

ROL DE LOS EXOSOMAS PROVENIENTES DE CÉLULAS DE CÁNCER COLORRECTAL IRRADIADAS, SOBRE CÉLULAS RECEPTORAS MEDIADO POR “BYSTANDER EFFECT”

ROLE OF EXOSOMES FROM IRRADIATED COLORECTAL CANCER CELLS ON “BYSTANDER EFFECT” MEDIATED RECEPTOR CELLS

Mateo Godoy Cabezas^{a*}

Francisca Campos Olivares^a

Jocelyn Alarcón Díaz^a

Mayra Crisóstomo Mendoza^a

^aEstudiante de Tecnología Médica, Facultad de Medicina Clínica Alemana de Santiago - Universidad del Desarrollo.

Artículo recibido el 06 de enero, 2024. Aceptado en versión corregida el 8 de mayo, 2024.

RESUMEN

Introducción: Uno de los tratamientos para el cáncer colorrectal es la radioterapia, la cual, a pesar de sus múltiples ventajas, presenta importantes efectos adversos. Uno de estos es el denominado Bystander effect, donde las células irradiadas transmiten señales a células no expuestas a radiación, las cuales modifican su funcionamiento, asociándose a la formación de nuevos tumores primarios en zonas alejadas del tumor inicial. Recientemente, se han propuesto a los exosomas como mediadores del fenómeno Bystander effect, sin embargo, su contribución aún no está del todo esclarecida. **Objetivo:** Evaluar el efecto de exosomas liberados por células de cáncer colorrectal en respuesta a una irradiación de 0,6 Gy, en células derivadas de tejido de colon normal. **Metodología:** Se emplearon técnicas de cultivo celular, ultracentrifugación para obtención de exosomas; cuantificación de muerte celular mediante azul de tipán; Rt-q-PCR para la expresión de transcritos antiapoptóticos. **Resultado:** Los exosomas provenientes de células cancerígenas inducen la muerte celular de forma progresiva en el tiempo y una tendencia a la baja de los transcritos antiapoptóticos BCL-2 y BCL-W. **Conclusión:** Se pudo observar que los exosomas liberados por células de cáncer colorrectal irradiadas, inducen la muerte de células de colon normales no sometidas a irradiación de forma progresiva en el tiempo y una tendencia a la baja de los transcritos antiapoptóticos BCL-2 y BCL-W, indicando una posible asociación con la vía apoptótica. **Palabras clave:** Bystander effect, Cáncer colorrectal, Células HCT-116, Exosomas, Irradiación.

ABSTRACT

Introduction: One of the treatments for colorectal cancer is radiotherapy, which despite its many advantages, has significant adverse effects. One of these is the so-called Bystander effect, in which irradiated cells transmit signals to cells not exposed to radiation, which modify their function and are associated with the formation of new primary tumours in areas distant from the initial tumour. Recently, exosomes have been proposed as mediators of the Bystander effect, however, their contribution is not yet fully elucidated. **Objective:** In this study, the effect of exosomes released from colorectal cancer cells in response to 0,6 Gy irradiation was evaluated in cells derived from normal colon tissue. **Methodology:** Cell culture techniques were used; ultracentrifugation to obtain exosomes; quantification of cell death by typan blue; Rt-q-PCR for the expression of anti-apoptotic transcripts. **Result:** Exosomes from cancer cells induced cell death progressively over time and a downward trend of anti-apoptotic transcripts BCL-2 and BCL-W. **Conclusion:** We observed that exosomes released from irradiated colorectal cancer cells induce the death of non-irradiated normal colon cells progressively over time and a downward trend of anti-apoptotic BCL-2 and BCL-W transcripts, indicating a possible association with the apoptotic pathway. **Key words:** Bystander effect, Colorectal cancer, HCT-116 cells, Exosomes, Irradiation.

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) constituye el tercer tumor maligno más común a nivel mundial con 1.849.518 casos nuevos registrados en el año 2018¹. Se estima que la tasa de incidencia cruda del CCR en ambos sexos es 24,2 por 100.000 habitantes¹. Adicionalmente, el CCR constituye la segunda causa de muerte por tumores malignos en el mundo, con 880.792 defunciones reportadas en 2018, cifra que representa el 9,2% del total de muertes por

enfermedades neoplásicas. En Chile, la incidencia estimada para el período 2003-2007 en ambos sexos asciende a 1.626 casos nuevos de CCR al año¹.

