

**BASES MOLECULARES DEL CÁNCER. EXOSOMAS CIRCULANTES EN
CÁNCER COLORRECTAL**

**MOLECULAR BASIS OF CANCER. CIRCULATING EXOSOMES IN
COLORECTAL CANCER**



COLORECTAL CANCER

TRABAJO FIN DE GRADO.GRADO EN BIOLOGÍA. SEPTIEMBRE 2019

AUTOR

CARMEN CRISTINA QUINTERO BARRIOS

TUTOR

PABLO MARTÍN VASALLO

COTUTOR

REBECA GONZÁLEZ FERNÁNDEZ

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 ORIGEN DE LOS EXOSOMAS	1
1.1.1 Formación de vesículas cubiertas de clatrina. Movilización de la carga	1
1.1.2 Endosomas	1
1.2 LOS EXOSOMAS	5
1.2.1 Biogénesis de los exosomas	5
1.2.2 Estructura superficial y contenido luminal	9
1.2.3 Secreción e interacción con la célula diana	10
1.2.4 Implicación de los exosomas en el cáncer	10
1.2.4.1 Crecimiento tumoral	11
1.2.4.2 Angiogénesis	12
1.2.4.3 Metástasis	16
1.2.5 Los exosomas portan biomarcadores oncológicos	16
2. OBJETIVO.	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	17
3.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS DEL ESTUDIO	17
3.2 PROCESADO DE MUESTRAS DE SANGRE PARA LA OBTENCIÓN DE PLASMA Y SUERO	17
3.3 AISLAMIENTO DE EXOSOMAS A PARTIR DE SUERO	18
3.4 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS EXOSOMALES	18
3.5 ELECTROFORESIS DISCONTINUA EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN SDS	19
3.5.1 Preparación de un gel de poliacrilamida discontinuo en SDS	19
3.6 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU ANÁLISIS POR SDS-PAGE	19
3.7 TINCIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA	20
3.7.1 Tinción azul de Coomassie	20
3.7.2 Tinción Sypro Ruby	20
3.7.3 Tinción con el reactivo de Schiff	21
3.8 ANÁLISIS DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	21
5. CONCLUSIÓN.	26
BIBLIOGRAFÍA.	27

RESUMEN

Los exosomas son vesículas membranosas extracelulares que participan en la comunicación intercelular, viajan en los fluidos corporales portando mensajes moleculares en forma de ADN, ARN y proteínas. La comunicación molecular que llevan a cabo es diferente según nos encontremos ante un estado fisiológico o patológico.

En este trabajo hemos estudiado el perfil proteico de los exosomas del cáncer colorrectal (CCR) y el de los exosomas de personas sanas con el objetivo de hallar proteínas diferenciales las cuales podrían estar interviniendo en el establecimiento y desarrollo de la enfermedad.

En el presente estudio se purificaron exosomas a partir de muestras clínicas de suero de pacientes diagnosticados con cáncer de colon y de individuos sanos que actuaron como controles. Se llevó a cabo un proteinograma de los exosomas purificados (pellets) mediante SDS-PAGE para separar el contenido proteico de los exosomas, el del suero original y el de este último tras purificar los exosomas, lo que permitió llevar a cabo una primera evaluación cualitativa del contenido proteico de los exosomas purificados, encontrándose diferencias entre las proteínas exosomales del paciente y las de los exosomas del control.

Palabras clave: Exosomas; biopsia líquida; cáncer

ABSTRACT

Exosomes are extracellular membranous vesicles, which participate in intercellular communication, travel in body fluids carrying molecular messages in the form of DNA, RNA and proteins. The molecular communication they carry out is different depending on physiological or pathological state.

In this work, we report the protein profile of exosomes of colorectal cancer (CRC) compared to that of exosomes from healthy people in order to find differential proteins which could be involved in the establishment and development of CRC.

Exosomes were purified from clinical serum samples from patients suffering from CRC and from controls. The pellets of purified exosomes were lysed in order to extract their proteins. SDS-PAGE evidenced the protein content of the exosomes, the crude serum and the supernatant. This allowed to carry out a first qualitative evaluation of the protein content of isolated exosomes, finding differences between the protein content of the exosomes of the patient and the protein content of the exosomes of the control individual.

Key words: Exosomes; liquid biopsy; cancer

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 ORIGEN DE LOS EXOSOMAS.

1.1.1 FORMACIÓN DE VESÍCULAS CUBIERTAS DE CLATRINA. MOVILIZACIÓN DE LA CARGA.

Mediante la endocitosis mediada por receptores las moléculas del medio extracelular pueden acceder al interior de la célula. Entre las macromoléculas que acceden al interior de la célula por este mecanismo se encuentran lipoproteínas de baja densidad (LDL), la transferrina fijadora de hierro, muchas hormonas proteicas como por ejemplo la insulina, y ciertas glucoproteínas⁵⁰. Al comienzo de este proceso los receptores de carga se van ubicando en regiones de la membrana plasmática denominadas balsas lipídicas, acoplada a los receptores aparece la adaptina, un complejo proteico cuyo papel es fundamental a la hora de seleccionar la carga molecular que interacciona con los receptores y que finalmente será introducida en la célula⁵⁰. La adaptina a su vez interaccionará con las moléculas de clatrina que acceden a la región. La clatrina permite la deformación de la membrana plasmática y por tanto la formación de la vesícula naciente. Finalmente una GTPasa llamada Dinamina media la liberación de la vesícula con cubierta de clatrina, la cual puede entonces acceder libremente al citoplasma celular. Una vez en el interior de la célula la vesícula va perdiendo su cubierta de clatrina a la vez que la Adaptina también se desprende. La vesícula desnuda podrá entonces interaccionar y fusionarse a su membrana diana⁵⁰.

Las vesículas con cubierta de clatrina pueden formarse tanto a partir de la membrana celular como de la membrana del aparato de Golgi³⁹.

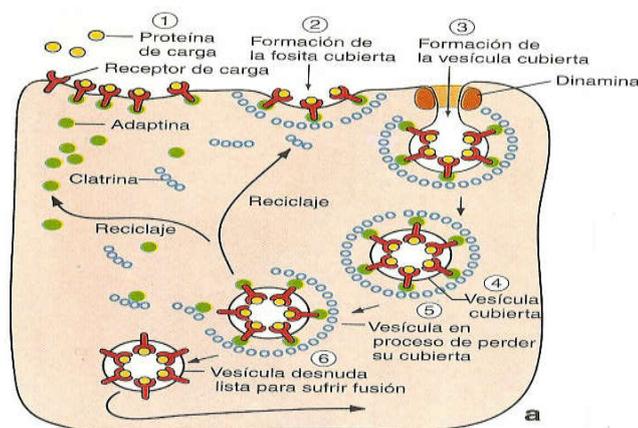


Figura 1. Endocitosis mediada por receptores. (Fuente; Michael H. Ross et al., 2007).

En las membranas de las vesículas migrantes se encuentra unida una Rab-GTPasa. La Rab-GTPasa interactúa primeramente con proteínas de amarre unidas a la membrana diana permitiendo el reconocimiento de la vesícula. Posteriormente el acoplamiento de Rab-GTPasa a su receptor permite la inmovilización de la vesícula cerca de la membrana diana⁵⁰. Tanto en la superficie de las membranas de las vesículas migrantes como en la superficie de las membranas diana se encuentran proteínas específicas denominadas v-SNARE y t-SNARE respectivamente⁵⁰. Las proteínas SNARE garantizan la especificidad de la interacción entre una vesícula migrante particular y su membrana diana y contribuyen a la fusión que acontece inmediatamente después entre las membranas contactadas⁵⁰. La fusión permite la entrega de la carga contenida en las vesículas al compartimento endosómico. Después de la fusión el complejo proteico NSF/ α -SNAP desune al complejo v-SNARE/t-SNARE. Las proteínas v-SNARE son enviadas, en vesículas de reciclaje, de vuelta a la membrana celular para su uso en otra ronda de fusión⁵⁰.

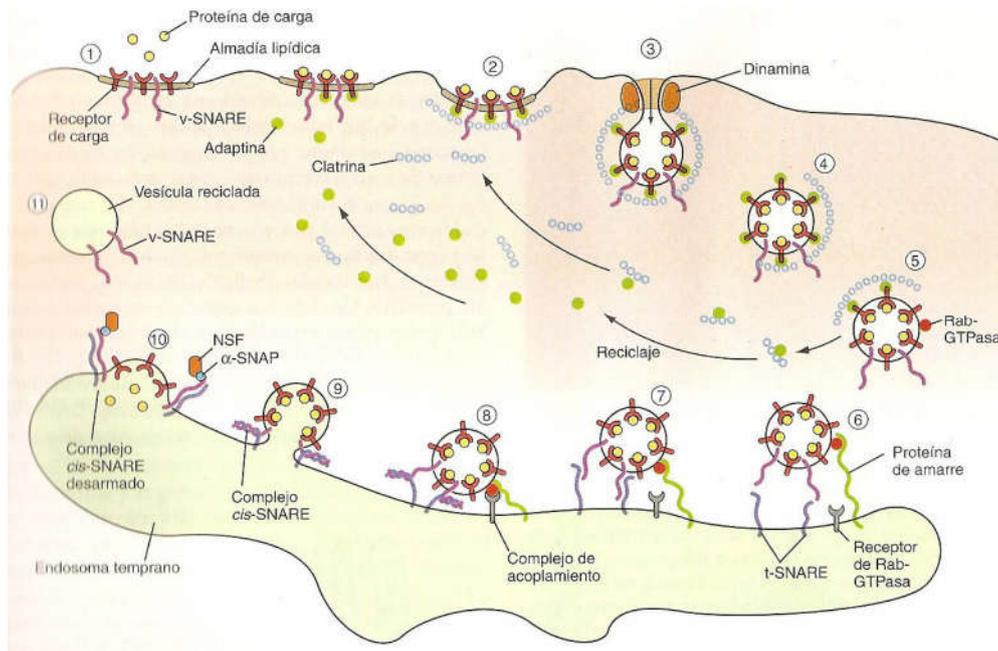


Figura 2. Formación, interacción y fusión de las vesículas cubiertas de clatrina. (Fuente: Michael H. Ross et al., 2007).

1.1.2 ENDOSOMAS.

A medida que las vesículas cubiertas de clatrina se desprenden de la membrana celular y se liberan de la clatrina, pasan a constituir lo que se denomina endosomas tempranos. Los endosomas tempranos son pues vesículas desnudas, dispuestas en el citoplasma más

periférico cercano a la membrana celular, con un pH interno que es apenas más ácido que el del citosol (entre 6.2 y 6.5), y que finalmente terminan fusionándose entre sí, para posteriormente hacerlo con el endosoma tardío al que le entregan su carga (generalmente durante este proceso los receptores de membrana son devueltos a la membrana celular en vesículas de reciclaje que brotan del endosoma tardío)³⁹. El endosoma tardío recibe también vesículas cubiertas de clatrina procedentes del aparato de Golgi, y lo hace por dos vías distintas³⁹. Por la vía más directa se generan vesículas cubiertas mediante brotes de la membrana del aparato de Golgi, que tras perder la clatrina se fusionan con los endosomas tardíos. La vía constitutiva forma igualmente vesículas cubiertas de clatrina que brotan del aparato de Golgi, pero estas viajan primero hasta la membrana plasmática celular y se fusionan con ella dejando el contenido molecular en el medio extracelular³⁹. Posteriormente la carga molecular puede ser incluida en una vesícula de clatrina formada en la membrana celular y ésta más tarde fusionarse con el endosoma tardío cediéndole su carga. Las vesículas cubiertas de clatrina procedentes del aparato de Golgi portan enzimas lisosómicas solubles³⁹. Dado el pH ácido del endosoma tardío (cercano a 5.5), los complejos receptor/ligando que llegan como carga molecular a este compartimento se desacoplan. Los receptores son generalmente devueltos en vesículas de reciclaje que brotan del endosoma tardío y viajan a sus respectivas membranas de partida (Golgi o membrana celular)³⁹.

