

© 2023 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.  
Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).  
TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 26: 1-18, 2023.  
<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2023.575>

## La citocina TGF- $\beta$ en el cáncer colorrectal: mecanismos de acción y de secreción

M. Andrea Lara-Salas<sup>1</sup>, Pablo O. García-Díaz<sup>1</sup>, Daniel F. Mendoza-Lara<sup>2</sup>,  
Marcela Sosa-Garrocho<sup>1</sup>, Mitzi P. Pérez-Calixto<sup>1</sup>, A. Carolina Mota-López<sup>1</sup>,  
Gloria Soldevila<sup>3</sup>, Martha Robles-Flores<sup>4</sup> y Marina Macías-Silva<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, Alcaldía Coyoacán 04510, Ciudad de México. <sup>2</sup>Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72000, Puebla, México, <sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas y <sup>4</sup>Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, Alcaldía Coyoacán 04510, Ciudad de México. E-mail: \*mmaciass@ifc.unam.mx

### RESUMEN

El cáncer colorrectal (CRC) es uno de los más agresivos y letales en el humano, su incidencia aumenta por los malos hábitos alimenticios y un estilo de vida sedentario. Las alteraciones genómicas que afectan la función de diversas vías de señalización contribuyen al desarrollo de este tipo de cáncer. El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) es una citocina multifuncional con diversos efectos biológicos, incluido el control de la homeostasis tisular; sin embargo, los cambios inusuales en sus funciones favorecen el desarrollo de patologías como la fibrosis y el cáncer. En estadios tempranos del CRC, el TGF- $\beta$  ejerce efectos supresores de tumores, pero en etapas avanzadas promueve la progresión tumoral, por lo que es considerado un importante blanco terapéutico. Esta revisión describe y analiza los mecanismos potenciales de acción y de secreción de la citocina TGF- $\beta$  en el microambiente tumoral del CRC, y sus efectos biológicos sobre las líneas cancerosas humanas del CRC: SW480 (tumor primario) y SW620 (tumor metastásico), las cuales provienen del mismo paciente y muestran un alto grado de malignidad. Estas células se caracterizan por sintetizar y secretar altas cantidades de la citocina TGF- $\beta$ , expresan a los principales componentes de su vía de señalización como los receptores y sus efectores, con excepción de la proteína SMAD4; además se conoce parte de la composición de las vesículas extracelulares secretadas por estas células, así como sus efectos biológicos en diferentes células blanco, por lo que las células SW480 y SW620 representan un modelo biológico ideal para estudiar las acciones del TGF- $\beta$  en las etapas avanzadas del CRC.

**Palabras clave:** cáncer colorrectal, citocina TGF- $\beta$ , células SW480, células SW620, secreción.

### The cytokine TGF- $\beta$ in colorectal cancer: mechanisms of action and secretion.

### ABSTRACT

The colorectal cancer (CRC) is one of the most aggressive and lethal in humans; its incidence is increasing due to poor eating habits and a sedentary lifestyle. Genomic alterations affecting various signaling pathways contribute to this cancer development. The transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is a multifunctional cytokine that controls multiple biological effects, including the maintenance of tissue homeostasis; however, alterations in its mechanisms of action favor the development of pathologies such as fibrosis and cancer. In early stages of CRC, TGF- $\beta$  exerts tumor suppressive effects, whereas it promotes tumor progression in advanced stages, which is why it is considered an important therapeutic target. This review describes and analyzes the potential mechanisms of action and secretion of TGF- $\beta$  in the tumor microenvironment of CRC, focusing on the knowledge generated using human CRC cell lines: SW480 (primary tumor) and SW620 (metastatic tumor), which come from the same patient and are characterized by being very aggressive. These cells synthesize and secrete high levels of TGF- $\beta$ , and express the main components of its signaling pathway, such as receptors and effectors, with the exception of SMAD4 protein. Furthermore, this review is also focused on describing the composition of the extracellular vesicles secreted by SW480 and SW620 cells, and their biological effects on various types of target cells; thus, we propose that these cells can provide a model to study the mechanisms of action and secretion of TGF- $\beta$  cytokine in the later stages of CRC.

**Keywords:** colorectal cancer; TGF- $\beta$  cytokine; SW480 cells; SW620 cells; secretion.

## INTRODUCCIÓN

**E**l cáncer es una enfermedad provocada por las alteraciones genéticas de las células, que manifiestan un crecimiento descontrolado y resistencia a la muerte. Las células cancerosas presentan otras características adicionales distintivas que incluyen la inmortalidad, la evasión del sistema inmune, la adquisición de un metabolismo energético reprogramado, así como capacidades migratorias e invasivas, entre otras (Hanahan & Weinberg, 2011). En el cáncer, por ser una enfermedad genética, es común la activación de los oncogenes y/o la inhibición de los genes supresores de los tumores. El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ , del inglés *Transforming Growth Factor-beta*) en un supresor tumoral importante por su habilidad para inhibir la proliferación de las células y causar su muerte; sin embargo, las células malignas adquieren resistencia a estas acciones del TGF- $\beta$  y provocan incluso un cambio en sus acciones en las etapas avanzadas del cáncer al adquirir efectos pro-tumorales y favorecer la metastásis (David & Massagué, 2018); además ejerce un papel dual en la mayoría de los tipos de cáncer, como supresor tumoral en las etapas iniciales y como promotor tumoral en las etapas avanzadas. En general, al TGF- $\beta$  se le considera como el principal guardián de la homeostasis en los epitelios y cualquier alteración en sus mecanismos de acción conduce al desarrollo de patologías como la fibrosis y el cáncer, tema central de varios estudios.

## GENERALIDADES DEL CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal (CRC, del inglés *colorectal cancer*) surge por la aparición de mutaciones en algunos protooncogenes, en genes supresores de tumores y en genes asociados con los mecanismos de reparación del ácido desoxirribonucleico (DNA, del inglés *Deoxyribonucleic Acid*) (Fearon & Vogelstein, 1990). Al CRC se le clasifica por el origen de sus alteraciones genéticas en: 1) esporádico (70%); 2) familiar (25%); y 3) hereditario (5-10%) (Bogaert & Prenen, 2014). Diversas alteraciones genéticas y epigenéticas conducen a la transformación neoplásica progresiva del epitelio intestinal; a este evento se le conoce como secuencia del adenocarcinoma (Fearon & Vogelstein, 1990; Grady & Markowitz, 2002). El CRC es uno de los cánceres más comunes en el mundo, con entre uno y dos millones de casos nuevos diagnosticados anualmente, lo que lo convierte en el tercer cáncer en incidencia y el segundo en mortalidad, con casi 1 millón de muertes por año (Globocan, 2020). Además, el CRC es el segundo tipo de cáncer más común en las mujeres (9.2%) y el tercero en los hombres (10%), con una tendencia al aumento (Bray *et al.*, 2018). El CRC avanzado hace metastasis principalmente en el hígado y en el pulmón, con pronóstico de supervivencia muy bajo en las etapas avanzadas.

La inestabilidad genómica es una característica fundamental del CRC y se manifiesta en tres tipos principales: 1) inestabilidad cromosómica (CIN, del inglés *Chromosomal Instability*), 2) inestabilidad de microsátélites (MSI, del inglés *Microsatellite*

*Instability*) y 3) el fenotipo metilador de islas CpG (CIMP, del inglés *CpG Island Methylator Phenotype*). La CIN representa la causa del 80% al 85% de todos los casos de CRC con desequilibrios en el número de cromosomas, lo que conduce al desarrollo de tumores aneuploídicos y a la pérdida de heterocigosidad (LOH, del inglés *Loss of heterozygosity*) (Pino & Chung, 2010). Las alteraciones genómicas que ocurren en el CRC afectan la función de diversas vías de señalización, aunque la activación aberrante de la vía de señalización canónica WNT/ $\beta$ -CATENINA es un sello distintivo de la mayoría de los cánceres de colon. Cabe mencionar que el 60% de los carcinomas esporádicos y de los adenomas familiares presentan mutaciones en el gen supresor tumoral APC (*adenomatous polyposis coli*), un modulador negativo de la vía WNT canónica. Estudios genéticos han demostrado que las mutaciones en este gen son el evento inicial en el desarrollo de la tumorigénesis intestinal (Sansom *et al.*, 2004). Las aberraciones genómicas pueden afectar también a otras vías de señalización muy importantes, como: MAPK (del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinases*), PI3K (del inglés, *PhosphoInosite-3 Kinases*), P53 y la vía del TGF- $\beta$  (The Cancer Genome Atlas Network, 2012).

La clasificación del CRC más reciente, en los subtipos moleculares consenso (CMS, del inglés *Consensus Molecular Subtype*), se basa en las siguientes características moleculares: 1) El tipo CMS1 (14%) incluye tumores con hipermutaciones, en su mayoría contienen MSI y exhiben una fuerte infiltración de células del sistema inmune; 2) El tipo CMS2 (37%) son tumores que se caracterizan por la activación de las vías WNT y MYC; 3) El tipo CMS3 (13%) son tumores con mutaciones frecuentes en KRAS y con un metabolismo desregulado; y 4) El tipo CMS4 (23%) presenta tumores con células tipo mesenquimales y una alta activación de la vía de señalización de la citocina TGF- $\beta$ , además de un incremento en la angiogénesis, la activación del sistema inmunológico y la infiltración de células cancerosas al estroma (Dienstmann *et al.*, 2017) (Cuadro 1). Cabe mencionar que al predominar un microambiente tumoral enriquecido con la citocina TGF- $\beta$  en los tumores del CRC tipo CMS4, se genera un ambiente inmunosupresor asociado con una gran actividad angiogénica y por lo tanto, se le considera como uno de los tumores más agresivos y con el peor pronóstico (Hao, Baker & Ten Dijke, 2019; Okita *et al.*, 2018). Es importante mencionar que hay un 13% de casos de CRC que no se pueden clasificar dentro de alguno de los subtipos CMS en particular, se les conoce como mixtos por una mezcla de sus características (Dienstmann *et al.*, 2017).

## GENERALIDADES DE LA CITOCINA TGF- $\beta$

La familia de la citocina TGF- $\beta$  consta de poco más de 30 miembros en el ser humano: las tres isoformas del TGF- $\beta$ , las proteínas formadoras de hueso (BMP, del inglés *Bone Morphogenetic Proteins*), los factores de diferenciación y crecimiento (GDF, del inglés *Growth Differentiation Factors*), las activinas, las inhibinas, nodal y la sustancia inhibidora

CMS1 (14%) - INMUNE	CMS2 (37%) - CANÓNICO
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Presencia de hipermutaciones:</b> BRAF, en islas CpG,</li> <li>• <b>Inestabilidad microsatelital</b></li> <li>• <b>Fuerte Activación del Sistema Inmune:</b> Infiltración de las células inmunes: T CD8, T CD4, Th1, NK y los macrófagos M1</li> <li>• Líneas celulares tipo mesenquimales</li> <li>• Tumores principalmente del lado derecho del colon</li> <li>• Tumores enriquecidos en <i>Fusobacterium</i>, <i>Porphyromonas</i> y <i>Peptostreptococcus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Características Epiteliales</b></li> <li>• <b>Activación de las vías WNT y MYC</b></li> <li>• Pobre respuesta intratumoral, bajos niveles de linfocitos, monocitos, etc.</li> <li>• Líneas celulares tipo epiteliales</li> <li>• Apoptosis inducida por sensibilidad a quimioterapia</li> <li>• Tumores enriquecidos en especies de <i>Selenomonas</i> y <i>Prevotella</i></li> </ul>
CMS3 (13%) - METABÓLICO	CMS4(23%) - MESENQUIMAL
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Características Epiteliales</b></li> <li>• Frecuentes mutaciones en KRAS</li> <li>• <b>Metabolismo desregulado</b></li> <li>• Pobre infiltración de las células inmunes</li> <li>• Líneas celulares tipo epiteliales</li> <li>• Tumores principalmente del lado derecho del colon</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Características Epitelio-mesenquimales</b></li> <li>• <b>Prominente activación de la vía del TGFβ</b></li> <li>• <b>Incremento en angiogénesis</b></li> <li>• Presencia de factores angiogénicos: TGFβ, CXCL12 y VEGF</li> <li>• Activación del sistema inmunológico: alta infiltración de linfocitos, monocitos y macrófagos</li> <li>• <b>Fuerte infiltración de células cancerosas al estroma</b></li> <li>• Expresión disminuida de la familia del miR-200</li> <li>• Líneas celulares tipo mesenquimales</li> <li>• Apoptosis inducida por sensibilidad a la quimioterapia</li> </ul>

Cuadro 1. Clasificación del Cáncer colorrectal (CRC) por subtipo molecular consenso (CMS).