La radioterapia, con dosis superiores a 50 Gy, es un tratamiento común para el CCR³, con beneficios evidentes en la sobrevida y reducción de la recidiva después de 5 años^{2,3}. A pesar de sus ventajas, la radioterapia conlleva efectos adversos como erupciones cutáneas, náuseas y fatiga. Aunque los efectos adversos ocurren fundamentalmente en el

*Correspondencia: mateogodoyc@udd.cl
2024, Revista Confluencia, 7

área irradiada, se ha observado que zonas distantes al foco irradiado pueden presentar algunas alteraciones, como cánceres primarios producto del tratamiento. Este fenómeno, conocido como Efecto Vecindad (Bystander Effect) no es del todo entendido, pero se ha propuesto que factores clastogénicos y moléculas de señalización serían transmitidas desde células irradiadas. Recientemente, se ha propuesto que el Bystander Effect podría ser mediado por exosomas⁴, pequeñas vesículas (30-150 nm) altamente heterogéneas, de origen endosomal y secretadas activamente por la mayoría de las células^{5,6}. Estas vesículas, formadas por una bicapa lipídica, transportan en su interior proteínas, lípidos, ARN y fragmentos de ADN⁷. Estos pueden inducir daño en el ADN y muerte celular⁸.

El Bystander Effect ha sido demostrado en distintos modelos in-vitro⁶ e in-vivo¹⁰⁻¹³, asociándose a daño en el ADN, transformación celular¹⁴, aberraciones cromosomales¹⁵⁻¹⁷, apoptosis¹⁸ y respuestas adaptativas a la radiación^{17,18} en células vecinas. El efecto de radiación sobre el tejido adyacente no irradiado, fue inicialmente evaluado por Nagasawa y Little et al¹⁹, quienes expusieron células de ovario de hámster chino a dosis de 0,31 mGy de radiación de partículas alfa. A pesar de que a esta dosis sólo el 1% de la población celular recibió un impacto directo de partículas alfa, cerca del 30% de las células presentaron alteraciones, como intercambio de cromátidas hermanas. Posteriormente, distintos investigadores reportaron este efecto sobre células y tejidos ubicados fuera del haz de radiación, acuñándose el término "Bystander Effect", que describe cómo células irradiadas pueden inducir alteraciones en células no expuestas a radiación^{4,8,20}. Aunque se ha propuesto que los exosomas mediarían el efecto a distancia de la radiación, su contribución no está del todo esclarecida.

En este estudio se evaluó el efecto de los exosomas provenientes de células de CCR HCT-116 en células de tejido de colon normal CCD841CoN, estimando la muerte celular y la expresión de transcritos asociados a la apoptosis de las células receptoras.

Pregunta de investigación

¿Los exosomas derivados de células de cáncer colorrectal HCT-116 irradiadas pueden inducir muerte en las células receptoras no expuestas a radiación?

Hipótesis

Los exosomas liberados de células HCT-116, en respuesta a la irradiación pueden inducir muerte en células receptoras, no expuestas a radiación.

Objetivo general

Evaluar la muerte celular inducida por los exosomas provenientes de las células HCT-116

irradiadas y no irradiadas, sobre células receptoras no irradiadas.

Objetivos específicos

1. Caracterizar el tamaño de las microvesículas liberadas por las células HCT-116 en respuesta a la irradiación.
2. Evaluar el impacto de los exosomas en la muerte de células receptoras no irradiadas.
3. Evaluar el efecto de los exosomas en la expresión de transcritos asociados a la muerte celular en células no irradiadas.

METODOLOGÍA

A continuación, se observa en la Tabla 1 la clasificación de las variables del estudio, la escala de medición utilizada y la unidad de medida.

Tabla 1. Variables del estudio

Variables	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad de medida
Irradiación	Independiente	Cuantitativa	Gray (Gy)
Nº de Células irradiadas	Independiente	Cuantitativa	Células/mL
Nº Exosomas	Dependiente	Cuantitativa	Microvesículas/mL
Exosomas en células receptoras	Independiente	Cuantitativa	Microvesículas/mL
Muerte celular de células receptoras	Dependiente	Cuantitativa	Nº células muertas/mL
Expresión relativa de transcritos BCL 2 y W	Dependiente	Semicuantitativa	Relative Fold change (veces de cambio en niveles de expresión)

Fuente: Elaboración propia.

