



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Secreción de la citocina TGF- $\beta$  por células metastásicas de  
cáncer colorrectal**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
**David Toledo Padilla**

TUTOR PRINCIPAL  
**Dra. Marina Macías Silva**  
IFC, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dr. Fernando López Casillas**  
IFC, UNAM  
**Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz**  
UACM

Ciudad de México. Junio, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Marina Macías Silva, en el Departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y con el apoyo financiero al proyecto No. IV200220 de PAPIIT/DGAPA/UNAM.

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

A la Dra. Mitzi P. Pérez Calixto, Investigadora posdoctoral, por su asesoría y apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

A los miembros de mi Comité Tutorial: Dr. Fernando López Casillas y la Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz, por los comentarios y sugerencias sobre mi trabajo.

A los miembros de mi Jurado de examen: Dr. Jesús Adolfo García Sainz, Dr. Ignacio Camacho Arroyo, Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes, Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo y el Dr. Ángel Alfonso Zarain Herzberg, por la revisión y los comentarios sobre mi trabajo.

A los miembros de Bioterio del IFC, UNAM, por su asesoría y apoyo técnico: M.V.Z. Claudia V. Rivera Cerecedo, M.V.Z. Héctor Malagón Rivero y M.V.Z. Gabriela Xochitl Ayala Méndez.

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

A los miembros de la Unidad de Imagenología del IFC, UNAM, por su asesoría y apoyo técnico: Dra. Ruth Rincón Heredia, Dr. Abraham Rosas Arellano y Med. Cir. Rodolfo Paredes Díaz.

A los miembros de la Unidad de Biología Molecular del IFC, UNAM, por su asesoría, apoyo técnico y servicios de generación de oligonucleótidos y secuenciación: Dra. Laura Ongay Larios, Biól. Ma. Guadalupe Códiz Huerta y M. en C. Minerva Mora Cabrera.

A los miembros de la Unidad de Cómputo del IFC, UNAM, por su asesoría, 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, Ing. Francisco Pérez Eugenio y demás miembros de la Unidad.

Al Dr. César A. Poot Hernández de la Unidad de Bioinformática y Manejo de la Información, por su asesoría.

Al Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y al CONAHCYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría.

# Índice

Lista de abreviaturas.....	5
Resumen .....	7
1. Introducción.....	8
2. Marco Teórico .....	8
2.1. Cáncer colorrectal .....	8
2.2. Comunicación intercelular en el microambiente tumoral .....	10
2.2.1. Factores solubles .....	11
2.2.2. Vesículas extracelulares .....	12
2.3. Factor de crecimiento transformante – beta (TGF- $\beta$ ) .....	15
2.3.1. Síntesis del TGF- $\beta$ .....	15
2.3.2. TGF- $\beta$ en estado latente unido al péptido asociado a latencia (LAP) ...	16
2.3.3. Biodisponibilidad del TGF- $\beta$ .....	17
2.3.4. Vía de señalización del TGF- $\beta$ .....	17
2.4. Proteínas portadoras de TGF- $\beta$ .....	19
3. Antecedentes .....	22
4. Planteamiento del problema .....	26
5. Hipótesis .....	27
6. Objetivo general.....	27
7. Objetivos particulares .....	27
8. Materiales y Métodos.....	28
8.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo .....	28
8.2. Medios condicionados .....	29
8.3. Esferoides tumorales .....	29
8.4. Purificación y caracterización de las vesículas extracelulares (EV).....	30
8.4.1. Centrifugación diferencial.....	30

8.4.2.	Ultrafiltración y cromatografía por exclusión molecular .....	30
8.5.	Determinación de la actividad del TGF- $\beta$ .....	32
8.6.	Extractos de proteínas y ensayos de Western Blot .....	33
8.7.	Ensayo de inmunofluorescencia .....	35
8.8.	Detección de marcadores en lisados totales celulares y de las EV .....	35
8.9.	Análisis estadístico .....	36
9.	Resultados .....	36
9.1.	El TGF- $\beta$ puede unirse a distintas proteínas transmembranales en las EV secretadas por las líneas celulares SW480 y SW620.....	36
9.2.	El TGF- $\beta$ puede unirse a proteínas transmembranales y estas proteínas se encuentran presentes en la superficie de las EV .....	38
9.3.	El TGF- $\beta$ es secretado por las células SW620 cultivadas tanto en monocapa como en esferoides.....	41
9.4.	Las células SW620 secretan al TGF-beta principalmente en forma soluble	44
9.5.	El EGF en el medio de cultivo para esferoides tiene un efecto sinérgico con el TGF- $\beta$ .....	51
9.6.	El MC de las células SW620 activa a las vías canónicas y no canónicas en las células AD293 mediante la fosforilación de ERK1/2 .....	53
10.	Discusión .....	56
11.	Conclusiones .....	61
12.	Perspectivas .....	61
13.	Referencias .....	61
14.	Anexo I .....	75
15.	Anexo II.....	79

## Lista de abreviaturas

**AKT:** Proteína cinasa de residuos de serina/treonina

**APC:** Poliposis coli adenomatosa

**ARF6:** Factor 6 de ADP-ribosilación

**BMP:** Proteínas morfogenéticas de hueso

**CAF:** Fibroblastos asociados a cáncer

**CIMP:** Fenotipo metilador de islas CpG

**CRC:** Cáncer colorrectal

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol

**DMEM:** Medio de Eagle modificado por Dulbecco

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DTT:** Ditiotreitól

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico

**ELISA:** Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

**ERK:** Cinasa regulada por señalización extracelular

**ESCRT:** Complejo de distribución (sorting) endosómico requerido para el transporte

**EV:** Vesículas extracelulares

**FBS:** Suero fetal bovino

**GARP:** Glicoproteína A con repeticiones predominantes

**GDF:** Factor de diferenciación y crecimiento

**HS:** Suero de caballo

**IgG:** Inmunoglobulina G

**ILV:** Vesículas intraluminales

**JNK:** Cinasa del N-terminal de c-Jun

**LAP:** Péptido asociado a latencia

**LLC:** Complejo latente grande

**LOH:** Pérdida de heterocigosidad

**LTBP:** Proteína de unión a TGF- $\beta$  latente

**MAPK:** Proteína cinasa activada por mitógeno

**MC:** Medio condicionado

**MDSCs:** Células supresoras derivadas de mieloides

**MHC-1:** Complejo mayor de histocompatibilidad 1

**MLCK:** Cinasa de la cadena ligera de la miosina

**MMP:** Metaloproteinasas de matriz

**MSC:** Célula troncal mesenquimal

**MVB:** Cuerpos multivesiculares

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**n-SMase:** Esfingomielinasa neutral tipo II

**PBS:** Solución salina amortiguada con fosfato

**PFA:** Paraformaldehído

**PI3K:** Fosfoinositol 3-cinasa

**PLD:** Fosfolipasa D

**PVDF:** Fluoruro de polividileno

**RGD:** Tripéptido Arg-Gly-Asp

**RIPA:** Ensayo de precipitación radioinmune

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RTK:** Receptor-cinasa de tirosina

**SBE:** Elemento de unión a Smad

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico

**SLC:** Complejo latente menor

**TME:** Microambiente Tumoral

**TNTE:** Tris-NaCl-Tritón-EDTA

**TG2:** Transglutaminasa 2

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante-beta

**TSP-1:** Trombospondina-1

**VEGF:** Factor de crecimiento de endotelio vascular

**WB:** Western blot

## Resumen

El cáncer colorrectal (CRC) es una enfermedad que ocupa el segundo lugar mundial en mortalidad por cáncer, por lo que es importante conocer los mecanismos moleculares que promueven sus capacidades tumorales. Un proceso importante en el desarrollo del CRC es la comunicación intercelular que establecen las células cancerosas con las demás células que forman el microambiente tumoral (TME). Esta comunicación se puede dar a través de factores solubles o mediante la secreción de vesículas extracelulares (EV) que portan moléculas importantes para el desarrollo tumoral; entre los mensajeros químicos que participan en esta comunicación celular se encuentra el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- $\beta$ ). Existe evidencia de que algunas de las células de CRC secretan al TGF- $\beta$  principalmente en estado activo y en mayor proporción en EV, por lo cual, nos interesó estudiar cómo es la secreción del TGF- $\beta$  por las células de CRC metastásicas SW620, encontradas en tumores que se han clasificado como CMS4, un subtipo molecular de CRC que se caracteriza por tener una alta actividad del TGF- $\beta$ .

Primero realizamos una búsqueda bibliográfica sobre el estado del arte de la secreción del TGF- $\beta$ , investigando si es secretado en estado latente o activo o si se secreta en forma soluble o en EV. Encontramos que los mecanismos de secreción son muy variados y que dependen del contexto celular, pero hay poca información sobre las células de CRC.

Por lo tanto, en este trabajo estudiamos experimentalmente la secreción del TGF- $\beta$  por las células SW620 cultivadas en monocapa (2D) o en esferoides (3D). Los resultados muestran que, independientemente de su cultivo en 2D o 3D, estas células secretan altas cantidades de TGF- $\beta$  tanto en forma latente como activa y principalmente en estado soluble, mientras que solo una pequeña fracción se encuentra en EV y solamente una fracción menor en exosomas.

El TGF- $\beta$  secretado por las células SW620 es capaz de activar a la proteína Smad2, aumentando su fosforilación y su translocación al núcleo; además, es capaz de activar genes reporteros sensibles al TGF- $\beta$ . Cabe mencionar que, de manera colateral, encontramos que los suplementos incluidos en los medios de cultivo para los esferoides, principalmente el EGF, tienen un efecto sinérgico o potencian los efectos del TGF- $\beta$  presente en los medios condicionados, obtenidos de los cultivos en esferoides de las células SW620. Este efecto sinérgico se observó al medir la actividad de genes reporteros que se usaron para detectar la actividad del TGF- $\beta$  presente en los medios condicionados.

Los hallazgos son muy interesantes puesto que confirman el papel del TGF- $\beta$  en la comunicación intercelular en CRC y nos queda por estudiar si el TGF- $\beta$  secretado



por las SW620 tiene algún efecto biológico sobre alguna de las células que constituyen el TME del CRC, como las células inmunes o los fibroblastos.

## 1. Introducción

En el microambiente tumoral la comunicación intercelular es fundamental para la progresión del cáncer y en particular de metástasis. Las células tumorales para comunicarse pueden secretar factores solubles, así como vesículas extracelulares (EV). Las EV son cuerpos membranosos derivados de distintos tipos de células, cuya carga molecular es muy variada y depende del tipo y estado fisiológico o patológico de la célula donadora. Además, el contenido molecular de las EV puede estar en su interior o en su membrana, para ejercer su función de mediadoras de la comunicación celular tanto cercana como distante. Las células cancerosas pueden comunicarse con otras células para promover un fenotipo tumoral y se ha reportado que varios tipos de células tumorales secretan al factor de crecimiento transformante-beta (TGF- $\beta$ ) en estado soluble o presente en la superficie de su membrana (Rodrigues-Junior, 2022; Toledo-Padilla, 2023).

En el cáncer colorrectal (CRC), el TGF- $\beta$  es una de las moléculas que puede ser llevada en la superficie de las EV secretadas y presenta un efecto dual en este tipo de cáncer; normalmente, esta citocina tiene la función de suprimir el fenotipo tumoral, pero en el contexto del CRC avanzado, se ha reportado que sus vías de señalización se encuentran desreguladas y pueden promover un ambiente inmunosupresor que favorece la progresión tumoral. Se ha encontrado que aproximadamente la mitad de los componentes de la vía del TGF- $\beta$  se encuentran alterados en el CRC (Salas-Lara, 2023).

Aunque aún es desconocido el mecanismo exacto por el cual las EV secretadas por las células de CRC pueden llevar al TGF- $\beta$  en su membrana, existen reportes de que algunas proteínas pueden unir al TGF- $\beta$  y de esta manera portarlo en la membrana de las EV (Elpek, 2015; Jenkins *et al.*, 2018; Metelli *et al.*, 2018; Shelke *et al.*, 2019; Kossatz *et al.*, 2021), lo cual justifica estudiar los mecanismos moleculares implicados en la secreción del TGF- $\beta$  por las células de CRC.

## 2. Marco Teórico

### 2.1. Cáncer colorrectal

El CRC es una de las causas principales de muerte por cáncer en el mundo, por lo que el desarrollo de tratamientos más efectivos es una necesidad urgente

(Ganesh *et al.*, 2019). Aunque el CRC se considera una enfermedad principalmente de los países desarrollados, un aumento rápido en su incidencia se está produciendo en países que están en desarrollo económico. La mayoría de los casos de CRC (90%) son adenocarcinomas, una neoplasia maligna que se desarrolla a partir de células epiteliales glandulares del colon y del recto; aproximadamente del 60 al 65% de los casos de CRC surgen esporádicamente (Keum & Giovannucci, 2019). Por lo tanto, es muy importante que los gobiernos y las organizaciones de la salud informen a las personas, para que conozcan los principales factores que aumentan la incidencia del CRC y las estrategias de prevención primaria y secundaria para contrarrestar su aumento (Keum & Giovannucci, 2019).

En distintos tipos de cáncer, se ha identificado como un sello característico al escape del sistema inmune, que se refiere a cómo las células cancerosas escapan del reconocimiento y ataque del sistema inmune. La secreción de factores inmunosupresores como el TGF- $\beta$ , así como citocinas pro-inflamatorias como la IL-6, el reclutamiento de las células inmunosupresoras como las células T reguladoras (Tregs) o la pérdida de la inmunogenicidad por medio de las células tumorales que disminuyen la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad 1 (MHC-1), son todos factores que pueden contribuir al escape del sistema inmune (Xie *et al.*, 2019).

De acuerdo con la estratificación del CRC propuesto por el Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer (AJCC), el estado 0 está definido por su etapa más temprana, conocido como carcinoma *in situ* o intramucosal, donde no ha crecido más allá de la capa interna del colon o del recto. El estado I está definido por la etapa donde el cáncer ha crecido a través de la mucosa muscularis, pero que no ha invadido nódulos linfáticos. El estado II está caracterizado por el crecimiento del cáncer a través de la pared del colon o del recto, pero que sigue sin invadir nódulos linfáticos o metástasis. En el estado III el cáncer ha crecido a través de la pared del colon, no ha alcanzado órganos distantes, pero si se ha esparcido a los nódulos linfáticos, mientras que el estado IV está caracterizado por la metástasis a órganos distantes (Brown *et al.*, 2019).

El estado 0 del cáncer puede ser tratado removiendo las células cancerosas por colonoscopia, mientras que para los estados I, II y III, es necesario realizar cirugía usando colectomía radical del segmento involucrado. En el caso de pacientes con el estado IV que ha diseminado al hígado, se deben tomar en cuenta los distintos enfoques terapéuticos dirigidos específicamente a los órganos afectados, incluyendo ablación, quimioterapia, radioterapia, crioterapia o cirugía (Granados-Romero *et al.*, 2017).

En general, en el CRC se distinguen tres distintas vías de inestabilidad genómica: (1) mutaciones en los genes de reparación del DNA, llevando al fenotipo de inestabilidad microsatelital del DNA (MSI), (2) mutaciones en *APC* y en otros

genes que activan la vía Wnt, caracterizada por el fenotipo de inestabilidad cromosómica (CIN), e (3) hipermetilación del genoma global, resultando en el apagado de genes supresores de tumores, indicado como fenotipo metilador de islas CpG (CIMP) (Mojarad *et al.*, 2013).

El CRC es una enfermedad genéticamente heterogénea en la que se han involucrado varias y diferentes vías moleculares en las etapas de iniciación, crecimiento y progresión tumoral. De acuerdo con la re-evaluación y comparación de los perfiles de expresión génica del CRC que se han obtenido por el uso de diferentes bases de datos, se ha desarrollado una clasificación en subtipos moleculares consenso (CMS, del inglés *Consensus Molecular Subtype*), que está basada en la expresión genética tanto en el tumor como en el estroma infiltrado (Ciardiello *et al.*, 2019).

Se han identificado cuatro grupos principales: 1) CMS1 (Inestabilidad microsatelital inmune, con aproximadamente 14% de los casos): son tumores hipermutados generalmente con características de inestabilidad microsatelital que pueden mostrar una fuerte infiltración inmune. 2) CMS2 (canónica, con aproximadamente 37% de los casos): son tumores, que están caracterizados por la activación de las vías Wnt y Myc. 3) CMS3 (Metabólica, con aproximadamente 13% de los casos): los tumores tienen frecuentemente mutaciones en KRAS y muestran una desregulación en las vías metabólicas en las células cancerosas. 4) CMS4 (Mesenquimal, con aproximadamente 13% de los casos): los tumores son caracterizados por la activación de la vía del TGF- $\beta$ , la invasión del estroma y aumento en angiogénesis (Ciardiello *et al.*, 2019).

## **2.2. Comunicación intercelular en el microambiente tumoral**

El microambiente tisular de un tumor (TME, del inglés *Tumor Microenvironment*) en desarrollo está compuesto por células tumorales en proliferación, el estroma tumoral, los vasos sanguíneos, las células inflamatorias infiltradas y una variedad de células tisulares asociadas. El TME es un entorno único que surge en el curso de la progresión del tumor como resultado de sus interacciones con el huésped y está conformado y dominado por el tumor, que orquesta los eventos moleculares y celulares que toman lugar en los tejidos aledaños (Weber & Kuo, 2012; Whiteside, 2008).

Las células normales pueden aportar señales negativas o positivas al tumor, pueden ser reclutadas o modificadas por las células cancerosas para producir una variedad de factores de crecimiento, quimiocinas y enzimas degradadoras de matriz que aumentan la proliferación e invasión del tumor. Además, estas células reclutadas pueden proveer un sistema de soporte para las células cancerosas después de recibir terapias citotóxicas tradicionales, por lo que las condiciones ambientales dentro del tumor, causadas por los cambios en el estroma, como el

incremento de la presión del fluido intersticial y los cambios en el flujo vascular reducen la distribución efectiva de los fármacos anticancerosos (Joyce, 2005).

La supervivencia, quiescencia y diseminación de las células metastásicas depende de las señales estromales, de los contactos celulares, de la matriz extracelular y de las señales metabólicas, colectivamente referidas como “nicho metastásico”. Las interacciones entre las células iniciadoras de la metástasis y sus nichos son bidireccionales, con la participación de los factores derivados de las células cancerosas en hacer al tejido huésped más propicio para la supervivencia de las células iniciadoras de la metástasis (Ganesh & Massagué, 2021).

En el TME residen las células troncales cancerosas, las cuales son células con capacidades de auto-renovación y tumorigénesis. El TME contiene a células circulantes del sistema inmune, los vasos sanguíneos, la matriz extracelular, los fibroblastos, los linfocitos, las células inflamatorias derivadas de la médula ósea y moléculas de señalización (Arneth, 2020).

Las interacciones entre las células malignas y no malignas crean un TME que afecta el desarrollo y la progresión del cáncer (Arneth, 2020). Las características del parénquima neoplásico dependen de una compleja interacción entre las células cancerosas y las estromales, orquestada por factores solubles, metabolitos, EV, así como por las interacciones célula-célula (Comito *et al.*, 2020). Este TME contiene factores solubles como citocinas y factores de crecimiento que proporcionan las señales para el crecimiento y supervivencia de las células tumorales (Li & Dalton, 2006).

### **2.2.1. Factores solubles**

Los factores solubles pueden promover una interacción recíproca entre el estroma y las células tumorales, por ejemplo, la IL-6 secretada por las células estromales estimula a las células de mieloma múltiple para producir el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) activando de esta manera a las células endoteliales y promoviendo la angiogénesis (Wu & Dai, 2017).

Los ligandos peptídicos solubles de factores de crecimiento se unen a sus receptores e inician una cascada de señales intracelulares que culminan en una respuesta de desarrollo apropiada, el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés *Epidermal Growth Factor*), el miembro prototípico de la familia de factores de crecimiento EGF, representa una de estas formas de señales extracelulares (Pritchard, 2013). La familia de factores EGF pueden tener actividad mitogénica que ha sido explorada extensivamente en los sistemas de cultivo celular, su receptor ha sido caracterizado como un modelo prototipo para la transducción de señales que involucra a las tirosinas cinasas (Hawks & Levitt, 2017).

El EGF puede estimular a las células tumorales para producir una variedad de factores solubles inflamatorios, como IL-8, CXCL8, CXCL-12, IL-6 e IL-1, para quimioatraer células tumorales y leucocitos, como monocitos, neutrófilos o linfocitos, de la circulación a los tejidos tumorales, contribuyendo a la formación del ambiente inflamatorio (Huang *et al.*, 2014).

El *crosstalk* o comunicación cruzada, a través de estos factores, entre las células epiteliales y las mesenquimales, tiene un papel importante en la función y la morfogénesis de los tejidos (Kenny *et al.*, 2007). Uno de los factores solubles presentes en el TME más estudiados es el TGF- $\beta$ , sus efectos son complejos y pueden ser supresores o promotores de tumores (Weber & Kuo 2012); además, puede ser producido por las células tumorales propias o por las células estromales locales o infiltradas (Gajewski *et al.*, 2006).

En algunos casos, la protección de las células troncales cancerosas por el TME involucra a los fibroblastos asociados al cáncer (CAF, del inglés *Cancer Associated Fibroblasts*). Los CAF son componentes estromales activos del TME que pueden dirigir la progresión tumoral por medio de la secreción de factores solubles, modulan la composición de la matriz extracelular y se asocian con otros tipos celulares (Arneth, 2020).

### **2.2.2. Vesículas extracelulares**

Las EV son una familia heterogénea de vesículas limitadas por una bicapa lipídica que se originan a partir de endosomas o de la membrana plasmática (Abels & Breakefield, 2016), su membrana consiste de los componentes lipídicos como esfingomielina, colesterol y ceramidas, que influyen en la selección de las cargas, su secreción, estructura y señalización (Gurung *et al.*, 2021).

Su secreción es un proceso que parece estar conservado evolutivamente, ya que tanto las células procariotas como las eucariotas han mostrado liberar vesículas al ambiente extracelular (Colombo *et al.*, 2014). En el pasado, la ambigüedad de la nomenclatura de las vesículas resultó en el uso de diferentes términos como exosomas, microvesículas, vesículas desprendidas, ectosomas o micropartículas, y ahora han acordado llamar a esas vesículas como “vesículas extracelulares” (EV), las cuales fueron después sub-categorizadas en exosomas y microvesículas (MV), basándose principalmente en su biogénesis (Deep & Schlaepfer, 2016).

La mayoría de estudios sobre las EV han enfocado su atención sobre el subgrupo más pequeño, los exosomas, que tienen un diámetro aproximadamente entre 30 a 100 nm, expresando como marcadores algunas de las proteínas que participan en su biogénesis, mientras que las MV presentan un tamaño ampliamente heterogéneo, desde 50 nm hasta 10  $\mu$ m, expresan marcadores relacionados con

su biogénesis, donde participan proteínas presentes en la superficie celular (Bebelman *et al.*, 2018; Gustafson *et al.*, 2017).

Dentro del TME, los exosomas tienen un papel crítico facilitando la intercomunicación entre las células cancerosas y las células estromales. En el cáncer, los exosomas promueven la inflamación, la progresión tumoral, la angiogénesis y la metástasis. Dentro del TME, las condiciones de hipoxia exacerbaban la producción de exosomas por las células cancerosas y promueven la transdiferenciación de las células estromales en CAF (Anderson & Simon, 2020).

### **2.2.2.1. Biogénesis de las vesículas extracelulares**

Los exosomas son formados por el brote hacia adentro de la membrana limitante de los cuerpos multivesiculares (MVB, del inglés *Multi-vesicular Bodies*), llevando a la generación de vesículas intraluminales (ILVs). Después de la maduración de los endosomas tempranos a tardíos, los MVB se pueden fusionar con la membrana plasmática para liberar a las ILV (después referidas como exosomas) hacia el medio extracelular (Bebelman *et al.*, 2018).

El mecanismo mejor descrito para la formación de MVB y ILV es dirigido por el complejo de distribución (*sorting*) endosómico requerido para el transporte (ESCRT). El complejo ESCRT-0 reconoce a las proteínas ubiquitinadas en la membrana endosómica, mientras que los complejos ESCRT-I y ESCRT-II parecen ser los responsables de la deformación de la membrana en brotes, con las cargas seleccionadas, y subsecuentemente los componentes de ESCRT-III dirigen la escisión vesicular (Colombo *et al.*, 2014). Aunque también puede ocurrir la biogénesis de exosomas de manera independiente de la maquinaria ESCRT, a través de la conversión de esfingomiélin a ceramida mediante la esfingomiélinasa neutral tipo II (n-SMase), que estimula la curvatura negativa de la membrana endosómica para formar ILV (Tan *et al.*, 2020).

Las MV son liberadas de la superficie celular por un brote hacia el exterior y por la fisión de la membrana plasmática. Las MV son formadas por la redistribución de los fosfolípidos, el reposicionamiento de fosfatidilserinas a la cara externa de la membrana y por la contracción del sistema de miosina-actina (Petrovčíková *et al.*, 2018). Para permitir el brote de las MV, el factor 6 de ADP-ribosilación (ARF6) inicia una cascada de señalización que empieza con la activación de la fosfolipasa D (PLD, del inglés *Phospholipase D*), la cual recluta a la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK, del inglés *Extracellular Signal-Regulated Kinase*) a la membrana plasmática. ERK entonces fosforila y activa a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK, del inglés *Myosin Light-Chain Kinase*), la cual activa la liberación de las MV (Akers *et al.*, 2013).

### 2.2.2.2. Carga molecular de las vesículas extracelulares

Aunque sin importar su origen, todas las EV contienen o exponen en su superficie una multitud de biomoléculas que incluyen RNA, lípidos, proteínas y posiblemente DNA (Figura 1) (Bebelman *et al.*, 2018). Las EV llevan moléculas funcionales que son capaces de modificar el fenotipo de las células receptoras. Los exosomas son preferencialmente endocitados y pueden liberar sus contenidos mediante su fusión con la membrana de la célula receptora (Record *et al.*, 2018).

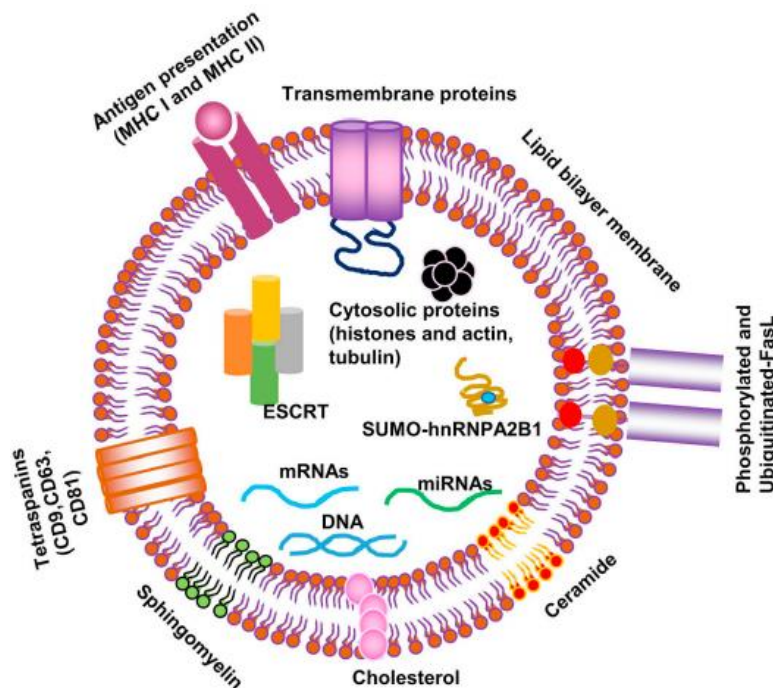


Figura 1. Contenido molecular de las EV. Tomado de Anand *et al.*, (2019).