Muleriana (MIS, del inglés *Mullerian Inhibiting Substance*) (Morikawa, Derynck & Miyazono, 2016). Los miembros de la familia del TGF-β regulan múltiples funciones celulares en condiciones normales y tienen un papel importante en muchas patologías, como la autoinmunidad, la fibrosis y el cáncer. El TGF-β, como se mencionó, es uno de los inhibidores de la proliferación celular más importantes, principalmente de las células epiteliales, las células endoteliales, las células hematopoyéticas y las células inmunes. Sin embargo, algunos de los miembros de la familia del TGF-β pueden inducir a la proliferación celular, pero esto depende del tipo y del contexto celular. La familia del TGF-β también regula la diferenciación de diversos tipos celulares en el desarrollo embrionario y en la reparación de los tejidos. Además, estos factores causan o protegen contra la muerte celular, regulan el metabolismo, inducen la expresión de las proteínas de la matriz extracelular (ECM, del inglés, *Extracellular Matrix*) y promueven la motilidad e invasión celular (Morikawa *et al.*, 2016), pero siempre de manera dependiente del contexto celular. En condiciones patológicas, la familia del TGF-β ejerce funciones, también, importantes en el desarrollo de la fibrosis y el cáncer. Además, el TGF-β facilita la angiogénesis y suprime las acciones del sistema inmune, lo que contribuye a sus efectos protumorales (David & Massagué, 2018).

La citocina TGF-β activa a su vía de señalización canónica, al unirse a un par de receptores transmembranales con actividad

de cinasa de residuos de serina y treonina (David & Massagué, 2018). Esta citocina se une primero al receptor tipo II llamado TβRII (del inglés *TGF-β Receptor II*), que recluta al receptor tipo I conocido como TβRI o ALK5 (del inglés, *Activin-Like Kinase 5*) y lo activa por medio de la fosforilación de algunos residuos de serina y treonina en el dominio GS, un sitio rico en glicinas y serinas (Wrana, Attisano, Wieser, Ventura & Massagué, 1994). El betaglicano es un proteoglicano transmembranal conocido también como TβRIII o receptor tipo III, que favorece en algunos tipos celulares la unión del TGF-β al receptor TβRII, como por ejemplo en las células endoteliales (López-Casillas, Wrana & Massagué, 1993). La vía de señalización canónica del TGF-β incluye la fosforilación de las proteínas SMAD, que son factores transcripcionales conservados evolutivamente (Figura 1). En respuesta al TGF-β, el TβRI o ALK5 fosforila a las proteínas SMAD2 y SMAD3 (R-SMAD o reguladas por el receptor), en las últimas dos serinas del motivo conservado SSXS de su extremo carboxilo terminal (Macías-Silva *et al.*, 1996; Abdollah *et al.*, 1997). Las R-SMAD fosforiladas se asocian con el mediador común SMAD4 (Co-SMAD) para formar un complejo trimérico que es translocado al núcleo. Los complejos R-SMAD/SMAD4 se asocian de manera directa con el DNA o en asociación con otras proteínas, como factores de transcripción, coactivadores y correpresores, reconociendo en el DNA a los elementos de unión a las SMAD (SBE, del inglés *Smad Binding Elements*) que se localizan principalmente en los promotores de los genes que responden al TGF-β (David &



Massagué, 2018; Tecalco-Cruz, Rios-Lopez, Vazquez-Victorio, Rosales-Alvarez & Macías-Silva, 2018).

El TGF- $\beta$  activa también a otras vías de señalización independientes de las proteínas SMAD, denominadas vías no canónicas, que incluyen a las vías de MAPK, como las cinasas SAPK (del inglés, *Stress-activated Protein Kinase*), las cinasas JNK (del inglés, *Jun N-terminal Kinase*) y las cinasas ERK (del inglés, *Extracellular signal-Regulated Kinase*); también a la vía de la cinasa de lípidos PI3K y a algunas GTPasas de la familia de proteínas G pequeñas como RAS, RHO y RAC (David & Massagué, 2018) (Figura 1). En la Tabla I, se enlistaron los nombres de diversas proteínas y sus funciones, que presentan alguna relación con la vía del TGF- $\beta$  y que son mencionadas en esta revisión.

Aún cuando el TGF- $\beta$  es un inhibidor del crecimiento epitelial en los tejidos normales y promueve la progresión del cáncer.

La vía de señalización del TGF- $\beta$  produce un marcado arresto del ciclo celular en las células sanas y en las células cancerosas en estadios tempranos, como supresor tumoral. Sin embargo, en el contexto de muchos tipos de cáncer se ha observado una expresión elevada del TGF- $\beta$  y la activación de las proteínas SMAD (David & Massagué, 2018), lo que inicia el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés *Epithelial to Mesenchymal Transition*), de manera que las células epiteliales pierden su polaridad apico-basal y su adhesión, al adquirir las características de las células mesenquimales motiles. La EMT es un proceso crucial para las células tumorales, ya que se ha asociado con la resistencia a la quimioterapia y con la evasión de la vigilancia por parte del sistema inmune (Nieto, Huang, Jackson & Thiery, 2016). Asimismo, el TGF- $\beta$  es producido, con frecuencia, en grandes cantidades por las células estromales del tumor y, a su vez, estimula la angiogénesis, la troncalidad y la EMT, y suprime al sistema inmunológico, hecho que apoya la progresión del

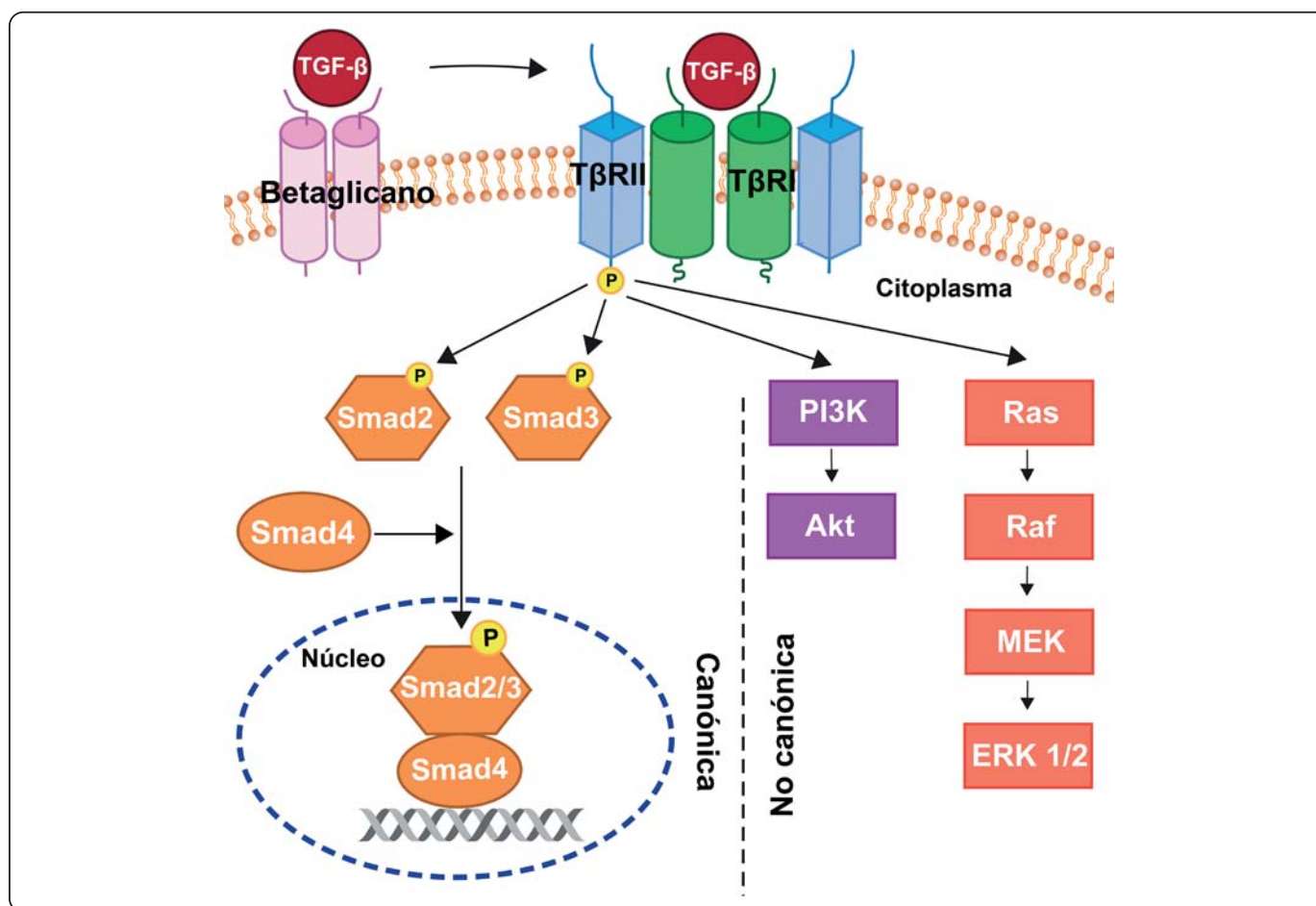


Figura 1. Vías de señalización canónica y no canónica del TGF- $\beta$ . El TGF- $\beta$  activo se une al receptor T $\beta$ RII que recluta y fosforila al receptor T $\beta$ RI para favorecer su actividad de cinasa de residuos de serina y treonina. El T $\beta$ RI fosforila a las proteínas SMAD2 y SMAD3 que forman un complejo con la SMAD4 para translocarse al núcleo y se dé la transcripción de sus genes blanco. Además, de esta señalización canónica via las SMAD, el TGF- $\beta$  puede señalizar a través de las vías no canónicas, como la de MAPK y la de PI3K. Creada con Adobe Illustrator.

**Tabla I. Proteínas que regulan o son reguladas por el TGF-β.**

Proteínas	Funciones
Betaglicano	Receptor tipo 3 del TGF-β funciona como co-receptor para transducir las señales de la citocina.
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i> : Cinasa de serinas y treoninas que modifican por fosforilación a las proteínas Smad o bien ser activadas por el TGF-β.
ITGA5	Integrina α5: Moléculas de adhesión que activan al TGF-β
ITGA6	Integrina αV: Moléculas de adhesión que activan al TGF-β
ITGB1	Integrina β1: Moléculas de adhesión que activan al TGF-β
ITGB1	Integrina β6: Moléculas de adhesión que activan al TGF-β
ITGB6	Integrina β8: Moléculas de adhesión que activan al TGF-β
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i> : Cinasas de serinas y treoninas que modifican por fosforilación a las proteínas Smad o ser activadas por el TGF-β.
PI3K/AKT	<i>Phosphatidylinositol-3 kinase/AKT</i> : PI3K es una cinasa de fosfolípidos activada por el TGF-β para generar PIP3 y así activar a la cinasa de proteínas AKT.
RAF	Cinasa de serinas y treoninas que activa igual a MEK por fosforilación como a ERKs, para fosforilar a las proteínas Smad, o ser activada por el TGF-β.
RAS	Proteína G pequeña con actividad de GTPasa activada por el TGF-β.
SMAD2,3,4	Factores transcripcionales regulados por la vía del TGF-β
SMAD7	Proteína que une al receptor tipo I para inhibir la vía del TGF-β
TGIF	Corregulador transcripcional que se asocia con las proteínas Smad para regular la vía del TGF-β
TβRI	<i>TGF-β receptor type I</i> : Receptor activado por el TGF-β
TβRII	<i>TGF-β receptor type II</i> : Receptor activado por el TGF-β

cáncer por un cambio en las acciones del TGF-β, de supresor a promotor de tumores (David & Massagué, 2018).

