las células SW480 y SW620 (Choi, D., *et al.*, 2012; Ji, H., *et al.*, 2013; Suwakulsiri, W., *et al.*, 2019), no se ha detectado la presencia de la citocina TGF- β , posiblemente porque la cantidad de esta biomolécula contenida en las EVs es muy baja o que la mayor cantidad de TGF- β es secretada por medio de mecanismos de secreción convencionales y, por ende, no se ha logrado identificar a la citocina en las EVs con la técnica de espectrometría de masas, por limitaciones en la sensibilidad de la misma. El tipo de espectrometría de masas empleado en tales investigaciones detecta proteínas en el rango de los nanogramos (Paulo, J. 2016; ThermoFisher., 2022) y es posible que la cantidad de TGF- β en esas EVs se encuentre, por ejemplo, dentro del rango de los picogramos, es decir, está fuera del rango de lo que la espectrometría de masas puede medir o detectar. Entonces, en su lugar, se podría usar alguna técnica con mayor sensibilidad, como, por ejemplo, el ensayo de ELISA para poder detectar a la citocina en EVs, ya que el rango de detección típico para un ELISA es de 0,01 ng a 0,1 ng (Bio-Rad., 2022). Tomando en cuenta lo anterior, cabe la posibilidad de que se trate propiamente de ese método de

laboratorio, ya que las condiciones bajo las cuales se incubaron a las células SW480 y SW620 entre los diferentes estudios proteómicos realmente no variaban, es decir, usaron el mismo medio de cultivo, 5 o 10% de CO₂, 5 o 10% de suero fetal bovino o de ternera, mismo uso de antibióticos para prevenir la contaminación bacteriana, una temperatura de incubación de 37 °C, células incubadas por separado (no en co-cultivo), y no fueron estimuladas con ningún reactivo o compuesto que alterará o inhibiera la expresión o distribución de la citocina en EVs.

Asimismo, en la tesis de Liu Lin se utilizaron casi las mismas condiciones de cultivo celular que en las investigaciones de los estudios proteómicos de las EVs provenientes de las células de CCR y bajo esas condiciones experimentales empleadas en esa investigación, si se logró identificar la presencia de TGF- β en exosomas por medio de ELISA, por lo que esto es un indicativo de que las células SW480 y SW620 si son capaces de secretar EVs cargadas con la citocina (Liu, L., 2015), aunque esos datos todavía no se han reportado en ningún artículo de investigación, como ya se mencionó. Además, como un dato importante e interesante, en aquellos artículos en donde se hicieron investigaciones de la secreción de TGF- β por las células SW480 y SW620, así como también se utilizaron otras líneas celulares de CCR para evaluar la expresión de la citocina (Ayinde, O., Wang, Z., y Griffin, M. 2017; de la Mare, A., Jurgens, T., y Edkins, A., 2017; Gasió, K., *et al.* 2019; Jiang, Z., *et al.* 2019) y se observó que las condiciones de cultivo fueron bastante semejantes en comparación con aquellas empleadas en los estudios proteómicos de EVs provenientes de las células SW480 y SW620 (Choi, D., *et al.*, 2012; Ji, H., *et al.*, 2013; Suwakulsiri, W., *et al.*, 2019), por lo que se podría sugerir que son condiciones favorables u óptimas para la secreción y estudio de EVs y, por consiguiente, para identificar a la citocina en esas EVs.

El betaglicano transmembranal o receptor tipo III contiene cadenas de glucosaminoglicano (GAG) de sulfato de condroitina y sulfato de heparán unidas a dos residuos de serina vecinos, en un subdominio del dominio extracelular de la proteína (dominio huérfano). Una gran parte de este ectodominio se puede

escindir proteolíticamente y existe como una forma soluble extracelular de betaglicano (López-Casillas, F., *et al.*, 1994). El betaglicano se une con las isoformas 1, 2 y 3 de TGF- β , con una afinidad elevada y promueve la señalización de todos estos ligandos, ya que puede formar complejos con receptores tipo I y II para el TGF- β (López-Casillas, F., *et al.*, 1991; Wang, X., *et al.*, 1991; Moustakas, A., *et al.*, 1993). La función del betaglicano como correceptor positivo para los TGF- β s se ha destacado en el caso de la isoforma TGF- β 2, la cual cuenta con una baja afinidad por el dominio extracelular del receptor TGFBRII (Lin, H., *et al.*, 1995), por lo que el betaglicano media y promueve la presentación de este ligando a los receptores de la vía de señalización de manera indispensable (Stenvers, K., *et al.*, 2003).

El correceptor del TGF- β , endoglina, es una glicoproteína dimérica unida por enlaces disulfuro (Barbara, N., Wrana, J., y Letarte, M., 1999). La endoglina interviene en la vía de señalización de los receptores para los miembros de la familia de TGF- β en algunos tipos celulares (Guerrero-Esteo, M., *et al.*, 2002). En las células endoteliales, el TGF- β se acopla tanto a su receptor TGFBR1 o ALK5 tradicional como al receptor ALK1 (Goumans, M., *et al.*, 2003). La presencia de endoglina parece antagonizar la señalización del TGF- β hacia el TGFBR1 o ALK5 y promover la señalización a través del receptor ALK1 de la vía de BMP (Lebrin, F., *et al.*, 2004).