El contenido del endosoma tardío se transferirá al lisosoma cuando ambos compartimentos se fusionen³⁹. En el lisosoma, gracias al pH extremadamente ácido de su lumen y a la acción de las enzimas hidrolíticas solubles, las macromoléculas incorporadas por la vía endocítica se degradan en sus constituyentes más pequeños, los cuales podrán entonces ser utilizados nuevamente por la célula⁵⁰. Por otro lado, también se conoce que los autofagosomas y fagosomas son degradados en los lisosomas⁵⁰.

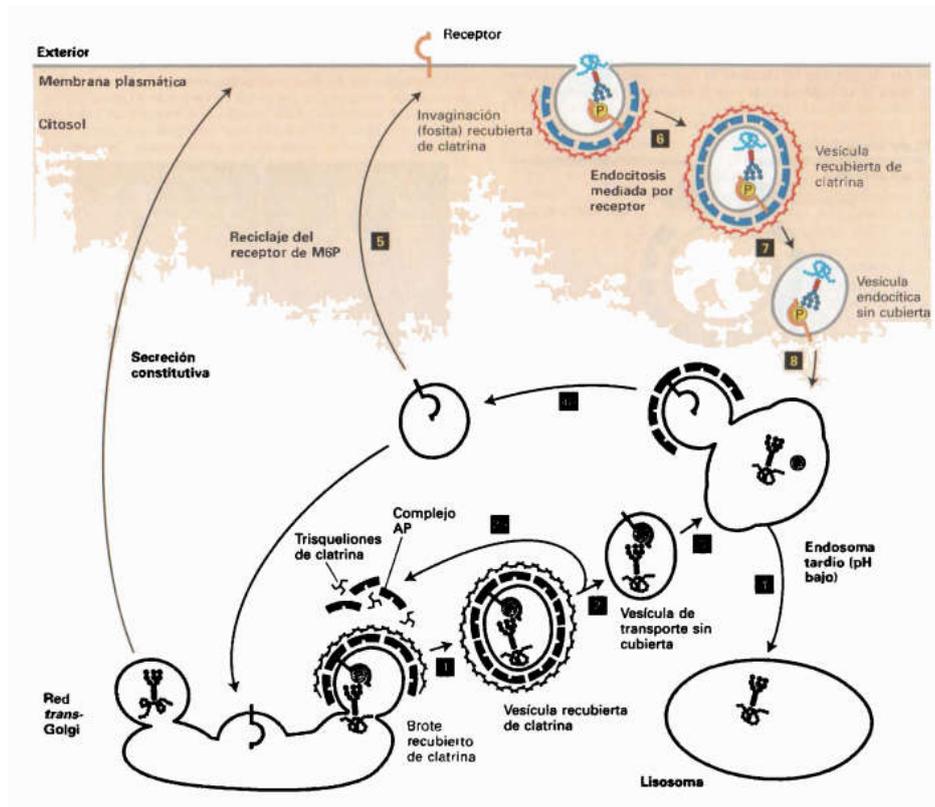


Figura 3. Tránsito de enzimas lisosómicas solubles desde el Golgi y la membrana celular hacia el endosoma tardío primero y posteriormente hacia el lisosoma. (Fuente; Lodish Harvey et al., 2005).

Los cuerpos o endosomas tardíos multivesiculares (MVB, del inglés, multivesicular bodies) de la vía degradativa, permiten el transporte de proteínas de membrana lisosómicas hacia la membrana del lisosoma y la degradación de proteínas de membrana de la superficie celular en el lisosoma³⁹.

Vesículas, de transporte procedentes del Golgi y endosómicas procedentes de la membrana celular, trasladan en su superficie vesicular proteínas lisosómicas de membrana, tales como bombas de protones y transportadores, y proteínas de membrana de la superficie celular, como por ejemplo receptores de membrana, respectivamente³⁹. Estas vesículas terminaran fusionándose con un endosoma tardío, pero mientras las primeras logran que sus proteínas de membrana pasen a formar parte de la membrana del endosoma tardío, las segundas sufren una endocitosis adicional que permite la generación de vesículas intraluminales en el endosoma tardío³⁹. Estas vesículas intraluminales conservan las proteínas de membrana celular que transportaba la vesícula inicial. De esta forma, al fusionarse la membrana del endosoma tardío con la del lisosoma, las proteínas lisosómicas de membrana permanecerán en la membrana del

lisosoma, mientras que las proteínas de membrana plasmática celular serán vertidas a la luz del lisosoma con su consiguiente degradación³⁹.

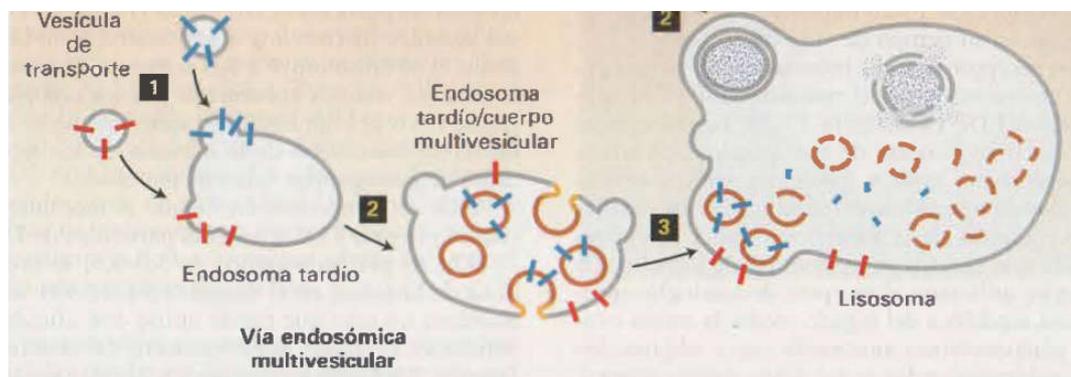


Figura 4. Vía endosómica multivesicular degradativa. (Fuente; Modificado de Lodish Harvey et al., 2005).

1.2 LOS EXOSOMAS.

Los exosomas son pequeñas vesículas de bicapa lipídica, de entre 30 a 100 nm, que contienen material molecular representativo del estado actual de la célula en la que se originan, y que al ser liberados de ésta, constituyen una forma de comunicación celular.

1.2.1 BIOGÉNESIS DE LOS EXOSOMAS.

Los exosomas se originan a partir de la invaginación de la membrana plasmática de los endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares (MVB), lo que resulta en la acumulación de vesículas dentro del lumen del endosoma tardío (ILVs, del inglés, intraluminal vesicles) destinadas a la vía exocítica. Los procesos que se llevan a cabo en la formación de las ILVs no se conocen con exactitud.

Uno de los mecanismos moleculares que interviene en la biogénesis de los exosomas es conocido como la vía de la ceramida. La vía dependiente de la ceramida se basa en la formación de balsas lipídicas. Estos microdominios pueden contener altas concentraciones de esfingolípidos a partir de los cuales, mediante la acción de las esfingomielinasas (SMases), se forman las ceramidas. La ceramida puede inducir la concentración de los pequeños microdominios formando dominios más grandes, lo que provocaría la invaginación de la membrana del endosoma tardío⁵⁵. Además, la forma de cono de la ceramida podría inducir una curvatura negativa espontánea⁵⁵. Otro lípido en forma de cono, el ácido lisobisfosfatídico, induce la formación de vesículas internas en los liposomas⁵⁵. Este lípido, que está ausente en los exosomas, puede regular la

biogénesis y los ILV dinámicos a lo largo de la vía degradativa⁵⁵. La ceramida, en contraste, parece estar implicada en la generación de ILVs que no están dirigidas a los lisosomas sino a la vía exocítica para ser secretadas como exosomas⁵⁵.

La otra vía implicada en la formación de los exosomas es el Complejo de clasificación requerido para el transporte (ESCRT, del inglés, Endosomal Sorting Complex Required for Transport). La maquinaria de ESCRT se compone de cuatro complejos, ECRT- 0, I, II, y III que actúan secuencialmente para reclutar las proteínas ubicuas en el endosoma tardío. Estos complejos se encuentran conservados desde hongos hasta mamíferos, aunque ha sido en levadura donde mejor se han caracterizado^{31,32}.

Complejo	S.cerevisiae	Humanos	Dominio/motivo	Interacción
<i>ESCRT-0</i>	Vps7p Hse1p	HRS STAM1,STAM2	UIM, FYVE, VHS UIM, VHS, SH3	Ub,PtdIns(3)P,Vps23 Ub,Rsp5, Ubpy7
<i>ESCRT-I</i>	Vps23p Vps28p Vps37p Mvb12p	TSG101 VPS28 VPS37 A, B, C, D —	UEV coiled-coil	Ub, Vps27 Vps20
<i>ESCRT-II</i>	Vps22p Vps25p Vps36p	EAP30 EAP25 EAP45	coiled-coil GLUE, NZF	Vps20 Ub, PtdIns(3)P,Vps28
<i>ESCRT-III</i>	Vps2p/Did4p Vps20p Vps24p Vps32p/Snf7p	CHMP2 A, B CHMP6 CHMP3 CHMP4 A, B, C, D	coiled-coil coiled-coil coiled-coil coiled-coil	Vps4 Vps32, Vps25 Vps2, Did2 Vps20, Bro1
<i>Asociadas a ESCRT-III</i>	Vps4p Bro1p/Vps31p Vps60p/Mos10p Did2p Doa4p Vta1p	VPS4 A, B ALIX CHMP5 CHMP1 A, B AMSH LIP5	AAA ATPase, coiled-coil coiled-coil coiled-coil coiled-coil	Vps2, Did2, Vta1 Vps32, Doa4 Vta1 Vps4, Vta1 Ub, Bro1 Vps4, Did2, Vps60

Tabla 1. Proteínas Vps clase E organizadas por complejos y sus ortólogos humanos, mostrándose los principales dominios / motivos de estas proteínas y sus interacciones con proteínas de otros complejos. (Modificado de Hurley, JH, & Emr, SD, 2006^{31,32}).

ESCRT-0.