Cabe destacar que la carga molecular es secuestrada y protegida de proteasas y nucleasas presentes en el espacio extracelular, por lo que estas EV tienen un potencial notable para transferir paquetes de información a las células blanco, de forma local y hacia sitios más distantes (D'Souza-Schorey & Schorey, 2018). La naturaleza y abundancia de las cargas de las EV son específicas del tipo celular y a menudo están influenciadas por el estado fisiológico o patológico de la célula donadora, así como por el estímulo que modula su producción y liberación, y por los mecanismos moleculares que llevan a su biogénesis (Niel *et al.*, 2018).

La actividad oncogénica de las EV no solo es dependiente de su carga intraluminal, sino que también del arreglo de las proteínas en la membrana de las EV (Jabalee *et al.*, 2018). Por ejemplo, los exosomas que provienen de las células cancerosas son capaces de reprogramar a los fibroblastos a través del TGF- $\beta$

presente en la superficie de las EV, induciendo su señalización dependiente de Smads, pero también los exosomas derivados de células cebadas del sistema inmune transportan al TGF- $\beta$  activo y latente en su superficie y puede llegar a endosomas de las células troncales mesenquimales (MSC) receptoras, cuando los exosomas son endocitados (Schubert & Boutros, 2020).

### **2.3. Factor de crecimiento transformante – beta (TGF- $\beta$ )**

Los miembros de la familia del TGF- $\beta$  son codificados por 33 genes que llevan a la expresión de polipéptidos estructuralmente relacionados, que corresponden a los precursores de los ligandos de esta familia. Los ligandos de la familia del TGF- $\beta$  son homodímeros o heterodímeros de la región C-terminal del polipéptido precursor, que están unidos por enlaces disulfuros. Esta familia incluye a los ligandos: TGF- $\beta$ , activinas, proteínas morfogenéticas de hueso (BMP, del inglés *Bone Morphogenetic Proteins*), Nodal y factores de crecimiento y diferenciación (GDF, del inglés *Growth Differentiation Factors*). La vía del TGF- $\beta$  estimula distintas redes de señalización involucradas en la determinación, crecimiento y diferenciación celular; además, algunos de sus miembros pueden inhibir el crecimiento e inducir apoptosis en un gran número de tipos celulares (Anaya *et al.*, 2016).

El TGF- $\beta$  induce una respuesta anti-proliferativa en muchos tipos de células, incluyendo a las células normales epiteliales y a algunas células transformadas. Al principio, algunos reportes indicaban que la inhibición del TGF- $\beta$  mejoraba la tumorigenicidad *in vivo* y algunas células tumorales se podían volver insensibles al TGF- $\beta$ . Por lo que se asumía que la desestabilización de la señalización del TGF- $\beta$  estaba implicada en la patogénesis del desarrollo tumoral. Sin embargo, posteriormente se observó que algunas células tumorales incrementaban la expresión de TGF- $\beta$ , más comúnmente de la isoforma TGF- $\beta$ 1, y su secreción (Morikawa *et al.*, 2016).

El TGF- $\beta$  es producido en exceso por las células tumorales, así como por las células Tregs, las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC, del inglés *Myeloid-Derived Suppressor Cells*) y por otras células estromales presentes en el TME. Así, los niveles patológicos del TGF- $\beta$  perjudican al sistema inmune innato y adaptativo de los pacientes con cáncer (Otegbeye *et al.*, 2018).

#### **2.3.1. Síntesis del TGF- $\beta$**

El TGF- $\beta$  es sintetizado como un precursor denominado pro-TGF- $\beta$ , seguido de su homodimerización, esta forma puede presentar un peso de alrededor de 125 kDa. El pro-TGF- $\beta$  dimérico es escindido en dos fragmentos por una convertasa del tipo



furina. El homodímero C-terminal corresponde al TGF- $\beta$  maduro, con un peso de alrededor de 25 kDa en su forma dimérica, mientras que el homodímero N-terminal es conocido como péptido asociado a la latencia (LAP, del inglés *Latent-Associated Peptide*), con un peso de alrededor de 80 kDa en su forma dimérica (Baillie *et al.*, 1996; Stockis *et al.*, 2009). Los residuos hidrofóbicos cerca del extremo NH<sub>2</sub> de LAP se unen al TGF- $\beta$  maduro y esta interacción es necesaria para mantener a la molécula en una conformación competente para la dimerización. Cabe mencionar que previo al procesamiento por la furina, los dos precursores se unen covalentemente por puentes disulfuro en sitios dentro del ligando maduro y de LAP, luego del corte por la furina continúan asociados para formar el complejo latente menor (SLC, del inglés *Small Latent Complex*), aunque LAP también se asocia covalentemente con las proteínas de unión al TGF- $\beta$  latente (LTBP, del inglés *Latent TGF- $\beta$ -Binding Proteins*) para formar el complejo latente grande (LLC, del inglés *Large Latent Complex*). En la ausencia de las LTBP, la cisteína reactiva (Cys33) dentro de LAP forma un enlace disulfuro apareado incorrectamente con una cisteína libre en el TGF- $\beta$  maduro, asegurándose de que el SLC sea secretado en forma inactiva (Walton *et al.*, 2010).

### **2.3.2. TGF- $\beta$ en estado latente unido al péptido asociado a latencia (LAP)**

LAP y TGF- $\beta$  son productos de un solo gen, que después de modificaciones post-traduccionales como la glicosilación, la fosforilación y la posterior escisión por la furina, permanecen asociados no covalentemente, formando el SLC (Carlson *et al.*, 2010). LAP se encuentra asociado no covalentemente con TGF- $\beta$  en un complejo inactivo en estado glicosilado. El complejo LAP-TGF- $\beta$  contiene tres sitios de N-glicosilación en los residuos de asparagina 82, 136 y 176. Algunos reportes muestran que la inhibición de la N-glicosilación con la tunicamicina o con un inhibidor de la manosidasa II, bloquea la secreción del TGF- $\beta$  en la línea celular de ovario de hámster chino CHO, mientras que una mutación en el segundo sitio de N-glicosilación de LAP-TGF- $\beta$  bloquea la secreción del TGF- $\beta$  maduro e inhibe su bioactividad en las células de riñón de embrión humano 293S (Zhang *et al.*, 2021).

Existe un mecanismo particular de activación del TGF- $\beta$  latente, que inicia por la unión del complejo latente de TGF- $\beta$  a la trombospondina 1 (TSP-1). Se ha sugerido que la TSP-1 se une al complejo LAP-TGF- $\beta$  cambiando su conformación y permitiendo que el TGF- $\beta$  se una con su receptor. Para que esto ocurra es indispensable la unión específica entre la TSP-1 y LAP (Senties-Gómez *et al.*, 2005).

### 2.3.3. Biodisponibilidad del TGF- $\beta$

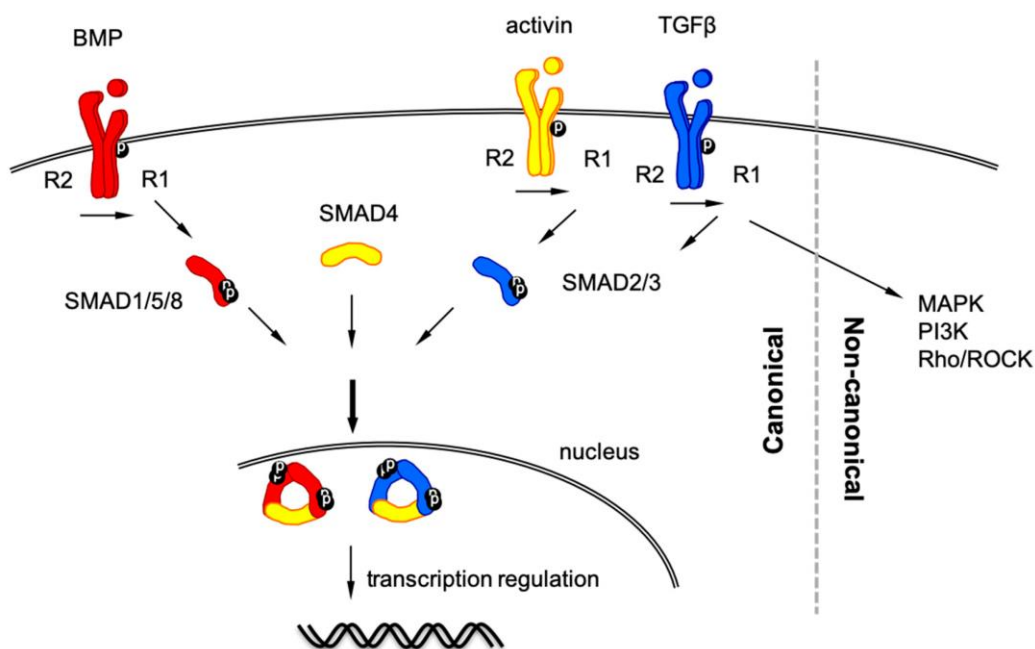
Una vez liberado, el TGF- $\beta$  maduro tiene una vida media corta y para estabilizarse puede unirse a otras proteínas como la  $\alpha$ -macroglobulina y la decorina, las cuales inhiben su actividad, o puede unirse a transportadoras como la albúmina y las IgGs (inmunoglobulinas G), que no interfieren con su actividad. Otras proteínas que se unen al TGF- $\beta$  incluyen al biglicano, al precursor  $\beta$ -amiloide y a la  $\alpha$ -fetoproteína, estas uniones podrían alterar la disponibilidad del TGF- $\beta$  para unirse a su receptor (Vilchis-Landeros *et al.*, 2002).

### 2.3.4. Vía de señalización del TGF- $\beta$

Todas las células normales y la mayoría de las células neoplásicas tienen receptores en su superficie para el TGF- $\beta$ . Los receptores tipo RI y RII son los responsables de los efectos biológicos del TGF- $\beta$  en las células de mamíferos, mientras que los receptores RIII, incluidos el betaglicano y la endoglina, son también capaces de unirse al TGF- $\beta$ . Los betaglicanos se unen a través de su región extracelular, poseen una región citoplasmática corta y una región intracelular que parece no participar en la transducción de la señal (Peralta-Zaragoza *et al.*, 2001).

Después de la unión del TGF- $\beta$  a sus receptores en la superficie celular, los receptores T $\beta$ RI y T $\beta$ RII se dimerizan (Javle *et al.*, 2014) y el T $\beta$ RII fosforila y activa al T $\beta$ RI. El complejo de receptores de TGF- $\beta$  activa la vía de señalización de las proteínas Smad, la cual incluye Smad2, Smad3 y Smad4, y a las cascadas de señalización independientes de Smad, como por ejemplo, PI3K (fosfoinositol 3-cinasa)/AKT (una proteína cinasa de serina/treonina), p38 MAPK (proteína cinasa activada por mitógeno), MAPK-ERK, JNK (cinasa del N-terminal de c-Jun), etc., para producir las respuestas del TGF- $\beta$  (Rojas *et al.*, 2009).

En la vía canónica, la unión del ligando al receptor conduce a la formación de un complejo de TGF- $\beta$ /receptores, lo que resulta en la fosforilación, mediada por T $\beta$ RI, de Smad2 y Smad3 en los dos últimos residuos de serina del motivo conservado de Ser-Ser-X-Ser (SSXS), localizado en el COOH terminal de las R-Smads (Smad2 y Smad3); la fosforilación de esos residuos de serina activa a las Smads y se favorece la formación de complejos con otros factores de transcripción. Smad2 y Smad3 fosforiladas se unen a la co-Smad (Smad4) y el complejo puede entonces translocarse al núcleo para funcionar como complejos de factores de transcripción (Figura 2) (Rojas *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Vía de señalización de la super familia de TGF- $\beta$ . Tomado de Itatani *et al.*, (2019).

### Vía de señalización del TGF-beta y el CRC

El TGF- $\beta$  tiene un papel importante manteniendo la integridad de la mucosa intestinal y estimulando el proceso de cicatrización de heridas en las mucosas, así como también se ha visto que promueve el cierre de heridas estimulando la síntesis de colágena (Mei & Xu, 2005). La pérdida selectiva de la señalización del TGF- $\beta$  en la mucosa del colon acelera la formación de focos de criptas aberrantes y acelera el desarrollo del cáncer de colon inducido por azoximetano, por lo que el mantenimiento de la señalización del TGF- $\beta$  en el colon es importante para regular la homeostasis en el intestino (Hahm *et al.*, 2002), como es el caso del TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y activina A, que inhiben fuertemente la proliferación de las células epiteliales del intestino, así como también se ha demostrado que TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 participan en la regulación de la homeostasis apoptótica del intestino. Smad3, un blanco clave de la señalización del TGF- $\beta$ , está implicado en el efecto citostático del TGF- $\beta$  en el intestino, el *knockdown* de Smad3 disminuye el efecto anti-proliferativo que tiene TGF- $\beta$  en el intestino, así como también se ha visto que Smad3 está asociado con la señalización de Akt regulando la apoptosis (Fink & Wrana, 2022).

En la mayoría de los casos la vía de señalización del TGF- $\beta$  es pro-apoptótica en las células de cáncer de colon. La apoptosis inducida por TGF- $\beta$  es mediada por la vía dependiente de Smad y las células tumorales escapan de la inhibición del

crecimiento a través de un aumento en la secreción de TGF- $\beta$ 2, induciendo la activación constitutiva de NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) (Ramamoorthi & Sivalingam, 2014).

La pérdida de función del T $\beta$ RII en el epitelio intestinal se ha asociado con la formación de cáncer intestinal, cooperando con *Kras* mutante para promover la formación de adenocarcinomas y metástasis (Trobridge *et al.*, 2009). También se ha encontrado que en células de cáncer de colon, la inactivación del receptor T $\beta$ RII resulta en la desregulación de múltiples procesos que afectan la tumorigénesis, incluyendo la angiogénesis, la proliferación, la diferenciación, la estabilidad cromosómica, el remodelamiento de la matriz extracelular, la senescencia, etc. (Calon *et al.*, 2012; Trobridge *et al.*, 2009). En ratones heterocigotos dobles que carecen de *Smad4* y de *APC* (Poliposis coli adenomatosa) se ha reportado un mayor desarrollo de tumores pancreáticos o intestinales; asimismo, la delección de *Smad2* acelera la progresión del cáncer de colon en ratones deficientes en *APC* (Luo, 2017).

Por otra parte, se ha reportado que las células de CRC pueden promover la progresión del cáncer a través de EV, llevando cargas que aumentan las propiedades invasoras de las células del CRC (Wang *et al.*, 2021). En estudios recientes se ha encontrado que las células del CRC también pueden secretar EV enriquecidas con TGF- $\beta$ , alterando a los linfocitos T a través de la activación de la señalización TGF- $\beta$ /Smad (Yamada *et al.*, 2016).

En otros modelos celulares, por ejemplo, el TGF- $\beta$ , para mediar sus efectos, puede ser transportado en la membrana de las EV, como ocurre en la levadura *Candida albicans*, que secreta  $\beta$ -glucanos que son reconocidos por el receptor CR3 de los monocitos, lo que conlleva a que estos monocitos secreten EV que portan al TGF- $\beta$ . En los vasos sanguíneos esas vesículas que transportan al TGF- $\beta$  inhiben la respuesta del sistema inmune (Andriantsitohaina & Papon, 2020). Además, las células tumorales pueden secretar exosomas al microambiente extracelular y en este proceso el TGF- $\beta$  puede afectar la invasión, migración y metástasis de las células tumorales de pulmón, modulando la carga que llevan los exosomas derivados de las células A549 (adenocarcinoma de pulmón humano). Los niveles de MiR-23a y  $\beta$ -catenina pueden ser incrementados por TGF- $\beta$  en los exosomas derivados de las células A549, mientras que los niveles de E-cadherina son disminuidos (Lai *et al.*, 2020).

#### **2.4. Proteínas portadoras de TGF- $\beta$**

Para que el TGF- $\beta$  vaya en la membrana de las EV debe estar unido a una proteína asociada a la membrana (Figura 3) (Webber *et al.*, 2010), así un candidato potencial es la endoglina, que es una proteína transmembranal

homodimérica que puede actuar como receptor accesorio para el TGF- $\beta$  y de esta manera puede mantener unido al TGF- $\beta$  a la superficie de las EV; en los resultados reportados por Meurer *et al.* (2019), se sugiere que la N-glicosilación de la endoglina es importante para su localización en los exosomas.

Otra de las proteínas que pueden estar asociadas al TGF- $\beta$  en la superficie membranal son las integrinas. La mayoría de las integrinas se unen a componentes de la matriz extracelular, mientras que otras participan en las interacciones célula-célula (Flier & Sonnenberg, 2001). Las integrinas  $\alpha v$  reconocen un motivo RGD presente en la proteína LAP del TGF- $\beta$  latente. La secuencia RGD fue identificada como un motivo de unión a integrinas en general. La unión de LAP a las integrinas induce que las fuerzas celulares mediadas por la adhesión acerquen al TGF- $\beta$  latente hacia la proximidad de MMPs, las cuales consecuentemente llevan a la liberación/activación del TGF- $\beta$  de su complejo latente. Tras su activación, el TGF- $\beta$  se une al receptor T $\beta$ RII iniciando la cascada de señalización (Takada *et al.*, 2007; Mamuya & Duncan, 2011).

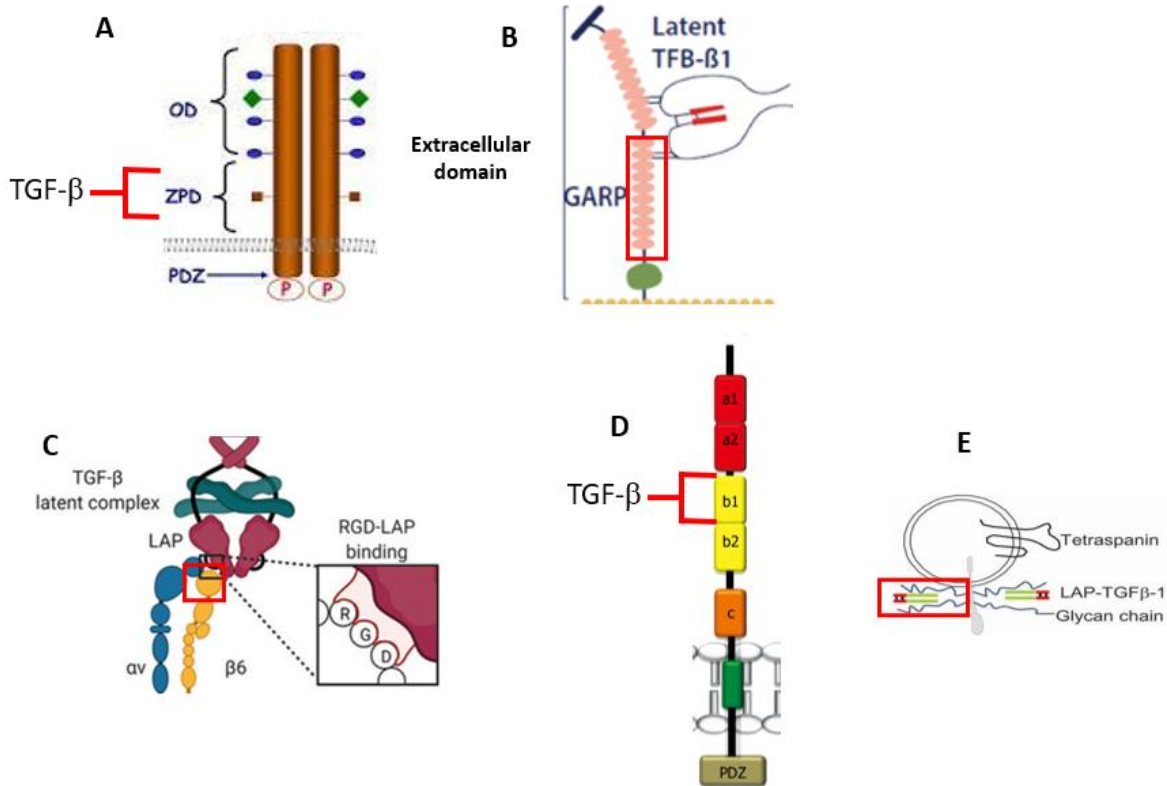
Se ha demostrado que las integrinas  $\alpha v\beta 6$  y  $\alpha v\beta 8$ , al unirse al motivo RGD en LAP, son las principales integrinas que activan al TGF- $\beta$ ; ya sea por cambios alostéricos en TGF- $\beta$ -LAP ( $\alpha v\beta 6$ ) o al inducir a la MMP14 y causando la liberación proteolítica de TGF- $\beta$  ( $\alpha v\beta 8$ ) al cortar a LAP (Barczyk *et al.*, 2009).

En años recientes, se ha mostrado que las neuropilinas son co-receptores con la habilidad de unirse a diferentes familias de proteínas, como el TGF- $\beta$ , y mediante su dominio 1b se unen tanto a su forma activa como a la forma latente y promueven su afinidad por los receptores del TGF- $\beta$  (Glinka, & Prud'homme, 2008; Elpek, 2015). La cola citoplasmática de la neuropilina 1 (Nrp1) carece de actividad catalítica, sugiriendo que Nrp1 transduce señales en la vasculatura a través de un co-receptor. Esto puede ser análogo a como Nrp1 trasmite las señales de semaforina en el sistema nervioso, donde las plexinas tipo A funcionan como co-receptores de Nrp1 y como transductoras de señal (Plein *et al.*, 2014). Nrp1 funciona como un co-receptor para el TGF- $\beta$  y puede mediar su señalización. Se ha demostrado que tras la estimulación del TGF- $\beta$ , Nrp1 es capaz de regular la señalización diferencial de Smad y por lo tanto los fenotipos de los miofibroblastos. Nrp1 también tiene papeles duales en el cáncer, hallazgos recientes han provisto información acerca de los mecanismos de la regulación del TGF- $\beta$  por medio de Nrp1 (Vivekanandhan & Mukhopadhyay, 2019).

De manera similar a las neuropilinas, se ha reportado que los sindecanos de la familia de proteoglicanos de heparán sulfato se unen a diversas proteínas encontradas en el microambiente celular, como los componentes de la matriz extracelular, factores de crecimiento, moléculas de adhesión, enzimas lipolíticas, inhibidores de proteasas y lipoproteínas circundantes, algunas de esas interacciones son requeridas para la función de las proteínas, teniendo la

capacidad de poder actuar como co-receptores del TGF- $\beta$  y regular su señal a través de su ectodominio (Bernfield *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2004). El sindecano-1 y el betaglicano son proteoglicanos que contienen un dominio extracelular grande, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático corto que carece de actividad cinasa, el dominio extracelular del betaglicano contiene un dominio de zona pelúcida que es importante para la polimerización de la proteína y para las interacciones proteína-proteína. Específicamente, el dominio ZP del betaglicano contiene dos sitios de unión distintos para el TGF- $\beta$ : uno en la región distal de la membrana (ZP1) y otro en la región próxima a la membrana (ZP2) (Jenkins *et al.*, 2018; Yoneda & Couchman, 2003).

Otro tipo de proteína que se ha encontrado asociada al TGF- $\beta$  es la glicoproteína GARP, un tipo de receptor de acoplamiento transmembranal que, junto con las integrinas, actúan como mediadores de la activación y disponibilidad del TGF- $\beta$  mediante su unión al complejo LAP-TGF- $\beta$  (Robertson, & Rifkin, 2013; Metelli *et al.*, 2018). Después de la síntesis del SLC en el retículo endoplásmico, se forman los enlaces disulfuro que unen una molécula de GARP a LAP-TGF- $\beta$ . Estos enlaces disulfuro ocurren entre la Cys33 de LAP y las Cys192 y Cys331 de GARP. Ambas formas latentes (pro o latente) se encuentran asociadas a GARP, sugiriendo que la edición de pro-TGF- $\beta$  por furina puede ocurrir en complejos preformados de GARP/pro-TGF- $\beta$  (Stockis *et al.*, 2017). Aunque se forman enlaces disulfuro entre GARP y el TGF- $\beta$ , en experimentos en donde se han mutado a las cisteínas 192 y 331 a alaninas, se ha demostrado que GARP todavía puede unirse a TGF- $\beta$ , aunque estos enlaces disulfuro siguen siendo necesarios para la activación. La forma soluble de GARP también puede formar un complejo con LAP-TGF- $\beta$ , aunque en esta forma soluble es incapaz de apoyar la activación de TGF- $\beta$  mediada por las integrinas, sugiriendo que la forma transmembranal de GARP es necesaria para activación de TGF- $\beta$  (Sun *et al.*, 2016).



**Figura 3.** Sitios de unión entre TGF- $\beta$  y proteínas transmembranales. (A) Se ha reportado que TGF- $\beta$  se puede unir al dominio ZP del betaglicano (Jenkins *et al.*, 2018). (B) LAP-TGF- $\beta$  puede unirse a GARP en su dominio extracelular rico en motivos de leucina (Metelli *et al.*, 2018). (C) Las integrinas reconocen el motivo RGD de LAP-TGF- $\beta$  (Kossatz *et al.*, 2021). (D) TGF- $\beta$  se puede unir a las neuropilinas en su dominio 1b (Elpek, 2015). (E) LAP-TGF- $\beta$  puede unirse a proteoglicanos de heparán sulfato mediante cadenas de glicano (Shelke *et al.*, 2019).

### 3. Antecedentes

En la actualidad, el CRC ocupa el tercer lugar en incidencia y el segundo en mortalidad por cáncer a nivel global, los tratamientos actuales son efectivos cuando el cáncer es detectado en las primeras etapas, pero una vez que el CRC ha metastatizado las estrategias terapéuticas se vuelven desfavorables, es en este estado cuando se asocia la progresión metastásica con la desregulación de la vía del TGF- $\beta$ , promoviendo un fenotipo más agresivo (Itatani *et al.*, 2019).

El CRC es una enfermedad compleja que prospera en un TME heterogéneo y adaptativo. Cuando se comparan los componentes del TME, los adenocarcinomas de colon presentan una gran complejidad heterotípica, lo que causa un incremento en la activación de vías de señalización que no estaban presentes en el colon normal o saludable. Como tal, el TME representa una entidad patológica que

evoluciona a través de la progresión del cáncer, sentando las redes de comunicación intercelular (AlMusawi *et al.*, 2021).