Entre la carga molecular de las EVs provenientes de las células SW480 y SW620 no se reportó la presencia de TGF- β o a algún componente de su vía de señalización; sin embargo, debido a que ambas líneas celulares si expresan a la citocina, así como a los correceptores betaglicano y endoglina (a excepción de las células SW620, ya que aún no se reporta que lo expresen), se hipotetiza que las células SW480 y SW620 utilicen a las EVs como un medio de secreción de TGF- β siendo portado por los correceptores, betaglicano o endoglina, así como se sugiere la utilización de diferentes técnicas experimentales, sugeridas en la sección de resultados, para el estudio experimental de estas EVs.

9. PERSPECTIVAS

1. La información analizada en esta tesis se utilizó para escribir un artículo de revisión, el cual será enviado para su publicación en una revista nacional especializada en el área químico-biólogo.
2. Se hipotetiza que las células SW480 y SW620 utilicen a las EVs como un medio de secreción de TGF- β siendo portado por los correceptores, betaglicano o endogлина, así como también se sugiere la utilización de algunas técnicas para el estudio experimental de estas EVs. Esta hipótesis debe ser comprobada experimentalmente.
3. La propuesta hipotética sobre el mecanismo de secreción del TGF- β por medio de EVs, contribuirá a plantear un estudio experimental sobre la presencia del TGF- β en EV unido a moléculas portadoras, secretado por las células de cáncer colorrectal, SW480 y SW620.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Admyre, C., *et al.* 2007. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol.* 179, 1969–1978
- Ahmed, D., *et al.* 2013. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis.* 2, e71
- Aggarwal, M., *et al.* 2019. p53 mutant-type in human prostate cancer cells determines the sensitivity to phenethyl isothiocyanate induced growth inhibition. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38, 307
- Ai, X., *et al.* 2013. Targeting the ERK pathway reduces liver metastasis of Smad4-inactivated colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.* 14, 1059–1067
- Aizawa, K., *et al.* 2016. Tobacco carcinogen induces both lung cancer and non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinomas in ferrets which can be attenuated by lycopene supplementation. *Int J Cancer.* 139, 1171e1181
- Akalay, I., *et al.* 2013. Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis. *Cancer Res.* 73, 2418–2427

Akhurst, R., y Hata, A. 2012. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 790–811

Alvarez, E., *et al.* 2008. Floral morphogenesis: stochastic explorations of a gene network epigenetic landscape. *PLoS One.* 3, e3626

American Type Culture Collection. 2020. SW480 [SW-480] (ATCC CCL-228). <https://www.atcc.org/products/all/CCL-228.aspx#generalinformation>

American Type Culture Collection. 2020. SW620 [SW-620] (ATCC CCL-227). <https://www.atcc.org/products/all/CCL-227.aspx#generalinformation>

Andaloussi, S., Mager, I., Breakefield, X., y Wood, M. 2013. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 347-357

Annes, J., *et al.* 2004. Integrin α V β 6 mediated activation of latent TGF- β requires the latent TGF- β binding protein-1. *J. Cell Biol.* 165, 723–734

Antwi, S., *et al.* 2015. Exposure to environmental chemicals and heavy metals, and risk of pancreatic cancer. *Cancer Causes Control.* 26, 1583-1591

Arnold, M., *et al.* 2017. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 66, 683–91

Asiri, A., *et al.* 2019. TGF β 1-induced cell motility is mediated through Cten in colorectal cancer. *International Journal of Experimental Pathology.* 99, 323 – 330

Avila-Carrasco, L., *et al.* 2019. Natural Plants Compounds as Modulators of Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Frontiers in pharmacology,* 10, 715

Ayinde, O., Wang, Z., y Griffin, M. 2017. Tissue transglutaminase induces Epithelial-Mesenchymal- Transition and the acquisition of stem cell like characteristics in colorectal cancer cells. *Oncotarget.* 8, 20025-20041

Babst, M., Katzmann, D., Snyder, W., Wendland, B., y Emr, S. 2002. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell.* 3, 283 – 289

Baietti, M., *et al.* 2012. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.* 14, 677–685

Baj, M., *et al.* 2016. Colorectal cancer-derived microvesicles modulate differentiation of human monocytes to macrophages. *J Transl Med.* 14, 1-15

Banik, K., *et al.* 2019. Honokiol for cancer therapeutics: A traditional medicine that can modulate multiple oncogenic targets. *Pharmacol Res.* 144, 192-209

Barbara, N., Wrana, J., & Letarte, M. 1999. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem*, 274, 584-94

Battle, R., *et al.* 2019. Regulation of tumor angiogenesis and mesenchymal–endothelial transition by p38 α through TGF- β and JNK signaling. *Nat. Commun.* 10, 3071

Beck, S., *et al.* 2006. Bone morphogenetic protein signaling and growth suppression in colon cancer. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* 291, 135–145

Berg, K., *et al.* 2017. Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Mol Cancer*, 16, 116

Beerling, E., *et al.* 2016. Plasticity between epithelial and mesenchymal states unlinks EMT from metastasis-enhancing stem cell capacity. *Cell Rep.* 14, 2281–2288

Bervers, E., y Williamson, P. 2010. Phospholipid scramblase: An update. *FEBS Lett.* 584, 2724–2730

Bhowmick, N., *et al.* 2004. TGF- β signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science.* 303, 848–851