Líneas celulares

- HCT-116, línea celular de carcinoma colorrectal humano de fenotipo adherente.
- CCD841CoN, línea celular de tejido de colon normal humano.

Cultivo Celular

Células HCT-116 y CCD841CoN cultivadas en medio RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino, Penicilina G-Estreptomicina, incubadas a 37°C con 5% de CO₂. Triptinizadas al alcanzar el 80-90% de confluencia. Día previo a la irradiación, 5x10⁵ células HCT-116 sembradas en placa de 100mm en medio RPMI-1640 con 10% SFB. 24 horas post-irradiación, se recolectó el medio de células HCT-116 para la purificación de exosomas.

Subcultivo celular

Alcanzada una confluencia entre 80-90%, las células CCD841CoN fueron subcultivadas. Se eliminó el medio de cultivo de las placas, se lavaron con 2 mL de PBS al 1X y se incubaron con 1 mL de Tripsina por 1 minuto. Las células fueron resuspendidas en 4mL de medio RPMI-1640 y

centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm. Por último, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio RPMI-1640.

Irradiación

Previo a la irradiación, 10 placas fueron sembradas con $1,3 \times 10^5$ células por placa, en medio RPMI-1640 más suplementos. Una hora antes de la irradiación, el medio de las placas fue eliminado y reemplazado por medio RPMI-1640 sin suplementos. Posteriormente las células fueron irradiadas en un acelerador lineal (X1870940, Philips, Holanda) en la Comisión Chilena de Energía Nuclear usando una tasa de 0,6 Gy/min (10 mA, 180 kVt).

Purificación exosomas

El sobrenadante se centrifugó a 2.000 g durante 10 minutos, eliminando el pellet y luego a 12.000 g durante 10 minutos. Tras filtrar a través de filtros de 0,2 μm , se concentraron las muestras a 5.000 g durante 5 minutos a 4°C usando unidades de filtro Amicon Ultra-15. Se recogieron volúmenes entre 250-500 μL en cada centrifugación. Los tubos almacenados fueron ultracentrifugados a 120.000 g durante 2 horas a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en PBS filtrado y se almacenó a -80°C. La caracterización de microvesículas y pureza de exosomas se realizó en NanoSight midiendo tamaño y concentración de partículas en muestras diluidas 1:500 con PBS filtrado. Se seleccionaron para estudio los purificados con mayor concentración de partículas de tamaño entre 30-150 nm.

Incubación con exosomas

Se realizó un cultivo celular de líneas receptoras CCD841CoN en placas well de 24 pocillos y 24 hrs luego se incubaron 1×10^7 exosomas en 10 μL de PBS por pocillo. Los resultados de muerte celular se observaron a las 24, 48 y 72 horas post-incubación con los exosomas.

Conteo de viabilidad y muerte celular

Se mezclaron 10 μL de suspensión celular con 10 μL de azul de tripán (0,4%). Luego, se transfirieron 10 μL de la mezcla a un cubreobjeto para el equipo LUNA-FLTM y se contaron automáticamente. Las células azules se registraron como muertas y las incoloras como vivas.

Extracción de ARN

Se sembraron 20×10^3 células CCD841CoN por pocillo en placas de 6 well, se incubaron con exosomas irradiados y no irradiados durante 24 horas. Posteriormente se realizó la extracción de ARN total en columnas de sílica con GenElute™ Total Purification Kit, con el protocolo de lisado para cultivo celular monocapa, por indicaciones del fabricante y se almacenó a -80°C.

RT-qPCR y Cuantificación relativa

ADNc generado con ImProm II™ Reverse Transcription System, utilizando Oligos dt y almacenado a -20°C. Evaluación de BCL-W y BCL-2 mediante qPCR con Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix en sistema AriaMX. Perfil térmico: ciclo inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos con desnaturalización a 95°C, hibridación a 55°C y extensión a 72°C, cada uno por 30 segundos. Para cuantificar la expresión relativa de cada transcrito se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ y como gen normalizador se utilizaron los niveles de expresión de 18s.