En levadura el complejo ESCRT-0 es un heterodímero formado por las proteínas Vps27p y Hse1p^{31, 32}. El complejo es reclutado a la membrana del endosoma tardío cuando el dominio FYVE de Vps27p se une al fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns (3) P o PI3P) de membrana^{31, 32}. Cuando ESCRT-0 está dispuesto sobre la membrana del endosoma tardío, las cargas proteicas monoubiquitinadas interaccionan con los motivos UIMs (ubiquitin-interacting motifs, UIMs) de este complejo^{31, 32}. Por otro lado el complejo Vps27p tiene un motivo c-terminal, Lys-Ile-Glu-Phe, que puede unirse a la clatrina, la unión facilita la disposición de la carga proteica monoubiquitinada y del

complejo Vps27p en el sitio donde se va a producir la invaginación de la membrana del endosoma tardío^{31, 32}. En Hse1p se encuentra el dominio SH3 que interacciona con la deubiquitinasa Upb7p, la interacción podría estar implicada en la salida de la ruta de los MVBs de proteínas que habrían sido ubiquitinadas, estableciéndose con ello una regulación de las proteínas que van a ser internalizadas en los MVBs^{31, 32}. El motivo VHS del complejo Vps27p (Vps27; HRS/STAM) hasta el momento tiene función desconocida.

Después de haber sido reclutado ESCRT-0 hacia la membrana del endosoma tardío, y concentrada la carga proteica monoubiquitinada en ésta, ESCRT-0 recluta al complejo ESCRT-I, para ello Vps27p se une al dominio UEV (ubiquitin E2 variant) de Vps23p la cual pertenece al complejo ESCRT- I entrante^{31,32}.

ESCRT-I.

El complejo ESCRT-I es un heterotetrámero formado por Vps23p, Vps28p, Vps37p y Mvb12p. A través de su región C-terminal Vps28p se une a uno de los dominios NZF (dominios de “dedos de zinc”) de Vps36p, una proteína del complejo ESCRT-II. A medida que los complejos 0, I y II se van reclutando en la membrana del endosoma tardío, la carga monoubiquitinada va pasando de un complejo a otro. La función de Mvb12 no está clara^{31,32}.

ESCRT-II.

El complejo ESCRT-II es un heterotetrámero formado por una copia de las proteínas Vps22p y Vps36p y dos copias de Vps25p. Cuando el dominio GLUE (GRAM-like ubiquitin –binding in EAP45) de la región N- terminal de Vps36p se une a PtdIns (3) P, el complejo ESCRT-II queda unido a la membrana del endosoma tardío, por lo que ESCRT-II puede reclutarse sin la intervención de ESCRT-I^{31,32}.

Vps36p une ubiquitina a través de un dominio “dedo de zinc” (NZF) dispuesto en su región N-terminal. El segundo dominio NZF N-terminal de Vps36 interacciona con ESCRT-I a través de Vps28p. La región C-terminal de Vps25p interacciona con Vps20p del ESCRT-III^{31, 32}.

ESCRT-III.

En levadura seis proteínas forman el complejo ESCRT-III. Cuatro de estas proteínas forman el “núcleo” del complejo ESCRT-III (Vps32p, Vps20p, Vps2p y Vps24p), mientras que las otras dos (Vps46p/Did2p y Vps60p) se asocian al núcleo del complejo y estarían implicadas en su regulación^{31,32}.

Vps20p puede unirse a través de su región N-terminal a los fosfolípidos de membrana del endosoma tardío. Esta unión a la membrana coincide con el ensamblaje de ESCRT-III. El ensamblaje del complejo ESCRT-III ocurre de manera secuencial. Seguidamente a la unión de Vps20p a la membrana del endosoma tardío se produce la polimerización de Vps32p. Los polímeros formados se disponen en la membrana del endosoma causando cierta deformación y promoviendo la invaginación de esta para la formación de la ILV^{31, 32}. Por otro lado los oligómeros de Vps32p concentran la carga proteica monoubiquitinada y promueven con ello su internalización en la membrana de la vesícula en formación (antes de su internalización la carga deberá deubiquitinarse. (Vps32p/Bro1/Doa4; Alix)). Vps24p parece bloquear la oligomerización de Vps32p. Además Vps24p se une a Vps2p la cual recluta a la AAA-ATPasa Vps4p para iniciar la disociación del complejo^{31,32}.

Por otro lado, el complejo ESCRT-II interacciona con el complejo ESCRT-III a través de la interacción de Vps25p con el extremo N-terminal de Vps20p^{31,32}.

Finalmente, ESCRT-III antes de disociarse de la membrana permite el cierre y la escisión de las ILVs de la membrana endosomal^{31,32}.

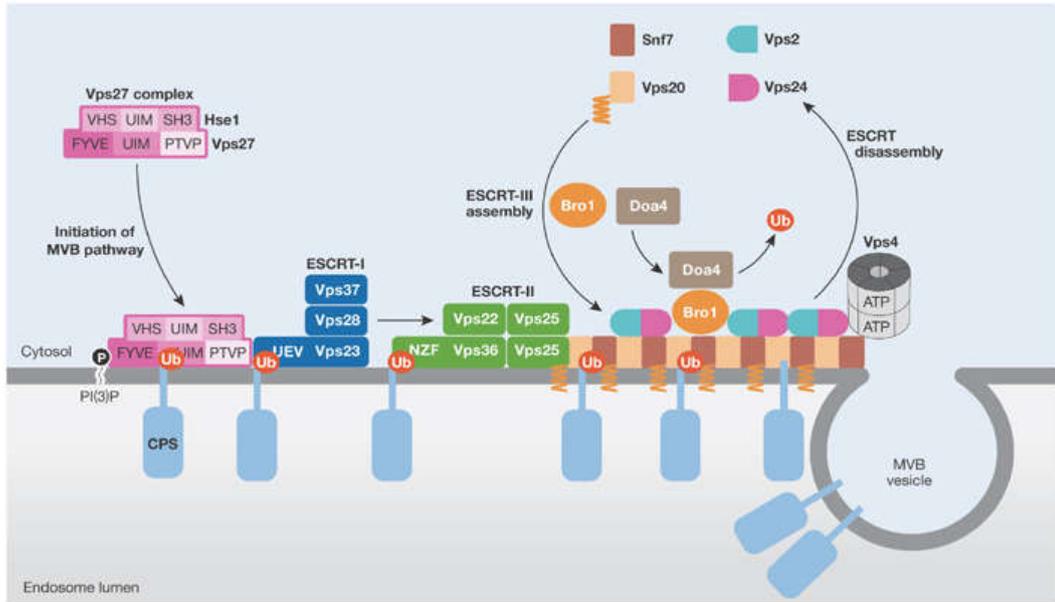


Figura 5. Maquinaria molecular requerida para la formación de vesículas intraluminales en los endosomas tardíos. Vía dependiente del Complejo de clasificación requerido para el transporte (ESCRT). (Hurley, JH, & Emr, SD, 2006).

Se apuesta por suponer que las dos vías comentadas no están separadas, sino que actúan conjuntamente pudiéndose volver una dominante sobre la otra.

1.2.2 ESTRUCTURA SUPERFICIAL Y CONTENIDO LUMINAL.

La composición de los exosomas es heterogénea, específica y dinámica, depende en gran medida del origen celular, así como del estado fisiológico y patológico de la célula. De forma general se ha observado que la membrana de los exosomas muestra un enriquecimiento en lípidos, principalmente en ceramida, esfingomiélin, colesterol, fosfatidilserina y ácidos grasos saturados, que muy a menudo forman parte de las denominadas balsas lipídicas^{28,36}. Curiosamente no se ha detectado el ácido lisobisfosfatídico (LBPA) en la membrana de los exosomas, pero sí en la de las ILVs de MVBs de la vía degradativa. En cuanto al contenido proteico se ha observado que la membrana de los exosomas muestra proteínas implicadas en su biogénesis tales como Tsg101 y Alix, proteínas implicadas en el transporte y la fusión como Rab GTPases, anexinas, flotilinas, implicadas en la adhesión como las integrinas, muestra moléculas presentadoras de antígeno de la clase MHC, proteínas de choque térmico como Hsp70 o Hsp90 y están enriquecidas en tetraspaninas como la CD9, CD63, CD81^{28,36}.

En cuanto al contenido luminal de los exosomas, de forma general, este muestra contenido molecular presente en el citosol de la célula en ese momento, entre ese contenido se incluye material genético, ARN y ADN de doble cadena^{28,36}.

ExoCarta (www.exocarta.org) es una base de datos de libre acceso donde se almacena información acerca de la composición molecular de los exosomas.

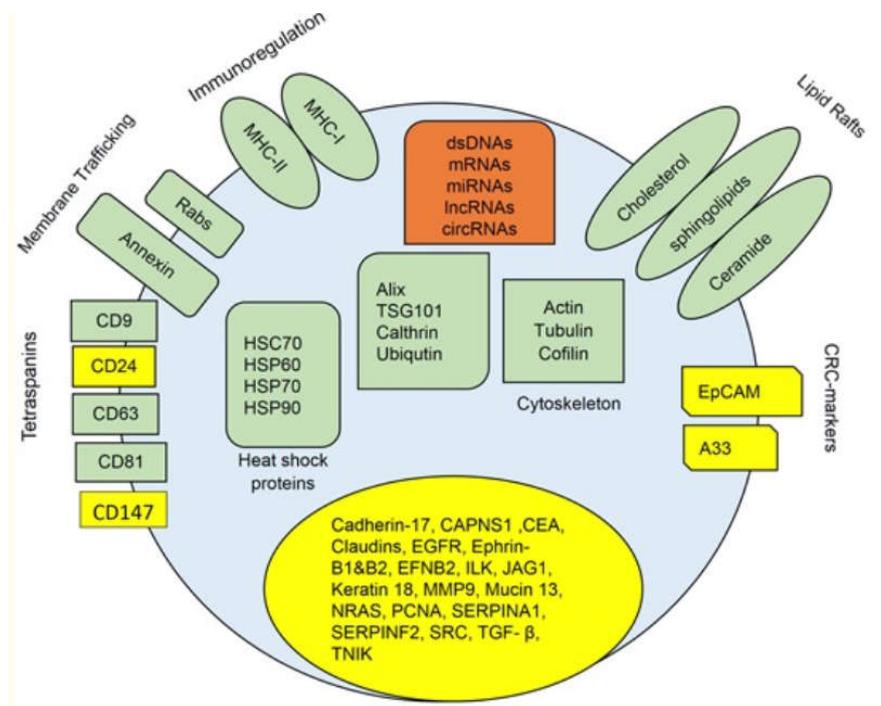


Figura 6. Composición molecular de los exosomas. En verde se muestran las moléculas halladas de forma general en los exosomas, en amarillo las moléculas halladas exclusivamente en exosomas procedentes de células del cáncer colorrectal y en naranja diferentes tipos de ácidos nucleicos en exosomas de cáncer colorrectal. (Modificado de Hon, K.W.et, al. (2017)).

1.2.3 SECRECIÓN E INTERACCIÓN CON LA CÉLULA DIANA.

Los MVBs cuyo destino es la exocitosis se dirigen a la membrana plasmática por medio de un mecanismo de transporte modulado por la GTPasa Rab7. Tras anclarse a la membrana, mediante un proceso mediado por las GTPasas Rab35/Rab27⁴⁵, se unen a la maquinaria SNARE, lo que permite la fusión directa entre ambas membranas facilitándose la liberación del contenido de los MVBs al medio extracelular.