Bio-Rad. 2022. ELISA: Results – Quantitative, Qualitative and Sensitivity. <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-results-quantitative-semi-qualitative.html>

Boland, C., y Goel, A. 2010. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 138, 2073–2087

Bray, F., *et al.* 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 68, 394–424

Brocardo, M., y Henderson, B. 2008. APC shuttling to the membrane, nucleus and beyond. *Trends Cell Boil.* 18, 587–596

Brunner, A., *et al.* 1989. Site-directed mutagenesis of cysteine residues in the pro region of the transforming growth factor β 1 precursor. Expression and characterization of mutant proteins. *J Biol Chem.* 264, 13660–13664

Buschow S., *et al.* 2009. MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic.* 10, 1528 – 1542

Calon, A., *et al.* 2015. Stromal gene expression defines poor- prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 47, 320–329

Carrière J., Barnich N., y Nguyen H. 2016. Exosomes: From functions in host-pathogen interactions and immunity diagnostic and therapeutic opportunities. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 172, 39 – 75

Chen, W., y ten Dijke, P. 2016. Immunoregulation by members of the TGF β superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 723–740

Choi, D., *et al.* 2012. Quantitative proteomics of extracellular vesicles derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells. *Journal of Extracellular Vesicles.* 1, 18704

Choi, D., *et al.* 2012. The protein interaction network of extracellular vesicles derived from human colorectal cancer cells. *J. Proteome Res.* 11, 1144-1151

Choi, D., *et al.* 2013. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics.* 13, 1554-1571

Claudia, S., Carolin, S., y Walter, N. 2008. Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 and galectin-1 does not require shedding of plasma membrane-derived vesicles. *FEBS Lett.* 582, 1362–8

Cocucci, E., Racchetti, G., y Meldolesi, J. 2009. Shedding microvesicles: Artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 19, 43–51

Colak, S., y Dijke, P. 2017. Targeting TGF- β Signaling in Cancer. *Trends in Cancer,* 3, 56 – 71

Colombo M., Raposo G., y Théry C. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 30, 255–289

Daleke, D. 2003. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J. Lipid Res.* 44, 233–242

Davies, B., Lee, J., Oestreich, A., y Katzmann, D. 2009. Membrane protein targeting to the MVB/lysosome. *Chem Rev.* 109, 1575 – 1586

de la Mare, A., Jurgens, T., y Edkins, A. 2017. Extracellular Hsp90 and TGF β regulate adhesion, migration and anchorage independent growth in a paired colon cancer cell line model. *BMC cancer*, 17, 202

de Miranda, N., *et al.* 2015. Transforming growth factor β signaling in colorectal cancer cells with microsatellite instability despite biallelic mutations in TGFBR2. *Gastroenterology*. 148, 1427–1437

de Sousa, F., *et al.* 2013. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat. Med.* 19, 614–618

de Vinuesa, A., *et al.* 2016. Targeting tumour vasculature by inhibiting activin receptor-like kinase (ALK)1 function. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 1142–1149

de Wever, O., *et al.* 2008. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int. J. Cancer.* 123, 2229–2238

Deatherage, B. y Cookson, B. 2012. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet under- appreciated aspect of microbial life. *Infect. Immun.* 80, 1948–1957

Derynck, R., y Zhang, Y. 2003. Smad dependent and Smad-independent pathways in TGF-b family signaling. *Nature.* 425, 577-584.

Derynck, R., y Miyazono, K. 2008. The TGF-b family. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.*

Derynck, R., y Miyazono, K. 2017. The Biology of the TGF- β Family. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* 1164 pp

Devaux, P., Herrmann, A., Ohlwein, N., y Kozlov, M. 2008. How lipid flippases can modulate membrane structure. *Biochim. Biophys.* 1778, 1591–1600

Dong, X., *et al.* 2017. Force interacts with macromolecular structure in activation of TGF- β . *Nature.* 542, 55–59

Düchler, M., *et al.* 2019. Melanoma-Derived Extracellular Vesicles Bear the Potential for the Induction of Antigen-Specific Tolerance. *Cells*. 8, 665

Duda, D., *et al.* 2003. Restoration of SMAD4 by gene therapy reverses the invasive phenotype in pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene*, 22, 6857-64

Eitan, E., *et al.* 2016. Impact of lysosome status on extracellular vesicle content and release. *Ageing Res. Rev.* 32, 65–74

Elliott, R., y Blobe, G. 2005. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol.* 23, 2078–93

Endzelins, E., *et al.* 2018. Extracellular Vesicles Derived from Hypoxic Colorectal Cancer Cells Confer Metastatic Phenotype to Non-metastatic Cancer Cells. *Anticancer Research.* 38, 5139-5147

Eppert, K., *et al.* 1996. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell.* 86, 543–52

Fearon, E., y Vogelstein, B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61, 759–767

Fearon, E. 2011. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 6, 479–507

Feng, X., y Derynck, R. 2005. Specificity and versatility in TGF-b signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev. Biol.* 21, 659–693

Fischer, K., *et al.* 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature.* 527, 472–476

Flavell, R., *et al.* 2010. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFβ. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 554–567

Frühbeis, C., *et al.* 2013. Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS biology*, 11, e1001604

Fukai, Y., *et al.* 2003. Reduced expression of transforming growth factor-beta receptors is an unfavorable prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 104, 161–6

