UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE CÉLULAS MESENQUIMALES SOBREEXPRESANDO TRAIL SOLUBLE EN CÉLULAS MADRE DE TUMOR DE CANCER COLORRECTAL

por

M.C. Adriana Guadalupe Quiroz Reyes

Como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

JULIO 2024

Determinación de Actividad Antitumoral de Células Mesenquimales Sobreexpresando TRAIL Soluble en Células Madre de Tumor de Cáncer Colorrectal.

Aprobación de la tesis:

Dra. C. ELSA NANCY GARZA TREVING

Directora de tesis

Dra. Med. Paulina Delgado González

Co-Director de tesis

ŧ

Dr. C. José Francisco Islas Cisneros

Miembro de la Comisión

Dr. C. Alberto Camacho Morales

Miembro de la Comisión

Dr. C. Adolfo Seto Demínguez

Miembro de la Comisión

Dr. Med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Subdirector de Estudios de Posgrado

Esta investigación se llevó a cabo en la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Facultad de Medicina y Hospital Universitario "José Eleuterio González", Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.

Con la colaboración de la siguiente dependencia: Departamento de Histología, Facultad de Medicina y Hospital Universitario "José Eleuterio González".

Colaboradores

Dr. C. Humberto Rodríguez Rocha Departamento de Histología

Dr. C. Gerardo Padilla Rivas Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Este trabajo de investigación fue autorizado por el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina de la UANL con el número de registro BI21-00005 y financiado por el Programa de apoyo a la Ciencia, Tecnología e Innovación de la UANL (PAICYT2019, ProACTI-UANL196-MCS-2023)

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con mucho amor para mi familia. Gracias Papá y Mamá por enseñarme que los sueños sí se cumplen mientras uno no deje de perseguirlos. Gracias Hermana por ser mi pilar y acompañarme en las buenas y malas.

Enséñame a cumplir tu voluntad, pues tú eres mi Dios. Tu espíritu bueno me guíe por tierra llana. Salmo 143 (142), 10

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León por ser mi hogar estos 6 años de preparación académica.

Agradezco al laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular por las enseñanzas de estos 6 años. A las Doctoras Elsa y Paulina por sus enseñanzas, consejos y alegrías compartidas. Gracias al Doctor Islas, al Doctor Padilla, al Doctor Camacho y al Doctor Soto por los consejos y regaños, que me ayudaron a ser hoy una investigadora. Lo logramos.

Gracias especiales a mis compañeros de laboratorio Antonio, Michelle, Selene y Oscar por apoyarme para terminar esta investigación y por las memorias compartidas. También gracias a todos los estudiantes de servicio social que participaron en este proyecto, en especial a Carmina, Alexia, Brenda y Elena.

Agradezco también a la Doctora Ana María Rivas y la Doctora Sonia por sus consejos y por impulsarme a dar siempre lo mejor de mi.

Gracias a Cynthia, Tania, Fernanda y Sofía por su ayuda en el laboratorio, así como su amistad y las risas compartidas.

Doy gracias también a todos los amigos que hice en este camino: Paola, Samuel, Pablo, Daniel, Larli, Luis, Itzel, Sergio y Juan de Dios.

Gracias al personal administrativo del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular: Juany, Deyanira, Violeta y Laura por su atención diaria.

Por último, gracias a CONAHCYT por la beca de posgrado para sustentar mis estudios.

ÍNDICE

	Página
Índice de figuras	νĪ
Índice de tablas	VIII
Abreviaturas	IX
Resumen	Х
Abstract	XI

Página

1.	INTR	RODUCCIÓN	1
1	.1. Me	ecanismos generales de inicio del cáncer	1
1	.2. Tu	mores sólidos	2
1	.3. Ad	lenocarcinoma colorrectal	3
	1.3.1	. Clasificación de CCR	6
	1.3.3	B. Diagnóstico y tratamiento	8
1	.4. Cé	lulas madre de tumor	9
1	.5. Tra	ansición Epitelial-Mesenquimal	13
1	.6. Qu	imiorresistencia en el cáncer	15
1	.7. Te	rapias actuales contra células madre de tumor	16
1	.8. Cé	lulas madre mesenquimales	17
1	.9. CN	/M adultas en el tratamiento del cáncer	19
1	.10. M	lodificación genética de las CMM	20
	1.10.	1. Empleo de lentivirus para modificación genética de CMM	20
1	.11. E	xpresión de proteínas antitumorales por CMM genéticamente modificadas	26
	1.11.	1. TRAIL	26
2.	ANT	ECEDENTES DIRECTOS	32
3.	JUS	TIFICACIÓN	34
4.	HIPĆ	ÓTESIS	35
5.	OBJ	ETIVOS	36
5	.1.	Objetivo general	36
5	.2.	Objetivos específicos	36
6.	EST	RATEGIA EXPERIMENTAL	37
7.	МАТ	ERIALES Y MÉTODOS	38

8.	RESULTADOS	54
9.	DISCUSIÓN	
10.	CONCLUSIÓN	81
11.	PERSPECTIVAS	82
12.	REFERENCIAS	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Principales características de las células tumorales	2
Figura 2. Proceso de desarrollo de CCR	4
Figura 3. Clasificación TNM del cáncer de CCR	7
Figura 4. Vías de señalización activadas en las CMT	13
Figura 5. Mecanismo inducción de apoptosis por TRAIL	28
Figura 6. Comparación de estructuras de TRAIL completo y TRAIL	29
soluble.	
Figura 7. Estrategia experimental	37
Figura 8. CMM-MO en cultivo	54
Figura 9. CMM sobreexpresando la proteína GFP	55
Figura 10. Western Blot de TRAIL	56
Figura 11. Niveles de concentración de TRAIL soluble en	57
sobrenadante a las 48 h	
Figura 12. Caracterización de marcadores mesenquimales tras	58
modificación genética	
Figura 13. Líneas celulares de cáncer colorrectal	59
Figura 14. Expresión del receptor DR5 en líneas celulares de CCR	60
Figura 15. Expresión del receptor DR5 en tejidos de CCR	61
Figura 16. Sensibilidad a TRAIL recombinante en líneas celulares de	62
CCR	
Figura 17. Expresión de marcadores de CMT en línea celular Caco-2	63
Figura 18. Expresión de marcadores de CMT en línea celular CMT-93	63
Figura 19. Gráfica de linealidad para determinación de IC50 de	65
quimioterapias en células Caco-2	
Figura 20. Gráfica de linealidad para determinación de IC50 de	65
quimioterapias en células CMT-93	
Figura 21. Co-cultivo CMM expresando TRAIL y líneas celulares de	67
CCR	

Figura 22. Análisis de muerte celular en co-cultivos de CMM 68 sobreexpresando TRAIL y células tumorales pre-tratadas con Oxaliplatino

Figura 23. Análisis de apoptosis en co-cultivos de CMM 69 sobreexpresando TRAIL y células tumorales pre-tratadas con Oxaliplatino

Figura 24. Análisis individual de apoptosis en co-cultivos de CMM70sobreexpresandoTRAIL y células tumorales pre-tratadas conOxaliplatino

Figura 25. Actividad citotóxica de CMM sobreexpresando TRAIL72soluble contra CMT de CCR

Figura 26. Expresión de receptor de TRAIL DR5 bajo estímulo de 73 quimioterapia

Figura 27. Efecto de Oxaliplatino y CMM sobreexpresando TRAIL75soluble en la expresión de genes de CMT de CCR

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Marcadores de identificación de CMT	12
Tabla 2. Vectores virales más frecuentes en terapia génica	21
Tabla 3. Tratamientos experimentales	47
Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos	49
Tabla 5. Concentración citotóxica media (IC50) de fármacos	64
quimioterapéuticos en líneas celulares de CCR.	

ABREVIATURAS

CMT	Célula madre de tumor
CCR	Cáncer colorrectal
CMM	Células Madre Mesenguimales
МО	Médula ósea
TRAILc	Forma completa unida a membrana celular del ligando
	inductor de la apoptosis relacionado con el Factor de
	Necrosis Tumoral
TRAILs	Forma soluble del ligando inductor de la apoptosis
	relacionado con el Factor de Necrosis Tumoral
DR5	Receptor de muerte 5 (Death receptor 5)
MOI	Multiplicidad de infección
Kg	Kilogramo
g	Gramo
μg	Microgramo
mL	Mililitro
μL	Microlitro
nM	Nanomolar
рМ	Picomolar
μm	Micrómetro
nm	Nanómetro
h	Hora
min	Minuto
seg	Segundo
rpm	Revoluciones por minuto
KDa	Kilodalton
HRP	Peroxidasa de rábano picante (Horse-radish peroxidase)
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
SFB	Suero fetal bovino
°C	Grado Celsius
PMC	Porcentaje de muerte celular
Pb	Pares de bases

RESUMEN

M.C. Adriana Guadalupe Quiroz Reyes

Título: "Determinación de actividad antitumoral de Células Mesenquimales sobreexpresando TRAIL soluble en Células Madre de Tumor de Cáncer Colorrectal".

Introducción: El desarrollo de resistencia es muy frecuente en los tratamientos de cáncer colorrectal (CCR) por la presencia de células madre de tumor (CMT). El ligando de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) activa la apoptosis de células tumorales mediante la unión a los receptores DR4 y DR5. Las células madre mesenquimales (CMM) han sido propuestas como sistemas de entrega de TRAIL. Además, se ha reportado que la combinación con quimioterapia puede incrementar el efecto de TRAIL sobre las células tumorales y poblaciones de CMT. Objetivo: Analizar la capacidad de CMM-MO que sobreexpresan TRAIL soluble para generar apoptosis en CMT de líneas celulares y un aislado de células madre de tumor de CCR. Materiales y métodos: La modificación genética de las CMM fue mediante lentivirus para la expresión de TRAIL. Esta se validó mediante Western blot y ELISA. Se determinó la expresión del receptor DR5, CD44, CD24, CK-18 y ABCB1 mediante inmunofluorescencia en líneas celulares de CCR (CMT-93 y Caco-2). El receptor DR5 también se determinó en biopsias de CCR de una colección histórica de tejidos. También se evaluó la concentración citotóxica media (IC50) a TRAIL recombinante y a 5-Fluorouracilo, Oxaliplatino e Irinotecán. Se probó la actividad citotóxica y apoptótica de las CMM sobreexpresando TRAIL soluble en co-cultivo con líneas celulares de CCR (Caco-2. CMT-93 y un aislado de CMT) de forma individual y en combinación con un pre-tratamiento con Oxaliplatino mediante luminiscencia. Por medio de Transwell® se evaluó la actividad de TRAIL soluble contra CMT de la línea celular Caco-2. Cambios en la expresión de marcadores de CMT CD44v6, CK-18 y EpCAM se evaluaron mediante qPCR después del tratamiento. Resultados: Las CMM presentaron una eficiencia de transducción de más del 70% para TRAIL, observando la proteína por Western blot y una concentración promedio de 328.3 ± 90.13 pg/mL en sobrenadantes de CMM modificadas con TRAIL soluble. Las líneas celulares de CCR CMT-93 y Caco-2 presentaron altos niveles de co-expresión de marcadores de CMT CD44/CD24, CD44/CK18 y CK18/ABCB1 (>35%), así como más del 50% de expresión de los receptores DR5. Los tejidos de CCR expresaron niveles variados del receptor, sin verse relacionada la expresión con la quimioresistencia. Las líneas celulares de CCR mostraron resistencia moderada a TRAIL recombinante y resistencia a Oxaliplatino. La relación 1:6 de CMM-TRAIL soluble fue la que generó mayor citotoxicidad en las líneas celulares de CCR. El pre-tratamiento de Oxaliplatino y CMM-TRAIL incrementó la apoptosis de las líneas celulares de CCR sobreexpresando CD44. Además, se observó una reducción de marcadores de CMT mediante qPCR a las 24 y 48 h de tratamiento. Conclusión: El Oxaliplatino incrementa la sensibilidad a TRAIL soluble derivado de CMM en líneas celulares de CCR sobreexpresando marcadores de CMT.

Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño

Directora de Tesis

M.C. Adriana Guadalupe Quiroz Reyes

Title: "Determination of antitumoral activity of Mesenchymal Cells overexpressing Soluble TRAIL on Colorectal Cancer Cancer Stem Cells.

Introducción: Resistance development is very common in colorectal cancer (CRC) associated with cancer stem cells (CSC). Tumor necrosis factor related-apoptosis inducing ligand (TRAIL) can activate apoptosis on tumoral cells overexpressing TRAIL death receptors DR4 and DR5. Mesenchymal stem cells (MSC) have been proposed as TRAIL delivery systems. Besides, other groups have reported the combination approach of chemotherapy and TRAIL increases TRAIL's effect on cancer cells and CSC populations. Objective: Analyze the ability of soluble TRAIL derived by MSC for apoptosis induction on cell lines and CSC isolated of colorectal cancer. Materials and methods: Lentiviral transduction was used for overexpression of TRAIL on MSC. Protein expression was validated by western blot and ELISA. We identified DR5 receptor, CD44, CD24, CK.18, and ABCB1 expression by immunofluorescence on CRC cell lines (CMT-93 and Caco-2). DR5 death receptor also was identified on CRC biopsies from a historic tissue collection. We evaluated half-inhibitory concentration of recombinant TRAIL and 5-Fluorouracil, Oxaliplatin, and Irinotecan. It was determined the cytotoxic and apoptotic activity of MSC overexpressing soluble TRAIL by co-culture with CRC cell lines (Caco-2, CMT-93, and CSC isolated from biopsy) and its combination with a pre-treatment of Oxaliplatin by luminescence assays. By Transwell® co-culture was evaluated the soluble TRAIL activity against Caco-2 cell line. Changes in CSC gene expression of CD44v6, CK-18, and EpCAM were determined by qPCR at 24, 48, and 72 h after adding soluble TRAIL-MSC and Oxaliplatin treatment. Results: MSC had TRAIL (soluble and full-length) transduction efficiency of more than 70%; western blot showed TRAIL corresponding multimers bands and soluble TRAIL was detected on supernatants (328.3 ± 90.13 pg/mL). CRC cell lines CMT-93 and Caco-2 presented high co-expression levels of CMT markers CD44/CD24, CD44/CK18, and CK18/ABCB1 (>35%), as well as more than 50% of DR5 receptors expression. CRC tissues expressed diverse levels of DR5 receptor, from 8 to 60 %, without being related to chemoresistance. CRC cell lines showed moderated resistance to recombinant TRAIL and Caco-2 cell line and Px91 CSC isolate showed Oxaliplatin resistance. The soluble TRAIL-MSC 1:6 rate increased the cytotoxicity more on CRC cell lines. Combinate treatment of Oxaliplatin and TRAIL-MSC increased apoptosis on Caco-2 and PX91 CSC isolate cell lines, and induced apoptosis-related changes on cells expressing CD44. There was a reduction of CSC markers by qPCR at 24 and 48 h of treatment. Conclusion: Oxaliplatin increased sensitivity to TRAIL derived from MSC on CRC cell lines overexpressing CSC markers.

Dra. Elsa Nancy Garza Treviño

Ta. LISa Naricy Gaiza Trevil

Thesis Director

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un proceso que involucra una serie de cambios genéticos y metabólicos en la célula, que culminan con el crecimiento celular descontrolado y la posterior diseminación hacia otros puntos del organismo. Un tumor puede desarrollarse en cualquier sitio del cuerpo e invadir otros tejidos [1]. Algunos de los factores modificables asociados con el cáncer son el tabaquismo, la inactividad física, obesidad, organismos infecciosos y dietas poco saludables que generan inflamación y mutaciones del ADN; así también se asocia a factores no modificables como sexo, edad, mutaciones genéticas hereditarias, alteración de hormonas e inmunodeficiencias [2]. En México, el cáncer es la cuarta causa de muerte, después de enfermedades cardiovasculares, COVID-19 y diabetes [3]. En el 2022, se registraron 207,154 nuevos casos de cáncer y 96,210 muertes en México [4].

1.1. Mecanismos generales de inicio del cáncer

De manera general, todos los agentes relacionados con el desarrollo del cáncer presentan como característica en común la capacidad de alterar el genoma de las células involucradas. Entre estos agentes se encuentran sustancias químicas, radiación ionizante, radiación ultravioleta y diversos virus. Las sustancias carcinógenas, como el asbesto o el humo de los cigarrillos, inducen mutaciones directa o indirectamente al convertirse en compuestos mutágenos, en algunos casos induciendo la activación y acción de enzimas celulares que participan en procesos celulares como la división celular, reparación del ADN [5]. Las alteraciones genéticas en las células cancerosas generalmente resultan en una reprogramación de los mecanismos de regulación homeostática (Figura 1) [6].

Existen alteraciones que marcan pauta de la transformación de células sanas hacia la formación del tumor; entre ellos se incluye la estimulación del crecimiento, la evasión de señales supresoras del crecimiento, resistencia a apoptosis, replicación ilimitada, inducción de angiogénesis y activación de mecanismos de invasión y metástasis [7].



Figura 1. Principales características de las células tumorales [8]. Las células pasan por alteraciones genéticas que resultan en cambios metabólicos para favorecer su proliferación, resistencia a la muerte celular, evasión del sistema inmune e invasión a otros tejidos.

1.2. Tumores sólidos

Durante el 2022 a nivel mundial los tipos de cáncer más frecuentemente diagnosticados fueron: pulmón (12.4 %), mama (11.5 %), colorrectal (9.6 %), próstata (7.3 %) y estómago (4.8 %). Sin embargo, visualizando el cáncer en base a nivel de mortalidad destacaron cánceres asociados a pulmón (18.7 %), colorrectal (9.3 %), hígado (7.8 %), estómago (6.8 %) y mama (6.8%), con un total de 9 743 832 muertes [4]. Entre los antes mencionados tienen la característica común de presentar tumores sólidos, y de tener la capacidad de diseminarse hacia otros tejidos generando tumores secundarios.

Un tumor sólido se define como un conjunto de células anormales que forman cúmulos o masas. Éstos pueden desarrollarse en cualquier sitio del organismo, crecer y presentar un comportamiento distinto dependiendo de si son cancerosos (malignos) o no cancerosos (benignos) que no se extiende de forma agresiva ni invade otros tejidos. Un tumor es canceroso cuando puede extenderse a tejidos cercanos o diseminarse por el torrente sanguíneo hacia otros tejidos. Cuando las células tumorales se dispersan de un tumor primario hacia otros tejidos, se denomina metástasis [9].

El modelo de metástasis establece que dentro de los tumores primarios una pequeña fracción celular puede presentar cambios genéticos que le permitan adquirir la capacidad de migrar. Estas células denominadas como células madre de tumor (CMT), presentan las propiedades de autorrenovación, diferenciación, resistencia terapéutica, evasión inmune e invasión [10]. Para establecer la metástasis, las CMT deben ser capaces de sobrevivir en la sangre o circulación linfática e invadir tejidos distantes, y finalmente, establecer un tumor secundario [11]. Por ello se han vuelto un atractivo blanco terapéutico en el tratamiento del cáncer para desarrollo de terapias efectivas a largo plazo [10].

1.3. Adenocarcinoma colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR), es el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia y la segunda causa de muerte asociada a cáncer a nivel mundial [12]. La mayoría de los casos de CCR surgen de manera esporádica o asociado a factores modificables del ambiente; sin embargo, el 20% tienen un origen hereditario, presentándose como cáncer colorrectal hereditario no-poliposo (CCHNP) y poliposis adenomatosa familiar (PAF), en donde surgen múltiples pólipos o bultos anormales en el tubo gastrointestinal [13]. Entre los factores de riesgo modificables del CCR esporádico se encuentran la dieta rica en carne y grasa, y bajo consumo de fibra, folatos y calcio, obesidad, vida sedentaria, fumar, elevado consumo de

alcohol, que desencadenan una mayor inflamación en el colon, produciendo una liberación aberrante de citocinas, productos metabólicos y mayor flujo sanguíneo que promueven la carcinogénesis; por otro lado, el riesgo también incrementa con la edad y el sexo masculino [13], [14].

Esta suma de factores ambientales y genéticos genera cambios en las células de la mucosa del intestino grueso y recto que lleva a la transición de mucosa normal a pólipos, formación de adenomas benignos y luego a progresar hacia una displasia severa donde se descontrola el ciclo celular generando una proliferación excesiva que culmina en carcinoma (Figura 2). Los pólipos pueden ser de dos tipos: hiperplásicos y adenomatosos. Los pólipos hiperplásicos contienen un elevado número de células glandulares con disminución del moco citoplasmático [15].



Figura 2. Proceso de desarrollo de CCR. Las células de la mucosa del intestino grueso y recto que pueden presentar mutaciones genéticas que llevan a la transición y proliferación de mucosa normal a pólipos adenomatosos, progresión hacia una displasia severa donde se descontrola el ciclo celular generando una proliferación excesiva que culmina en adenocarcinoma y cáncer metastásico.

El riesgo de CCR aumenta con el número de pólipos adenomatosos dentro del intestino; entre los factores de riesgo que incrementan la malignidad de los pólipos hiperplásicos incluyen el tamaño mayor a 1 cm de diámetro, donde suelen presentarse mutaciones en el oncogen *KRAS* y mutaciones que llevan a la pérdida de función de *TP53*, localización en el colon derecho por su difícil detección, un foco de adenoma dentro del pólipo, más de 20 pólipos hiperplásicos dentro del colon, una historia familiar de poliposis y de CCR [15], [16].

Los adenomas pueden transformarse a cáncer mediante dos vías clásicas, la vía supresora y la vía mutadora. La vía supresora es responsable del 85% de los casos esporádicos de CCR. Los genes de esta vía regulan el crecimiento, y las mutaciones clave en esta vía es en gen supresor de tumores Adenomatus polipus coli (*APC*) y en el gen de β -catenina *CTNNB1*, importantes en la vía de señalización Wnt/ β . La mutación en el gen *APC* se encuentra en al menos del 80 al 85% de los casos de CCR, principalmente durante el desarrollo de adenomas en las criptas displásicas, generando una resistencia a la degradación de β -catenina por el proteosoma, acumulándose y promoviendo la sobreexpresión de oncoproteínas y la proliferación celular [15], [17].

Por su parte, la vía mutadora también llamada de inestabilidad de microsatélite (MSI, del inglés *microsatellite instability*) se ha asociado con el 15% de los CCR esporádicos, con el síndrome de Lynch I o HNPCC (del inglés *hereditary non-polyposis colorectal cancer*), y es más frecuente que se genere en el colon proximal. Su nombre viene dado por las mutaciones en regiones microsatélite, acompañado de estabilidad cromosómica, dando tumores diploides. Esta mutación lleva a fallas en el sistema de reparación del ADN por *mismatch*, alterando genes del ciclo celular como *CTNNB1*, *TGF-βIIR*, *IGF-IIR*, *BAX* y *PTEN* [17]. Otros genes supresores de tumores que se ven comprometidos son *DCC*, *DCP4*/ *Smad4*, *p53*, *nm32*, y oncogenes *K-ras*, *c-myc*, *c-neu*, *c-erb-2*, *c-src*. En CCHNP ocurren mutaciones germinales en alguno de los 5 genes de reparación del ADN, siendo más frecuentes las mutaciones en los genes MSH2 o MLH1. Además, otros genes

supresores de tumores como *TGF-βRII, IGF2R, y BAX* están mutados en esta vía [13].