Cada vez más líneas de investigación han revelado el papel crítico de las EV en el establecimiento y mantenimiento del TME, incluyendo el sostenimiento de la proliferación celular, la evasión de la supresión del crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la adquisición de inestabilidad genómica y la reprogramación de líneas celulares estromales, contribuyendo conjuntamente a la generación del TME remodelado funcionalmente (Han *et al.*, 2019). Por otra parte, las interacciones entre las células tumorales y el estroma mediado por las integrinas y los factores solubles, llevan a la activación de vías de supervivencia e incrementan la expresión de las proteínas anti-apoptóticas en las células tumorales, promoviendo la viabilidad celular y la resistencia a fármacos (Wu & Dai, 2017).

Las líneas celulares SW480 y SW620 son un modelo que representa al CRC clasificado como CMS4, que se caracteriza por una alta actividad de la vía de señalización del TGF- $\beta$ . La línea celular de tipo epitelial no metastásica SW480 fue generada de un adenocarcinoma primario de colon, mientras que la línea celular metastásica de tipo fibroblástica SW620 fue establecida varios meses después de un nódulo linfático del mismo paciente, después de que el tumor había metastatizado, estos dos linajes proveen un modelo celular de malignidad y progresión del cáncer colorrectal (López-Cortés *et al.*, 2022).

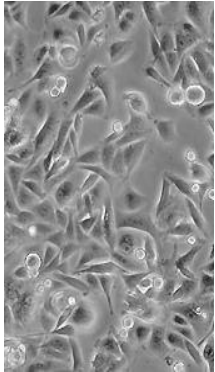
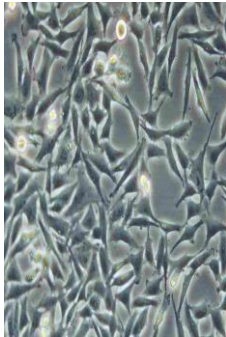
Las células SW620 han mostrado tener un fenotipo más agresivo que las células SW480, además presentan características metastásicas y tienen un índice de crecimiento más alto, también se ha visto en ensayos *in vitro* que secretan niveles más elevados de VEGF y MMPs que las células SW480, que se encuentra relacionado con etapas avanzadas del cáncer (Hewitt *et al.*, 2000). Se han realizado estudios sobre la secreción del TGF- $\beta$  en vesículas provenientes de CRC, pero han sido en las líneas celulares DLD-1 y WiDr, que corresponden a los subtipos CMS1 y CMS3, respectivamente, mientras que no se han realizado estudios para detectar la presencia del TGF- $\beta$  en EV secretadas por células que correspondan al CMS4, el cual es considerado el más agresivo y en el que la desregulación de la vía del TGF- $\beta$  es la característica más importante de este subtipo molecular (Yamada *et al.*, 2016; Pramit *et al.*, 2021).

Se han descrito algunas de las características de las células SW480 y de las células SW620 (ATCC, 2020), entre las que se incluyen algunas alteraciones en componentes de la vía de señalización del TGF- $\beta$ , ya que en ambas líneas células ocurre la pérdida de heterocigosidad (LOH, del inglés *Loss of Heterocigosity*) en el cromosoma 18, lo que lleva a la inactivación del gen *Smad4*, una pérdida característica en el CRC, aunque a diferencia de las células SW480, las células SW620 presentan el fenotipo metilador de islas CpG (CIMP, del inglés *CpG Island Methylator Phenotype*) (Tabla 1), lo que conlleva a la hipermetilación y el



consecuente apagado de genes supresores de tumores (Mare *et al.*, 2017; Mojarad *et al.*, 2013; Mouradov *et al.*, 2014).

**Tabla 1. Características y componentes de la vía del TGF- $\beta$  entre las líneas celulares SW480 y SW620**

Línea celular	Morfología	Tipo de tumor	Oncogenes	TGF- $\beta$ 1	T $\beta$ RII	Smad4	Smad2/3	Evento molecular carcinogénico
SW480		Primario	myc +; myb +; ras +; fos +; sis +; abl -; ros -; src - RAS (G12V), TP53 (R273H/P309S)	2.5 ng/mL (100 pM)	Expresa el doble que SW620	No se expresa	Expresa menor cantidad de Smad2/2 nuclear que SW620	Inestabilidad cromosómica: LOH 18q
SW620		Secundario	myc +; myb +; ras +; fos +; sis +; abl -; ros -; src - RAS (G12V), TP53 (R273H/P309S)	2.1 ng/mL (84 pM)	Expresa menor cantidad que SW480	No se expresa	Expresa una mayor cantidad de Smad2/3 nuclear que SW480	Inestabilidad cromosómica: LOH 18q CIMP

Como modelo de estudio, las células SW620 pueden ser cultivadas en 2D o 3D. En los cultivos 2D en monocapa, las células crecen en superficies planas sólidas, que carecen de las interacciones entre célula y célula y célula-ECM que están presentes en los tumores sólidos, mientras que en los cultivos 3D de esferoides, estas interacciones están presentes, por lo que en general, estas características muestran las ventajas de usar cultivos 3D, ya que en ellos el efecto del TME está mejor representado (Nath & Devi, 2016).

Recientemente, algunos estudios han sugerido que la eficiencia de la secreción de exosomas puede ser aumentada al pre-condicionar a las células, como la

exposición a la hipoxia, como en los cultivos en esferoides, por lo que estas condiciones pueden aumentar el rendimiento de exosomas (Kim *et al.*, 2018). Los cultivos en esferoides están fisiológicamente más relacionados a los tejidos tumorales que los cultivos en monocapa, por lo que las células cancerosas cultivadas en esferoides pueden secretar más exosomas que su cultivo en monocapa, así como mostrar diferentes propiedades en cuanto a la expresión de proteínas en exosomas (Tu *et al.*, 2021).

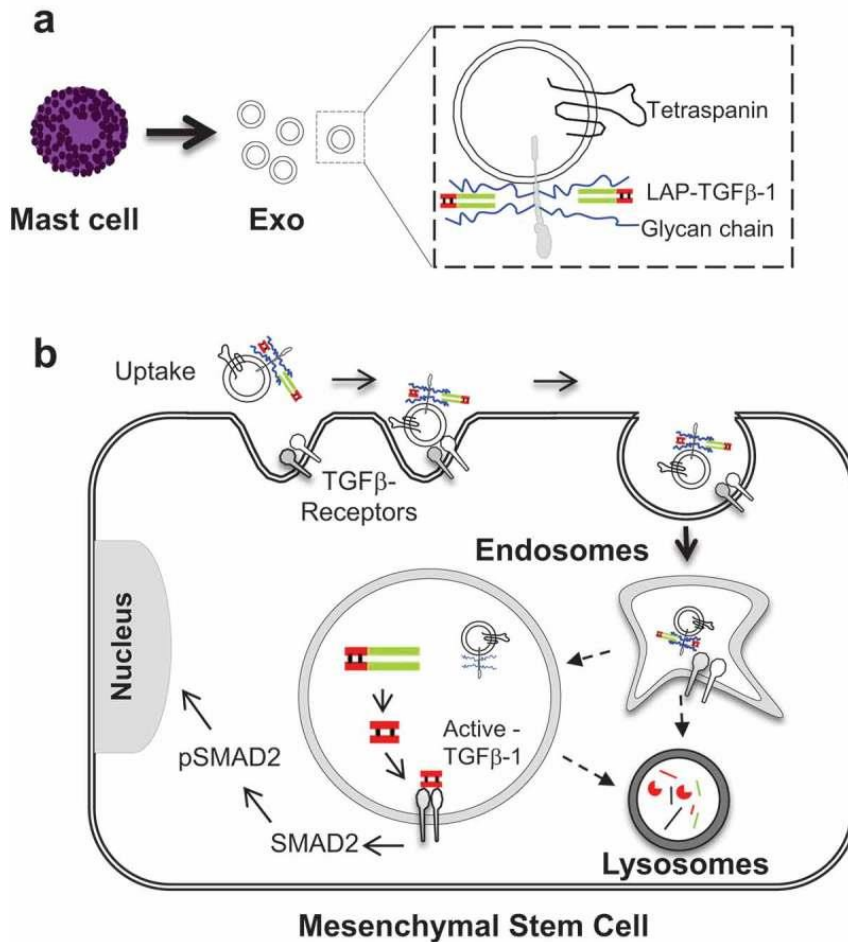
El TGF- $\beta$  es una citocina que puede ser secretada por las células cancerosas en estado activo o latente, pero su presencia en estado activo está relacionada con la progresión tumoral, las células cancerosas pueden expresar distintas proteínas que pueden promover a la activación del TGF- $\beta$  una vez que es secretado (Sasaki *et al.*, 2001).

También puede ser secretado en forma soluble o presente en EV, pero cuando es secretado en EV, puede prolongar su señalización celular en comparación con su forma soluble, así como también se ha visto que cuando se secreta en EV, puede promover la progresión tumoral al aumentar el fenotipo migratorio de las células recipientes (Shelke *et al.*, 2019).

El TGF- $\beta$  también funciona como un supresor tumoral que inhibe la proliferación celular e induce apoptosis, pero en el CRC las células cancerosas evaden los efectos supresores de tumores del TGF- $\beta$  y en su lugar esta citocina actúa como una promotora tumoral y se encuentra altamente expresada (Xu & Pasche, 2007).

La forma soluble de TGF- $\beta$  ha sido el principal objetivo en las investigaciones de esta citocina, mostrando tener un efecto supresor del sistema inmune en etapas avanzadas del cáncer, promoviendo la diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> hacia células Tregs, aunque recientemente también se ha visto que el TGF- $\beta$  en su formada unida a la membrana celular, puede promover la supresión del sistema inmune (Yang *et al.*, 2013), mientras que en EV de CRC, Yamada *et al.*, (2016) reportaron que el TGF- $\beta$  secretado en exosomas también puede promover la diferenciación de las células T hacia Tregs, promoviendo un ambiente inmunosupresor.

El TGF- $\beta$  puede ser portado en la superficie de las EV por medio de proteínas transmembranales (Figura 4), como proteoglicanos (Shelke *et al.*, 2019; Webber *et al.*, 2010), neuropilinas (Vivekanandhan & Mukhopadhyay, 2019), GARP (Metelli *et al.*, 2018; Stockis *et al.*, 2017), o integrinas (Barczyk *et al.*, 2009), aunque aún hacen falta más estudios sobre estas proteínas que pueden portar al TGF- $\beta$ .



**Figura 4.** Secreción de exosomas que llevan a TGF- $\beta$ 1. (a) las células cebadas pueden secretar exosomas que lleven al complejo LAP-TGF- $\beta$ 1 en su superficie membranal. (b) Los exosomas son endocitados por las MSC donde TGF- $\beta$ 1 puede evadir su degradación por los lisosomas, liberarse de su complejo latente y comenzar con su vía de señalización. Tomado de Shelke *et al.*, (2019).

#### 4. Planteamiento del problema

La progresión del CRC depende de la comunicación intercelular en el TME, la cual es mediada principalmente por citocinas secretadas de forma soluble y en vesículas extracelulares, como por ejemplo la citocina TGF- $\beta$ . Esta citocina tiene propiedades promotoras de tumores en etapas avanzadas del cáncer, así como también se ha visto que su presencia en EV puede regular el enriquecimiento de moléculas que favorecen este crecimiento tumoral, por lo que entre los temas importantes por investigar se encuentra la caracterización de la secreción del TGF- $\beta$  por las células de CRC con propiedades metastásicas como las del tipo CMS4. El TGF- $\beta$  puede ser secretado de forma latente o activa, pero su secreción

en estado activo está relacionada con un estado tumoral más avanzado, mientras que su secreción mediante EV puede prolongar su señalización y se ha reportado que esta secreción puede promover la progresión tumoral. Además, es importante estudiar si las distintas condiciones de cultivo (2D vs 3D) de las células cancerosas pueden promover una secreción diferencial de la citocina TGF- $\beta$ , en cuanto a su actividad (activo vs latente) y solubilidad (soluble vs vesiculado), ya que se ha reportado que los cultivos 3D representan mejor el TME a diferencia de los cultivos 2D, mostrando tener mejores interacciones entre las células y su entorno a diferencia de los cultivos 2D, por otra parte se ha reportado que en cultivos 3D se puede propiciar un aumento de secreción de exosomas debido a las condiciones de las células.

## **5. Hipótesis**

Debido a que el cultivo en esferoides (3D) representa mejor al TME y a un estado más avanzado del cáncer, el cultivo 3D las células metastásicas de cáncer colorrectal SW620 favorecerá una secreción preferencial de la citocina TGF- $\beta$  en estado activo más que latente y en vesículas extracelulares más que en su forma soluble, en comparación con su cultivo en monocapa (2D).

## **6. Objetivo general**

Estudiar el mecanismo de secreción y la actividad de la citocina TGF- $\beta$  por células metastásicas de cáncer colorrectal SW620.

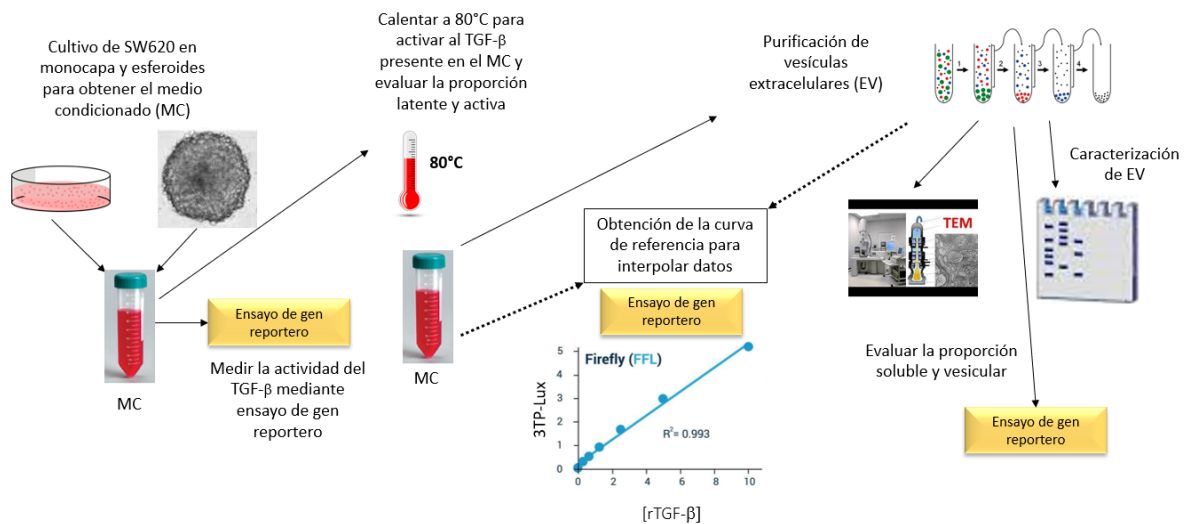
## **7. Objetivos particulares**

- 7.1.** Análisis bibliográfico sobre las proteínas portadoras de TGF- $\beta$  (Receptores, co-receptores, GARP, integrinas, neuropilinas y proteoglicanos, entre otras) presentes en células cancerosas y en las vesículas extracelulares secretadas por células cancerosas.
- 7.2.** Determinar si las células SW620 secretan al TGF- $\beta$  en estado latente o activo, en cultivos en monocapa.
- 7.3.** Determinar si las células SW620 secretan al TGF- $\beta$  en estado latente o activo, en cultivos en esferoides.
- 7.4.** Investigar si las células SW620 secretan al TGF- $\beta$  en forma soluble o en vesículas extracelulares del tipo exosomas, en cultivos en monocapa.
- 7.5.** Investigar si las células SW620 secretan al TGF- $\beta$  en forma soluble o en vesículas extracelulares del tipo exosomas, en cultivos en esferoides.

## 8. Materiales y Métodos

### Estrategia experimental

Para la realización de los experimentos se llevó a cabo una estrategia experimental, donde de manera resumida se muestran los pasos de la experimentación del proyecto como se observa en la siguiente figura.



**Estrategia experimental.** Se usaron cultivos celulares de SW620 en monocapa y en esferoides, para obtener el medio condicionado y medir la actividad del TGF- $\beta$  mediante ensayos de gen reportero; además, los MC se activaron por calor para determinar la proporción latente y activa del TGF- $\beta$ . Este MC también se usó para la purificación de EV mediante centrifugación diferencial. Se caracterizaron a estas EV mediante la detección de marcadores usando la técnica de Western blot, así como también por su morfología mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Estas EV fueron usadas como estímulo, para evaluar mediante un ensayo de gen reportero la actividad del TGF- $\beta$  que presentan. Se realizaron curvas de referencia tipo curva dosis-respuesta con TGF- $\beta$  recombinante, para interpolar los datos obtenidos y de manera semi-cuantitativa determinar la actividad del TGF- $\beta$  presente en estos MC y en las EV.

#### 8.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las células de cáncer de colon humano de la línea celular SW620 de tumor secundario, fueron adquiridas de ATCC® por la Dra. Martha Robles Flores (Facultad de Medicina, UNAM); esta línea fue extraída de un paciente cuando el tumor ya había metastatizado a los ganglios (Siekmann, *et al.*, 2019). Las células se sembraron en cajas de cultivo Petri de 10 cm de diámetro (Corning), se

cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco-F12 (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO™) con suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*, GIBCO™) al 10%, penicilina 100U/mL y estreptomicina 100µg/mL.

Para los ensayos de gen reportero se usaron a las células AD293 que nos proporcionó la Dra. Angeles C. Tecalco Cruz (UACM), las cuales son una clona derivada de las células de la línea celular HEK293 de riñón de embrión humano, que fueron mantenidas con medio DMEM bajo en glucosa, con FBS al 10%, penicilina 100U/mL y estreptomicina 100µg/mL. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, las células fueron usadas cuando alcanzaron una densidad del 90%.

## **8.2. Medios condicionados**

Para la obtención de EV y para medir la actividad del TGF-β secretado por las células SW620, estas fueron cultivadas en monocapa y una vez que alcanzaron una densidad del 80-90%, fueron puestas en ayuno de 24 h (medio DMEM-F12 sin FBS), luego se recolectó el medio al que se le denominó como “Medio Condicionado (MC)”. Para la obtención de los MC de las células SW620 cultivadas en esferoides, las células SW620 se sembraron en placas de baja adherencia con medio de crecimiento para esferoides (DMEM-F12, B27 1x ThermoFisher™, EGF 20ng/mL, ampicilina 100U/mL y estreptomicina 100µg/mL) sin FBS, por alrededor de 11 días y después se colectó el MC.

Los MC obtenidos se usaron para detectar la actividad del TGF-β secretado por las células SW620, por lo que se usaron como estímulo para las células AD293, con el fin de evaluar la activación de la vía del TGF-β en estas células mediante ensayos de luciferasa, así como también los MC se usaron para el aislamiento de EV que se caracterizaron por Western Blot (WB).

## **8.3. Esferoides tumorales**

Los MC y los lisados totales de esferoides tumorales fueron obtenidos por la M. en C. Ángela Patricia Moreno Londoño del laboratorio de la Dra. Martha Robles Flores (Facultad de Medicina, UNAM). El procedimiento para la formación de esferoides tumorales fue el siguiente:

Se sembraron células SW620 en cajas de cultivo Petri, una vez que las células proliferaron en las cajas de cultivo se les retiró el medio. Posteriormente se les agregó PBS (*Phosphate buffered saline*) para lavar las células, luego se les adicionó tripsina (0.25%) y se colectaron a las células por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron a las células

en medio DMEM-F12 sin FBS, se contaron las células y se sembraron 200,000 células en placas de baja adherencia con medio de crecimiento para esferoides.

Para mantener a las células en cultivo se les adicionó medio cada 3 o 4 días durante el tiempo de formación de esferoides, después de 10 a 11 días las células con el medio se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min, el sobrenadante fue usado como MC de esferoides y el pellet se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min, en este caso el pellet consiste en las células de los esferoides y fueron lisadas con buffer de lisis RIPA (*Radioimmunoprecipitation Assay*), los MC y los lisados celulares fueron almacenados a 4 y -20°C, respectivamente.

#### **8.4. Purificación y caracterización de las vesículas extracelulares (EV)**

Se purificaron EV por dos métodos distintos, el primero consistió en la obtención de EV mediante centrifugación diferencial y fueron caracterizadas por WB y microscopía electrónica de transmisión (TEM, *Transmission electron microscopy*) como exosomas y usadas para ensayos de actividad de luciferasa. Por otra parte, se purificaron EV mediante ultrafiltración junto con cromatografía por exclusión molecular (Benedikter *et al.*, 2017), por la Dra. Cynthia Paola López Pacheco del laboratorio de la Dra. María Gloria Soldevila. Estas EV fueron también usadas en ensayos de gen reportero.

##### **8.4.1. Centrifugación diferencial**

La purificación de exosomas de las células SW620 cultivadas en monocapa y en esferoides se realizó mediante una centrifugación diferencial para obtener a los exosomas a partir de los MC. Dicho protocolo consiste en una centrifugación inicial a 300 xg durante 10 min para sedimentar células no adheridas y se descarta el pellet, se realizó otra centrifugación a 2,000 xg durante 30 min para eliminar cuerpos apoptóticos descartando el pellet, después una tercera centrifugación a 10,000 xg durante 30 min para eliminar detritos celulares y el pellet se descartó. El sobrenadante después se ultracentrifugó a 100,000 xg durante 70 min para sedimentar a los exosomas. El pellet se lavó con PBS mediante otra ultracentrifugación a 100,000 xg durante 70 min, posteriormente se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 40µL de PBS. Los exosomas obtenidos se preservaron a -70°C, como se describió previamente (Théry *et al.*, 2006).

##### **8.4.2. Ultrafiltración y cromatografía por exclusión molecular**

#### **8.4.2.1. Pre-tratamiento de la sefarosa CL-2B**

Se colocaron de 20-40 mL de sefarosa en un recipiente de plástico estéril y se dejó sedimentar durante 15 min. Se desechó el diluyente con pipeta Pasteur, se agregaron 15 mL de buffer (PBS-Citrato de sodio 0.32% filtrado) y se mezcló gentilmente para lavar la sefarosa. Se esperó nuevamente a que sedimentara durante 15 min y se repitió el procedimiento 2 veces más. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 10 mL de buffer nuevo. Se mantuvo a 4°C.

#### **8.4.2.2. Preparación de la columna**

Se preparó la columna momentos previos a su uso. Se cortó 1 cm<sup>2</sup> de media de nylon esterilizada por radiación UV. La media se introdujo con guantes estériles dentro de la columna, por la parte de abajo formando un tapón. (Jeringa 10 mL Syringe, marca BD). Se colocó una llave de 3 vías en la boquilla de la jeringa y se aseguró que se encontrara bien cerrada. Se llenó la columna hasta la marca de 10 mL y se dejó que sedimentara, luego se repitió el procedimiento hasta que sedimentada llegó a 10 mL. Se mantuvo húmeda la columna con buffer todo el tiempo. El buffer para empacar es el PBS/Citrato 0.32% con antibiótico-antimicótico 1X filtrado con filtros de 0.1 µm. Se realizaron 2 lavados de la columna (4 mL) con el disolvente de la muestra (PBS IX con antibiótico-antimicótico 1X filtrado 0.1 µm).

#### **8.4.2.3. Aislamiento de EV**

Para la obtención de las EV menores de 200 nm, se filtró la muestra del MC con un filtro de polietersulfona con un poro de 0.2 µm, en caso contrario, cuando se analizaron partículas pequeñas y mayores a 200 nm, se omitió este paso y se realizó una centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. Se colocó el MC en tubos de ultrafiltración (Amicon Millipore) de 15 mL y se centrifugó a 3100 xg y 4°C durante 30 min. Se recuperó un volumen de aproximadamente 200 µL con ayuda de una sonda o con pipeta de 200 µL. Se colectó el sobrenadante y se resuspendió en un volumen final de 1.5 mL. Una vez empacada y lista la columna de sefarosa, con la llave cerrada, se dejó el volumen del diluyente con el menisco en 10 mL y se colocó entonces 1.5 mL de la muestra. A partir de este momento se dejó abierta la llave y se comenzaron a colectar fracciones de 500 µL cada una en tubos cónicos. Cuando se alcanzó el volumen de 1.5 mL en el tubo cónico, se cerró la llave y se reemplazó en la parte superior de la columna con más diluyente. Se abrió nuevamente la llave y se siguieron colectando las fracciones. Las



fracciones de interés son diferentes dependiendo del tipo de muestra. Esto se estableció en los primeros experimentos mediante análisis de rastreo de nanopartículas con un Nanosight. Se siguió el procedimiento hasta haber pasado 26 fracciones, para asegurar que las lipoproteínas de alta densidad se hubieran eluido.

## 8.5. Determinación de la actividad del TGF- $\beta$

### Ensayo de luciferasa

Para detectar al TGF- $\beta$  presente en los MC y en las EV, se utilizó un ensayo de gen reportero acoplado a la actividad de luciferasa. Se usaron a las células AD293 transfectadas establemente con los plásmidos reporteros 3TP-Lux (Wrana *et al.*, 1992) o 9xCAGA-Luc mediante el método de lipofectamina (Invitrogen). Las células AD293 expresando establemente a cada gen reportero fueron sembradas en cajas de cultivo Petri de 10 cm de diámetro y se mantuvieron en medio DMEM bajo en glucosa con FBS al 10%. Después de alcanzar el 80-90% de densidad, se les agregó tripsina (0.25%) para remover el FBS residual de las células, se les retiró y se les agregó nuevamente tripsina (0.25%), se incubaron durante 3 min y posteriormente se les agregó medio DMEM bajo en glucosa con FBS al 10%.

Se procedió al conteo celular usando un hemocitómetro y se sembraron 103,000 células por pozo en placas de cultivo de 12 pozos, que se mantuvieron en medio DMEM bajo en glucosa con FBS al 10%. Después de 24 h se les retiró el medio y se mantuvieron por 2-3 h en ayuno con medio DMEM bajo en glucosa sin FBS. Posteriormente se estimuló a las células en distintas condiciones: TGF- $\beta$ , SB431542 (10 $\mu$ M), MC, MCA (Medio condicionado activado por calor), suplemento B27 (Thermofisher), B27 activado por calor, B27+EGF, B27+EGF activado por calor, EV, EV activadas por calor, exosomas, exosomas activados por calor. Las condiciones activadas por calor se calentaron a 80°C durante 5 min para desnaturalizar a LAP y liberar al TGF- $\beta$  (Brown *et al.*, 1990). También se usó como estímulo el sobrenadante de los pasos de la centrifugación diferencial.

Para los ensayos con el TGF- $\beta$  recombinante, se realizaron diluciones seriadas de las concentraciones desde 200 pM hasta 3.125 pM. Para el inhibidor SB431542 se usó a una concentración de 10  $\mu$ M y se adicionó a las células 30 min antes de la respectiva estimulación, para la activación de los MC, B27, B27+EGF, EV y exosomas, estos fueron previamente calentados a 80°C durante 5 min y enfriados a temperatura ambiente.

Después de 24 h de estimulación, a las células se les retiró el medio, se lavaron las células con PBS frío, se les retiró el PBS y se les agregó buffer de lisis (kit de

Promega). Las células fueron lisadas con ayuda de una espátula para lisis y los lisados totales fueron transferidos a microtubos de 0.6mL de capacidad (todo el procedimiento se realizó en hielo para mantener a las células y lisados totales en frío). Los lisados se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante en microtubos de 1.5 mL de capacidad. Se añadió el sustrato para la enzima luciferasa (kit de Promega) con una alícuota de los sobrenadantes de extractos celulares y finalmente se procedió a medir la actividad de luciferasa en el luminómetro (Turner Biosystems).

