



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**  
**PAPEL DE LAS INTEGRINAS EN LA**  
**METÁSTASIS**

Autor: Silvia Martín Garrido

Tutor: Dra. María del Carmen de Juan Chocano

Convocatoria: Junio 2019

# **INDICE:**

<b>Resumen.....</b>	<b>2</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>2</b>
1.1.Exosomas.....	3
1.1.1. Biogénesis.....	3
1.1.2. Estructura ycomporsición .....	4
1.2.Integrinas.....	5
1.2.1. Rasgos estructurales.....	6
1.2.2. Localización y función.....	7
1.2.3. Tipos de señalización.....	8
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>9</b>
<b>3. Material y métodos.....</b>	<b>9</b>
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>9</b>
4.1 Expresión de las integrinas en cáncer.....	9
4.2 Papel de las integrinas en la metástasis: La cascada metastásica .....	11
4.3 Ejemplo: Integrina $\alpha\beta 3$ y la metástasis.....	14
4.4 Exosomas, integrinas y organotropismo.....	16
<b>5. Conclusión.....</b>	<b>18</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>19</b>



## **Resumen**

Desde que Stephen Paget desarrolló la teoría “seed and soil”, muchas han sido las investigaciones realizadas para intentar descubrir cuál es la pieza clave implicada en el organotropismo metastásico.

Así, tras los experimentos desarrollados por el Dr. Lyden y su equipo, finalmente se comprobó el papel primordial de unas vesículas secretadas por las células tumorales, conocidas como exosomas; las cuales fueron señaladas como las principales responsables de la progresión tumoral, gracias a su participación en el “acondicionamiento” del tejido u órgano elegido por el cáncer para producir la metástasis. Por ello, Lyden optó, por estudiar más a fondo estas vesículas, observando finamente que en la superficie de los exosomas se encuentran expresados de manera abundante, una familia de moléculas de adhesión, conocidas como integrinas.

Estas integrinas, parecen tener un papel primordial en el organotropismo metastásico, de hecho, se ha comprobado que según el patrón de integrinas expresado en su superficie, los exosomas tumorales, se dirigen hacia un órgano predeterminado, donde se encuentran sus dianas, consiguiendo esta organoespecificidad dentro de la progresión tumoral.

*Palabras clave: exosomas, integrinas, organotropismo metastásico, cascada metastásica, nicho pre-metastásico, metástasis.*

## **Abstract**

Since Stephen Paget developed the theory "seed and soil", many have been the investigations carried out to try to discover which is the key piece involved in metastatic organotropism. Thus, after the experiments developed by DR. Lyden and his team finally found the primordial role of vesicles secreted by tumor cells, known as exosomes, and which were identified as the main responsible for tumor progression, thanks to their participation in the "conditioning" of tissue or organ chosen by cancer to produce metastasis.. Therefore, Lyden chose to study these vesicles more thoroughly, observing finally that a family of adhesion molecules, known as integrins, are abundantly expressed on the surface of exosomes. These integrins seem to be the real responsible for metastatic organotropism, in fact, it has been found that according to the integrin pattern expressed on its surface, the tumor exosomes are directed towards a predetermined organ, where their targets are found, achieving this organospecificity within the tumor progression.

*Key words: exosomes, integrins, metastatic organotropism, metastatic cascade, pre-metastatic niche, metastasis*

## **1. Introducción.**

Las células pueden comunicarse unas con otras mediante la liberación de vesículas extracelulares (EVs) que son capaces de interactuar y modificar el comportamiento de sus células diana independientemente de la distancia a la que se encuentren respecto al foco de liberación.

Estas vesículas extracelulares se pueden definir como un grupo heterogéneo de “mensajeros multi-señal” capaces de desencadenar distintas funciones biológicas en su lugar de acción, gracias a las biomoléculas que contienen y expresan en su superficie.

En base a su origen, las EVs se pueden dividir en dos subgrupos; vesículas obtenidas directamente de la membrana plasmática, y “pequeñas” vesículas generadas dentro de compartimentos endosomales denominados exosomas (figura 1). [1]

## 1.1 Exosomas

El término “exosoma” fue acuñado por primera vez en 1981 por E.G.Trams, el cual descubrió en un cultivo celular, que tanto células normales como neoplásicas, podían secretar unas vesículas con actividad 5'-nucleotidasa. Años después, Pan y Harding describieron con detalle el proceso de secreción de exosomas tras estudiar los fenómenos de endocitosis y procesamiento de receptores de transferrina en los reticulocitos.

Estos exosomas son un grupo muy heterogéneo de vesículas de tamaño nanométrico (30-150nm), cuya composición y estructura dependen del fenotipo de la célula que los ha generado. Presentan forma de “copa” y se encuentran rodeadas por una bicapa lipídica rica en colesterol, esfingomielina y ceramida. Sobre esta superficie, existen una serie de proteínas de membrana (tetraspaninas), moléculas de adhesión (integrinas) y receptores, específicos de cada tipo de exosoma y que determinan el lugar sobre el que van a actuar. [2,3]

### 1.1.1 Biogénesis de los exosomas (Figura 1)

La formación de los exosomas tiene lugar en los endosomas, esto se conoce dado que las proteínas encontradas dentro de estas vesículas tienen un origen citosólico, fundamentalmente procedentes de compartimentos endocíticos.

Aunque su síntesis y liberación pueden seguir distintos caminos, todo comienza con la invaginación de la membrana endosomal para formar lo que se conocen como cuerpos multivesiculares (MVBs) los cuales contienen vesículas intraluminales (ILVs).

Un componente que es imprescindible para la formación de estos MVBs, es la ceramida obtenida a partir de la hidrólisis de la esfingomiosina presente en la membrana.

La formación de los MVBs puede ocurrir de manera dependiente al complejo ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) o bien de manera independiente a éste.

En el proceso dependiente de ESCRT, intervienen 4 complejos distintos: ESCRT-0,-I,-II y III. La liberación de los cuerpos multivesiculares (MVBs) empieza con la unión del complejo ESCRT-0 a los endosomas consiguiendo su interacción con los restos de ubiquitina contenido dentro de los mismos. Mientras sucede esto, los complejos ESCRT-I y ESCRT-II facilitan la maduración de estos cuerpos multivesiculares (endosomas tardíos) que se fusionaran con la membrana plasmática del endosoma para conseguir la liberación de los ILVs al medio extracelular en forma de exosomas estimulada por la acción de RabGTPasas 27a y 27b.[1,4]

El mecanismo explicado anteriormente resumiría el proceso dependiente del complejo ESCRT donde es necesario resaltar la acción de las proteínas, ALIX y VPS32, las cuales de manera eventual colaboran en la escisión y formación de las vesículas. [1,4]

Aunque este complejo es considerado importante en la formación de los ILVs, recientemente se ha demostrado que su síntesis puede producirse de manera independiente al complejo ESCRT, donde las tetraspaninas y la esfingosina 1-fosfato han desvelado ser imprescindibles para la liberación de las vesículas una vez formadas. Otras proteínas de interés para la regulación de este mecanismo son las SNAREs, que junto con las RasGtpasas reducen la barrera energética que deben superar los exosomas para su liberación.

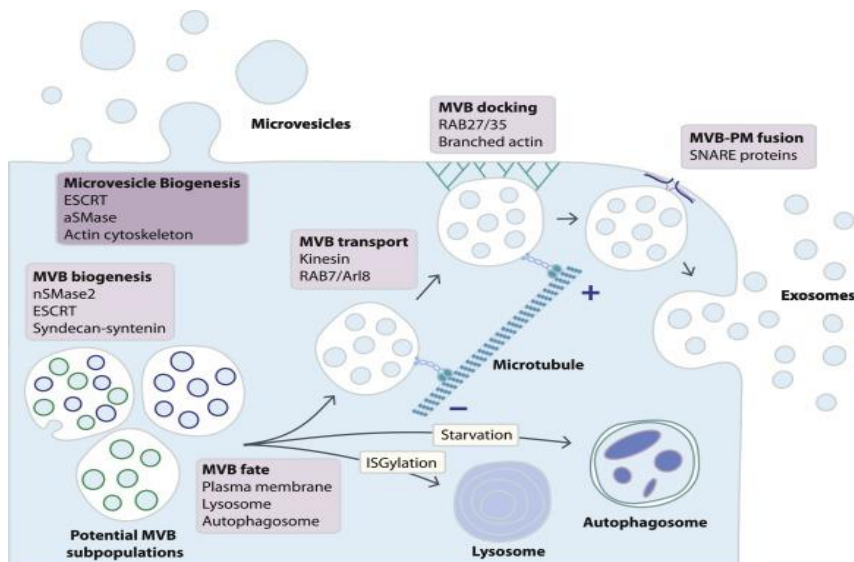


Figura 1. Esquema representativo de las diferentes rutas de biogénesis de los exosomas. Los exosomas se forman dentro de los cuerpos multivesiculares (MVBs). Así, estas vesículas sufren un proceso de maduración produciéndose en su interior unas vesículas intraluminales (ILVs), las cuales se fusionan con la membrana plasmática para conseguir liberarse al exterior de la célula en forma de exosomas. Además todo este proceso de biogénesis y transporte hacia el exterior se encuentra altamente regulado por distintos complejos (ESCRT, microtúbulos) y proteínas como las pertenecientes a la familia SNARE y a la familia Rab.