Existe otra vía de carcinogénesis de CCR que es la vía aserrada, que incluye mutaciones en los genes *KRAS* y *BRAF*, generando malignización del tejido a partir de pólipos aserrados, los cuales tienen una apariencia de pólipos hiperplásicos con una base de cripta estrecha y una morfología dentada superior. Hasta un 20% de todos los CCR se desarrolla por esta vía, donde hay una metilación extensa del ADN [16], [17].

Se reporta que el 20 al 25% de los pacientes con CCR presentan metástasis al momento del diagnóstico, y el 25% lo desarrollará durante el transcurso del seguimiento [18]. La metástasis a hígado ocurre fácilmente en estadios tempranos debido al drenaje venoso del colon por la vía portal. Otros sitios donde ocurre metástasis son los pulmones, peritoneo, pelvis y glándulas adrenales, frecuentemente posterior a metástasis hepática y linfática [15], [19].

1.3.1. Clasificación de CCR

El CCR puede clasificarse según el tamaño del tumor e invasión a nódulo linfaticos u órganos distantes. Esta clasificación se denomina como TNM por la profundidad del tumor primario (T), la invasión a nódulos linfáticos locales (N) y la metástasis a tejidos distantes (M). En la clasificación TNM, el cáncer de colon invasivo se clasifica del estadio I al IV [15]. En el estadio I el tumor se limita a la pared del intestino (mucosa, mucosa muscular, submucosa y mucosa propria). El estadio II involucra que el tumor ya se extendió a tejido extramural, donde el cambio en la invasividad viene dado por MSI-H y una mayor frecuencia de mutación en el gen *BRAF* [20]. Por otro lado, el estadio III presenta nódulos regionales infiltrados,

y en el estadio IV el cáncer se ha extendido afectando a órganos alejados del colon o recto como hígado, pulmón o huesos (Figura 3) [21].



Figura 3. Clasificación TNM de CCR. El estadio I implica un tumor delimitado al intestino. El estadio II involucra extención a tejido extramural. El estadio III presenta nódulos regionales infiltrados. El estadio IV representa un cáncer metástasico a órganos alejados como hígado, pulmón o huesos

El CCR también se puede clasificar como bien diferenciado, moderadamente bien diferenciado o poco diferenciado según el grado de conservación de la arquitectura normal de las glándulas mucosas y aspectos citológicos. Más del 90% de los CCR son adenocarcinomas que se originan en las células epiteliales de la mucosa colorrectal. El adenocarcinoma se caracteriza por el crecimiento glandular, ya que en adenocarcinomas bien diferenciados más del 95% del tumor es de este tipo. Los adenocarcinomas moderadamente diferenciados presentan 50-95% de formación de glándulas. Los poco diferenciados son principalmente sólidos con menos del 50% de formación de glándulas [22]. Describir un tejido como poco diferenciado es un marcador histológico que indica la presencia de abundantes mutaciones genéticas, y aproximadamente 20% de los cánceres son de esta categoría. El 15% de los CCR se clasifican como mucinosos o coloides debido a la acumulación intracelular de mucina. Esta variante es muy agresiva y tiene mal pronóstico [15].

1.3.2. Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico del CCR se basa en la colonoscopía, estudios de imagen como tomografía computarizada (CT), resonancia magnética imagen (MRI) y tomografía de emisión de positrones (PET), además del estudio histopatológico de la biopsia, el cual es crucial para confirmar el diagnóstico, el manejo apropiado del paciente, establecimiento del pronóstico y asesoramiento familiar [13], [22]. Adicionalmente, la determinación de los niveles de antígeno carcinoembrionario antes y después de la cirugía nos orientan el pronóstico del paciente, los cuales se correlacionan con la profundidad invasiva del tumor, metastasis a nódulos linfáticos, estadio TNM y recurrencia [23]. Niveles menores a 5 ng/mL antes de la cirugía en pacientes con CCR tuvieron una mayor sobrevida que aquellos con valores superiores, indicando no solo la respuesta de los pacientes sino también estabilidad del cáncer [24], [25].

Dentro de los tratamientos comunmente utilizados está la cirugía como primer método de elección para la eliminación de los tumores, sin embargo, cuando se tienen estadios avanzados (II y III) se recomienda el uso de un tratamiento adyuvante como la radioterapia y quimioterapia para reducir su tamaño y poder eliminarlos por completo [21]. Así mismo, se administran estos tratamientos para prevenir reincidencias y metástasis [13], debido a que incluso después de la resección del tumor, en 75% de los pacientes puede presentarse reincidencia, y de eso el 50% son en el hígado, contribuyendo a las altas tasas de mortalidad reportadas en CCR [26]. Se recomienda el uso de quimioterapia basada en Fluorouracilo en pacientes con CCR en estadio III y es menos usada en estadio II. Se han introducido nuevos regímenes de fármacos citotóxicos que contienen Irinotecán y Oxaliplatino como FOLFOX (Oxaliplatino, 5-Fluorouracilo (5-FU) y Leucovorina) y FOLFIRI (Irinotecán, 5-FU y Leucovorina) en pacientes en estadio II y III. Estos tienen respuestas entre 39% y 55% con sobrevivencia libre de enfermedad entre 7 a 9 meses [13]. El tratamiento estándar en el estadio III es un esquema doble de Oxaliplatino y 5-FU/ leucovorina (FOLFOX-4 o FLOX). También se pueden usar esquemas con 5-FU/ leucovorina o Capecitabina [21]. La terapia adyuvante con anticuerpos monoclonales contra la glicoproteína 17-1a (Edrecolomab) ha mostrado una sobrevivencia libre de enfermedad a 3 años del 53% [13].

El estadio IV de CCR suele presentar enfermedad metastásica distal al momento del diagnóstico (25-30%). En este estadio el tratamiento estándar es la resección quirúrgica del tumor primario y de las metástasis, quimioterapia paliativa con los fármacos ya mencionados, así como uso de terapia biológica con anticuerpos monoclonales. La radiación al tumor primario y las metástasis también se puede usar para reducir sangrado, obstrucción o dolor [21].

1.4. Células madre de tumor

Las células madre son células indiferenciadas dentro del cuerpo que con sus propiedades de autorregeneración y pluripotencia pueden diferenciarse en cualquier célula dentro del organismo. Existen tanto células embrionarias como adultas [27]. Recientemente las investigaciones han revelado que las responsables de la recaída en el cáncer y metástasis son las Células Madre de Tumor (CMT), quienes promueven la progresión del cáncer mediante múltiples mecanismos. Las CMT constituyen una pequeña población celular dentro de los tumores, que comprende del 2-5% de la masa tumoral. Estas células comparten características de las células madre, como autorrenovación y diferenciación asimétrica. Además, pueden desarrollar resistencia a tratamientos con fármacos citostáticos e irradiación. También tienen la habilidad de reconstituir tumores y proliferar lentamente en un periodo de tiempo prolongado debido a la existencia de células quiescentes (fase G1 o G0 del ciclo celular), elevada capacidad de reparación del ADN y habilidad para tomar ventaja de vías de señalización para proliferación y sobrevivencia como lo son Wnt, Notch y Sonic hedgehog (Shh) [28], [29].

El término de CMT fue aplicado por primera vez en tumores sólidos por Clarke y cols. (2003). Ellos investigaron una subpoblación de CMT de mama expresando marcadores CD44⁺ CD24^{-/bajo} como la única población capaz de iniciar el desarrollo de tumores durante subcultivos celulares seriados en ratones inmunodeficientes [29]. Desde entonces, las CMT se han identificado en una gran variedad de cánceres con tumores sólidos, incluyendo glioblastoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de hígado y otros [10], [29]. Su presencia usualmente es demostrada mediante aumento de tumorogénesis y plasticidad en un grupo de células cancerígenas [30], pudiendo ubicarse en el mismo lugar donde se origina el tumor o migrar hacia otros sitios del cuerpo [31].

Como forma de identificación, las CMT en tumores sólidos, estas suelen expresar múltiples marcadores de superficie como CD133 (prominina-1), CD44 (molécula de adhesión celular de migración, *homing cell adhesion molecule*), CD90 (Thy-1), población celular lateral (SP), entre otras (Tabla 1). Mediante estos marcadores, las CMT pueden ser aisladas y enriquecidas *in vitro* e *in vivo*. Además, su potencial tumorogénico es caracterizado por su alta capacidad para formar un nuevo tumor cuando son trasplantadas en ratones inmunodeficientes aún a baja densidad clonal [32], [33]. Se ha encontrado que solo se requieren 100 células con este fenotipo para formar los tumores, mientras que miles de células con fenotipo diferente no son capaces de desarrollar tumores [32], [34]. El primer marcador empleado para el enriquecimiento de CMT en tumores sólidos fue CD133, una glicoproteína transmembranal. Sin embargo, CD133 se ha cuestionado como

marcador confiable para todos los tipos de cáncer, debido a que se expresa en algunos cánceres solo bajo estrés bioenergético, y en CCR se ha reportado metástasis de células que carecen del marcador CD133 [35]. Por otro lado, CD44 se ha reportado para identificar una población celular enriquecida en CMT en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) [30]. Las células CD44⁺ presentan propiedades de CMT como capacidad de formación de esferas *in vitro* y generar tumores en xenoinjerto. Además, se han caracterizado poblaciones de CMT de CCR mediante este marcador [36], [37]. La sobreexpresión de CD44 por las células de CCR se ha asociado con mayor capacidad de invasión y participación de nódulos linfáticos, siendo un predictor de la sobrevivencia [37], [38]. Se ha demostrado que CD44 y sus isoformas son marcadores confiables de CMT que pueden emplearse solos o en combinación con otros marcadores de superficie para identificar CMT de CCR, como por ejemplo CD166, CD29, CD24, CD26, Lgr-5 y Wnt/β-catenina [39]. Otro marcador es citoqueratina-18 (CK-18), que en CCR también está asociado con la sobrevivencia de los pacientes [40].

También se han empleado factores de transcripción para identificar CMT, como Oct-4 y Sox2, promoviendo la sobrevivencia, resistencia a tratamientos y las propiedades de célula madre [41]. En CCR se han identificado estos factores de manera incrementada, y además están relacionados con un incremento en la proliferación de las CMT y mal pronóstico en los pacientes [37]. Por otro lado, se define como población lateral o SP a una subpoblación de CMT capaz de expulsar el colorante de unión a DNA Hoechst 33342 hacia afuera de la membrana por medio de transportadores *ATP-binding cassette* (ABC). Esta población puede ser caracterizada como CMT en tejidos primarios de cánceres gastrointestinales y de ovario. Las células de la población lateral también se demostraron en líneas celulares de tumor de glioma, mama y tiroides [42].

Tabla 1. Marcadores de identificación de CMT.

MARCADORES DE CMT	TIPO DE CÁNCER	REFERENCIAS
CD44, CD117 (c-kit), CD133,	Ovario	[28]
ALDH1A1, Oct-4 (POU5F1), NANOG,		
BM11, Nestina		
CD34, CD38, CD19, CD26	Hematológico	[39]
CD44, CD24, CD133, ALDH	Mama	[39], [42]
ESA, CD61		
CD44, CD24, CD29, CD133, CD166,	Colon	[10], [37], [39],
EpCAM, LGR5, ALDH1, CK-18, ABCB1		[40], [42], [43]
CD90, CD133, CD15	Cerebro	[39], [42]
CD44, CD271	Cabeza y cuello	[30], [39]
CD20, CD271	Piel	[39]
CD4, CD90, CD133, CD13, EpCAM	Hígado	[39]
CD44, CD133, CD166	Pulmón	[39], [44]
CD133, ALDH	Endometrio	[39]
CD44, CD24, ESA, CD133, CXCR4,	Páncreas	[42], [45]
cMet, ALDH1		
CD44, α2β1 ^{hi} CD133	Próstata	[42]
Side population (Transportadores tipo	Glioma, mama y tiroides,	[42], [46], [47]
ABC, ABCG2)	pancreas	
Sox2	Glioblastoma	[10]

Marcadores intracelulares y de superficie identificados en diversos tipos de cáncer para la detección de CMT. CMT: Células Madre de Tumor.

Las CMT requieren de un microambiente específico extracelular, denominado nicho, el cual les permite mantener sus propiedades de célula madre y el fenotipo maligno de su progenie [48]. Dentro de este se encuentran diversos tipos de células como células endoteliales, pericitos, macrófagos, células mesenquimales, células inmunes y fibroblastos, así como matriz extracelular. En particular los fibroblastos asociados a cáncer tienen un papel en la remodelación de moléculas de adhesión intercelular (ICAMs) y citocinas como factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) e interleucina-6 (IL-6) que promueven la sobrevivencia y proliferación de las CMT [49]. Se ha reportado que el fenotipo de CMT se desarrolla por la transición epitelial mesenquimal (TEM), donde la combinación de mecanismos de mutación, proliferación y el microambiente tumoral lleva a las diferentes etapas de la evolución a célula madre como la formación de esferas, capacidad de invasión, expresión de marcadores, resistencia a fármacos [29], [50].

Dentro del microambiente, las CMT forman un complejo intercomunicado entre las células tumorales y las no tumorales, donde se dan interacciones célulacélula y mediante la secreción de factores paracrinos. Estos factores del microambiente mantienen la inmadurez mediante vías de autorrenovación como Wnt/β-catenina, TGF-β, MAPK, Notch y Hedgehog (Figura 4) [10], [33], [34].



Figura 4. Vías de señalización activadas en las CMT. Interrelación de Wnt/βcatenina, TGF-β, Notch y Hedgehog en cáncer [51].

1.5. Transición Epitelial-Mesenquimal

La transición epitelial-mesenquimal (TEM) es un fenotipo adquirido por las células epiteliales bajo ciertos estímulos del microambiente, incrementando su capacidad de migración, proliferación, invasión y cambio de morfología. Dicho proceso es importante para las CMT ya que aumenta su proliferación, formación de esferas y facilita la invasión a otros tejidos. Durante el proceso de TEM ocurre la pérdida de las uniones intercelulares basadas en cadherinas, claudinas y ocludinas, la secreción de metaloproteinasas y la pérdida de la polaridad basal por la reorganización del citoesqueleto, para adquirir atributos mesenquimales como morfología alargada y fibroblástica, así como un aumento en la capacidad de migración e invasión y la degradación de la matriz extracelular (MEC) [18], [52].

El mecanismo de TEM está regulado por cambios epigenéticos, factores de crecimiento y de transcripción. Entre los cambios epigenéticos destacan aquellos activados por hipoxia y TGF- β . Durante la hipoxia, la activación de la TEM es mediada por histona deacetilasa 3 (HDAC3) y WDR5 asociados con la marca de histona 3 lisina 4 acetilación (H3K4Ac), que funciona como un promotor de genes como *CDH1* y *VIM*. El TGF- β , induce cambios globales en la cromatina, remoción de la variante de histona (H2A.Z), y nuevos modificadores de cromatina como UTX, Rad21, PRMT5, RbBP5, entre otros [53].

Algunos factores de crecimiento que participan en la activación de la TEM son el factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF). El EGF promueve la TEM al reducir las uniones adherentes y desmosomas entre células de cáncer, promoviendo su capacidad de migrar, además de incrementar la actividad de metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9. Esto ocurre al mismo tiempo que se activan la vía de JAK2/STAT3 y de IL-6. De forma similar, el HGF también promueve la migración celular mediante la activación de c-Met, un receptor de tirosina cinasa, y al igual que el FGF, incrementa la actividad de Snail mediante la vía de MAPK. El PDGF activa la vía PI3K, al mismo tiempo que induce la acumulación de β-catenina en el núcleo. El IGF-II media la TEM por la translocación nuclear de β-catenina, la degradación de E-caderina y la sobreexpresión de ZEB1 [54].

Por otro lado, se han identificado los factores de transcripción que participan en la activación de TEM, los cuales orquestan los cambios en la expresión génica asociados al proceso. Estos factores se ubican en tres familias proteicas, Snail (SNAI1, SNAI2, SNAI3), ZEB (ZEB1 y ZEB2), y la hélice-alfa-hélice básica (TWIST1, TWIST2 y TCF3), las cuales activan las vías TGF β – SMAD y Wnt– β -catenina. Estos son proteínas que permiten la activación de transcripción de genes para la expresión adecuada de N-cadherina, vimentina, alfa actina de músculo liso (a-SMA), fibronectina, la proteína homeobox pareada (Prrx1). Esta última participa en la atenuación de la expresión complementaria de Snail1, y la pérdida de Prxx1 que es requerida para que las CMT puedan migrar hacia otros órganos [18]. El resultado final es la supresión de genes asociados con el fenotipo epitelial, como los de Ecadherina y citoqueratinas. Una vez modificado el fenotipo de las células tumorales, éstas entran a la circulación por medio de la sangre hacia distintos órganos, donde se adaptan al nuevo microambiente y desarrollan tumores secundarios o metástasis [52], [55].

1.6. Quimiorresistencia en el cáncer

Actualmente existe una gran variedad de opciones terapéuticas para el tratamiento del cáncer; no obstante, esta enfermedad continúa encabezando las causas de muerte más comunes a nivel mundial. El cáncer detectado en etapas tempranas puede ser tratado con mayor eficacia, sin embargo, en la mayoría de los casos los cánceres son diagnosticados en etapas tardías, cuando el cáncer ya ha progresado e invadido otros órganos. Además, después del tratamiento convencional pueden llegar a persistir algunas células residuales, las cuales son las principales causas de la recurrencia del tumor y metástasis. Evidencia creciente indica que esas células residuales son las CMT, las cuales pueden encontrarse en cualquier etapa del cáncer y son las principales responsables de causar la resistencia terapéutica [33].

Entre las características de las CMT asociadas con la resistencia a los fármacos quimioterapéuticos se derivan distintos mecanismos celulares, como una elevación de la expresión de proteínas anti-apoptóticas, un incremento en los

transportadores ABC que expulsan los fármacos y la baja tasa de proliferación de las CMT [55]. La resistencia a terapias es el resultado de una mayor capacidad para reparar el daño intracelular (DNA y proteínas), y que pueden inactivar las especies reactivas del oxígeno (ROS), reduciendo el daño que presentan bajo condiciones de estrés [29]. Más aún, la TEM contribuye en gran medida con el desarrollo de resistencia a varios tipos de agentes terapéuticos contra el cáncer al promover cambios moleculares en las CMT [55].

1.7. Terapias actuales contra células madre de tumor

El conocimiento de la genética del tumor y las vías de señalización, así como el estudio de moléculas de adhesión, epítopos para anticuerpos, intermediarios de señalización, elementos de vías de sobrevivencia, modificadores de cromatina y blancos metabólicos, brindan herramientas valiosas para el desarrollo de tratamientos [56]. Algunos tratamientos del cáncer como la quimioterapia y la radioterapia son capaces de llegar hasta los tumores y destruir a las células tumorales. Sin embargo, la respuesta de la población total es incapaz de predecir los efectos causados en la población de CMT, además en la mayoría de los casos presentan mutaciones que seleccionan a las CMT resistentes a los medicamentos, lo que ocasiona la reaparición del cáncer [57]. Es importante tomar en cuenta que la inhibición de la proliferación celular es un requisito para la mayoría de las quimioterapias, así como las terapias de radiación para ser efectivas y que cualquier célula senescente o quiescente puede ser resistente a esas terapias. En estudios previos se ha reportado que la población de CMT en glioma y cáncer de mama después de irradiación se encuentra en estado quiescente y después reingresa al ciclo celular [30]. Por lo tanto, es necesario implementar nuevas estrategias para atacar a los tumores, y que estos nuevos tratamientos sean activos específicamente contra las CMT [58].

Entre las diferentes estrategias terapéuticas aplicadas, Yu y cols. en el 2009 estudiaron los efectos de la combinación de régimen quimioterapéutico y curcumina en cáncer de colon, donde hay una reducción efectiva de CMT [59]. Otras terapias

dirigidas a CMT incluyen anticuerpos monoclonales, bloqueo de vías de autorrenovación e inducción de diferenciación e interrupción de la TEM [29]. Sin embargo, a pesar de las terapias ahora disponibles, aún no se ha encontrado un tratamiento específico que pueda eliminar a las células tumorales y a las CMT, evitando las reincidencias y el progreso a metástasis. Entre las nuevas terapias contra el cáncer que han surgido en las últimas décadas destacan las nanopartículas que liberan compuestos *in situ* a las células tumorales, como fármacos o anticuerpos monoclonales [60], [61], inmunoterapia con el uso de vacunas, inhibidores de check-point, CAR T-cells [62]–[64], terapia basada en microARN y ARN largo no codificante (ARN-Lnc) [65]–[67] así como la administración por terapia génica de citocinas y productos antitumorales [68], [69]. Dentro de esto último, se ha implementado el uso de células como vehículos de entrega para productos antitumorales directamente en las CMT, como lo son las células *natural killer* y las células madre mesenquimales (CMM) [46], [70], [71].

1.8. Células madre mesenquimales

Actualmente se ha reportado la aplicación potencial de las células madre mesenquimales (CMM) en la terapia génica. Esto basado en células madre después de su post-modificación genética como tratamiento de enfermedades [72]–[75], debido a diversas propiedades que las vuelven atractivas para su aplicación como terapia contra el cáncer. Las CMM son una población de células de linaje mesodérmico que pueden obtenerse de una gran variedad de tejidos como médula ósea, pulpa dental, cerebro, hígado, páncreas, piel, tejido adiposo, cordón umbilical, gelatina de Wharton, placenta, y son fáciles de aislar [76]. Las CMM son autorregenerativas, donde una sola célula puede dar lugar a nuevas colonias y son multipotentes, es decir, pueden dar lugar a diversos linajes de células diferenciadas [77]. Además, tienen propiedades inmunomoduladoras, de migración y efectos parácrinos [78]. La Sociedad Internacional de Terapia Celular ó ISCT (Internacional Society of Cellular Therapy) en el 2006 propuso tres criterios para definir a las CMM: 1) son adherentes en placas de cultivo; 2) tienen la capacidad de expresar los

antígenos CD44, CD24, CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA-DR, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; 3) las CMM deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo [79], [80].

De manera natural en el organismo, las CMM tienen funciones clave en los procesos de reparación de heridas y mantenimiento de la hematopoyesis en la médula ósea. Al presentarse una lesión, estas células se trasladan a sitios lesionados, y comienzan su diferenciación en elementos del tejido conectivo, promoviendo el desarrollo de angiogénesis y la secreción de citocinas y factores de crecimiento, que en conjunto promueven la cicatrización y la reparación del sitio lesionado [81]. Las CMM han demostrado que pueden diferenciarse y regenerar diversos tejidos como piel, hueso, cartílago, córnea, riñón entre otros [82]. Se han empleado como terapia alternativa en infarto al miocardio [83], daño cerebral traumático [84], enfermedad de Parkinson, diabetes mellitus tipo 1 [85]. Actualmente, las CMM representan un tipo celular para trasplante alogénico debido a su baja inmunogenicidad al tener una escasa expresión del complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC I) y ausencia de MHC II, representando bajo riesgo de rechazo del implante [86], por lo que se han empleado como terapia en la enfermedad de injerto contra huésped generada por rechazo autoinmune [87].