## **8.6. Extractos de proteínas y ensayos de Western Blot**

Para la identificación de la activación de la vía del TGF- $\beta$  en las células AD293 se realizó un ensayo tipo WB. Se sembraron células AD293-WT en cajas Petri de cultivo y se mantuvieron con medio DMEM-F12 bajo en glucosa con FBS al 10%. Cuando alcanzaron el 80-90% de densidad se les retiró el medio y se dejaron en ayuno con medio DMEM-F12 bajo en glucosa (sin FBS) durante toda la noche. Posteriormente las células fueron estimuladas durante 45 min con rTGF- $\beta$  en concentraciones de 300/200/100/50/25/12.5/6.12 pM, así como también fueron estimuladas con 1mL de MA, MA+SB431542 (10  $\mu$ M), MC y MCA de esferoides. Posterior a los 45 min de estimulación, a las células se les retiró el medio y se lavaron con PBS frío y luego se les agregó buffer de lisis TNTE (Tris-NaCl-Tritón-EDTA) junto con un coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (los inhibidores y concentraciones se encuentran en el Anexo I). Las células se lisaron con ayuda de una espátula para lisis y los extractos fueron transferidos a microtubos de 1.5mL de volumen, se centrifugaron los lisados a 13,000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se pasó a microtubos nuevos.

Para la cuantificación de proteínas se realizó una curva patrón con BSA (del inglés *Bovine Serum Albumin*) por el método de Bradford (BioRad). Se agregaron concentraciones conocidas de BSA en una escala de 2 a 12  $\mu$ g/mL, se adicionó 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford y H<sub>2</sub>O hasta completar 1mL de volumen; posteriormente, se procedió a su lectura en un espectrofotómetro a 595 nm y se graficó la curva patrón en Excel. Para conocer los niveles de proteína de los extractos celulares se añadieron 798  $\mu$ L de agua con 2  $\mu$ L de los extractos celulares y 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford, se leyó su absorbancia a 595 nm y se interpolaron los datos obtenidos en la curva patrón.

Para el análisis de las proteínas por electroforesis, se preparó una solución para los geles de acrilamida al 10% y se vertieron en el equipo para SDS-PAGE (del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Una vez que polimerizaron los geles se les agregó 3 $\mu$ L del marcador de peso molecular (dual color de BioRad) y se cargaron 100 y 200  $\mu$ g de proteína de los extractos

celulares con una concentración 1:1 de Laemmli 2x, usando una micro-jeringa Hamilton.

Después se corrió la electroforesis a 120 V hasta que el frente de migración llegó al final del gel. Se desmontó el equipo de SDS-PAGE y se eliminó el gel concentrador. Se montó el equipo de transferencia poniendo las esponjas entre papel filtro y el gel en medio de ambas esponjas con papel filtro, el gel quedó junto con una membrana de PVDF (del inglés *Polyvinylidene Fluoride*) de Millipore, de manera que las proteínas migraron hacia la membrana (la membrana se humedeció previamente 5 min en metanol absoluto, posteriormente 5 min en buffer de transferencia). La electrotransferencia se corrió a 240 mA durante 2 h y 45 min a 4°C en la cámara de transferencia húmeda y a 120 mA durante 1 h y 30 min en la cámara de transferencia semi-húmeda. Durante todo el procedimiento se mantuvieron en constante humedad el gel y la membrana con buffer de transferencia frío, para la transferencia en cámara húmeda una vez insertados los cassettes se le agregó buffer de transferencia hasta cubrir por completo el gel y la membrana.

Después de la transferencia se retiró la membrana y se remarcaron las bandas del marcador de peso con un bicolor. Se tiñó la membrana con 50 mL de Rojo de Ponceau (al 5% diluido en agua desionizada y 1% ácido acético), se recolectó el Rojo de Ponceau y se lavó la membrana con H<sub>2</sub>O y TBS-T en agitación a 60 rpm durante 10 min por lavado. Posteriormente se bloqueó la membrana durante 1 h con 40 mL de leche descremada en polvo al 5% disuelta en TBS-T (del inglés *Tris Buffered Saline, Tween-20*). Después se lavó 3 veces la membrana con TBS-T y luego se incubó la membrana con un anticuerpo primario diluido 1:1000 en 4 mL de TBS-T con timerosal (0.001%) en una bolsa de plástico sellada a 4°C, en agitación toda la noche. El anticuerpo primario se recuperó y se preservó a 4°C, la membrana se lavó con H<sub>2</sub>O y TBS-T. Posteriormente se incubó durante 1 h con un anticuerpo secundario diluido 1:10,000 en TBS-T con leche en polvo descremada al 5%, después se lavó 3 veces la membrana con H<sub>2</sub>O y TBS-T y se procedió al revelado. Se usó el kit de detección de quimioluminiscencia (Millipore), diluyendo peróxido de hidrógeno con luminol con H<sub>2</sub>O 1:4 y 1:8 (dependiendo de la proteína de interés).

La membrana se expuso durante 1 min a la solución para detección (Millipore), se mantuvo en ligera agitación y se colocó dentro de una bolsa de plástico, se expuso la membrana en un cuarto oscuro a placas de autorradiografía sensibles al azul. La detección se llevó a cabo con un tiempo de exposición de 10 s hasta 15 min (dependiendo de la proteína de interés); posteriormente, las placas se colocaron en solución reveladora, seguido de H<sub>2</sub>O y posteriormente en solución fijadora. Finalmente, las placas se lavaron con H<sub>2</sub>O y fueron secadas. Las placas fueron escaneadas para el análisis cualitativo de los niveles proteicos (Hurwitz *et al.*, 2019).

## 8.7. Ensayo de inmunofluorescencia

Para detectar la activación de la vía del TGF- $\beta$  por medio de la translocación de Smad2 al núcleo, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia. Para el ensayo se sembraron células AD293-WT en cubreobjetos preparados con polilisina en placas de 12 pozos.

Una vez adheridas las células se dejaron en ayuno con medio DMEM F12 bajo en glucosa (sin FBS) toda la noche, posteriormente se lavaron con PBS a temperatura ambiente y se estimularon durante 45 min con TGF- $\beta$  en concentraciones de 300/200/100/50/25/12.5/6.12 pM, así como también fueron estimuladas con 1mL de MA, MA+SB431542 (10  $\mu$ M), MC y MCA de esferoides.

Posterior a la estimulación, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 30 min a temperatura ambiente. Una vez fijadas las células se lavaron con PBS, se permeabilizaron con metanol durante 6 min a -20°C, se les agregó PBS a cada pozo sobre metanol para evitar deshidratación. Posteriormente las células se lavaron con PBS y fueron bloqueadas con suero de caballo (HS, del inglés *Horse Serum*) al 10% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente en agitación.

Las células se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario (anti-Smad2 o anti-pSmad2C) en HS al 10% en agitación suave. Una vez incubadas con el anticuerpo primario se lavaron con PBS y se incubaron durante 90 min con anticuerpo secundario (*anti-rabbit*) acoplado a Alexa fluor 488 diluido 2:500 en HS al 10%, cubriendo las células de la luz en agitación suave. Una vez incubadas las células con el anticuerpo secundario, se lavaron con PBS, se incubaron con solución de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 1:1000 en PBS durante 15 min y posteriormente se colocaron en portaobjetos con solución de montaje Mowiol. Las células fueron analizadas por microscopia confocal.

## 8.8. Detección de marcadores en lisados totales celulares y de las EV

Para la identificación de los marcadores de exosomas aislados se realizó un ensayo tipo WB. Se sembraron células SW620 en cajas Petri de cultivo y se mantuvieron con medio DMEM-F12 con FBS al 10%. Cuando alcanzaron el 80-90% de densidad se les retiró el medio, se lavaron las células con PBS frío, se les retiró el PBS y se les agregó buffer de lisis RIPA o TNTE, junto con un coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa. Las células se lisaron con ayuda de una espátula para lisis y los extractos fueron transferidos a microtubos de 1.5mL de volumen, se centrifugaron los lisados a 13,000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se pasó a microtubos nuevos de 1.5mL de capacidad, se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford (antes mencionado) y se preparó un gel de acrilamida al 10%. Se cargaron 25/50/100 y 200  $\mu\text{g}$  de proteína de los extractos celulares lisados con RIPA o TNTE, mientras que para analizar las proteínas presentes en los exosomas se preparó otro gel de acrilamida al 10%. Se cargaron 100  $\mu\text{g}$  de extractos celulares lisados con RIPA de células SW620 cultivadas en monocapa y en esferoides, mientras que se cargaron 35  $\mu\text{g}$  de proteínas de los exosomas purificados de las células SW620 lisados con RIPA: para la electroforesis, transferencia y revelado se realizaron los protocolos como se menciona anteriormente en el ensayo de WB.

### 8.9. Análisis estadístico

Se obtuvo el promedio de los resultados por triplicado  $\pm$  error estándar de la media (SEM) para la medición de actividad del TGF- $\beta$  en MC, exosomas y vesículas extracelulares purificados de medios condicionados de células SW620 cultivadas en esferoides.

## 9. Resultados

### 9.1. El TGF- $\beta$ puede unirse a distintas proteínas transmembranales en las EV secretadas por las líneas celulares SW480 y SW620

Para conocer cuales proteínas portadoras del TGF- $\beta$  están presentes en las células SW620 y en sus EV, se realizó una búsqueda en la bibliografía haciendo énfasis en buscar a proteínas que se unieran al TGF- $\beta$  y que aumentaran su vía de señalización, así como en proteínas transmembranales que pudieran portarlo en la membrana de las EV. Para obtener la información se revisaron alrededor de 50 artículos en donde el TGF- $\beta$  estaba relacionado con la progresión del CRC y en donde se usaron a las líneas celulares SW480 y/o SW620. En la Tabla 2 se resume la información obtenida.

**Tabla 2.** Estudios recopilados sobre proteínas que pueden unir al TGF- $\beta$  y portarlo en la superficie membranal en las líneas celulares SW480 y SW620.

Unión entre proteínas y el TGF- $\beta$	Línea celular	Autores
La unión del LAP-TGF $\beta$ 1 a la integrina $\alpha$ 8 $\beta$ 1 puede localizar a LAP-TGF $\beta$ 1 en la superficie celular y facilitar su activación.	SW480	Lu <i>et al.</i> , 2002

El betaglicano incrementa la señalización mediada por el TGF- $\beta$ y la BMP-2 en células de cáncer de colon.	SW480 y SW620	Gatza <i>et al.</i> , 2011
La Nrp2 se une a los receptores del TGF- $\beta$ y a su forma latente, promoviendo la señalización por Smad2/3.	HT29 y Colo320; SW620 también expresa la Nrp2	Grandclement <i>et al.</i> , 2011
La integrina $\alpha v$ puede activar la vía de señalización del TGF- $\beta$ /Smad y aumentar la capacidad de las células de CRC para la formación de esferas tumorales.	SW480 y LS174T	Wang <i>et al.</i> , 2016b
La actividad de superficie de la Transglutaminasa 2 (TG2) se correlacionó con la presencia de TGF- $\beta$ 1 en el medio extracelular.	SW480	Ayinde <i>et al.</i> , 2017
La integrina $\alpha\beta 6$ puede activar al TGF- $\beta$ al liberarlo de su complejo latente LAP, el TGF- $\beta$ entonces activa a los fibroblastos y se promueve la metástasis de las células de CRC.	SW480 y SW620	Peng <i>et al.</i> , 2018
La integrina $\alpha\beta 8$ promueve la invasividad tumoral y la migración de las células de CRC mediante la activación del TGF- $\beta$ .	SW480 y SW620	Zhou <i>et al.</i> , 2020

En la línea celular SW480, Lu *et al.* en el 2002 encontraron que el TGF- $\beta$  es un importante mediador de la respuesta inflamatoria, al ser secretado en forma latente y que se requiere de su activación para ejercer sus efectos, pero que su forma inactiva contiene la secuencia RGD que es un motivo de reconocimiento por las integrinas. La integrina  $\alpha 8\beta 1$  se adhiere a este sitio para localizar al TGF- $\beta$  en la superficie celular y promover su activación. Gatza *et al.* (2011) encontraron que en las líneas SW480 y SW620, el receptor T $\beta$ RIII incrementa la señalización mediada por TGF- $\beta$  y BMP-2 en estas células de cáncer de colon.

Grandclement *et al.* (2011) observaron que al transfectar a las líneas celulares de CRC con Nrp2, esta neuropilina promueve una fosforilación constitutiva de Smad2/3 en las células de CRC, más aún la sobre-expresión de Nrp2 promovió sus capacidades para responder al TGF- $\beta$  y encontraron que las células SW620 expresan esta neuropilina.

Wang *et al.* (2016b) encontraron que la integrina  $\alpha 5$  puede aumentar la vía de señalización dependiente de Smad y que al inhibir esta integrina disminuye la actividad de la vía del TGF- $\beta$  en las células de CRC, así como su capacidad en la formación de esferas, movilidad celular y formación de tumores.

En el 2017, Ayinde *et al.* reportaron que la actividad de la transglutaminasa 2 (TG2) correlacionaba con la presencia del TGF- $\beta$  en el medio extracelular, sugiriendo una relación entre la TG2 de la superficie celular y el TGF- $\beta$  unido a la matriz extracelular, lo cual puede ser necesario para adquirir un potencial metastásico en las células SW620.

Peng *et al.* (2018) reportaron que las células SW480 y SW620 expresan a la integrina  $\alpha v \beta 6$  y aunque todos los tipos de células de CRC en el microambiente tumoral pueden secretar al TGF- $\beta$ -LAP, este está en su forma inactiva, pero la integrina  $\alpha v \beta 6$  puede activar al TGF- $\beta$  y liberarlo de su complejo latente. El TGF- $\beta$  activado puede entonces inducir la activación de fibroblastos y subsecuentemente, los CAF activados pueden promover la invasividad de las células de CRC. También Zhou *et al.* (2020) reportaron resultados similares, en donde la integrina  $\alpha v \beta 8$  se expresa en las líneas celulares SW480 y SW620 y promueve la invasividad tumoral y la migración de las células de CRC, mediante la activación del TGF- $\beta$  y la sobre-regulación de la MMP-9. A diferencia de las otras integrinas,  $\alpha v \beta 8$  activa al TGF- $\beta$  latente de manera dependiente de una proteasa unida a la membrana.

## 9.2. El TGF- $\beta$ puede unirse a proteínas transmembranales y estas proteínas se encuentran presentes en la superficie de las EV

Se investigó también en la bibliografía a las proteínas que podrían portar al TGF-beta en la superficie membranal de las EV secretadas por distintas células cancerosas (Tabla 3).

**Tabla 3.** Estudios realizados en distintas líneas celulares sobre proteínas que se unen al TGF- $\beta$  para activar su vía de señalización.

Proteína	Función relacionada al TGF- $\beta$	Línea celular	Autores
Nrp-1	La Nrp-1 puede unirse al TGF- $\beta$ , aumentando la capacidad de las células cancerosas para proliferar.	MDA-MB-231 y MCF-7	Glinka <i>et al.</i> , 2011
Integrina $\alpha 6$	Incrementa la expresión del TGF- $\beta$ , llevando al aumento de la capacidad invasiva de las células de CRC.	HT-29 y DLD-1	Li <i>et al.</i> , 2020.
GARP	Cuando se sobreexpresa GARP aumenta la secreción del TGF- $\beta$ activo	G292, SAOS-2 y RD-ES	Carrillo-Gálvez <i>et al.</i> , 2020
Betaglicano	Su presencia se correlacionó con una alta expresión del TGF- $\beta$ en exosomas, mientras que su disminución mediante un <i>knockdown</i> o por un tratamiento con pervanadato provocó que disminuyeran los niveles del TGF- $\beta$ .	Mesotelioma, PC3 y DU145	Webber <i>et al.</i> , 2010

Li *et al.* (2020) demostraron que un aumento en la expresión de la integrina  $\alpha 6$  en dos líneas celulares de CRC se relacionaba con el incremento en la producción de

factores relacionados con la transición epitelio-mesénquima (EMT), como la N-cadherina y la vimentina, pero al inhibir al TGF- $\beta$  disminuyó la concentración de estos factores, por lo que demuestran una relación entre el TGF- $\beta$  y la integrina  $\alpha 6$  para promover estas propiedades invasivas de las células de CRC.

Carrillo-Gálvez *et al.* (2020) encontraron que al sobre-expresar a la proteína GARP en distintas líneas celulares de sarcoma aumentaba la producción del TGF- $\beta$  activo y que el TGF- $\beta$  era necesario para la capacidad proliferativa de las células cancerosas, así como para su capacidad para resistir el daño al DNA. De manera similar Glinka *et al.* (2011) reportan que la Nrp-1, otra proteína que une al TGF- $\beta$ , es necesaria para aumentar la capacidad proliferativa de las células cancerosas al aumentar la vía de señalización canónica de las Smads.

En el 2010 Webber *et al.* reportaron que el TGF- $\beta$  se encuentra en los exosomas de una línea celular de mesotelioma y en dos líneas celulares de cáncer de próstata, y que estos exosomas son capaces de activar la vía de señalización dependiente de Smad, pero que el betaglicano es necesario para la expresión del TGF- $\beta$  en los exosomas.

Posteriormente se realizó una búsqueda en la literatura con el fin de encontrar antecedentes sobre algunas de estas proteínas, que ya se ha visto que están relacionadas con la función del TGF- $\beta$ , y que puedan ser expresadas en EV que se relacionen con la progresión tumoral (Tabla 4).

**Tabla 4.** Estudios realizados sobre proteínas que unen al TGF- $\beta$  y que se encuentran presentes en las EV de distintas líneas celulares.

Proteína	Efecto relacionado con las EV	Línea celular	Autores
Integrina $\alpha 6 \beta 1$	Las EV provenientes de melanoma, expresan a la integrina $\alpha 6 \beta 1$ y esta es necesaria para la distribución de las EV en pulmones de ratones.	B16BL6	Charoenviriyakul <i>et al.</i> , 2018
GARP	Al usar un siRNA para silenciar a GARP, las células MC38 tratadas con exosomas derivados de MSC demostraron tener una reducción en la proliferación celular.	MC38	Xing <i>et al.</i> , 2020
Nrp-1	Con análisis proteómicos se encontró que la Nrp-1 estaba expresada en altos niveles en las EV derivadas de hBM-MSCs y que se encuentra implicada en la migración, invasión, quimiotaxis y vasculogénesis.	hBM-MSCs	Munshi <i>et al.</i> , 2019



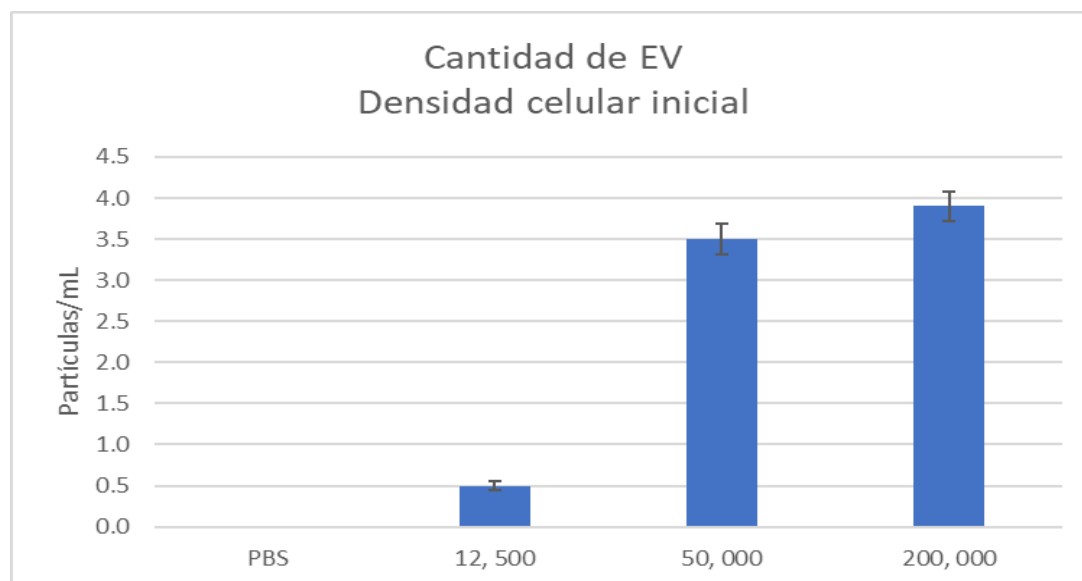
Proteínas como integrinas, GARP y neuropilinas también se han reportado que se encuentran en las EV, como lo reportado por Charoenviriyakul *et al.* (2018), en donde la integrina  $\alpha 6\beta 1$  se encontró en la superficie de las EV secretadas por las células de melanoma y vieron que al remover a la integrina  $\alpha 6\beta 1$  disminuye la capacidad de las EV para diseminarse en los pulmones de ratón.

Xing *et al.* (2020) reportaron que la proteína transmembranal GARP también se encontraba en exosomas derivados de MSC y que esta proteína confiere propiedades proliferativas e invasivas a una línea celular de CRC, ya que, al disminuir la expresión de GARP, estos exosomas de las células de CRC ya no adquirirían estas propiedades.

En el 2019 Munshi *et al.* demostraron que la Nrp-1 se encuentra sobre-expresada en las EV derivadas de MSC de médula ósea de humanos y que está involucrada en distintas vías de activación de la capacidad tumorigénica.

### Condiciones del MC de las células SW620 cultivadas en esferoides

**Comunicación personal por los grupos de la Dra. Martha Robles y de la Dra. Gloria Soldevila.** Para la realización de los experimentos en este trabajo, se buscó cual era la mejor condición en la cual realizar el cultivo en esferoides de las células SW620, para lo cual se realizó un experimento comparando la secreción de EV por las células SW620 cultivadas en esferoides con 50,000 células iniciales vs 200,000 células iniciales (Figura 5).

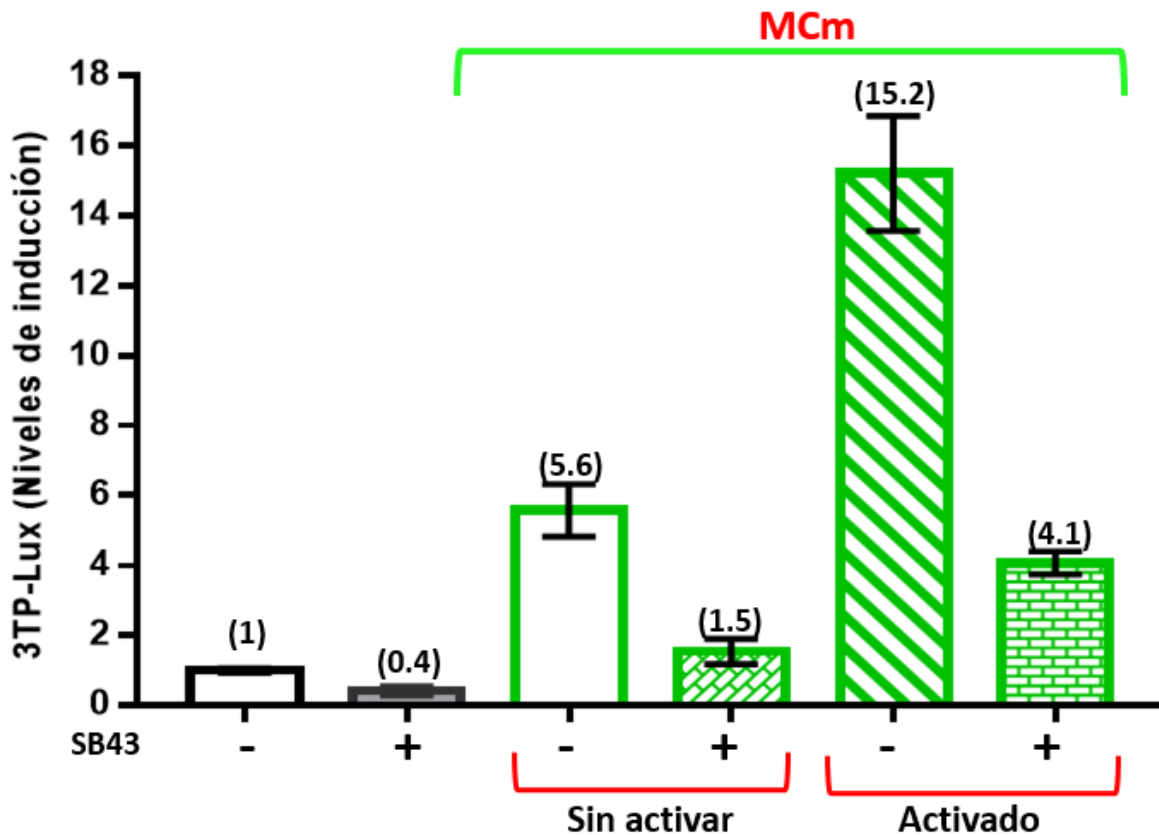


**Figura 5.** Secreción de EV por SW620 con 50,000 células iniciales vs 200,000 células iniciales. Se sembraron 50,000 y 200,000 células SW620 en cultivos 3D, cuando se formaron los esferoides se obtuvo el MC secretado por estos cultivos y mediante citometría de flujo se comparó la cantidad de EV secretadas por las células SW620 cuando son cultivadas con 50,000 o 200,000 células iniciales.

Como se observa en la Figura 5, cuando se cultivan 200,000 células iniciales de SW620 se observa una mayor secreción de EV que cuando se cultivan 50,000 células iniciales, por lo que se decidió que, para cumplir con los objetivos de este trabajo, se usaría MC obtenido de 200,000 células iniciales de SW620.