Este proceso de biogénesis engloba a una gran diversidad de moléculas para garantizar su correcto funcionamiento. Una de estas moléculas descubiertas por Baietti y su equipo en 2012, fue el sindecano (un proteoglicano heparan sulfato) por su papel en la formación de los exosomas por el complejo ESCRT-III. Su trabajo mostró que la interacción entre el sindecano y ESCRT está mediada por una proteína adaptadora, denominada sintenina que conecta a su vez todo este complejo con la proteína Alix, aportando un punto de regulación esencial en la formación y liberación de los exosomas al medio extracelular.

Finalmente, aunque se han realizado diversos estudios sobre la formación y liberación de los exosomas, éste sigue siendo un campo de estudio incierto, ya que se desconocen los mecanismos exactos por los cuales se produce la secreción de los exosomas o qué factores determinan la composición específica de estas vesículas extracelulares.

### 1.1.2 Estructura y composición (Figura 2)

Existen numerosos estudios que describen los componentes que conforman los exosomas, desde proteínas, lípidos hasta material genético de distinta índole (RNA, DNA...). Sin embargo, aunque el contenido es similar en todas estas vesículas, existen disparidades en su composición según el tipo de célula, el ambiente o mecanismo implicado en la liberación de los exosomas al medio extracelular. [3]

Como ya se ha citado anteriormente, estas vesículas se encuentran rodeadas por una bicapa lipídica con proteínas de membrana características del tipo de célula que la secreta. Así, la composición lipídica incluye colesterol, esfingomiélin, hexosilceramidas, fosfatidilserina y ácidos grasos saturados. [2]

Respecto al material genético presente en los exosomas, el RNA despunta como la biomolécula más importante por su papel en la progresión y transferencia de genes relacionados con el desarrollo de tumores.

Las primeras clases de ácidos nucleicos que se identificaron en estas vesículas fueron el mRNA y el miRNA [3]. Años después, se encontraron otros tipos de RNA como el tRNAs (RNA de transferencia), lncRNAs (secuencias largas de RNA no codificante) y RNA viral. Todas estas biomoléculas son funcionales y pueden alterar el transcriptoma de las células que actúan como receptoras de las mismas. Por último, también se han localizado fragmentos de DNA contenidos en los exosomas, pero su papel no es tan destacado. [4]

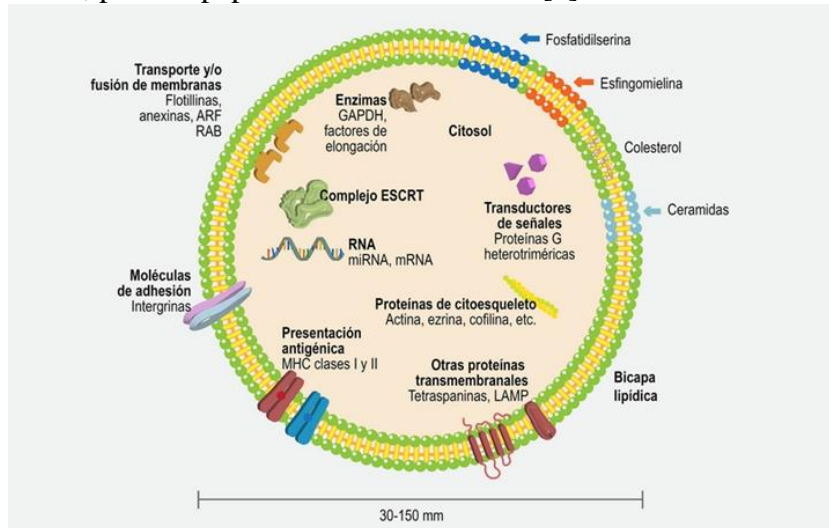


Figura 2. Estructura y composición del exosoma

En cuanto al contenido proteico exosómico [3,4], destaca la presencia de proteínas de origen endosomal, plasmático, citosólico y nuclear. A su vez, posee proteínas asociadas a funciones de transporte y fusión en la membrana plasmática como la familia de las RabGTPasas y las anexinas, así como proteínas responsables de su biogénesis como el complejo ESCRT o ALIX. Por otro lado, los exosomas presentan elevados niveles de HSP (proteínas de choque térmico estimuladas en situaciones de estrés para salvaguardar la funcionalidad de estas vesículas), tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 y CD82), proteínas pertenecientes al MHC-II y moléculas de adhesión de gran relevancia para el desarrollo de su actividad biológica como las integrinas. [3,5]

Muchas veces, la composición proteica es reflejo de la vía común de biogénesis que siguen la mayoría de exosomas mientras que otras proteínas contenidas suponen una marca de diferenciación relacionadas con el distinto origen celular del que proceden. [2]

## 1.2 Integrinas

El proceso de adhesión celular a la matriz extracelular (ECM) es fundamental para la vida multicelular. La adherencia celular se define como la capacidad que tienen las células pluricelulares de unirse a elementos del medio externo o a otras células; y se produce por la acción de fuerzas electrostáticas y otras interacciones inespecíficas como por moléculas de adhesión. Además, este proceso está relacionado con múltiples funciones celulares como son la comunicación celular, la migración celular o el desarrollo del [6,7]. Una de las moléculas de adhesión que predomina mayormente en esta acción es la familia de receptores de superficie transmembrana conocidas como integrinas. [8]

Las integrinas son una extensa familia de glicoproteínas transmembrana heterodiméricas que intervienen en las interacciones célula-célula y célula-medio celular. Además se encuentran

ampliamente expresadas en muchos tipos de células, incluyendo células tumorales, endoteliales, pericitos, fibroblastos y células del sistema inmune. [9,10]

Están compuestas por dos subunidades asociadas de manera no covalente:  $\alpha$  y  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$ , tiene un tamaño de 120-170 kDa y determina la especificidad en la unión ligando-integrina. Mientras que la subunidad  $\beta$ , presenta un tamaño de 90-100kDa y se encuentra conectada al citoesqueleto de la célula determinando las diferentes rutas de señalización [10].

Ambas subunidades son muy dispares, no encontrándose ninguna homología entre ellas. De hecho, cuando se somete a un alineamiento de secuencias; se obtiene una baja identidad de las mismas (una elevada identidad de secuencia implica que tienen un ancestro común más reciente mientras que un valor bajo implica que la divergencia es más remota y por lo tanto su homología es menor). En cambio, si comparamos entre distintas subunidades  $\alpha$ , se obtiene un valor del 30 %; mientras que entre las subunidades  $\beta$  está alrededor del 45 %, esto implica que ambas familias han evolucionado por duplicación genética. [8,9]

La habilidad de las integrinas para dirigir respuestas celulares a infinidad de lugares diana radica en su capacidad de reconocer de manera diferente los distintos entornos. Para permitir esta “flexibilidad”, las integrinas están compuestas por 18 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$  que se combinan entre ellas para formar hasta 24 receptores heterodiméricos distintos y funcionales, capaces de unirse a uno o más ligandos localizados en la matriz extracelular. [10]

### 1.2.1 Rasgos característicos estructurales

Como ya hemos visto en el punto anterior, las integrinas constan de dos subunidades:  $\alpha$  y  $\beta$  (18 y 8, respectivamente). Ambas familias presentan un dominio extracelular largo, un dominio transmembrana y normalmente una pequeña “cola” citoplasmática. [8]

Nueve de las 18 cadenas  $\alpha$ , contienen un dominio  $\alpha I$  (o interactivo) consistente en una secuencia de aproximadamente 190-200 residuos de aminoácidos situados cerca del “N” terminal de la subunidad  $\alpha$ . Este dominio se encuentra en los subgrupos  $\beta 2$ ,  $\alpha E \beta 7$  y en las uniones al colágeno de la familia  $\beta 1$ , y contiene un sitio de unión a iones metálicos (similar al presente en el dominio  $\beta I$ ). [9]

Para definir las características de estos receptores heterodiméricos, nos centraremos en las estructuras cristalinas de las integrinas humanas,  $\alpha V \beta 3$  y  $\alpha II \beta 3$ , ya que muestran que la porción extracelular de una integrina heterodimérica consta de múltiples dominios. [9]

En el caso de  $\alpha V \beta 3$ , el componente principal consiste en un dominio  $\beta$  en forma de hélice y otro dominio constituido por la asociación de dos proteínas: plexina-semaforina conocido como (PSI) y situado en la subunidad  $\alpha V$ . En esta parte se encuentra el lugar de unión al ligando ya que presenta en su estructura dominios  $\beta$  tipo I que contienen el sitio de adhesión dependiente de iones metálicos (MIDAS).