En un inicio estás células estaban limitadas únicamente a su uso en terapia regenerativa, debido a las propiedades anteriormente mencionadas, no obstante, en las últimas décadas han demostrado ser un vehículo potencial para entrega de productos génicos de forma dirigida a las células malignas, sin generar alteraciones y toxicidad sistémica como los tratamientos convencionales [44], [82]. Por ello, se han propuesto como un vehículo para entrega de tratamientos en cáncer.

1.9. CMM adultas en el tratamiento del cáncer

Entre las características de las CMM como alternativa a las terapias actuales contra el cáncer se encuentra la posibilidad de migrar hacia un estímulo inflamatorio procedente de tejidos lesionados o tumorales, infiltrándolos [88]; este proceso de migración es denominado *homing*. Algunas moléculas que desencadenan el *homing* de las CMM hacia el microambiente del tumor se encuentran citocinas y factores de crecimiento, principalmente mediante la activación del eje CXCL12/CXCR4. Algunos factores involucrados son el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), interleucina-8 (IL-8), factor derivado de células estromales (CSCL12), la proteína-1 quimiotáctica de monocitos (CCL2), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ1) y metaloproteinasas como MMP-2 [89], [90].

Así mismo, los tumores producen una gran cantidad de ligandos para las citocinas producidas por las CMM y moléculas estructurales de sus membranas plasmáticas [58]. Una vez arribadas al sitio del tumor, las CMM se incorporan al estroma, secretan factores como TGF- β o el ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL); estos ligandos pueden presentar actividad anti-proliferativa por la inhibición de vías como la de fosfatidilinositol 3-cinasa/ proteína cinasa B (PI3K/AKT), promoviendo arresto celular y con ello la reducción del crecimiento [89]. Por otro lado, pueden presentar actividad pro-tumorogénica y pro-angiogénesis, sugiriendo un rol complejo [90]. Sin embargo, se han desarrollado una gran variedad de procedimientos técnicos para modificarlas genéticamente y sobreexpresar un gen exógeno dirigido al sitio del tumor, promoviendo con ello la eliminación del mismo [91]. Actualmente están en curso ensayos clínicos en fases 1, 2 de CMM modificadas genéticamente para que expresen productos antitumorales y virus oncolíticos (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02079324, NCT03298763, NCT02068794, NCT02530047). Todo ello muestra que la terapia génica basada en CMM es prometedora, aunque aún se requiere realizar más investigaciones para analizar la eficacia y seguridad de los diferentes modelos experimentales que utilizan CMM genéticamente modificadas.

1.10. Modificación genética de las CMM

La modificación genética implica la transferencia de una secuencia génica hacia la célula para que esta funja como un vector de expresión. Un vector de expresión se define como un vehículo utilizado para entregar un gen de interés. Un vector ideal puede transferir una cantidad específica de material genético dentro de la célula blanco, permitiendo la expresión transitoria o constante por modificación genética de un producto sin ser tóxico. Cuando se necesita modificar genéticamente una célula blanco, el material genético exógeno se puede entregar por medio de vectores no virales y virales [92].

En los vectores no virales están aquellas moléculas de ADN y ARN [plásmidos, ARN de interferencia (siARN), entre otros], que son distribuidas a la célula blanco por medio de métodos físico-químicos como liposomas, fosfato de calcio, polímeros catiónicos, electroporación, nucleofección, sono-transfección, nanopartículas, complejos proteicos, entre otros; este procedimiento se denomina transfección [73], [92]. La transfección se ha visto limitada debido a la baja eficiencia para expresar un gen exógeno, además que pueden afectar la membrana celular y la expresión de los genes es transitoria debido a que no se integran al genoma o lo hacen con una menor eficiencia [93], por lo que se va diluyendo conforme la célula se divide [73].

Por otro lado, los vectores virales se han empleado ampliamente en la investigación actual; este proceso se denomina transducción, y destaca alta eficiencia para generar células modificadas y una expresión más prolongada [44]. Existe una gran variedad de vectores virales, y su uso depende de la naturaleza de la célula blanco a la cual se desea infectar [94].

1.10.1. Empleo de lentivirus para modificación genética de CMM

Uno de los objetivos principales de la terapia génica es entregar el material genético en las células blanco dentro de un tejido específico con el fin de modificar

el microambiente tumoral, limitar la progresión de la enfermedad y obtener el efecto terapeutico o mayor suceptibilidad a un tratamiento [95]. Tomando esto en cuenta, la llegada de los vectores virales facilitó el crecimiento de las aplicaciones en la terapia génica, al permitir generar células que funcionan como un vector de expresión contante para una proteína específica necesaria para el tratamiento de determinada enfermedad [94]. Hasta el momento, se ha desarrollado una amplia gama de vectores virales, los más frecuentes se abordan en la Tabla 2. En este estudio nos enfocaremos en los vectores lentivirales. Los vectores lentivirales han sido empleados extensivamente para modificar genéticamente a las CMM y con ello expresar genes específicos, debido a sus ventajas para inducir una estable y elevada expresión de los transgenes en las células blanco, su baja toxicidad y limitada inmunogenicidad [44], [70], [74], [96].

Vector	Genoma	Capacidad	Propiedades	REFERENCIAS
viral		de		
		inserción		
Adenovirus	dsADN	<7.5 kb	No se insertan en	[73], [92], [97],
			genoma	[98]
			 Expresión 	
			transitoria	
			Altos títulos	
			virales	
			Amplio rango de	
			células blanco,	
			células con y sin	
			división	

Tabla 2. Vectores virales más frecuentes en terapia génica.

			•	Muy	
				inmunogénicos	
Virus	ssADN	<4 kb	٠	Integración al	[92], [94], [97],
Adeno-				genoma,	[98]
asociados				infección latente	
			•	Expresión a largo	
				plazo	
			•	Menor toxicidad	
			•	Dependientes de	
				otros virus	
			•	Infección de	
				células con y sin	
				división	
Herpes	dsADN	>30 kb	•	Evasión de	[92], [94]
virus				respuesta inmune	
(VHS)			٠	Entrega de	
				múltiples genes	
			٠	Limitado rango de	
				células blanco	
			•	Baja eficiencia de	
				infección	
			•	Expresión génica	
				a largo plazo	
			•	Empleo como	
				virus oncolítico	
Gamma-	ssARN	8 kb	•	Amplio rango de	[95], [97]
retrovirus				células blanco,	
				infección de	
				células madre	

			•	Expresión a largo plazo Inserción aleatoria en el genoma huésped Mutagénesis insercional No infectan células sin división	
Lentivirus	ssARN	8 kb	•	Integración al genoma huésped Expresión constante a largo plazo Menor riesgo de mutagénesis insercional Altos títulos virales Infección de células con y sin división Vectores autoinactivables	[94], [97], [99]

Características de vectores virales más frecuentemente empleados para terapia génica. dsADN: ADN de doble cadena; ssARN: ARN de cadena sencilla; Kb: Kilobases.
Abordando más detalladamente, los lentivirus están integrados dentro de la familia *Retroviridae* de virus envueltos de ARN de una sola hebra (ssARN). Los lentivirus contienen dos copias de una molécula de ARN de sentido positivo, además de portar enzimas importantes para su replicación como son la transcriptasa reversa, integrasa y proteasa [100]. De manera natural los lentivirus infectan los linfocitos que poseen el receptor CD4 y los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4, fusionando su membrana con la de la célula huésped [101]. Dentro de la célula, la partícula viral libera su contenido enzimático y de ácidos nucleicos para la transcripción de ADN a partir del molde de ARN. Esta secuencia de ADN se inserta en el genoma del huésped, permitiendo la transmisión vertical de la información hacia la descendencia de la célula, y mediante la maquinaria de transcripción de la célula el virus sintetiza todos sus componentes [92].

En cuanto a su secuencia génica, un lentivirus contiene tres genes básicos: gag, pol y env. El gen gag codifica proteínas estructurales, pol codifica la enzima transcriptasa reversa y enzimas requeridas para la integración al genoma huésped, y env codifica las glicoproteínas de la envoltura viral [99].

Tomando en cuenta que los lentivirus tienen como base a la estructura viral del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), se han realizado múltiples modificaciones para mejorar su seguridad y reducir el riesgo de mutación insercional. En un inicio, la primera generación de vectores lentivirales contenía una gran cantidad del genoma original del VIH, incluyendo los genes *gag* y *pol*, además de proteínas virales. Para incrementar el espectro de infección de células blanco, se cambió la envoltura viral del VIH por la del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), la cual reconoce al receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL). Además que proporciona mayor estabilidad durante el procesamiento rio abajo y tiene mayor espectro de transducción [102].

Posteriormente, en los vectores de segunda generación se eliminaron los factores de virulencia accesorios (*vif*, *vpr*, *vpu*, and *nef*). La tercera generación de lentivirus presentaban dividido el genoma viral, lo que redujo la capacidad de generación de virus competentes. Estos vectores aún contenían los genes *gag* y

24

pol, sin embargo, estos se encuentran en plásmidos aislados con la secuencia exacta para el empaquetamiento [99]. También se eliminó el gen *tat*, así como el promotor U3 de la secuencia terminales repetidas largas o LTR (*Long Terminal Repeat*) y en cambio se colocó un promotor constitutivo como el de citomegalovirus o el promotor del virus de sarcoma de Rous, más un potenciador opcional o un promotor inducible [102]. Más aún, introducir deleciones en el extremo 3'de LTR crea vectores auto-inactivables, en donde está interrumpida la actividad del promotor/potenciador del LTR, minimizando el riesgo de replicación de virus competentes, disminuyendo interferencias por el promotor y reduciendo el riesgo de mutagénesis insercional [100].

Los sistemas lentivirales de cuarta generación presentan dividido el genoma viral en cuatro segmentos, que al principio son desarrollados como plásmidos: tres plásmidos son auxiliares y uno corresponde a la secuencia génica que se va a insertar en la célula blanco. Este sistema de producción incluye los requisitos para su uso clínico, como lo son el uso de construcciones con el genoma dividido para evitar superposiciones y reducir al máximo el riesgo potencial de recombinación, lo que podría conducir a la generación de lentivirus competentes replicables. El plásmido de la secuencia génica contiene la secuencia del gen que se quiere sobreexpresar, flanqueada por elementos cis requeridos para la formación de la cápside, transcripción reversa e integración [102].

En la clínica, los lentivirus se han empleado como vectores de expresión de proteínas específica para tratar distintas enfermedades como lo es el síndrome de inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X, cáncer [73], [103], [104] y enfermedades monogénicas como la anemia de células falciformes, sin que se hayan presentado efectos adversos por su uso [94]. También se han utilizado para tratamiento del VIH, con vectores tipo pT, que contienen miARNs que suprimen la expresión del receptor CCR5 e inhiben la infección viral [105].

Este tipo de vector viral se ha utilizado principalmente para terapia *ex vivo,* en donde se toman células del paciente, se cultivan junto con el virus para modificar las células con un gen de interés y posteriormente son reintroducidas dentro del paciente para permitir su actividad específica [94]. Además, se han empleado para la modificación genética de CMM con el propósito de expresar genes específicos.

1.11. Expresión de proteínas antitumorales por CMM genéticamente modificadas

De forma nativa las CMM son capaces de expresar proteínas y factores que promueven la eliminación de células tumorales y controlar el microambiente inflamatorio [89]. No obstante, en las últimas décadas se han empleado como vectores en la terapia génica para sobreexpresar genes y sus productos proteicos específicos con el fin de potenciar su actividad antitumoral. Por ejemplo, se han realizado estudios con CMM genéticamente modificadas para sobreexpresar interferones IFN α , IFN β , IFN γ [110] [89], distintas interleucinas como IL-12 [109], IL-18 [70], y proteínas pro-apoptóticas como TRAIL [74], la proteína morfogénica ósea 4 (BMP4) y la fosfatidil-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa (PTEN) [89]. En el presente trabajo se abordará de manera particular a la proteína TRAIL.

1.11.1. TRAIL

El ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral o TRAIL también es conocido como Apo-2L [111]; es una citocina perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) debido a la homología de su dominio C-terminal extracelular. TRAIL es una proteína de 20 kDa cuyo gen está conformado por cinco exones y tres intrones localizado en el cromosoma 3 [112].

TRAIL completo (TRAILc) es una proteína transmembranal que puede inducir apoptosis por la vía extrínseca dependiente de receptor o la vía intrínseca mediada por mitocondria selectivamente en células tumorales, pero no en células normales. Además, el ARNm del TRAILc se expresa constitutivamente en una amplia variedad de tejidos, principalmente hígado, pulmón y próstata [113]. La proteína TRAILc consiste de 281 aminoácidos (40 KDa) y se ubica de forma transmembranal (aminoácidos 1-113); sin embargo, por medio de enzimas proteolíticas puede escindirse en una fracción externa soluble (aminoácidos 114-281) o TRAIL soluble (TRAILs) [111]. La apoptosis por esta citocina se activa de manera similar a otros elementos de la familia del TNF, y es mediante la formación de homotrímeros con sus receptores transmembranales. Un átomo de Zn, unido por cisteínas en el ligando trimérico es esencial para la estabilidad de éste y asegura su actividad biológica [114]. TRAIL puede interactuar con cinco receptores, nombrados TRAIL-R1 (DR4, Death receptor), TRAIL-R5 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1/TRID/LIT), TRAIL-R4 (DcR2/TRUNND) y osteoprotegerina (OPG). El efecto selectivo de TRAIL de producir apoptosis de las células tumorales y no en células sanas depende de la unión a los receptores celulares DR4 y DR5 ambos con un motivo conservado en el dominio de muerte (DD, Death Domain) [115]-[117]. Los otros receptores actúan como "señuelos", debido a que su sobreexpresión inhibe la activación de la apoptosis. No obstante, mientras que DcR1 no tiene una región citosólica, DcR2 sí la presenta, pero de forma acortada y no funcional. La relevancia fisiológica de OPG como receptor de TRAIL se mantiene aún inconclusa, pero se ha relacionado con resistencia a apoptosis vía este mecanismo [74].

El mecanismo de acción de TRAIL es la inducción de la apoptosis, también llamada muerte celular programada, la cual permite el mantenimiento de la homeostasis celular y la prevención de procesos patológicos, tales como el cáncer, inmunodeficiencia y autoinmunidad. La vía extrínseca de la apoptosis es activada por medio de la unión trimérica de TRAIL a los receptores de muerte celular (TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5) antes mencionados [117]. Posterior a la unión de TRAIL a sus receptores, ocurre la estabilización y trimerización. Esta acción recluta la molécula adaptadora dominio de muerte asociado a Fas (FADD), el cual es ensamblado en el complejo de señalización inductor de muerte (DISC). DISC interacciona con las caspasas 8 y 10 y las activa. Estas caspasas iniciadoras activan a su vez a las caspasas 3/6/7, las cuales están encargadas de escindir proteínas celulares y formar una cascada de señalización que culmina en los cambios bioquímicos y morfológicos característicos de la apoptosis como son la

fragmentación del ADN, la disociación del citoesqueleto y las proteínas nucleares [112].

Así mismo, puede activarse la vía intrínseca de la apoptosis. La caspasa-8/10 de forma activa, convierte a la proteína que contiene el dominio BH3 inhibidor de Bcl-2 (Bid) en Bid truncado (tBit). El efecto sinérgico de Bcl-2 asociado a X (BAX) y el antagonista homólogo de Bcl-2 (BAK) resulta en la traslocación intramitocondrial de tBid y la liberación al citoplasma del citocromo c, ensamblando así la procaspasa-9 y el factor de activación de la proteasa apoptótica-1 (APAF-1), para formar el complejo apoptosoma y eventualmente activar las caspasas ejecutoras 3/6/7 [118]. El mecanismo de apoptosis por TRAIL por ambas vías se muestra en la figura 3.



Figura 5. Mecanismo inducción de apoptosis por TRAIL [8]. TRAIL activa la apoptósis por la vía extrínseca mediante unión y trimerización de receptores de muerte de TRAIL DR4 y DR5, lo que lleva al ensamblaje del complejo DISC y la posterior activación de la caspasa 8/10, que activan la cascada de apoptosis por las caspasas 3/6/7 efectoras. Al mismo tiempo, la caspasa 8 puede activar la vía

intríseca de la apoptosis mediante tBid y estrés mitocondrial que libera al Citocromo C y culmina con el ensamblaje del apoptosoma por la caspasa 9. En ambas vías se llevan a cabo cambios en la célula que llevan a la fragmentación del núcleo y formación de vesículas con material celular.

En la bibliografía se han descrito más estudios que utilizan TRAILc para producir apoptosis en las células diana a diferencia de TRAILs (Figura 6) [119]. Sin embargo, dado que TRAILc requiere la interacción de célula-célula, algunos estudios se ha visualizado el potencial de TRAILs para producir apoptosis manera exitosa sin requerir la interacción celular [74], [119]–[123]. Además, actualmente se han desarrollado diversos tipos de TRAIL recombinante humano, proteína que se ha utilizado en ensayos clínicos contra cáncer en fases I y II (Clinical Trails: NCT03443674, NTC03083743, NTC03298763).



Figura 6. Comparación de estructuras de TRAIL completo y TRAIL soluble. El ligando TRAIL puede presentar dos estructuras: La completa está unida a membrana plasmática y requiere la interacción célul-célula con los receptores de muerte DR4 y DR5 en la célula tumoral para activar el proceso de apoptosis. Por

otro lado, la forma de TRAIL soluble puede difundir por el medio extracelular hasta los receptores de muerte en la célula tumoral y activar la apoptosis.

En años recientes se ha abordado el papel de las CMM expresando TRAIL sobre las CMT como una estrategia más específica para eliminar células tumorales responsables de la reincidencia de los tumores. Loebinger y cols. en el 2010 identificaron que las CMM-TRAILc podían generar apoptosis en líneas celulares de cáncer de pulmón las cuales presentaban una población lateral (SP) de CMT (ABCG2⁺) [46]. Adicionalmente, este tratamiento mostraba sinergismo con tratamiento quimioterapéutico mitoxantrona. En otro estudio por Fakiruddin y cols. en el 2019 se demostró que además las CMM-TRAILc podían inducir apoptosis por la vía intrínseca y extrínseca en una población de CMT CD133⁺ de cáncer de pulmón, encontrando una relación del receptor de muerte DR5 con la sensibilidad al tratamiento de TRAIL [44].

No obstante, uno de los principales inconvenientes es la generación de resistencia a TRAIL en diversos tumores [124]. Los mecanismos de resistencia a TRAIL y el aumento de la invasión se deben a múltiples factores, como la subexpresión de los receptores de inducción de muerte por TRAIL (DR4, DR5), niveles elevados de receptores señuelo (DcR1, DcR2), niveles incrementados de inhibidores de apoptosis como cFLIP, sobreexpresión de vías proliferativas mediante las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y factor nuclear kappa beta (NF-kβ), entre otros [125]. La vía PI3K/AKT/mTOR se encuentra comúnmente desregulada en el cáncer, debido a mutaciones que conducen a su hiperactivación. promueven la proliferación celular. reducen apoptosis. quimiosensibilidad y otros eventos biológicos [126]. Sin embargo, algunos fármacos han mostrado la capacidad de reducir la resistencia generada por las células tumorales hacia a TRAIL, por medio de la reducción de la expresión de proteínas antiapoptóticas como cFLIP, Bcl2, Bcl-XL, y el incremento en la expresión y la translocación en membrana de los receptores de muerte, con ello sensibilizando a las células para producir apoptosis vía este mecanismo, inclusive en aquellas

células resistentes a quimioterapia, como se ha abordado en diversos estudios [127]–[130]. Esto indica que la actividad de TRAIL puede verse potenciada en combinación con terapias adyuvantes.

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

En el laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León ya se ha estado trabajando con la búsqueda de biomarcadores que faciliten la detección temprana del cáncer, así como el desarrollo de nuevas estrategias para su tratamiento. En específico, se ha enfocado en una población particular de células dentro del tumor, las CMT, las cuales están asociadas con reincidencia y resistencia a la quimioterapia en cáncer colorrectal. En el 2017, Garza-Treviño realizó el aislamiento de CMT de líneas celulares y de biopsias de tumor de pacientes con CCR, observando un aumento de la expresión de marcadores de CMT CD44 y CD24 en células resistentes a quimioterapia convencional como 5-FU y Oxaliplatino (5-FUOL o FOLFOX). Además, por medio de secuenciación con RNATruSeq Target, se analizó un panel de 66 genes implicados en farmacorresistencia de CCR, encontrando la sobreexpresión de genes EGF (factor de crecimiento epidérmico), HGD (homogentisato 1,2dioxigenasa), KRT18 (citoqueratina-18) y RRM1 (subunidad mayor de ribonucleósido difosfato reductasa) en CMT de adenocarcinoma colorrectal resistentes a 5-FUOL en tumores humanos [131], [132]. Posteriormente, en el 2019 Solís-Coronado aisló y caracterizó CMT de adenocarcinoma colorrectal (ACCR). Por medio de inmunofluorescencia se verificó que los aislados de ACCR coexpresaban marcadores de CMT (CD44 y CD24) y de resistencia a 5-FUOL (ABCB1, CK-18 y BNIP) en muestras de tumores de pacientes [133].

Mientras tanto en el 2018, González-Villareal diseñó vectores lentivirales para la expresión de las proteínas TRAILc, TRAILs e IFN β , y la proteína verde fluorescente (*GFP*) como reportero. Por medio de ellos modificó CMM murinas de médula ósea para sobreexpresar las mencionadas proteínas y evaluar su actividad antitumoral en un modelo de linfoma sólido murino. Para la generación de los tumores empleó la línea celular de linfoma murino L5178Y. El grupo tratado con la combinación de CMM IFN β y TRAILs permitió la sobrevivencia de 62.5% del grupo, con una completa eliminación de los tumores de manera macroscópica. Por lo tanto, el tratamiento combinado de TRAILs e IFNβ fue el más eficaz de los tratamientos para la eliminación de tumores in vivo [123]. En el 2020, Quiroz-Reyes continuando con lo establecido por González-Villarreal, evaluó la capacidad antitumoral de CMM murinas sobreexpresando las combinaciones TRAILs con IFNβ, TRAILs con IL-12 e IL-12 individual en un modelo murino de metástasis. Nuevamente empleó la línea de linfoma murino L5178Y para la generación de tumores sólidos, la cual fue modificada para la expresión del gen reportero fluorescente mCherry. Al presentarse marcadas las células tumorales, fue posible detectar su migración a otros tejidos, presentando señal fluorescente, así como alteraciones histológicas correspondientes con metástasis en el hígado, como infiltración de células tumorales y modificación estructural del parénquima hepático. En este estudio, los tres grupos tratados con CMM sobreexpresando los transgenes fueron los que presentaron menor volumen de los tumores, así como una mayor sobrevivencia en comparación con los controles (CMM-TRAILs + IFNβ 40 %, CMM-TRAILS + IL-12 60%, CMM-IL-12 60% al día 36 post-inoculación) [8].