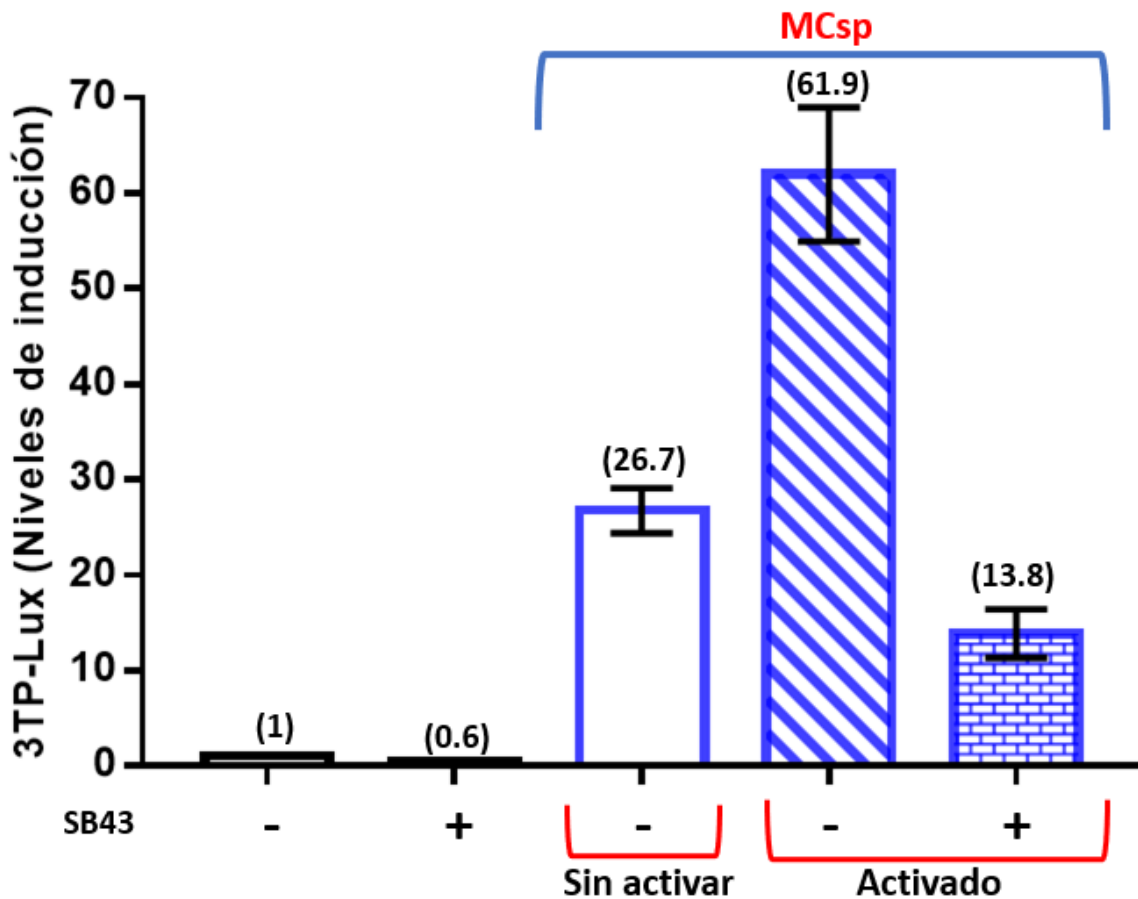
### **9.3. El TGF- $\beta$ es secretado por las células SW620 cultivadas tanto en monocapa como en esferoides**

Para evaluar la actividad del TGF- $\beta$  proveniente de las células SW620, se usaron como estímulos a los MC obtenidos de las células SW620 cultivadas en monocapa o en esferoides, para estimular a las células AD293-3TP-Lux. El TGF- $\beta$  puede ser secretado en estado latente, pero puede ser activado de manera artificial mediante calor, a una temperatura de 80°C LAP se desnaturaliza y cambia su conformación libre del TGF- $\beta$ , el TGF- $\beta$  en cambio, debido a sus enlaces de hidrógeno, puede recuperarse del estrés térmico a 80°C, por lo que no se desnaturaliza y de esta forma se activa al liberarse de LAP (Brown *et al.*, 1990; Annes *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2021). Por lo tanto, se activó en los MC de manera artificial al elevar la temperatura a 80°C por 5 min, mientras que para determinar que la señal proviene de la vía del TGF- $\beta$  se usó el inhibidor SB431542 (10  $\mu$ M), que inhibe la actividad de cinasa del receptor tipo I del TGF- $\beta$ . En la Figura 6 se puede observar que los MC provenientes de las células SW620, aún sin ser activados, contienen una actividad alta de la señal del TGF- $\beta$ , al observar una actividad del reportero de aproximadamente 5.6 veces sobre el control (medio de ayuno o MA), mientras que al ser activado el MC se puede llegar hasta aproximadamente 15.2 veces sobre el control. Al usar al inhibidor SB431542 se bloquea el efecto del TGF- $\beta$  visto por los estímulos (MCm).



**Figura 6. Las células SW620 cultivadas en monocapa secretan TGF- $\beta$  principalmente en estado latente.** Las células AD293-3TP-Lux fueron estimuladas con los MC de las células SW620 cultivadas en monocapa y el MC activado se activó por calor a 80°C durante 5 minutos. Se usó medio de ayuno como control negativo y se usó SB431542 como inhibidor del receptor tipo I del TGF- $\beta$ . SB43 = SB431542 (10  $\mu$ M), MCm = Medio condicionado de monocapa. Los valores son expresados como media  $\pm$  SEM de 2-3 experimentos por triplicado.

Posteriormente se evaluó la actividad del TGF- $\beta$  presente en los MC a partir de las células SW620 cultivadas en esferoides, las células AD293-3TPlux fueron estimuladas con los MC y el MC también fue activado por calor, así como usado en conjunto con el inhibidor SB431542. En la Figura 7 se observa un efecto similar, en donde los MC provocan una alta actividad del plásmido reportero, aproximadamente 61.9 veces en comparación con el control (MA) cuando el MC es activado por calor.

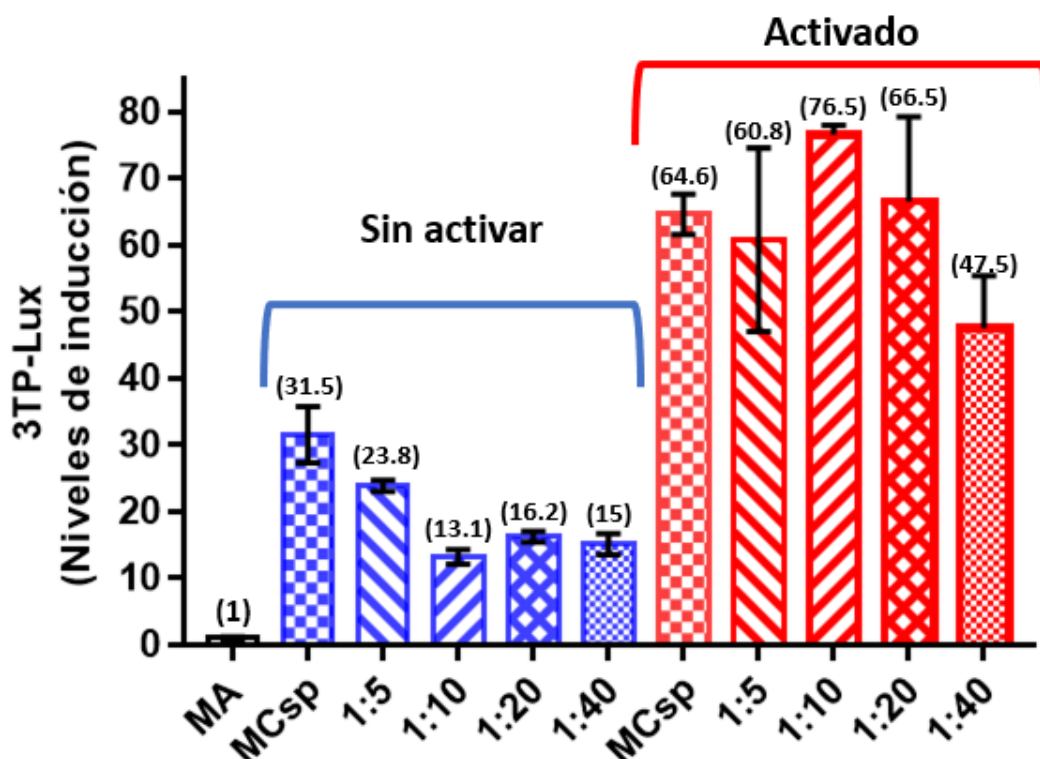


**Figura 7. Las células SW620 cultivadas en esferoides secretan TGF- $\beta$  principalmente en estado latente.** Las células AD293-3TP-Lux fueron estimuladas con los MC de las células SW620 y el MC activado se activó por calor a 80°C durante 5 minutos. Se usó medio de ayuno como control negativo y se usó SB431542 (10  $\mu$ M) como inhibidor del receptor tipo I del TGF- $\beta$ . SB43 = SB431542, MCsp = Medio condicionado de esferoides. Los valores son expresados como media  $\pm$  SEM de 2-3 experimentos por triplicado.

Con el fin de determinar la concentración aproximada del TGF- $\beta$  presente en los MC, de manera semi-cuantitativa al interpolar los datos obtenidos, se realizó una curva dosis-respuesta en las células AD293-3TP-Lux (Anexo II), para lo cual las células AD293-3TP-Lux fueron estimuladas con rTGF- $\beta$ 1 (en diluciones seriadas) con las concentraciones: 3.125 pM, 6.25 pM, 12.5 pM, 25 pM, 50 pM, 100 pM y 200 pM usando MA como control negativo. Los datos se ajustaron a una sigmoide y se tomaron los datos de la parte lineal para obtener una línea recta y obtener la ecuación de la recta por medio de regresión lineal (Anexo II). Sin embargo, los valores obtenidos de los MC de esferoides no pueden ser interpolados en la curva por salirse del rango, pero al analizar la actividad correspondiente a MC de monocapa se estima que tienen una concentración de TGF- $\beta$  de 80 pM, aunque cabe resaltar que es una medición semi-cuantitativa.

Debido a que se detectó una alta actividad del TGF- $\beta$  secretado en los MC de los esferoides de las células SW620, se realizó otro ensayo de gen reportero con el

MC de esferoides, en donde se diluyó el medio 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40 y también se midió la condición activada por calor de cada caso. Como se observa en la Figura 8, a pesar de estar diluido el MC hasta 40 veces, todavía presenta alta actividad del TGF- $\beta$  en comparación con el control (MA) al ser activado. El sistema se satura con los medios condicionados y no responde más al estímulo, los valores obtenidos de actividad en los MC están fuera del rango de la curva estándar realizada para el gen reportero, por lo que estos valores no se puedan interpolar en la curva patrón para poder estimar la concentración del TGF- $\beta$  presente y por lo tanto hay algo que se encuentra en el MC de las células SW620 cultivadas en esferoides que ejerce un efecto sinérgico con la actividad del TGF- $\beta$ .

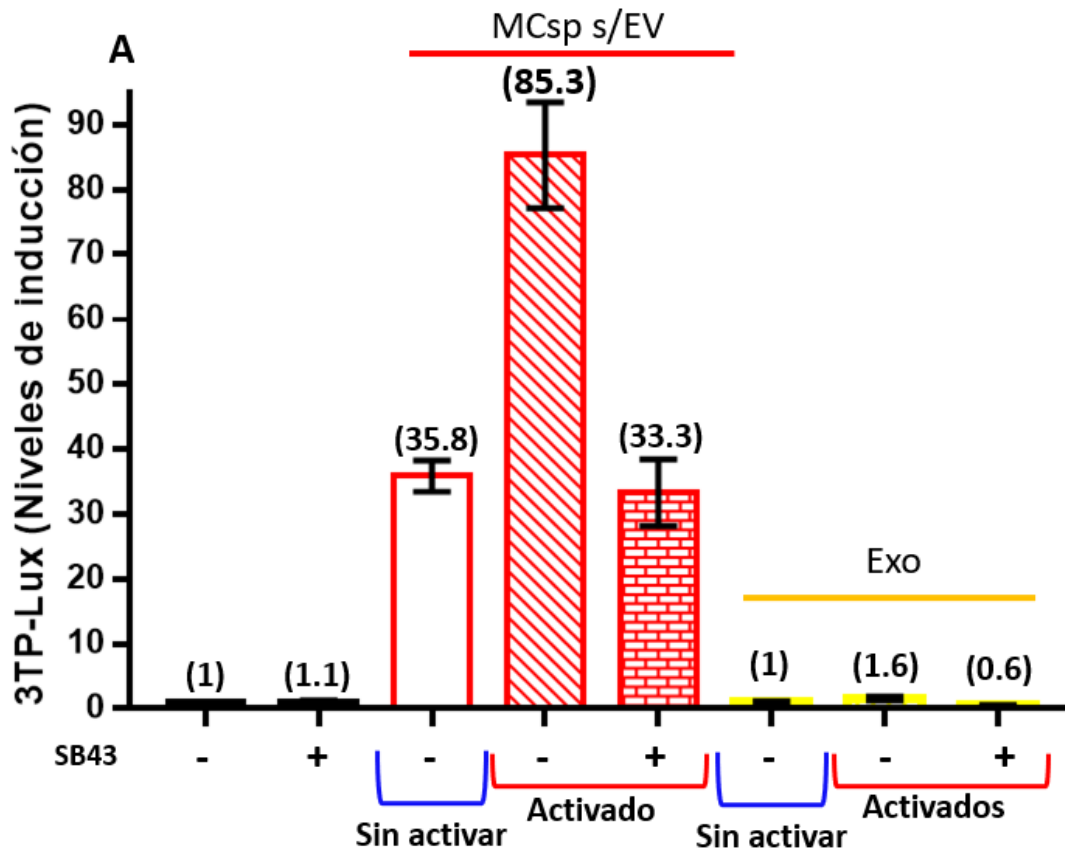


**Figura 8.** El medio condicionado diluido de células SW620 cultivadas en esferoides muestra una actividad del TGF- $\beta$  que satura la curva patrón. Las células AD293-3TP-Lux fueron estimuladas con el medio condicionado de esferoides formados por células SW620, los medios condicionados activados fueron calentados previamente a 80°C durante 5 min antes de la estimulación. MA = Medio de ayuno, MCSp = Medio condicionado de esferoides. Los valores son expresados como media  $\pm$  SEM de 2 experimentos por triplicado.

#### 9.4. Las células SW620 secretan al TGF-beta principalmente en forma soluble

Para analizar si el TGF- $\beta$  es secretado en su mayoría en forma soluble o portado en EV de esferoides, se purificaron exosomas mediante ultrafiltración junto con

cromatografía por exclusión molecular, (se usaron 40  $\mu$ L de exosomas y de EV aisladas por la Dra. Cynthia Paola López Pacheco del laboratorio de la Dra. Gloria Soldevila del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) a partir de los MC de los cultivos de esferoides formados a partir de células SW620, para estimular a las células AD293-3TP-Lux y compararlo con el MCsp depletado de EV (Figura 9), las condiciones fueron evaluadas también en su forma activada por calor a 80°C durante 5 min. Como se observa en la Figura 9, hay cierta actividad del TGF- $\beta$  en las EV (Figura 9), pero la mayor parte del TGF- $\beta$  es secretado en forma soluble por los esferoides de las células SW620, ya que en el MCsp sin exosomas se presenta una actividad del TGF- $\beta$  de más de 50 veces en comparación con el control (MA), mientras que cuando se estimula solo con exosomas activados se observa poca diferencia con respecto al control (MA) con una actividad de 1.6 veces mayor y en las EV se observa una actividad del TGF- $\beta$  de alrededor de 2.5 veces mayor en comparación con el control (MA) (Figura 9B), aunque no hay diferencias significativas con respecto al control.



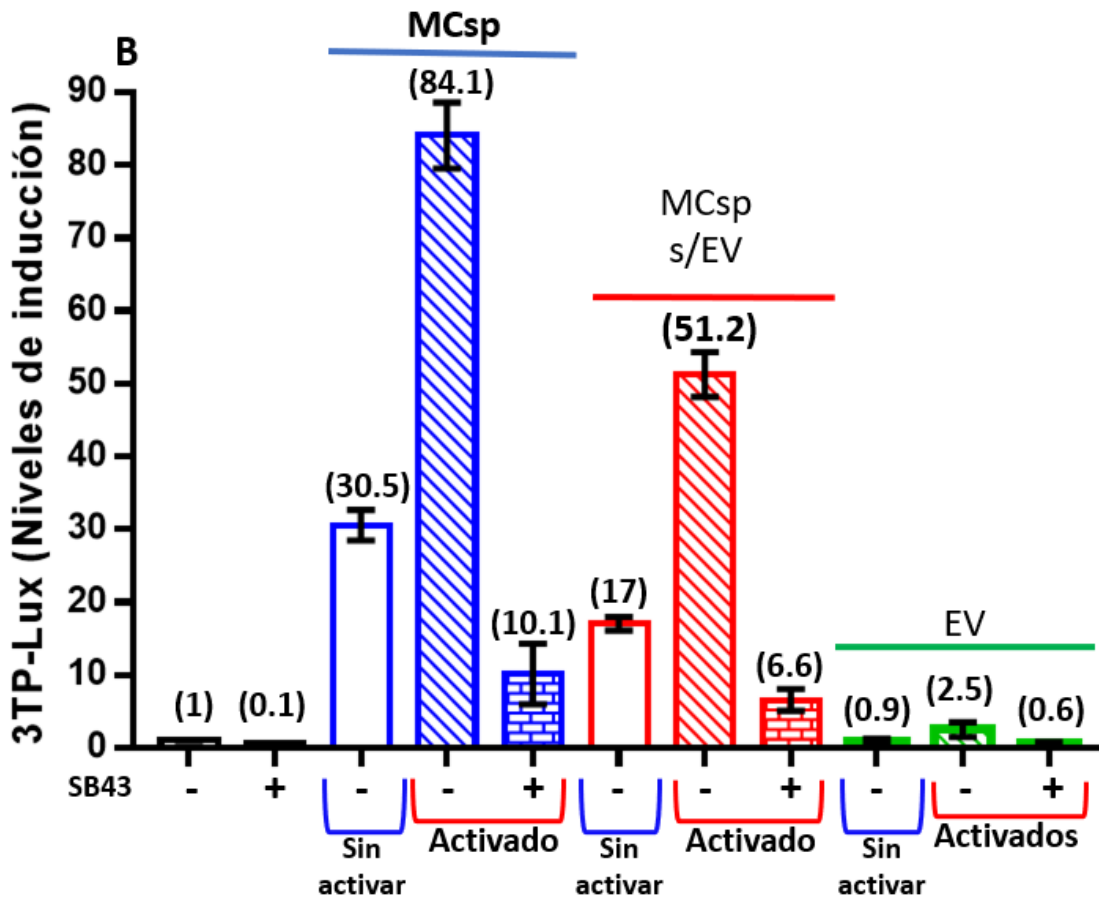
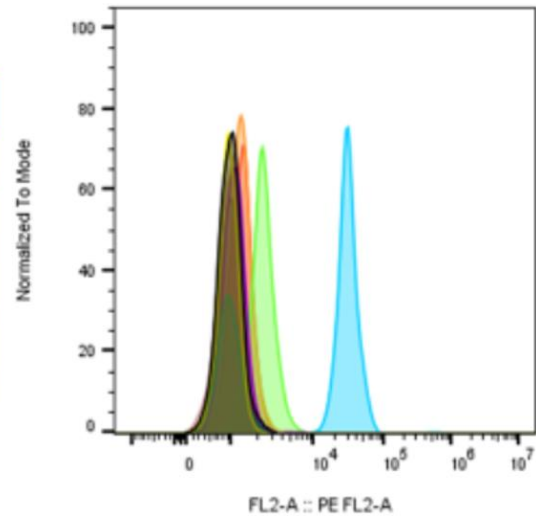


Figura 9. Ensayo de gen reportero con células AD293-3TP-Lux estimuladas por medio condicionado depletado de EV, así como estimuladas con exosomas y EV. A) Las células AD293-3TP-Lux fueron estimuladas con los medios condicionados depletados de exosomas, así como estimulados con exosomas purificados (sin MCsp). B) también fueron analizadas con MCsp depletados de EV, así como estimuladas con EV sin MC. Los medios condicionados fueron obtenidos de esferoides formados a partir de células SW620 y tanto los exosomas como los EV fueron purificados a partir de los medios condicionados de esferoides. MCsp = Medio condicionado de esferoides. Cada condición fue activada por calor a 80°C durante 5 min. Los valores son expresados como media  $\pm$  SEM n = 3.

**Comunicación personal por el grupo de la Dra. Gloria Soldevila.** Debido a que se detectó un nivel bajo en la actividad del TGF- $\beta$  presente en las EV secretadas por las células SW620 cultivadas en esferoides (Figura 9), se decidió hacer un ensayo de arreglo de perlas citométricas (CBA, por sus siglas en inglés *Cyometric Beads Array*), con el fin de rastrear en que paso del procedimiento es donde se encuentra una mayor actividad del TGF- $\beta$ , aunque en este ensayo se ve que se pierde la señal del TGF- $\beta$  en la purificación de exosomas (Figura 10), ya que no se observa una señal detectable. Por lo que debido a estos resultados se decidió utilizar otro método de purificación de exosomas.

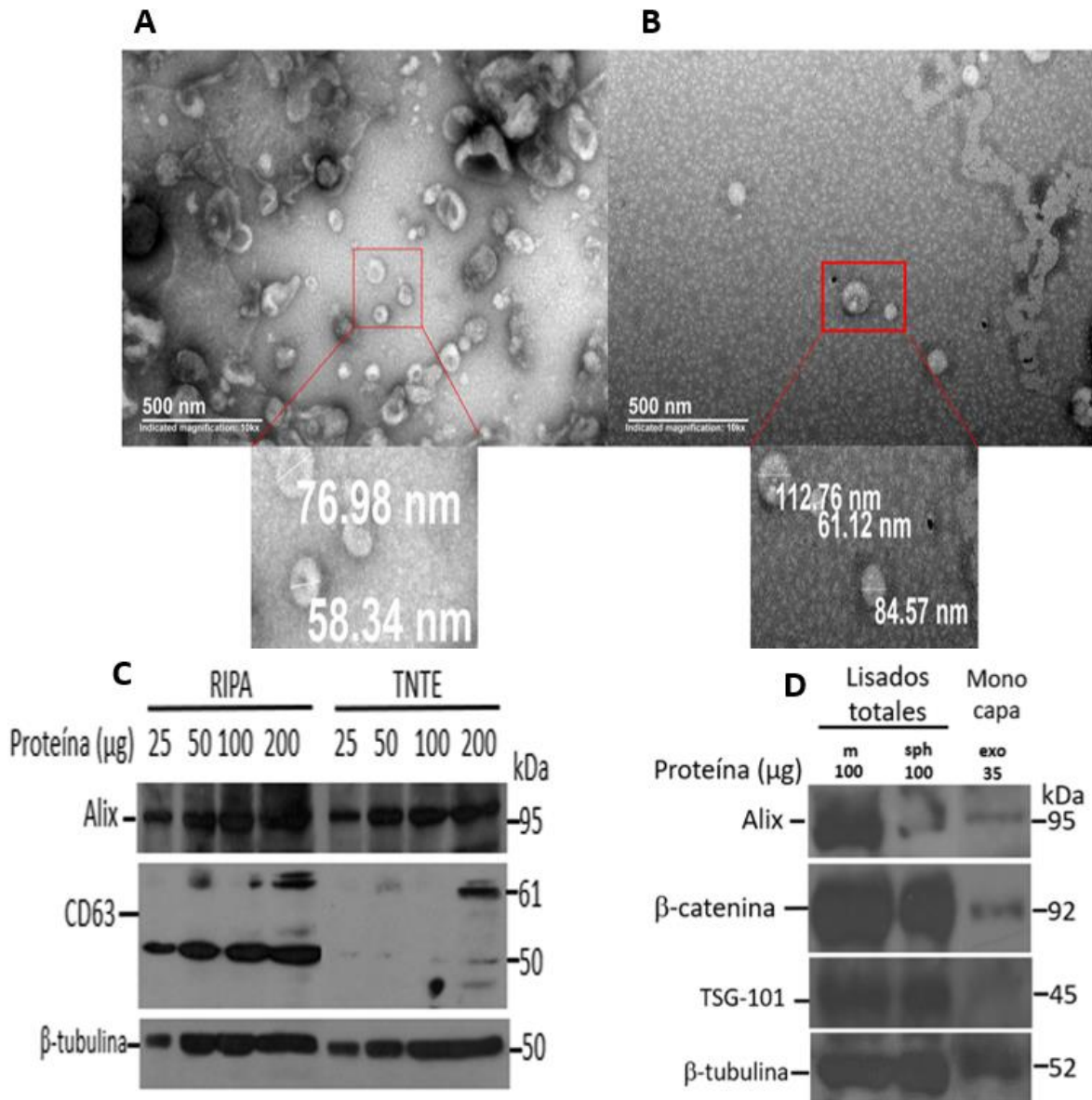
Clave	Muestra	Concentración [pM]
A	Medio Condicionado s/Act	Fuera de LC
B	Medio Condicionado c/Act	36.96
C	MC s/EV s/ Act	Fuera de LC
D	MC s/EV c/Act	0.68
E	EV s/Act	Fuera de LC
F	EV c/Act	Fuera de LC
G	EV lisadas s/Act	Fuera de LC
H	EV lisadas c/Act	Fuera de LC



**Figura 10.** Ensayo de CBA para rastrear la señal del TGF- $\beta$  presente en las EV del MC de esferoides. Se realizó un ensayo de CBA con las EV y los MC de las células SW620 con el fin de rastrear la señal del TGF- $\beta$  presente en la fracción soluble o vesicular, los MC y las EV activadas por calor se calentaron previamente a 80°C durante 5 min. Act = activados, LC = Límite de cuantificación.

Posteriormente, se purificaron a los exosomas de las células SW620 cultivadas en monocapa y en esferoides mediante centrifugación diferencial de los MC. Para caracterizar a los exosomas purificados de los MC, primero se observaron mediante TEM (Figura 11A y B), se corroboró la morfología y el tamaño reportado de los exosomas (30-150nm), y posteriormente se caracterizaron los marcadores de exosomas reportados en las células SW620, usando dos tipos de buffer de lisis (RIPA vs TNTE) (Figura 11C). Realizando ensayos de WB se corroboró que las EV aisladas correspondían a los exosomas, al detectar a marcadores de exosomas como Alix y TSG101 (Figura 11D).





**Figura 11. Caracterización de exomas secretados por SW620.** A) Imágenes obtenidas por TEM de exomas purificados de células SW620 cultivadas en monocapa. B) Imágenes obtenidas por TEM de exomas purificados de células SW620 cultivadas en esferoides. C) Caracterización de buffer de lisis RIPA vs TNTE, así como los anticuerpos Alix y CD63 como marcadores de exomas, CD63 al ser una proteína glicosilada puede presentar un peso de 30 60 kDa aproximadamente. D) WB de lisados totales de las células SW620 cultivadas en monocapa y esferoides, así como exomas purificados de células SW620 cultivadas en monocapa y fueron lisados con buffer de lisis RIPA. β-tubulina se utilizó como control de carga.