Gasior, K., *et al.* 2019. The role of cellular contact and TGF- β signaling in the activation of the epithelial mesenchymal transition (EMT). *CELL ADHESION & MIGRATION*. 1, 63 – 75

Gatza, C., *et al.* 2011. Type III TGF- β Receptor Enhances Colon Cancer Cell Migration and Anchorage-Independent Growth. *Neoplasia*. 13, 758–770

Goelz, S., Vogelstein, B., Hamilton, S., Feinberg, A. 1985. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science*. 228, 187-191

Goumans, M., *et al.* 2003. Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell*, 12, 817-28

Grady, W., y Carethers, J. 2008. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*.135, 1079–1099

Granger, E., McNee, G., Allan, V., y Woodman, P. 2014. The role of the cytoskeleton and molecular motors in endosomal dynamics. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 31, 20–29

Gryfe, R., *et al.* 2000. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 342, 69–77

Gu, J., *et al.* 2012. Gastric Cancer Exosomes Trigger Differentiation of Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cells to Carcinoma-Associated Fibroblasts through TGF- β /Smad Pathway. *PLoS ONE*. 7, e52465

Guerrero-Esteo, M., Sanchez-Elsner, T., Letamendia, A., & Bernabeu, C. 2002. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem*, 277, 29197-209

Guix, F., *et al.* 2017. Tetraspanin 6: a pivotal protein of the multiple vesicular body determining exosome release and lysosomal degradation of amyloid precursor protein fragments. *Mol. Neurodegener.* 12, 25

Haraldsdottir, S., *et al.* 2016. Patients with colorectal cancer associated with Lynch syndrome and MLH1 promoter hypermethylation have similar prognoses. *Genet. Med.* 18, 863–868

Hata, A., y Guang, Y. 2016. TGF- β Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 8, a022061

- He, W., *et al.* 1998. Novel cytokine release inhibitors. Part III: truncated analogs of tripterine. *Bioorg Med Chem Lett.* 8, 3659–3664
- Heldin, C., *et al.* 2014. Signals and receptors. In Signal transduction principles, pathways and processes (ed. Cantley LC, Hunter T, Sever R, Thorner J). *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.* 3–29 pp
- Henrik, C., y Moustakas, A. 2016. Signaling Receptors for TGF- β Family Members. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* doi: 10.1101/cshperspect.a022053
- Herzig, D., y Tsikitis, V. 2015. Molecular markers for colon diagnosis, prognosis and targeted therapy. *J. Surg. Oncol.* 111, 96–102
- Hewitt, R., *et al.* 2000. Validation of a model of colon cancer progression. *J Pathol,* 192, 446-54
- Hong, C., *et al.* 2014. Plasma exosomes as markers of therapeutic response in patients with acute myeloid leukemia. *Front. Immunol.* 5, 160
- Hsu C., *et al.* 2010. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol.* 189, 223–232
- Huang, D., *et al.* 2018. Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 37, 173–187
- Hurley, J. 2010. The ESCRT complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 45, 463 – 487
- Hyytiainen M., Penttinen, C., y Keski-Oja, J. 2004. Latent TGF- β -binding proteins: Extracellular matrix association and roles in TGF- β activation. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 41, 233–264
- Ikushima, H., y Miyazono, K. 2010. TGF β signalling: A complex web in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer.* 10, 415–424
- Itatani, Y., *et al.* 2018. Resistance to Anti-Angiogenic Therapy in Cancer- Alterations to Anti-VEGF Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1232
- Itatanai, Y., Kawada, K., y Sakai, Y. 2019. Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway in Colorectal Cancer and Its Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 5822
- Jahn, R., y Scheller, R. 2006. SNAREs—engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 631–643

Ji, H., *et al.* 2013. Proteome profiling of exosomes derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells reveal differential expression of key metastatic factors and signal transduction components. *Proteomics*. 13, 1672–1686

Jiang, Z., *et al.* 2019. Celastrol inhibits colorectal cancer through TGF-1/Smad signaling. *OncoTargets and Therapy*. 12, 509 - 518

Jin, Y., Youn, O., y Song, Y. 2014. Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes. *BMB Reports*. 47, 531 – 539

Kahlert C, *et al.* 2014. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem*. 289, 3869–3875

Kalra, H., Drummen, G., y Mathivanan, S. 2016. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *Int. J. Mol. Sci*. 17, 170

Kang, H., Lee, M., y Jang, S. 2013. Celastrol inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition by inhibiting Snail and regulating E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 437, 550-6

Katzmann, D., Babst, M., y Emr, S. 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*. 106, 145 – 155

Kim, B., *et al.* 2006. Smad4 signalling in T cells is required for suppression of gastrointestinal cancer. *Nature*. 441, 1015–1019

Kim, H., *et al.* 2004. Hyaluronan facilitates invasion of colon carcinoma cells in vitro via interaction with CD44. *Cancer Res*. 64, 4569-76

Kim, K., Sheppard, D., y Chapman, A. 2018. TGF- β 1 signaling and tissue fibrosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 10, a022293

Kitamura, T., *et al.* 2007. SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1+ myeloid cells that promote invasion. *Nat. Genet*. 39, 467–475

Kodach, L., *et al.* 2008. The Bone Morphogenetic Protein Pathway Is Inactivated in the Majority of Sporadic Colorectal Cancers. *Gastroenterology*. 134, 1332–1341