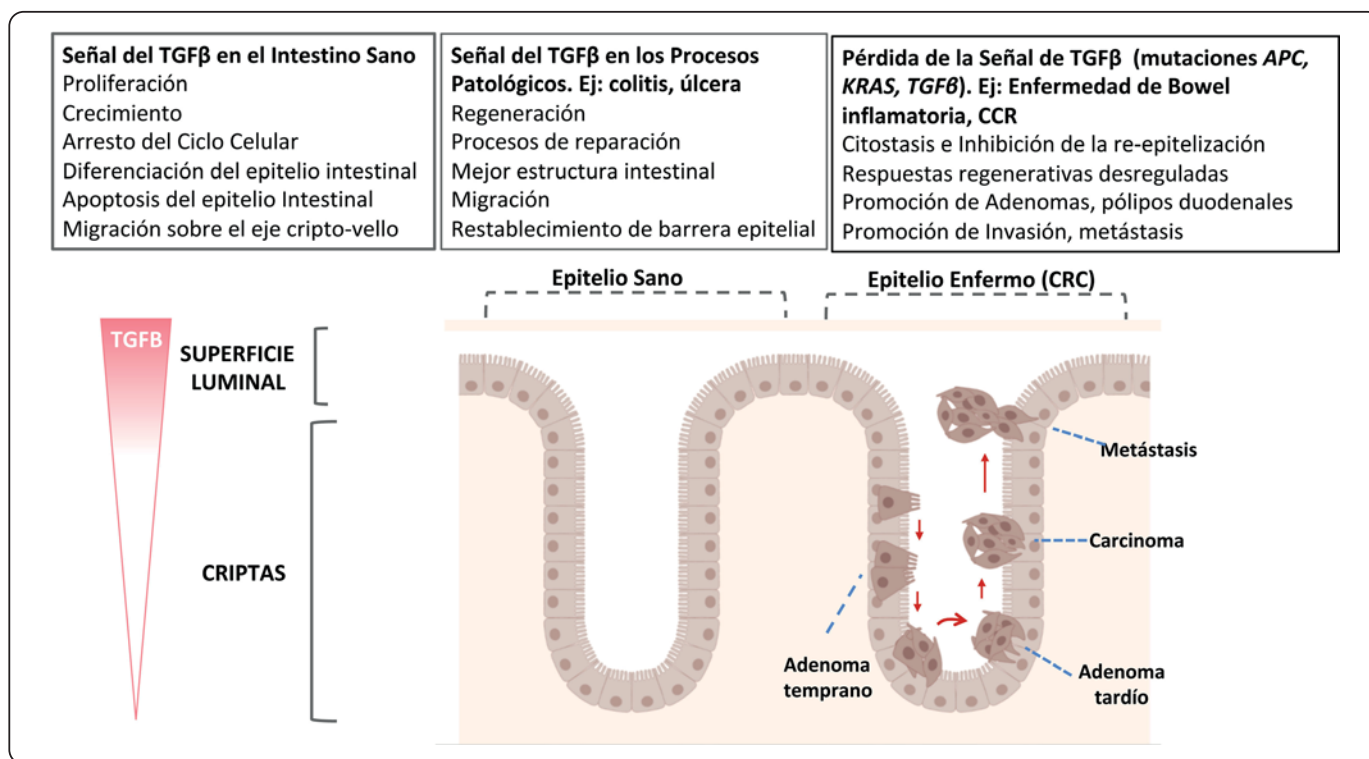
**ACCIONES DEL TGF-β EN EL COLON SANO Y EN EL CÁNCER COLORRECTAL**

Los miembros de la familia del TGF-β, como las activinas, las BMP y los TGF-β, son reguladores clave en la renovación epitelial homeostática y en los procesos regenerativos del intestino (Fink & Wrana, 2022) (Figura 2). La vía de señalización del TGF-β inhibe la proliferación celular y al mismo tiempo regula la diferenciación y la apoptosis de las células epiteliales del colon (Jung, Staudacher & Beauchamp, 2017; David & Massagué, 2018; Fink & Wrana, 2022). Además, el TGF-β suprime a las células inmunitarias intestinales presentes en el estroma e induce a la tolerancia inmunitaria. Por lo tanto, la perturbación de la señalización del TGF-β en el colon contribuye a la tumorigénesis, no solo a través de la transformación de las células epiteliales, sino también participando en las interacciones entre el tumor y el estroma (Ogawa *et al.*, 2019; Fink & Wrana, 2022) (Figura 2).

Las mutaciones esporádicas en distintos componentes de la vía del TGF-β no son en particular comunes en el CRC, por lo que no son importantes como marcadores para el pronóstico (Herzig & Tsikitis, 2015). No obstante, las modificaciones en

los cromosomas que albergan los locus de genes que codifican a los componentes de la vía del TGF-β, son producto de la inestabilidad genómica en el CRC. Las mutaciones en el receptor del TβRII se encuentran con frecuencia en los tumores del CRC que presentan MSI y una alta respuesta inmune (de Miranda *et al.*, 2015; Grady, 2015; Principe *et al.*, 2016). Por lo tanto, la inactivación del TβRII en las células del CRC contribuye al fenotipo maligno, primero al ser afectada la vía de señalización del TGF-β y segundo al provocar alteraciones en otras vías como las de MAPK, WNT/β-CATENINA e HIPPO (Morris *et al.*, 2017).

La pérdida del brazo largo (q) del cromosoma 18 es una de las principales aberraciones genómicas asociadas con las alteraciones de la vía del TGF-β en el CRC (Sarli *et al.*, 2004). El cromosoma 18q alberga los locus de dos genes importantes que codifican para los supresores de tumores, conocidos como SMAD2 y SMAD4, cuya pérdida hace que las células tumorales evadan la apoptosis y presenten una desregulación del ciclo celular (Popat & Houlston, 2005). La pérdida del gen que codifica para SMAD4 altera la vía de señalización canónica del TGF-β, puesto que se trata de un factor de transcripción decisivo para la señalización. Además, la base de datos del atlas del genoma del cáncer o TCGA (del inglés, *The Cancer Genome Atlas*) reveló que SMAD4 es codificada por uno de



**Figura 2. Acciones del TGF-β en el colon intestinal sano y en el colon enfermo. La citocina TGF-β ejerce varios efectos biológicos que incluyen la regulación de la homeostasis en el epitelio del colon sano y alteraciones en sus mecanismos de acción favorecen procesos patológicos en el epitelio del colon enfermo. Creada con Biorender.com.**

los genes mutados con mayor frecuencia en el CRC (*Cancer Genome Atlas Network*, 2012).

La mutación de la proteína SMAD4 junto con la mutación inicial de APC contribuyen a la progresión y la metástasis del CRC (Huang *et al.*, 2018; Kitamura *et al.*, 2007). La pérdida de la expresión de la proteína SMAD4 se encuentra en aproximadamente un 30-40% de los casos del CRC humano (Ogawa *et al.*, 2019). Además, la pérdida de la proteína SMAD4 aumenta la expresión de la quimiocina CCL15 (ortólogo humano de Ccl9 de ratón), que contribuye al reclutamiento de las células MDSC (del inglés, *Myeloid-Derived Suppressor Cells*) CCR1+ (Inamoto *et al.*, 2016), y de la quimiocina CXCL1/8, que favorece el reclutamiento de los neutrófilos asociados al tumor (Ogawa *et al.*, 2019). La acumulación de las células MDSC es una característica de los tumores tipo CMS4 (Roelands *et al.*, 2017), lo que sugiere que la delección de la proteína SMAD4 en el CRC provoca cambios en el fenotipo de las células cancerosas y en el microambiente tumoral (TME, del inglés *Tumor Microenvironment*), que generan un cáncer más agresivo (Ai *et al.*, 2013; Voorneveld *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017). De hecho, la ausencia de expresión de la proteína SMAD4 es un factor de mal pronóstico en el CRC (Mizuno *et al.*, 2018).

### LA COMUNICACIÓN INTERCELULAR EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

La comunicación intercelular es muy activa en el TME, al contener principalmente a una población heterogénea de células cancerosas que exhiben diferentes fenotipos y características genéticas, así como diferentes tipos de células que constituyen el estroma y contribuyen al desarrollo del tumor, como células endoteliales, células mesenquimales, células estromales y fibroblastos asociados al cáncer (CAF, del inglés *Cancer Associated Fibroblasts*). En el TME también se encuentran diversos tipos de células del sistema inmunológico, como las células dendríticas, los linfocitos B, los linfocitos T, las células asesinas naturales o NK (del inglés, *Natural Killer*) y los macrófagos (Qu *et al.*, 2019).

Más allá de la señalización a través del contacto célula-célula o por factores solubles, como los mediadores inflamatorios, las citocinas, las hormonas y los metabolitos, la comunicación intercelular también se establece por medio de la liberación de las vesículas extracelulares (EV, del inglés, *Extracellular Vesicles*). Esta modalidad de comunicación proporciona una diversidad de mensajes a las células capaces de detectar a las EV, independiente de la señalización de los factores solubles, porque las EV aportan una gran gama de moléculas

bioactivas, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Raposo & Stoorvogel, 2013). Las cargas moleculares de las EV varían al depender del tipo celular y de las condiciones fisiológicas y patológicas de las células secretoras y aunque casi todos los tipos celulares producen EV, la comunicación celular mediada por EV es uno de los mecanismos menos estudiados (Raposo & Stoorvogel, 2013).

La liberación de las EV es un proceso evolutivo conservado desde las bacterias y las arqueas hasta las células eucariotas (Kalra, Drummen & Mathivanan, 2016). Las EV están compuestas por una membrana con una bicapa lipídica y son secretadas por muchos tipos de células, por lo que son localizadas en los sobrenadantes de los cultivos de tejidos, así como en los fluidos biológicos como la saliva, la leche materna, la sangre, el fluido cerebroespinal y la ascitis maligna. Por lo tanto, las EV están implicadas en la comunicación intercelular de diversos procesos fisiológicos normales, como son la lactancia, la función neuronal y la respuesta inmunológica, así como también en la comunicación celular que ocurre en condiciones patológicas, como por ejemplo en las enfermedades neurodegenerativas, en las enfermedades hepáticas y en el cáncer (Kalra *et al.*, 2016).

Existen diferentes tipos de EV, clasificadas en dos grandes grupos con base en su origen celular antes de ser secretadas: microvesículas y exosomas (Raposo & Stoorvogel, 2013; Antonyak & Cerione, 2014). El término *microvesícula* alude a estructuras grandes de 200 – >1000 nm, que se expelen directamente de la superficie de la membrana plasmática, llamadas *oncosomas* cuando provienen de células cancerosas, y no requieren de los componentes de la vía clásica secretoria; en lo que se refiere al término exosomas, son típicamente vesículas pequeñas de 30 – 200 nm, generadas intracelularmente por la vía endosómica. Los exosomas contienen proteínas endosomales, como: tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), Alix y TSG101 (proteína perteneciente a la maquinaria ESCRT, del inglés *Endosomal Complex Required for Transport*), utilizadas como biomarcadores exosomales (Raposo & Stoorvogel, 2013).

Las EV han sido detectadas en el TME y favorecen la tumorigénesis al regular diversos procesos como son el crecimiento tumoral, la proliferación celular, la invasión, la angiogénesis, la inmunidad y la formación de metástasis. Las EV circulantes también han servido como biopsias líquidas y son reconocidas como biomarcadores para la detección temprana, el diagnóstico, el tratamiento y la respuesta al tratamiento, en pacientes con cáncer (Jabalee, Towle & Garnis, 2018; Jurj *et al.*, 2020). Además, de que las EV son liberadas dentro del TME, es probable que contribuyan a la heterogeneidad de las EV circulantes y sean consideradas una huella dactilar del tumor.

## MECANISMOS DE SECRECIÓN DE LA CITOCINA TGF- $\beta$

Los ligandos de la familia del TGF- $\beta$  se generan como grandes polipéptidos precursores diméricos, en donde cada monómero esta compuesto de tres regiones: un péptido señal en el amino terminal que participa en la secreción de los precursores, un segmento grande llamado péptido asociado a la latencia (LAP, del inglés *Latency-Associated Peptide*) y un extremo carboxilo terminal que corresponde al péptido monomérico del TGF- $\beta$  (112 residuos de aminoácidos). La proteína LAP dimérica es escindida del péptido dimérico del TGF- $\beta$  maduro (25 KDa) mediante una convertasa de proteínas llamada furina. No obstante, la proteína LAP permanece asociada de forma no covalente con el dímero del TGF- $\beta$  maduro y forman el complejo latente pequeño (SLC, del inglés *Small Latent Complex*). LAP se considera como un atrapa-ligando (del inglés, *Ligand-Trap*), porque mantiene al TGF- $\beta$  en un estado inactivo, antagonizando sus acciones.

El SLC se puede unir a otras proteínas mediante enlaces disulfuro, a través de uno de los residuos de cisteína de la proteína LAP (Cys33) y forma el complejo latente grande (LLC, del inglés *Large Latent Complex*). Existe evidencia de que al menos dos grupos diferentes de proteínas se unen a las proteínas LAP: LTBP (LTBP-1, -3 y -4) y GARP/LRRC32. Las proteínas LTBP (del inglés, *Latent-TGF- $\beta$  Binding Protein*) están involucradas en las funciones del TGF- $\beta$  relacionadas con su almacenamiento en la ECM para una futura activación (Robertson & Rifkin, 2016). Los mecanismos de activación del TGF- $\beta$  latente se han estudiado ampliamente para la isoforma TGF- $\beta$ 1, como la escisión proteolítica de LAP y la liberación del TGF- $\beta$  activo, o por cambios en la conformación de LAP que llevan a la liberación del TGF- $\beta$  activo mediante su unión a integrinas (en particular  $\alpha$ V $\beta$ 1,  $\alpha$ V $\beta$ 6 y  $\alpha$ V $\beta$ 8), igualmente por cambios en el pH, por la radiación ionizante, por el calor o por la acción de la trombospondina-1 o TSP-1 (Robertson & Rifkin, 2016; Toledo-Padilla, Coquis-Bucio, Sosa-Garrocho & Macias-Silva, 2023).

Se ha demostrado que el TGF- $\beta$  o alguno de los componentes de su vía de señalización son secretados en las EV, como los exosomas o las microvesículas. Sin embargo, hasta ahora no está claro si la citocina va en el interior o en la superficie de las EV. En la Tabla II se muestran algunos ejemplos de las células cancerosas que secretan al TGF- $\beta$  en las EV y sus efectos biológicos. En general, se sabe poco sobre los mecanismos implicados en la biogénesis de las EV portadoras del TGF- $\beta$ .