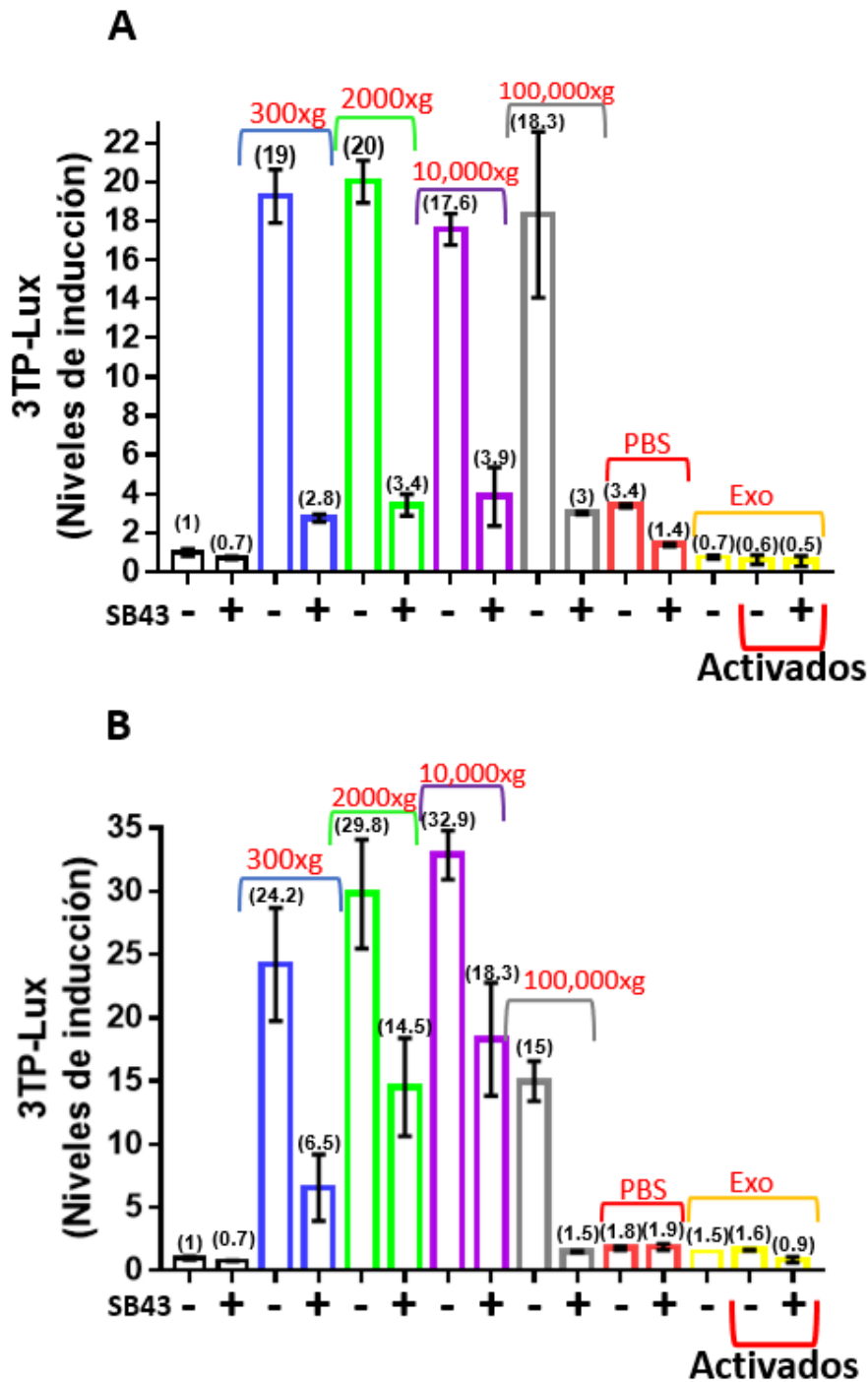
Los lisados celulares obtenidos por el buffer de lisis RIPA muestran una mejor calidad para visualizar las proteínas de interés que los lisados con el buffer de lisis TNTE, esto puede ser debido a que el buffer de lisis RIPA contiene detergentes iónicos como SDS y desoxicolato de sodio, que rompen las uniones entre

proteínas y las separan de posibles compartimentos, mientras que el buffer de lisis TNTE permite conservar las uniones entre proteínas, así como el posible confinamiento de proteínas. También se observa que los marcadores de exosomas se encuentran presentes en los lisados totales de las SW620.

Una vez caracterizados los exosomas purificados de los MC de las células SW620, se realizaron dos ensayos de gen reportero por actividad de luciferasa, estimulando a las células AD293-3TP-Lux con los sobrenadantes obtenidos en cada paso de la centrifugación, así como también se usaron 40  $\mu$ L de exosomas como estímulo, activándolos por calor y usando el inhibidor SB431542.

Como se observa en la Figura 12, la señal del TGF- $\beta$  es mayor cuando se usan los sobrenadantes como estímulo, llegando a un aproximado de actividad de 20 veces en comparación con el control (MA), mientras que la señal del TGF- $\beta$  proveniente de los exosomas se encuentra en 0.7 veces en comparación con el control (MA) cuando se usaron los sobrenadantes y exosomas purificados de las células SW620 cultivadas en monocapa (Figura 12A).

Cuando se estimulan las células AD293 con los sobrenadantes de las células SW620 cultivadas en esferoides se observa una actividad del TGF- $\beta$  de aproximadamente 30 veces en comparación con el control (MA). Cuando se usaron los exosomas como estímulo se observó una actividad del TGF- $\beta$  de aproximadamente 1.5 veces en comparación con el control (MA) (Figura 12B), demostrando que la actividad del TGF- $\beta$  presente en el MC de las células SW620 se encuentra principalmente en forma soluble cuando las células se cultivan en monocapa y en esferoides.



**Figura 12. Las células SW620 cultivadas en 2D y 3D secretan TGF-β principalmente de forma soluble.** Las células AD293-3TP-LUX fueron estimuladas con los sobrenadantes de los pasos de la ultracentrifugación, así como de los exosomas purificados de células SW620 cultivadas en A) monocapa y B) esferoides. Se usó medio de ayuno como control negativo y se usó SB431542 (10 μM) como inhibidor del receptor tipo I del TGF-β. Sólomente dos condiciones de exosomas fueron activados por calor a 80°C durante 5 min. Los valores son expresados como media ± SEM de 1 experimento por triplicado.

### 9.5. El EGF en el medio de cultivo para esferoides tiene un efecto sinérgico con el TGF-β

Una vez investigada la secreción del TGF-β por las células SW620, se observó que la actividad del reportero 3TP-Lux cuando se usaban los MC de esferoides era tan alta que sobrepasaba los valores más altos en la curva de referencia (Anexo II), por lo que el efecto observado puede ser debido a un efecto potenciador o sinérgico que se encuentre en el medio por los componentes del medio B27 o EGF.

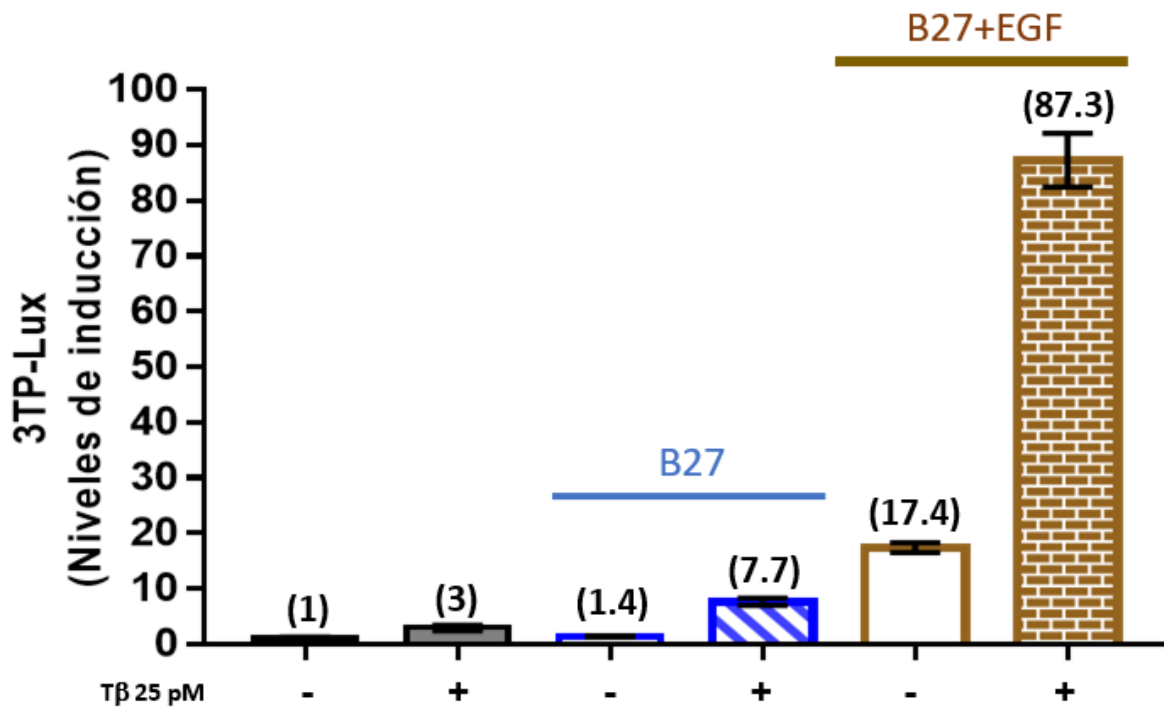
**Tabla 5.** Componentes del suplemento para cultivo en esferoides B27.

Components	Concentration (mg/L)	mM	Components	Concentration (mg/L)	mM
<b>Vitamins</b>			<b>Components</b>		
Biotin	confidential	n/a	L-Carnitine HCl	confidential	n/a
DL Alpha Tocopherol Acetate	confidential	n/a	Linoleic Acid	confidential	n/a
DL Alpha-Tocopherol	confidential	n/a	Linolenic Acid	confidential	n/a
Vitamin A (acetate)	confidential	n/a	Progesterone	confidential	n/a
<b>Proteins</b>			Putrescine 2HCl	confidential	n/a
BSA, fatty acid free Fraction V	confidential	n/a	Sodium Selenite	confidential	n/a
Catalase	confidential	n/a	T3 (triiodo-L-thyronine)	confidential	n/a
Human Recombinant Insulin	confidential	n/a			
Human Transferrin	confidential	n/a			
Superoxide Dismutase	confidential	n/a			

Como se observa en la Tabla 5, el suplemento B27 contiene algunos componentes como la vitamina A, que se ha visto que puede sobre-regular la expresión del TGF-β (Saboer-Yaraghi *et al.*, 2015), así como la insulina, que se ha visto que promueve la señalización del TGF-β mediante la vía de Akt (Budi *et al.*, 2015), mientras que los ácidos linoleicos han sido asociados con la activación y secreción del TGF-β (Harbige *et al.*, 2000), así mismo, también se ha reportado que las hormonas pueden sobre-regular a los receptores RTK, regulando río abajo proteínas efectoras como MAPK y factores de crecimiento como el TGF-β (Yu *et al.*, 2010).

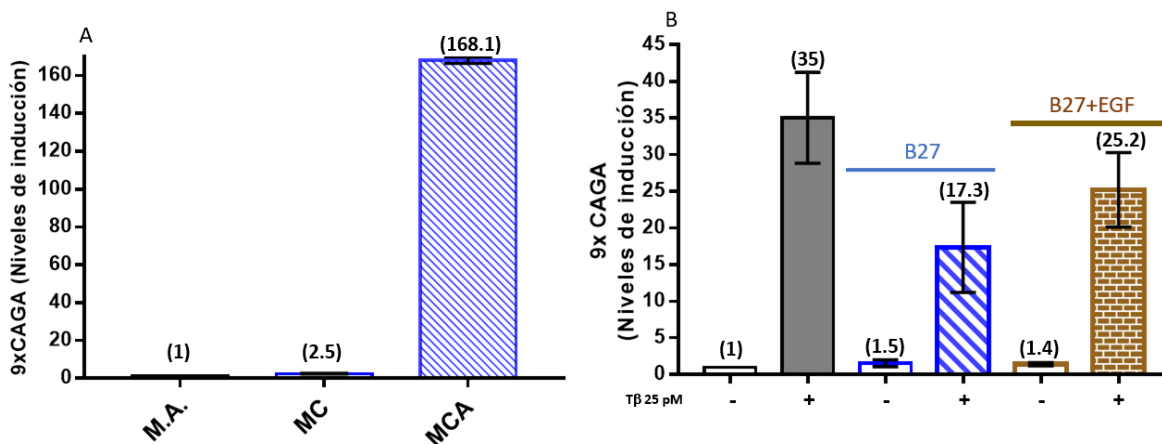
Por lo tanto, en búsqueda de identificar la causa de este aumento de la actividad del reportero 3TP-Lux con los MC, se realizó un ensayo de gen reportero por actividad de luciferasa, usando como estímulos al suplemento para el cultivo de esferoides B27 con y sin el EGF, así como al rTGF-β1 (25 pM) y los medios fueron calentados previamente a 80°C durante 5 min en un thermoblock. En la Figura 13 se observa un efecto sinérgico cuando se usan en conjunto B27+EGF+TGF-β, con una señal de 87.3 veces en comparación con el control (MA), mientras que cuando

se usan B27+TGF- $\beta$  25 pM sin el EGF solo se ve una señal 7.7 veces mayor en comparación con el control, por lo que el EGF tiene el efecto sinérgico con el TGF- $\beta$ .



**Figura 13. El EGF del suplemento para esferoides sinergiza con el TGF- $\beta$  al ser activado por calor.** Las células AD293-3TP-Lux fueron estimuladas con medio B27 con y sin EGF, además de usar rTGF- $\beta$  25 pM, los medios fueron activados por calor a 80°C. Se usó medio de ayuno como control negativo. Los valores son expresados como media  $\pm$  SEM. Imagen representativa de 2 experimentos independientes con resultados por triplicado.

Posteriormente para comprobar que la señal era debida al TGF- $\beta$  y podía ser detectada por otro reportero, se realizó un ensayo de gen reportero con las células AD293 transfectadas establemente con el plásmido 9xCAGA-Luc, el cual tiene 9 cajas de SBE (del inglés *Smad Binding Element*), por lo que es más sensible y específico para la señalización de la vía del TGF- $\beta$  (Dennler *et al.*, 1998). Para el ensayo se estimularon a las células AD293-9xCAGA-Luc con MC obtenido de esferoides SW620, suplemento B27, EGF y rTGF- $\beta$  25 pM. Como se observa en la Figura 14, la señal del TGF- $\beta$  se encuentra muy elevada al ser activado el MC con calor, en comparación con el control (MA), con una actividad de alrededor de 160 veces más en comparación al control (MA) (Figura 14A), aunque al usar como estímulo al suplemento para esferoides B27 y EGF, la señal no se encuentra tan elevada. Por lo que el efecto sinérgico previamente observado parece ocurrir solo visto con el plásmido reportero 3TP-Lux, ya que usando el plásmido reportero 9xCAGA no se observa esta sinergia entre el EGF y el TGF- $\beta$ .



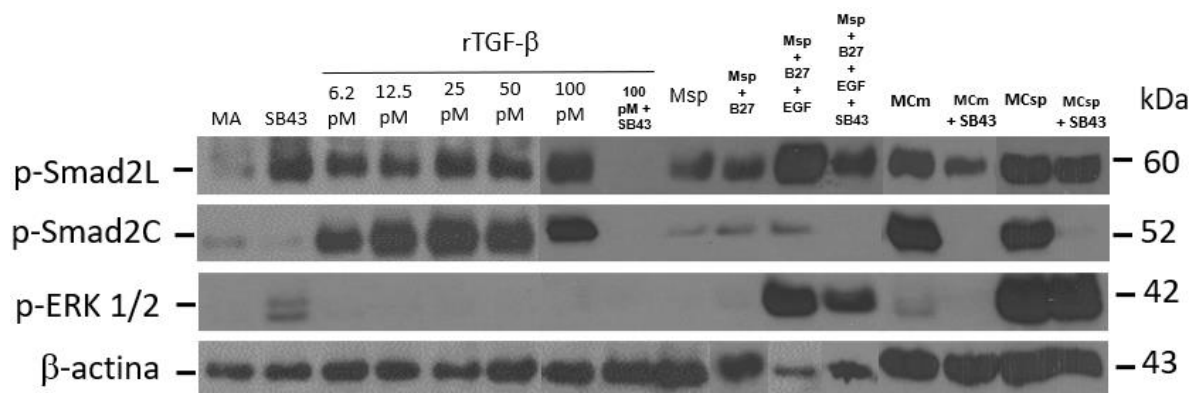
**Figura 14. El efecto sinérgico con el TGF-β es dependiente del plásmido reportero.** Las células AD293-9xCAGA fueron estimuladas con los MC de las células SW620 y MCA activados por calor a 80°C durante 5 minutos (A), mientras que también fueron estimuladas con medio B27 con y sin EGF, además de usar rTGF-β 25 pM (B). Los valores son expresados como media ± SEM. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

Para interpolar los datos obtenidos y estimar la concentración del TGF-β presente en los MC de manera semi-cuantitativa, se realizó una curva dosis respuesta con las células AD293-9xCAGA (Anexo II), para lo cual las células AD293-9xCAGA fueron estimuladas con rTGF-β1 en unas diluciones seriadas con las concentraciones: 3.125 pM, 6.25 pM, 12.5 pM, 25 pM, 50 pM, 100 pM y 200 pM, usando MA como control negativo. Los datos se ajustaron a una línea recta y se obtuvo la ecuación de la recta por medio de regresión lineal (Anexo II); sin embargo, los valores no entran dentro del rango de la curva, por lo cual no se pudo estimar la concentración del TGF-β.

### 9.6. El MC de las células SW620 activa a las vías canónicas y no canónicas en las células AD293 mediante la fosforilación de ERK1/2

Para evaluar si los medios condicionados de esferoides pueden promover la vía de señalización del TGF-β, se realizó un ensayo de WB para ver a la proteína Smad2 fosforilada (p-Smad2) y a las proteínas ERK1/2 fosforiladas (p-ERK1/2) (Figura 15). Como la fosforilación de Smad2 es necesaria para la activación de la vía del TGF-β y puede ser fosforilada también por ERK1/2, se usaron dos anticuerpos distintos para p-Smad2, que reconocen a las serinas 465/467 en la región carboxilo, lo que nos muestra que la vía canónica del TGF-β está siendo activada, en mayor medida por el MC secretado por las células SW620 cultivadas en monocapa y esferoides, mientras que cuando se usó el anticuerpo que reconoce a las serinas 245/250/255 fosforiladas de la región *linker* de p-Smad2, se

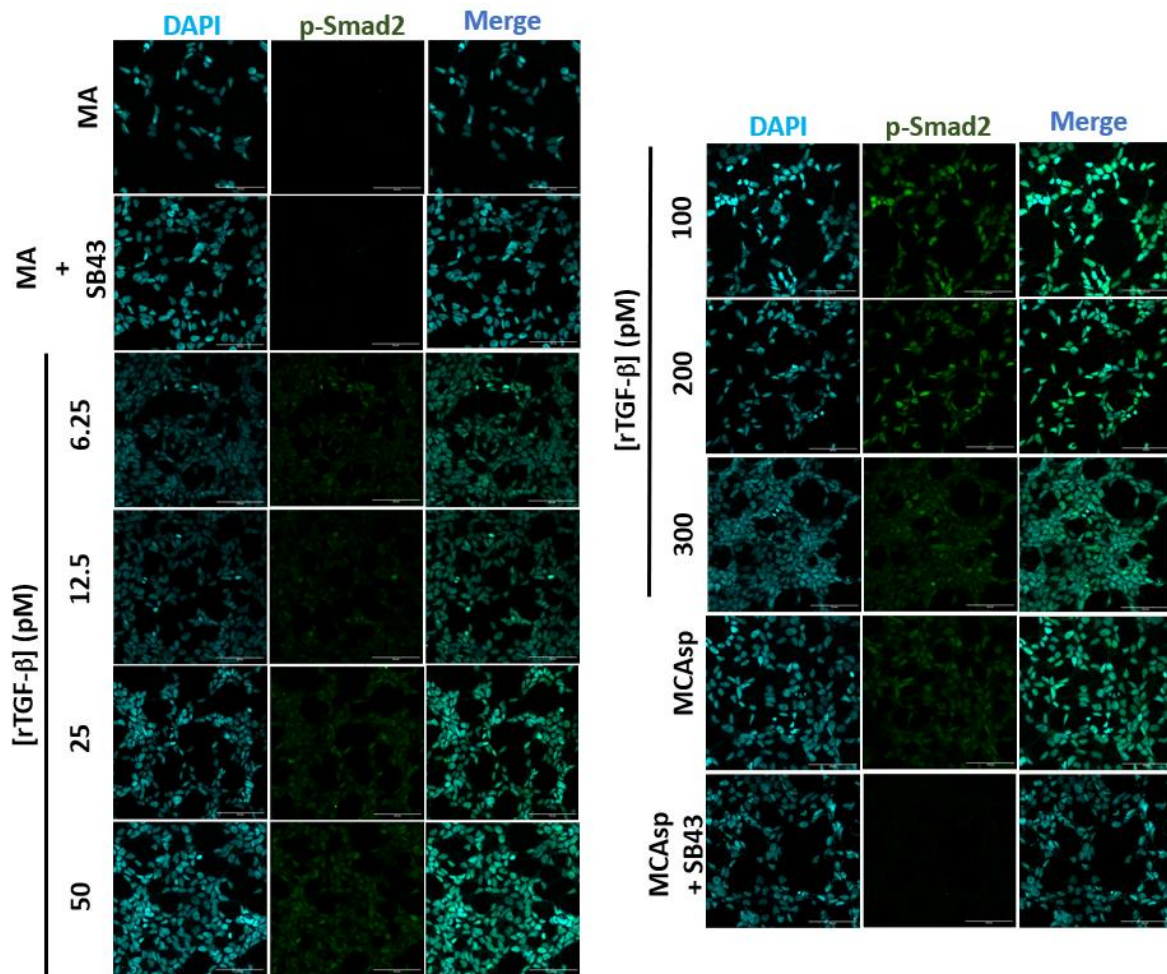
observa una mayor cantidad de p-Smad2 cuando se estimulan a las células AD293 con el medio de cultivo para esferoides y cuando se usan los MC de monocapa y esferoides, aún en mayor medida que cuando se estimulan con rTGF- $\beta$ , por lo que el suplemento B27, junto con el EGF y los MC pueden estar activando a las vías no canónicas del TGF- $\beta$  (Figura 15).



**Figura 15. Se activan las vías canónicas y las no canónicas en las células AD293 al ser tratadas con MC de las células SW620.** Las células AD293 fueron estimuladas con rTGF- $\beta$  en diluciones seriadas de 6.25/12.5/25/50/100 pM, Msp, suplemento B27, EGF, MCm y MCsp. Las células fueron lisadas con buffer de lisis TNTE y se usaron anticuerpos para observar la fosforilación en el extremo carboxilo y en la región linker, así como para detectar a ERK 1/2 fosforilada. MA = Medio de ayuno, SB43 = SB431542, Msp = Medio para cultivo en esferoides, MCm = Medio condicionado de células SW620 cultivadas en monocapa, MCsp = Medio condicionado de células SW620 cultivadas en esferoides. Se usó medio de ayuno (MA) como control negativo y se usó SB431542 (10  $\mu$ M) como inhibidor del receptor tipo I del TGF- $\beta$ .  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga. Los medios fueron activados por calor a 80°C durante 5 min. Imagen representativa de tres experimentos independientes.

Para detectar la fosforilación de Smad2 se realizó la tinción de inmunofluorescencia de las células AD293 WT, que fueron estimuladas con rTGF- $\beta$  en diluciones seriadas de 6.25/12.5/25/50/100/200/300 pM y con el MC activado de las células SW620 cultivadas en esferoides, como se observa en la Figura 16, la fosforilación de Smad2 aumenta con respecto a la concentración del rTGF- $\beta$ , así como también se observa una mayor fosforilación de Smad2 cuando las células son estimuladas con el MC de las células SW620 cultivadas en esferoides con respecto al control negativo (MA), observándose un efecto similar al estimular a las células con la concentración más alta usada de rTGF- $\beta$  (300 pM). Al inhibir el receptor tipo del TGF- $\beta$  con el SB431542, disminuye la fosforilación de Smad2 observada con el tratamiento con el MC de las células SW620, por lo que estos datos en conjunto demuestran que el TGF- $\beta$  del MC promueve la fosforilación de Smad2 en las células AD293.





**Figura 16. El MC de células SW620 cultivadas en esferoides activa la vía del TGF- $\beta$  mediante la fosforilación de Smad2.** Tinción de inmunofluorescencia de células AD293 WT estimuladas con rTGF- $\beta$  en diluciones seriadas de 6.25/12.5/25/50/100/200/300 pM y MC activado de células SW620 cultivadas en esferoides. El núcleo se marcó en azul con DAPI y en verde con pSmad2 fosforilada en la región carboxilo terminal. Las imágenes fueron tomadas por microscopía confocal a 40x MA = Medio de ayuno, SB43 = SB431542, MCAsp = Medio condicionado activado de células SW620 cultivadas en esferoides. Se usó medio de ayuno (MA) como control negativo y se usó SB431542 (10  $\mu$ M) como inhibidor del receptor tipo I del TGF- $\beta$ . Los MC fueron activados por calor a 80°C durante 5 min. Imagen representativa de dos experimentos independientes.



## 10. Discusión

La vía de señalización del TGF- $\beta$  es una de las principales vías alteradas en el CRC, lo que contribuye al desarrollo de este tipo de cáncer. Uno de los aspectos poco estudiados es la secreción del TGF- $\beta$  por las células de CRC. Esta tesis se enfoca en estudiar como las células SW620, clasificadas como CMS4 y consideradas de las más agresivas, secretan al TGF- $\beta$  cuando son cultivadas en monocapa (2D) o en esferoides (3D) que mimetizan mejor las condiciones *in vivo* de los tumores.

Las células cancerosas en general y las de CRC en particular secretan múltiples mensajeros químicos solubles o en EV, para comunicarse con las demás células presentes en el TME. Uno de los mensajeros químicos más relevantes es la citocina TGF- $\beta$ , la cual ejerce acciones anti-tumorales o pro-tumorales, dependiendo del estadio de avance del cáncer. En el caso particular del CRC, las células cancerosas pueden secretar al TGF- $\beta$  en forma soluble o empaquetado en EV (Salas-Lara, 2023).

Las EV derivadas de las células tumorales tienen un papel importante en la patogénesis del cáncer desde la iniciación y formación del nicho pre-metastásico hasta la invasión y metástasis del cáncer, de esta forma las EV pueden ser usadas como biomarcadoras del cáncer, ya que las EV contienen moléculas específicas del estado fisiológico o patológico de la célula secretora (Jaiswal & Sedger, 2019). Se sabe que las EV tienen un papel fundamental en la comunicación celular, incluyendo procesos facilitadores como la presentación de antígenos y en la señalización entre las células vecinas (Lim *et al.*, 2012), además de que facilitan la distribución de cargas moleculares específicas que median la comunicación con otras células (Shifrin *et al.*, 2013). Las EV derivadas de las células tumorales son capaces de aumentar la proliferación y la migración de las células tumorales, a través de la activación de vías reguladas por el TGF- $\beta$  asociado a exosomas (Lan *et al.*, 2018).

En el contexto del CRC, se ha reportado que la deficiencia de los componentes de la vía del TGF- $\beta$ , como es el caso de la pérdida de función del receptor tipo II, pueden afectar el contenido de proteínas, metabolitos, RNA, entre otras, que llevan las EV secretadas por este tipo de células cancerosas, por lo que, en el CRC, el TGF- $\beta$  puede regular las cargas seleccionadas que son secretadas en EV (Rodriguez-Junior *et al.*, 2022; Salas-Lara, 2023).