Esto nos indica que las CMM sobreexpresando proteínas pro-apoptóticas como TRAIL y que activan al sistema inmune como IL-12 e IFNβ pueden inducir la muerte en células tumorales. No obstante, aún queda la pregunta de si estas células pueden eliminar de forma específica a las CMT dentro de los tumores o únicamente a otras poblaciones celulares, y si se está generando un mecanismo de resistencia contra este mecanismo de muerte celular.

3. JUSTIFICACIÓN

El CCR tiene el tercer lugar en incidencia y el segundo lugar en mortalidad por cáncer a nivel mundial. Aunque existe una terapia estandarizada para su tratamiento, esta presenta limitantes principalmente debido a la presencia de CMT que promueven la resistencia a fármacos, reincidencia del tumor y finalmente metástasis a otros tejidos. Por ello, es importante la búsqueda de nuevas estrategias que mejoren las terapias actuales e incrementen la calidad de vida de los pacientes.

Uno de los principales mecanismos para eliminar a las células tumorales por el sistema inmune es mediante la proteína TRAIL, el cual ha ganado interés en la actualidad porque además es capaz de eliminar poblaciones de CMT. CD44 y CK-18 son marcadores que en CCR tienen una relación directa con la resistencia y metástasis, por lo que representan blancos terapéuticos importantes que requieren un mayor análisis.

Las CMM pueden modificarse para sobreexpresar TRAILs, el cual puede distribuirse mejor en el microambiente tumoral, y junto con fármacos quimioterapéuticos puede incrementar sensibilidad a la apoptosis de las CMT, mejorando el pronóstico en pacientes con cáncer colorrectal resistentes a la terapia convencional.

4. HIPÓTESIS

Las CMM-MO genéticamente modificadas para la expresión de TRAILs presentan actividad pro-apoptótica en CMT y su efecto se incrementa en combinación con quimioterapia de primera línea en líneas celulares de CCR.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

• Analizar la capacidad de CMM-MO que sobreexpresan TRAILs para generar apoptosis en CMT de líneas celulares y en un aislado de CMT de CCR.

5.2. Objetivos específicos

- 1. Modificar genéticamente y validar a las CMM-MO para la sobreexpresión de TRAILs.
- 2. Determinar la expresión de receptor DR5 y efecto citotóxico a TRAIL recombinante en líneas celulares de CCR.
- 3. Analizar porcentaje de CMT y susceptibilidad a fármacos quimioterapéuticos en líneas celulares de CCR.
- 4. Evaluar la actividad antitumoral y pro-apoptótica de CMM que sobreexpresan TRAILs en líneas celulares y en un aislado de CMT de CCR.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Figura. 7. Estrategia Experimental. En este estudio se realizará la validación de la sobreexpresión de los transgenes TRAILs, TRAILc por las CMM, las cuales serán modificadas genéticamente mediante vectores lentivirales. Se analizó la expresión del receptor DR5 y la concentración inhibitoria media (IC₅₀) de TRAIL recombinante en líneas celulares y biopsias de CCR para validar la sensibilidad a TRAIL. se evaluaron los marcadores Posteriormente de CMT. así como la quimiosensibilidad a fármacos. Después, se evaluaron los diversos tratamientos de CMM sobreexpresando TRAIL de manera individual o en combinación con quimioterapia, para evaluar la muerte celular en líneas celulares de CCR y en aislados de CMT de pacientes. Por último, se analizó la disminución de marcadores de CMT y resistencia posterior al tratamiento.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Cultivo de CMM de medula ósea de ratón.

Las CMM-MO fueron obtenidas a partir de fémures de 3 ratones BALB/c, de 6-8 semanas de edad, producidos en el Laboratorio de Experimentación Animal del Servicio de Inmunología de la Facultad de Medicina de la UANL. Las CMM-MO fueron cultivadas hasta el pase 2 en medio DMEM-F12-glutamax (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY 14072, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino estéril (SFB) (Gibco), 100 µg/mL gentamicina (Gibco) y 2.5 µg/mL de anfotericina B (Gibco), se ajustó su concentración a 1.0×10⁶ células/ mL y fueron congeladas con dimetilsulfóxido (DMSO) (ATCC, Manassas, Virginia 20110, USA.) al 10%, para posteriormente ser almacenadas en nitrógeno líquido. Esta línea celular de CMM-MO ya fue caracterizada previamente para la diferenciación a osteocitos y adipocitos, además de presentar los marcadores de estirpe mesenquimal CD105, CD90 [134].

7.2. Diseño de secuencias de los transgenes.

Los vectores que se utilizaron en este trabajo fueron diseñados empleando la plataforma Vector Builder de Cyagen (Santa Clara, California 95050, USA). Los constructos de los vectores fueron diseñados por González-Villareal [123], para la expresión de TRAILs y TRAILc, y que además expresan la proteína verde fluorescente (*GFP*) como marcador reportero: pLV[Exp]-EGFP/Neo-EF1A>{sMurTRAIL}, pLV[Exp]-EGFP/Neo-EF1A>{flMurTRAIL}. El vector lentiviral pLV[Exp]-EGFP:T2A:Puro-EF1A>mCherry fue comprado directamente de la casa comercial Vector Builder, y le brinda a las células fluorescencia color verde de *GFP* y rojo por *mCherry;* este último fue empleado como control.

7.3. Modificación genética de CMM para la sobreexpresión de TRAIL

En botellas de cultivo de 25 cm² se inocularon 5.0×10⁵ CMM-MO y se incubaron por 16 h en atmósfera de CO2 al 5% a 37°C. Después de ese tiempo se adicionaron 5 µg de sulfato de protamina/mL (Sigma-Aldrich) para transducir a las células. Todos los cultivos se infectaron con el lentivirus correspondiente a una multiplicidad de infección (MOI) de 2 partículas virales/célula, de acuerdo a lo reportado por Yuan y cols. en el 2016 [135]. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% por 48 h. Después de haber hecho un pase de los cultivos transducidos, a cada uno de éstos se le agregaron 400 µg de geneticina (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) /mL para seleccionar las células transducidas. Después de una semana de selección, se tomó una alícuota de las CMM-MO modificadas y fueron cultivadas en microcámaras de 4 pozos Lab-Tek® (Nunc®, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA); se mantuvieron por 12 h con medio DMEM-F12 suplementado para permitir la adherencia a la laminilla. Después de ese tiempo se eliminó el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS al 10% y se fijaron las células con metanol-acetona (4:1) por 10 min a 4°C; seguido de eso se realizó otro lavado con PBS al 10%, se retiró el exceso de humedad y se añadió una gota (25 µL) medio de montaje Vectashield con DAPI (Vecta Mount, Vector laboratories), y se colocó un cubreobjetos sobre la laminilla. Se realizó el conteo de las células totales y las células verde-fluorescentes en cuatro campos por medio de microscopio de epifluorescencia (Nokia, Eclipse 50i) 40×; se tomaron fotografías digitales de cada campo con una cámara Sight DS-2MV acoplada al microscopio de epifluorescencia. Se calculó la eficiencia del procedimiento como porcentaje de transducción.

Cálculo de la eficiencia de transducción

Se calculó la eficiencia de transducción aplicando la siguiente ecuación: % eficiencia de transducción= *CMM*-*MO*-*GFP* /*CMM*-*MO* totales × 100 Donde, CMM-MO-GFP son las CMM de médula ósea murinas que muestran una señal verde-fluorescente bajo el microscopio de epifluorescencia; CMM-MO totales es el número total de CMM-MO.

Validación de la expresión de los transgenes por las CMM-MO

Para confirmar la expresión de los transgenes a nivel de traducción se realizó la técnica de Western Blot. Después de incubar 48 h en medio DMEM-F12 suplementado, se obtuvieron 9 ± 1 mL del medio de cultivo usado de monocapas confluentes de CMM-MO modificadas con TRAILs y TRAILc. El medio de cultivo se concentró por ultrafiltración con centrifugación a 5,000 rpm por 40 min a temperatura ambiente en una columna Amicon (Amicon® Ultra-15 10K Centrifugal Filter Devices). Se colectó el medio concentrado y se tomaron 500 µL de éste en un microtubo de 1.5 mL para proceder con la precipitación de proteínas por el método de metanol-cloroformo. Brevemente: Se adicionan 600 µL de metanol al 100% (Sigma Aldrich) y 450 µL de cloroformo puro (Sigma Aldrich) a los 500 µL de medio concentrado en el mismo tubo, y se mezcló por inversión durante 1 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C por 2 min. Después se retiró la fase acuosa (la fase superior), cuidando no tocar la interfase, y se agregaron 600 µL de metanol; se mezcló por inversión 1 min. Enseguida se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C por 7 min y se retiró el sobrenadante. Finalmente se dejó secar la pastilla a 50°C y se resuspendió en agua MilliQ (volumen final 100 µL). Las células que expresan TRAILc en su membrana se lisaron con el buffer PKR para obtener la proteína. Brevemente: se inocularon 5.0×10⁵ células en una placa Petri y se incubaron por 12 h. Se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS 10%. Se añadió el buffer de lisis PKR 1X, y se incubó por 20 min a -20°C. Transcurrido este tiempo, se hizo un raspado de las células y se transfirieron a un microtubo de 1 mL. Las células se mezclaron en un vórtex por 10 seg, para lisar por completo. El lisado se centrifugó 12,000 rpm a 4°C por 2 min y se recuperó el sobrenadante. Se cuantificaron las proteínas totales por medio de Bradford

(Bradford Quick Start Bio Rad); brevemente, se usó una placa de 96 pozos la cual manejamos con hielo para mantener más estables las proteínas. Se colocó 1 µL por pozo de muestra y se añadieron 100 µL del reactivo de Bradford. Se incubó por 5 min sobre hielo y se leyó la absorbancia a 600 nm. Para estandarizar la técnica se lisaron CMM-MO sin transducir empleando el buffer de lisis PKR para la detección de actina. Con las preparaciones obtenidas se realizó un Western Blot; primero, se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS (SDS/PAGE, sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gel electrophoresis) al 12% con 1.5 mm de grosor (Sigma-Aldrich). Los geles se cargaron con 40 µL del concentrado proteico por carril (100 µg/mL aprox. de proteína total) y se corrieron a 85 V por 15 min y luego 100 V por 1 h. Se empleó como control positivo a la proteína TRAIL recombinante murina (Peprotech, No. Cat. 315-19). Las proteínas se electro-transfierieron a una membrana de Polifluoruro de Vinilideno (PVDF) (Bio Rad, Hercules, California, USA) por medio de una cámara de transferencia húmeda con un voltaje de 120 V durante 2 h; la membrana se bloqueó toda la noche con leche semidescremada comercial (Svelty, Nestlé, Ciudad de México) al 5% en TBS a 4°C en agitación (20 RPM). Se realizó un lavado con TBS y posteriormente las preparaciones de proteínas se incubaron 4 h a 4°C, con anticuerpos primarios anti-TRAIL (ab2435, 1:200) y anti-Actina (ab1801,1:1000) de ratón, obtenidos de conejo (Abcam, Burlingame, CA, USA), diluídos en PBS . Se realizaron 4 lavados con TBST por 5 min y luego se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario policional anti-conejo conjugado con HRP (Horse-radish peroxidase – Peroxidasa de rábano picante—) (NA W4011, Promega 1:10,000). Después de incubar, se realizaron 4 lavados con TBST por 5 min y un último lavado por 5 min con TBS. Se reveló la membrana utilizando el estuche de luminol Clarity ECL Kit (1705060 Bio Rad, Hercules, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante y se analizaron las membranas en un fotodocumentador Molecular Imager® Chemidoc XRS+ Imaging System (Bio Rad) y con el software ImageLab incluido en el equipo se tomaron imágenes de las membranas.

Cuantificación de niveles de TRAIL

La cuantificación de la proteína TRAIL generada por las CMM fue analizada por ELISA empleando el kit comercial de abcam (ab253210), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes de medio de cultivo de las CMM-TRAILs se recolectaron y centrifugaron a 2,000 *x g* por 10 min para remover debris celular. Se colectaron los sobrenadantes y luego se analizaron. Inmediatamente se realizó el ensayo o se almacenó la alícuota a -80°C. Se empleó como control positivo a la proteína TRAIL recombinante incluida en el kit (abcam, ab157345). Las placas fueron analizadas en Cytation 3 (BIOTEK,Winooski, VT, USA). Se realizaron 3 repeticiones por duplicado.

7.4. Caracterización mediante marcadores CD105, CD90, CD34

El proceso de caracterización se realizó siguiendo los criterios de la ISCT, donde las CMM-MO expresan marcadores CD44, CD24, CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA-DR, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B [79], [80]. El análisis se llevó a cabo por medio de inmunohistoquímica (IHQ) empleando anticuerpos monoclonales primarios anti-CD105 (C2446-55), anti-CD90 (C2441-60) (USbiologicals, Salem, Massachusetts, USA) y anti-CD34 (ab81289) (Abcam, Burlingame, CA, USA), diluidos con PBS 1:25, 1:200 y 1:100, respectivamente. Las CMM se cultivaron en microcámaras de 4 pozos Lab-Tek® (Nunc®, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) por 12 h para permitir su adherencia, en una concentración de 5.0×10³ células por pozo. Después de ese lapso las células fueron fijadas con metanol-acetona (4:1) por 10 min a 4°C. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS al 10%. Las CMM-MO se lavaron en TBST por 5 min. Se bloqueó la peroxidasa endógena con H₂O₂ y se incubó la preparación 10 min a temperatura ambiente. Se realizó otro lavado con TBST por 3-5 min, y se bloquearon las proteínas con la solución protein block, incluida en el

kit (por 30 min a 37°C, en cámara húmeda). Se realizó otro lavado con TBST por 3-5 min, para continuar con la adición del anticuerpo primario. La laminilla con el anticuerpo primario se cubrió con plástico sellador durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Después de transcurrido ese tiempo, se lavó como antes y se cubrió con el anticuerpo secundario, incubando por 30 min a 37°C en cámara húmeda. Se lavó con TBST 3-5 min y se agregó la solución de estreptavidina-HRP incluida en el kit, incubando por 15 min a 37°C en cámara húmeda. La preparación se lavó con TBST 3-5 min y se reveló la presencia de los marcadores de interés agregando una solución de sustrato-cromógeno (10:1 gotas; incluido en el kit) y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. En la misma laminilla, se hizo una contra-tinción con Hematoxilina de Harris, se hicieron tres lavados con agua destilada (por 2 min en cada ocasión). Se agregó Hematoxilina de Harris, cubriendo uniformemente las células por 2 min. Se lavó la preparación con agua corriente y después con agua destilada, en cada ocasión por 3 min. Posteriormente se deshidrató la preparación, sumergiéndola sucesivamente en etanol al 70%, al 96%, al 100% y en Xilol. Se eliminó el exceso de Xilol con un pañuelo, se montó un cubreobjetos encima de la preparación y, se selló con resina Entellan (Merck). Las laminillas se conservaron a 4°C hasta su observación. Se observaron las laminillas en un microscopio de epifluorescencia ZEISS Imager.A2 (Carls ZEISS, Alemania) y se tomaron cinco campos seleccionados al azar, a una amplificación de 40×, con la ayuda de la cámara AxioCam MRc acoplada al microscopio. Las imágenes fueron analizadas con el software del ZEISS ZEN del microscopio, así como con el programa Image J (https://imagej.nih.gov/ij/download.html).

7.5. Determinación de sensibilidad a TRAIL.

Se realizó una inmunofluorescencia para el receptor de TRAIL (TRAIL R2/DR5) (anti-DR5, abcam, ab8416, Abcam, Burlingame, CA, USA), en una dilución 1:100 con PBS, con el fin de evaluar la sensibilidad de TRAILs para producir apoptosis, en las líneas celulares Caco-2 (ATCC® HTB-37) y CMT-93 (ATCC® CCL-223[™]),

así como en biopsias de pacientes con CCR. Las biopsias corresponden a muestras de una colección histórica de pacientes en estadio 3 y 4, sensibles y resistentes a quimioterapia (n=16), atendidos en el Hospital Universitario de la UANL o en el Centro Médico Nacional del Noreste, Unidad de Altas Especialidades Médicas No. 25 (UMAE 25), IMSS y pertenecientes al protocolo de investigación BI-11-004. Las células tumorales se fijaron en microcámaras de 4 pozos Lab-Tek® (Nunc®, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA); se mantuvieron por 12 h con medio DMEM suplementado para permitir la adherencia a la laminilla. Se lavaron con PBS 1X y se fijaron con metanol-acetona (4:1) por 10 min a 4°C, seguido de un lavado con PBS 1X. Los bloques de parafina con los tejidos se cortaron en secciones de 6 µm con un microtomo, y se realizó el proceso de desparafinado en Xilol, y concentraciones descendientes de etanol 100%, 95%, 70%, 50%, agua destilada). Enseguida, se lavó la laminilla con TBST (Tris-Buffered saline Tween 20), tres veces por tres min. Cada laminilla se cubrió posteriormente con 50 µL de una solución de bloqueo de proteínas, incluida en el Kit Mouse & Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC (Abcam Inc, Cambridge, MA, USA). Las laminillas se incubaron en cámara húmeda a 37°C por 30 min y se les agregó 50 µL de la dilución correspondiente de anticuerpo primario. Se incubó la laminilla en una cámara húmeda, en oscuridad, a 4°C por 12 h. Como control negativo de la técnica de inmunofluorescencia se emplearon células sin añadir el anticuerpo primario. Las preparaciones se lavaron tres veces con TBST, cada una por 3 minutos. Cada preparación se cubrió con 50 µL de anticuerpos secundarios Alexa Fluor® 488 (verde) y 649 (rojo) (Abcam), diluidos 1:1000 con PBS. Se incubaron las preparaciones en una cámara húmeda a 37°C por 1 h y se lavaron por inversión (cinco veces) en TBST. Por último, se cubrieron con 25 µL de medio de montaje VECTASHIELD® mezclado 4´,6-diamino-2-fenilindol con (DAPI) (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) como medio para la observación de núcleos celulares. Se colocó sobre las preparaciones un cubreobjetos (Corning, NY, USA). Las laminillas se conservaron a 4°C hasta su observación. Se observaron las laminillas en un microscopio de epifluorescencia ZEISS Imager.A2 (Carls ZEISS, Alemania) y se tomaron cinco campos seleccionados al azar, a una amplificación

de 40×, con la ayuda de la cámara AxioCam MRc acoplada al microscopio. Las imágenes fueron analizadas con el software del ZEISS ZEN del microscopio, así como con el programa Image J (<u>https://imagej.nih.gov/ij/download.html</u>).

Se empleó el kit de CellTiter-Glo (Promega), para determinar la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de las líneas celulares de CCR Caco-2 (ATCC® HTB-37) y CMT-93 (ATCC® CCL-223TM) hacia la proteína recombinante de TRAIL murino (PeproTech, 315-19); se sembraron 2.0×10^3 células por pozo en una placa de 96 pozos y se aplicaron diferentes concentraciones de TRAIL recombinante (0.25 ng/ mL – 625 ng/ mL). El protocolo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadió un volumen igual al medio de cultivo en la placa de reactivo CellTiter-Glo y se mezcló por dos minutos para lisar las células. Se incubó la placa por 10 min a temperatura ambiente para estabilizar la señal y se leyó la luminiscencia en lector de placas Cytation 3 (BIOTEK). Se realizaron 3 repeticiones por triplicado. El valor de IC₅₀ de TRAIL recombinante en cada línea celular fue calculada empleando la fórmula 1 - (luminiscencia promedio del tratamiento/ luminiscencia promedio del control) X 100.

7.6. Caracterización de CMT y evaluación de quimiosensibilidad

Se emplearon las siguientes líneas celulares de CCR: Adenocarcinoma colorrectal humano Caco-2 (ATCC® HTB-37) y carcinoma poliploide de recto murino CMT-93 (ATCC® CCL-223[™]). Estas se cultivaron en medio DMEM 1X glutamax (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY 14072, USA) suplementado con 10% de SFB (Gibco), 100 µg/mL gentamicina (Gibco) y 2.5 µg/mL de anfotericina B (Gibco). En las líneas celulares se realizó la detección de los siguientes marcadores de CMT: CD44, CD24, CK-18 y ABCB1, los cuales se han identificado ampliamente en CCR y en múltiples tipos de tumor. Esto fue analizado mediante inmunofluorescencia. Se emplearon los siguientes anticuerpos primarios anti-CD24 conjugado con FITC (1:100), anti-CD44 conjugado con PE/Cy7 (1:100),

anti-ABCB1 (1:200) y anti-CK-18 (1:200), todos diluidos en PBS. Las células se cultivaron en microcámaras de 4 pozos Lab-Tek® (Nunc®, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) por 12 h para permitir su adherencia, en una concentración de 5.0x10³ células por pozo. Después de ese lapso las células fueron fijadas con metanol-acetona (4:1) por 10 min a 4°C. Enseguida, se lavó la laminilla con TBST (Tris-Buffered saline Tween 20), tres veces por tres min. Cada laminilla se cubrió posteriormente con 50 µL de una solución de bloqueo de proteínas, incluida en el Kit Mouse & Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC (Abcam Inc, Cambridge, MA, USA). Las laminillas se incubaron en cámara húmeda a 37°C por 30 min y se les agregaron 50 µL de la dilución correspondiente de anticuerpo primario. Se incubó la laminilla en una cámara húmeda, en oscuridad, a 4°C por 12 h. Como control negativo de la técnica de inmunofluorescencia se emplearon células sin añadir el anticuerpo primario. Las preparaciones se lavaron tres veces con TBST, cada una por 3 minutos. Cada preparación se cubrió con 50 µL de anticuerpos secundarios Alexa Fluor® 488 (verde, ab150113) y 647 (rojo, 150075) (Abcam), diluidos 1:1000 y 1:1000, respectivamente, con PBS. Se incubaron las preparaciones en una cámara húmeda a 37°C por 1 h y se lavaron por inversión (cinco veces) en TBST. Por último, se cubrieron con 25 µL de medio de montaje VECTASHIELD® mezclado con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) como medio para la observación de núcleos celulares. Se colocó sobre las preparaciones un cubreobjetos (Corning, NY, USA). Las laminillas se conservaron a 4°C hasta su observación. Se observaron las laminillas en un microscopio de epifluorescencia ZEISS Imager.A2 (Carls ZEISS, Alemania) y se tomaron cinco campos seleccionados al azar, a una amplificación de 40×, con la ayuda de la cámara AxioCam MRc acoplada al microscopio. Las imágenes fueron analizadas con el software del ZEISS ZEN del microscopio, así como con el programa Image J (https://imagej.nih.gov/ij/download.html).