## LA CITOCINA TGF- $\beta$ Y LAS EV SECRETADAS POR LAS CÉLULAS DEL MICROAMBIENTE TUMORAL DEL CRC

Además de que la carga molecular de las EV puede contener ligandos u otros componentes de la vía del TGF- $\beta$ , este regula el enriquecimiento de las cargas moleculares específicas (proteínas, RNAs, metabolitos) en las EV, así como lo hacen



**Tabla II. Efectos biológicos de las vesículas extracelulares secretadas por las células cancerosas, que portan al TGF- $\beta$  y/o a componentes de su vía de señalización.**

Célula Secretora	Célula Blanco	Componente en las EV	Efecto Biológico del TGF- $\beta$ contenido en las EV
Células de mesotelioma y PC3 de cáncer de próstata	Fibroblastos primarios	LAP-TGF- $\beta$ anclado al betaglicano	-Diferenciación hacia miofibroblastos -Expresión positiva de $\alpha$ -SMA (Webber <i>et al.</i> , 2010)
Células SGC7901 de cáncer gástrico	Células troncales mesenquimales del cordón umbilical	TGF- $\beta$ maduro	-Activación de las proteínas SMAD2/3 -Diferenciación hacia fibroblastos asociados al cáncer -Aumentos en los niveles de las proteínas FAP, $\alpha$ -SMA, N-cadherina y vimentina -Migración (Gu <i>et al.</i> , 2012)
Blastos de pacientes con leucemia mieloide aguda	Células NK de sangre periférica de individuos sanos	Propéptido TGF- $\beta$ , LAP-TGF- $\beta$ y TGF- $\beta$ maduro	-Regulación positiva de las proteínas SMAD1/5/8 -Expresión disminuida de NKG2D (Szczepanski, Szajnik, Welsh, Whiteside & Boyiadzis, 2011; Hong, Muller, Whiteside & Boyiadzis, 2014)
Fibroblastos primarios estromales de cáncer de células escamosas	Queratinocitos primarios de cáncer de células escamosas	T $\beta$ RII	-Expresión incrementada de T $\beta$ RII -Fosforilación incrementada de SMAD2 (Languino <i>et al.</i> , 2016)
Células de sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico	Linfocitos T vírgenes de sangre periférica	TGF- $\beta$ maduro	-Diferenciación hacia linfocitos Treg -Expresión positiva de CD25, CTLA-4 y FoxP3 (Yen, Miaw, Yu & Lai, 2017)
Células RT4, T24 y SW1710 del cáncer de vejiga	Fibroblastos de biopsias de vejiga, de pacientes pediátricos	LAP-TGF- $\beta$	-Activación de la vía de señalización TGF- $\beta$ /SMAD -Diferenciación hacia CAF -Expresión de $\alpha$ -SMA, FAP y Galectina (Ringuette <i>et al.</i> , 2018)
Células A375 del melanoma	Células mononucleares de sangre periférica diferenciadas hacia células dendríticas	TGF- $\beta$ maduro	-Regulación negativa de la expresión de las moléculas MHC de las clases I y II, e igual de CD40 y CD86 (Düchler <i>et al.</i> , 2019)
Células L3.6pl de cáncer de páncreas	Células NK92	TGF- $\beta$ maduro	-Fosforilación incrementada de las proteínas SMAD2/3 -Disfunción celular (Zhao <i>et al.</i> , 2019)

otras vías de factores de crecimiento y de citocinas que también regulan el contenido de las EV. Por otro lado, el TGF- $\beta$  contenido en las EV usualmente ejerce acciones pro-tumorigénicas en distintas células blanco, localizadas en el TME o en el nicho premetastásico. Además, las EV pueden contener reguladores indirectos de la vía de señalización del TGF- $\beta$ , como algunos micro-RNAs o miRNAs que tienen como blanco a componentes de la misma vía, o contienen algunos lncRNAs (del inglés, *long non-coding RNAs*) cuya función de andamio secuestra a los miRNAs complementarios y así logran liberar a la vía del TGF- $\beta$  de estos reguladores negativos (Papoutsoglou & Moustakas, 2020; Rodrigues-Junior, Tsigoti, Lim, Heldin & Moustakas, 2022).

En el CRC, diversas alteraciones en la vía de señalización del TGF- $\beta$  conducen a la progresión del tumor (Itatani, Kawada & Sakai, 2019), por ejemplo, una deficiencia en el gen *TGFBR2* inactiva a la mayoría o a todas las funciones de la vía de señalización del TGF- $\beta$ , y afecta el contenido de miRNAs y proteínas en las EV derivadas de las células del CRC. Por lo tanto, la evidencia disponible indica que la vía de señalización del TGF- $\beta$  es regulada por las moléculas contenidas en las EV y al mismo tiempo es capaz de regular la biogénesis, el contenido y la secreción de las EV (Fricke *et al.*, 2019). Al respecto, en la Tabla III se muestran varios ejemplos de la interregulación que ocurre entre la vía del TGF- $\beta$  y las EV (cargadas de RNAs no codificantes) que son secretadas por distintas células del



**Tabla III. Moléculas reguladoras de la vía de señalización del TGF-β en el cáncer colorrectal.**

<b>Biomolécula</b>	<b>Blanco molecular</b>	<b>Efecto biológico</b>
TGF-β libre	Incremento en la expresión y la transferencia del <i>miR-200b</i> a las células vía EVs	-Inhibición en la expresión de p27 -Aumento en la proliferación de las células tumorales (Zhang <i>et al.</i> , 2018).
RNA no-codificante <i>circPACRGL</i> contenido en las EV	Regulación en la expresión del TGF-β al bloquear al miR-142-3p y al miR-506-3p	-Promoción de la proliferación y la metástasis de las células tumorales (Shang <i>et al.</i> , 2020).
miR-424 contenido en las EV	Disminución de la expresión del correceptor TβRIII	-Generación de un fenotipo agresivo en las células del CRC. -Perturbación de la vía de señalización del TGF-β. -Inducción de la progresión del CRC (Zhang <i>et al.</i> , 2021).
miR-17-5p contenido en las EV	Expresión disminuida de RUNX3 y c-MYC (inducción de la expresión de la isoforma del TGF-β1)	-Promoción de la invasión del CRC. -El TGF-β1 sintetizado por las células del CRC estimula a los CAF y promueve una mayor secreción de las EV enriquecidas en el miR-17-5p (Zhang <i>et al.</i> , 2020).
miR-93-5p contenido en las EV	Aumento en la expresión de la isoforma del TGF-β3	-Aumento en la proliferación de las células tumorales. -Evasión de la apoptosis inducida por radiación (Chen <i>et al.</i> , 2020).
miR-10b contenido en las EV	Disminución de los niveles de la subunidad catalítica de PI3K (PI3KCA) y de la actividad de la vía de señalización PI3K/AKT	-Los fibroblastos blanco proliferan menos y son diferenciados a CAFs que expresan al TGF-β1 y a αSMA (Dai <i>et al.</i> , 2018).

microambiente tumoral del CRC, como las células cancerosas, las células inmunes y los CAF (Caja *et al.*, 2018; Dai *et al.*, 2018; Shang *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020; Derynck, Turley & Akhurst, 2021; Zhang, Xing, Chen & Xiao, 2018; Zhang *et al.*, 2020, 2021).

La acción del sistema inmune en los tumores puede tener efectos anti-tumorales o pro-tumorales, acorde al panorama inmunológico que se presente en el TME. La progresión del tumor dependerá de la habilidad de este para evadir a la respuesta inmune y para favorecer los procesos de inmunotolerancia, inmunosupresión e inmunoescape (Galon & Bruni, 2020). La presencia del TGF-β en el TME está en general asociada a un panorama inmunosupresor (Galon & Bruni, 2020). En el CRC, una prognosis negativa se relaciona con la presencia de linfocitos Th17, células dendríticas inmaduras y macrófagos tipo M2. Al respecto, se conoce que las EV liberadas por las células cancerosas del CRC, con una carga del TGF-β1, originan un cambio fenotípico en la línea celular Jurkat, al pasar de un fenotipo tipo linfocito T a células parecidas a los linfocitos T reguladores (Treg), a través de la activación de la vía del TGF-β/SMAD2 y de la inactivación de las vías de JNK y p38 (Yamada *et al.*, 2016); las EV purificadas de células MC38 del CRC que sobreexpresan a la IL-12 y depletadas del TGF-β1 por la transfección de un shRNA dirigido contra el RNAm del TGF-β1, inhiben el crecimiento del tumor además de causar inmunidad antitumoral (Rossowska *et al.*, 2019).

En la formación de los nichos premetastásicos, las integrinas transportadas por las EV se unen a órganos específicos para crear un ambiente favorable para el crecimiento de las células metastásicas y para que se forme una neoplasia secundaria (Hoshino *et al.*, 2015). El contenido de las EV circulantes secretadas por las células del CRC, señalan el sitio metastásico con la presencia y aumento de los niveles de las integrinas α6, β1 y β4, indicativo de una metástasis en el pulmón y cuando esto mismo sucede pero con las integrinas α5 y β5, es una metástasis en el hígado (Ji *et al.*, 2020).

### **MECANISMOS DE ACCIÓN DEL TGF-β EN LAS CÉLULAS SW480 y SW620**

Las líneas celulares SW480 y SW620 provienen de un tumor localizado en el epitelio del colon humano y clasificado como CMS4 (Berg *et al.*, 2017); las líneas SW480 y SW620 se establecieron a partir de un adenocarcinoma, la primera de un tumor primario de colon y la segunda de un sitio metastásico (ganglio linfático); ambas líneas fueron aisladas del mismo paciente y están disponibles comercialmente (CCL-227 y CCL-228 de ATCC, del inglés, *American Type Culture Collection*). Las líneas SW480 y SW620 expresan a los oncogenes *c-MYC*, *K-RAS*, *H-RAS*, *N-RAS*, *MYB*, *SIS* y *FOS*, y solo la línea SW480 tiene una mutación en el codón 12 del protooncogén *RAS*. Además, ambas líneas del CRC responden al TGF-β y es común usarlas para estudio de los efectos del TGF-β en el crecimiento de las células cancerosas del CRC.

La vía de señalización del TGF-β es funcional en ambas líneas celulares SW480 y SW620, porque responden al ligando TGF-β y además tienen la capacidad de sintetizarlo y secretarlo. Ambas líneas muestran una sobreexpresión en los receptores de tipo I (ALK5), tipo II (TβRII) y tipo III (betaglicano) para el TGF-β. Las proteínas SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 y SMAD9 se han detectado en las células SW480. Las proteínas SMAD2 y SMAD3, así como los receptores de las BMP del tipo BMPRIA y BMPRII, se han detectado en las células SW620. El correceptor endoglina y la proteína SMAD7 se han detectado solo en las células SW480. Por otro lado, las células SW620 presentan un aumento en los niveles de SMAD2 y SMAD3 tanto en el núcleo como en el citoplasma, lo que indica que la vía puede estar activa en estas células. La proteína SMAD4 está ausente en ambas líneas celulares; se sabe que la delección o ausencia de la proteína SMAD4 en los tumores del CRC inhibe el efecto supresor tumoral del TGF-β, sin modificar sus actividades protumorales, provocando que las células tumorales estimuladas con el TGF-β adquieran un

fenotipo más agresivo (Levy & Hill, 2005). Como las células SW480 y SW620 carecen de la expresión de la proteína SMAD4, los efectos biológicos de la citocina TGF-β y de su vía canónica aumentan la migración, la proliferación celular y la inducción de la EMT en estas células (Figura 3) (Gatza *et al.*, 2011; Papageorgis *et al.*, 2011; Yan, Liu, Yang & Wu, 2018; Asiri, Raposo, Alfahed & Ilyas, 2019; Zhang *et al.*, 2019). La relevancia de la proteína SMAD4 queda clara al observar que su re-expresión en las células SW620 restaura algunos de los efectos supresores de tumores del TGF-β (Yan *et al.*, 2018).