Kogure, T., *et al.* 2011. Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology* 54, 1237-1248

Kosmacek, E., *et al.* 2016. MnTnBuOE-2-PyP protects normal colorectal fibroblasts from radiation damage and simultaneously enhances radio/chemotherapeutic killing of colorectal cancer cells. *Oncotarget*, 7, 34532–34545

Languino, L., *et al.* 2016. Exosome-mediated transfer from the tumor microenvironment increases TGF- β signaling in squamous cell carcinoma. *Am J Transl Res.* 8, 2432-2437

Lao, V., y Grady, W. 2011. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 686–700

Lawler, S., *et al.* 1997. The type II transforming growth factor-b receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues. *J Biol Chem.* 272, 14850–14859

Lebrin, F., *et al.* 2004. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J*, 23, 4018-28

Levy, L., y Hill, Caroline. 2005. Smad4 Dependency Defines Two Classes of Transforming Growth Factor β (TGF- β) Target Genes and Distinguishes TGF- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition from Its Antiproliferative and Migratory Responses. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY.* 25, 8108 – 8125

Li, P., *et al.* 2014. Effects of ephrinB2 gene siRNA on the biological behavior of human colorectal cancer cells. *Oncol Rep*, 33, 758-66

Li, Q., *et al.* 2020. Anti-proliferative effect on honokiol on SW620 cells through upregulating BMP7 expression via the TGF- β 1/p53 signaling pathway. *Oncology Reports.* 44, 2093-2107

Li, X., *et al.* 2017. Smad4 Inhibits VEGF-A and VEGF-C Expressions via Enhancing Smad3 Phosphorylation in Colon Cancer. *Anat. Rec.* 300, 1560–1569

Lin, H., *et al.* 1995. The soluble exoplasmic domain of the type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor. A heterogeneously glycosylated protein with high affinity and selectivity for TGF-beta ligands. *J Biol Chem*, 270, 2747-54

Lin, L., *et al.* 2015. Celastrol ameliorates ulcerative colitis-related colorectal cancer in mice via suppressing inflammatory responses and epithelial-mesenchymal transition. *Front Pharmacol.* 6, 320

Liu, L. 2015. Exosomal Regulation of TGF- β Signalling [Tesis de Maestría, Universidad de Melbourne, Australia].

Lo, R., *et al.* 1998. The L3 loop: A structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF- β receptors. *EMBO J.* 17, 996–1005

López-Casillas, F., *et al.* 1991. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell*, 67, 785-95

López-Casillas, F., *et al.* 1994. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *The Journal of cell biology*, 124, 557–568

Lu, M., Munger, J. S., Steadele, M., Busald, C., Tellier, M. y Schnapp, L. M. 2002. Integrin $\alpha 8\beta 1$ mediates adhesion to LAP-TGF $\beta 1$. *Journal of Cell Science.* 115, 4641-4648

Lutz, M., y Knaus, P. 2002. Integration of the TGF- β pathway into the cellular signaling network. *Cell Signal.* 14, 977-988

Lynch, H., y de la Chapelle., A. 2003. Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 919–932

Manning, G., *et al.* 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 298, 1912–1934

Markowitz, S., *et al.* 1995. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science.* 268, 1336

Mármol, I., *et al.* 2017. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences.* 18, 197

Massagué, J., y Chen., Y. 2000. Controlling TGF-beta signaling. *Genes and Development.* 14, 627–644

Massague, J., Seoane, J., y Wotton, D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19, 2783–2810

Massagué, J. 2008. TGF β in cancer. *Cell*. 134, 215–230

Massagué, J. 2012. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13, 616–630

Mathivanan, S., Ji, H., y Simpson, R. 2010. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*. 73, 1907–1920

Masyuk, A., Masyuk, T., y Larusso, N. 2013. Exosomes in the pathogenesis, diagnostics and therapeutics of liver diseases. *J Hepatol*. 59, 621–625

Matlashewski, G., *et al*. 1984. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J*. 3, 3257

MERCK. 2020. SW480 Cell Line human. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_87092801?lang=es®ion=MX

MERCK. 2020. SW620 Cell Line human. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_87051203?lang=es®ion=MX

Metcalf, D., & Isaacs, A. 2010. The role of ESCRT proteins in fusion events involving lysosomes, endosomes and autophagosomes. *Biochem Soc Trans*. 38, 1469 – 1473

Miguchi, M., *et al*. 2016. Gasdermin C Is Upregulated by Inactivation of Transforming Growth Factor β Receptor Type II in the Presence of Mutated Apc, Promoting Colorectal Cancer Proliferation. *PLoS ONE*. 11, e0166422

Miyazono, K., Olofsson, A., Colosetti, P., & Heldin, C. 1991. A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *The EMBO journal*, 10, 1091–1101. PMID: 2022183

Mobius, W., *et al*. 2003. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic* 4, 222–231

Moreno, O., Villarroya, C., y Sánchez, F. 2014. Post-translational modifications of exosomal proteins. *Front. Immunol*. 5, 383

Morikawa, M., Deryinck, R., y Miyazono, K. 2016. TGF- β and the TGF- β family: Context dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 8, a021873