Tabla 2. Primers utilizados

BCL-2 F-GTATTGTGGCTGCACTTGCT3'	BCL-W F-ACCAAATTGGCCCTCAGGTGT 3'
BCL-2 R-CTCTGTTGCCCACTGCAAA3	BCL-W R-GCTCTGCCAAGCAGTTTGAA 3'

Fuente: Elaboración propia.

Estadísticas del estudio

Los resultados se expresan como media, moda y desviación estándar, obtenidos de al menos 3 experimentos independientes. Se aceptó una significancia estadística $P < 0,05$, calculada a partir de prueba T student. Los gráficos y análisis fueron realizados en el programa GraphPad Prism 8.0.

RESULTADO

Caracterización de exosomas

Para determinar el impacto de los exosomas en la muerte de células sanas, las células HCT-116 fueron expuestas a dosis de 0,6 Gy de radiación. El sobrenadante de las células irradiadas y no irradiadas fue filtrado y ultracentrifugado para obtener exosomas. La caracterización de la población de micropartículas, se realizó mediante un análisis de tamaño (Figura 1, A y B).

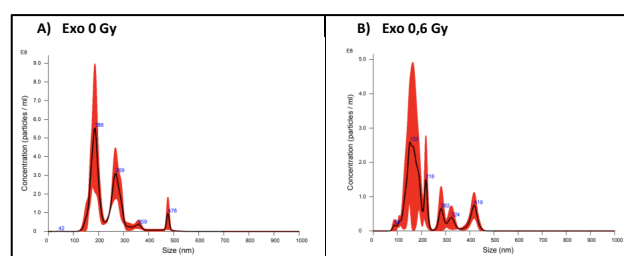


Figura 1. Caracterización de exosomas por tamaño: los exosomas obtenidos de células no irradiadas A) Mostraron una concentración de $8,49 \times 10^{10}$ partículas/ml y moda de 186 nm para el tamaño. B) Presentan una concentración y moda de tamaño de $2,36 \times 10^{10}$ partículas/ml y 152 nm.

Exosomas provenientes de células HCT-116 irradiadas promueven la muerte celular en células de tejido de colon normal

Las células receptoras fueron incubadas con exosomas de células donantes no irradiadas e irradiadas a 0,6 Gy. Aquellas incubadas con exosomas de células no irradiadas mantuvieron una media porcentual constante a lo largo del tiempo. En contraste, se registró un aumento significativo en el

porcentaje de muerte celular en los cultivos incubados con exosomas de células irradiadas a lo largo del tiempo (Figura 2).

Exosomas provenientes de células HCT-116 irradiadas median una tendencia a la baja en la expresión del marcador anti-apoptótico BCL-W

Se evaluaron los genes antiapoptóticos BCL-2 y BCL-W para analizar el tipo de muerte celular mediado por exosomas. Tras la incubación de las células receptoras con exosomas de grupos irradiados y no irradiados durante 24 horas, se observó que las células receptoras incubadas con exosomas del grupo 0 Gy mantuvieron niveles constantes de los transcritos, superiores al grupo tratado con exosomas de células irradiadas. En el grupo de células receptoras incubadas con exosomas irradiados a 0,6 Gy, se evidenció una disminución de los transcritos antiapoptóticos, especialmente BCL-W, en congruencia con los resultados de muerte celular. Aunque no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 2, A y B).

celular a través del tiempo en células CCD841CoN. Aunque los transcritos antiapoptóticos no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control, se observa una clara tendencia que podría sugerir un rol de la vía apoptótica en la muerte celular observada. Sin embargo, hay variables a considerar, como los niveles de radiación utilizados, purificación de exosomas, caracterización de la respuesta celular, entre otros.

La radiación utilizada en los cultivos celulares es clave al momento de evaluar una respuesta celular. En el presente estudio se tomó como punto de partida evaluar el efecto de exosomas provenientes de células irradiadas a 0,6 Gy, ya que Andaur et al concluyeron que dosis bajas de radiación ionizante (RI), entre ellas 0,6 Gy, reducen la viabilidad celular en células de CCR DLD-1. En adición, proponen que diferentes dosis de RI inducen expresión diferencial de microARN, de los cuales, miR-205p tuvo un rol particular al aumentar la sensibilidad de las células a dosis bajas de radiación, pudiendo ser un objetivo de estudio en los exosomas provenientes de células irradiadas a 0,6 Gy, considerando un posible efecto en las células receptoras²¹.