En ambos tipos de células, SW480 y SW620, el TGF-β también activa a las vías de señalización no canónicas: p38, ERK1/2 y PI3K, a diferencia de la vía de ROCK que sólo es activada en las células SW620 y se le relaciona a un aumento en la EMT, la proliferación, la migración, la invasión, la inhibición de la apoptosis y la resistencia a la inhibición del crecimiento (Beck *et al.*, 2006; Kodach *et al.*, 2008; Papageorgis *et al.*,

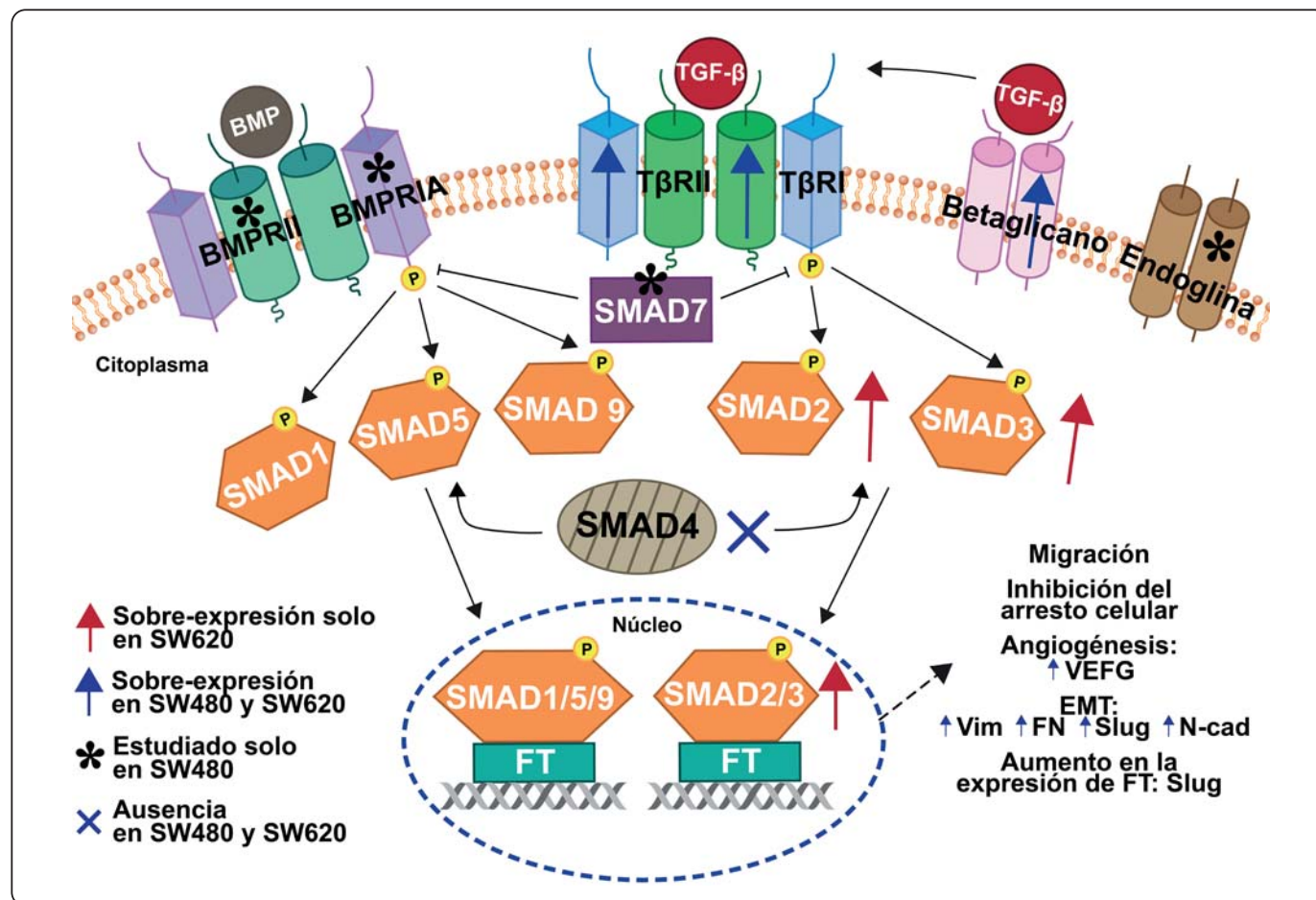


Figura 3. La vía de señalización canónica del TGF-β y sus efectos biológicos en las líneas epiteliales humanas de cáncer colorrectal SW480 y SW620. La citocina TGF-β ejerce varios efectos biológicos a través de la vía dependiente de las SMADs en las células SW480 y SW620. Estos efectos incluyen la migración, la inhibición del arresto del ciclo celular, la angiogénesis, la EMT y el aumento en la expresión de los factores de transcripción (FT). Creada con Adobe Illustrator.

2011; Gatza *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2018; Gasior *et al.*, 2019; Asiri *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2020) (Figura 3).

### **LAS CÉLULAS SW480 Y SW620 COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA SECRECIÓN Y DE LAS ACCIONES DEL TGF- $\beta$ EN EL CRC**

Las células SW480 y SW620 son un modelo único para estudiar las etapas más avanzadas del CRC. Aunque estas células tienen alteraciones genéticas similares difieren en su morfología, en las células SW480 es del tipo epitelial y en las células SW620 es del tipo de los fibroblastos. Además, las células SW620 secretan altos niveles de VEGF, expresan a la oncoproteína MET y carecen de la expresión del receptor EGFR (Hewitt *et al.*, 2000; Ji *et al.*, 2013). Por otro lado, las células SW480 expresan una mayor cantidad de la glucoproteína CD44 de superficie celular, y cuentan con mayor capacidad migratoria y adhesiva (Kim *et al.*, 2004). Las células SW620 tienen una gran capacidad invasiva y un crecimiento proliferativo independiente del anclaje (Hewitt *et al.*, 2000; Ji *et al.*, 2013). Por lo tanto, las células SW480 y SW620 muestran características compatibles con la etapa temprana (primaria) y tardía (metastásica) del cáncer, respectivamente; sin embargo, la principal diferencia epigenética que presentan es que solo las SW620 tienen un fenotipo metilador de islas CpG (Ahmed *et al.*, 2013).

Otras características comunes de las SW480 y las SW620 es que son capaces de sintetizar y secretar al TGF- $\beta$  en concentraciones elevadas (alrededor de 2 ng/mL), pero las SW620 contienen más TGF- $\beta$  citosólico. El TGF- $\beta$  parece ser secretado por estas células en forma activa y en forma latente, pero se desconoce si es secretado en su forma soluble o contenido en EV (Lu *et al.*, 2002; Gasior *et al.*, 2019). Sería relevante dilucidar los mecanismos moleculares implicados en la secreción del TGF- $\beta$  por estas líneas celulares del CRC, y en condiciones que mimeticen el microambiente tumoral como los co-cultivos tridimensionales (3D) del tipo esferoides u organoides, y así abrir una línea de investigación que contribuya al conocimiento del papel que juega el TGF- $\beta$  en el TME y la progresión del CRC.

### **EV SECRETADAS POR LAS CÉLULAS SW480 Y SW620**

Las células cancerosas cultivadas en esferoides parecen secretar una mayor cantidad de EV; sin embargo, los análisis proteómicos de las EV secretadas a su vez por las células SW480 y SW620 solo se han realizado a partir de las células cultivadas en monocapa (2D). En este contexto se han encontrado proteínas que distinguen a las microvesículas y a los exosomas secretados por cada una de estas líneas celulares. En la Figura 4 se muestran esquemas tipo diagramas de Venn, que contienen a las proteínas que se consideran como marcadores de cada tipo de EV, así como una lista de las integrinas y de los componentes de diferentes sistemas de transducción de señales, presentes en alguno de los tipos de EV secretadas por las líneas celulares, mencionadas, del CRC (Choi *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2013; Suwakulsiri *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2019).

Las EV aisladas tanto de los medios condicionados de las SW480 como de las SW620, han sido usadas para estimular a diferentes células blanco, como monocitos, macrófagos, fibroblastos e inclusive a las mismas líneas celulares del CRC. Los resultados muestran la regulación de diversos procesos celulares por las distintas EV, como la citotoxicidad, la proliferación, la invasividad, la motilidad y la angiogénesis, además de que las células blanco estimuladas expresan biomoléculas de superficie como las quimiocinas y al receptor HLA-DR, y secretan algunas citocinas e interleucinas (Figuras 5 y 6). Los monocitos pasan por un proceso de polarización hacia un fenotipo mixto M1/M2 (Baj-Krzyworzeka *et al.*, 2016; Popěna *et al.*, 2018), los fibroblastos son transformados a CAF (Rai *et al.*, 2018) y las células cancerosas pasan a ser metastásicas. Sin embargo, no se observó un cambio significativo en las células SW620 al incubarlas con las EV de la misma línea celular, pero obtenidas bajo condiciones de hipoxia (Endzelins *et al.*, 2018). Actualmente se desconoce cuáles son las moléculas, de las EV, responsables de cada uno de los efectos biológicos, lo que deja lugar a investigar si una de las responsables es la citocina TGF- $\beta$ .

Existe evidencia de la presencia de la citocina TGF- $\beta$  y de sus biomoléculas portadoras en la superficie de las EV secretadas por distintos tipos celulares (Webber, Steadman, Mason, Tabi & Clayton, 2010; Shelke *et al.*, 2019); en el caso de las EV secretadas por las células SW480 y SW620 cultivadas en monocapa, se desconoce la presencia de la citocina TGF- $\beta$ , aunque si se detectaron dos componentes reguladores de su vía de señalización: las proteínas TGIF (cofactor transcripcional) e IQGAP1 (proteína andamio) (Choi *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2013; Suwakulsiri *et al.*, 2019). En resumen, ambos tipos de células del CRC cultivadas en monocapa sintetizan y secretan al TGF- $\beta$ , pero se desconocen los mecanismos implicados en su secreción, así como sus efectos en las posibles células blanco (Lu *et al.*, 2002; Gasior *et al.* 2019).

### **CONCLUSIONES**

En el CRC, las células cancerosas presentan cambios en la expresión y función de algunos componentes de la vía del TGF- $\beta$  (SMAD4, T $\beta$ R2 y TGF- $\beta$ ), lo cual conduce a una pérdida en la actividad supresora de tumores de la citocina TGF- $\beta$  y favorece su actividad pro-tumoral, ya que puede activar vías de señalización independientes de las SMAD que pueden contribuir con la progresión tumoral, por ejemplo, al ocasionar el crecimiento de las células cancerosas y su paso por la EMT, lo que favorece la invasión y la metástasis. Además, un microambiente tumoral enriquecido con la citocina TGF- $\beta$ , como ocurre en el CRC tipo CMS4 que es uno de los más agresivos y con el peor pronóstico, puede ayudar a las células cancerosas a evadir al sistema inmune, debido a su fuerte actividad inmunosupresora. Por lo tanto, en los tumores CMS4, el TGF- $\beta$  es considerado como un importante blanco terapéutico, sobretodo en el diseño de las terapias usadas en la medicina



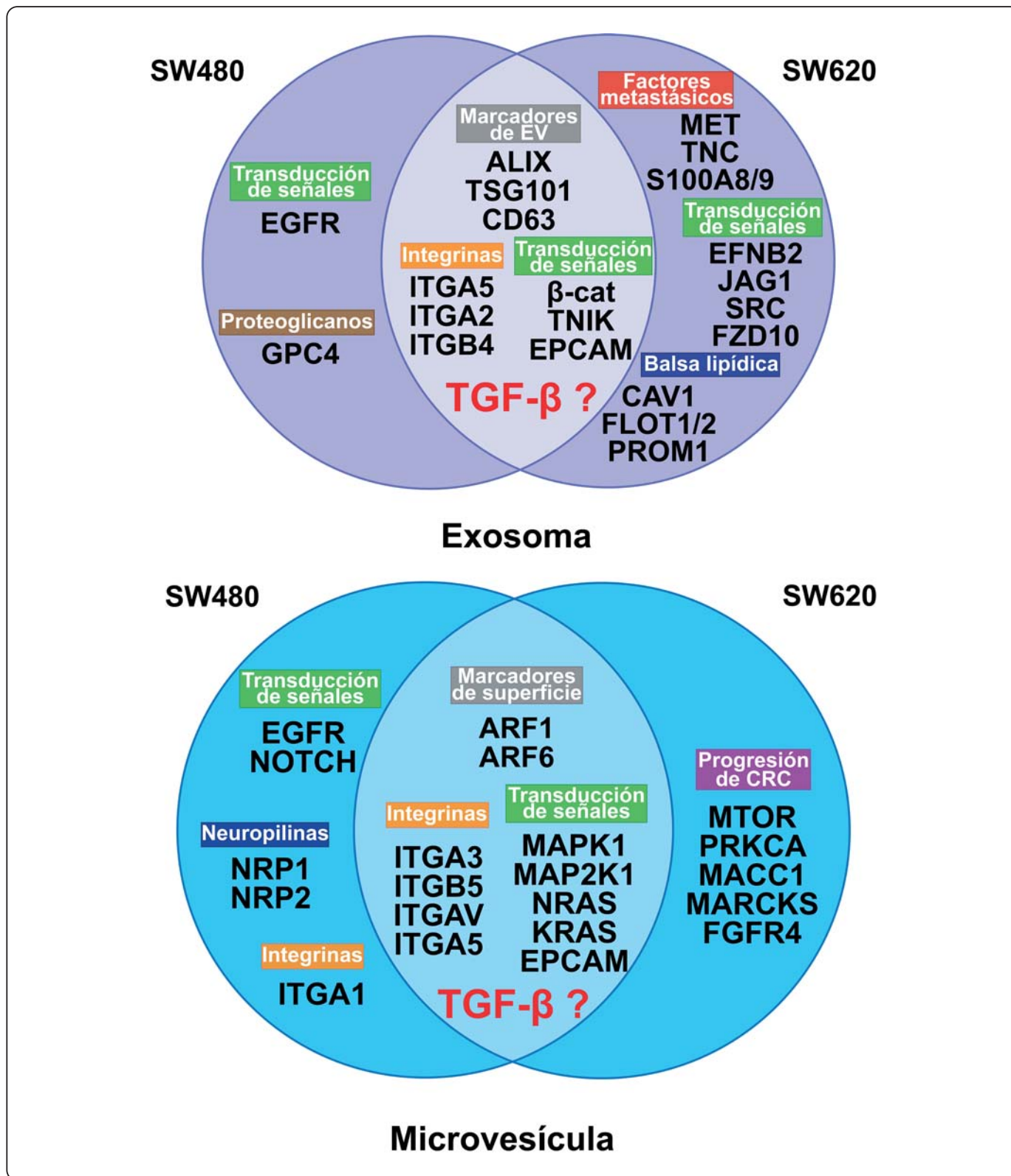


Figura 4. Carga molecular de microvesículas y exosomas secretados por las líneas celulares SW480 y SW620. En los exosomas, se muestran las biomoléculas que son comunes para ambas líneas celulares, y las que son únicas para cada línea celular. Lo mismo sucede con las microvesículas. El TGF-β está indicado en rojo y con un signo (“?”) por la carencia de estudios que avalen si está contenido en los exosomas de estas líneas celulares del cáncer colorrectal. Creada con Adobe Illustrator.