- Morris, S., *et al.* 2017. Transposon mutagenesis identifies candidate genes that cooperate with loss of transforming growth factor-beta signaling in mouse intestinal neoplasms. *Int. J. Cancer.* 140, 853–863
- Moustakas, A., *et al.* 1993. The transforming growth factor beta receptors types I, II, and III form hetero-oligomeric complexes in the presence of ligand. *J Biol Chem,* 268, 22215-8
- Moustakas, A., y Heldin, C. 2009. The regulation of TGF- β signal transduction. *Development.* 136, 3699–3714
- Moustakas, A., y Heldin, C. 2016. Mechanisms of TGF β -induced epithelial–mesenchymal transition. *J. Clin. Med.* 5, 63
- Mu, Y., *et al.* 2012. Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res.* 347, 11–20
- Munro, A., Lain, S., y Lane, D. 2005. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: A systematic review. *Br. J. Cancer.* 92, 434–444
- Muralidharan, V., *et al.* 2009. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr. Biol.* 19, 1875–1885
- Muralidharan, V., Clancy, J., Sedgwick, A., y D'Souza, C. 2010. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J. Cell Sci.* 123, 1603-1611
- Nabhan, J., *et al.* 2012. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 4146–4151
- Nieto, M., *et al.* 2016. EMT: 2016. *Cell.* 166, 21–45
- Ogawa, R., *et al.* 2019. Loss of SMAD4 Promotes Colorectal Cancer Progression by Recruiting Tumor-Associated Neutrophils via the CXCL1/8-CXCR2 Axis. *Clin. Cancer Res.* 25, 2887–2899
- Oshima, H., *et al.* 2015. Suppressing TGF β signaling in regenerating epithelia in an inflammatory microenvironment is sufficient to cause invasive intestinal cancer. *Cancer Res.* 75, 766–776
- Ostrowski M., *et al.* 2011. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol.* 12, 19 – 30

Papageorgis, P., *et al.* 2011. Smad4 Inactivation Promotes Malignancy and Drug Resistance of Colon Cancer. *Cancer Res.* 71, 1–11

Pardali, E., *et al.* 2010. Signaling by members of the TGF- β family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol.* 20, 556–567

Parkin, D. 2006. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer.* 118, 3030-3044.

Paulo, J. 2016. Sample preparation for proteomic analysis using a GeLC-MS/MS strategy. *Journal of biological methods*, 3, e45.

Perekatt, A., *et al.* 2018. SMAD4 Suppresses WNT-Driven Dedifferentiation and Oncogenesis in the Differentiated Gut Epithelium. *Cancer Res.* 78, 4878–4890

Perez D., *et al.* 2013. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J Biol Chem.* 288, 11649 – 11661

Pino, M., y Chung, D. 2010. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology.* 138, 2059–2072

Popat, S., y Houlston, R. 2005. A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur. J. Cancer.* 41, 2060–2070

Popat, S., *et al.* 2007. Relationship between chromosome 18q status and colorectal cancer prognosis: A prospective, blinded analysis of 280 patients. *Anticancer Res.* 27, 627–633

Popēna, I., *et al.* 2018. Effect of colorectal cancer-derived extracellular vesicles on the immunophenotype and cytokine secretion profile of monocytes and macrophages. 16, 1-12

Portela, A., y Esteller, M. 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 28, 1057-1068

Principe, D., *et al.* 2014. TGF- β : Duality of Function Between Tumor Prevention and Carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 106

Principe, D., *et al.* 2016. Loss of TGF β signaling promotes colon cancer progression and tumor-associated inflammation. *Oncotarget.* 8, 3826–3839

- Qin, F., *et al.* 2020. Anti-TGF- β attenuates tumor growth via polarization of tumor associated neutrophils towards an anti-tumor phenotype in colorectal cancer. *Journal of Cancer*. 11, 2580 – 2592
- Rabbani, Z., *et al.* 2009. Antiangiogenic action of redox-modulating Mn(III) meso-tetrakis(N-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin, MnTE-2-PyP5+, via suppression of oxidative stress in a mouse model of breast tumor. *Free Radical Biology & Medicine*. 47, 992–1004
- Rai, A., *et al.* 2018. Exosomes derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells contribute to functional heterogeneity of activated fibroblasts by reprogramming their proteome. 19, e1800148
- Raimondo, F., *et al.* 2011. Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. *Proteomics*. 11, 709-720
- Raiborg, C., y Stenmark, H. 2002. Hrs and endocytic sorting of ubiquitinated membrane proteins. *Cell Struct Funct*. 27, 403 – 408
- Raposo, G., y Stoorvogel, W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 200, 373–383
- Ratajczak, J., *et al.* 2006. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*. 20, 1487–1495
- Rauch, S., y Martin, J. 2011. Multiple interactions between the ESCRT machinery and arrestin-related proteins: Implications for PPXY-dependent budding. *J. Virol*. 85, 3546–3556
- Rennoll, S., y Yochum, G. 2015. Regulation of myc gene expression by aberrant Wnt/ β -catenin signaling in colorectal cancer. *World J. Biol. Chem*. 6, 290
- Ringuette, C., *et al.* 2018. Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into Cancer-Associated Fibroblasts through TGF- β Signaling. *Mol Cancer Res*. 16, 1196 – 1204
- Robertson, I., y Rifkin, D. 2016. Regulation of the bioavailability of TGF- β and TGF- β -related proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 8, a021907