Para analizar la quimiosensibilidad, las líneas celulares fueron tratadas con fármacos quimioterapéuticos de primera línea para cáncer colorrectal: 5-Fluorouracilo (5-FU) (0.1 – 50 μ g/mL), Oxaliplatino (0.1 – 59 μ g/mL) e Irinotecán, determinándose la IC₅₀ (0.75 - 15 µg/mL). Las células se incubaron por 24 h en una placa de 96 pozos en una concentración de 2.0x10³ células y posteriormente fueron añadidos los fármacos a concentración creciente. Las células de incubaron por 48 h con los tratamientos. Para el análisis de viabilidad se empleó el reactivo CellTiter-Glo (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadió un volumen igual al medio de cultivo en la placa de reactivo CellTiter-Glo y se mezcló por dos minutos para lisar las células. Se incubó la placa por 10 min a temperatura ambiente para estabilizar la señal y se leyó la luminiscencia en lector de placas Cytation 3 (BIOTEK). Se realizaron 3 repeticiones por triplicado. Se utilizó regresión lineal para determinar el valor de la IC₅₀.

7.7. Análisis de actividad antitumoral de CMM-TRAILs individual y con fármacos quimioterapéuticos de primera línea.

Una vez caracterizada la presencia de CMT en las líneas celulares de cáncer, así como la expresión de TRAIL por las CMM, se analizó el tratamiento de CMM-TRAILs. Las células tumorales se incubaron por 24 h en placas de 96 pozos en una concentración de 2x10³ cel/ pozo. Posteriormente se añadieron los siguientes tratamientos a cada una de las líneas celulares (Tabla 3).

Grupo	Tratamiento	Aplicación
1	CMM-TRAILs	1:1, 1:3,1:6
2	CMM-TRAILc	1:1, 1:3,1:6
3	СММ	1:1, 1:3, 1:6
4	TRAILrm	IC ₅₀

En el ensayo de Co-cultivo se aplicaron los tratamientos de CMM genéticamente modificadas con TRAIL (soluble o completo) así como con CMM sin modificarse. Se utilizaron 3 diferentes relaciones celulares para evaluar la mejor actividad citotóxica, donde

se sembraron 2,000 células tumorales por pocillo y a partir de ahí se incluyeron 1:1, 1:3 y 1:6 CMM en Co-cultivo. Se incluyó la proteína TRAIL recombinante como control positivo. CMM-TRAILs: células madre mesenquimales transducidas con TRAIL soluble; CMM-TRAILc: células madre mesenquimales transducidas con TRAIL completo; CMM-EV: células madre mesenquimales transducidas con el vector vacío; CMM: células madre mesenquimales in transducir; TRAIL recombinante murino.

Las células en co-cultivo se incubaron por 24 h a 37°C, 5% CO₂. Para el análisis de viabilidad se empleó el reactivo CellTiter-Glo (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron 3 repeticiones por triplicado.

Una vez analizada la actividad individual de las CMM sobreexpresando TRAILs, se seleccionó la proporción celular con mayor actividad en las células tumorales Caco-2 y CMT-93 para evaluar la combinación con pre-tratamiento quimioterapéutico y su posible efecto sensibilizador a TRAIL. Nuevamente se incubaron las células tumorales en placas de 96 pozos en una concentración de 2.0x10³ cel/ pozo. Se añadieron los fármacos quimioterapéuticos a la concentración máx. en plasma. Se incubaron por 24 h y luego se añadió la proporción de CMM-TRAILs que mostró mayor actividad (1:6). Se incubaron por 24 h y se evaluó la citotoxicidad por luminiscencia con el kit CellTiter-Glo® (Promega) y activación de apoptosis mediante luminiscencia con el kit Caspase-Glo® 3/7 Assay System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadió un volumen igual al medio de cultivo en la placa de reactivo Caspase-Glo® 3/7 y se agitó por 30 segundos a 300-500 rpm en una placa de agitación. Se incubó la placa por 30 min a temperatura ambiente para estabilizar la señal, y se leyó la luminiscencia en un lector de placas Cytation 3 (BIOTEK). Se realizaron 3 repeticiones por duplicado. Se utilizó la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de muerte celular (PMC) en los ensayos de co-cultivo:

$$1 - \left(\frac{\text{Luminiscencia promedio tratamiento} - luminiscencia promedio efector}{luminiscencia promedio control}
ight) imes 100$$

Donde, luminiscencia promedio del tratamiento es la señal total del co-cultivo; luminiscencia promedio efector es la señal de las CMM expresando TRAIL individual o tratadas con quimioterapia; luminiscencia promedio del control es la señal de las células tumorales sin tratamiento.

7.8. Determinación de marcadores genéticos de CMT

7.8.1. Secuencia de los primers (oligonucleótidos)

Seleccionamos los *primers* para amplificar regiones específicas de los genes de interés que corresponden a marcadores de CMT y el gen endógeno GAPDH según reportado por la literatura. Las secuencias de los *primers* fueron validadas con la secuencia de nucleótidos correspondiente empleando la plataforma Primer Blast (NCBI) y la plataforma de Oligo Analyzer (IDT, Integrated Technologies, Iowa, EUA). Los primers fueron elaborados y adquiridos de la casa comercial T4 oligo (T4 oligo, Irapuato, GTO, México).

Gen	Secuencia Primers	Tamaño producto	REF.
CD44v6	Forward:	119 pb	[136]
	GACAGAATCCCTGCTACCAATAG		
	Reverse: TCCTTCGTGTGTGGGTAATG		
KRT-18	Forward:	171 pb	[137]
	TCGCAAATACTGTGGACAATGC		
	Reverse: GCAGTCGTGTGATATTGGTGT		
EpCAM	Forward:	188 pb	[138]
	GCTGGAATTGTTGTGCTGGTTA		
	Reverse: AGATGTCTTCGTCCCACGC		
GAPDH	Forward: TCGCCAGCCGAGCCA	214 pb	[139],
	Reverse: CCTTGACGGTGCCATGGAAT		[140]

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos.

Secuencias de los oligonucleótidos o primers utilizados para la detección de genes sobreexpresados por CMT de CCR y el tamaño de su producto amplificado por qPCR.

7.8.2. Análisis de expresión de genes de CMT por qPCR

Se colocaron las células tumorales Caco-2 y el aislado de CMT PX91 en una concentración de 5.0x10⁴ por pozo en una placa de 24 pozos. Se añadió Oxaliplatino a concentración máxima en plasma (2.9 µg/mL). Después de incubar por 24 h, se añadieron en co-cultivo las CMM sobreexpresando TRAILs a la relación celular que mejor haya mostrado actividad apoptótica (1:6). Se incubó por 24 y 48 h. El ARN total de las células tumorales se extrajo por medio del kit RNAeasy mini de Qiagen (Qiagen, Alemania) siguiendo la metodología del fabricante. Brevemente: las células del pozo se lisaron con 350 µL de Buffer RLT y se homogenizaron mediante pipeteo. Luego se transfirieron a un tubo de 1.5 mL y se homogenizaron con vortex por 1 min. Se añadió un volumen de etanol al 70% al lisado y se mezcló bien por pipeteo. Se transfirieron 700 µL de la muestra a una columna RNeasy spin dentro de un tubo de 2 mL incluido en el kit. Se centrifugó por 15 seg a 10,000 rpm. Se descartó el líquido filtrado. Se añadieron 700 µL de Buffer RW1 a la columna Rneasy spin. Se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 15 seg y se descartó el líquido filtrado. Se añadieron 500 µL de Buffer RPE a la columna Rneasy spin y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 seg, descartando nuevamente el líguido filtrado. Se añadieron 500 µL de Buffer RPE a la columna Rneasy spin y se centrifugó por 2 min a 10,000 rpm. Se añadieron 20 μL de agua libre de RNasas directo a la columna. Se centrifugó por 1 min a 10,000 rpm para eluir el ARN. Por último, se cuantificó el ARN en un NanoDrop 2000 (ThermoFisher, Scientific).

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó con el SuperScript IV VILO synthesis kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente se mezcló: 4 μ L de 5X VILO reaction mix, 2 μ L de 10X Super Script Enzyme mix, hasta 2.5 μ g de RNA y agua DEPC hasta un volumen final de 20 μ L. En un termociclador se realizó el alineamiento a 25°C por 10 min. Extensión a 42°C por 60 min. Inactivación de transcriptasa inversa a 85°C por 5 min. Se almacenaron los ADNc a -20°C hasta su uso. La qPCR en tiempo real se llevó a cabo con SYBR Green Master Mix 2X (ThermoFisher, Scientific, MA, USA), añadiendo los *primers* sentido (*Forward*) y anti-sentido (*Reverse*), ADNc templado y agua: 5 µL SYBR Green 2X, 1 µL de primer Forward (200 nM), 1 µL de primer Reverse (200 nM), 200 ng de ADNc y agua DEPC hasta un volumen de 10 µL. Se emplearon las siguientes condiciones de reacción: activación de la Taq, 50°C, 2 min; desnaturalización inicial, 95°C, 10 min; desnaturalización, 95°C, 15 seg; extensión 60°C, 60 seg. Repetir del paso 2 al paso 4, 40 veces. Se realizó cuantificación relativa de la expresión génica con relación al gen GAPDH por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y la ecuación de Pfaffl.

7.9. Determinar especificidad de tratamiento CMT de cáncer colorrectal.

Se utilizó un aislado de CMT no adherentes obtenido de paciente con CCR resistente a Oxaliplatino para probar el tratamiento de CMM sobreexpresando TRAILs. Este aislado fue obtenido de una paciente femenina de 44 años con tumor maligno de colon en estadio 4, que desarrollo metástasis a hígado y pulmón [133]. Las células se cultivaron en medio de CMT: DMEM 1X (Dulbecco's Modified Eagle's medium; Life Technologies), adicionado con 10 nM de nicotinamida (Sigma Aldrich-Merck, St. Luis MO, USA), 20 ng de EGF [epidermal growth factor]/ mL y 10 ng de FGF-β [fibroblast growth factor; PeproTech, Rocky Hill, NJ. USA]/mL, 2.5 μg de anfotericina B/mL y 100 µg de gentamicina/mL. Se incubaron en placas de 96 pozos a una concentración de 2.0x10³ células por pozo. Se añadió el fármaco Oxaliplatino a concentración máx. en plasma (2.9 µg/mL) y se dejó incubar 24 h a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Posteriormente se añadió el tratamiento de CMM-TRAILs a la relación celular 1:6. Se incubó por 24 h y enseguida se evaluó la muerte celular y la apoptosis. Para determinar el porcentaje de muerte celular se utilizó el reactivo CellTiter-Glo (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para evaluar la activación de apoptosis se utilizó el kit Caspase-Glo® 3/7 assay (Promega) como se describio anteriormente.

Con el fin de visualizar la muerte celular específica de las células tumorales, se analizó el marcador de CMT CD44 posterior al pre-tratamiento con Oxaliplatino y con CMM-TRAILs. Para este fin se empleó la línea celular Caco-2 por ser adherentes y presentar alta expresión de marcadores de CMT. Las células se sembraron a una concentración de 5.0x10⁴ células en una placa de 6 pozos en la cual se colocó un cubreobjetos tratado con Poly-L-lisina, 0.1 % w/v (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Se incubaron hasta observar adherencia de las células a la superficie a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Después se añadió el Oxaliplatino a concentración máx. en plasma (2.9 µg/mL), y se incubó por 24 h. Utilizando filtros Transwell® (Corning, NY, USA) de 0.4 µm se realizó un co-cultivo con las CMM-TRAILs a la relación 1:6 (3.0x10⁵ células) colocándose encima del filtro. Se incubó por 24 h, y luego se siguió con el procedimiento de fijación y lavados para determinación por inmunofluorescencia del marcador CD44 en las células tumorales. También se evaluó por fluorescencia la expresión del receptor de muerte de TRAIL DR5 posterior al estímulo con Oxaliplatino a concentración máx. en plasma (2.9 µg/mL). Se incubaron las células Caco-2 en microcámaras de 8 pozos a 1.0x10⁴ células por pozo y se dejaron adherir a la superficie. Se añadió el tratamiento con Oxaliplatino y se incubó por 48 h. El procedimiento de inmunofluorescencia se mencionó previamente. Se empleó el anticuerpo primario anti-CD44 (Abcam, ab6124) diluido con PBS (1:100), y anti-DR5 (Abcam, ab8416) diluído con PBS (1:200). Se empleó un anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo Alexa 488 (A488) (Abcam, ab150113). Se observaron las laminillas en un microscopio de epifluorescencia ZEISS Imager.A2 (Carls ZEISS, Alemania) y se tomaron cinco campos seleccionados al azar por triplicado, a una amplificación de 40×, con la ayuda de la cámara AxioCam MRc acoplada al microscopio. Las imágenes fueron analizadas con el software del ZEISS ZEN del microscopio, así como con el programa Image J (https://imagej.nih.gov/ij/download.html).

7.10. Análisis estadístico

Los datos se analizaron por medio del software SPSS versión 25 de IBM, y las gráficas serán elaboradas con Graph Pad Prisma 9. Los resultados se interpretaron con el software SPSS v.25. Se realizaron pruebas de T para datos paramétricos o U de Mann Whitney para datos no paramétricos para análisis entre grupo prueba y grupo control. En comparaciones entre varios grupos se utilizó la prueba Anova con comparación múltiple de Tukey o Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunnen caso de datos no paramétricos.

7.11. Ética

Este trabajo está aprobado por el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina con el número de registro BI21-00005.

8. RESULTADOS

8.1. Cultivo de CMM de medula ósea de ratón.

Se partió de una línea celular de CMM-MO de ratón en pase 3, las cuales fueron descongeladas y cultivadas en condiciones de cultivo estándar. Después de una semana de cultivo las células se adhirieron a la caja de cultivo presentando una morfología alargada en forma de huso (Figura 5), la cual es característica de las CMM-MO. De aquí en adelante se denominarán como CMM.



Figura 8. CMM-MO en cultivo. Las células adherentes al plástico corresponden al pase 3 y se encuentran en 80 % de confluencia (40×). Microscopía de campo claro.

8.2. Modificación genética de CMM para la sobreexpresión de TRAIL

Posteriormente se realizó la modificación genética por medio de transducción lentiviral para la expresión de los transgenes TRAILc y TRAILs. Primero seleccionamos la mejor concentración del antibiótico Geneticina para la selección de las CMM-MO transducidas. Se aplicaron concentraciones desde 100 a 1000 µg/

mL en CMM-MO de ratón. Después de 7 días de cultivo se seleccionó la concentración de 400 μ g/ mL, debido a que fue la que presentó 50% de muerte celular de las células sin modificar. Enseguida se realizó la transducción lentiviral de las CMM-MO con los lentivirus de TRAILs y TRAILc. Las células fueron seleccionadas mediante cultivo con 400 μ g/ mL de Geneticina por 7 días. Después se evaluó la eficiencia de transducción mediante microscopía de fluorescencia tomando como positivas a las células que expresaron el marcador verde fluorescente GFP. Con el lentivirus de TRAILs se obtuvo un porcentaje de eficiencia de transducción del 77.42 ± 4.9 %, y con el lentivirus de TRAILc un porcentaje del 81.09 ± 5.93 %. La Figura 6 incluye imágenes representativas de las CMM-MO transducidas.



Figura 9. CMM sobreexpresando la proteína GFP. Las células transducidas expresaron el marcador fluorescente GFP incluido en el vector lentiviral (40×). La señal verde indica que la secuencia del vector fue insertada en el genoma de la célula huésped. CMM: células madre mesenquimales; TRAILs: TRAIL soluble;

TRAILc: TRAIL completo. DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol; GFP: Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*).

Para validar la expresión génica de TRAILc y TRAILs se llevó a cabo un análisis de la proteína por *Western Blot*. La proteína de TRAILc presentó múltiples bandas, correspondientes a las formas multiméricas de TRAIL (trímero, dímero y monómero); mientras tanto, la proteína TRAILs solamente presentó una banda correspondiente a la forma monomérica de aproximadamente 20 KDa. Como control positivo se utilizó a la proteína TRAIL recombinante murina (Peprotech, 315-19), y de control negativo se empleó un lisado de CMM sin modificar. La figura 7 muestra la membrana con las bandas.



Figura 10. Western Blot de TRAIL. TRAILc presenta formas multiméricas de trímero, dímero y monómero, mientras que TRAILs solo muestra forma monomérica. Control positivo (TRAILrm), control negativo (CMM).

Además, se colectaron los sobrenadantes de 48 h de las CMM expresando TRAILs para la cuantificación de TRAIL por medio de ELISA. Se evaluó la concentración de la proteína en sobrenadante inmediatamente después de colectar a 37°C. También una alícuota se congeló a -80°C para evaluar la estabilidad tras almacenar a baja temperatura. El sobrenadante a 37°C presentó una concentración de TRAILs en promedio de 328.3 \pm 90.13 pg/mL, mientras que el sobrenadante congelado a -80°C presentó una concentración promedio de 255.03 \pm 241.87 pg/mL. Se realizó una prueba de U de Man Withney de para comparar ambas concentraciones, pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas (p>0.05, n=3) (Figura 8).



Figura 11. Niveles de concentración de TRAIL soluble en sobrenadante a las 48 h. 37°C (recién recolectado), -80°C (almacenado a baja temperatura) (n=3). Prueba U de Man Withney, p>0.05.

8.3. Caracterización mediante marcadores CD105, CD90, CD34

Con la finalidad de evaluar la conservación de los marcadores de estirpe mesenquimal, CD105, CD90 y la expresión de CD34, se realizó una inmunohistoquímica para su determinación. Las CMM-MO presentaron porcentajes altos de CD105 y CD90 (99.8 \pm 0.45, 88.83 \pm 11.201), así como de CD34 (81.043 \pm 26.07). Al realizar una comparación con las CMM sobreexpresando TRAILs y TRAILc no se observaron cambios estadísticamente significativos relacionados con la expresión de los marcadores (p>0.05, Anova de una vía, comparación múltiple

de Tukey). La figura 9 incluye imágenes representativas de las inmunohistoquímicas.



Figura 12. Caracterización de marcadores mesenquimales tras modificación genética. A) Micrografías representativas de laminillas de CMM, CMM-TRAILs y CMM-TRAILc. La coloración café-rojiza es indicativa de positividad, mientras que la coloración azul-violeta es indicativa de negatividad al marcador (40×). B) Porcentaje de expresión de marcadores CD105, CD90 y CD34. Ns: p>0.05, prueba Anova de una vía, comparación múltiple de Tukey. CMM: células madre mesenquimales; TRAILs: TRAIL soluble; TRAILc: TRAIL completo.

8.4. Determinación de sensibilidad a TRAIL.

Las líneas celulares de cáncer colorrectal humano y murino fueron cultivadas siguiendo las recomendaciones de ATCC. Ambas líneas celulares presentaron morfología epitelial con heterogeneidad en tamaño y complejidad celular como era esperado. El cultivo puede observarse en la figura 10.



Caco-2 (ATCC® HTB-37)

CMT-93 (ATCC® CCL-223™)

Figura 13. Líneas celulares de cáncer colorrectal. Línea celular Caco-2 de adenocarcinoma colorrectal humano; línea celular CMT-93 de carcinoma poliploide de recto murino (40×).

Posteriormente se determinó el porcentaje de expresión del receptor de TRAIL-R2 (DR5) por medio de inmunofluorescencia. La línea Caco-2 expresó el receptor en un 59.08 \pm 5.07 %, mientras que la línea CMT-93 lo expresó en un 51.65 \pm 11.99 % (Figura 11).


Figura 14. Expresión del receptor DR5 en líneas celulares de CCR. A) La señal verde de Alexa 488 corresponde con la expresión del receptor DR5 por las células tumorales. La señal azul corresponde a los núcleos teñidos por DAPI (40×). B) Porcentaje de expresión de DR5 en líneas celulares Caco-2 y CMT-93. DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.

A partir de una colección histórica de biopsias de tumor de CCR embebidas en parafina, se realizaron cortes de 6 mm para análisis del receptor DR5 por inmunofluorescencia. Los resultados se muestran en la Figura 8. A diferencia de las líneas celulares, los tejidos mostraron elevada variabilidad en cuanto a la expresión del receptor DR5, fluctuando desde el 8 hasta el 53 % (Figura 12, A, B). Estos valores en conjunto se encontraban estadísticamente reducidos en comparación con el control positivo de células de riñón de ratón (p<0.05, prueba T) (figura 12, C). Además, se realizó una comparación entre los pacientes con resistencia y sensibilidad a quimioterapia, observando que no se encontraban diferencias estadísticamente significativas entre la expresión del receptor (p>0.05, prueba T) (Figura 12, D).



Figura 15. Expresión de DR5 en tejidos de CCR. A) Detección de receptor TRAIL-R2/DR5 en corte de tumor de paciente 9 (Px 9). Control positivo: corte de riñón de ratón; control negativo: Corte de tejido sin anticuerpo secundario (40×). B) Porcentaje de expresión de receptor DR5 en tejidos de pacientes de CCR. C) Subexpresión de receptor DR5 en tejidos de pacientes con CCR. P<0.05, prueba de T. D) Comparación de expresión de DR5 entre tejidos de pacientes resistentes y sensibles a quimioterapia. DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol. Ns: p>0.05, prueba de T.

Posteriormente, se determinó la IC_{50} a la proteína TRAIL recombinante en las líneas celulares de CCR. Por medio del método de mínimos cuadrados se determinó que las IC_{50} de las líneas celulares Caco-2 y CMT-93 son de 534.15 ng/mL y 581.34 ng/mL. La Figura 13 presenta los gráficos correspondientes.



Figura 16. Sensibilidad a TRAIL recombinante en líneas celulares de CCR. A) El gráfico muestra la curva de sensibilidad a TRAIL en Caco-2; B) El gráfico muestra la curva de sensibilidad a TRAIL en CMT-93. PMC: Porcentaje de muerte celular. IC₅₀: Concentración inhibitoria 50.

8.5. Caracterización de CMT y evaluación de quimiosensibilidad

La caracterización de la presencia de CMT en cultivos de líneas celulares de CCR se efectuó por medio de inmunofluorescencia. Se evaluó la co-expresión de la combinación de marcadores CD24, CD44, CK-18 y ABCB1. Las células Caco-2 mostraron co-expresión de los marcadores CD24⁺/CD44⁺ (56.44 \pm 14.66), CD44⁺/CK-18⁺ (44.15 \pm 9.76) y CK18⁺/ABCB1⁺ (51.52 \pm 13.79). La línea CMT-93 mostró porcentajes de co-expresión CD24⁺/CD44⁺ (35.27 \pm 19.28), CD44⁺/CK-18⁺ (54.77 \pm 16.02) y CK18⁺/ABCB1⁺ (39.22 \pm 12.11). En las Figuras 14 y 15 se muestran imágenes representativas de la caracterización, así como sus gráficos de expresión.



Figura 17. Expresión de marcadores de CMT en línea celular Caco-2. Las células presentaron porcentajes de co-expresión de CD24⁺/CD44+ (56.44 ± 14.66), CD44⁺/CK-18⁺ (44.15 ± 9.76) y CK18⁺/ABCB1⁺ (51.52 ± 13.79). DAPI: 4',6- diamidino-2-fenilindol.