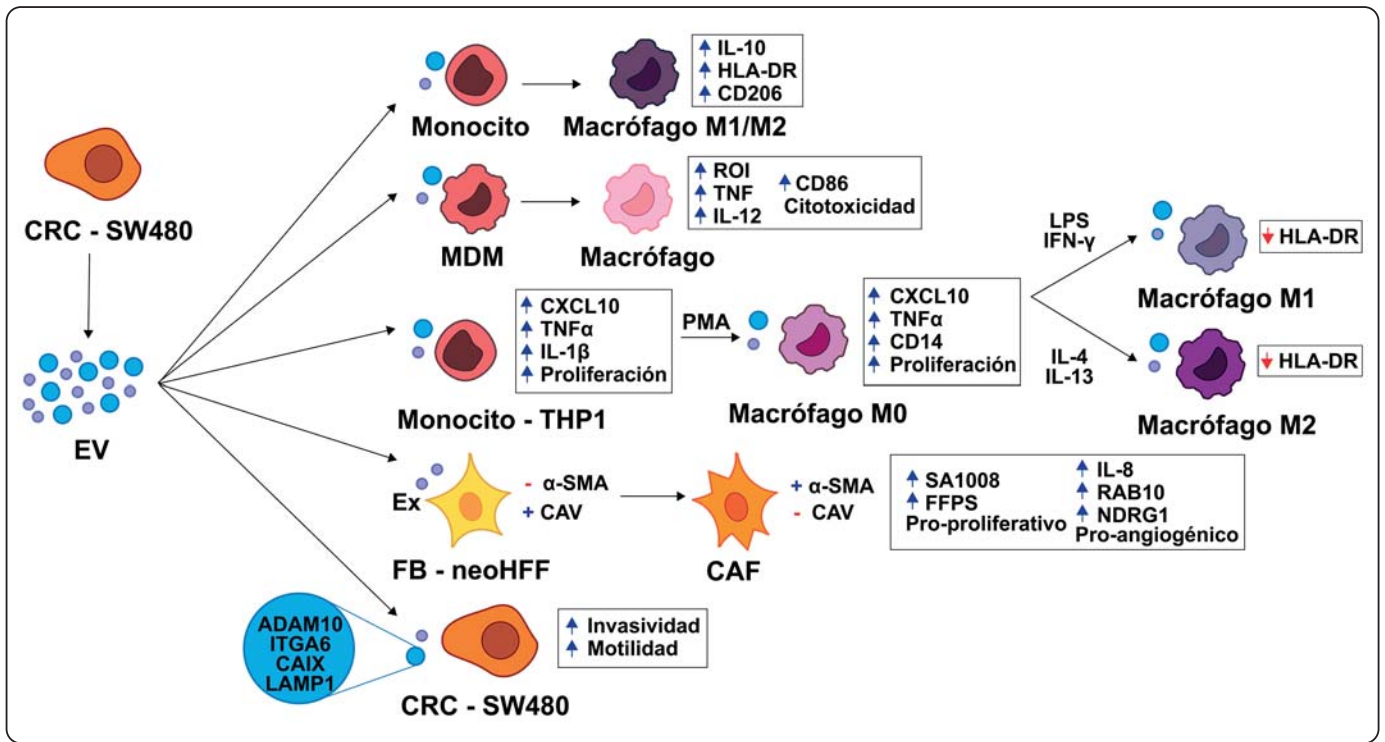


Figura 5. Vesículas extracelulares secretadas por la línea de cáncer colorrectal SW480 y sus efectos biológicos en diversas células blanco. Las EV de la línea celular SW480 de un tumor primario del CRC ocasionan la sobreexpresión de diferentes moléculas en varias células blanco, con varias respuestas biológicas relacionadas al establecimiento y la progresión del cáncer. El resultado de las EV incubadas con las células SW480, fue la invasividad y la motilidad de las células. Creada con Adobe Illustrator.

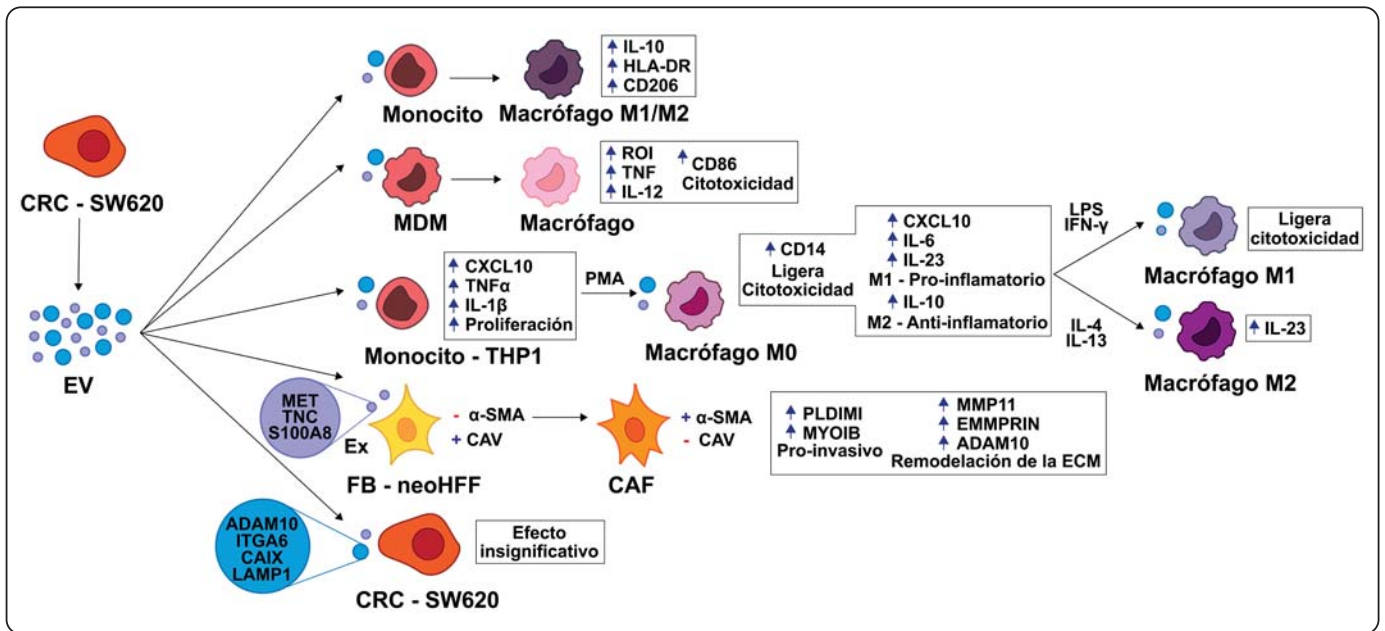


Figura 6. Vesículas extracelulares secretadas por la línea de cáncer colorrectal SW620 y sus efectos biológicos en diversas células blanco. Las EV de la línea celular SW620 derivadas de un tumor metastásico del CRC sobreexpresan distintas moléculas en diversas células blanco, y produce diversos efectos biológicos asociados con la metástasis y la progresión tumoral. Las EV incubadas con las células SW620 no tuvieron efecto. Creada con Adobe Illustrator.

personalizada (Maslankova *et al.*, 2022). Cabe señalar que el TGF- $\beta$  secretado en forma soluble o en EV provenientes de las células de diferentes tipos de cáncer, es capaz de activar su vía de señalización dependiente de las SMAD, al ejercer diversos efectos biológicos sobre varias células blanco en el TME y contribuir con la tumorigénesis.

#### AGRADECIMIENTOS

Nuestro trabajo esta apoyado con recursos del proyecto No. IV200220 del PAPIIT/DGAPA/UNAM (MRF, GS y MMS). María Andrea Lara Salas y Daniel Francisco Mendoza Lara recibieron una beca del CONAHCYT, para realizar sus estudios de maestría en el Posgrado de Ciencias Bioquímicas de la UNAM y en el Posgrado de Ciencias Químicas de la BUAP (Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica), respectivamente. Mitzi Paulina Pérez Calixto fue apoyada por una beca posdoctoral de la DGAPA, UNAM. Agradecemos la asesoría de los miembros de la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

#### REFERENCIAS

- Abdollah, S., Macías-Silva, M., Tsukazaki, T., Hayashi, H., Attisano, L. & Wrana, J. L. (1997). T $\beta$ RI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *J. Biol. Chem.*, **272**, 27678–27685. DOI: 10.1074/jbc.272.44.27678
- Ahmed, D., Eide, P., Eilertsen, I., Danielsen, S., Eknæs, M., Hektoen, M., Lind, G. & Lothe, R. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, **2**, e71. DOI: 10.1038/oncsis.2013.35
- Ai, X., Wu, Y., Zhang, W., Zhang, Z., Jin, G., Zhao, J., Yu, J., Lin, Y., Zhang, W., Liang, H., Datta, P., Zhang, M., Zhang, B. & Chen, X. (2013). Targeting the ERK pathway reduces liver metastasis of Smad4-inactivated colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.*, **14**, 1059–1067. DOI: 10.4161/cbt.26427
- Antonyak, M. A. & Cerione, R. A. (2014). Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer. *Methods in Molecular Biology Series: Cancer Cell Signaling*, Second Edition, **1165**, 147–173.
- Asiri, A., Raposo, T., Alfahed, A. & Ilyas, M. (2019). TGF $\beta$ 1-induced cell motility is mediated through Cten in colorectal cancer. *Int. J. Exp. Pathol.*, **99**, 323–330. DOI: 10.1111/iep.12300
- Baj-Krzyworzeka, M., Mytar, B., Szatanek, R., Surmiak, M., Węglarczyk, K., Baran, J. & Siedlar, M. (2016). Colorectal cancer-derived microvesicles modulate differentiation of human monocytes to macrophages. *J. Transl. Med.*, **14**, 1–15. DOI: 10.1186/s12967-016-0789-9
- Beck, S., Jung, B., Fiorino, A., Gomez, J., Rosario, E., Cabrera, B., Huang, S., Chow, J. & Carethers, J. (2006). Bone morphogenetic protein signaling and growth suppression in colon cancer. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **291**, G135–G145. DOI: 10.1152/ajpgi.00482.2005
- Berg, K., Eide, P., Eilersten, I., Johannessen, B., Bruun, J., Danielsen, S., Bjørnslett, M., Meza-Zepeda, L., Eknæs, M., Lind, G., Myklebost, O., Skotheim, R., Sveen, A. & Lothe, R. (2017). Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Mol. Cancer*, **16**, 116. DOI: 10.1186/s12943-017-0691-y
- Bogaert, J. & Prenen, H. (2014). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annals of gastroenterology*, **27**, 9–14. PMID: PMC3959535
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L. & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.*, **68**, 394–424. DOI: 10.3322/caac.21492
- Caja, L., Dituri, F., Mancarella, S., Caballero-Diaz, D., Moustakas, A., Gianelli, G. & Fabregat, I. (2018). TGF-beta and the tissue microenvironment: relevance in fibrosis and cancer. *Ijms*, **19**, 1294. DOI: 10.3390/ijms19051294
- Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, **487**, 330–337. DOI: 10.1038/nature11252
- Chen, X., Liu, J., Zhang, Q., Liu, B., Cheng, Y., Zhang, Y., Sun, Y., Ge, H. & Liu, Y. (2020). Exosome-mediated transfer of miR-93-5p from cancer-associated fibroblasts confer radioresistance in colorectal cancer cells by downregulating FOXA1 and upregulating TGF $\beta$ 3. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **39**, 65. DOI: 10.1186/s13046-019-1507-2
- Choi, D., Choi, D., Hong, B., Jang, S., Kim, D., Lee, J., Kim, Y., Kim, K. & Ghoo, Y. (2012). Quantitative proteomics of extracellular vesicles derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells. *J. Extracell. Vesicles*, **1**, 18704. DOI: 10.3402/jev.v1i0.18704
- Dai, G., Yao, X., Zhang, Y., Gu, J., Geng, Y., Xue, F. & Zhang, J. (2018). Colorectal cancer cell-derived exosomes containing miR-10b regulate fibroblasts cells via the PI3K/Akt pathway. *Bull. du Cancer*, **105**, 336–349. DOI: 10.1016/j.bulcan.2017.12.009
- David, C. J. & Massagué, J. (2018). Contextual determinants of TGF $\beta$  action in development, immunity and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 419–435. DOI: 10.1038/s41580-0007-0
- de Miranda, N., van Dinther, M., van den Akker, B., van Wezel, T., ten Dijke, P. & Morreau, H. (2015). Transforming growth factor  $\beta$  signaling in colorectal cancer cells with microsatellite instability despite biallelic mutations in TGFBR2. *Gastroenterology*, **148**, 1427–1437. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.02.052
- Derynck, R., Turley, S. J. & Akhurst, R. J. (2021). TGFbeta biology in cancer progression and immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **18**, 9–34. DOI: 10.1038/s41571-020-0403-1
- Dienstmann, R., Vermeulen, L., Guinney, J., Kopetz, S., Tejpar, S. & Taberero, J. (2017). Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **17**, 79–92. DOI: 10.1038/nrc.2016.126
- Düchler, M., Czernek, L., Peczek, L., Cypryk, W., Sztiller-Sikorska, M. & Czyz, M. (2019). Melanoma-Derived