El dominio helicoidal  $\beta$  contiene siete repeticiones de unos 60 aminoácidos, que se pliegan sobre si mismos dando lugar a la conformación de hélice (similar a la estructura de una proteína G heterotrimérica). Además, encontramos otro lugar de unión denominado “*RGD-binding*” (constituido por un tripéptido Arg-Gly-Asp) localizado en la interfaz entre la hélice  $\beta$  y el dominio  $\beta I$ , por el cual interacciona con sus residuos aminoacídicos con el péptido RGD de un ligando consiguiendo así la unión. Sin embargo, existen otros motivos no relacionados con estos aminoácidos como el tripéptido LVD (Leu-Asp-Val) que también sirve como sitio de reconocimiento para la unión ligando-integrina.

Aunque los aminoácidos anteriormente nombrados (arginina, glicina, aspártico) son los principales implicados en esta interacción ligando-receptor, estudios relacionados con la mutagénesis han demostrado que existen otros residuos que juegan un rol crítico en el enlace con el ligando. Estos residuos suelen encontrarse de manera discontinua en la conformación primaria de la proteína pero después quedan expuestos al constituirse la estructura cuaternaria, formando así parte de la superficie de unión.



En cuanto a la “cola citoplasmática”, se compone de apenas 75 aminoácidos y existe una sorprendente homología entre las colas citoplasmáticas correspondientes a las subunidades  $\beta$ , en contraste con las pertenecientes a las  $\alpha$  que presentan una alta divergencia, a excepción del motivo GFFKR (participa en la regulación del reconocimiento del ligando) que se conserva cerca de la región transmembrana, y que es importante para la asociación con el dominio  $\beta$ . Por último, estas colas citoplasmáticas, sobre todo las  $\beta$ , contienen uno o dos motivos NPxY/F (donde x es un aminoácido) que forman parte de una secuencia de reconocimiento para el dominio de unión a fosfotirosina (PTB), que son unas proteínas presentes en una amplia variedad de proteínas señalización y del citoesqueleto. Así, cuando encuentran esta secuencia, la identifican y se produce la fosforilación de la tirosina (Y) en el motivo NPxY/F lo que supone un modo de regulación de las interacciones de la integrina con otras proteínas localizadas en la membrana plasmática del ligando. Estas colas citoplasmáticas “reclutan” varias proteínas como la talina, una proteína del citoesqueleto que se une a filamentos de actina consiguiendo la conexión con el citoesqueleto, lo cual es esencial, para la mayoría de funciones mediadas por las integrinas. [10]

### 1.2.2 Localización y función

Las integrinas funcionan como receptores de tracción que pueden transmitir y detectar cambios en la fuerza mecánica que actúa sobre la matriz extracelular. En los mamíferos, algunas integrinas encuentran su localización limitada a ciertos tipos celulares o tejidos:  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 en las plaquetas;  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 en los queratinocitos o  $\beta$ 2 y  $\beta$ 7 en los leucocitos. Otras, por el contrario se encuentran ampliamente distribuidas como  $\alpha$ V $\beta$ 3, que se expresa en el endotelio. [7,9]

La unión a los ligandos depende de que se produzca una coordinación con el ion  $Mg^{2+}$  contenido en un región conocida como sitio de adhesión dependiente de iones metálicos (MIDAS), localizado en el puente de unión al ligando en el dominio  $\alpha$ I. [9]

Por otro lado, la subunidad  $\beta$  contiene un dominio  $\beta$ I con un ion  $Mg^{2+}$  coordinado a MIDAS y una región adyacente conocida como ADMIDAS unido a un ion  $Ca^{2+}$  con acción inhibitoria. Este enlace supone la forma inactiva de la integrina, por lo que para conseguir llegar a la forma activa, se debe unir un ion  $Mn^{2+}$  a la región conocida como ADMIDAS, logrando un cambio de conformación que supone la activación del receptor. Por lo tanto, el dominio  $\beta$ I juega un papel importante en la unión al ligando en integrinas que no contienen el dominio  $\alpha$ I. [9]

El reconocimiento de los ligandos parece estar sujeto a cambios conformacionales que dictan la activación o inactivación de las integrinas. El mecanismo general por el cual estos receptores identifican a los diferentes ligandos se basa en alteraciones en la estructura terciaria de los dominios  $\alpha$ I (en su defecto,  $\beta$ I), que determinan la activación o inactivación de la misma.

Por otro lado, la implicación de las integrinas en la transmisión de “señales de entrada y salida”, da lugar a cascadas de transducción intracelular que median las respuestas funcionales y la integración con otras señales. Debido al hecho, de que las integrinas carecen de actividad enzimática, la señalización se induce por la disposición de una serie de complejos de señalización y de adhesión localizados en el lado citoplasmático de la membrana. Así, la cascada conduce al ensamblaje de los receptores que cambian su conformación para dejar expuestos sus sitios de unión.

La interacción de las integrinas con el medio extracelular desencadena una gran variedad de señales de transducción que modulan distintos comportamientos celulares a través de sus efectos sobre proteínas presentes en el citoesqueleto como son: la adhesión, proliferación ( $\beta$ 1), supervivencia o apoptosis celular, motilidad, respuestas del sistema inmune ( $\beta$ 2), o el mantenimiento de la integridad de la piel ( $\alpha$ 6 $\beta$ 4). [10]

Una característica clave de la mayoría de integrinas es su capacidad para unirse a una gran variedad de ligandos. Los factores determinantes en la interacción ligando- integrina son la afinidad, el estado conformacional de la integrina, la disponibilidad y el estado conformacional

del ligando. Además, para añadir aún más complejidad a esta interacción, existen otras moléculas de adhesión y proteínas presentes en la membrana extracelular que se pueden unir de manera no específica a las integrinas.

Sin embargo, es posible dividir en cuatro clases distintas las diferentes combinaciones ligando-integrina, según sus estructuras subyacentes: integrinas de unión a RGD:  $\alpha$ V,  $\beta$ 1 ( $\alpha$ 5,  $\alpha$ 8) y  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, que reconocen ligandos que presenten esta secuencia de aminoácidos en su sitio activo, produciéndose su interacción, de tal forma que el residuo arginina se encuentra unido a la hélice  $\beta$  y el aminoácido aspártico se coordina a un catión enlazado al dominio  $\alpha$ I. Otra clase, son las integrinas de unión a LVD:  $\alpha$ 4 $\beta$ 1,  $\alpha$ 4 $\beta$ 7,  $\alpha$ 9 $\beta$ 1, la subfamilia  $\beta$ 2,  $\alpha$ E $\beta$ 7. Y por último, las integrinas que contienen el dominio A (dominio  $\alpha$ I):  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 10,  $\alpha$ 11; que son las integrinas  $\beta$ 1 con uniones a colágeno y laminina; y las integrinas que no contienen el dominio A:  $\alpha$ 3 $\beta$ 1,  $\alpha$ 6 $\beta$ 1,  $\alpha$ 7 $\beta$ 1,  $\alpha$ 6 $\beta$ 4.

### 1.2.3 Tipos de señalizaciones.

Las integrinas se diferencian del resto de receptores transmembrana presentes en la superficie celular, por su capacidad de transmitir señales de manera bidireccional (es decir, tanto de dentro a fuera como de fuera a dentro).

De tal forma, que la unión de una proteína adaptadora conocida como talina a la cola citoplasmática de la integrina induce un cambio conformacional en el receptor, lo que conlleva una activación del mismo y una mayor afinidad por los ligandos localizados en la matriz extracelular.

A través de este enlace bidireccional, las integrinas proporcionan diferentes líneas de comunicación espacialmente restringidas entre el interior de la célula y su entorno. Así, estos receptores actúan como sensores mecánicos y transductores de señales, capaces de coordinar la polimerización de los filamentos de actina que constituyen el citoesqueleto para regular importantes funciones biológicas. [7]

Existen dos tipos de señalizaciones:

- "*Inside-out signaling*": La afinidad de las integrinas por sus respectivos ligandos, está estrechamente regulada por su estructura heterodimérica y sobre todo por señales citoplasmáticas procedentes del interior de la célula ("*inside-out*"). De forma que, estos receptores con actividad tirosina-quinasa pueden ser activados intracelularmente por la acción de receptores acoplados a proteínas G que fosforilan el dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta$  produciendo la disociación del complejo  $\alpha$  y  $\beta$  (la disociación de estas dos unidades conforma el estado activo de la integrina).