La ultracentrifugación es la técnica principal para aislar exosomas, pero su aplicación conlleva problemas como la necesidad de grandes volúmenes de muestra, riesgo de contaminación proteica, baja eficiencia, pérdida de muestra y pureza reducida de exosomas²². Además, las altas velocidades de centrifugación pueden dañar los exosomas, disminuyendo su actividad biológica²³. Los exosomas obtenidos de células HCT-116 irradiadas y no irradiadas mediante ultracentrifugación mostraron resultados variables, tanto en pureza como rendimiento en el número de partículas, pese a la estandarización de los procesos de obtención de exosomas en este estudio. La calidad del cultivo, dosis de radiación, capacidad de producción de exosomas por la línea celular HCT-116 y el proceso de ultracentrifugación, pueden influir en los resultados. Mansourabadi et al concluyeron que la producción y calidad de los exosomas de HCT-116 dependen de la calidad del cultivo²⁴, medida por la cantidad de células obtenidas y su viabilidad, en consonancia con nuestros hallazgos. Dada la variabilidad, se sugiere apoyar la extracción/purificación de exosomas con técnicas como microscopía electrónica de transmisión y citometría de flujo para la caracterización exosomal con marcadores como CD62 y CD81.

Se observó que la muerte celular en CCD81CoN, incubadas con exosomas de HCT-116 irradiadas, aumentó proporcionalmente con el tiempo de exposición. De acuerdo con Wan et al., las micropartículas, incluyendo exosomas, liberadas por células irradiadas, como la línea HCT-116, inducen la

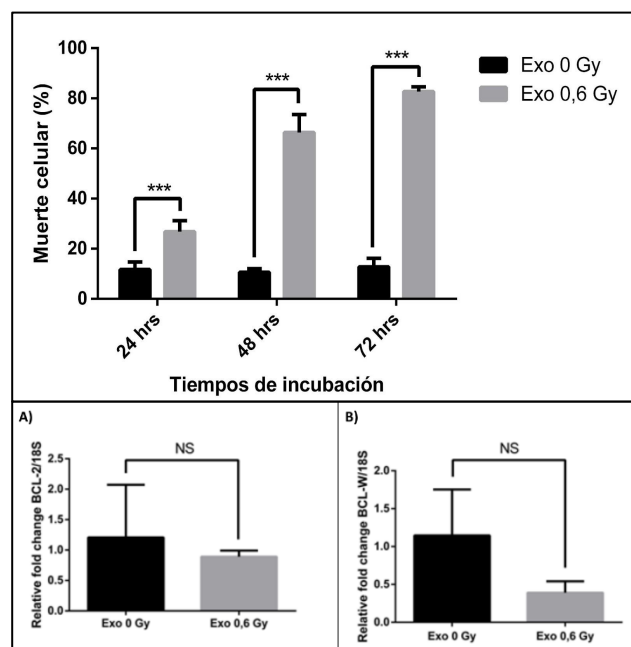


Figura 2. Exosomas provenientes de células de cáncer de colon irradiadas HCT-116 (Exo 0,6 Gy) promovieron la muerte celular de forma progresiva a través del tiempo: las células de colon incubadas con exosomas de células no irradiadas (Exo 0 Gy) presentaron una media porcentual similar a lo largo del tiempo, con valores de muerte celular a las 24, 48 y 72 hrs de 11,7, 10,6 y 12,8% respectivamente. Por otra parte, se observó un aumento significativo en el porcentaje de muerte celular en los cultivos incubados con exosomas de células irradiadas, con una media porcentual de muerte celular del 26,8, 66,4 y 82,7% a las 24, 48 y 72 horas respectivamente. La diferencia fue estadísticamente significativa entre ambos grupos con un $P < 0,001$ en todos los tiempos evaluados. **Expresión relativa de transcritos antiapoptóticos:** se observa que los exosomas provenientes de células donantes HCT-116 irradiadas con 0,6 Gy, mediaron una tendencia a la baja de los marcadores antiapoptóticos BCL-2 (A) y BCL-W (B). ($P > 0,05$).