Los exosomas liberados al medio extracelular son captados por la célula receptora mediante moléculas de superficie como las tetraspaninas, integrinas, proteoglicanos, glucolípidos, lectinas, las cuales se disponen tanto en la membrana exosomal como en la membrana de la célula receptora. Una vez capturados por la célula receptora, los exosomas se internalizan mediante endocitosis dependiente de clatrina, endocitosis dependiente de caveolina, endocitosis mediada por lípidos (balsas lipídicas), fagocitosis, macropinocitosis, por fusión directa de la membrana exosomal con la plasmática, o a

través de la unión y activación de receptores de superficie expresados en la célula receptora sin ser internalizados^{22, 41}.

1.2.4 LA IMPLICACIÓN DE LOS EXOSOMAS EN EL CÁNCER.

La liberación del contenido de los exosomas de origen tumoral, en sus células diana, se ha relacionado con la modificación en la expresión génica de las células receptoras. Así a los exosomas procedentes de células tumorales se les asocian diversas funciones tales como la promoción de la tumorigénesis, crecimiento tumoral, angiogénesis, metástasis, evasión del sistema inmune y resistencia a fármacos.

Los exosomas derivados del tumor pueden transferir proteínas y ARN a otras células, y de esta manera promover vías de activación tumoral.

1.2.4.1 CRECIMIENTO TUMORAL.

El crecimiento tumoral es una de las características que define al cáncer. El contenido de los exosomas procedentes de células tumorales puede fomentar el crecimiento tumoral. Por ejemplo, el receptor EGFR (HER1) es un receptor tirosina quinasa que media la activación de distintas vías de señalización, las cuales son importantes desde el punto de vista oncológico, entre ellas está la vía RAS/RAF/MEK/MAPK o la vía PI3K/AKT/mTOR. La activación de estas vías promueve la proliferación celular, supervivencia celular, invasión y metástasis, y la angiogénesis inducida por tumor¹⁷. Se conoce que los exosomas liberados por células cancerosas del epitelio colónico pueden transferir KRAS mutado a células vecinas sanas, promoviendo su transformación hacia células cancerosas, llevándolas a un estado de proliferación sostenido¹⁷. Además, se sabe que los exosomas de células CCR que poseen KRAS mutado contienen muchas proteínas promotoras de tumores como EGFR, anfiregulina en niveles elevados, SRC, integrinas, que podrían fomentar el crecimiento tumoral al llegar a las células sanas del epitelio colónico¹⁷.

También se ha llegado a informar que la carga de B-catenina en exosomas derivados del tumor fomenta el crecimiento tumoral en el colon²¹. La vía Wnt juega un papel fundamental en la homeostasis del epitelio colónico. La correcta señalización de la vía APC/B-catenina, es importante a la hora de mantener un estado proliferativo, no diferenciado, de las células del epitelio colónico (células madre en el fondo de la cripta, y células proliferantes, precursoras de los diferentes tipos celulares, dispuestas en la

mitad basal de la cripta), así como para evitar el estado proliferativo en las células diferenciadas de la parte apical de la cripta²¹.

En ausencia de la proteína de señalización WNT, la proteína APC (gen de la poliposis adenomatosa del colon; supresor de tumores) causa la degradación de B-catenina, evitando su acumulación en el citoplasma. Para ello APC forma un complejo con axina y GSK3, el cual conduce a la fosforilación y ubiquitinación de B-catenina, que posteriormente será destruida en el proteosoma²¹. Cuando Wnt está presente, unida a su receptor de membrana, se produce el bloqueo del complejo APC-AXIN-GSK3, lo que permite la translocación de B-catenina hacia el núcleo. En el núcleo B-catenina se une al factor de transcripción TCF y promueve la proliferación celular incrementando la transcripción de genes como MYC, ciclina D1 y otros²¹. Por tanto, las células con APC no funcional se comportan como si estuvieran bajo señal continua de Wnt. Por otro lado se ha visto como tumores de colon que tienen genes APC normales poseen mutada la B-catenina, lo cual no permite su interacción con el complejo de destrucción APC-AXIN-GSK3, permitiendo que la proteína mutada para APC-AXIN-GSK3 se acumule en el núcleo y fomente la proliferación celular (en la parte apical de las criptas de Lieberkühn) con la consecuente formación de pólipos que marcan el estadio inicial de la carcinogénesis del colon²¹.

1.2.4.2 ANGIOGÉNESIS.

La angiogénesis es el proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura ya existente. Permite que el suministro de sangre llegue a todos los tejidos metabólicamente activos asegurando el intercambio de oxígeno, nutrientes, desechos, etc. El proceso angiogénico consiste en una serie de pasos secuenciales tales como la degradación de la matriz extracelular, en la que pueden estar implicadas enzimas proteolíticas como las metaloproteinasas, elongación del endotelio activado, migración y proliferación de la célula endotelial, formación del tubo vascular, y maduración a través del reclutamiento de pericitos. Todos estos eventos están regulados por factores pro y antiangiogénicos, es lo que se conoce como balance angiogénico⁴⁰.

Diferentes estímulos pueden promover la angiogénesis siendo la hipoxia tisular uno de los más relevantes. En medio hipóxico HIF (factor inducible por la hipoxia) promueve en el núcleo la expresión de genes blanco relacionados con eventos como la angiogénesis entre otros⁹. HIF puede promover la expresión de genes que codifican para factores proangiogénicos como por ejemplo el factor de crecimiento vascular endotelial

(VEGF)⁹. HIF es un factor de transcripción heterodimérico compuesto por una subunidad HIF-1 α lábil que depende del oxígeno, y una subunidad β estable no dependiente del oxígeno. En condiciones normales de oxígeno, la prolil hidroxilasa (PH) hidroxila residuos de prolina en HIF-1 α , lo cual causa su ubiquitinación y su degradación por el proteosoma. En condiciones de hipoxia HIF-1 α se estabiliza, se trasloca al núcleo donde heterodimeriza con HIF-1 β , uniéndose a elementos respondedores de hipoxia (HRE) para activar la expresión de genes implicados en la angiogénesis, apoptosis, proliferación y supervivencia, proteólisis, entre otros⁹.

En el endotelio vascular el sistema VEGF/VEGFR-2 promueve el proceso angiogénico. La familia VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial), expresada por muchas células estromales, mesenquimatosas y de distintos tejidos adultos, en humanos consta de 5 miembros, siendo VEGF-A el principal miembro implicado en los procesos angiogénicos. VEGF-A es una citoquinina multifuncional que al actuar sobre las células endoteliales promueve su proliferación, la reorganización del citoesqueleto y la migración celular, la supervivencia celular y puede regular la permeabilidad vascular, siendo todas estas acciones necesarias en el proceso de la angiogénesis^{44,49}. Los receptores del ligando VEGF, los llamados VEGFR, son receptores tirosina quinasa que atraviesan la membrana celular. Existen tres VEGFR, siendo el VEGFR-2 el implicado en promover la angiogénesis en el endotelio vascular. La unión de VEGF a su receptor VEGFR-2, hace que se fosforilen los residuos de tirosina del receptor, iniciándose una cascada de señalización que desencadena la angiogénesis^{44, 49}. Pero la señalización puede tomar varios caminos, dependiendo esto de que tirosina intracelular se fosforile en el receptor. Así se puede activar la señalización para la vía MEK/ERK, que media la proliferación de células endoteliales; una cascada en la que interviene la activación de quinasa de adhesión focal (FAK), que media la reorganización del citoesqueleto y la migración celular; la vía fosfoinositol 3- quinasa (PI3K), que media la supervivencia de las células, y activación de la fosfolipasa C- γ (PLC- γ) que regula la permeabilidad vascular y la proliferación celular^{44, 49}.

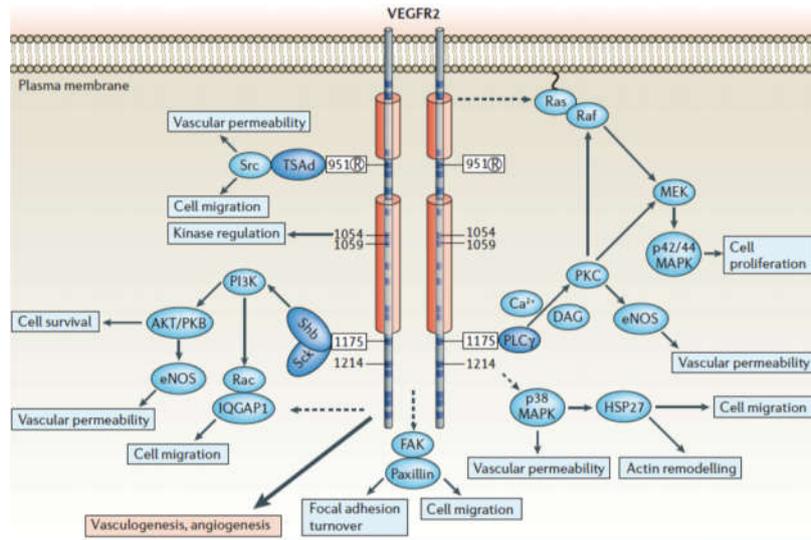


Figura 6. Respuesta angiogénica. Cascada de señalización inducida por VEGF a través de VEGFR2 (Olsson et al., 2006).

La vía Notch puede regular la angiogénesis a través del sistema de señalización VEGF/VEGFR-2. Mediante la hipótesis del fenotipo “célula de la punta” y “célula del tallo” podemos comprender como ambas vías interactúan para evitar la proliferación caótica de vasos sanguíneos. Las “células de la punta” están presentes en el frente del vaso sanguíneo en crecimiento, y poseen la maquinaria proteolítica necesaria para la migración, las “células del tallo” son las que tienen capacidad para proliferar y formar el lumen. La interacción entre las vías de señalización mencionadas determina el rol “célula de la punta” o “célula del tallo” que toma la célula endotelial en cuestión, contribuyendo con ello a la formación controlada de los vasos sanguíneos³⁵. Cuando VEGF interactúa con su receptor en las células endoteliales de la "punta" se desencadena la expresión del ligando Dll4 el cual interactúa con su receptor Notch-1 dispuesto en las “células del tallo”, esta interacción abre la vía de señalización Notch que inhibe el fenotipo “célula de la punta” en dicha “célula del tallo”, además de regular a la baja la expresión del gen que codifica para VEGFR en las “células del tallo”. Por otro lado, el ligando Jagged1 interactúa con el receptor Notch-1 en las “células del tallo” y antagoniza la acción del ligando Dll4, lo que permite que la célula adquiera el fenotipo "célula de la punta". La célula endotelial que más exprese Dll4, que será la que tenga mayor concentración de VEGF a su alrededor, adquirirá el fenotipo de “célula de la punta”³⁵.

La angiogenia promovida por el tumor se requiere para el crecimiento continuado de este y para que el tumor tenga acceso al sistema vascular, permitiendo esto último la

metástasis. La vascularización cubre las necesidades de oxígeno, nutrientes y eliminación de los productos de desecho. Las células endoteliales recién formadas estimulan el crecimiento de las células tumorales adyacentes mediante la secreción de factores de crecimiento³⁸.