- "*Outside-in signaling*": Se ha propuesto que al producirse el enlace con los ligandos extracelulares, las integrinas se agrupan en la membrana y transducen señales hacia el interior de la célula ("*outside-in*"). La unión extracelular del ligando induce cambios conformacionales que incluyen la disociación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ; y la separación de los dominios transmembrana que conducen a la interacción de las colas citoplasmáticas con moléculas de señalización intracelular, como enzimas y proteínas adaptadoras que se ensamblan dentro de estructuras de adhesión. De tal forma que a partir de estas estructuras se constituyen sitios activos que pueden transducir información como la dirección y magnitud de fuerzas extracelulares que actúan sobre una célula. [8,9]

Ambos tipos de señalizaciones conducen a rutas que son capaces de modular los comportamientos celulares como son la adhesión, supervivencia, proliferación, polaridad, motilidad, apoptosis, la expresión génica y diferenciación celular a través de su acción sobre el citoesqueleto.

## **2. Objetivos**

El propósito de este trabajo se centra en ampliar los conocimientos acerca de las funciones de los exosomas y las integrinas en el organotropismo metastásico. Para ello, se plantean una serie de apartados donde se pasaran a definir tanto a los exosomas como a las integrinas con el fin de conocer su composición, estructura y funciones, así como sus mecanismos de acción a la hora de favorecer la metástasis en distintos órganos.

Por otro lado, también se explicara el papel que tienen estas moléculas en las distintas fases del proceso metastásico, concluyendo con las nuevas alternativas terapéuticas que se han abierto en los últimos años para intentar conseguir el tratamiento eficaz del cáncer.

## **3. Material y métodos**

Para la realización de este trabajo, se ha realizado una búsqueda bibliográfica de artículos de investigación basados en la utilización de líneas celulares de cáncer humano y modelos animales, referentes a las integrinas exosomales y su relación con la metástasis, publicados en los últimos cinco años. Para ello, se han utilizado diversas bases de datos especializadas en el terreno de investigación, tales como PubMed, Elsevier y MedLine.

La identificación de los artículos de interés se ha llevado a cabo mediante la búsqueda de distintas combinaciones de palabras clave: “integrinas”, “exosomas”, “integrinas y exosomas”, “organotropismo metastascico”, “exosomas y metástasis”, “integrinas y metástasis”, “integrinas, exosomas y metástasis” y “organotropismo e integrinas” entre otras.

Esta revisión bibliográfica se ha centrado en el papel de las integrinas presentes en la superficie de los exosomas tumorales como las responsables del organotropismo que se produce durante la metástasis de ciertos tipos de cáncer y su importancia como futura diana terapéutica. Cabe añadir que todos los artículos utilizados son publicaciones actuales y revisadas.

## **4. Resultados y discusión**

### 4.1 Expresión de las integrinas en cáncer

Existe una gran variedad de integrinas que han demostrado contribuir a la progresión tumoral. Las integrinas ( $\alpha6\beta4$ ,  $\alpha6\beta1$ ,  $\alpha v\beta5$ ,  $\alpha2\beta1$  y  $\alpha3\beta1$ ) se expresan tanto en las células epiteliales como en las células tumorales, aunque en éstas últimas pueden presentar variaciones en su expresión [11].

Además, las integrinas no solo presentan un papel importante en la progresión del tumor sino que también están implicadas en la metástasis, ya que son capaces de incrementar la adhesión celular, la proliferación, la inhibición de la apoptosis, la inducción de la angiogénesis, la migración y la invasión por parte de las células tumorales[11,12]:

-La adhesión celular esta mediada por la unión de las integrinas a sus respectivos ligandos que contienen el motivo de reconocimiento RGD (secuencia aminoacídica: Arg-Gly-Asp) dentro de la matriz extracelular (ECM) y de otros componentes como la fibronectina, osteopontina y la vitronectina. Esta unión mejora la comunicación entre la matriz extracelular y los componentes intracelulares, como el citoesqueleto. [12]

-La proliferación tumoral esta mediada por distintos subtipos de integrinas como  $\alpha v\beta3$ ,  $\alpha v\beta6$  y  $\alpha v\beta8$ , que pueden inducir la nuevamente al unirse al motivo RGD contenido en el péptido asociado a la latencia (LAP) presente en el factor de crecimiento TGF- $\beta$  inactivo, lo que provoca su activación. Este TGF- $\beta$  activo induce la transición epitelial-mesenquimal o EMT (se explicará con mayor detalle en el siguiente apartado) y la consiguiente proliferación celular [12]. Las integrinas una vez se han unido a su ligando, son capaces de controlar la expresión de

proteínas clave presentes en el ciclo celular, como la ciclina D1 que regula el comienzo de la fase S (se produce la replicación del ADN), promoviendo el aumento de estas células tumorales). [11]

-La supervivencia celular se consigue gracias a que la expresión de ciertas integrinas ( $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta4$ ) permite a las células que las presentan en su superficie, unirse a moléculas que son capaces de inhibir la apoptosis [12]. Además, cuando las integrinas se encuentran unidas a sus ligandos pueden prevenir cascadas de señalización pro-apoptóticas impidiendo la muerte de estas células tumorales (anoikis). [11]

-Invasión y migración celular: La adhesión de la integrina al ECM proporciona la tracción requerida para que se produzca la invasión tumoral. Así, estas moléculas de adhesión, también contribuyen a esta incursión de las células cancerígenas, regulando la localización y la actividad de proteasas capaces de degradar la matriz extracelular, como la metaloproteasa 2 (MMP2) y el activador de plasminógeno de tipo urokinasa (uPA) [11]. Por otro lado, el cambio de integrina  $\alpha\beta1$  o  $\alpha\beta5$  a  $\alpha\beta6$  permite a las células migrar y atravesar la membrana basal e invadir la matriz extracelular circundante (este proceso está íntimamente relacionado con la EMT) [12]. Por último esta migración mediada por las integrinas, normalmente, requiere de una señalización dependiente de la quinasa de adhesión focal (FAK) y la familia de kinasas Src (SFK). Por ejemplo, la integrina  $\alpha5\beta1$  utiliza la cascada de activación de Src mediada por FAK en el neuroblastoma para conseguir la migración de las células tumorales [11].

Integrin	Cancer Type	Cell Type	Main Expression Feature
$\alpha\beta3$	gastric cancer	tumor, endothelial and stromal cells	low to moderate expression frequency in tumor cells, high frequency in stroma and endothelia, correlates with phenotype, endothelial expression correlates with survival
	glioma	endothelial and tumor cells	expression correlates with grade
	lung cancer brain metastases	endothelial and tumor cells	high expression frequency in endothelial, low frequency in tumor cells
	non small cell lung cancer	endothelial and tumor cells	high expression frequency in endothelia, low frequency in tumor cells, no correlation with survival
	oral squamous cell carcinoma	endothelial cells	higher expression in intratumoral endothelia compared with control tissue
	pancreatic cancer	tumor cells	moderate expression frequency, involved in lymph node metastasis
	prostate cancer	endothelial cells	high expression frequency peritumoral
$\alpha\beta5$	gastric cancer	tumor, endothelial and stromal cells	moderate (to high) frequency in tumor cells, high frequency in stroma and endothelial cells, independent prognostic factor in intestinal-type
	lung cancer (with brain metastases)	vessel endothelia and tumor cells	high expression frequency in endothelia, low frequency in tumor cells
	non small cell lung cancer	tumor cells and stroma	high frequency in tumor and stroma cells, no correlation with survival
	oral squamous cell carcinoma	tumor cells and stroma	
	prostate cancer	tumor cells	expression influenced by differentiation
$\alpha\beta6$	basal cell carcinoma	tumor cells	higher expression frequency in infiltrative subtype
	breast cancer		expression correlates with prognosis
	colon cancer		upregulated at invasive front and in budding tumor cells
	endometrial cancer		often overexpressed without correlation with occurrence of lymph node metastasis
	gastric cancer		potential prognostic marker in early stage carcinoma
	liver		differentiates cholangiocarcinoma from hepatocellular carcinoma
	non small cell lung cancer		high expression frequency with intratumoral heterogeneity, no correlation with survival
	lung cancer brain metastases		high expression frequency
	oral squamous cell carcinoma		expression at invasive front
	ovarian cancer		expression correlates with grade
	pancreatic cancer		high expression frequency
$\alpha\beta8$	prostate cancer		not/weakly expressed
	non small cell lung cancer	tumor cells	low to moderate expression frequency, no correlation with survival
$\alpha5\beta1$	prostate cancer		not expressed
	oral squamous cell carcinoma	tumor, endothelial cells, stroma	strong expression in stroma, expressed also in tumor and endothelial cells
	ovarian cancer	tumor cells	moderate expression frequency, correlates with survival

Tabla 1 Integrinas y sus niveles de expresión en distintos tipos de cáncer, así como las células donde se encuentran mayoritariamente y su impacto sobre el pronóstico de la enfermedad [11]

La expresión de las integrinas suele variar considerablemente en los tejidos normales y los tumorales. De hecho, las integrinas  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$  y  $\alpha6\beta4$  se encuentran en niveles casi indetectables en la mayoría de los tejidos epiteliales de un adulto sano, mientras que se hallan sobre-expresadas en algunos tumores. Por el contrario, la expresión de ciertas integrinas como  $\alpha2\beta1$ , disminuye la proliferación tumoral, por lo que su ausencia aumenta la diseminación de las células cancerígenas provocando un aumento de la progresión del tumor [11].