Rocha, N., et al. 2009. Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *The Journal of cell biology*, 185, 1209–1225

Rong, L., Li, R., Li, S., y Luo, R. 2016. Immunosuppression of breast cancer cells mediated by transforming growth factor-b in exosomes from cancer cells. *Oncol Lett.* 11, 500–504

Rosty, C., et al. 2013. PIK3CA activating mutation in colorectal carcinoma: Associations with molecular features and survival. *PLoS ONE*. 8, e65479

Rouce, R., et al. 2016. The TGF- β /SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B-acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 30, 800–811

Rubenstein, J., et al. 2015. American Gastroenterological Association Institute Guideline on the Diagnosis and Management of Lynch Syndrome. *Gastroenterology*. 149, 777–782

Saharinen, J., Taipale, J., y Keski-Oja, J. 1996. Association of the small latent transforming growth factor- β with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1. *EMBO J.* 15, 245–253

Sanderson, M., et al. 2008. Generation of novel, secreted epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB1) isoforms via metalloprotease-dependent ectodomain shedding and exosome secretion. *J Cell Biochem.* 103, 1783–97

Sarli, L., et al. 2004. Association between recurrence of sporadic colorectal cancer, high level of microsatellite instability, and loss of heterozygosity at chromosome 18q. *Dis. Colon Rectum.* 47, 1467–1482

Savina A., Vidal M., y Colombo M. 2002. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci.* 115, 2505 – 2515

Shi, M., et al. 2011. Latent TGF- β structure and activation. *Nature*. 474, 343–349

Sinha, S., et al. 2016. Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *The Journal of cell biology*, 214, 197–213

Song, P., Trajkovic, K., Tsunemi, T., y Krainc, D. 2016. Parkin modulates endosomal organization and function of the endo-lysosomal pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 2425–2437

Stein, U., et al. 2009. MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis. *Nat Med*, 15, 59-67

Szczepanski, M., et al. 2011. Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor-beta1. *Haematologica*. 96, 1302–1309

SEER. 2020. Review: What is Cancer? [Surveillance, Epidemiology and End Results](https://training.seer.cancer.gov/disease/cancer/review.html). Sitio Web: <https://training.seer.cancer.gov/disease/cancer/review.html>

Seoane, J., y Gomis, R. 2017. TGF- β family signaling in tumor suppression and cancer progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9, a022277

Seto, M., Honma, K., y Nakagawa, M. 2010. Diversity of genome profiles in malignant lymphoma. *Cancer Sci.* 101, 573-578

Shelke, G., et al. 2019. Endosomal signalling via exosome surface TGF β - 1. *J Extracell Vesicles*. 8, 1650458

Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R., y Canaani, E. 1985. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*. 315, 550-554

Simons, M., y Raposo, G. 2009. Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 575-581

Subra, C., et al. 2007. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*. 89, 205-212

Skog, J., et al. 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 10, 1470-1476

Stenvers, K., et al. 2003. Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Mol Cell Biol*, 23, 4371-85

Stewart, B., y Wild, C. 2014. (Eds.) World Cancer Report 2014. *International Agency for Research on Cancer (IARC)*: Lyon, France

Stoffel, E., y Kastrinos, F. 2014. Familial colorectal cancer, beyond lynch syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 1059–1068

Stuffers, S., Sem. W., Stenmark, H., y Brech, A. 2009. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*. 10, 925 – 937

Subra, C., *et al.* 2010. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J. Lipid Res.* 51, 2105-2120

Surgucheva, I., Sharov, V., y Surguchov, A. 2012. γ -Synuclein: seeding of α -synuclein aggregation and transmission between cells. *Biochemistry* 51, 4743–4754

Suwakulsiri, W., *et al.* 2019. Proteomic profiling reveals key cancer progression modulators in shed microvesicles released from isogenic human primary and metastatic colorectal cancer cell lines. *BBA - Proteins and Proteomics.* 1867, 140171

Takeda, H., *et al.* 2019. CRISPR-Cas9–mediated gene knockout in intestinal tumor organoids provides functional validation for colorectal cancer driver genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 116, 15635

Tamai, K., *et al.* 2010. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 399, 384 – 390

Tamura, K., *et al.* 2019. Genetic and genomic basis of the mismatch repair system involved in Lynch syndrome. *Int. J. Clin. Oncol.* 24, 999–1011

ThermoFisher. 2022. Imperial™ Protein Stain. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/24615>

They, C., Zitvogel, L., y Amigorena, S. 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2, 569–579

They, C., *et al.* 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* Chapter 3, 22

Thiagalingam, S., *et al.* 1996. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet.* 13, 343–46

Trajkovic, K., *et al.* 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science.* 319, 1244 – 1247

Umar, A., *et al.* 2004. Revised bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (lynch syndrome) and microsatellite instability. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 261–268

Valadi, H., *et al.* 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654-659

Valapala, M., y Vishwanatha, J. 2011. Lipid raft endocytosis and exosomal transport facilitate extracellular trafficking of annexin A2. *J. Biol. Chem.* 286, 30911–30925

van N., *et al.* 2011. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell.* 21, 708 – 721

Vasen, H., *et al.* 2013. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): Recommendations by a group of European experts. *Gut.* 62, 812–823

Velapasamy, S., Dawson, C., Young, L., Paterson, I., y Yap, L. 2018. The Dynamic Roles of TGF- β Signalling in EBV-Associated Cancers. *Cancers*, 10, 247