La angiogénesis tumoral se puede llevar a cabo debido al aumento de la producción de factores angiogénicos y/o la pérdida de inhibidores angiogénicos. Estos factores pueden ser producidos por las células tumorales, células inflamatorias como por ej. macrófagos, o células estromales asociadas al tumor. Las células tumorales y estromales pueden también liberar proteasas las cuales al degradar la matriz extracelular liberan factores proangiogénicos como el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) o VEGF³⁸.

El cáncer de colon, como neoplasia epitelial, presenta una expresión significativa de EGF (factor de crecimiento epidérmico) y/o su receptor EGFR. La activación del receptor EGFR puede abrir vías como RAS-RAF-MEK-MAPK, así como la vía PI3K-ART-mTOR, y mediar la expresión génica que conduce a la producción de VEGF (mediante ligandos como TGF α o bFGF), estimulando una cascada de procesos implicados en el crecimiento y progresión tumoral que incluyen mecanismos de proliferación celular, supervivencia celular, angiogénesis inducida por tumor, invasión y metástasis. Diversos estudios sostienen que los exosomas de distintas líneas celulares podrían trasladar receptores del factor de crecimiento epidérmico a las células endoteliales, lo que permitiría la activación de la vía MAPK y AKT, así como la producción de VEGF autocrino¹. Esto nos puede llevar a pensar que las células cancerosas podrían estar utilizando al exosoma para transferir factores de crecimiento y sus receptores EGFR a las células endoteliales, para poder con ello volver a cablear las vías de señalización en las células endoteliales y conseguir la amplificación de la respuesta angiogénica⁴⁰. Por otro lado, también es conocido como los exosomas del cáncer pueden transferir Dll4 a las células endoteliales e integrarlo en la membrana celular de estas, lo que resulta en la inhibición de la señalización de Notch y el aumento de la ramificación del vaso⁴⁰. También se conoce que los exosomas endoteliales pueden transferir Dll4 al endotelio y conseguir el aumento de la ramificación del vaso⁵³.

Además de la transferencia de proteínas, los exosomas del cáncer transportan una gran variedad de ARN no codificante que influye en la señalización angiogénica, promoviéndola en muchas ocasiones²⁰.

1.2.4.3 METÁSTASIS.

La metástasis es la diseminación de células malignas de un tumor primario a lugares distantes. La metástasis se lleva a cabo a través de una serie de pasos recogidos en lo que se conoce como cascada metastásica, ésta contempla la creación de un nicho premetastásico en el sitio de destino, la transición de la célula cancerosa hacia célula mesenquimal (EMT), la disociación de las células tumorales del tumor primario, invasión de los tejidos vecinos, la intravasación en sangre y vasos linfáticos seguida de transporte a través de los vasos, establecimiento de las células en tejidos distantes y formación del tumor secundario²³.

A nivel local el tumor primario está formado no sólo por células tumorales, sino por fibroblastos, células endoteliales, células del sistema inmune, entre otras. Este heterogéneo conjunto secreta una gran variedad de exosomas llevándose a cabo una compleja red de comunicación entre todas las células. Como resultado de esta comunicación intercelular se producen cambios en la proliferación, migración e invasión de las células tumorales⁴⁶. Recientemente se ha descubierto la generación de nichos pre-metastáticos en aquellos órganos que van a ser colonizados por las células tumorales. Durante este proceso se ha observado como los exosomas del tumor primario, a través de los vasos sanguíneos, llegan a otros tejidos dependiendo de su organotropismo²⁹. Una vez alcanzado el tejido diana los exosomas son capaces de promover cambios en la integridad de los vasos sanguíneos, en las características estructurales de la matriz extracelular de estos órganos, facilitando el reclutamiento de las células tumorales y la formación de metástasis.

1.2.5 LOS EXOSOMAS PORTAN BIOMARCADORES ONCOLÓGICOS.

Los exosomas liberados por las células, a través de su cargamento de ADN, ARN y proteínas, participan en una dinámica comunicación celular, siendo esta distinta entre el estado fisiológico normal y el patológico.

Ser conocedores del contenido molecular de los exosomas puede ayudarnos en la detección, e incluso monitoreo, de enfermedades como el cáncer. El contenido molecular de los exosomas se presenta como una fuente de posibles biomarcadores con los que identificar al cáncer.

2. OBJETIVOS.

El objetivo general de este trabajo es estudiar el perfil proteico de los exosomas pertenecientes a personas diagnosticadas con cáncer colorrectal y el perfil proteico de los exosomas de personas sanas, en busca de proteínas diferenciales que pudieran estar interviniendo en el desarrollo del cáncer colorrectal.

Para el desarrollo del mismo se han abordado los siguientes objetivos específicos:

1. Aislar exosomas del suero de pacientes con cáncer de colon y del suero de sujetos sanos.
2. Estudiar el proteinograma de los exosomas aislados del suero de pacientes con cáncer de colon, y el de los exosomas aislados del suero de personas sanas.
3. Comparar el patrón proteico de los exosomas de pacientes con cáncer de colon con el de los exosomas pertenecientes a personas sanas.
4. Establecer el patrón de bandas proteicas diferenciales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Consideraciones éticas del estudio.

Las muestras de sangre periférica fueron colectadas de dos personas sanas y dos pacientes diagnosticados con cáncer de colon. Los individuos participantes en el estudio firmaron el consentimiento informado y este contó con la aprobación del comité de ética de la Universidad de la Laguna y el Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria (HUNSC).

3.2 Procesado de muestras de sangre para la obtención de plasma y suero.

Para la obtención de suero las muestras de sangre se recogieron en tubos en los que no se había puesto anticoagulante. Las muestras así obtenidas se dejaron en posición vertical hasta que se coagularon y se inició la retracción del coágulo. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 650xg durante 5 minutos logrando con ello separar el suero del coágulo. El suero obtenido se dispensó en varios tubos eppendorf llevándolos hasta un volumen de 500µL cada uno.

Para la obtención del plasma las muestras se recogieron en tubos que contenían ácido etilendiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. Posteriormente los tubos se

centrifugaron a 650xg durante 5 minutos. El plasma obtenido se dispensó en varios tubos eppendorf llevándolos hasta un volumen de 300µL cada uno.

Tanto las alícuotas de suero como las de plasma fueron conservadas a -80°C tras su obtención.

3.3 Aislamiento de exosomas a partir de suero.

Las muestras de suero congeladas a -80°C se mantuvieron en hielo aproximadamente durante 30 minutos, llevándose después a un baño de 25°C hasta que estuvieron completamente descongeladas. Una vez descongeladas fueron sometidas a un primer paso de centrifugación a 2000xg durante 30 minutos a 4°C, siendo el propósito de esta primera centrifugación la eliminación de restos celulares, recuperándose finalmente el sobrenadante. Posteriormente a este sobrenadante se le añadió la cantidad necesaria del reactivo Total Exosome Isolation (from serum) (Invitrogen by ThermoFisher Scientific), en la proporción de 20µL de reactivo para 100µL de suero, tratando en todo momento de conseguir una buena homogenización del producto con el suero. Seguidamente las muestras se incubaron en un baño a 4°C durante 30 minutos. Después de la incubación las muestras se centrifugaron a 10000xg durante 10 minutos. Finalmente de cada muestra se extrajo el sobrenadante y se alícuotó en su correspondiente tubo eppendorf, obteniéndose tras ello el pellet de exosomas para cada muestra. Tanto los pellets de exosomas como las alícuotas de sobrenadante fueron congelados a -80°C.

3.4 Obtención de proteínas exosomales.

Para la obtención de las proteínas contenidas en los exosomas se administraron 75µL de buffer de lisis RIPA (50mM Tris pH8, 150mM NaCl, 1% Nonidet 40, 0,5% deoxicolato sódico, 0,1% SDS, inhibidor de proteasas Complete 1x) sobre cada pellet de exosomas, resuspendiendo con micropipeta durante 5 minutos y dejando reposar en hielo otros 5 minutos, así hasta un total de 20 minutos. Seguidamente se centrifugaron las muestras a 12000xg durante 2 minutos a 4°C con el objetivo de recuperar el sobrenadante en donde se encontraban las proteínas, y descartar los restos del componente vesicular. Las proteínas obtenidas se conservaron a -80°C hasta su uso.

Soluciones preparadas:

10ml de RIPA buffer de lisis (50mM Tris pH8, 150mM NaCl, 1% Nonidet 40, 0,5% deoxicolato sódico, 0,1% SDS, inhibidor de proteasas Complete 1x).

3.5 Electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE).

La separación de proteínas se llevó a cabo por medio de electroforesis vertical discontinua en gel de poliacrilamida en SDS y bajo condiciones reductoras, empleándose el sistema Mini-Protean de Bio-Rad.

3.5.1 Preparación de un gel de poliacrilamida discontinuo en SDS.

♦ Preparación del gel separador al 10%T.

Se mezcló en un recipiente 2,03ml de agua, 1,67ml de acrilamida/bisacrilamida 30%, 1,25ml de Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 0,05ml de SDS 10%, añadiendo finalmente 25µL de persulfato amónico (PSA) y 2,5µL de TEMED (N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina). La mezcla así preparada se vertió entre las dos placas de vidrio del sistema Mini-Protean de Bio-Rad, para seguidamente crear una fina capa de agua sobre ella. Se dejó polimerizar el gel durante aproximadamente 1 hora.

♦ Preparación del gel de compactación al 4%T.

Se mezcló en un recipiente 1,82ml de agua, 0,40ml de acrilamida/bisacrilamida 30%, 0,75ml de Tris-HCl 0,5M pH 6,8, 0,03ml de SDS 10%, añadiéndose finalmente 15µL de persulfato amónico y 3µL de TEMED. Tras retirar la fina capa de agua dispuesta anteriormente sobre el gel separador, se vertió la mezcla preparada sobre este y se dejó polimerizar aproximadamente durante 1 hora.

Los geles así preparados se conservaron en la nevera, dentro de un recipiente con tampón de cámara 1x a pH 8,3 (0,2M glicina, 0,025M Tris, 0,0035M SDS), para ser utilizados al día siguiente.

Alternativamente también se llegaron a utilizar geles de poliacrilamida preformados, 10% Mini-PROTEAN TGX y 4-20% Mini-PROTEAN TGX, (Bio-Rad).

3.6 Preparación de las muestras para su análisis por SDS-PAGE.

Las muestras a analizar por SDS-PAGE en condiciones reductoras consistieron en suero, suero tras la purificación de los exosomas (sobrenadante) y las proteínas de los exosomas purificados. El tandeen de muestras descrito anteriormente se obtuvo tanto de personas sanas (controles) como de pacientes con cáncer de colon.