Como consecuencia de esto, se han realizado diversos estudios que buscan la correlación entre los niveles de expresión de integrinas en tumores y los resultados patológicos, así como la supervivencia del paciente y la propensión a metástasis, identificándose varias integrinas que podrían jugar un papel importante en la progresión del cáncer [11,12]. Para finalizar, la expresión de  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha6\beta4$ ,  $\alpha\beta8$  y  $\alpha\beta6$  en las células tumorales, se relaciona con la progresión de la enfermedad en varios tipos de cáncer, por lo que son las más estudiadas [Tabla 1]. Sin embargo, no se ha descartado que existan otros tipos de integrinas que contribuyan al avance del tumor [11,13].

#### 4.2 Papel de las integrinas en la metástasis: La cascada metastásica

Dentro de los 24 subtipos de integrinas humanas conocidos hasta la fecha, solo ocho de las mismas ( $\alpha\beta1$ ,  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta8$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha\beta6$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha8\beta1$  y  $\alpha\text{II}\beta3$ ), reconocen el motivo conformado por el tripéptido RGD presentado en la superficie de las proteínas que constituyen la matriz extracelular. Por lo que, estos miembros de la familia de integrinas presentan un rol clave en la progresión del cáncer y su consiguiente metástasis. [12,14]

De este modo la metástasis, consiste en una serie de eventos que deben sucederse de manera secuencial para lograr la diseminación de las células cancerígenas a otros órganos, denominada cascada metastásica, la cual engloba la invasión local e intravasación, diseminación en la circulación y supervivencia; detención en el órgano diana y extravasación, colonización en el nicho premetastásico y micrometástasis, y finalmente la macrometástasis. [14,15]

Esta cascada metastásica está compuesta por varias etapas, donde la presencia de las integrinas se vuelve primordial para que ocurra [10,11, 21]: (Figura 3)

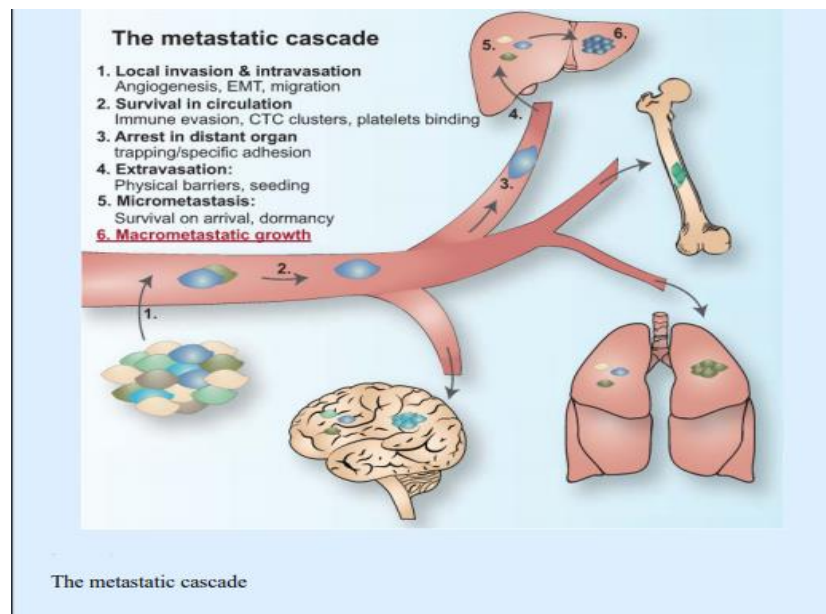


Figura 3. Fases de la cascada metastásica [21]

1. Invasión local e intravasación: La fase inicial de la diseminación del tumor desde un sitio primario conlleva una serie de señales, que son moduladas por múltiples integrinas. Asimismo, durante la incursión, las células cancerosas utilizan mecanismos similares a los que se utilizan en los procesos fisiológicos como la morfogénesis embrionaria, donde las células adquieren la capacidad para extenderse dentro de los tejidos e invadir la matriz extracelular [9]. Para ello, las células tumorales utilizan la acción de una serie de proteínas extracelulares como las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y catepsinas, que descomponen la matriz extracelular y desencadenan la liberación de factores de crecimiento que influyen en el crecimiento e invasión del tumor [21].

Para que se produzca la migración, la célula cancerígena modifica su forma de interactuar con el tejido circundante, lo que requiere un cambio fenotípico conocido como EMT (transición epitelio-mesénquima), el cual es el responsable de estimular la metástasis, y de la adquisición de propiedades migratorias por parte de las células tumorales.

Este proceso de EMT se ha convertido en uno de los sellos distintivos de la cascada metastásica, ya que supone la fase inicial de la invasión a otros órganos, y se caracteriza por la transdiferenciación de las células neoplásicas epiteliales en células mesenquimales móviles debido a la influencia de unas células conocidas como fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) consiguiendo originar las transposiciones celulares [21]. Por lo tanto, el resultado final supone una pérdida de la organización y polaridad de las uniones célula-célula que conduce a una disminución de la adhesión celular y un aumento de la motilidad e invasividad de dichas células. Además este fenómeno implica una regulación negativa o “*downregulation*” de la cadherina-E y de las moléculas de adhesión presentes en dichas células, así como una regulación positiva de ciertos marcadores mesenquimales y componentes de la matriz extracelular como la vimentina o la fibronectina, para conseguir una mayor movilidad celular, la progresión del cáncer y la formación de la metástasis [12,15].

Por último, la formación de nuevos vasos que presentan fugas por la acción del tumor primario contribuye a facilitar el acceso de las células tumorales a la circulación sanguínea [21].

2. Diseminación en la circulación y supervivencia: Las células no transformadas dependen de las integrinas para transmitir señales que preservan la integridad de los órganos y evitar que las células se desvíen hacia otros tejidos. Así, una vez que las células cancerígenas se escapan del tumor primario para penetrar en los vasos sanguíneos o linfáticos, deben adaptarse para sobrevivir en ausencia de su anclaje al medio extracelular, lo que es indispensable para que se produzca la metástasis hematogena (las células neoplásicas invaden un vaso de pequeño calibre y proliferan en el mismo). Esta supervivencia independiente de anclaje y el control del crecimiento del mismo están regulados por integrinas. Por ejemplo, la integrina  $\beta 1$  promueve el desarrollo tumoral independientemente del anclaje en el cáncer de próstata y de pecho, activando la vía PAK (FAK/p21 Kinasa)/MAPK, mientras que la integrina  $\beta 3$ , interacciona con el protooncogén c-*Src* para impulsar la metástasis en los ganglios linfáticos tanto en cáncer de mama como de páncreas [8,9].

Además estas células cancerígenas pueden migrar como células individuales o como agrupaciones multicelulares; y asociarse a células no neoplásicas para aumentar su supervivencia durante la diseminación [21]. Al llegar a los órganos diana, las células tumorales circulantes son capaces de quedarse retenidas en lechos capilares y extravasar debido al pequeño tamaño de la vasculatura y a las características de las células cancerígenas, las cuales consiguen formar conexiones adhesivas en órganos específicos (organotropismo debido a las integrinas que presentan en su superficie) [10,21].

3. Detención en el órgano diana y extravasación (puntos 3 y 4 de la figura 3) Las células neoplásicas alojadas en la microvasculatura pueden iniciar el crecimiento a nivel intraluminal o bien, pueden extravasarse directamente en el parénquima tisular al penetrar por las paredes microvasculares. Por ejemplo, en la medula ósea o en el hígado, los vasos están fenestrados por lo que presentan una barrera física menor que otros órganos como el cerebro o los pulmones, donde la vasculatura está rodeada de una membrana basal reforzada por pericitos y astrocitos, lo que complica el proceso de extravasación para las células tumorales [21].
4. Colonización en el nicho metastásico y micrometástasis (punto 5 de la figura 3): Para garantizar la supervivencia y la expansión de las células tumorales en los órganos secundarios donde se produce la metástasis, es necesario conseguir unas condiciones idóneas para asegurar su proliferación. Así, esto solo se logra con verdadero éxito en una minoría de células cancerígenas, ya que el establecimiento de un “nicho premetastásico” requiere un reconocimiento específico entre las células neoplásicas y los ligandos presentes en la matriz del órgano a metastatizar. Por lo que es el patrón de integrinas expresado por una célula tumoral lo que dicta la capacidad para responder a un determinado nicho e iniciar la colonización. Estas moléculas de adhesión pueden ser críticas para “teledirigir” a las células tumorales a distintos tejidos donde se producirá la metástasis al reconocer ciertas proteínas.
5. Macrometástasis. (punto 6 figura 3).

Después de esta descripción de la cascada metastásica, se explicará la implicación de las integrinas en este evento patológico.