Figura 18. Expresión de marcadores de CMT en línea celular CMT-93. Las células presentaron porcentajes de co-expresión CD24⁺/CD44+ (35.27 ± 19.28), CD44⁺/CK-18⁺ (54.77 ± 16.02) y CK18⁺/ABCB1⁺ (39.22 ± 12.11). DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.

Se llevó a cabo la determinación de la IC₅₀ de las líneas celulares de CCR con los fármacos de primera línea que se usan como tratamiento: 5-Fluorouracilo, Oxaliplatino e Irinotecán. Los resultados para ambas líneas celulares se muestran en la tabla 5. Se empleó regresión lineal de los datos obtenidos con el protocolo de ATP-CRA y se analizó la ecuación de la recta (Figuras 16 y 17).

Tabla5.Concentracióncitotóxicamedia(IC50)defármacosquimioterapéuticos en líneas celulares de CCR.

			Fármacos			
	5-Fluorouracilo		Oxaliplatino		Irinotecán	
	IC ₅₀	Max	IC ₅₀	Max	IC ₅₀	Max
Células	(µg/mL)	plasma	(µg/mL)	plasma	(µg/mL)	plasma
		(µg/mL)		(µg/mL)		(µg/mL)
Caco-2	1.66	10	4.0	2.9	2.14	1.97
CMT-93	0.096	10	0.15	2.9	1.33	1.97

Max plasma: Concentración máxima en plasma.

IC₅₀: Concentración inhibitoria del 50% de las células.



Figura 19. Gráfica de linealidad para determinación de IC₅₀ **de quimioterapias en células Caco-2.** PMC: porcentaje de muerte celular. IC₅₀: Concentración inhibitoria 50.



Figura 20. Gráfica de linealidad para determinación de IC₅₀ de quimioterapias en células CMT-93. PMC: porcentaje de muerte celular. IC₅₀: Concentración inhibitoria 50.

Se realizó una comparación de las IC₅₀ con la concentración máxima en plasma de los fármacos como punto de corte para determinar sensibilidad o resistencia. Únicamente la IC₅₀ de la línea Caco-2 fue mayor que la concentración máxima en plasma de Oxaliplatino e Irinotecán.

Además de las líneas celulares, se analizó la sensibilidad a quimioterapia en un aislado de células tumorales proveniente de un paciente con CCR, el cual cumplía con las características de presentar alta expresión de los marcadores CD44⁺/CD24⁺ [132], [141]. Para este aislado el cual clasificamos como PX91, se estableció un límite de sensibilidad, en donde un porcentaje de muerte celular (PMC) \geq 20 se consideraba como sensible y < 20 se consideraba como resistente. Siguiendo lo anterior, el aislado del PX91 mostró sensibilidad a 5FU (36.09 ± 3.09 %), y resistencia a Oxaliplatino. Con estos resultados de quimioresistencia, en este estudio elegimos únicamente al fármaco Oxaliplatino para continuar los siguientes ensayos.

8.6. Análisis de actividad antitumoral de CMM-TRAILs individual y con fármacos quimioterapéuticos de primera línea.

La actividad citotóxica de las CMM expresando TRAILs y TRAILc se llevó a cabo mediante co-cultivo con las líneas celulares de CCR Caco-2 y CMT-93. Para ambas líneas celulares se observó un incremento del PMC proporcional a la concentración de CMM añadidas (Figura 18). Se incluyó como control positivo a la proteína TRAIL recombinante. En la línea Caco-2 se observó que la relación de CMM-TRAILs 1:6 (12,000 células) generó un porcentaje de muerte celular del 57.12 ± 11.84 % (error est.), la cual fue estadísticamente significativa en comparación del control sin tratamiento (p<0.05, Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn); sin embargo, aunque a la relación 1:6 de CMM-TRAILc se observó el mayor PMC (68.52 ± 12.54 %, error est.), Mientras tanto, la misma relación celular 1:6 en la línea CMT-93 generó un PMC del 60 ± 11.86 % (error est.), siendo también estadísticamente significativa en relación con el control sin tratamiento (p<0.001, Kruskal Wallis con comparación múltiple de Dunn). Así mismo, las CMM sin modificar a la relación 1:6, en las células CMT-93 generaron un PMC del 73.75 ± 11.86 % (p<0.0001, Kruskal Wallis con comparación múltiple de Dunn) a diferencia de las células Caco-2 donde solamente se alcanzó un PMC del 29.94 ± 12.68 %

(p>0.05, U de Mann-Whitney). Al ser empleadas como un control las CMM-TRAILc, se seleccionó la relación celular que generara PMC alrededor del 50%, que en ambas líneas celulares fue la 1:3. Tomando en cuenta estos resultados, se seleccionó la relación celular 1:6 de CMM-TRAILs y 1:3 para CMM-TRAILc para los siguientes ensayos con quimioterapia.



Figura 21. Co-cultivo CMM expresando TRAIL y líneas celulares de CCR. Porcentaje de muerte celular de líneas celulares Caco-2 y CMT-93 al co-cultivarse con CMM expresando TRAILs y TRAILc. TRAILr: Proteína TRAIL recombinante; CMM: Células madre mesenquimales; TRAILs: TRAIL soluble; TRAILc: TRAIL completo. PMC: Porcentaje de muerte celular. **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.00001 (Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn).

Una vez seleccionada la relación celular de CMM sobreexpresando TRAIL, se añadió un pre-tratamiento de Oxaliplatino a la concentración máxima en plasma (2.9 µg/mL) por 24 h, tiempo después del cual se aplicó el co-cultivo con las CMM-TRAILs o CMM-TRAILc por otras 24 h. Se utilizaron las líneas celulares de CCR Caco-2 y CMT-93 así como un aislado de CMT obtenidas de una biopsia de tumor maligno de colon al cual denominamos como PX91. Entre otras características clínicas provenía de un paciente femenino de 44 años, en estadio 4 con metástasis a hígado y el cual fue aislado en octubre del 2017 por el grupo de trabajo [133]. Este

aislado fue caracterizado previamente con la expresión de marcadores de CMT CD44+/CD26+, así como análisis de resistencia a Oxaliplatino [141]. Por medio de análisis de luminiscencia se determinó el PMC. Tanto para las líneas celulares de CCR como el aislado PX91, el tratamiento combinatorio de CMM sobreexpresando TRAILs o TRAILc con Oxaliplatino generó un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de muerte celular en comparación con el control (p<0.05, Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn) (Figura 19), no obstante, no se presentó una sinergia entre la quimioterapia y las CMM sobreexpresando TRAIL (p>0.05), pero sí una tendencia a la alza en las líneas celulares Caco-2 y CMT-93.



Figura 22. Análisis de muerte celular en co-cultivos de CMM sobreexpresando **TRAIL y células tumorales pre-tratadas con Oxaliplatino.** Evaluación del porcentaje de muerte celular en las líneas celulares de CCR Caco-2, CMT-93 y aislado PX91. PMC: porcentaje de muerte celular; TRAILr: proteína TRAIL recombinante; CMM: células madre mesenquimales; TRAILs: TRAIL soluble; TRAILc: TRAIL completo. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Kruskal-Wallis, comparación múltiple de Dunn).

Para confirmar que la muerte celular estaba siendo ocasionada por mecanismo de apoptosis, se analizó la inducción de apoptosis celular por caspasas-3/7 efectoras mediante luminiscencia. Para esta prueba se seleccionaron la línea celular Caco-2 y el aislado PX91 debido a que fueron los que presentaron resistencia a Oxaliplatino. Para los tratamientos de CMM expresando TRAILs o TRAILc de forma individual o en combinación con Oxaliplatino, se observó un incremento estadísticamente significativo de la señal de luminiscencia la cual es correspondiente con la actividad de las caspasas-3/7 (Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn para aislado PX91, Anova de una vía con comparación múltiple de Tukey para Caco-2), lo que nos indica un incremento de apoptosis en las células tumorales generada por los tratamientos (Figura 20). Sin embargo, el tratamiento combinado de Oxaliplatino con CMM-TRAILs fue el que presentó el mayor aumento de la actividad de caspasas-3/7 para ambas líneas celulares.





Figura 23. Análisis de apoptosis en co-cultivos de CMM sobreexpresando TRAIL y células tumorales pre-tratadas con Oxaliplatino. Evaluación de activación de caspasa-3/7 en cultivos de CCR. URL: unidades relativas de luminiscencia; CMM: Células madre mesenquimales; TRAILs: TRAIL soluble; TRAILc: TRAIL completo. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 (Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn).

En el análisis de apoptosis se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la actividad de caspasas-3/7 generada por los tratamientos de CMM sobreexpresando TRAIL a comparación del tratamiento con el fármaco Oxaliplatino, en la línea celular Caco-2 (p<0.001, Anova de una vía con comparación múltiple de Tukey). Además, el pre-tratamiento de Oxaliplatino incrementó el efecto pro-apoptótico de CMM-TRAILs (Figura 21 A). En el aislado de CMT PX91 también se observó mayor señal de caspasas-3/7 con los tratamientos de CMM-TRAIL que la inducida por la quimioterapia, sin embargo, aunque presentó una tendencia al alza este no fue estadísticamente significativo (p<0.05, Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn) (Figura 21 B).



Figura 24. Análisis individual de apoptosis en co-cultivos de CMM sobreexpresando TRAIL y células tumorales pre-tratadas con Oxaliplatino. Evaluación de activación de caspasa-3/7 en (A) línea celular Caco-2 y (B) aislado PX91. URL: unidades relativas de luminiscencia; CMM: Células madre mesenquimales; TRAILs: TRAIL soluble; TRAILc: TRAIL completo. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 (A. Anova de una vía con comparación múltiple de Tukey; B. Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn).

8.7. Determinar especificidad de tratamiento contra CMT de CCR.

Por medio de co-cultivo en Transwell® se determinó la especificidad del tratamiento con TRAILs contra CMT de CCR. Este método únicamente permite el

contacto de las células tumorales con TRAILs liberado por las CMM que difunde a través del filtro de 0.4 µm de poro. Dentro del pozo de cultivo se colocó un cubreobjetos para permitir la adherencia de las células tumorales a la laminilla. Se mantuvieron las relaciones celulares empleadas previamente en los ensayos de citotoxicidad y apoptosis. Las células de la línea Caco-2 se cultivaron hasta observar adherencia al pozo de la placa de cultivo, tiempo en el cual se añadieron los tratamientos de CMM-TRAILs y la combinación del pre-tratamiento Oxaliplatino y el tratamiento de CMM-TRAILs. A las 24 h se observó por microscopía de campo claro desprendimiento de las células adheridas a la superficie de la placa en ambos tratamientos experimentales (Figura 22 A). Se llevó a cabo una inmunofluorescencia para CD44 y tinción de núcleos con DAPI. Al analizar la señal de DAPI se observó una reducción de la señal de fluorescencia asociada con las células adheridas a la laminilla, la cual fue estadísticamente significativa para ambos tratamientos (p<0.05, Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn). No obstante, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre la reducción generada por el tratamiento individual de CMM-TRAILs y su pre-tratamiento con Oxaliplatino (p>0.05, Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn) (Figura 22 B). Además, en la inmunofluorescencia para el marcador CD44, se observaron cambios morfológicos asociados con apoptosis en las células CD44+ como compactación de la cromatina y fragmentación nuclear, siendo más evidente con la combinación del pre-tratamiento con Oxaliplatino y el tratamiento de CMM-TRAILs (Figura 22 C).



Figura 25. Actividad citotóxica de CMM sobreexpresando TRAILs contra CMT de CCR. Análisis microscópico de la actividad de CMM-TRAIL individual y en combinación con Oxaliplatino. (A) Se observa menor adherencia en células Caco-2 tratadas con CMM-TRAILs y en combinación con Oxaliplatino a las 24 h por microscopía en campo claro y fluorescencia de núcleos por DAPI (10×). (B) Cuantificación de señal fluorescente derivada de núcleos teñidos por DAPI bajo los distintos tratamientos. (C) Inmunofluorescencia para CD44 con anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 en cultivo Caco-2 muestra CMT positivas a CD44 con cambios morfológicos asociados a apoptosis (compactación de cromatina y fragmentación nuclear) (40×). CMM: Células madre mesenquimales; TRAILs: TRAIL soluble; OXA: Oxaliplatino. DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol. *p<0.05, (Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn).

Para dilucidar el efecto de Oxaliplatino en la línea celular Caco-2 se evaluó la señal de expresión de DR5 posterior al tratamiento con quimioterapia. Se utilizó el anticuerpo anti-DR5 y el anticuerpo secundario conjugado con fluoróforo Alexa 488. Mediante microscopía de fluorescencia y el software Image J, se evaluó la señal verde fluorescente, observándose una tendencia al aumento de la señal de DR5 hacia el citoplasma y membrana plasmática de la célula posterior a tratamiento con Oxaliplatino; no obstante, no se presentó una diferencia estadísticamente significativa con el control basal (Prueba de T, p= 0.0734) (Figura 23). Por lo que aunque el mecanismo propuesto es el aumento de la expresión de receptores de muerte de TRAIL, se requiere realizar otro abordaje.



Figura 26. Expresión de receptor de TRAIL DR5 bajo estímulo de quimioterapia. Efecto del tratamiento con Oxaliplatino por 48 h en la expresión de DR5. (A) Micrografías de fluorescencia de DR5 en células Caco-2 (40×). Concentración máxima en plasma de Oxaliplatino (2.9 μ g/mL). (B) Gráfico de intensidad de fluorescencia media de señal de DR5 (Alexa 488). DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol. Prueba de T. p = 0.0734.

Posteriormente, se evaluó la expresión de marcadores CD44v6, CK-18 y EpCAM, para confirmar la disminución de la población de CMT en la línea celular de CCR Caco-2. Se le aplicó un pre-tratamiento con Oxaliplatino a concentración

máx. en plasma (2.9 µg/ mL) por 24 horas y luego las CMM expresando TRAIL soluble en una relación de 1:6 (5.0x10⁴ células Caco-2 y 3.0x10⁵ CMM-TRAILs). Se incubaron a 2 tiempos: 24 y 48 h, después de cuales se evaluó la expresión relativa mediante qPCR. Se empleó GAPDH como gen endógeno y el método de PFaffl para análisis de expresión relativa. La Figura 24 ilustra los resultados. Desde las 24 h se observó una disminución estadísticamente significativa de la expresión relativa de los genes CD44v6 y KRT-18 en la combinación de pre-tratamiento con Oxaliplatino y tratamiento CMM-TRAILs (p<0.05, Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn). Para *EpCAM* se observó una tendencia a la baja en la expresión a las 24 h con los dos tratamientos, sin presentarse diferencias estadísticamente significativas (p>0.05, Anova de una vía con comparación múltiple de Tukey). Se llevaron los tratamientos a un mayor tiempo, mostrando a las 48 h la disminución estadísticamente significativa de los tres genes CD44v6, KRT-18 y EpCAM en las células tratadas con la combinación de Oxaliplatino y CMM-TRAILs (p<0.5, Anova de una vía con comparación múltiple de Tukey). El gen *KRT-18* presentó una mayor disminución estadísticamente significativa con los tratamientos de CMM-TRAILs con y sin pre-tratamiento con Oxaliplatino (p<0.001, Anova de una vía con comparación múltiple de Tukey). Con ello se confirma que la combinación del pretratamiento de Oxaliplatino y las CMM-TRAIL pueden reducir genes asociados con la población de CMT, y el efecto se incrementa a las 48 h.



Figura 27. Efecto de Oxaliplatino y CMM sobreexpresando TRAIL soluble en la expresión de genes de CMT de CCR. Análisis de expresión génica de la línea celular Caco-2 tratada con CMM-TRAILs individual y en combinación con Oxaliplatino. (A) Expresión de CD44v6 a las 24 h. (B) Expresión de KRT-18 a las 24 h. (C) Expresión de EpCAM a las 24 h. (D) Expresión de CD44v6 a las 48 h. (E) Expresión de KRT-18 a las 48 h. (F) Expresión de EpCAM a las 48 h. Normalización con GAPDH. CCMM: Células madre mesenquimales; TRAILs: TRAIL soluble; OXA: Oxaliplatino. *p<0.05, ***p<0.001 (Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn, Anova de una vía con comparación múltiple de Tukey).

9. DISCUSIÓN

Las CMM se han empleado anteriormente como un sistema para entrega de proteínas con fines terapéuticos. En este trabajo empleamos CMM-MO de ratón para la modificación genética con TRAIL como una estrategia de tratamiento contra CCR, así como la evaluación del efecto sensibilizador de la quimioterapia para incrementar la efectividad del tratamiento con TRAIL. Las CMM-MO empleadas fueron de una línea celular que previamente ya fue caracterizada por nuestro grupo de investigación, siguiendo los criterios de la ISCT [8], [142]. Estos marcadores no fueron significativamente afectados por el proceso de modificación genética, lo que coincide con lo reportado previamente por otros grupos de trabajo [143], [144].

En la transducción lentiviral las CMM modificadas fueron seleccionadas con una concentración de 400 µg/mL del antibiótico Geneticina, por lo que después de 7 días de cultivo obtuvimos eficiencias de transducción de 77.42 ± 4.9 % para TRAILs y 81.09 ± 5.93 % para TRAIL completo. Además, las proteínas fueron detectadas por Western Blot, observándose la presencia de múltiples bandas en los lisados celulares de CMM-TRAILc que corresponden a los multímeros de TRAIL; por otro lado, el concentrado proteico del sobrenadante de TRAILs únicamente presentó una banda intensa de aproximadamente 25 KDa correspondiente con la unidad monomérica. Este incremento en el peso molecular se asocia con la adición del motivo zipper de isoleucina integrado en el diseño del vector de TRAIL soluble, el cual además de facilitar la formación de los multímeros, brinda mayor actividad biológica [145]. También se cuantificó la concentración de la proteína soluble en el sobrenadante celular, obteniéndose un promedio de 328.3 ± 90.13 y 255.03 ± 241.87 pg/mL en el sobrenadante fresco a 37°C y congelado a -80°C, respectivamente. Estos datos coinciden con lo reportado por otros estudios; Spano y cols. en el 2019 reportaron porcentajes de transducción lentiviral de 89.3 ± 5.2 %, y concentraciones promedio en el sobrenadante de 227.8 ± 49.5 pg/mL. No obstante, ellos reportan la presencia de dos bandas en el sobrenadante de TRAILs [74]. Otro estudio reporta la expresión de TRAILs en concentración de 407 \pm 97 pg/ mL [128], lo que nos indica que nuestros resultados coinciden con las concentraciones promedio alcanzadas mediante la transducción lentiviral de las CMM, y no se ven afectados por cambios de temperatura.

Para el estudio *in vitro* de la actividad de CMM expresando TRAIL se emplearon líneas celulares de CCR humano y murino Caco-2 y CMT-93 de la casa comercial ATCC. En ambas líneas celulares se determinó la expresión del receptor TRAIL-R2 (DR5) mediante inmunofluorescencia. Ambas líneas presentaron altos porcentajes de expresión del receptor (59.08 \pm 5.071 % y 51.65 \pm 11.99 %, Caco-2 y CMT-93). La expresión del receptor DR5 se ha asociado con mayor sensibilidad a TRAIL [44]. Sin embargo, se requirieron concentraciones elevadas de la proteína TRAIL recombinante para alcanzar la muerte celular del 50% (534.15 ng/mL y 581.34 ng/mL, Caco-2 y CMT-93). Se ha reportado que líneas celulares resistentes a TRAIL en cáncer de páncreas presentan una inhibición máxima a 500 ng/mL [128]. Otro grupo de investigación clasificó que líneas celulares de cáncer con IC₅₀ mayor de 1000 ng/ mL se consideran resistentes a TRAIL [44]. Se ha reportado previamente que la línea Caco-2 es resistente a TRAIL, ya que ha presentado IC₅₀ a concentraciones mayores a 0.1 nM [146]. Tomando en cuenta los resultados y la literatura previa, podemos considerar a las líneas celulares de CCR como moderadamente resistentes.

Simultáneamente, se llevó a cabo el análisis del receptor DR5 en tejidos procedentes de pacientes con CCR pertenecientes a una colección de tejidos. A diferencia de las líneas celulares, en los tejidos se observó heterogeneidad en cuanto a la expresión del receptor, variando desde el 8 hasta el 53 %. Sin embargo, esto no se relacionó con la sensibilidad a quimioterapia de los pacientes, lo que nos orienta a que el tratamiento de TRAIL podría ser empleado tanto en pacientes con CCR sensibles como quimiorresistentes.

La quimioresistencia en CRC se ha asociado con la presencia de CMT, por lo que en este trabajo también se analizó el potencial de las CMM expresando TRAIL para poder eliminar especificamente a estas células en las líneas celulares de cáncer colorrectal. Por ello, las líneas Caco-2 y CMT-93 se caracterizaron para detectar la presencia de CMT, mediante la expresión de marcadores CD24, CD44 y CK-18. Se evaluó la co-expresión de los marcadores en ambas líneas celulares obteniendo porcentajes altos de expresión [Caco-2: CD24+/CD44+ (56.44 ± 14.66 %), CD44⁺/CK-18⁺ (44.15 ± 9.76 %) y CK18⁺/ABCB1⁺ (51.52 ± 13.79 %). CMT-93: CD24+/CD44+ (35.27 ± 19.28 %), CD44+/CK-18+ (54.77 ± 16.02 %) y CK18+/ABCB1+ (39.22 ± 12.11 %)]. Otros marcadores como CD133 presentan expresión menor al 1 % en cáncer de páncreas [44]. La co-expresión de marcadores CD44^{alto}/CD133^{alto} en líneas celulares de cáncer colorrectal muestra relación con mayor expresión de genes de CMT y mayor capacidad tumorogénica [147]. En un estudio previo de nuestro grupo de trabajo se encontró la expresión elevada del marcador CD44 en tejidos de CCR resistentes a quimioterapia, y la co-expresión de CD44⁺/CD26⁺ en aislados de CMT de CCR obtenidos de pacientes [132]. Además, se ha detectado

la expresión de CK-18 en co-expresión con ABCB1 en aislados de CMT de pacientes con CCR [133]. Por lo tanto, podemos confirmar que las líneas celulares de CCR presentan CMT, caracterizadas por la expresión de CD24, CD44, CK18 y ABCB1.

Para analizar la quimiosensibilidad de las líneas celulares de CCR, se determinó la IC₅₀ con los fármacos 5-Fluorouracilo, Oxaliplatino e Irinotecán. Como punto de corte de sensibilidad o resistencia se compararon las concentraciones de IC₅₀ con la concentración máxima en plasma de los fármacos, según lo reportado previamente por nuestro grupo de trabajo [132]. Únicamente la línea Caco-2 mostró una IC₅₀ más alta que la concentración máxima en plasma para Oxaliplatino e Irinotecán, lo cual nos orienta una posible resistencia al fármaco. Previamente se había reportado que aislados celulares de tumor de CCR presentan resistencia al esquema combinatorio de 5-Fluorouracilo/Oxaliplatino [132]. Además, se ha reportado en líneas celulares de CCR con resistencia a Oxaliplatino una alta presencia de CMT [148].