Tras descongelar las muestras en hielo, se tomaron de cada una de ellas 0,5µL, a excepción del sobrenadante del cual se tomó 0,25µL. A las muestras se les adicionó seguidamente 9µL de H₂O más 5µL de LSB3x (Laemmli Sample Buffer) (6,9% SDS,

15% B-Mercaptoetanol, 30% glicerol, 185,735Mm Tris HCl pH6, 8 y 0,015% azul de bromofenol). Para el gel que recibió la tinción con el reactivo de schiff's se tomaron 3µL de cada muestra a las cuales se les adicionó 7µL de H₂O más 5µL de LSB3x(6,9% SDS, 15% B-Mercaptoetanol, 30% glicerol, 185,735Mm Tris HCl pH6, 8 y 0,015% azul de bromofenol). En todas las ocasiones se tomaron 5µL de peso molecular, Precision Plus Protein Standars Kaleidoscope (Bio-Rad), a los que se les adicionó 10µL de LSB 1x.

Una vez cargadas las muestras en el gel, para los geles prefabricados la electroforesis se desarrolló a 200 voltios, mientras que para los geles elaborados en el laboratorio esta tuvo lugar a 150 voltios, ambas a temperatura ambiente, en tampón de cámara a pH 8,3(0,2M glicina, 0,025M Tris, 0,0035M SDS) y durante aproximadamente 45 minutos.

3.7 Tinción de los geles de poliacrilamida.

La visualización de la mayoría de las proteínas separadas por medio de SDS-PAGE requiere el uso de colorantes.

3.7.1 Tinción azul de Coomassie.

Una vez retirado el gel del casete este se sumergió en la disolución de teñido azul de Coomassie Brilliant Blue R250 durante 15 minutos bajo suave agitación continua. Transcurrido este tiempo se retiró la disolución de teñido y el gel fue sometido a dos lavados consecutivos con disolución de desteñido, resultando un gel de bandas azules sobre fondo transparente.

Disoluciones utilizadas:

- Disolución de teñido (105ml de stock Coomassie Brilliant Blue R250, 105ml Metanol, 42ml Acético).
- Disolución de desteñido (40% Metanol, 10% Acético, 50% Agua).

3.7.2 Tinción Sypro Ruby.

Una vez retirado el gel del casete este se mantuvo en solución fijadora durante 30 minutos bajo agitación continua, esta operación se repitió dos veces. Tras retirar la solución fijadora el gel se cubrió con SYPRO Ruby Protein Gel Stain (invitrogen) manteniéndose en oscuridad y agitación continua durante toda la noche. Transcurrido este tiempo el gel se dispuso en solución de lavado durante 30 minutos, bajo agitación continua y oscuridad, esta operación se repitió dos veces. Finalmente, al gel se le aplicaron dos lavados con agua de cinco minutos cada uno.

Disoluciones utilizadas:

- Solución fijadora (50% Metanol, 7% Ácido acético glacial).
- Tinción con SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Invitrogen).
- Solución de lavado (10% Metanol, 7% Ácido acético glacial).

3.7.3 Tinción con el reactivo de Schiff.

Esta tinción permite detectar las glicoproteínas presentes en un gel de poliacrilamida al quedar sus azúcares teñidos de un color magenta.

Una vez se retiró el gel del casete este se dispuso en solución de TCA (ácido tricloroacético) al 12% durante 10 minutos bajo agitación continua. Seguidamente el gel se sumergió en ácido peryódico (disponible en el kit Ventana Medical Systems) durante 20 minutos. Posteriormente el gel se sometió a tres lavados, de 5 minutos cada uno, en ácido acético al 15%. Se realizaron dos lavados de forma secuencial con el reactivo de Schiff, en intervalos de 15 minutos con cada reactivo, y preservándose en todo momento la condición de oscuridad y agitación continua. Finalmente, el gel se sometió a dos lavados, de aproximadamente 15 minutos cada uno, con ácido acético al 7,5%, consiguiendo que las bandas color magenta quedaran enmarcadas sobre un gel transparente.

Soluciones preparadas:

Stock de TCA al 20%; a 20g de TCA se le adicionaron 100ml de agua, manteniéndose la mezcla sobre agitador magnético hasta que la solución quedó completamente homogénea.

3.8 Análisis de los geles de poliacrilamida.

Los geles procedentes de las SDS-PAGE llevadas a cabo se analizaron a través del software de análisis de geles Quantity-one (Bio-Rad).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para separar las proteínas presentes en una muestra de suero, en el suero obtenido tras la purificación de los exosomas (sobrenadante) y las proteínas resultantes del lisado de un pellet de exosomas aislado del suero, tanto para pacientes diagnosticados con cáncer de colon como para las personas sanas que actuaron como controles, se empleó la electroforesis monodimensional (1-DE), concretamente la técnica SDS-PAGE bajo

condiciones reductoras. Tras realizar la técnica mencionada se pudo obtener una primera evaluación del contenido proteico presente en cada gel.

En el gel de la figura N°7 se puede observar que la técnica de separación electroforética se llevó a cabo correctamente. Los carriles 1, 2 y 3 se ocuparon con muestras procedentes del paciente (suero, sobrenadante y proteínas del lisado del pellet de exosomas, respectivamente). El carril 1 muestra todas las proteínas existentes, ya que se contemplan tanto las proteínas del suero como las de los exosomas que viajaban en él. El carril 2 mantiene las proteínas presentes en el suero, pero no las presentes en los exosomas puesto que estos últimos han sido extraídos. El carril 3 muestra únicamente las proteínas presentes en los exosomas. El carril 3 también pone de manifiesto las proteínas que son exclusivas de los exosomas puesto que no están en el sobrenadante y por tanto no forman parte del suero sino de los exosomas (flechas amarillas y ocre en la figura N° 7 y figura N° 8). Obsérvese que la banda señalada con la flecha ocre en realidad son dos bandas que no llegan a apreciarse bien separadas en la fotografía del gel, pero que sí se ponen de manifiesto en la gráfica adjunta. Las bandas exclusivas del carril 3, con respecto al carril 2, contienen subunidades proteicas o proteínas monoméricas cuyos pesos moleculares (Mr) son 250KD, 41,69KD, 38,90KD, 36,31KD, 33,11KD, 26,30KD, según la curva de calibrado de la figura N°8.

Los carriles 5, 6 y 7 se ocuparon con muestras pertenecientes a la persona sana que actuó de control (suero, sobrenadante y proteínas del lisado del pellet de exosomas, respectivamente). El carril 5 muestra todas las proteínas existentes, tanto las que forman parte del suero como las que forman parte de los exosomas, aún así si alguna proteína perteneciente al lisado de exosomas no se llegase a apreciar en este carril, podría ser debido a que la cantidad de ésta en el suero crudo cargado es insuficiente. El carril 6 mantiene las proteínas presentes en el suero, pero no las presentes en los exosomas puesto que estos últimos han sido extraídos. El carril 7 muestra únicamente las proteínas presentes en los exosomas, poniendo a la vez de manifiesto las proteínas que son exclusivas de los exosomas, puesto que estas últimas no están en el sobrenadante (flechas azul claro y blancas en la figura N°7 y N°8). Nótese que la banda señalada con la flecha blanca en realidad son dos bandas independientes, dualidad que se observa más claramente sobre la gráfica. La flecha azul claro sobre la gráfica pone de manifiesto la banda más tenue señalada en el gel con una flecha de ese mismo color. Los pesos moleculares de las subunidades proteicas o proteínas monoméricas contenidas en las

bandas exclusivas del carril 7, con respecto al carril 6, son 250KD, 53,70KD, 38,90KD, 36,31KD, 33,11KD, 26,30KD, según la curva de calibrado de la figura N°8.

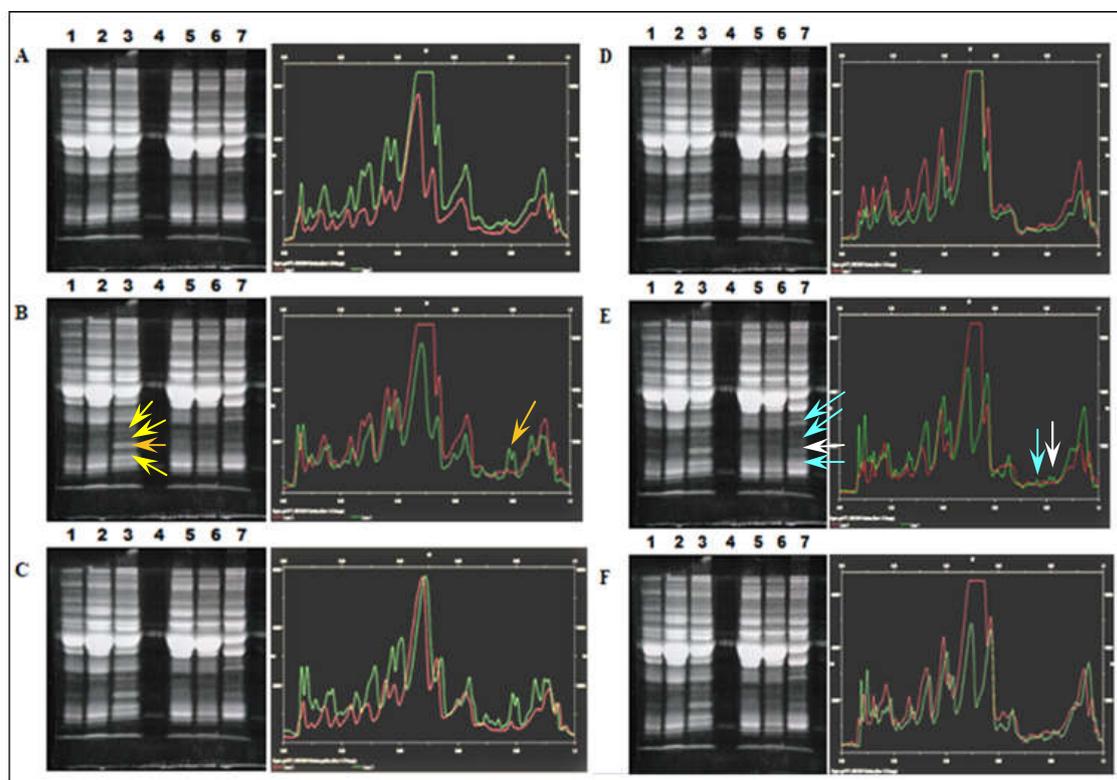


Figura 7. Separación mediante SDS-PAGE de 0,5 μ L de suero, 0,25 μ L de sobrenadante y 0,5 μ L de proteínas obtenidas del lisado de exomas purificados (carriles 1, 2 y 3 respectivamente, pertenecientes al paciente diagnosticado con cáncer de colon). Los carriles 5, 6 y 7, pertenecientes al control sano, contienen 0,5 μ L de suero, 0,5 μ L de sobrenadante y 0,5 μ L de proteínas obtenidas del lisado de exomas purificados, respectivamente. Se adjunta gráfica comparativa que lee cantidad de proteína; A) Suero del paciente (línea roja) junto a sobrenadante del paciente (línea verde), B) Sobrenadante del paciente (línea roja) junto a proteínas de exomas del paciente (línea verde), C) Suero del paciente (línea roja) junto a proteínas de exomas del paciente (línea verde). D) Suero del individuo sano (línea roja) junto a sobrenadante del individuo sano (línea verde), E) Sobrenadante del individuo sano (línea roja) junto a proteínas de exomas del individuo sano (línea verde), F) Suero del individuo sano (línea roja) junto a proteínas de exomas del individuo sano (línea verde).