Las integrinas han demostrado su implicación en casi todas las fases de la progresión del cáncer, incluidos la invasión local y proliferación tumoral, la migración celular, extravasación vascular, la supervivencia de las células tumorales circulantes (CTCs), y la preparación del nicho premetastásico en el tejido diana [16,17].

Para la mayoría de los tumores sólidos, la cascada metastásica comienza con la acción de las células tumorales sobre la membrana basal subyacente consiguiendo su rotura. Para lograr esta rotura, las integrinas regulan positivamente la expresión de los genes de las metaloproteinasas de la matriz, además de facilitar su activación y acción en la interfaz de la matriz extracelular [17,18].

Por otro lado, la invasión de las células tumorales y su migración hacia los tejidos circundantes se produce por múltiples mecanismos dependientes de integrinas, ya que son capaces de aumentar la actividad y tráfico de protusiones de actina que facilitan el movimiento de estas células de manera individual, o agrupadas. Además, estas moléculas de adhesión son capaces de trabajar en conjunción con otras células conocidas como CAFs (fibroblastos asociados a cáncer) y así conseguir la progresión del tumor, ya que estas células pueden dirigir la invasión mediante la generación de señales pro-migratorias a través de la matriz extracelular, mediante el depósito de fibronectina o produciendo la salida de células cancerígenas del tumor primario y favoreciendo su llegada al lugar elegido para producirse la metástasis [17,19]

Además, las células tumorales circulantes (CTCs) se detectan fácilmente en pacientes con cáncer, lo que sugiere que las células cancerosas entran constantemente en la circulación desde el tumor primario.

Mientras, que las células epiteliales normales suelen sufrir la apoptosis, las CTCs experimentan un crecimiento independiente de anclaje a la matriz extracelular y muestran resistencia a la muerte celular programada través de rutas que implican vías de señalización generadas por integrinas presentes en estas células neoplásicas. (Figura 4)



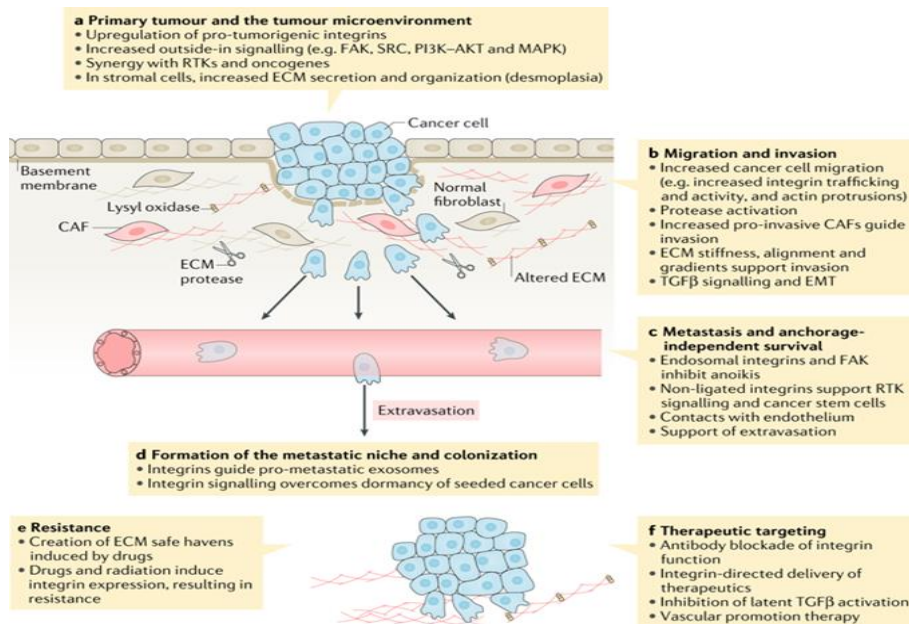


Figura 4. Implicación de las integrinas en la cascada metastásica

Para conseguir una metástasis exitosa, las CTCs deben unirse a la vasculatura de los órganos circundantes y extravasarse en el tejido perivascular (Véase figura 4). Par facilitar esta extravasación de estas células tumorales se produce la formación de trombos mediante el reclutamiento de fibronectina para activar las integrinas que se unirán a distintos ligandos presentes en la matriz extracelular como el VCAM-1 o LICAM. Estas uniones son sumamente importantes para determinar si las células tumorales conseguirán la adhesión necesaria para continuar proliferando o simplemente se quedaran en un estado de latencia [9,17]. De esta manera, las integrinas han desarrollado diferentes estrategias para favorecer la proliferación del tumor. Por ejemplo, la integrina  $\beta 1$  es capaz de inducir la formación de unas protuberancias que refuerzan la unión entre las células cancerígenas y los componentes de la matriz extracelular, desencadenando así distintos eventos de señalización como la activación de FAK que fosforila y activa a ERK (Kinasas reguladas por señales extracelulares) facilitando la proliferación del tumor en el tejido huésped

#### 4.3 Ejemplo: Integrina $\alpha\beta 3$ y la metástasis.

La integrina  $\alpha\beta 3$  fue identificada por primera vez por el investigador Ruoslahti y su equipo. Aunque en un primer momento, esta molécula recibió el nombre de “receptor de vitronectina” debido a su unión predominante a la matriz extracelular por este componente, pronto se descubrió que esta molécula de adhesión era capaz de unirse a un amplio abanico de componentes presentes en el ECM, entre ellas, la fibronectina, la osteopontina y la laminina [13]. Esta unión estimulaba la activación de diferentes cascadas de señalización por parte de esta integrina.

De esta manera, se corroboró la necesidad de la señalización inducida por  $\alpha\beta 3$  para provocar la migración celular en muchos tipos celulares, incluyendo las células endoteliales, las del músculo liso y varios tipos de células tumorales. En concreto, en ovario humano y en cáncer de mama, se comprobó que la mejora de adhesión celular mediada por  $\alpha\beta 3$  era indispensable para proporcionar una “agarre” suficiente sobre las células subyacentes a la matriz extracelular y, para promover los reordenamientos citoesqueléticos necesarios [13,17]. De hecho, las células tumorales que presentan niveles elevados de  $\alpha\beta 3$  son capaces de emitir filópodos que



favorecen la migración celular (“lamellipodia”), consiguiendo alcanzar así el órgano elegido para que se produzca la metástasis.

En las células de cáncer de próstata, la expresión  $\alpha\beta3$  también provocó un aumento de los niveles del receptor de quimiocinas, lo que se traduce en una mayor migración e invasividad durante la metástasis de las células tumorales hacia el hueso [13].

Por otro lado,  $\alpha\beta3$  expresada en las células neoplásicas del cáncer de mama es capaz de producir metástasis en pulmón, al identificar al ligando L1-CAM sobre la superficie de las células del endotelio pulmonar, consiguiendo una adherencia adecuada para asegurar la proliferación del cáncer [17].

De hecho, se ha demostrado la importancia de la presencia de  $\alpha\beta3$  en el cáncer de ovario para garantizar la proliferación celular, ya que la unión integrina- quinas supone el punto de partida para que se inicie la cascada de señalización que origine esta expansión tumoral. Por lo que, el bloqueo de  $\alpha\beta3$  provoca una detención drástica del ciclo celular.

Durante su acción sobre las células tumorales, la integrina  $\alpha\beta3$  se cruza con diferentes factores de crecimiento y sus respectivos receptores. Así, en el cáncer de mama y páncreas, esta molécula de adhesión es capaz de colaborar física y funcionalmente con estos receptores como por ejemplo con EGF-R (receptor del factor de crecimiento epidérmico) y con el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF); cuya activación favorece la proliferación celular. En las células tumorales del ovario, la expresión de  $\alpha\beta3$  se correlaciona con una mayor expresión y actividad de EGF-R. De hecho, se ha demostrado que incluso en ausencia de sus respectivos ligandos, los receptores de factor de crecimiento y las integrinas son capaces de actuar sinérgicamente induciendo las cascadas de señalización celular. Además, de confirmar que la señalización desencadenada por las integrinas conduce a un crecimiento descontrolado de las células tumorales produciéndose la metástasis, también se ha observado que son capaces de evitar la apoptosis, de hecho, la integrina  $\alpha\beta3$  es capaz de inducir la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y FLIP (*FLICE-inhibitory protein*) en estas células cancerígenas consiguiendo un mayor efecto proliferativo [18,13].

Por último, se ha observado la implicación de las integrinas en la angiogénesis tumoral, la cual es necesaria para que se desarrolle la metástasis. Las células tumorales como cualquier otro tipo de célula necesitan un aporte continuo de nutrientes y oxígeno para mantener sus funciones vitales. Cuando el tumor empieza a crecer de manera descontrolada, las células que lo conforman se ven obligadas a inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos para asegurar su supervivencia [19].

Para que se produzca, este evento, se necesita de la presencia de tres integrinas fundamentalmente, entre la que se encuentra  $\alpha\beta3$ , la cual es capaz de secretar factores pro-angiogénicos como VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) [13,16].