DISCUSIÓN

Los resultados demuestran que los exosomas liberados por células irradiadas inducen muerte

muerte celular por ferroptosis. Además, sugieren que las micropartículas de células tumorales irradiadas a 20 Gy, combinadas con anticuerpos monoclonales Anti-PD1, tienen efectos antitumorales y generan respuesta inmune de memoria en modelos murinos de cáncer pulmonar con derrame pleural maligno²⁵. A su vez, Hu et al concluyeron en modelos in-vivo e in-vitro, que las células CD34+ derivadas de cordón umbilical humano trasplantadas en modelos murinos NOG (NOD/Shi-scid/IL-2R γ nl) y células de médula ósea humana, previamente irradiados disminuyeron su ciclo celular y aumentaron la apoptosis, en comparación al grupo no irradiado, atribuyendo este efecto a ROS²⁶.

BCL-2, es una proteína antiapoptótica²⁷, que se vincula con la supervivencia celular, cuya disminución está asociada con apoptosis, demostrado en células de cáncer de colon tratadas con β -glucano²⁸. BCL-W, también antiapoptótica²⁹, se asocia con la formación y progresión del cáncer. Dado que la expresión elevada de BCL-W, combinada con otros oncogenes, contribuyen a la aparición de tumores³⁰. Los resultados de la presente investigación indican una tendencia a la baja, coherente con el papel de BCL-2 y BCL-W en la apoptosis, particularmente en BCL-W. Esto sugiere un posible efecto de exosomas de células cancerosas irradiadas en la inducción de apoptosis en células normales no irradiadas. Se requiere más investigación en los mecanismos de señalización, composición de exosomas y su impacto en el microambiente tumoral o a distancia.

El tamaño de muestra es una limitación del presente estudio, la que puede estar relacionada con las ligeras diferencias observadas en los marcadores BCL-2 y BCL-W. Para futuras investigaciones, también se sugiere ampliar el análisis a marcadores pro y antiapoptóticos, microARN, caracterización detallada de microvesículas y secuenciación genética de exosomas. Se destaca la importancia de establecer dosis de radiación precisas para inducir apoptosis en células cancerosas sin afectar las no tumorales circundantes.

CONCLUSIÓN

Los exosomas de células de CCR donantes inducen el Bystander Effect, generando un notorio impacto en células receptoras, provocando muerte celular de forma progresiva en el tiempo de exposición, con una marcada tendencia a la baja del marcador antiapoptótico BCL-W. Por ende, los resultados obtenidos permitieron confirmar la hipótesis planteada, donde se expresa que los exosomas de células HCT-116 irradiadas inducen muerte a las células receptoras que no fueron expuestas a radiación.

La radiación ionizante cumple un rol fundamental en el tratamiento del cáncer, no obstante, sus efectos adversos se deben seguir estudiando, con el afán de