Por la importancia que tiene el TGF- $\beta$  presente en EV, primero buscamos antecedentes sobre la unión del TGF- $\beta$  con proteínas transmembranales que pudieran portar al TGF- $\beta$  en la superficie membranal de EV, en células de CRC, enfocándose en las líneas celulares SW480 y SW620, como por ejemplo Lu *et al.* en el 2002 y Zhou *et al.* en el 2020, reportan que las células de CRC pueden

secretar integrinas que se unen al TGF- $\beta$  latente mediante el motivo RGD de LAP y promover su activación. Otros autores han reportado que las integrinas  $\alpha\beta 1$  o  $\alpha\beta 8$  pueden unirse al TGF- $\beta 1$  sin poder liberarlo de LAP de forma autónoma, como es el caso de la integrina  $\alpha\beta 6$ , y necesitan de la participación de otras integrinas o proteasas para poder degradar a LAP del complejo latente, aunque si se pueden unir a TGF- $\beta 1$  y mediante esta unión favorecer la señalización de TGF- $\beta$  (Worthington *et al.*, 2012). También se ha reportado que la Nrp-1 es un receptor de alta afinidad para el TGF- $\beta 1$  presente en la membrana de células tumorales y que puede activar la forma latente de TGF- $\beta 1$ , ya que en ausencia de Nrp-1 disminuye la señalización del TGF- $\beta 1$  (Wang *et al.*, 2016a).

Por otro lado, existen numerosos reportes que indican que el receptor T $\beta$ RIII en su forma soluble actúa como un inhibidor de la vía del TGF- $\beta$ , mientras que, en su forma anclada a la membrana, el T $\beta$ RIII tiene actividades promotoras en el CRC, aumentando la migración, el crecimiento y la formación de colonias actuando como co-receptor del TGF- $\beta$  (Tazat *et al.*, 2015). Existe evidencia que la TG2 puede estimular la activación del TGF- $\beta$  al promover el entrecruzamiento del complejo LAP-TGF- $\beta$  a la matriz extracelular, un paso clave para la activación del TGF- $\beta 1$  por medio de enzimas proteolíticas (Fadel & Emma, 2019). Algunas de estas proteínas no solo han sido reportadas por unir al TGF- $\beta$  para promover su señalización en cáncer, sino que también se ha reportado que se encuentran en las EV (Webber *et al.*, 2010; Charoenviriyaku *et al.*, 2018; Munshi *et al.*, 2019; Xing *et al.*, 2020).

Uno de nuestros objetivos principales era investigar si las células SW620 de CRC secretaban al TGF- $\beta$  en EV, por lo que primero evaluamos la presencia de este ligando en los medios condicionados de las células cultivadas en 2D y 3D. Para determinar si las células SW620 secretan al TGF- $\beta$  en estado latente o activo se usó el ensayo de gen reportero, que es un sistema muy sensible, eficiente por su bajo costo y nos permite obtener una estimación semi-cuantitativa de los niveles de la proteína de interés. La actividad de luciferasa generada por la expresión del plásmido reportero 3TP-Lux, es altamente inducida por el TGF- $\beta$  (Cárcamo *et al.*, 1994), por lo que los resultados obtenidos en este trabajo por medio de los ensayos de gen reportero demuestran que las células SW620 secretan al parecer gran cantidad de TGF- $\beta$ , en su mayoría en estado latente, como se ha reportado en otras células (Shelke *et al.*, 2019). Sin embargo, sería importante usar algún método cuantitativo para determinar la concentración del TGF- $\beta$  secretado por estas células, como el método de ELISA.

Como modelo de estudio, el cultivo en 3D mostró una mayor capacidad para secretar al TGF- $\beta$  por su actividad medida por los ensayos de luciferasa, así como de secretarlo en estado latente, que está asociado con una mejor regulación del TGF- $\beta$  (Wakefield *et al.*, 1990; Martínez, 2018), lo que facilita que el TGF- $\beta$  pueda ejercer una mejor función como promotor de tumores, de manera que los cultivos

3D mimetizan más al TME, a diferencia de los cultivos 2D. Por lo tanto, en los resultados mostrados en este trabajo se observa una clara diferencia de la actividad del TGF- $\beta$  cuando las células SW620 son cultivadas en monocapa en comparación con su cultivo en esferoides.

El grupo de nuestra colaboradora, la Dra. G. Soldevila encontró que el método descrito por Benedikter *et al.* (2017) para purificar a los exosomas es muy poco eficiente para detectar al TGF- $\beta$  secretado, por lo que nosotros utilizamos otro método para aislar a los exosomas basado en un método de centrifugación diferencial, modificado del previamente descrito por Théry *et al.* (2006). Los exosomas que aislamos fueron caracterizados mediante TEM y WB, la morfología y tamaño (50-150 nm) corresponden a lo reportado por Pang *et al.* (2021) en exosomas de las células SW620. Mediante WB se encontró la expresión de los marcadores de exosomas Alix, CD63 y TSG-101, que corresponden a lo reportado en la literatura (Simons & Raposo, 2009), así como también se ha reportado que los exosomas de las células SW620 expresan estos marcadores (Choi *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2013; Salas-Lara, 2023), lo que confirma que las EV purificadas en este trabajo corresponden a exosomas.

Las EV derivadas de tumores pueden contener moléculas como el TGF- $\beta$  que disminuyen la citotoxicidad y establecen un TME inmunosupresor (Taghikhani *et al.*, 2020). Webber y colaboradores vieron que el TGF- $\beta$  puede estar presente en la superficie de las EV derivadas de líneas celulares de cáncer de próstata y mesotelioma, esas EV derivadas de cáncer pueden activar la vía de señalización del TGF- $\beta$  en fibroblastos e inducir fenotipos de tipo miofibroblasto (Naito *et al.*, 2017). Aunque los resultados de nuestro trabajo muestran que las células SW620 cultivadas en 2D o 3D secretan al TGF- $\beta$  principalmente en forma soluble, sabemos que esta forma es la que tiene impacto principalmente en las células aledañas más que en los órganos distantes (Webber *et al.*, 2015).

Por otra parte, se encontró una alta actividad de TGF- $\beta$  presente en los MC de los cultivos de las células SW620, aún mayor que la actividad vista en la curva patrón por el TGF- $\beta$  recombinante, siendo que se ha reportado que la concentración que satura la señal de TGF- $\beta$  es desde 100 pM (Li *et al.*, 2007), por lo que pensamos que debía existir algo en los MC que ejerce un efecto sinérgico con la vía del TGF- $\beta$ . Nuestros candidatos fueron el EGF o el B27, ya que su presencia causa un efecto sinérgico mas que aditivo con el TGF- $\beta$ , especialmente cuando el MC es activado por calor. Existen algunos ligandos del suplemento B27 como hormonas y vitaminas que pueden estar activando también a la vía del TGF- $\beta$  (Budi *et al.*, 2015; Saboor-Yaraghi *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2010), aunque el mayor efecto se vio con el EGF presente en el medio de cultivo de las SW620 en esferoides y se ha visto que éste ligando también puede promover indirectamente la vía de señalización del TGF- $\beta$  (Wrighton *et al.*, 2006).

Aunque el reportero 3TP-Lux se usa frecuentemente como indicador de la señalización del TGF- $\beta$ , por los sitios SBE presentes en el promotor del gen PAI-1, también se ha visto que el EGF puede activar a este reportero, ya que el EGF puede activar a PAI-1 directamente a través de las vías Ras/MAPK, por lo que es posible que el EGF con el que se cultivan a los esferoides, esté contribuyendo a aumentar los niveles de señalización del TGF- $\beta$  a través de las MAPK, como muestran los ensayos de gen reportero en las células AD293-3TP-Lux (Doody, 2001).

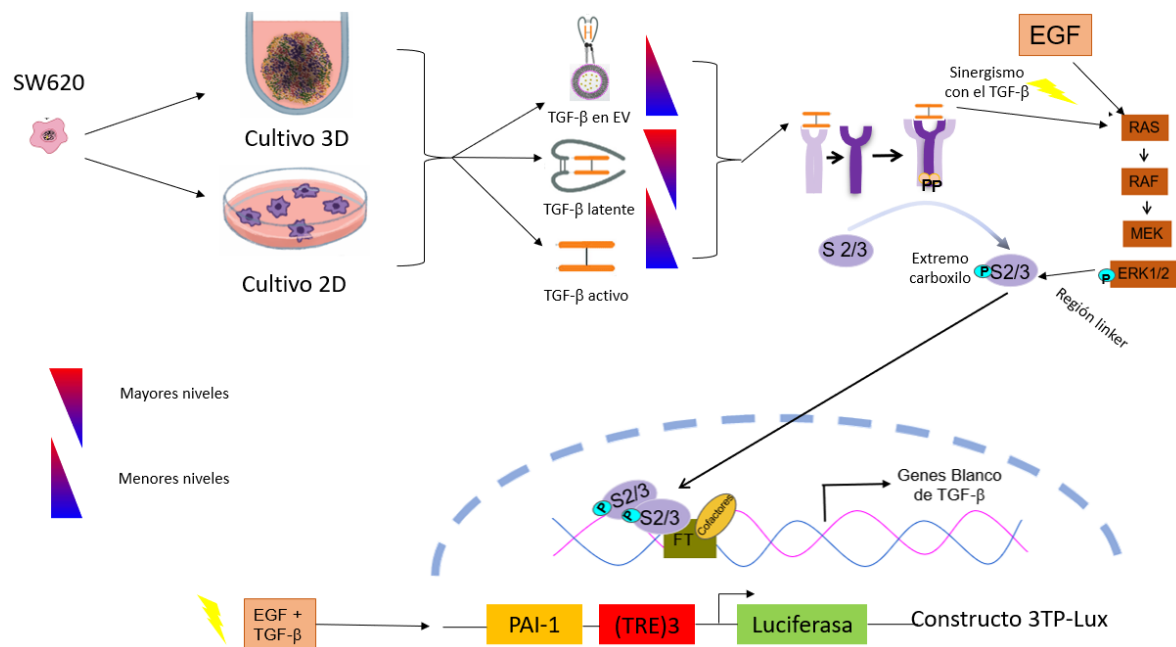
Por otro lado, también se investigó si este efecto sinérgico podía replicarse con otro plásmido reportero, usando el gen reportero 9xCAGA-Luc, el cual tiene 9 cajas de SBE (Dennler *et al.*, 1998). Sin embargo, al usar al gen reportero 9xCAGA-Luc para evaluar el efecto del suplemento B27 y del EGF sobre el efecto del rTGF- $\beta$ , se observó que se pierde este efecto sinérgico, por lo que el efecto observado previamente solo ocurre usando al gen reportero 3TP-Lux. Esto puede ser debido a que la construcción del gen reportero 3TP-Lux tiene algunas regiones que pueden ser reguladas por otras señales como la de las MAPK, mientras que la construcción del gen reportero 9xCAGA-Luc es más específica para la señal del TGF- $\beta$  y las Smads.

Posteriormente, para evaluar si el TGF- $\beta$  presente en el MC es capaz de regular la vía canónica del TGF- $\beta$ , se realizaron ensayos de WB e inmunofluorescencia, con el fin de evaluar la localización nuclear de Smad2 activa, así como la fosforilación de Smad2 en el extremo carboxilo, característica de la activación de la vía canónica del TGF- $\beta$  y la fosforilación de la región *linker*, característica de las vías canónicas (Roskoski *et al.*, 2012). Las vías no canónicas como las MAPK son activadas en las células AD293 cuando son tratadas con el MC de las células SW620 cultivadas en esferoides, aún en presencia del inhibidor SB431542, lo que puede estar ocurriendo por acción del EGF que se usa como suplemento, ya que se ha reportado que el EGF puede activar las vías no canónicas del TGF- $\beta$  al aumentar la fosforilación de Smad2 en las serinas 245/250/255 de la región *linker*, mediante las cinasas ERK1/2 (Wrighton *et al.*, 2006; Kamato *et al.*, 2019). La activación de las vías no canónicas se relacionó con la presencia de p-ERK1/2, donde se observó que a pesar de usar el inhibidor del receptor de ALK5, el SB431542, se seguía observando la fosforilación de la cinasa ERK1/2, esto es debido a que la activación de esta cinasa es mediada por los RTK, y no por los receptores con actividad de cinasa de serina/treonina (Witte *et al.*, 2017).

ERK1/2 pueden ser las enzimas que estén promoviendo la fosforilación de Smad2 en la región *linker*, lo que lleva a modificar su actividad transcripcional, ya que también se ha reportado que la activación de ERK1/2 puede llevar a la sobre-regulación de PAI-1, que puede estar contribuyendo al aumento de la actividad observada en los experimentos al usar el reportero 3TP-Lux (Hough *et al.*, 2012). Una de las formas de contribuir a la activación del promotor PAI-1 ha sido

reportado por Yoshimura *et al.*, (2006) donde se reportó que ERK1/2 puede promover la actividad de AP-1, lo que lleva a que ocurra la activación del promotor PAI-1, que se activa por Smad3 y AP-1, por otra parte, se ha reportado también el EGF puede activar la vía de las MAPK para regular a AP-1 y favorecer la activación del promotor PAI-1 (Kajanne *et al.*, 2007) (Figura 17).

Las células SW620 son un modelo de estudio importante en el contexto del CRC, pertenecen al subtipo CMS4 y no hay reportes anteriores sobre este subtipo en donde se analice la secreción del TGF- $\beta$ . Los resultados de este trabajo muestran que no se cumplió con la hipótesis, pero se encontraron resultados muy interesantes que muestran que las células SW620 secretan al TGF- $\beta$  principalmente en estado latente y una fracción activa, así como también secretan al TGF- $\beta$  de forma soluble y en menor proporción en EV.



**Figura 17. Modelo propuesto de secreción y efecto del TGF- $\beta$  por las células SW620.**

Las células SW620 cultivadas en monocapa (2D) y esferoides (3D), secretan al TGF- $\beta$  principalmente en forma soluble, en estado latente, mientras que en menor medida secretan al TGF- $\beta$  en vesículas y en estado activo. Una vez este TGF- $\beta$  es activado, se puede unir a los receptores de la familia del TGF- $\beta$ , así como también activar las vía no canónica del TGF- $\beta$  de MAPK, lo que termina por promover la fosforilación de Smad2 en el extremo carboxilo y en la región linker, respectivamente, entonces se forma un complejo posiblemente con Smad3 y se une a los factores de transcripción, junto con cofactores, para promover la transcripción de genes blanco del TGF- $\beta$ , aunque el efecto sinérgico que se observa con el EGF solo se observó con el constructo artificial 3TP-Lux.

## 11. Conclusiones

1. Las células SW620 cultivadas en 2D y 3D secretan al TGF- $\beta$  principalmente en estado activo, más que latente y de forma soluble, más que en exosomas.
2. Los exosomas aislados de las células SW620 cultivadas en 2D y 3D tienen una actividad muy discreta de TGF- $\beta$  que es sensible al inhibidor SB431542 del receptor ALK5.
3. El EGF recombinante y no el suplemento B27 que se adicionan al medio de cultivo de los esferoides, ejerce un efecto sinérgico con el TGF- $\beta$ , presente en los medios condicionados de las células SW620 cultivadas, solo cuando se mide la actividad del reportero 3TP-Lux y no del 9xCAGA-Luc.

## 12. Perspectivas

1. Demostrar si la vía de señalización de las MAPK es la que está activando el EGF para ejercer su efecto sinérgico con el TGF- $\beta$  presente en el medio de cultivo de los esferoides de células SW620.
2. Investigar la secreción del TGF- $\beta$  por las células SW620 en otro tipo de vesículas extracelulares diferentes a los exosomas, como son los oncosomas.
3. Evaluar la secreción del TGF- $\beta$  soluble y en vesículas extracelulares en otro modelo celular de cáncer colorrectal.
4. Estudiar la presencia de las proteínas transportadoras de TGF- $\beta$  en la membrana plasmática y en la superficie de las EV secretadas por las células de CRC.

## 13. Referencias

- Abels, E. R., & Breakefield, X. O. (2016). Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(3), 301-312.

- AlMusawi, S., Ahmed, M., & Nateri, A. S. (2021). Understanding cell-cell communication and signaling in the colorectal cancer microenvironment. *Clinical and Translational Medicine*, 11(2), e308.
- Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology*, 113(1), 1-11.
- Anaya, M., Moneriz, P. C. E., & Suárez, C. A. (2016). Implicaciones moleculares del Factor de crecimiento Transformante Beta (TGF- $\beta$ ) en el desarrollo de las fisuras labiopalatinas. *Avances en Odontología*, 32(5), 251-258.
- Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current Biology*, 30(16), R921-R925.
- Andriantsitohaina, R., & Papon, N. (2020). Extracellular Vesicles: New Bullets to Fight Fungal Infections. *Trends in Cell Biology*, 30(8), 589-590.
- Anand, S., Samuel, M., Kumar, S., & Mathivanan, S. (2019). Ticket to a bubble ride: Cargo sorting into exosomes and extracellular vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1867(12), 140203-140212.
- Annes, J. P., Munger, J. S., & Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGF $\beta$  activation. *Journal of cell science*, 116(2), 217-224.
- Arneth, B. (2020). Tumor microenvironment. *Medicina*, 56(1), 15-17.
- ATCC (2020). SW480 [SW-480] (ATCC CCL-228). <https://www.atcc.org/products/ccl-228>.
- ATCC (2020). SW620 [SW-620] (ATCC CCL-227). <https://www.atcc.org/products/ccl-227>.
- Baillie, R., Coombes, R. C., & Smith, J. (1996). Multiple forms of TGF- $\beta$ 1 in breast tissues: a biologically active form of the small latent complex of TGF- $\beta$ 1. *European Journal of Cancer*, 32(9), 1566-1573.
- Barczyk, M., Carracedo, S., & Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and tissue research*, 339(1), 269-280.
- Bebelman, M. P., Smit, M. J., Pegtel, D. M., & Baglio, S. R. (2018). Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacology & therapeutics*, 188, 1-11.

- Benedikter, B. J., Bouwman, F. G., Vajen, T., Heinzmann, A. C., Grauls, G., Mariman, E. C., ... & Stassen, F. R. (2017). Ultrafiltration combined with size exclusion chromatography efficiently isolates extracellular vesicles from cell culture media for compositional and functional studies. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13.
- Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M. T., Spring, J., Gallo, R. L., & Lose, E. J. (1992). Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annual review of cell biology*, 8(1), 365-393.
- Brown, K. G., Solomon, M. J., Mahon, K., & O'Shannassy, S. (2019). Management of colorectal cancer. *Bmj*, 366-372.
- Brownh, P. D., Wakefiel, L. M., Levinson, A. D., & Sporn, M. B. (1990). Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, and 3. *Growth factors*, 3(1), 35-43.
- Budi, E. H., Muthusamy, B. P., & Derynck, R. (2015). The insulin response integrates increased TGF- $\beta$  signaling through Akt-induced enhancement of cell surface delivery of TGF- $\beta$  receptors. *Science signaling*, 8(396), 96-132.
- Calon, A., Espinet, E., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D. V., Iglesias, M., Céspedes, M. V., Sevillano, S., Nadal, C., Jung, P., Zhang, X. H. F., Byrom, D., Riera, A., Rossell, D., Mangués, R., Massagué, J., Sanchi, E., & Batlle, E. (2012). Dependency of colorectal cancer on a TGF- $\beta$ -driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell*, 22(5), 571-584.
- Cárcamo, J., Weis, F. M., Ventura, F., Wieser, R., Wrana, J. L., Attisano, L., & Massague, J. (1994). Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Molecular and cellular biology*, 14(6), 3810-3821.
- Carrillo-Gálvez, A. B., Quintero, J. E., Rodríguez, R., Menéndez, S. T., González, M. V., Blanco-Lorenzo, V., ... & Anderson, P. (2020). GARP promotes the proliferation and therapeutic resistance of bone sarcoma cancer cells through the activation of TGF- $\beta$ . *Cell Death & Disease*, 11(11), 1-12.
- Charoenviriyakul, C., Takahashi, Y., Morishita, M., Nishikawa, M., & Takakura, Y. (2018). Role of extracellular vesicle surface proteins in the pharmacokinetics of extracellular vesicles. *Molecular Pharmaceutics*, 15(3), 1073-1080.
- Chen, L., Klass, C., & Woods, A. (2004). Syndecan-2 regulates transforming growth factor- $\beta$  signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 15715-15718.



- Choi, D. S., Choi, D. Y., Hong, B., Jang, S., Kim, D. K., Lee, J., ... & Gho, Y. (2012). Quantitative proteomics of extracellular vesicles derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells. *Journal of extracellular vesicles*, 1(1), 18704-18719.
- Ciardiello, D., Vitiello, P. P., Cardone, C., Martini, G., Troiani, T., Martinelli, E., & Ciardiello, F. (2019). Immunotherapy of colorectal cancer: Challenges for therapeutic efficacy. *Cancer treatment reviews*, 76, 22-32.
- Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 255-289.
- Comito, G., Ippolito, L., Chiarugi, P., & Cirri, P. (2020). Nutritional exchanges within tumor microenvironment: impact for cancer aggressiveness. *Frontiers in Oncology*, 10, 396.
- D'Souza-Schorey, C., & Schorey, J. S. (2018). Regulation and mechanisms of extracellular vesicle biogenesis and secretion. *Essays in Biochemistry*, 62(2), 125-133.
- Deep, G., & Schlaepfer, I. R. (2016). Aberrant lipid metabolism promotes prostate cancer: role in cell survival under hypoxia and extracellular vesicles biogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1061-1074.
- Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S., & Gauthier, J. M. (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF $\beta$ -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *The EMBO journal*, 17(11), 3091-3100.
- Doody, J. (2001). Repression of transforming growth factor beta signaling by epidermal growth factor, Ras and interferon gamma (Tesis de doctorado). Ciudad Universitaria de Nueva York.
- Elpek, G. Ö. (2015). Neuropilins and liver. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21(23), 7065-7075.
- Fadel, S., & Emma, R. (2019). Upregulation of Tissue Transglutaminase in Transforming Growth Factor- $\beta$  Induced Epithelial Mesenchymal TG2Transdifferentiation In Rat Tubular Epithelial Cells. *The Medical Journal of Cairo University*, 87, 3525-3534.
- Fink, M., & Wrana, J. L. (2022). Regulation of homeostasis and regeneration in the adult intestinal epithelium by the TGF- $\beta$  superfamily. *Developmental Dynamics*, 1-18.
- Flier, A., & Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell and tissue research*, 305(3), 285-298.

- Gajewski, T. F., Meng, Y., & Harlin, H. (2006). Immune suppression in the tumor microenvironment. *Journal of immunotherapy*, 29(3), 233-240.
- Ganesh, K., & Massagué, J. (2021). Targeting metastatic cancer. *Nature medicine*, 27(1), 34-44.
- Ganesh, K., Stadler, Z. K., Cercek, A., Mendelsohn, R. B., Shia, J., Segal, N. H., & Diaz, L. A. (2019). Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16(6), 361-375.
- Glinka, Y., & Prud'homme, G. J. (2008). Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor  $\beta$ -1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(1), 302-310.
- Granados-Romero, J. J., Valderrama-Treviño, A. I., Contreras-Flores, E. H., Barrera-Mera, B., Herrera Enríquez, M., Uriarte-Ruíz, K., ... & Arauz-Peña, G. (2017). Colorectal cancer: a review. *Int J Res Med Sci*, 5(11), 4667-4676.
- Grandclement, C., Pallandre, J. R., Degano, S. V., Viel, E., Bouard, A., Balland, J., Rémy-Martin, J. P., Simon, B., Rouleau, A., Boireau, W., Klagsbrun, M., Ferrand, C., & Borg, C. (2011). Neuropilin-2 expression promotes TGF- $\beta$ 1-mediated epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *PloS one*, 6(7), 1-13.
- Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., & Baruteau, J. (2021). The exosome journey: From biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 1-19.
- Gustafson, D., Veitch, S., & Fish, J. E. (2017). Extracellular vesicles as protagonists of diabetic cardiovascular pathology. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 4, 71-83.
- Hahm, K. B., Lee, K. M., Kim, Y. B., Hong, W. S., Lee, W. H., Han, S. U., ... & Kim, S. J. (2002). Conditional loss of TGF- $\beta$  signalling leads to increased susceptibility to gastrointestinal carcinogenesis in mice. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 16(2), 115-127.
- Han, L., Lam, E. W. F., & Sun, Y. (2019). Extracellular vesicles in the tumor microenvironment: old stories, but new tales. *Molecular cancer*, 18(1), 1-14.
- Harbige, L. S., Layward, L., Morris-Downes, M. M., Dumonde, D. C., & Amor, S. (2000). The protective effects of omega-6 fatty acids in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in relation to transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$  1) up-regulation and increased prostaglandin E2 (PGE2) production. *Clinical & Experimental Immunology*, 122(3), 445-452.

- Hawkes, C. P., & Levitt, L. E. K. (2017). *Fetal and Neonatal Physiology* (5<sup>a</sup> ed. Vol 2). Elsevier: Amsterdam, Netherlands. pp 1461-1470.
- Hewitt, R. E., McMarlin, A., Kleiner, D., Wersto, R., Martin, P., Tsoskas, M., ... & Stetler-Stevenson, W. G. (2000). Validation of a model of colon cancer progression. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 192(4), 446-454.
- Hough, C., Radu, M., & Doré, J. J. (2012). TGF-beta induced ERK phosphorylation of smad linker region regulates smad signaling. *PLoS ONE*, 7(8), 42513-42525.
- Huang, P., Xu, X., Wang, L., Zhu, B., Wang, X., & Xia, J. (2014). The role of EGF-EGFR signalling pathway in hepatocellular carcinoma inflammatory microenvironment. *Journal of cellular and molecular medicine*, 18(2), 218-230.
- Hurwitz, S. N., Olcese, J. M., & Meckes Jr, D. G. (2019). Extraction of extracellular vesicles from whole tissue. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (144), 59143-59149.
- Itatani, Y., Kawada, K., & Sakai, Y. (2019). Transforming growth factor- $\beta$  signaling pathway in colorectal cancer and its tumor microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5822-5837.
- Jabalee, J., Towle, R., & Garnis, C. (2018). The role of extracellular vesicles in cancer: cargo, function, and therapeutic implications. *Cells*, 7(8), 93-115.
- Jaiswal, R., & Sedger, L. M. (2019). Intercellular vesicular transfer by exosomes, microparticles and oncosomes-implications for cancer biology and treatments. *Frontiers in Oncology*, 9, 125-151.
- Javle, M., Li, Y., Tan, D., Dong, X., Chang, P., Kar, S., & Li, D. (2014). Biomarkers of TGF- $\beta$  signaling pathway and prognosis of pancreatic cancer. *PloS one*, 9(1), 1-8.
- Jenkins, L. M., Horst, B., Lancaster, C. L., & Myhre, K. (2018). Dually modified transmembrane proteoglycans in development and disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 39, 124-136.
- Ji, H., Greening, D. W., Barnes, T. W., Lim, J. W., Tauro, B. J., Rai, A., ... & Simpson, R. J. (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(10-11), 1672-1686.
- Joyce, J. A. (2005). Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer cell*, 7(6), 513-520.