- Extracellular Vesicles Bear the Potential for the Induction of Antigen-Specific Tolerance. *Cells*, **8**, 665. DOI: 10.3390/cells8070665
- Endzelins, E., Ābols, A., Bušs, A., Zandberga, E., Palviainen, M., Siljander, P. & Linē, A. (2018). Extracellular Vesicles Derived from Hypoxic Colorectal Cancer Cells Confer Metastatic Phenotype to Non-metastatic Cancer Cells. *Anticancer Res.*, **38**, 5139–5147. DOI: 10.21873/anticancer.12836
- Fearon, E. & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61**, 759–767. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90186-i
- Fink, M. & Wrana, J. L. (2022). Regulation of homeostasis and regeneration in the adult intestinal epithelium by the TGF- $\beta$  superfamily. *Developmental Dynamics*, **2022**, 1–18. DOI: 10.1002/dvdy.500
- Fricke, F., Mussack, V., Buschmann, D., Hausser, I., Pfaffl, M. W., Kopitz, J. & Gebert, J. (2019). TGFBR2-dependent alterations of microRNA profiles in extracellular vesicles and parental colorectal cancer cells. *Int. J. Oncol.*, **55**, 925–937. DOI:10.3892/ijo.2019.4859
- Galon, J. & Bruni, D. (2020). Tumor immunology and tumor evolution: intertwined histories. *Immunity*, **52**, 55–81. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.12.018
- Gasior, K., Wagner, N., Cores, J., Caspar, R., Wilson, A., Bhattacharya, S. & Hauck, M. (2019). The role of cellular contact and TGF- $\beta$  signaling in the activation of the epithelial mesenchymal transition (EMT). *Cell Adhesion & Migration*, **1**, 63–75. DOI: 10.1080/19336918.2018.1526597
- Gatza, C., Holtzhausen, A., Kirkbride, K., Morton, A., Gatza, M., Datto, M. & Blobe, G. (2011). Type III TGF- $\beta$  Receptor Enhances Colon Cancer Cell Migration and Anchorage-Independent Growth. *Neoplasia*, **13**, 758–770. DOI: 10.1593/neo.11528
- Globocan. (2020). <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data>
- Grady, W. & Markowitz, S. (2002). Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **3**, 101–128. DOI: 10.1146/annurev.genom.3.022502.103043
- Grady, W. & Carethers, J. (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, **135**, 1079–1099. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.07.076
- Grady, W. (2015). Polymerase Slippage Restoration of Frameshifted TGFBR2 in Colorectal Cancer: A Novel Paradigm. *Gastroenterology*, **148**, 1276–1279. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.04.023
- Gu, J., Qian, H., Shen, L., Zhang, X., Zhu, W., Huang, L., Yan, Y., Mao, F., Zhao, C., Shi, Y. & Xu, W. (2012). Gastric cancer exosomes trigger differentiation of umbilical cord derived mesenchymal stem cells to carcinoma-associated fibroblasts through TGF- $\beta$ /Smad pathway. *PLoS One*, **7**, e52465. DOI: 10.1371/journal.pone.0052465
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: Next generation. *Cell*, **144**, 646–674. DOI:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hao, Y., Baker, D. & Ten Dijke, P. (2019). TGF- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2767. DOI: 10.3390/ijms20112767
- Herzig, D. & Tsikitis, V. (2015). Molecular markers for colon diagnosis, prognosis and targeted therapy. *J. Surg. Oncol.*, **111**, 96–102. DOI: 10.1002/jso.23806
- Hewitt, R., McMarlin, A., Kleiner, D., Wersto, R., Martin, P., Tsokos, M., Stamp, G. & Stetler-Stevenson, W. (2000). Validation of a model of colon cancer progression. *J. Pathol.*, **192**, 446–454. DOI: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH775>3.0.CO;2-K
- Hong, C., Muller, L., Whiteside, T. & Boyiadzis, M. (2014). Plasma exosomes as markers of therapeutic response in patients with acute myeloid leukemia. *Front. Immunol.*, **5**, 160. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00160
- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplod, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., Zhang, T., Zhang, H., Hernandez, J., Weiss, J. M., Dumont-Cole, V. D., Kramer, K., Wexler, L. H., Narendran, A., Schwartz, G. K., Healey, J. H., Sandstrom, P., Labori, K. J., Kure, E. H., Grandgenett, P. M., Hollingsworth, M. A., de Sousa, M., Kaur, S., Jain, M., Mallya, K., Batra, S. K., Jarnagin, W. R., Brady, M. S., Fodstad, O., Muller, V., Pantel, K., Minn, A. J., Bissell, M. J., Garcia, B. A., Kang, Y., Rajasekhar, V. K., Ghajar, C. M., Matei, I., Peinado, H., Bromberg, J. & Lyden, D. (2015). Tumor Exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, **527**, 329–335. DOI:10.1038/nature15756
- Huang, D., Sun, W., Zhou, Y., Li, P., Chen, F., Chen, H., Xia, D., Xu, E., Lai, M., Wu, Y. & Zhang, H. (2018). Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, **37**, 173–187. DOI: 10.1007/s10555-017-9726-5
- Inamoto, S., Itatani, Y., Yamamoto, T., Minamiguchi, S., Hirai, H., Iwamoto, M., Hasegawa, S., Taketo, M., Sakai, Y. & Kawada, K. (2016). Loss of SMAD4 Promotes Colorectal Cancer Progression by Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells through the CCL15-CCR1 Chemokine Axis. *Clin. Cancer Res.*, **22**, 492–501. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0726
- Itatani, Y., Kawada, K. & Sakai, Y. (2019). Transforming Growth Factor- $\beta$  signaling pathway in colorectal cancer and its tumor microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 5822. DOI:10.3390/ijms20235822
- Jabalee, J., Towle, R. & Garnis, C. (2018). The Role of Extracellular Vesicles in Cancer: Cargo, Function, and Therapeutic Implications. *Cells*, **7**, 93. DOI: 10.3390/cells7080093
- Ji, H., Greening, D., Barnes, T., Lim, J., Tauro, B., Rai, A., Xu,

- R., Adda, C., Mathivanan, S., Zhao, W., Xue, Y., Xu, T., Zhu, H. & Simpson, R. (2013). Proteome profiling of exosomes derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells reveal differential expression of key metastatic factors and signal transduction components. *Proteomics*, **13**, 1672–1686. DOI: 10.1002/pmic.201200562
- Ji, Q., Zhou, L., Sui, H., Yang, L., Wu, X., Song, Q., Jia, R., Li, R., Sun, J., Wang, Z., Liu, N., Feng, Y., Sun, X., Cai, G., Feng, Y., Cai, J., Cao, Y., Cai, G., Wang, Y. & Li, Q. (2020). Primary tumors release ITGBL1-rich extracellular vesicles to promote distal metastatic tumor growth through fibroblast-niche formation. *Nat. Commun.*, **11**, 1211. DOI:10.1038/s41467-020-14869-x
- Jung, B., Staudacher, J. & Beauchamp, D. (2017). Transforming Growth Factor  $\beta$  Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, **152**, 36–52. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.10.015
- Jurj, A., Zanoaga, O., Braicu, C., Lazar, V., Tomuleasa, C., Irimie, A. & Berindan-Neagoe, I. (2020). A Comprehensive Picture of Extracellular Vesicles and Their Contents. Molecular Transfer to Cancer Cells. *Cancers*, **12**, 298. DOI: 10.3390/cancers12020298
- Kalra, H., Drummen, G. & Mathivanan, S. (2016). Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 170. DOI: 10.3390/ijms17020170
- Kim, H., Wheeler, M., Wilson, C., Iida, J., Eng, D., Simpson, M., McCarthy, J. & Bullard, K. (2004). Hyaluronan facilitates invasion of colon carcinoma cells *in vitro* via interaction with CD44. *Cancer Res.*, **64**, 4569–4576. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0202
- Kitamura, T., Kometani, K., Hashida, H., Matsunaga, A., Miyoshi, H., Hosogi, H., Aoki, M., Oshima, M., Hattori, M., Takabayashi, A., Minato, N. & Taketo, M. (2007). SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1+ myeloid cells that promote invasion. *Nat. Genet.*, **39**, 467–475. DOI: 10.1038/ng1997
- Kodach, L., Wiercinska, E., de Miranda, N., Bleuming, S., Musler, A., Peppelenbosch, M., Dekker, E., van den Brink, G., van Noesel, C., Morreau, H., Hommes, D., Ten Dijke, P., Offerhaus, G. & Hardwick, J. (2008). The bone morphogenetic protein pathway is inactivated in the majority of sporadic colorectal cancers. *Gastroenterology*, **134**, 1332–1341. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.02.059
- Languino, L., Singh, A., Prisco, M., Inman, G., Luginbuhl, A., Curry, J. & South, A. (2016). Exosome-mediated transfer from the tumor microenvironment increases TGF $\beta$  signaling in squamous cell carcinoma. *Am. J. Transl. Res.*, **8**, 2432–2437. PMID: 27347352; PMCID: PMC4891457
- Levy, L. & Hill, C. (2005). Smad4 Dependency Defines Two Classes of Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Target Genes and Distinguishes TGF- $\beta$ -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition from Its Antiproliferative and Migratory Responses. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 8108–8125. DOI: 10.1128/MCB.25.18.8108-8125.2005
- Li, X., Li, X., Lv, X., Xiao, J., Liu, B. & Zhang, Y. (2017). Smad4 Inhibits VEGF-A and VEGF-C Expressions via Enhancing Smad3 Phosphorylation in Colon Cancer. *Anat. Rec.*, **300**, 1560–1569. DOI: 10.1002/ar.23610
- López-Casillas, F., Wrana, J. L. & Massagué, J. (1993). Betaglycan presents ligand to the TGF $\beta$  signaling receptor. *Cell*, **73**, 1435–1444. DOI:10.1016/0092-8674(93)90368-z
- Lu, M., Munger, J., Steadele, M., Busald, C., Tellier, M. & Schnapp, L. (2002). Integrin  $\alpha$ 8 $\beta$ 1 mediates adhesion to LAP-TGF $\beta$ 1. *J. Cell Sci.*, **115**, 4641–4648. DOI: 10.1242/jcs.00145
- Macías-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P., Pirone, R., Attisano, L. & Wrana, J. (1996). MADR2 is a substrate of the TGF $\beta$  receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell*, **87**, 1215–1224. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81817-6
- Maslankova, J., Vecurkovska, I., Rabajdova, M., Katuchova, J., Kicka, M., Gayova, M. & Katuch, V. (2022). Regulation of transforming growth factor- $\beta$ -induced cell motility is mediated through Cten in colorectal cancer signaling as a therapeutic approach to treating colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.*, **28**, 4733–4761. DOI: 10.3748/wjg.v28.i33.4744
- Mizuno, T., Cloyd, J., Vicente, D., Omichi, K., Chun, Y., Kopetz, S., Maru, D., Conrad, C., Tzeng, C., Wei, S., Aloia, T. & Vauthey, J. (2018). SMAD4 gene mutation predicts poor prognosis in patients undergoing resection for colorectal liver metastases. *Eur. J. Surg. Oncol.*, **44**, 684–692. DOI: 10.1016/j.ejso.2018.02.247
- Morikawa, M., Derynck, R. & Miyazono, K. (2016). TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  family: Context dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, a021873. DOI: 10.1101/cshperspect.a021873
- Morris, S., Davison, J., Carter, K., O’Leary, R., Trobridge, P., Knoblauch, S., Myeroff, L., Markowitz, S., Brett, B., Scheetz, T., Dupuy, A., Starr, T. & Grady, W. (2017). Transposon mutagenesis identifies candidate genes that cooperate with loss of transforming growth factor- $\beta$  signaling in mouse intestinal neoplasms. *Int. J. Cancer*, **140**, 853–863. DOI: 10.1002/ijc.30491
- Nieto, M., Huang, R., Jackson, R. & Thiery, J. (2016). EMT: 2016. *Cell*, **166**, 21–45. DOI: 10.1016/j.cell.2016.06.028
- Ogawa, R., Yamamoto, T., Hirai, H., Hanada, K., Kiyasu, Y., Nishikawa, G., Mizuno, R., Inamoto, S., Itatani, Y., Sakai, Y. & Kawada, K. (2019). Loss of SMAD4 Promotes Colorectal Cancer Progression by Recruiting Tumor-Associated Neutrophils via the CXCL1/8-CXCR2 Axis. *Clin. Cancer Res.*, **25**, 2887–2899. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3684
- Okita, A., Takahashi, S., Ouchi, K., Inoue, M., Watanabe, M., Endo, M., Honda, H., Yamada, Y. & Ishioka, C. (2018). Consensus molecular subtypes classification of colorectal cancer as a predictive factor for chemotherapeutic efficacy