Vella, L., *et al.* 2007. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol.* 211, 582–590

Verweij, F., *et al.* 2018. Quantifying exosome secretion from single cells reveals a modulatory role for GPCR signaling. *J. Cell Biol.* 217, 1129

Villarroya, C., *et al.* 2013. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* 4, 2980

Villarroya, C., *et al.* 2016. ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nat. Commun.* 7, 13588

Voorneveld, P., *et al.* 2014. Loss of SMAD4 alters BMP signaling to promote colorectal cancer cell metastasis via activation of Rho and ROCK. *Gastroenterology*, 147, 196-208.e13

Walton, K., Makanji, Y., Chen, J., Wilce, M., Chan, K., Robertson, D., y Harrison, C. A. 2010. Two distinct regions of latency-associated peptide coordinate stability of the latent transforming growth factor-beta1 complex. *The Journal of biological chemistry*, 285, 17029–17037.

Wang, X., *et al.* 1991. Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor. *Cell*, 67, 797-805

Wang, T., Ming, Z., Xiaochun, W., y Hong, W. 2011. Rab7: role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic. *Cell. Signal.* 23, 516–521

Webber, J., *et al.* 2010. Cancer Exosomes Trigger Fibroblast to Myofibroblast Differentiation. *Cancer Res.* 70, 9621–30

Wei, Q., Li, L., y Chen, D. 2007. DNA Repair, Genetic Instability, and Cancer: World Scientific

Weinberg, R. 2013. Tumor suppressor genes. *Biol. Cancer.* 2, 231–274

Weisenberger, D., *et al.* 2006. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 38, 787–793

Weiss, A. y, Attisano, L. 2013. The TGF- β superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2, 47–63

Whiteside, T. 2013. Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes). *Biochem Soc Trans.* 41, 245–51

WHO. 2018. Cancer. World Health Organization. Sitio web: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Willett, C., *et al.* 2012. Cancer genome atlas network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 487, 330–337

Wollert, T., Wunder, C., Lippincott, J., y Hurley, J. 2009. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature.* 458, 172 – 17

Woodman, P., y Futter, C. 2008. Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Curr Opin Cell Biol.* 20, 408 – 414

Xiao, J., *et al.* 2020. PEITC inhibits the invasion and migration of colorectal cancer cells by blocking TGF- β -induced EMT. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 130 (2020)

Yakicier, M., *et al.* 1999. Smad2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 18, 4879–4883

Yamada, N., *et al.* 2016. Colorectal cancer cell-derived extracellular vesicles induce phenotypic alteration of T cells into tumor-growth supporting cells with transforming growth factor- β 1-mediated suppression. *Oncotarget.* 7, 27033 – 27043

Yan, W., Liu, Z., Yang, W. y Wu, G. 2018. miRNA expression profiles in Smad4-positive and Smad4-negative SW620 human colon cancer cells detected by next-

generation small RNA sequencing. *Cancer Management and Research*. 10, 5479-5490

Yang, Y., *et al.* 2019. MnTE-2-PyP Attenuates TGF- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition of Colorectal Cancer Cells by Inhibiting the Smad2/3 Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019, 1–11

Yen, E., *et al.* 2017. Exosomal TGF- β 1 is correlated with lymphatic metastasis of gastric cancers. *Am J Cancer*. 7, 2199-2208

Yoo, K., y Shin, H. 2003. Cancer epidemiology and prevention. *Korean J Epidemiol*. 25, 1e15

Zhang, B., *et al.* 2010. Antimetastatic role of Smad4 signaling in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 138, 969-80.e1-3

Zhang, B., *et al.* 2014. Loss of Smad4 in colorectal cancer induces resistance to 5-fluorouracil through activating Akt pathway. *Br. J. Cancer*. 110, 946–957

Zhang, H., *et al.* 2006. A membrane form of TNF- α presented by exosomes delays T cell activation-induced cell death. *J Immunol*. 176, 7385–93

Zhang, L., *et al.* 2014. Phenethyl isothiocyanate suppresses cervical carcinoma metastasis potential and its molecular mechanism. *Molecular Medicine Reports*, 10, 2675-2680

Zhang, L., *et al.* 2019. PPTS Inhibits the TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Colorectal Cancer SW480 Cells. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2019, 2683534

Zhang, Y., Alexander, P., y Wang., X. 2017. TGF-b family signaling in the control of cell proliferation and survival. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 9, a022145

Zhang, Y. 2017. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β Family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9, a022129

Zhang, W., *et al.* 2018. Exosomes in pathogen infections: a bridge to deliver molecules and link functions. *Front Immunol*. 9, 90

Zhao, M., Mishra, L., y Deng, C. 2018. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *Int. J. Biol. Sci*. 14, 111–123

Zhao, J., *et al.* 2019. Tumor-derived extracellular vesicles inhibit natural killer cell function in pancreatic cancer. *Cancers*. 11, 874

Zheng, X., *et al.* 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pan-creatic cancer. *Nature*. 527, 525–530

Zhu, S., *et al.* 2019. Parthenolide inhibits transforming growth factor β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Intestinal Research*. 17, 527-536

Zylbersztein K., y Galli T. 2011. Vesicular traffic in cell navigation. *FEBS J*. 278, 4497–4505