Posteriormente se evaluó la actividad citotóxica de las CMM expresando TRAIL de forma soluble o completa sobre las líneas celulares de CCR. Al igual que con el ensayo de sensibilidad a quimioterapia, se observó una mayor resistencia a los tratamientos en la línea celular Caco-2 a diferencia de la línea CMT-93. La relación celular 1:6 de CMM-TRAILs fue la que mostró mayor muerte celular en ambas líneas celulares, produciendo un porcentaje de muerte de aproximadamente el 60 %. No obstante, la línea CMT-93 presentó muerte celular inclusive al co-cultivarse con CMM sin modificación genética, cuyo valor fue estadísticamente significativo en comparación con el control (p<0.01). El co-cultivo con CMM-TRAILc 1:6 generó un porcentaje de muerte celular de entre el 60 y 70 % para ambas líneas celulares, confirmando lo reportado por otros autores de la mayor actividad de TRAILc [149]. Por eso mismo, para ambas líneas celulares, se utilizó menor relación celular de CMM-TRAILc para obtener porcentajes de muerte del 50 % en los ensayos de co-cultivo. Con estos resultados, se seleccionaron las relaciones celulares de 1:6 para CMM-TRAILs y 1:3 para TRAILc.

Tomando como base la actividad de las CMM expresando TRAIL, se decidió aplicar un tratamiento previo con Oxaliplatino, debido a que fue el fármaco al que se observó resistencia tanto en la línea celular Caco-2, como en el aislado PX91 obtenido de una biopsia de tumor de CCR. El ensayo de citotoxicidad mostró que el tratamiento combinado de Oxaliplatino y CMM-TRAIL soluble o completo permitió alcanzar porcentajes más altos de muerte celular en las tres líneas celulares

analizadas, sin mostrarse diferencias entre estas dos combinaciones. Para confirmar que el mecanismo de muerte celular generado haya sido apoptosis, se analizó la activación de caspasas-3/7. Este análisis mostró una mayor activación de caspasas mediada por la combinación del pre-tratamiento con Oxaliplatino y CMM-TRAILs para la línea Caco-2 y el aislado PX91. Además, para la línea Caco-2, el tratamiento combinado con CMM-TRAILs fue mejor que la combinación con TRAILc, encontrándose un aumento en la sensibilidad a TRAIL al aplicar la combinación del pre-tratamiento con Oxaliplatino y CMM-TRAILs. Este resultado confirma que el incremento de la muerte celular del aislado PX91 esta llevado a cabo por inducción de apoptosis, sin embargo, contrasta con el análisis de la citotoxicidad de la línea Caco-2 en donde el mejor tratamiento fue la combinación de Oxaliplatino con CMM-TRAILC. Esto nos puede indicar que, aunque el incremento de la muerte celular no sea tan pronunciado, sí se está llevando a cabo una activación del proceso de apoptosis, el cual es mayor con la combinación del pre-tratamiento con Oxaliplatino y CMM-TRAILs. Otros grupos de trabajo han demostrado la activación de apoptosis por TRAIL mediante Anexina-V y voduro de propidio [128], [150], no obstante pocos trabajos evalúan el mecanismo específico por activación de caspasas [74], [127].

Para evaluar la especificidad del tratamiento con TRAILs sobre las CMT, se analizó la actividad antitumoral en la línea Caco-2. Previamente, se determinó alta co-expresión de marcadores de CMT [CD24⁺/CD44⁺ (56.44 ± 14.66 %), CD44⁺/CK-18⁺ (44.15 ± 9.76 %) y CK18⁺/ABCB1⁺ (51.52 ± 13.79 %)], por lo que se evaluó la actividad antitumoral mediante un sistema de co-cultivo. Después del tratamiento, mediante microscopía de campo claro se observó desprendimiento de las células de la superficie tanto en el tratamiento individual con TRAILs como con pretratamiento con Oxaliplatino. Los núcleos de las células adheridas a la laminilla fueron teñidos por DAPI; se llevó a cabo la cuantificación relativa de fluorescencia, observándose reducción de la señal fluorescente en las laminillas tratadas con TRAILs y en su combinación con el pre-tratamiento con Oxaliplatino de forma significativa (p<0.05). Sin embargo, no se observó diferencia entre la señal de estos dos tratamientos. Además, se llevó a cabo inmunofluorescencia contra CD44, demostrando que CMT positivas a CD44 presentaban cambios morfológicos relacionados con apoptosis al aplicar ambos tratamientos de TRAILs [151], [152]. No obstante, se observaban más alteraciones relacionadas con apoptosis en las células pre-tratadas con Oxaliplatino y TRAILs, lo cual nuevamente confirma los resultados observados en los ensayos de citotoxicidad y apoptosis. Esto nos permite confirmar la efectividad de la terapia de CMM-TRAILs directamente en CMT. Sin embargo, esta última técnica de co-cultivo no permitió ver cambios relacionados con quimiosensibilización en las células tumorales.

También, se evaluó el efecto de la quimioterapia en la expresión del receptor de muerte de TRAIL DR5 mediante inmunofluorescencia, en donde se observó una mayor expresión a nivel del citoplasma y en membrana plasmática en la línea celular Caco-2, sin embargo, no se presentó una diferencia estadísticamente significativa de este aumento a comparación con el control basal. En otros reportes de CCR se ha visualizado que el aumento de la sensibilidad a TRAIL por compuestos es por una mayor expresión y traslocación de receptores DR4 y DR5 en membrana plasmática, lo que facilita la activación de la vía de apoptosis de TRAIL [129], [153]. Por ello, es necesario realizar más abordajes para dilucidar el exacto mecanismo de sensibilización que ocurre en esta línea celular de CCR.

Para un análisis más profundo del impacto del pre-tratamiento con quimioterapia, se evaluó la expresión de genes de CMT en la línea celular Caco-2 tratada con la combinación después de 24 y 48 h. A las 24 h se observó una disminución en la expresión de los genes CD44v6 y KRT-18 de forma estadísticamente significativa (p<0.05) con la combinación del pre-tratamiento con Oxaliplatino y las CMM sobreexpresando TRAILs. Los marcadores CD44v6 y KRT-18 están relacionados con las CMT de CCR. Cd44v6 promueve la colonización, invasión y metástasis de las CMT en CCR, y su sobreexpresión se correlaciona con mal pronóstico y estadio avanzado de la enfermedad [154]. Por su parte el gen KRT-18 sobreexpresado en CCR se asocia con baja sobrevivencia de los pacientes y con la presencia de CMT [40], [132]. Por lo tanto, la reducción de su expresión relativa es un indicativo de la especificidad del tratamiento contra esta población celular. Por otro lado, se analizó a un tiempo de 48 h, observándose una mayor disminución en la expresión de los tres genes CD44v6, CK-18 y EpCAM al emplearse el pre-tratamiento combinado de Oxaliplatino y CMM sobreexpresando TRAILs. La expresión de *EpCAM* se encuentra elevada en tumores benignos y malignos de fenotipo epitelial. Además, en CCR la sobreexpresión de EpCAM está asociada con un peor pronóstico y metástasis [155]. Por lo tanto, se confirma que el tratamiento combinado de Oxaliplatino y CMM sobreexpresando TRAILs es capaz de reducir genes de CMT de CCR, observándose un mayor efecto a las 48 h.

10. CONCLUSIONES

- El sistema de expresión de TRAIL basado en CMM es capaz de producir TRAIL completo y TRAIL soluble. Además, TRAIL soluble es liberado al medio, es estable a baja temperatura y fue cuantificado en el orden de picogramos (328.3 ± 90.13 pg/mL).
- Las líneas celulares de CCR Caco-2 y CMT-93 tienen una alta expresión de marcadores de CMT CD24/CD44, CD44/CK18, CK18/ABCB1, y del receptor DR5.
- Debido a que no se encontró que la expresión del receptor DR5 se correlacionara con la quimioresistencia en los tejidos de CCR, consideramos que el tratamiento basado en TRAIL podría ser empleado tanto en pacientes con CCR sensibles como resistentes a quimioterapia.
- Se demostró que las CMT fueron sensibles a TRAILs expresado por las CMM.
- El pre-tratamiento con Oxaliplatino sensibiliza a las células de CCR Caco-2 y el aislado de CMT PX91 a una mayor apoptosis por TRAIL soluble.
- El pre-tratamiento con Oxaliplatino y CMM sobreexpresando TRAIL soluble puede reducir la expresión relativa de genes de CMT: CD44v6, CK-18 y EpCAM en la línea celular Caco-2.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar expresión de receptor DR4 y receptores señuelo DcR1 y DcR2.
- Confirmar el mecanismo molecular de sobreexpresión de DR5.
- Analizar efecto de pre-tratamiento con Irinotecán en líneas celulares de CCR.
- Evaluar el tratamiento de CMM-TRAILs en una línea celular sana.
- Evaluar el tratamiento combinado de Oxaliplatino y TRAIL soluble derivado de CMM en un modelo murino de CCR.

12. REFERENCIAS

- [1] OMS, "Cáncer," 2021. https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer.
- [2] A. Jemal, F. Bray, and J. Ferlay, "Global Cancer Statistics," vol. 61, no. 2, pp. 69–90, 2011, doi: 10.3322/caac.20107.Available.
- [3] SMeO, "Prevención y diagnóstico oportuno en cáncer.," 2016, [Online].Available: https://www.smeo.org.mx/descargables/COPREDOC_GUIA.pdf.
- [4] J. Ferlay *et al.*, "Cancer statistics for the year 2022: An overview," *Int. J. Cancer*, vol. 149, no. 4, pp. 778–789, 2022, doi: 10.1002/ijc.33588.
- [5] G. Karp, *Biología celular y molecular*, 6ta edició. México: Editorial Mc Graw Hill, 2011.
- [6] R. Siegel, J. Ma, Z. Zou, and A. Jemal, "Cancer Statistics, 2014," CA
 CANCER J CLIN, vol. 64, no. 1, pp. 9–29, 2014, doi: 10.3322/caac.21208.
- S. D. Horne, S. A. Pollick, and H. H. Q. Heng, "Evolutionary mechanism unifies the hallmarks of cancer," *Int. J. Cancer*, vol. 136, no. 9, pp. 2012– 2021, 2015, doi: 10.1002/ijc.29031.
- [8] A. G. Quiroz-Reyes, "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES MODIFICADAS GENÉTICAMENTE CON TRAIL SOLUBLE, IL-12 E IFNβ EN UN MODELO MURINO SINGÉNICO DE LINFOMA," 2020.
- [9] Canadian Cancer Society, "Types of Tumours," What is Cancer?, 2020. .
- B. C. Prager *et al.*, "Cancer Stem Cells : The Architects of the Tumor Ecosystem," *Cell Stem Cell*, vol. 24, no. 1, pp. 41–53, 2019, doi: 10.1016/j.stem.2018.12.009.Cancer.
- S. Ramaswamy, K. N. Ross, E. S. Lander, and T. R. Golub, "A molecular signature of metastasis in primary solid tumors," *Letter*, vol. 33, pp. 49–54, 2002, doi: 10.1038/ng1060.
- [12] H. Sung *et al.*, "Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, pp. 209–249, Feb. 2021, doi: 10.3322/caac.21660.

- [13] J. Weitz, M. Koch, J. Debus, T. Höhler, P. R. Galle, and M. W. Büchler,
 "Colorectal cancer," *Lancet*, vol. 365, no. 9454, pp. 153–165, 2005, doi: 10.1016/S0140-6736(05)17706-X.
- [14] V. A. Ionescu, G. Gheorghe, N. Bacalbasa, A. L. Chiotoroiu, and C. Diaconu,
 "Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis," *Medicina (B. Aires).*, vol. 59, no. 9, p. 1646, Sep. 2023, doi: 10.3390/medicina59091646.
- [15] M. S. Cappell, "Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer," *Gastroenterol. Clin. North Am.*, vol. 37, no. 1, pp. 1–24, 2008, doi: 10.1016/j.gtc.2007.12.002.
- B. A. Sullivan, M. Noujaim, and J. Roper, "Cause, Epidemiology, and Histology of Polyps and Pathways to Colorectal Cancer," *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.*, vol. 32, no. 2, pp. 177–194, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.giec.2021.12.001.
- [17] M. C. Sanabria, A. Umaña, M. L. Serrano, M. Sánchez, J. Mesa, and G. A. Hernández, "Vías de carcinogénesis colorrectal y sus implicaciones clínicas," *Rev. Colomb. Cancerol.*, vol. 16, no. 9, pp. 170–181, 2012.
- [18] C. A. Gonzalez-Villarreal, A. G. Quiroz-Reyes, J. F. Islas, and E. N. Garza-Treviño, "Colorectal Cancer Stem Cells in the Progression to Liver Metastasis," *Front. Oncol.*, vol. 10, no. August, pp. 1–17, 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.01511.
- [19] C. L. Stewart *et al.*, "Cytoreduction for Colorectal Metastases: Liver, Lung, Peritoneum, Lymph Nodes, Bone, Brain. When Does it Palliate, Prolong Survival, and Potentially Cure?," *Curr Probl Surg.*, vol. 55, no. 9, pp. 330– 379, 2018, doi: 10.1067/j.cpsurg.2018.08.004.Cytoreduction.
- [20] R. Salazar *et al.*, "Gene Expression Signature to Improve Prognosis Prediction of Stage II and III Colorectal Cancer," *J. Clin. Oncol.*, vol. 29, no. 1, pp. 17–24, Jan. 2011, doi: 10.1200/JCO.2010.30.1077.
- [21] R. Labianca *et al.*, "Colon cancer," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 74, pp. 106–133, 2010, doi: 10.1016/j.critrevonc.2010.01.010.
- [22] M. Fleming, S. Ravula, S. F. Tatishchev, and H. L. Wang, "Colorectal carcinoma: Pathologic aspects," *J. Gastrointest. Oncol.*, vol. 3, no. 3, pp.

153–173, 2012, doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030.

- [23] A. I. Filiz, I. Sucullu, Y. Kurt, D. O. Karakas, B. Gulec, and M. L. Akin,
 "Persistent High Postoperative Carcinoembryonic Antigen in Colorectal Cancer Patients- Is it Important?," *Clinics*, vol. 64, no. 4, pp. 287–294, Apr. 2009, doi: 10.1590/S1807-59322009000400004.
- [24] M. J. Goldstein and E. P. Mitchell, "Carcinoembryonic Antigen in the Staging and Follow-up of Patients with Colorectal Cancer," *Cancer Invest.*, vol. 23, no. 4, pp. 338–351, Jan. 2005, doi: 10.1081/CNV-58878.
- [25] F. et al. YOUNG TABUSSO, "Valor del antígeno carcinoembrionario preoperatorio como factor pronóstico independiente en cáncer de colón y recto.," *Rev. gastroenterol.*, vol. 22, no. 3, pp. 213–220, 2002, [Online]. Available: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292002000300004&lng=es&nrm=iso.
- [26] Q. Lin *et al.*, "The mechanism of the premetastatic niche facilitating colorectal cancer liver metastasis generated from myeloid-derived suppressor cells induced by the S1PR1 – STAT3 signaling pathway," *Cell Death Dis.*, vol. 10, no. 693, 2019, doi: 10.1038/s41419-019-1922-5.
- [27] W. Zakrzewski, M. Dobrzyński, M. Szymonowicz, and Z. Rybak, "Stem cells: past, present, and future," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 10, no. 1, p. 68, Dec. 2019, doi: 10.1186/s13287-019-1165-5.
- [28] A. Markowska, S. Sajdak, J. Markowska, and A. Huczyński, "Angiogenesis and cancer stem cells: new perspectives on therapy of ovarian cancer," *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.06.030.
- [29] N. Hodgkinson, C. A. Kruger, and H. Abrahamse, "Targeted photodynamic therapy as potential treatment modality for the eradication of colon cancer and colon cancer stem cells," *Tumor Biol.*, pp. 1–17, 2017, doi: 10.1177/1010428317734691.
- [30] E. Vlashi and F. Pajonk, "Cancer Stem Cells, Cancer Cell Plasticity and Radiation Therapy," *Semin Cancer Biol.*, vol. 0, pp. 28–35, 2015, doi: 10.1016/j.semcancer.2014.07.001.Cancer.
- [31] Mayo Clinic, "When cancer returns: How to cope with cancer recurrence,"

2020. .

- [32] D. Nassar, "Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications," *Annu. Rev. Pathol.*, vol. 11, no. 1, pp. 47–76, 2016, doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044438.
- [33] A. Z. Ayob and T. S. Ramasamy, "Cancer stem cells as key drivers of tumour progression," *J. Biomed. Sci.*, vol. 25, no. 20, pp. 1–18, 2018.
- [34] N. Miyoshi, T. Mizushima, Y. Doki, and M. Mori, "Cancer stem cells in relation to treatment," *Jpn. J. Clin. Oncol.*, no. 21, pp. 1–6, 2018, doi: 10.1093/jjco/hyy186.
- [35] S. V. Shmelkov *et al.*, "CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133 + and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors," *J. Clin. Invest.*, vol. 118, no. 6, pp. 2111–2120, 2008, doi: 10.1172/JCl34401.
- [36] D. Bocuk *et al.*, "The adaptation of colorectal cancer cells when forming metastases in the liver: Expression of associated genes and pathways in a mouse model," *BMC Cancer*, vol. 17, no. 1, pp. 1–15, 2017, doi: 10.1186/s12885-017-3342-1.
- [37] D. Izumi, T. Ishimoto, Y. Sakamoto, Y. Miyamoto, and H. Baba, "Molecular insights into colorectal cancer stem cell regulation by environmental factors," *J. Cancer Metastasis Treat.*, vol. 1, no. 3, p. 156, 2015, doi: 10.4103/2394-4722.165532.
- [38] J. W. Huh *et al.*, "Expression of standard CD44 in human colorectal carcinoma: Association with prognosis," *Pathol. Int.*, vol. 59, no. 4, pp. 241– 246, 2009, doi: 10.1111/j.1440-1827.2009.02357.x.
- [39] A. Kuşoğlu and Ç. B. Avcı, "CANCER STEM CELLS: A BRIEF REVIEW OF CURRENT STATUS," *Gene*, vol. 681, pp. 80–85, 2019, doi: 10.1016/j.gene.2018.09.052.
- [40] J. Zhang, S. Hu, and Y. Li, "KRT18 is correlated with the malignant status and acts as an oncogene in colorectal cancer," *Biosci. Rep.*, vol. 39, no. 8, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1042/BSR20190884.
- [41] S. Mirzaei *et al.*, "SOX2 function in cancers: Association with growth, invasion, stemness and therapy response," *Biomed. Pharmacother.*, vol.

156, p. 113860, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.biopha.2022.113860.

- [42] M. Murase *et al.*, "Side population cells have the characteristics of cancer stem-like cells / cancer-initiating cells in bone sarcomas," *Br. J. Cancer*, vol. 101, pp. 1425–1432, 2009, doi: 10.1038/sj.bjc.6605330.
- [43] S. Goto, T. Kawabata, and T. S. Li, "Enhanced Expression of ABCB1 and Nrf2 in CD133-Positive Cancer Stem Cells Associates with Doxorubicin Resistance," *Stem Cells Int.*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/8868849.
- [44] K. S. Fakiruddin, M. N. Lim, N. Nordin, R. Rosli, Z. Zakaria, and S. Abdullah, "Targeting of CD133+ cancer stem cells by mesenchymal stem cell expressing TRAIL reveals a prospective role of apoptotic gene regulation in non-small cell lung cancer," *Cancers (Basel).*, vol. 11, no. 9, pp. 1–29, 2019, doi: 10.3390/cancers11091261.
- [45] A. Arbor *et al.*, "Metabolism and Epigenetics of Pancreatic Cancer Stem Cells," *Semin Cancer Biol.*, vol. Semin Canc, pp. 19–26, 2019, doi: 10.1016/j.semcancer.2018.09.008.Metabolism.
- [46] M. Loebinger, E. SAGE, D. Davies, and S. Janes, "TRAIL-expressing mesenchymal stem cells kill the putative cancer stem cell population," *Br. J. Cancer*, vol. 103, pp. 1692–1697, 2010, doi: 10.1038/sj.bjc.6605952.
- [47] Y. Matsuda, H. Yoshimura, J. Ueda, Z. Naito, M. Korc, and T. Ishiwata,
 "Nestin Delineates Pancreatic Cancer Stem Cells in Metastatic Foci of NOD / Shi-scid IL2R g null (NOG) Mice," *Am. J. Pathol.*, vol. 184, no. 3, pp. 674– 685, 2014, doi: 10.1016/j.ajpath.2013.11.014.
- [48] Q. Liu *et al.*, "Cancer stem cells and their niche in cancer progression and therapy," *Cancer Cell Int.*, vol. 23, no. 1, p. 305, Dec. 2023, doi: 10.1186/s12935-023-03130-2.
- [49] A. Nayak, N. M. Warrier, and P. Kumar, "Cancer Stem Cells and the Tumor Microenvironment: Targeting the Critical Crosstalk through Nanocarrier Systems," *Stem Cell Rev. Reports*, vol. 18, no. 7, pp. 2209–2233, Oct. 2022, doi: 10.1007/s12015-022-10426-9.
- [50] Y. Zhang and R. A. Weinberg, "Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities," *Front. Med.*, vol. 12, no. 4, pp. 361–

373, Aug. 2018, doi: 10.1007/s11684-018-0656-6.

- [51] M. Pelullo, S. Zema, F. Nardozza, S. Checquolo, I. Screpanti, and D. Bellavia, "Wnt, Notch, and TGF-β Pathways Impinge on Hedgehog Signaling Complexity: An Open Window on Cancer," *Front. Genet.*, vol. 10, Aug. 2019, doi: 10.3389/fgene.2019.00711.
- [52] M. Singh, N. Yelle, C. Venugopal, and S. K. Singh, "EMT: Mechanisms and therapeutic implications," *Pharmacol. Ther.*, vol. 182, pp. 80–94, 2018, doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.08.009.
- [53] Y.-T. Lin and K.-J. Wu, "Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition: focusing on hypoxia and TGF-β signaling," *J. Biomed. Sci.*, vol. 27, no. 1, p. 39, Dec. 2020, doi: 10.1186/s12929-020-00632-3.
- [54] N. A. B. M. Said and E. D. Williams, "Growth Factors in Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis," *Cells Tissues Organs*, vol. 193, no. 1–2, pp. 85–97, 2011, doi: 10.1159/000320360.
- [55] T. Shibue and Robert A. Weinberg, "EMT CSCs and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications," *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 14, no. 10, pp. 611–629, 2017, doi: 10.1038/nrclinonc.2017.44.EMT.
- [56] T. Wang *et al.*, "Cancer stem cell targeted therapy : progress amid controversies," *Oncotaget*, vol. 6, no. 42, pp. 44191–44206, 2015.
- [57] E. N. Garza-treviño, S. L. Said-fernández, and H. G. Martínez-rodríguez, "Understanding the colon cancer stem cells and perspectives on treatment," *Cancer Cell Int.*, vol. 15, no. 2, pp. 1–9, 2015, doi: 10.1186/s12935-015-0163-7.
- [58] C. González-Villareal, H. G. Martínez-rodríguez, and S. Said, "How desirable and undesirable features of naïve or geneti - cally reengineered mesenchymal stem cells are being con - sidered in preclinical or clinical assays," vol. 22, no. 4, pp. 812–830, 2017.
- [59] Y. Yu, S. S. Kanwar, B. B. Patel, J. Nautiyal, F. H. Sarkar, and A. P. N. Majumdar, "Elimination of Colon Cancer Stem-Like Cells by the Combination of Curcumin and FOLFOX," *Transl. Oncol.*, vol. 2, no. 4, pp. 321–328, Dec. 2009, doi: 10.1593/tlo.09193.