- Kajanne, R., Miettinen, P., Mehlem, A., Leivonen, S. K., Birrer, M., Foschi, M., ... & Leppä, S. (2007). EGF-R regulates MMP function in fibroblasts through MAPK and AP-1 pathways. *Journal of cellular physiology*, 212(2), 489-497.
- Kenny, P. A., Lee, G. Y., & Bissell, M. J. (2007). Targeting the tumor microenvironment. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 12, 3468-3474.
- Keum, N., & Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16(12), 713-732.
- Kim, M., Yun, H. W., Park, D. Y., Choi, B. H., & Min, B. H. (2018). Three-dimensional spheroid culture increases exosome secretion from mesenchymal stem cells. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 15, 427-436.
- Kossatz, S., Beer, A. J., & Notni, J. (2021). It's Time to Shift the Paradigm: Translation and Clinical Application of Non- $\alpha\beta 3$  Integrin Targeting Radiopharmaceuticals. *Cancers*, 13(23), 5958-5971.
- Lai, X. N., Li, J., Tang, L. B., Chen, W. T., Zhang, L., & Xiong, L. X. (2020). MiRNAs and LncRNAs: dual roles in TGF- $\beta$  signaling-regulated metastasis in lung cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1193-1220.
- Lan, M., Zhu, X. P., Cao, Z. Y., Liu, J. M., Lin, Q., & Liu, Z. L. (2018). Extracellular vesicles-mediated signaling in the osteosarcoma microenvironment: roles and potential therapeutic targets. *Journal of Bone Oncology*, 12, 101-104.
- Li, L., Klim, J. R., Derda, R., Courtney, A. H., & Kiessling, L. L. (2011). Spatial control of cell fate using synthetic surfaces to potentiate TGF- $\beta$  signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(29), 11745-11750.
- Li, T., Wan, Y., Su, Z., Li, J., Han, M., & Zhou, C. (2021). Mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-3940-5p inhibits colorectal cancer metastasis by targeting integrin  $\alpha 6$ . *Digestive Diseases and Sciences*, 66(6), 1916-1927.
- Li, Z. W., & Dalton, W. S. (2006). Tumor microenvironment and drug resistance in hematologic malignancies. *Blood reviews*, 20(6), 333-342.
- Lim, J. W., Mathias, R. A., Kapp, E. A., Layton, M. J., Faux, M. C., Burgess, A. W., Ji, H., & Simpson, R. J. (2012). Restoration of full-length APC protein

in SW 480 colon cancer cells induces exosome-mediated secretion of DKK-4. *Electrophoresis*, 33(12), 1873-1880.

- López-Cortés, R., Muinelo-Romay, L., Fernández-Briera, A., & Gil-Martín, E. (2022). Inhibition of  $\alpha$  (1, 6) fucosyl transferase: Effects on Cell Proliferation, Migration, and Adhesion in an SW480/SW620 Syngeneic Colorectal Cancer Model. *International journal of molecular sciences*, 23(15), 8463-8478.
- Lu, M., Munger, J. S., Steadele, M., Busald, C., Tellier, M., & Schnapp, L. N. (2002). Integrin  $\alpha$ 8 $\beta$ 1 mediates adhesion to LAP-TGF-B1. *Journal of Cell Science*, 115(23), 4641-4649.
- Luo, K. (2017). Signaling cross talk between TGF- $\beta$ /Smad and other signaling pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(1), 1-29.
- Mamuya, F. A., & Duncan, M. K. (2011).  $\alpha$ V integrins and TGF- $\beta$ -induced EMT: a circle of regulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(3), 445-455.
- Mare, J. A. de la, Jurgens, T., & Edkins, A. L. (2017). Extracellular Hsp90 and TGF $\beta$  regulate adhesion, migration and anchorage independent growth in a paired colon cancer cell line model. *BMC Cancer*, 17(1), 1-16.
- Martínez, A. P. (2018). Avances en la fisiopatología de los aneurismas aórticos en el síndrome de Marfan (Trabajo fin de grado), Universidad de Cantabria, España.
- Mei, J., & Xu, R. J. (2005). Transient changes of transforming growth factor- $\beta$  expression in the small intestine of the pig in association with weaning. *British journal of nutrition*, 93(1), 37-45.
- Metelli, A., Salem, M., Wallace, C. H., Wu, B. X., Li, A., Li, X., & Li, Z. (2018). Immunoregulatory functions and the therapeutic implications of GARP-TGF- $\beta$  in inflammation and cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1), 1-11.
- Miyazono, K., Olofsson, A., Colosetti, P., & Heldin, C. H. (1991). A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *The EMBO journal*, 10(5), 1091-1101.
- Mojarad, E. N., Kuppen, P. J., Aghdaei, H. A., & Zali, M. R. (2013). The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 6(3), 120-128.
- Morikawa, M., Derynck, R., & Miyazono, K. (2016). TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  family: context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(5), 1-25.

- Mouradov, D., Sloggett, C., Jorissen, R. N., Love, C. G., Li, S., Burgess, A. W., ... & Sieber, O. M. (2014). Colorectal Cancer Cell Lines Are Representative Models of the Main Molecular Subtypes of Primary Cancer Genomic Landscape of Colorectal Cancer Cell Lines. *Cancer research*, 74(12), 3238-3247.
- Naito, Y., Yoshioka, Y., Yamamoto, Y., & Ochiya, T. (2017). How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(4), 697-713.
- Nath, S., & Devi, G. R. (2016). Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology & therapeutics*, 163, 94-108.
- Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(4), 213-259.
- Otegbeye, F., Ojo, E., Moreton, S., Mackowski, N., Lee, D. A., de Lima, M., & Wald, D. N. (2018). Inhibiting TGF-beta signaling preserves the function of highly activated, in vitro expanded natural killer cells in AML and colon cancer models. *PloS one*, 13(1), 1-13.
- Pang, H., Liu, L., Sun, X., Xi, W., Bao, Y., Wu, L., ... & Zhao, C. (2021). Exosomes derived from colon cancer cells and plasma of colon cancer patients promote migration of SW480 cells through Akt/mTOR pathway. *Pathology-Research and Practice*, 222, 153454-153463.
- Peng, C., Zou, X., Xia, W., Gao, H., Li, Z., Liu, N., Xu, Z., Gao, C., He, Z., Niu, W., Fang, R., Biswas, S., Agrez, M., Zhi, X., & Niu, J. (2018). Integrin  $\alpha\beta6$  plays a bi-directional regulation role between colon cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *Bioscience Reports*, 38(6), 1-11.
- Peralta-Zaragoza, O., Lagunas-Martínez, A., & Madrid-Marina, V. (2001). Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *Salud Pública de México*, 43, 340-351.
- Plein, A., Fantin, A., & Ruhrberg, C. (2014). Neuropilin regulation of angiogenesis, arteriogenesis, and vascular permeability. *Microcirculation*, 21(4), 315-323.
- Petrovčíková, E., Vičíková, K., & Leksa, V. (2018). Extracellular vesicles—biogenesis, composition, function, uptake and therapeutic applications. *Biologia*, 73(4), 437-448.

- Pramila, E., Dillard, C., & Escargueil, A. E. (2021). Colorectal Cancer and Immunity: From the Wet Lab to Individuals. *Cancers*, 13(7), 1713-1734.
- Pritchard, C. (2013). *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (2<sup>a</sup> ed.). Elsevier: Amsterdam, Netherlands. pp 497-499.
- Ramamoorthi, G., & Sivalingam, N. (2014). Molecular mechanism of TGF- $\beta$  signaling pathway in colon carcinogenesis and status of curcumin as chemopreventive strategy. *Tumor Biology*, 35(8), 7295-7305.
- Record, M., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., & Wakelam, M. O. (2018). Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions. *Journal of Lipid Research*, 59(8), 1316-1324.
- Robertson, I. B., & Rifkin, D. B. (2013). Unchaining the beast; insights from structural and evolutionary studies on TGF $\beta$  secretion, sequestration, and activation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 24(4), 355-372.
- Rodrigues-Junior, D. M., Tsigoti, C., Lim, S. K., Heldin, C. H., & Moustakas, A. (2022). Extracellular vesicles and transforming growth factor  $\beta$  signaling in cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10, 761-781.
- Rojas, A., Padidam, M., Cress, D., & Grady, W. M. (2009). TGF- $\beta$  receptor levels regulate the specificity of signaling pathway activation and biological effects of TGF- $\beta$ . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1793(7), 1165-1173.
- Roskoski Jr, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66(2), 105-143.
- Saboor-Yaraghi, A. A., Harirchian, M. H., Mohammadzadeh Honarvar, N., Bitarafan, S., Abdolahi, M., Siassi, F., ... & Koohdani, F. (2015). The effect of vitamin A supplementation on FoxP3 and TGF- $\beta$  gene expression in Avonex-treated multiple sclerosis patients. *Journal of molecular neuroscience*, 56(3), 608-612.
- Salas, L. M. A., García, D. P. O., Mendoza, L. D. F., Pérez, C. M. P., Sosa, G. M., Mota, L. A. C., Soldevila, M. M. G., Robles, F. M., & Macías, S. M. (2023). El cáncer colorrectal y la citocina TGF- $\beta$ : Las células tumorales humanas SW480 y SW620 como modelo de estudio. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. (Enviado).
- Sasaki, A., Naganuma, H., Satoh, E., Kawataki, T., Amagasaki, K., & Nukui, H. (2001). Participation of thrombospondin-1 in the activation of latent transforming growth factor-beta in malignant glioma cells. *Neurologia medico-chirurgica*, 41(5), 253-259.

- Schubert, A., & Boutros, M. (2020). Extracellular vesicles and oncogenic signaling. *Molecular Oncology*, 15(1), 3-26.
- Senties-Gómez, M. D., Gálvez-Gastélum, F. J., Meza-García, E., & Armendáriz-Borunda, J. (2005). Fibrosis Hepática: El papel de las metaloproteinasas y de TGF- $\beta$ . *Gaceta Médica de México*, 141(4), 315-322.
- Shelke, G. V., Yin, Y., Jang, S. C., Lässer, C., Wennmalm, S., Hoffmann, H. J., Li, L., Gho, Y. S., Nilsson, J. A., & Lötval, J. (2019). Endosomal signalling via exosome surface TGF $\beta$ -1. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8(1), 1650458-1650477.
- Shifrin Jr, D. A., Beckler, M. D., Coffey, R. J., & Tyska, M. J. (2013). Extracellular vesicles: communication, coercion, and conditioning. *Molecular Biology of the Cell*, 24(9), 1253-1259.
- Siekmann, W., Tina, E., Koskela von Sydow, A., & Gupta, A. (2019). Effect of lidocaine and ropivacaine on primary (SW480) and metastatic (SW620) colon cancer cell lines. *Oncology Letters*, 18(1), 395-401.
- Simons, M., & Raposo, G. (2009). Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication. *Current opinion in cell biology*, 21(4), 575-581.
- Stockis, J., Colau, D., Coulie, P. G., & Lucas, S. (2009). Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF- $\beta$  on the surface of activated human Treg. *European journal of Immunology*, 39(12), 3315-3322.
- Stockis, J., Dedobbeleer, O., & Lucas, S. (2017). Role of GARP in the activation of latent TGF- $\beta$ 1. *Molecular BioSystems*, 13(10), 1925-1935.
- Sun, L., Jin, H., & Li, H. (2016). GARP: a surface molecule of regulatory T cells that is involved in the regulatory function and TGF- $\beta$  releasing. *Oncotarget*, 7(27), 42826.
- Taghikhani, A., Farzaneh, F., Sharifzad, F., Mardpour, S., Ebrahimi, M., & Hassan, Z. M. (2020). Engineered tumor-derived extracellular vesicles: potentials in cancer immunotherapy. *Frontiers in immunology*, 11, 221.
- Takada, Y., Ye, X., & Simon, S. (2007). The integrins. *Genome biology*, 8(5), 1-9.
- Tan, C. F., Teo, H. S., Park, J. E., Dutta, B., Tse, S. W., Leow, M. K. S., Wahli, W., & Sze, S. K. (2020). Exploring Extracellular Vesicles Biogenesis in Hypothalamic Cells through a Heavy Isotope Pulse/Trace Proteomic Approach. *Cells*, 9(5), 1320-1341.
- Tang, R., Gasvoda, K., Rabin, J., & Alsberg, E. (2021). Transforming growth factor- $\beta$ 1 is resilient to heat-induced conformational change.



[https://web.archive.org/web/20220517225415id\\_/https://chemrxiv.org/engage/apigateway/chemrxiv/assets/orp/resource/item/60c756a0ee301c7fe8c7b3b7/original/transforming-growth-factor-b1-is-resilient-to-heat-induced-conformational-change.pdf](https://web.archive.org/web/20220517225415id_/https://chemrxiv.org/engage/apigateway/chemrxiv/assets/orp/resource/item/60c756a0ee301c7fe8c7b3b7/original/transforming-growth-factor-b1-is-resilient-to-heat-induced-conformational-change.pdf) -.

- Tazat, K., Hector-Greene, M., Blobe, G. C., & Henis, Y. I. (2015). T $\beta$ RIII independently binds type I and type II TGF- $\beta$  receptors to inhibit TGF- $\beta$  signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 26(19), 3535-3545.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 30(1), 3-22.
- Toledo-Padilla, D., Coquis-Bucio, D.A. Sosa-Garrocho, M., & Macías-Silva M. (2023). Síntesis, secreción y activación de la citocina TGF-beta: Relevancia en la salud y la enfermedad. *Revista de Educación Bioquímica*. (En prensa).
- Trobridge, P., Knoblaugh, S., Washington, M. K., Munoz, N. M., Tsuchiya, K. D., Rojas, A., Song, X., Ulrich, C. M., Sasazuki, T., & Grady, W. M. (2009). TGF- $\beta$  receptor inactivation and mutant Kras induce intestinal neoplasms in mice via a  $\beta$ -catenin-independent pathway. *Gastroenterology*, 136(5), 1680-1688.
- Tu, J., Luo, X., Liu, H., Zhang, J., & He, M. (2021). Cancer spheroids derived exosomes reveal more molecular features relevant to progressed cancer. *Biochemistry and biophysics reports*, 26, 101026-101032.
- Vilchis-Landeros, M., Juárez, P., & López-Casillas, F. (2003). El papel fisiopatológico del TGF- $\beta$  en las nefropatías de diversas etiologías: los inhibidores del TGF- $\beta$  como agentes terapéuticos potenciales. *Gac Med Mex*, 139, 126-134.
- Vivekanandhan, S., & Mukhopadhyay, D. (2019). Genetic status of KRAS influences transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) signaling: an insight into neuropilin-1 (Nrp1) mediated tumorigenesis. *In Seminars in cancer biology* 54, 72-79.
- Wakefield, L. M., Winokur, T. S., Hollands, R. S., Christopherson, K., Levinson, A. D., & Sporn, M. B. (1990). Recombinant latent transforming growth factor beta 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor beta 1, and a different tissue distribution. *The Journal of clinical investigation*, 86(6), 1976-1984.
- Wang, S., Gao, X., Shen, G., Wang, W., Li, J., Zhao, J., Wei, Y. Q., & Edwards, C. K. (2016a). Interleukin-10 deficiency impairs regulatory T cell-

derived neuropilin-1 functions and promotes Th1 and Th17 immunity. *Scientific Reports*, 6(1), 1-16.

- Wang, J., Zhang, B., Wu, H., Cai, J., Sui, X., Wang, Y., ... & Xiang, A. P. (2016b). CD51 correlates with the TGF-beta pathway and is a functional marker for colorectal cancer stem cells. *Oncogene*, 36(10), 1351-1363.
- Wang, S., Zhang, Z., & Gao, Q. (2021). Transfer of microRNA-25 by colorectal cancer cell-derived extracellular vesicles facilitates colorectal cancer development and metastasis. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 23, 552-564.
- Webber, J., Steadman, R., Mason, M. D., Tabi, Z., & Clayton, A. (2010). Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Research*, 70(23), 9621-9630.
- Weber, C. E., & Kuo, P. C. (2012). The tumor microenvironment. *Surgical oncology*, 21(3), 172-177.
- Whiteside, T. L. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27(45), 5904-5912.
- Witte, D., Otterbein, H., Förster, M., Giehl, K., Zeiser, R., Lehnert, H., & Ungefroren, H. (2017). Negative regulation of TGF-β1-induced MKK6-p38 and MEK-ERK signalling and epithelial-mesenchymal transition by Rac1b. *Scientific reports*, 7(1), 1-15.
- Worthington, J. J., Fenton, T. M., Czajkowska, B. I., Klementowicz, J. E., & Travis, M. A. (2012). Regulation of TGFβ in the immune system: an emerging role for integrins and dendritic cells. *Immunobiology*, 217(12), 1259-1265.
- Wrana, J. L., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., ... & Massague, J. (1992). TGFβ signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell*, 71(6), 1003-1014.
- Wu, T., & Dai, Y. (2017). Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer letters*, 387, 61-68.
- Xie, Y. H., Chen, Y. X., & Fang, J. Y. (2019). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 1-30.
- Xing, H., Liang, C., Xu, X., Sun, H., Ma, X., & Jiang, Z. (2020). Mesenchymal stroma/stem-like cells of GARP knockdown inhibits cell proliferation and invasion of mouse colon cancer cells (MC38) through exosomes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(23), 13984-13990.

- Xu, Y., & Pasche, B. (2007). TGF- $\beta$  signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Human molecular genetics*, 16(R1), R14-R20.
- Yamada, N., Kuranaga, Y., Kumazaki, M., Shinohara, H., Taniguchi, K., & Akao, Y. (2016). Colorectal cancer cell-derived extracellular vesicles induce phenotypic alteration of T cells into tumor-growth supporting cells with transforming growth factor- $\beta$ 1-mediated suppression. *Oncotarget*, 7(19), 27033-27043.
- Yang, Z. Z., Grote, D. M., Ziesmer, S. C., Xiu, B., Yates, N. R., Secreto, F. J., ... & Ansell, S. M. (2013). Soluble and membrane-bound TGF- $\beta$ -mediated regulation of intratumoral T cell differentiation and function in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *PLoS one*, 8(3), e59456.
- Yoneda, A., & Couchman, J. R. (2003). Regulation of cytoskeletal organization by syndecan transmembrane proteoglycans. *Matrix biology*, 22(1), 25-33.
- Yoshimura, H., Nakahama, K., Safronova, O., Tanaka, N., Muneta, T., & Morita, I. (2006). Transforming growth factor- $\beta$  stimulates IL-1 $\beta$ -induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human synovial cells via the ERK/AP-1 pathway. *Inflammation Research*, 55(12), 543-549.
- Yu, L., Moore, A. B., & Dixon, D. (2010). Receptor tyrosine kinases and their hormonal regulation in uterine leiomyoma. *Seminars in reproductive medicine*, 28(3), 250-259.
- Zhang, J., Ten Dijke, P., Wuhrer, M., & Zhang, T. (2021). Role of glycosylation in TGF- $\beta$  signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Protein & cell*, 12(2), 89-106.
- Zhou, M., Niu, J., Wang, J., Gao, H., Shahbaz, M., Niu, Z., ... & Liang, B. (2020). Integrin  $\alpha\beta$ 8 serves as a Novel Marker of Poor Prognosis in Colon Carcinoma and Regulates Cell Invasiveness through the Activation of TGF- $\beta$ 1. *Journal of Cancer*, 11(13), 3803-3815.

## 14. Anexo I

### Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Compañía	Número de catálogo
$\beta$ -tubulina	Sigma Aldrich	T5293
$\beta$ -actina	Santa Cruz	SC-47778
Alix	Santa Cruz	SC-53540
CD63	Santa Cruz	SC-5275
TSG101	Santa Cruz	SC-7964
p-ERK 1/2 (Thr202/ Tyr204)	Cell Signaling	9101S
p-Smad2 (Ser423/425)	Santa Cruz	SC-11769
p-Smad2 (Ser245/250/255)	Cell Signaling	3104S

### Buffer de corrida 10x

Tris Base	30.2g
Glicina	144g
SDS 10%	100mL

Se diluye a 1x antes de usarse

### Buffer de transferencia 10x

Tris Base	30.3g
Glicina	144.15g

Se diluye a 1x agregando 100 mL del buffer 10x con 700 mL de H<sub>2</sub>O y 200 mL de metanol absoluto

### Inhibidores de fosfatasas (para 1mL de buffer)

NaF [1M]	25 $\mu$ L [25 mM]
Nappi [100mM]	10 $\mu$ L [1mM]
NaVO <sub>4</sub> [100mM]	10 $\mu$ L [1mM]

### Inhibidores de proteasas (para 1mL de buffer)

PMSF	5 $\mu$ L [2.87 $\mu$ M]
Inhibidores de tripsina	2 $\mu$ L [ $1 \times 10^{-4}$ $\mu$ M]
Pepstatina A	2 $\mu$ L [2.92 $\mu$ M]
Leupeptina	2 $\mu$ L [4.69 $\mu$ M]
Benzamidina	2 $\mu$ L [1.66 $\mu$ M]
$\beta$ -glicerofosfato	2 $\mu$ L [9.26 $\mu$ M]

### Geles de acrilamida

Geles del 10%

Componente	Concentrador	Separador
H <sub>2</sub> O	11.9mL	11.9mL
Acrilamida/bisacrilamida (30%:0.8)	2.7mL	10mL
Tris [1.5M] pH 8.8	-	7.5mL
Tris [0.5M] pH 6.8	5mL	-
SDS (10%)	200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
APS (10%)	220 $\mu$ L	300 $\mu$ L
TEMED	15 $\mu$ L	12 $\mu$ L

Geles del 7%

Componente	Concentrador	Separador
H <sub>2</sub> O	11.9mL	14.9mL
Acrilamida/bisacrilamida (30%:0.8)	2.7mL	7mL
Tris [1.5M] pH 8.8	-	7.5mL
Tris [0.5M] pH 6.8	5mL	-

SDS (10%)	200 $\mu$ L	300 $\mu$ L
APS (10%)	220 $\mu$ L	300 $\mu$ L
TEMED	15 $\mu$ L	21 $\mu$ L

### Laemmli 2x (para 4mL)

Tris [0.5]	1mL
Glicerol	0.8mL
SDS (10%)	1.6mL
Azul de bromofenol (2%)	0.2mL
$\beta$ -mercaptoetanol	0.4mL

### PBS (para 1L)

NaCl	8.06g
KCl	0.22g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2g

### RIPA (para 500mL)

Tris HCl [1M]	25mL
NaCl [5M]	15mL
EDTA [0.5M]	1mL
SDS (10%)	5mL
NP40	5mL
Deoxicolato de sodio	2.5g

### TBS 10x

Tris base	24.2g
NaCl	80g
HCl	14mL

Ajustar pH a 7.6

### TBS-T (para 1L)

TBS 10x	100mL
Tween 20	1mL

H <sub>2</sub> O	899mL
------------------	-------

**TN 10x (para 100mL)**

Tris [1M]	50mL
NaCl [5M]	30mL
H <sub>2</sub> O	20mL

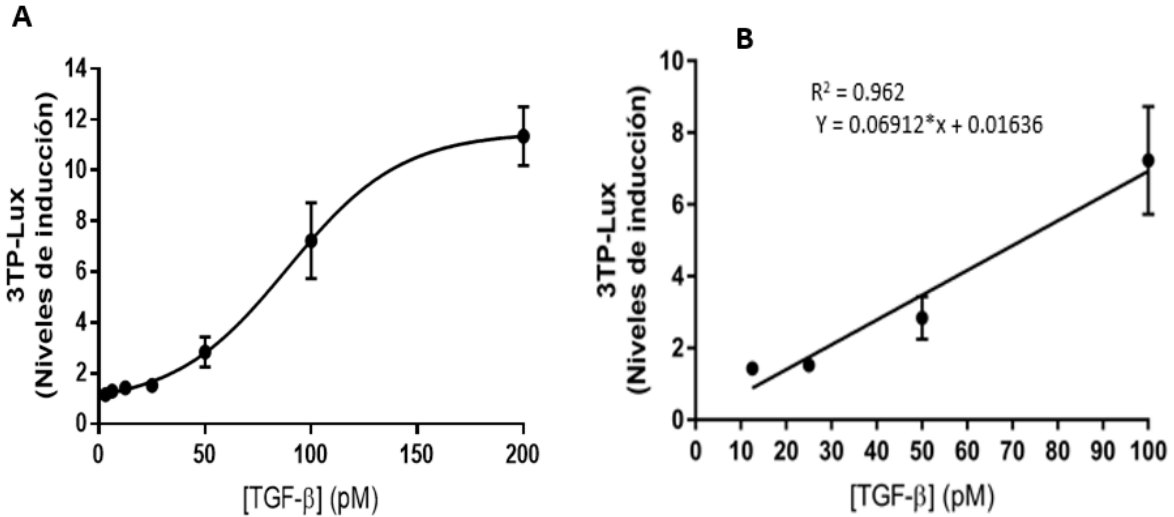
**TNTE (para 100mL)**

TN (10x)	10mL
EDTA [0.5M]	0.2mL
Tritón (10%)	5mL
H <sub>2</sub> O	85mL

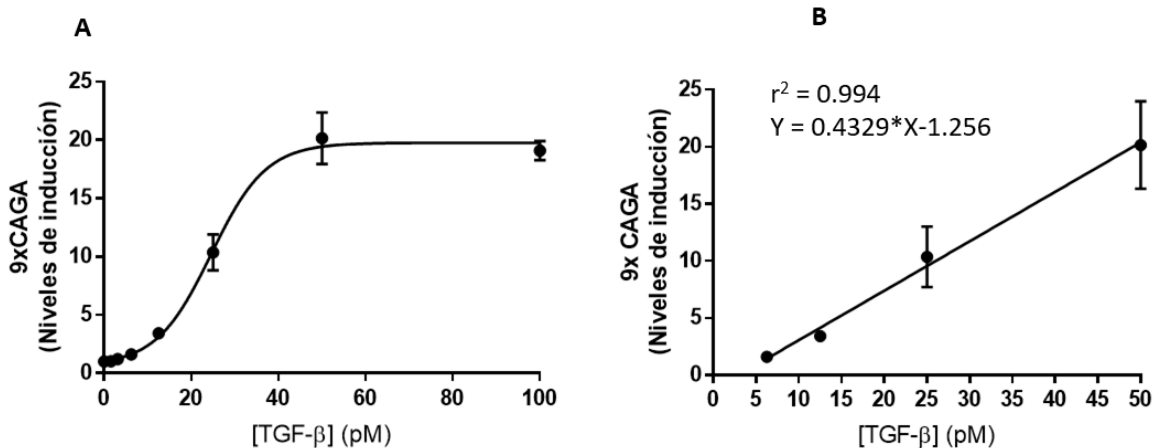
**Tripsina (0.25%)**

HBSS	50mL
Rojo de fenol	5mg
EDTA [0.5M]	1mL
Tripsina	1.25g

## 15. Anexo II



**Curva de referencia con el promotor 3TP-Lux.** A) Curva dosis respuesta, diluciones seriadas de [rTGF-β]: 3.12/6.25/12.5/25/50/100/200 pM. B) Ajuste de recta con los valores de tendencia lineal para obtener la ecuación y poder interpolar los resultados posteriores. Representativo de cuatro experimentos independientes.



**Curva de referencia con el promotor 9xCAGA.** A) Curva dosis respuesta, diluciones seriadas de [rTGF-β]: 1.56/3.12/6.25/12.5/25/50/100 pM. B) Ajuste de recta con los valores de tendencia lineal para obtener la ecuación y poder interpolar los resultados posteriores. Los valores son expresados como media ± SEM. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.