Al establecer una comparación del patrón de bandas entre el carril 3 y el carril 7, proteínas de exomas del paciente y proteínas de exomas del control respectivamente, se propone una banda diferencial que está presente en el carril 3 pero no se encuentra en el carril 7 (flecha roja en la figura N°8 o aro blanco sobre la gráfica), esta banda diferencial sería de contenido proteico que conforma el exosoma y no de origen sérico puesto que no se presenta igualmente perfilada en el sobrenadante del paciente, y de un peso molecular de 41,69KD. Por otro lado se propone una segunda

banda proteica diferencial entre estos dos carriles, que está presente en el carril 7 pero no se aprecia en el carril 3 (flecha magenta en la figura N°8), ésta se supone de origen proteico exosomal y no sérico, estimándose su peso molecular en 53,70KD.

El patrón de bandas del carril 2 y 6, sobrenadante del paciente y sobrenadante del control respectivamente, se contempla muy semejante.

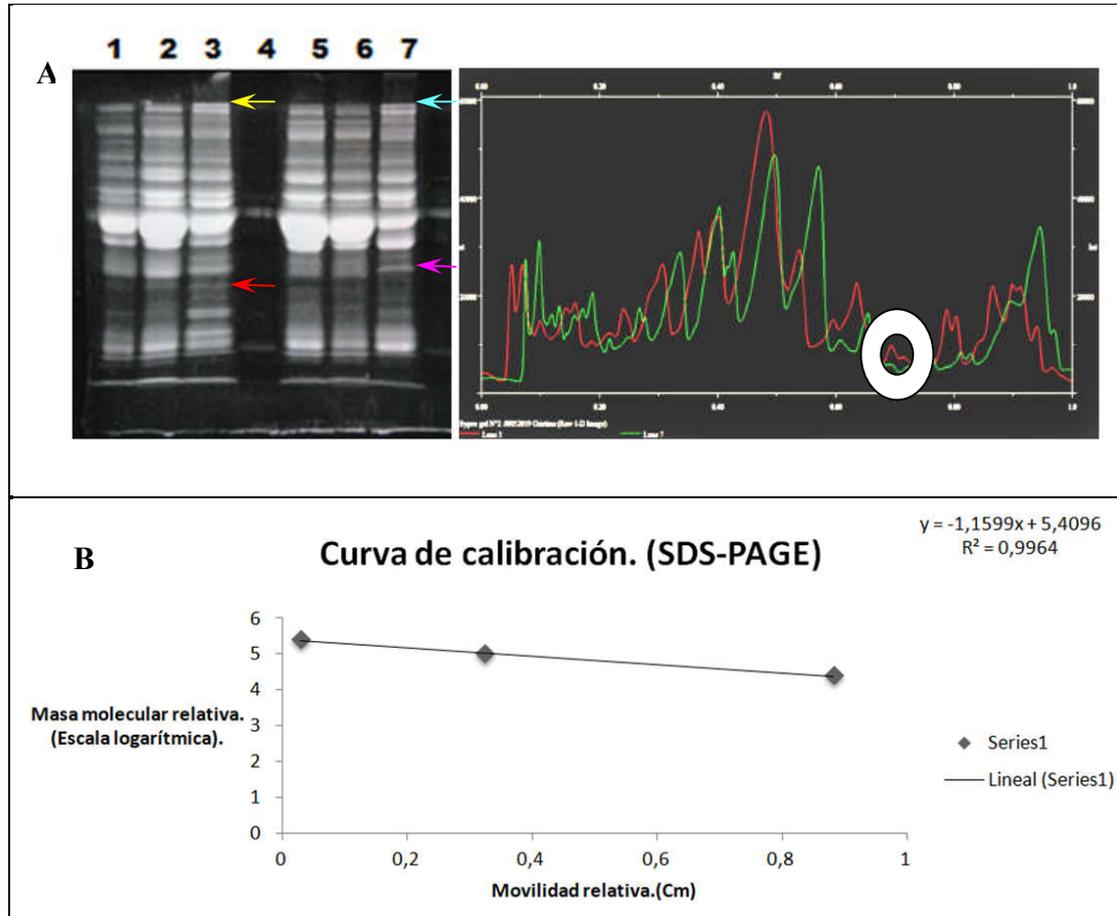


Figura 8. A) Separación mediante SDS-PAGE de 0,5µL de suero, 0,25µL de sobrenadante y 0,5µL de proteínas obtenidas del lisado de exosomas purificados (carriles 1, 2 y 3 respectivamente, pertenecientes al paciente diagnosticado con cáncer de colon). Los carriles 5, 6 y 7, pertenecientes al control sano, contienen 0,5µL de suero, 0,5µL de sobrenadante y 0,5µL de proteínas obtenidas del lisado de exosomas purificados, respectivamente. Se adjunta gráfica comparativa que lee cantidad de proteína; A) Proteínas de exosomas del paciente (línea roja) junto a proteínas de exosomas del individuo sano (línea verde). B) Curva de calibrado perteneciente al gel del apartado A.

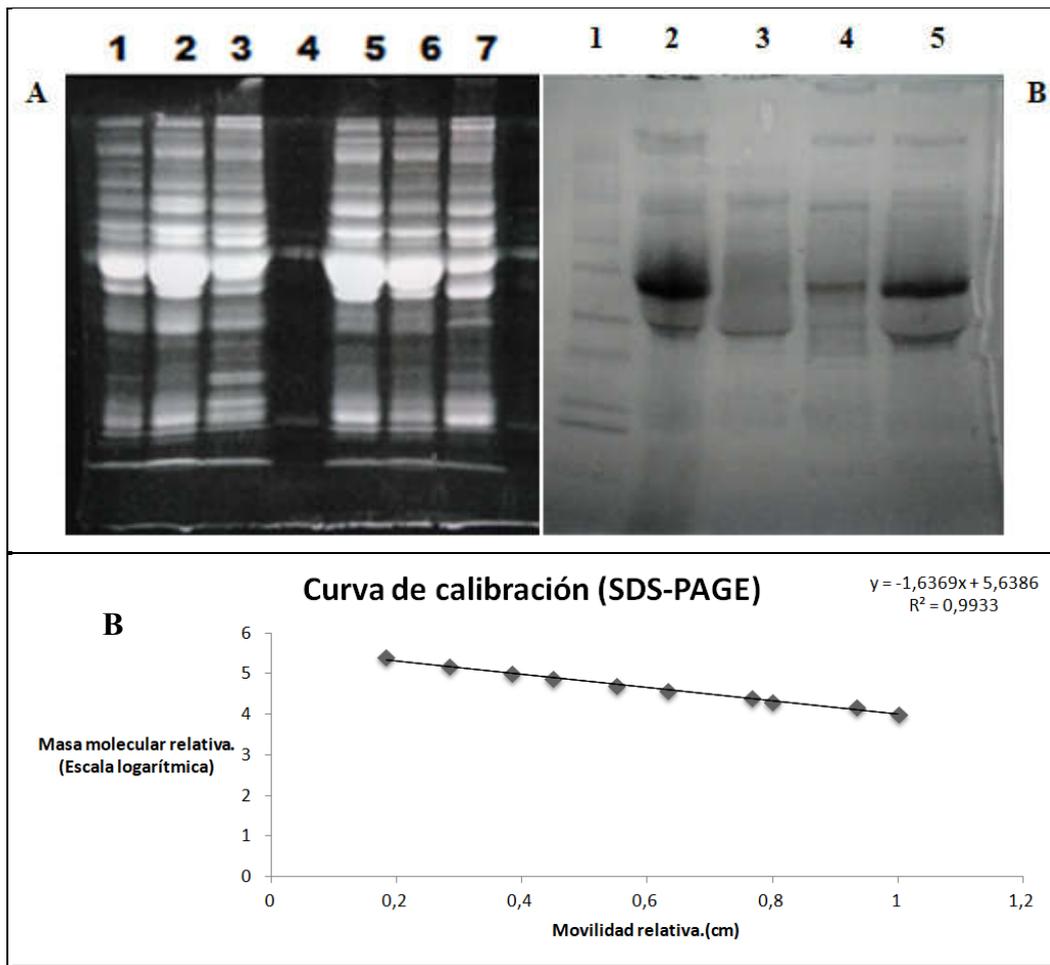


Figura 9. A) Separación mediante SDS-PAGE de 0,5 μ L de suero, 0,25 μ L de sobrenadante y 0,5 μ L de proteínas obtenidas del lisado de exosomas purificados (carriles 1, 2 y 3 respectivamente, pertenecientes al paciente diagnosticado con cáncer de colon). Los carriles 5, 6 y 7, pertenecientes al control sano, contienen 0,5 μ L de suero, 0,5 μ L de sobrenadante y 0,5 μ L de proteínas obtenidas del lisado de exosomas purificados, respectivamente. B) Determinación de la presencia de glicoproteínas. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE. Carril 1, patrón de masas moleculares; carril 2 y 5, proteínas obtenidas del lisado de exosomas purificados (3 μ L) pertenecientes a dos controles sanos respectivamente. Carril 4, proteínas obtenidas del lisado de exosomas purificados (3 μ L) del paciente diagnosticado con cáncer de colon. El carril 3 no forma parte de este estudio. Se adjunta curva de calibrado del gel B.

Con el fin de detectar la presencia de glicoproteínas y caracterizar, en la medida de lo posible, un poco más las muestras de proteínas de exosomas trabajadas, se llevó a cabo la técnica de SDS-PAGE, y posteriormente se tiñó el gel con el reactivo de Schiff. El gel así teñido revela la presencia de glicoproteínas por encima de los 45KD, tanto para el paciente como para los controles. Las proteínas reseñadas como “exclusivas” de los exosomas con respecto al suero, que se visualizaron en el gel de la figura nº7 (o en el

gel A de la figura nº 9), la mayoría tiene pesos moleculares por debajo de los 45KD, y no se manifestaron como glicoproteínas en el gel de tinción Schiff.

Dado que la técnica de detección de glicoproteínas solo fue realizada una vez, los resultados no se consideran concluyentes.

5. CONCLUSIÓN.

La técnica SDS-PAGE (1DE) empleada en la separación de muestras proteicas pertenecientes a un paciente diagnosticado con cáncer de colon y muestras proteicas pertenecientes a una persona sana, puso de manifiesto el contenido proteico que portaban los exosomas de las personas participantes, pudiéndose apreciar con ello el contenido proteico “exclusivo”, con respecto al contenido proteico propio del suero, que portaban dichos exosomas, y hallándose entre éste último dos bandas diferenciales, una presente en el contenido proteico de los exosomas del paciente , de aproximadamente 41,69KDa, y claramente ausente entre el contenido proteico de los exosomas del control, y otra, de aproximadamente 53,70KDa, presente entre el contenido proteico de los exosomas del control y ausente entre el contenido proteico de los exosomas del paciente. Por otro lado, la tinción con el reactivo de Schiff confirmó la presencia de glicoproteínas entre el contenido proteico de los exosomas, aunque no se pudo concluir si entre el contenido proteico “exclusivo” de exosomas había glicoproteínas.