- against metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*, **9**, 18698–18711. DOI: 10.18632/oncotarget.24617
- Papageorgis, P., Cheng, K., Ozturk, S., Gong, Y., Lambert, A., Abdolmaleky, H., Zhou, J. & Thiagalingam, S. (2011). Smad4 Inactivation Promotes Malignancy and Drug Resistance of Colon Cancer. *Cancer Res.*, **71**, 1–11. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3269
- Papoutsoglou, P. & Moustakas, A. (2020). Long non-coding RNAs and TGFbeta signaling in cancer. *Cancer Sci.*, **111**, 2672–2681. DOI:10.1111/cas.14509
- Pino, M. & Chung, D. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, **138**, 2059–2072. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.12.065
- Popat, S. & Houlston, R. (2005). A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur. J. Cancer*, **41**, 2060–2070. DOI: 10.1016/j.ejca.2005.04.039
- Popēna, I., Ābols, A., Saulīte, L., Pleiko, K., Zandberga, E., Jēkabsons, K., Endzeliņš, E., Llorente, A., Linē, A. & Riekstiņa, U. (2018). Effect of colorectal cancer-derived extracellular vesicles on the immunophenotype and cytokine secretion profile of monocytes and macrophages. *Cell Commun. Signal.*, **16**, 1–12. DOI: 10.1186/s12964-018-0229-y
- Principe, D., DeCant, B., Staudacher, J., Vitello, D., Mangan, R., Wayne, E., Mascariñas, E., Diaz, A., Bauer, J., McKinney, R., Khazaie, K., Pasche, B., Dawson, D., Munshi, H., Grippo, P. & Jung, B. (2016). Loss of TGF $\beta$  signaling promotes colon cancer progression and tumor-associated inflammation. *Oncotarget*, **8**, 3826–3839. DOI: 10.18632/oncotarget.9830
- Qin, F., Liu, X., Chen, J., Huang, S., Wei, W., Zou, Y., Liu, X., Deng, K., Mo, S., Chen, J., Chen, X., Huang, Y. & Liang, W. (2020). Anti-TGF- $\beta$  attenuates tumor growth via polarization of tumor associated neutrophils towards an anti-tumor phenotype in colorectal cancer. *J. Cancer*, **11**, 2580–2592. DOI: 10.7150/jca.38179
- Qu, Y., Dou, B., Tan, H., Feng, Y., Wang, N. & Wang, D. (2019). Tumor microenvironment-driven non-cell-autonomous resistance to antineoplastic treatment. *Mol. Cancer.*, **18**, 69. DOI: 10.1186/s12943-019-0992-4
- Rai, A., Greening, D., Chen, M., Xu, R., Ji, H. & Simpson, R. (2018). Exosomes derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells contribute to functional heterogeneity of activated fibroblasts by reprogramming their proteome. *Proteomics*, **19**, e1800148. DOI: 10.1002/pmic.201800148
- Raposo, G. & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell. Biol.*, **200**, 373–383. DOI: 10.1083/jcb.201211138
- Ringuette, C., Bernard, G., Tremblay, S., Chabaud, S., Bolduc, S. & Pouliot, F. (2018). Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into Cancer-Associated Fibroblasts through TGF $\beta$  Signaling. *Mol. Cancer Res.*, **16**, 1196–1204. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0784
- Robertson, I. & Rifkin, D. (2016). Regulation of the bioavailability of TGF- $\beta$  and TGF- $\beta$ -related proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, a021907. DOI: 10.1101/cshperspect.a021907
- Rodrigues-Junior, D. M., Tsirigoti, C., Lim, S. K., Heldin, C.-H. & Moustakas, A. (2022). Extracellular vesicles and transforming growth factor beta signaling in cancer. *Front. Cell. Dev. Biol.*, **10**, 849938. DOI:10.3389/fcell.2022.849938
- Roelands, J., Kuppen, P., Vermeulen, L., Maccalli, C., Decock, J., Wang, E., Marincola, F., Bedognetti, D. & Hendrickx, W. (2017). Immunogenomic Classification of Colorectal Cancer and Therapeutic Implications. *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 2229. DOI: 10.3390/ijms18102229
- Rossowska, J., Anger, N., Wegierek, K., Szczygiel, A., Mierzejewska, J., Milczarek, M., Szermer-Olearnik, B. & Pajtasz-Piasecka, E. (2019). Antitumor Potential of Extracellular Vesicles Released by Genetically Modified Murine Colon Carcinoma Cells With Overexpression of Interleukin-12 and shRNA for TGF- $\beta$ 1. *Front. Immunol.*, **10**, 211. DOI:10.3389/fimmu.2019.00211
- Sansom, O. J., Reed, K. R., Hayes, A. J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I. P., Battle, E., Simon-Assman, P., Clevers, H., Nathke, I. S., Clarke, A. R. & Winton, D. J. (2004). Loss of Apc *in vivo* immediately perturbs Wnt signaling, differentiation and migration. *Genes Dev.*, **18**, 1385–1390.
- Sarli, L., Bottarelli, L., Bader, G., Iusco, D., Pizzi, S., Costi, R., D'Adda, T., Bertolani, M., Roncoroni, L. & Bordi, C. (2004). Association between recurrence of sporadic colorectal cancer, high level of microsatellite instability, and loss of heterozygosity at chromosome 18q. *Dis. Colon Rectum*, **47**, 1467–1482. DOI: 10.1007/s10350-004-0628-6
- Shang, A., Gu, C., Wang, W., Wang, X., Sun, J., Zeng, B., Chen, C., Chang, W., Ping, Y., Ji, P., Wu, J., Quan, W., Yao, Y., Zhou, Y., Sun, Z. & Li, D. (2020). Exosomal circPACRGL promotes progression of colorectal cancer via the miR-142-3p/miR-506-3p-TGFB1 axis. *Mol. Cancer.*, **19**, 117. DOI:10.1186/s12943-020-01235-0
- Shelke, G., Yin, Y., Jang, S., Lässer, C., Wennmalm, S., Hoffmann, H., Li, L., Gho, Y., Nilsson, J. & Lötvall, J. (2019). Endosomal signalling via exosome surface TGF $\beta$ -1. *J. Extracell. Vesicles*, **8**, 1650458. DOI: 10.1080/20013078.2019.1650458
- Suwakulsiri, W., Rai, A., Xu, R., Chen, M., Greening, D. & Simpson, R. (2019). Proteomic profiling reveals key cancer progression modulators in shed microvesicles released from isogenic human primary and metastatic colorectal cancer cell lines. *BBA-Proteins and Proteomics*, **1867**, 14017. DOI: 10.1016/j.bbapap.2018.11.008
- Szczepanski, M., Szajnik, M., Welsh, A., Whiteside, T. & Boyiadzis, M. (2011). Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming



- growth factor-beta1. *Haematologica*, **96**, 1302–1309. DOI: 10.3324/haematol.2010.039743
- Tecalco-Cruz, A. C., Rios-Lopez, D. G., Vazquez-Victorio, G., Rosales-Alvarez, R. E. & Macías-Silva, M. (2018). Transcriptional cofactors Ski and SnoN are major regulators of thre TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway in health and disease. *Sig. Transduct. Target. Ther.*, **3**, 15. DOI: 10.1038/s41392-018-0015-8
- The Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, **487**, 330–337. DOI: 10.1038/nature11252
- Toledo-Padilla, D., Coquis-Bucio, D. A., Sosa-Garrocho, M. & Macías-Silva, M. (2023). Síntesis, secreción y activación de la citocina TGF- $\beta$ : Relevancia en la salud y la enfermedad. *Rev. Edu. Bioq.*, (En prensa).
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V., Zhou, S., Diaz, L., Jr. & Kinzler, K. (2013). Cancer genome landscapes. *Science*, **339**, 1546–1558. DOI: 10.1126/science.1235122
- Voorneveld, P., Kodach, L., Jacobs, R., Liv, N., Zonneville, A., Hoogenboom, J., Biemond, I., Verspaget, H., Hommes, D., de Rooij, K., van Noesel, C., Morreau, H., van Wezel, T., Offerhaus, G., van den Brink, G., Peppelenbosch, M., Ten Dijke, P. & Hardwick, J. (2014). Loss of SMAD4 alters BMP signaling to promote colorectal cancer cell metastasis via activation of Rho and ROCK. *Gastroenterology*, **147**, 196–208. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.03.052
- Webber, J., Steadman, R., Mason, M., Tabi, Z. & Clayton, A. (2010). Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res.*, **70**, 9621–9630. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1722
- Wrana, J., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. & Massagué, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, **370**, 341–347. DOI: 10.1038/370341a0
- Xu, R., Greening, D., Chen, M., Rai, A., Ji, H., Takahashi, N. & Simpson, R. (2019). Surfaceome of Exosomes Secreted from the Colorectal Cancer Cell Line SW480: Peripheral and Integral Membrane Proteins Analyzed by Proteolysis and TX114. *Proteomics*, **19**, e1700453. DOI: 10.1002/pmic.201700453
- Yamada, N., Kuranaga, Y., Kumazaki, M., Shinohara, H., Taniguchi, K. & Akao, Y. (2016). Colorectal cancer cell-derived extracellular vesicles induce phenotypic alteration of T cells into tumor-growth supporting cells with transforming growth factor-B1-mediated suppression. *Oncotarget*, **7**, 27033–27043. DOI:10.18632/oncotarget.7041
- Yan, W., Liu, Z., Yang, W. & Wu, G. (2018). miRNA expression profiles in Smad4-positive and Smad4-negative SW620 human colon cancer cells detected by next-generation small RNA sequencing. *Cancer Manag. Res.*, **10**, 5479–5490. DOI: 10.2147/CMAR.S178261
- Yen, E., Miaw, S., Yu, J. & Lai, I. (2017). Exosomal TGF- $\beta$ 1 is correlated with lymphatic metastasis of gastric cancers. *Am. J. Cancer Res.*, **7**, 2199–2208. PMID: 29218244; PMCID: PMC5714749
- Zhang, L., Naeem, A., Wei, S., Li, Z., Zang, Z., Wang, M., Liu, Y. & Su, D. (2019). PPTS Inhibits the TGF- $\beta$ 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Colorectal Cancer SW480 Cells. *Evid-Based Complement. Alternat. Med.*, **2019**, 1–10. DOI: 10.1155/2019/2683534
- Zhang, N., Li, L., Luo, J., Tan, J., Hu, W., Li, Z., Wang, X. & Ye, T. (2021). Inhibiting microRNA-424 in bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes suppresses tumor growth in colorectal cancer by upregulating TGFBR3. *Arch. Biochem. Biophys.*, **709**, 108965. DOI:10.1016/j.abb.2021.108965
- Zhang, Y., Wang, S., Lai, Q., Fang, Y., Wu, C., Liu, Y., Li, Q., Wang, X., Gu, C., Chen, J., Cai, J., Li, A. & Liu, S. (2020). Cancer-associated fibroblasts-derived exosomal miR-17-5p promotes colorectal cancer aggressive phenotype by initiating a RUNX3/MYC/TGF-b1 positive feedback loop. *Cancer Lett.*, **491**, 22–35. DOI:10.1016/j.canlet.2020.07.023
- Zhang, Z., Xing, T., Chen, Y. & Xiao, J. (2018). Exosome-mediated miR-200b promotes colorectal cancer proliferation upon TGF-B1 exposure. *Biomed. Pharmacother.*, **106**, 1135–1143. DOI:10.1016/j.biopha.2018.07.042
- Zhao, J., Schlößer, H., Wang, Z., Qin, J., Li, J., Popp, F., Popp, M., Alakus, H., Chon, S., Hansen, H., Neiss, W., Jauch, K., Bruns, C. & Zhao, Y. (2019). Tumor-Derived Extracellular Vesicles Inhibit Natural Killer Cell Function in Pancreatic Cancer. *Cancers*, **11**, 874. DOI: 10.3390/cancers11060874