aumentar la posibilidad de una mejor calidad de vida post radioterapia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Salud de Chile. Guía de Práctica Clínica - Problema de salud AUGE N° 70 Cáncer Colorrectal en personas de 15 años y más 2018 [Internet]. Santiago: Subsecretaría de Salud Pública; 2019 [citado el 15 de noviembre 2023]. Disponible en: <http://diprece.minsal.cl/le-informamos/auge/acceso-guias-clinicas/guias-clinicas-desarrolladas-utilizando-manual-metodologico/>
2. Folkesson J, Birgisson H, Pahlman L, Cedermark B, Glimelius B, Gunnarsson U. Swedish Rectal Cancer Trial: Long Lasting Benefits From Radiotherapy on Survival and Local Recurrence Rate. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 [citado el 15 de noviembre 2023];23(24):5644-50. Disponible en: <https://doi.org/10.1200/jco.2005.08.144>
3. Birgisson H, Pahlman L, Gunnarsson U, Glimelius B. Adverse Effects of Preoperative Radiation Therapy for Rectal Cancer: Long-Term Follow-Up of the Swedish Rectal Cancer Trial. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 [citado el 15 de noviembre 2023];23(34):8697-705. Disponible en: <https://doi.org/10.1200/jco.2005.02.9017>
4. Burdak-Rothkamm S, Rothkamm K. Radiation-induced bystander and systemic effects serve as a unifying model system for genotoxic stress responses. *Mutat Res* [Internet]. 2018 [citado el 15 de noviembre 2023];778:13-22. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.08.001>
5. Buonanno M, De Toledo SM, Howell RW, Azzam EI. Low-dose energetic protons induce adaptive and bystander effects that protect human cells against DNA damage caused by a subsequent exposure to energetic iron ions. *J Radiat Res (Tokyo)* [Internet]. 2015 [citado el 15 de noviembre 2023];56(3):502-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jrr/rrv005>
6. Wang X, Zhang J, Fu J, Wang J, Ye S, Liu W, et al. Role of ROS-mediated autophagy in radiation-induced bystander effect of hepatoma cells. *Int J Radiat Biol* [Internet]. 2015 [citado el 15 de noviembre 2023];91(5):452-8. Disponible en: <https://doi.org/10.3109/09553002.2015.1012308>
7. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci* [Internet]. 2019 [citado el 15 de noviembre 2023];9(1):19. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>
8. Mothersill C, Rusin A, Fernandez-Palomo C, Seymour C. History of bystander effects research 1905-present; what is in a name? *Int J Radiat Biol* [Internet]. 2018 [citado el 15 de noviembre 2023];94(8):696-707. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1398436>
9. American Cancer Society. Tratamiento del cáncer de colon según la etapa [Internet]. USA: ACS; 2023 [citado el 15 de noviembre 2023]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/por-etapas-colon.html>
10. Fernandez-Palomo C, Seymour C, Mothersill C. Inter-Relationship between Low-Dose Hyper-Radiosensitivity and Radiation-Induced Bystander Effects in the Human T98G Glioma and the Epithelial