De la misma manera, la integrina  $\alpha\beta3$  se co-localiza en los vasos sanguíneos angiogénicos y ayuda a la activación de las metaloproteinasas (MMPs), lo que provoca una remodelación del colágeno y de la membrana basal lo que se traduce en la rotura de la matriz extracelular, facilitando la migración celular. Con relación a esto, se ha observado que las células tumorales del páncreas presentan niveles elevados de  $\alpha\beta3$ , lo que se correlaciona con una mayor activación de la MMP-2 y metástasis en los ganglios linfáticos. [12,13, 17]

Otro de los factores responsables del inicio de la angiogénesis, es la ausencia de oxígeno o hipoxia, lo cual provoca la translocación al núcleo de los factores inducibles por la hipoxia (HIF). Estos factores reconocen los elementos de respuesta a la hipoxia (HREs) al unirse a sus dianas (las integrinas  $\alpha\beta1$ ,  $\alpha\beta6$  y en concreto  $\alpha\beta3$ ) inducen la transcripción génica de VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) al unirse a sus respectivas dianas como son. [13,17]

La interacción con estas moléculas de adhesión mejora el fenotipo de las células tumorales migratorias e invasivas al establecerse un *feed back* positivo sobre ellas, es decir, que, al mejorarse el perfil migratorio e invasivo de las mismas, el resto de las células tumorales también incrementarían su capacidad migratoria y de invasión, traducándose en una promoción del fenómeno de EMT y como resultado final el incremento la metástasis tumoral. [13]

#### 4.4 Exosomas, integrinas y organotropismo

A pesar de los avances que se han conseguido en gran parte de las terapias contra el cáncer, existe un gran porcentaje de fracaso en estos tratamientos debido a la metástasis. Por este motivo, la comprensión acerca del mecanismo por el cual se produce la metástasis se ha convertido en uno de los principales puntos de investigación [18].

Teniendo en cuenta, los resultados obtenidos en estudios recientes, está claro que la metástasis no es un proceso aleatorio, si no que la llegada e implantación de las células cancerígenas en un determinado órgano secundario (*“seeding”*) ocurre de manera específica dependiendo del tipo de cáncer, verificando así la teoría denominada *“seed and soil”* desarrollada en 1889 por Stephen Paget [19].

Este concepto de especificidad en el crecimiento metastásico se conoce como organotropismo metastásico y ha sido demostrado de manera clínica y experimental, ya que aunque se pueden encontrar células cancerígenas en múltiples órganos, la metástasis solo se producirá en unos pocos que presenten las características adecuadas. De hecho, se comprobó que las células tumorales derivadas de un determinado sitio metastásico mostraban capacidades mejoradas para metastatizar a ese órgano específico, lo que reivindica la veracidad de la teoría desarrollada por Paget [18,19]

Como ya se ha explicado, la metástasis es un paso crítico en la progresión maligna de un tumor ya que supone el fracaso de la mayoría de terapias antitumorales [20]. Así, muchos estudios se han centrado en conocer por qué distintos tipos de células cancerígenas tienden a colonizar y metastatizar en determinados órganos, llegando a la conclusión de la existencia de patrones moleculares y celulares responsables de este fenómeno. Estos componentes intrínsecos que determinan esta órgano-especificidad incluyen genes, receptores y una gran variedad de moléculas expresadas por las células tumorales [19].

Así, finalmente se llegó a la identificación de los exosomas como los verdaderos responsables de la expansión tumoral hacia otros tejidos. Esto fue demostrado por primera vez tras la realización de un experimento donde se dispersaron exosomas derivados de un melanoma en sangre; y se observó como la mayoría se dirigieron y se acumularon de manera específica en los ganglios linfáticos (organotropismo metastásico) [18]. Además, la llegada de los exosomas a estos sitios va acompañada de una serie de modificaciones en el medio elegido, como cambios en la disposición de la matriz o la proliferación de nuevos vasos sanguíneos para conseguir el abastecimiento de las células tumorales y que de esta manera, puedan proseguir con su desarrollo [21].

Este cambio en el microambiente donde se va a producir la metástasis se conoce como nicho pre-metastásico y fue acuñado por el Doctor Lyden para poder describir el evento por el cual un tumor primario promueve su propia metástasis mediante el reclutamiento de células derivadas de la médula ósea que se dirigen al órgano escogido y establecen así una atmósfera apropiada antes de que se produzca la llegada de las células tumorales [17,19].

Siguiendo con el estudio de los exosomas como componente clave en el desarrollo de la metástasis, se descubrió a través de la realización de una espectrometría de masas sobre exosomas tumorales procedentes de cerebro, hígado y riñón, que las integrinas eran los receptores más expresados en la superficie de estas vesículas y que además, estas moléculas de adhesión mostraban tener un papel destacado en la dirección de los exosomas a órganos

específicos, para que estas vesículas actuaran promoviendo la formación de nichos pre-metastásicos y por defecto la metástasis [16,17].

En particular, se descubrió que las células tumorales pulmón-trópicas secretan exosomas ricos en integrinas  $\alpha\beta1$  y  $\alpha\beta4$ , mientras que las células cancerígenas hepato-trópicas expulsan predominantemente exosomas que presenten en su superficie  $\alpha\beta5$  [17,19].

De hecho, cuando Lyden y su equipo aislaron exosomas pertenecientes a estas líneas celulares procedentes de cáncer de mama y páncreas; y posteriormente se inyectaron marcados con fluorescencia infrarroja cercana (NIR), se observó que la biodistribución de estos exosomas coincidía con la diseminación organotrópica de la línea celular de origen, es decir que el patrón de integrina presente en estas vesículas los “re-dirigían” automáticamente hacia las zonas donde las células tumorales originaban la metástasis.[18,19]

También, gracias a la espectrometría de masas y a la técnica inmunológica del *Western blotting*, se ha podido revelar que las integrinas  $\alpha\beta1$  y  $\alpha\beta4$  presentes en estos exosomas interactúan con fibroblastos –S100A4 positivos y con células epiteliales positivas a la proteína C surfactante en un ambiente pulmonar rico en laminina consiguiendo así la adhesión celular suficiente para que se produzca la proliferación celular y por ende la metástasis [18]. Por otro lado, la integrina  $\alpha\beta5$ , produce la metástasis en hígado al fusionarse con las células Kupffer en nichos ricos en fibronectina. Esta integrina también puede producir metástasis en páncreas al conseguir que los exosomas tumorales que presentan esta integrina en su superficie se sitúen junto a macrófagos F4/ 80<sup>+</sup>, pero esto no está muy estudiado por el momento. [17,19].

Así, los exosomas tumorales dirigen el organotropismo metastásico a través de las integrinas que se encuentran en su superficie. Estos exosomas tumorales también transportan proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. De tal manera que estas vesículas se fusionan con las células residentes en el órgano diana, preparando así el nicho pre-metastásico. Por último, los exosomas derivados de distintos tipos de cáncer presentan distintos patrones de integrinas que interactúan con diferentes células y, por lo tanto, tienden a producir la metástasis en distintos órganos, lo que se conoce como organotropismo.

En relación, al mecanismo de acción de las integrinas, Lyden explica que estas moléculas de adhesión al fusionarse con ligandos presentes en las células localizadas en el órgano diana, son capaces de activar la fosforilación de ciertas proteínas como la Src (proteína oncogénica con actividad tirosina quinasa) y también favorecer la expresión de las proteínas pro-inflamatorias S-100, la cual parece tener un papel primordial en este fenómeno de organotropismo y por consiguiente de la metástasis [18,20].

Otro paso crítico en el organotropismo metastásico sería la extravasación la cual depende de múltiples factores, entre ellos de la expresión de integrinas que presentan las células tumorales circulantes en su superficie. En este caso, el mecanismo de acción de las integrinas en el proceso de extravasación es totalmente independiente de las características del tejido diana y del tipo de célula tumoral. Por ejemplo, la presencia de filopodios inducidos por la miosina X dependiente de integrinas en células tumorales de mama se correlaciona con el grado de extravasación que se produce en el pulmón. Además, la cascada de coagulación que se produce para favorecer la metástasis en pulmón también se relaciona con la activación de ciertas integrinas, ya que los complejos de fibrina y fibronectina que se forman durante este evento activan entre otras a  $\alpha\beta3$ , lo que desencadena la formación de protusiones invasivas que favorecen la adhesión de las células tumorales al órgano diana, en este caso el pulmón.[12,14]. Por último, para demostrar, la importancia de las integrinas en el organotropismo, se inhibieron tanto  $\alpha\beta4$  y  $\alpha\beta5$ , mediante el uso de RNA de horquilla corta (molécula de RNA artificial que presenta un giro de horquilla cerrada y que puede usarse para silenciar la expresión del gen diana) o bloqueando su interacción con la célula diana mediante la introducción de péptidos HYD-1/RGD (péptidos de síntesis capaces de bloquear la migración de células tumorales al lugar donde deben originar la metástasis), lo que se tradujo en una disminución de la captación

de los exosomas tumorales en los órganos diana, así como una reducción de la metástasis tanto en pulmón como en hígado respectivamente, demostrando de esta manera, que existen ciertas integrinas que gobiernan el órgano-tropismo mediante su fusión con las células del órgano diana [19].