Por tanto, ha sido posible confirmar la existencia de un patrón proteico diferencial, lo que nos permite suponer que los exosomas del cáncer, a través de un mecanismo de carga diferencial, y a través de la transferencia de las proteínas diferenciales halladas, están participando en el desarrollo del cáncer colorrectal.

Las diferencias halladas sugieren que conocer el perfil completo de las moléculas transportadas por los exosomas de pacientes con cáncer, puede arrojar luz sobre la biología del proceso patológico, lo que nos ayudaría a diagnosticar y tratar la enfermedad.

CONCLUSION.

The SDS-PAGE (1DE) technique used in the separation of protein samples belonging to a patient diagnosed with colon cancer and protein samples belonging to a healthy person, revealed the protein content carried by the exosomes of the persons participants, thus being able to appreciate the “exclusive” protein content, with respect to the serum

content itself, of these exosomes, and finding two differential bands, one present in the protein content of the exosomes of the patient, of approximately 41,69 KD, and clearly absent among the protein content of the exosomes of the control, and another, approximately 53,70KD, present between the protein content of the exosomes of the control and absent between the protein content of the exosomes of the patient. On the other hand, the staining with the Schiff reagent confirmed the presence of glycoproteins between the protein content of the exosomes, but it could not be concluded if there were glycoproteins among the exclusive protein content of exosomes.

Therefore it has been possible to confirm the existence of a differential proteinogram pattern, which allows us to suppose that cancer exosomes, through a differential load mechanism, and through the transfer of these differential proteins, are participating in the development of colorectal cancer.

The differences found suggest that knowing the complete profile of the molecules transported by the exosomes of cancer patients can shed light on the pathological process, which would help us diagnose and treat the disease.

BIBLIOGRAFÍA

1. Al-Nedawi, K., Meehan, B., Kerbel, R. S., Allison, A. C. & Rak, J. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 3794–3799 (2009).
2. Al-Nedawi, K., Meehan, B. & Rak, J. Microvesicles: Messengers and mediators of tumor progression. *Cell Cycle* **8**, 2014–2018 (2009).
3. Andreu, Z. & Yáñez-Mó, M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front. Immunol.* **5**, 1–12 (2014).
4. Arvelo, F. & Poupon, M.-F. Aspectos Moleculares Y Celulares De La Metastasis Cancerosa Molecular and Cellular Aspects of the Cancer Metastasis. *Revis. (Biología Celular) Acta Científica Venez.* **52**, 304–312 (2001).
5. Benedetti Inés & Reyes Niradiz. Transición epitelial-mesenquimal en la progresión del adenocarcinoma prostático. *Iatreia* **28**, 420–433 (2015).
6. Bethan, P. & Lyden, D. The Metastatic Niche: Adapting Foreign Soil. *Nat. Rev. cancer* **9**, 285–293 (2009).
7. Bid, H. K., Roberts, R. D., Manchanda, P. K. & Houghton, P. J. RAC1: An Emerging Therapeutic Option for Targeting Cancer Angiogenesis and Metastasis. *Mol. Cancer Ther.* **12**, 1925–1934 (2013).
8. Bissig, C. & Gruenberg, J. ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends Cell Biol.* (2014). doi:10.1016/j.tcb.2013.10.009
9. Boticario, C. & Cascales, M. REVISIONES Hipoxia y cáncer. **76**, 379–408 (2010).
10. Cheshomi, H. & Matin, M. M. Exosomes and their importance in metastasis, diagnosis, and therapy of colorectal cancer. *J. Cell. Biochem.* **120**, 2671–2686 (2019).

11. Mantilla, C., SuÁRez Mellado, I., Duque Jaramillo, A. & Navas, M. C. β -catenin signaling mechanisms and its role in carcinogenesis Mecanismos de señalización por β -catenina y su papel en la carcinogénesis. *CES Med.* **29**, 109–127 (2015).
12. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 255–289 (2014).
13. Coronato, S., Laguens, G. & Di Girolamo, V. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *Med.* **72**, 495–502 (2012).
14. Crescitelli, R. *et al.* Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J. Extracell. Vesicles* **2**, 1–10 (2013).
15. Cuatrecasas, Míriam; Valera, A. Cáncer de colon: una enfermedad de las stem cells. *Gastroenterol. y Hepatol. Contin.* **9**, 20–24 (2010).
16. Cuesto Germán, Domínguez-Iturza Nuria, Enríquez-Barreto Lilian, Fernández-Martínez Patricia, Mata Gadea, Syriani Emilio, M. M. La activación de PI3K controla la formación de sinapsis en el sistema nervioso central. *24* 53–80 (2012).
17. Demory Beckler, M. *et al.* Proteomic Analysis of Exosomes from Mutant KRAS Colon Cancer Cells Identifies Intercellular Transfer of Mutant KRAS. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 343–355 (2013).
18. Fan, Q. *et al.* The emerging role of exosome-derived non-coding RNAs in cancer biology. *Cancer Lett.* **414**, 107–115 (2018).
19. Davis-Smyth; Ferrara Napoleone. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocr. Rev.* **18**, 4–25 (1997).
20. Fish, J. E. *et al.* miR-126 Regulates Angiogenic Signaling and Vascular Integrity. *Dev. Cell* **15**, 272–284 (2008).
21. Fodde, R., Smits, R. & Clevers, H. APC, Signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 55–67 (2001).
22. French, K. C., Antonyak, M. A. & Cerione, R. A. Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake. *Semin. cell Dev. Biol.* **67**, 48–55 (2017).
23. Geiger, T. R. & Peeper, D. S. Metastasis mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1796**, 293–308 (2009).
24. González-Buitrago, J. M., Ferreira, L. & Muñiz, M. D. C. Proteómica clínica y nuevos biomarcadores en los líquidos biológicos. *Med. Clin. (Barc).* **131**, 426–434 (2008).
25. Gopal, S. K. *et al.* Extracellular vesicles: their role in cancer biology and epithelial-mesenchymal transition. *Biochem. J.* **474**, 21–45 (2017).
26. Gopal, S. K. *et al.* Oncogenic epithelial cell-derived exosomes containing Rac1 and PAK2 induce angiogenesis in recipient endothelial cells. *Oncotarget* **7**, 19709–19722 (2016).
27. Hessvik, N. P. & Llorente, A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 193–208 (2017).
28. Hon, K. W., Abu, N., Ab Mutalib, N.-S. & Jamal, R. Exosomes As Potential Biomarkers and Targeted Therapy in Colorectal Cancer: A Mini-Review. *Front. Pharmacol.* **8**, 1–8 (2017).
29. Hoshino, A. *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329–335 (2015).
30. Hoshino Daisuke, Kirkbride Kellye C., Kaitlin Costello, Clark Emily S, Sinha Seema, Grega-Larson Nathan, Tyska Matthew J., W. A. M. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell Rep.* **5**, 1159–1168 (2013).
31. Hurley, J. H. & Emr, S. D. THE ESCRT COMPLEXES: Structure and Mechanism of a Membrane-Trafficking Network. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**, 277–298 (2006).
32. Hurley, J. H. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 4–11 (2008).
33. Hurley, J. H. *et al.* Piecing together the ESCRTs. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 161–166 (2009).
34. Hurley, J. H. & Odorizzi, G. Get on the exosome bus with ALIX. *Nat. Cell Biol.* **14**, 654–655 (2012).
35. Jakobsson, L. *et al.* Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat. Cell Biol.* **12**, 943–953 (2010).
36. Kalra, H., Drummen, G. & Mathivanan, S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 170 (2016).

37. Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A. & Altevogt, P. Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunol. Lett.* **107**, 102–108 (2006).
38. Kumar, Vinay; Abbas, Abul K.; Fausto, Nelson; Aster, J. C. *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional*. (Elsevier España, S.L. Travessera de Gràcia, 17-21 – 08021 Barcelona, España, 2010).
39. Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Matsudaira, Paul; Kaiser, Chris A.; Krieger, Monty; Scott, Matthew P.; Zipursky, Lawrence; Darnell, J. *Biología celular y molecular*. (Editorial Médica Panamericana., 2005).
40. Mansoor, M. A. & Rajagopal, R. *Diagnostic and Therapeutic Applications of Exosomes in Cancer*. (Elsevier, 2018).
41. Mulcahy, L. A., Pink, R. C. & Carter, D. R. F. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles* **3**, 24641 (2014).
42. Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. & Kojima, M. Angiogenesis in cancer. *Vasc. Health Risk Manag.* **2**, 213–219 (2006).
43. Ohno, S., Drummen, G. & Kuroda, M. Focus on Extracellular Vesicles: Development of Extracellular Vesicle-Based Therapeutic Systems. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 172 (2016).
44. Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J. & Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signalling - In control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 359–371 (2006).
45. Ostrowski, M. *et al.* Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* **12**, 19–30 (2010).
46. Quail, D. F. & Joyce, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **19**, 1423–1437 (2013).
47. Zhu, Q.-C., Gao, R.-Y., Wu, W. & Qin, H.-L. Epithelial-mesenchymal Transition and Its Role in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **14**, 2689–2698 (2013).
48. Ramírez Olmedo, J. P. Exosomas: ¿ La nueva ‘panacea’ de los biomarcadores? *Investigación y Ciencia* (2015). <https://www.investigacionyciencia.es/blogs/medicina-y-biologia/73/posts/exosomas-la-nueva-panacea-de-los-biomarcadores-13470>.
49. Roa, I. Conceptos Básicos en Angiogénesis Tumoral. *Int. J. Med. Surg. Sci.* **1**, 129–138 (2014).
50. Ross, Michael H.; Wojciech, P. *Histology: A text and atlas Whith correlated cell and molecular biology*. (Lippincott Williams and Wilkins, Inc. EE.UU., 2006).
51. Saavedra Torres, J. S., Zúñiga Cerón, L. F., Freyre Bernal, S. I., Muñoz Ordoñez, G. W., & Salguero, C. El Rol De Vegf En La Angiogénesis Fisiológica Y Tumoral. *Medicina (B. Aires)* **39**, 190–209 (2017).
52. Sánchez N., C. Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Rev. Médica Clínica Las Condes* **24**, 553–562 (2013).
53. Sheldon, H. *et al.* New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood* **116**, 2385–2394 (2010).
54. Théry, C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol. Rep.* **3**, 1–8 (2011).
55. Trajkovic, K. *et al.* Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (80-)*. **319**, 1244–1247 (2008).
56. Troncoso, D. *et al.* Transición epitelio mesénquima: de lo molecular a lo fisiológico. *Univ. Médica* **58**, (2017).
57. Yu, X., Harris, S. L. & Levine, A. J. The Regulation of Exosome Secretion: a Novel Function of the p53 Protein. *Cancer Res.* **66**, 4795–4801 (2006).
58. Zhang, H.-G. & Grizzle, W. E. Exosomes: a novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions. *Am. J. Pathol.* **184**, 28–41 (2014).
59. Zhou, J., Li, X.-L., Chen, Z.-R. & Chng, W.-J. Tumor-derived exosomes in colorectal cancer progression and their clinical applications. *Oncotarget* **8**, 100781–100790 (2017).
60. Zhuang, G. *et al.* Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *EMBO J.* **31**, 3513–3523 (2012).