- HaCaT Cell Line. *Radiat Res* [Internet]. 2016 [citado el 15 de noviembre 2023];185(2):124-33. Disponible en: <https://doi.org/10.1667/rr14208.1>
11. Cherubini R, De Nadal V, Gerardi S, Guryev D. Lack of hyper-radiosensitivity and induced radioresistance and of bystander effect in V79 cells after proton irradiation of different energies. *Radiat Prot Dosimetry* [Internet]. 2011 [citado el 15 de noviembre 2023];143(2-4):315-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/rpd/ncq406>
 12. Mohye El-Din AA, Abdelrazzak AB, Ahmed MT, El-missiry MA. Radiation induced bystander effects in the spleen of cranially-irradiated rats. *Br J Radiol* [Internet]. 2017 [citado el 15 de noviembre 2023];90(1080):20170278. Disponible en: <https://doi.org/10.1259/bjr.20170278>
 13. Drozdovitch V, Minenko V, Golovanov I, Khrutchinsky A, Kukhta T, Kutsen S, et al. Thyroid Dose Estimates [Internet] for a Cohort of Belarusian Children Exposed to 131 I from the Chernobyl Accident: Assessment of Uncertainties. *Radiat Res* [Internet]. 2015 [citado el 15 de noviembre 2023];184(2):203-18. Disponible en: <https://doi.org/10.1667/rr13791.1>
 14. Mladenov E, Li F, Zhang L, Klammer H, Iliakis G. Intercellular communication of DNA damage and oxidative status underpin bystander effects. *Int J Radiat Biol* [Internet]. 2018 [citado el 15 de noviembre 2023];94(8):719-26. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1434323>
 15. Buonanno M, de Toledo SM, Azzam EI. Increased Frequency of Spontaneous Neoplastic Transformation in Progeny of Bystander Cells from Cultures Exposed to Densely Ionizing Radiation. Santos J, editor. *PLoS ONE* [Internet]. 2011 [citado el 15 de noviembre 2023];6(6):e21540. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021540>
 16. Little JB, Nagasawa H, Li GC, Chen DJ. Involvement of the Nonhomologous End Joining DNA Repair Pathway in the Bystander Effect for Chromosomal Aberrations. *Radiat Res* [Internet]. 2003 [citado el 15 de noviembre 2023];159(2):262-7. Disponible en: [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2003\)159\[0262:iotnej\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2003)159[0262:iotnej]2.0.co;2)
 17. Watson GE, Lorimore SA, Macdonald DA, Wright EG. Chromosomal instability in unirradiated cells induced in vivo by a bystander effect of ionizing radiation. *Cancer Res* [Internet]. 2000 [citado el 15 de noviembre 2023];60(20):5608-11. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11059747/>
 18. Wang R, Zhou T, Liu W, Zuo L. Molecular mechanism of bystander effects and related abscopal/cohort effects in cancer therapy. *Oncotarget* [Internet]. 2018 [citado el 15 de noviembre 2023];9(26):18637-47. Disponible en: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24746>
 19. Nagasawa H, Little JB. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res* [Internet]. 1992 [citado el 15 de noviembre 2023];52(22):6394-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1423287/>
 20. Balcer-Kubiczek EK, Eley JG. Secondary Malignancies in the Era of High-Precision Radiation Therapy. *Crit Rev Oncog* [Internet]. 2018 [citado el 15 de noviembre 2023];23(1-2):93-112. Disponible en: <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.2018025830>
 21. Andaur R, Tapia JC, Moreno J, Soto L, Armisen R, Marcelain K. Differential miRNA expression profiling reveals miR-205-3p to be a potential radiosensitizer for low- dose ionizing radiation in DLD-1 cells. *Oncotarget* [Internet]. 2018 [citado el 15 de noviembre 2023];9(41):26387-405. Disponible en: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25405>
 22. LeBleu VS, Kalluri R. Exosomes as a Multicomponent Biomarker Platform in Cancer. *Trends Cancer* [Internet]. 2020 [citado el 15 de noviembre 2023];6(9):767-74. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.03.007>
 23. Jeppesen DK, Hvam ML, Primdahl-Bengtson B, Boysen AT, Whitehead B, Dyrskjøt L, et al. Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2014 [citado el 15 de noviembre 2023];3(1):25011. Disponible en: <https://doi.org/10.3402/jev.v3.25011>
 24. Mansourabadi AH, Aghamajidi A, Faraji F, Taghizadeh S, Mohamed Khosroshahi L, Bahramkiya M, et al. Mesenchymal stem cells- derived exosomes inhibit the expression of Aquaporin-5 and EGFR in HCT-116 human colorectal carcinoma cell line. *BMC Mol Cell Biol* [Internet]. 2022 [citado el 15 de noviembre 2023];23(1):40. Disponible en: <https://doi.org/10.1186%2Fs12860-022-00439-0>
 25. Wan C, Sun Y, Tian Y, Lu L, Dai X, Meng J, et al. Irradiated tumor cell-derived microparticles mediate tumor eradication via cell killing and immune reprogramming. *Sci Adv* [Internet]. 2020 [citado el 15 de noviembre 2023];6(13):eaay9789. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay9789>
 26. Hu L, Yin X, Zhang Y, Pang A, Xie X, Yang S, et al. Radiation-induced bystander effects impair transplanted human hematopoietic stem cells via oxidative DNA damage. *Blood* [Internet]. 2021 [citado el 15 de noviembre 2023];137(24):3339-50. Disponible en: <https://doi.org/10.1182/blood.2020007362>
 27. Bruckheimer EM, Cho SH, Sarkiss M, Herrmann J, McDonnell TJ. The Bcl-2 gene family and apoptosis. En: Al-Rubeai M, editors. *Apoptosis* [Internet]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 1998 [citado el 15 de noviembre 2023]. p. 75-105. Disponible en: <https://link.springer.com/10.1007/BFb0102306>
 28. Kim MJ, Hong SY, Kim SK, Cheong C, Park HJ, Chun HK, et al. β -Glucan enhanced apoptosis in human colon cancer cells SNU-C4. *Nutr Res Pract* [Internet]. 2009 [citado el 15 de noviembre 2023];3(3):180. Disponible en: <https://doi.org/10.4162/nrp.2009.3.3.180>
 29. Cui J, Placzek W. Post-Transcriptional Regulation of Anti-Apoptotic BCL2 Family Members. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 [citado el 15 de noviembre 2023];19(1):308. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms19010308>
 30. Shen L, Li J, Xu L, Ma J, Li H, Xiao X, et al. miR-497 induces apoptosis of breast cancer cells by targeting Bcl-w. *Exp Ther Med* [Internet]. 2011 [citado el 15 de noviembre 2023];3(3):475-80. Disponible en: <https://doi.org/10.3892%2Fetm.2011.428>