A continuación, se muestra una tabla donde se explica de manera esquemática la implicación de las integrinas en la progresión de diferentes tipos de cáncer. (Tabla 2).

**Table**

**Integrins in cancer progression**

Tumour type	Integrins expressed	Associated phenotypes
Melanoma	$\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$	Vertical growth phase and lymph node metastasis
Breast	$\alpha 6\beta 4$ and $\alpha v\beta 3$	Increased tumour size and grade, and decreased survival' ( $\alpha 6\beta 4$ ). Increased bone metastasis ( $\alpha v\beta 3$ )
Prostate	$\alpha v\beta 3$	Increased bone metastasis
Pancreatic	$\alpha v\beta 3$	Lymph node metastasis'
Ovarian	$\alpha 4\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$	Increased peritoneal metastasis proliferation ( $\alpha 4\beta 1$ ) and tumour ( $\alpha v\beta 3$ )
Cervical	$\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 6$	Decreased patient survival'
Glioblastoma	$\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$	Both are expressed at the tumour-normal tissue margin and have a possible role in invasion'
Non-small-cell lung carcinoma	$\alpha 5\beta 1$	Decreased survival in patients with lymph node-negative tumours
Colon	$\alpha v\beta 6$	Reduced patient survival

Tabla 2. Integrinas presentes en distintos tipos de tumores y dirección de su metástasis [11]

En resumen: [12, 16,18]

- I. Las integrinas promueven la adhesión y la fusión de los exosomas tumorales con las células que conforman el órgano diana.
- II. Las integrinas son capaces de activar las rutas de señalización pertenecientes al proto-oncogén Src y las respuestas inflamatorias (aumentan la expresión del gen pro-inflamatorio S100) en las células diana, lo que ayuda a preparar un ambiente favorable (nicho pre-metastásico) para que se produzca la metástasis

Por lo que, las integrinas no solamente intervienen en la adhesión, sino que también al activar estas vías de señalización promueven la oncogénesis, y al facilitar las respuestas inflamatorias en las células diana consiguen “re-educar” al órgano y lo hacen permisivo para el crecimiento de células metastásicas. [17,18].

## 5. Conclusión

Las integrinas exosomales juegan un papel esencial en la progresión del cáncer. Por un lado, pueden hacer que algunas células cancerígenas adquieran habilidades que normalmente no muestran, como la capacidad migratoria o infiltrativa. Y por otro, se ha demostrado que las integrinas expresadas por los exosomas liberados por células cancerígenas pueden dirigir la formación de nichos metastásicos y la diseminación de la metástasis a órganos específicos (organotropismo).

Las células cancerígenas expresan numerosas integrinas que participan en la adhesión al endotelio vascular y son capaces de promover la extravasación y la resistencia a los tratamientos quimioterápicos. Además, recientes investigaciones, señalan especialmente a las integrinas,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$  y  $\alpha 5\beta 1$ , las cuales median la angiogénesis tumoral mediante su interacción con el factor de crecimiento VEGF, lo cual activa diferentes rutas de señalización.

Por lo que se puede concluir que estas integrinas podrían representar posibles dianas en estrategias terapéuticas para combatir la metástasis, limitando el organotropismo metastásico.

## 6. Bibliografía

1. Maarten P. Bebelman, Martine J. Smit, D. Michiel Pegtel, S. Rubina Baglio. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer [Internet]. 2018. [Consulta 22 de Nov2018]; 188 (1): 1-11. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016372581830038X>
2. Raghu Kalluri. The biology and function of exosomes in cancer JCI [Internet]. 2016. [Consulta 26 de Oct 2018]; 128(4): 1208-1214. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27035812>
3. Xi Li, Yanan Wang, Qi Wang, Yinping Liu, Wei Bao, Sufang Wu. Exosomes in cancer: Small transporters with big functions [Internet]. 2018 [Consulta 9 de Nov 2018]; 435: 55-65. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383518305019>
4. Vignesh SundararajanFazlul H. SarkarThamil Selvee Ramasamy. The versatile role of exosomes in cancer progression: diagnostic and therapeutic implications. 2018. [Consulta 19 de Ene 2019]; 41 (3): 223-252. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13402-018-0378-4>
5. Christoph Kahlert, Raghu Kalluri. Exosomes in Tumor Microenvironment Influence Cancer Progression and Metastasis [Internet] 2013. [Publicado en HHS Public Access]. [Actualizado 22mar 2013], [consulta 19 de ene 2019]; 91(4): 431-437. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4073669/>
6. Hellyeh Hamidi, Mika Pietilä, Johanna Ivaska. The complexity of integrins in cancer and new scopes for therapeutic targeting BJC [Internet] 2016. [Consulta 22 de Ene 2019]; 115(9): 1017-1023. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5117799/>
7. Yoshikazu Takada, Xiaojing Ye and Scott Simon. The integrins BMC [Internet]. 2007. [Consulta 9 de Nov 2018]; 8:215. Disponible en: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2007-8-5-215>
8. Huang R, Rofstad EK. Integrins as therapeutic targets in the organ-specific metastasis of human malignant melanoma. J Exp Clin Cancer Res [Internet] 2018. [Consulta 19 de ene de 2019]; 37 (1): 92. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29703238>
9. Greta Sökeland, Udo Schumacher. The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade [Internet]. 2019. [Publicado en BMC]. [Actualizado 18 de Ene 2019] [Consulta 8 de Feb 2019]; Disponible en: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-018-0937-3>
10. Laetitia Seguin, Jay S. Desgrosellier, Sara M. Weis, David A. Cheresh. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance [Internet]. 2015. [Consulta 22 de Oct 2018]; 25(4): 234-240. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4380531/>.
11. Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities Nat Rev Cancer [Internet]. 2010. [Consulta 22 de Mar 2019]; 10(1): 9-22. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20029421>
12. Nieberler M, Reuning U, Reichart F, Notni J, Wester HJ, Schwaiger M. Exploring the role of RGD-Recognizing integrins in cancer Cancer basels ( Publicado en US National Library of Medicine). [Internet]. 2017. [Consulta 22 de Mar 2019], 9 (9): 116. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28869579>
13. Jun Niu, Zequn Li. The roles of integrin avb6 in cancer [Internet]. 2017. [Consulta 3 de Nov 2018]; 403 (3): 128-137. Disponible en: [doi: 10.1016/j.canlet.2017.06.012](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.06.012). Epub 2017 Jun 17.

14. Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis NCBI. [Internet]. 2018. [Consulta 22 de Mar 2019]; 18(9): 533-548. Disponible en: [DOI: 10.1038/s41568-018-0038-z](https://doi.org/10.1038/s41568-018-0038-z)
15. Ulrich H, Weidle, Fabian Birzele, Gwen Kollmergen, Rudiger Ruger. The Multiple Role of exosomes in Metastasis CGP [Internet]. 2017. [Consulta 22 de Mar 2019]; 14(1): 1-16. Disponible en: doi: [10.21873/cgp.20015](https://doi.org/10.21873/cgp.20015)
16. Richard J. Lobba, Luize G. Lima, Andreas Möllera. Exosomes: key mediators of metástasis and pre-metastatic niche formation [Internet]. 2017. [Consulta: 3 de Nov 2019]; 67(7): 3-10. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952117300058>
17. Ayuko Hoshino, Bruno Costa-Silva, Tang-Long Shen, Goncalo Rodrigues, Ayako Hashimoto, Milica Tesic Mark. Tumour exosome integrins determine organotropic metástasis Nature. [Internet]. 2015. [Consulta 19 de Ene 2019], 527: 329-345. Disponible en: doi: [10.1038/nature15756](https://doi.org/10.1038/nature15756)
18. Yang Liu, Xuetao Cao. Organotropic metastasis: role of tumor exosomes Nat Rev Cancer. [Internet]. 2016. [Consulta 23 de Ene 2019]; 26:149- 150. Disponible en: doi:[10.1038/cr.2015.153](https://doi.org/10.1038/cr.2015.153)
19. Ian Weea, Nicholas Syna, Gautam Sethib, Boon Cher Goha, Lingzhi Wanga. Role of tumor-derived exosomes in cancer metastasis [Internet]. 2019. [Consulta 8 de Mar 2018]; 1871(1): 12-19. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304419X18301574>
20. Paolillo M, Schinelli S. Integrins and Exosomes, a Dangerous Liaison in Cancer Progression NCBI [Internet]. 2017. (Publicado 26 de Jul 2017) [Consulta 22 de Oct 2018]; 9(8): 95-103. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28933725>
21. Anna C. Obenauf, Joan Massagué. Surviving at a distance: organ specific metastasis PMC. [Internet]. 2016. (Publicado en HHS Public Access). [Consulta 22 de Mar 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4673677/>