- [60] P. Singh, S. Pandit, V. R. S. S. Mokkapati, A. Garg, V. Ravikumar, and I. Mijakovic, "Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 7, 2018, doi: 10.3390/ijms19071979.
- [61] S. C. Baetke, T. Lammers, and F. Kiessling, "Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer," *Br. J. Radiol.*, vol. 88, no. 1054, 2015, doi: 10.1259/bjr.20150207.
- [62] M. F. Sanmamed and L. Chen, "A Paradigm Shift in Cancer Immunotherapy: From Enhancement to Normalization," *Cell*, vol. 175, no. 2, pp. 313–326, 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.09.035.
- [63] J. Van den Bulk, E. M. E. Verdegaal, and N. F. C. C. De Miranda, "Cancer immunotherapy: broadening the scope of targetable tumours," *Open Biol.*, vol. 8, no. 6, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1098/rsob.180037.
- [64] H. Qin *et al.*, "New Strategies for Therapeutic Cancer Vaccines," *Anticancer. Agents Med. Chem.*, vol. 19, no. 2, pp. 213–221, 2018, doi: 10.2174/1871520618666181109151835.
- [65] R. Rupaimoole and F. J. Slack, "MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 16, no. 3, pp. 203–221, 2017, doi: 10.1038/nrd.2016.246.
- [66] M. V. Iorio and C. M. Croce, "MicroRNA dysregulation in cancer: Diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review," *EMBO Mol. Med.*, vol. 4, no. 3, pp. 143–159, 2012, doi: 10.1002/emmm.201100209.
- [67] H. Ling, M. Fabbri, and G. A. Calin, "MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 176, no. 3, pp. 139–148, 2013, doi: 10.1038/nrd4140.MicroRNAs.
- [68] J. Pahle and W. Walther, "Vectors and strategies for nonviral cancer gene therapy," *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 16, no. 4, pp. 443–461, 2016, doi: 10.1517/14712598.2016.1134480.
- [69] G. Mazzolini, J. Prieto, and I. Melero, "Gene therapy of cancer with interleukin-12.," *Curr Phar Des*, vol. 9, pp. 1981–91, 2003.
- [70] X. Liu *et al.*, "Mesenchymal stem cells expressing interleukin-18 inhibit breast cancer in a mouse model," *Oncol. Lett.*, vol. 15, no. 5, pp. 6265–6274, 2018,

doi: 10.3892/ol.2018.8166.

- [71] S. Matosevic, "Viral and nonviral engineering of natural killer cells as emerging adoptive cancer immunotherapies," *J. Immunol. Res.*, vol. 2018, no. 4054815, 2018, doi: 10.1155/2018/4054815.
- [72] M. Mohammadian, E. Abasi, M. Zare, and A. Akbarzadeh, "Mesenchymal stem cell-based gene therapy: A promising therapeutic strategy," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 44, no. 5, pp. 1206–1211, 2016, doi: 10.3109/21691401.2015.1029624.
- [73] G. S. Oggu, S. Sasikumar, N. Reddy, K. K. R. Ella, C. M. Rao, and K. K. Bokara, "Gene Delivery Approaches for Mesenchymal Stem Cell Therapy: Strategies to Increase Efficiency and Specificity," *Stem Cell Rev. Reports*, vol. 13, no. 6, pp. 725–740, 2017, doi: 10.1007/s12015-017-9760-2.
- [74] C. Spano *et al.*, "Soluble TRAIL Armed Human MSC As Gene Therapy For Pancreatic Cancer," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–14, 2019, doi: 10.1038/s41598-018-37433-6.
- [75] X. Yang, J. Du, X. Xu, C. Xu, and W. Song, "IFN- y -Secreting-Mesenchymal Stem Cells Exert an Antitumor Effect *In Vivo* via the TRAIL Pathway," *J. Immunol. Res.*, vol. 2014, pp. 1–9, 2014, doi: 10.1155/2014/318098.
- [76] da S. M. L, C. PC, and N. NB, "Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues," *J Cell Sci*, vol. 119, pp. 2204–2213, 2006.
- [77] Beltrami AP *et al.*, "Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration," *Cell*, vol. 114, pp. 763–776, 2003.
- [78] Brooke G *et al.*, "Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells.," *Semin Cell Dev Biol*, vol. 18, pp. 846–858, 2007.
- [79] K. JM and L. T. GS, "Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details," *Cell Stem Cell*, vol. 4, pp. 206–216, 2009.
- [80] D. M *et al.*, "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.," *Cytotherapy*, vol. 8, pp. 315–317, 2006.
- [81] A. Klopp et al., "Tumor irradiation increases the recruitment of circulating

mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 24, pp. 11687–95, 2007.

- [82] J. A. Guadix, J. L. Zugaza, and P. Gálvez-Martín, "Características, aplicaciones y perspectivas de las células madre mesenquimales en terapia celular," *Med. Clin. (Barc).*, vol. 148, no. 9, pp. 408–414, 2016, doi: 10.1016/j.medcli.2016.11.033.
- [83] N. D'souza *et al.*, "Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies," *BMC Med.*, vol. 13, no. 1, p. 186, 2015, doi: 10.1186/s12916-015-0426-0.
- [84] Q. C, M. A, L. D, G. A, X. Y, and C. M, "Treatment of traumatic brain injury in mice with marrow stromal cells," *Brain Res*, vol. 1208, pp. 234–9, 2008.
- [85] P. Fiorina *et al.*, "Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes.," *J Immunol*, vol. 183, no. 2, pp. 993–1004, 2009.
- [86] L. Dai, M. R. Moniri, Z. Zeng, J. X. Zhou, J. Rayat, and G. L. Warnock,
 "Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy," *Cancer Lett.*, vol. 305, no. 1, pp. 8–20, 2011, doi: 10.1016/j.canlet.2011.02.012.
- [87] A. Naji, N. Rouas-Freiss, A. Durrbach, E. D. Carosella, L. Sensébé, and F. Deschaseaux, "Concise review: Combining human leukocyte antigen g and mesenchymal stem cells for immunosuppressant biotherapy," *Stem Cells*, vol. 31, no. 11, pp. 2296–2303, 2013, doi: 10.1002/stem.1494.
- [88] H. Hamada *et al.*, "Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy," *Cancer Sci*, vol. 96, no. 3, pp. 149–156, 2005.
- [89] A. Hmadcha, A. Martin-Montalvo, B. R. Gauthier, B. Soria, and V. Capilla-Gonzalez, "Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for Cancer Therapy," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, no. February, pp. 1–13, 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.00043.
- [90] G. Vangala, F. M. Imhoff, C. M. L. Squires, A. G. Cridge, and S. K. Baird,
 "Mesenchymal stem cell homing towards cancer cells is increased by enzyme activity of cathepsin D," *Exp. Cell Res.*, vol. 383, no. 1, p. Exp. Cell

Res., 2019, doi: 10.1016/j.yexcr.2019.07.007.

- [91] J. Ahn, Y. Coh, H. Lee, I. Shin, S. Kang, and H. Youn, "Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells Inhibit Melanoma Growth In Vitro and In Vivo," *Anticancer Res.*, vol. 35, no. 1, pp. 159–68, 2015.
- [92] S. Mali, "Delivery systems for gene therapy," *Indian J. Hum. Genet.*, vol. 19, no. 1, pp. 3–8, 2013.
- [93] D. P.Clark and N. J.Pazdernik, *Molecular Biology*, Segunda ed. Elsevier, 2013.
- [94] R. Goswami *et al.*, "Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle," *Front. Oncol.*, vol. 9, no. April, pp. 1–25, 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00297.
- [95] C. Elsner and J. Bohne, "The retroviral vector family: something for everyone," *Virus Genes*, vol. 53, no. 5, pp. 714–722, 2017, doi: 10.1007/s11262-017-1489-0.
- [96] V. Neshati *et al.*, "Cardiomyogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells transduced with Tbx20-encoding lentiviral vectors," *J. Cell. Biochem.*, vol. 119, no. 7, pp. 6146–6153, 2018, doi: 10.1002/jcb.26818.
- [97] K. Lundstrom, "Viral Vectors in Gene Therapy," *Diseases*, vol. 6, no. 42, pp. 1–20, 2018, doi: 10.3390/diseases6020042.
- [98] Y. H. Chen, M. S. Keiser, and B. L. Davidson, "Viral Vectors for Gene Transfer," *Curr. Protoc. Mouse Biol.*, vol. 8, no. 4, pp. 1–7, 2018, doi: 10.1002/cpmo.58.
- [99] M. C. Milone and U. O. Doherty, "Clinical use of lentiviral vectors," *Leukemia*, pp. 1529–1541, 2018, doi: 10.1038/s41375-018-0106-0.
- [100] D. Escors and K. Breckpot, "Europe PMC Funders Group Lentiviral vectors in gene therapy : their current status and future potential," vol. 58, no. 2, pp. 107–119, 2011, doi: 10.1007/s00005-010-0063-4.Lentiviral.
- [101] J. Alcamí and M. Coiras, "Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 29, no. 3, pp. 216–226, 2011, doi: 10.1016/j.eimc.2011.01.006.
- [102] O. W. Merten, M. Hebben, and C. Bovolenta, "Production of lentiviral

vectors," *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.*, vol. 3, no. September 2015, p. 16017, 2016, doi: 10.1038/mtm.2016.17.

- [103] Y. Zhang *et al.*, "Multi-target lentivirus specific to hepatocellular carcinoma : In vitro and in vivo studies," *J. Hepatol.*, vol. 58, no. 3, pp. 502–508, 2013, doi: 10.1016/j.jhep.2012.11.002.
- [104] H. Liu, D. Shi, T. Liu, Z. Yu, and C. Zhou, "Lentivirus-mediated silencing of SCIN inhibits proliferation of human lung carcinoma cells," *Gene*, vol. 554, no. 1, pp. 32–39, 2015, doi: 10.1016/j.gene.2014.10.013.
- [105] D. O. Omelchenko *et al.*, "Protection of Lymphocytes Against HIV using Lentivirus Vector Carrying a Combination of TRIM5 α -HRH Genes and microRNA Against CCR5," *Mol. Biol.*, vol. 52, no. 2, pp. 251–261, 2018, doi: 10.1134/S0026893318020085.
- [106] J. L. Song, W. Zheng, W. Chen, Y. Qian, Y. M. Ouyang, and C. Y. Fan, "Lentivirus-mediated microRNA-124 gene-modified bone marrow mesenchymal stem cell transplantation promotes the repair of spinal cord injury in rats," *Exp. Mol. Med.*, vol. 49, no. 5, pp. e332-9, 2017, doi: 10.1038/emm.2017.48.
- [107] V. Scheper, J. Schwieger, A. Hamm, T. Lenarz, and A. Hoffmann, "BDNFoverexpressing human mesenchymal stem cells mediate increased neuronal protection in vitro," *J. Neurosci. Res.*, vol. 97, no. 11, pp. 1414–1429, 2019, doi: 10.1002/jnr.24488.
- [108] M. Rostami, K. Haidari, and M. Shahbazi, "Genetically engineered adipose mesenchymal stem cells using HIV-based lentiviral vectors as gene therapy for autoimmune diseases," *Cell. Reprogram.*, vol. 20, no. 6, pp. 337–346, 2018, doi: 10.1089/cell.2018.0006.
- [109] L. Elzaouk, K. Moelling, and J. Pavlovic, "Anti-tumor activity of mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse melanoma model," *Exp. Dermatol.*, vol. 15, no. 11, pp. 865–874, 2006, doi: 10.1111/j.1600-0625.2006.00479.x.
- [110] Y. Xinyuan, D. Jingchun, X. Xia, X. Chun, and S. Wu, "IFN-γ-Secreting-Mesenchymal Stem Cells Exert an Antitumor Effect In Vivo via the TRAIL Pathway," *J. Immunol. Res.*, pp. 1–9, 2014, doi: 10.1155/2014/318098.

- [111] R. Pitti, S. a. Marsters, S. Ruppert, C. Donahue, A. Moore, and A. Ashkenazi, "Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family," *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 12687– 12690, 1996.
- [112] S. H. M. Wong *et al.*, "The TRAIL to cancer therapy: Hindrances and potential solutions," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 143, no. December 2018, pp. 81–94, 2019, doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.08.008.
- [113] S. R. Wiley *et al.*, "Identification and Characterization of a New Member of the TNF Family that Induces Apoptosis," *Immunity*, vol. 3, pp. 673–682, 1995.
- [114] S. Wang and W. S. El-deiry, "TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors," *Oncogene*, vol. 22, pp. 8628–8633, 2003, doi: 10.1038/sj.onc.1207232.
- [115] J. Sheridan *et al.*, "Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors.," *Science (80-.).*, vol. 277, no. 5327, pp. 818–21, 1997.
- [116] J. Bodmer *et al.*, "TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8.," *Nat Cell Biol*, vol. 2, no. 4, pp. 241–243, 2000.
- [117] G. Pan *et al.*, "The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL.," *Science (80-.).*, vol. 276, no. 5309, pp. 111–3, 1997.
- [118] W. Jiang, D. B. Wu, S. Y. Fu, E. Q. Chen, H. Tang, and T. Y. Zhou, "Insight into the role of TRAIL in liver diseases," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 110, no. September 2018, pp. 641–645, 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.004.
- [119] S. A. Choi *et al.*, "Preclinical Biosafety Evaluation of Genetically Modified Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Clinical Applications to Brainstem Glioma," *Stem Cells Dev.*, vol. 25, no. 12, pp. 897– 908, 2016, doi: 10.1089/scd.2015.0324.
- [120] Q. Deng *et al.*, "TRAIL-secreting mesenchymal stem cells promote apoptosis in heat-shock-treated liver cancer cells and inhibit tumor growth in nude mice," *Br. Dent. J.*, vol. 217, no. 1, pp. 317–327, 2014, doi: 10.1038/gt.2013.88.

- [121] S. M. Kim *et al.*, "Gene therapy using TRAIL-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against intracranial glioma," *Cancer Res*, vol. 68, no. 23, pp. 9614–9623, 2008, doi: 10.1158/0008-5472.can-08-0451.
- [122] J. Han, H. S. Hwang, and K. Na, "TRAIL-secreting human mesenchymal stem cells engineered by a non-viral vector and photochemical internalization for pancreatic cancer gene therapy," *Biomaterials*, vol. 182, pp. 259–268, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.08.024.
- [123] C. González-Villareal, "Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFNB en un Modelo Murino de Linfoma.," 2018.
- [124] M. Garofalo *et al.*, "MiR-221&222 regulate TRAIL-resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 down-regulation," *Cancer Cell*, vol. 16, no. 6, pp. 498–509, 2009, doi: 10.1016/j.ccr.2009.10.014.MiR-221.
- [125] H. Wang *et al.*, "Trail resistance induces epithelial-mesenchymal transition and enhances invasiveness by suppressing PTEN via miR-221 in breast cancer," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0099067.
- [126] Z. H. Wu *et al.*, "MiR-616-3p promotes angiogenesis and EMT in gastric cancer via the PTEN/AKT/mTOR pathway," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 501, no. 4, pp. 1068–1073, 2018, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.109.
- [127] S. A. Park, H. R. Han, S. Ahn, C. H. Ryu, and S. S. Jeun, "Combination treatment with VPA and MSCs-TRAIL could increase anti-tumor effects against intracranial glioma," *Oncology Reports*, vol. 45, no. 3. pp. 869–878, 2021, doi: 10.3892/or.2021.7937.
- [128] F. Rossignoli *et al.*, "MSC-delivered soluble TRAII and paclitaxel as novel combinatory treatment for pancreatic adenocarcinoma," *Theranostics*, vol. 9, no. 2, pp. 436–448, 2019, doi: 10.7150/thno.27576.
- [129] J. D. Greenlee *et al.*, "Oxaliplatin resistance in colorectal cancer enhances TRAIL sensitivity via death receptor 4 upregulation and lipid raft localization," *Elife*, vol. 10, pp. 1–30, 2021, doi: DOI: https://doi.org/10.7554/eLife.67750.
- [130] L. Galligan, D. B. Longley, M. McEwan, T. R. Wilson, K. McLaughlin, and P. G. Johnston, "Chemotherapy and TRAIL-mediated colon cancer cell death: The roles of p53, TRAIL receptors, and c-FLIP," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 4, no. 12, pp. 2026–2036, 2005, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0262.
- [131] E. N. Garza-treviño, "Análisis del transcriptoma de células madre de adenocarcinoma colorrectal resistentes a 5-fluorouracilo, oxaliplatino y leucovorina," 2017.
- [132] E. Garza-Treviño *et al.*, "Chemosensitivity analysis and study of gene resistance on tumors and cancer stem cell isolates from patients with colorectal cancer," *Mol. Med. Rep.*, vol. 24, no. 4, pp. 1–13, 2021, doi: 10.3892/mmr.2021.12360.
- [133] O. Solis-Coronado, "Adenocarcinoma colorrectal: Análisis de correlación entre la concentración de células madre de tumor ABCB1+/BNIP3+/KRT18+, farmacorresistencia y respuesta clínica a FOLFOX-6.," 2019.
- [134] A. G. Quiroz-Reyes *et al.*, "Mesenchymal Stem Cells Genetically Modified by Lentivirus-Express Soluble TRAIL and Interleukin-12 Inhibit Growth and Reduced Metastasis-Relate Changes in Lymphoma Mice Model," *Biomedicines*, vol. 11, no. 2, 2023, doi: 10.3390/biomedicines11020595.
- [135] Z. Yuan, S. D. S. Lourenco, E. K. Sage, K. K. Kolluri, M. W. Lowdell, and S. M. Janes, "Cryopreservation of human mesenchymal stromal cells expressing TRAIL for human anti-cancer therapy," *Cytotherapy*, vol. 18, no. 7, pp. 860–869, 2016, doi: 10.1016/j.jcyt.2016.04.005.
- [136] S. Ghatak, V. C. Hascall, R. R. Markwald, and S. Misra, "Folfox therapy induces feedback upregulation of cd44v6 through yb-1 to maintain stemness in colon initiating cells," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 2, pp. 1–37, 2021, doi: 10.3390/ijms22020753.
- [137] X. Liang *et al.*, "KRT18 regulates trophoblast cell migration and invasion which are essential for embryo implantation," *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 21, no. 78, pp. 1–10, 2023, doi: 10.1186/s12958-023-01129-y.
- [138] E. A. Flores-Contreras *et al.*, "Overexpression of Inc-ERP44-3:6 Causes Cell Death and Sensitivity to Cisplatin in Breast Cancer Cell Lines," *Oncologie*,

vol. 23, no. 3, pp. 373–392, 2021, doi: 10.32604/oncologie.2021.017786.

- [139] C. Liu, S. D. Dib-Hajj, and S. G. Waxman, "Fibroblast Growth Factor Homologous Factor 1B Binds to the C Terminus of the Tetrodotoxin-resistant Sodium Channel rNav1.9a (NaN)," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 22, pp. 18925–18933, Jun. 2001, doi: 10.1074/jbc.M101606200.
- [140] G. S. Pérez-Contreras, "Evaluación de la Sobreexpresión del Factor Krüppel-Like 15 como mecanismo de Sensibilización a TRAIL en Cáncer Colorrectal," 2023.
- [141] O. D. Solis-Coronado, "Adenocarcinoma colorrectal: Correlación entre la expresión de ABCB1+/BNIP3+/KRT18+, fármacorresistencia y respuesta clínica a FOLFOX-6," 2019.
- [142] K. Baghaei et al., "Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow," Gastroenterol. Hepatol. from Bed to Bench, vol. 10, no. 3, pp. 208–213, 2017, [Online]. Available: http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid,coo kie&db=a9h&AN=125761760(=es&site=ehost-live.
- [143] A. I. Ramos-Murillo *et al.*, "Efficient non-viral gene modification of mesenchymal stromal cells from umbilical cord wharton's jelly with polyethylenimine," *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 9, pp. 1–19, 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12090896.
- [144] F. A. van Vollenstee, C. Jackson, D. Hoffmann, M. Potgieter, C. Durandt, and M. S. Pepper, "Human adipose derived mesenchymal stromal cells transduced with GFP lentiviral vectors: assessment of immunophenotype and differentiation capacity in vitro," *Cytotechnology*, vol. 68, no. 5, pp. 2049–2060, 2016, doi: 10.1007/s10616-016-9945-6.
- [145] J. H. Han *et al.*, "Potentiation of TRAIL killing activity by multimerization through isoleucine zipper hexamerization motif [BMB Rep., 49, 5, (2016) (282-287)]," *BMB Rep.*, vol. 49, no. 5, pp. 282–287, 2016, doi: 10.5483/BMBRep.2016.49.5.245.
- [146] M. Kopczynski *et al.*, "Cytotoxic efficacy and resistance mechanism of a trail and vegfa-peptide fusion protein in colorectal cancer models," *Int. J. Mol.*

Sci., vol. 22, no. 6, pp. 1–17, 2021, doi: 10.3390/ijms22063160.

- [147] J.-Y. Zhou, M. Chen, L. Ma, X. Wang, Y.-G. Chen, and S.-L. Liu, "Role of CD44high/CD133high HCT-116 cells in the tumorigenesis of colon cancer," *Oncotarget*, vol. 7, no. 7, pp. 7657–7666, Feb. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.7084.
- [148] V. Rodríguez-Fanjul, R. Guerrero-López, B. Fernández-Varas, R. Perona, A. Sastre-Perona, and L. Sastre, "Comparison of Colorectal Cancer Stem Cells and Oxaliplatin-Resistant Cells Unveils Functional Similarities," *Cells*, vol. 11, no. 511, pp. 1–15, 2022, doi: https://doi.org/10.3390/cells11030511.
- [149] Z. Yuan, K. K. Kolluri, E. K. Sage, K. H. Gowers, and S. M. Janes,
 "Mesenchymal stromal cell delivery of full-length tumor necrosis factorrelated apoptosis-inducing ligand is superior to soluble type for cancer therapy," *Cytotherapy*, vol. 17, no. 7, pp. 885–896, 2015, doi: 10.1016/j.jcyt.2015.03.603.
- [150] K. S. Fakiruddin, M. N. Lim, N. Nordin, R. Rosli, and S. Abdullah, "Chemo-Sensitization of CD133+ Cancer Stem Cell Enhances the Effect of Mesenchymal Stem Cell Expressing TRAIL in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines," *Biology (Basel).*, vol. 10, no. 11, p. 1103, Oct. 2021, doi: 10.3390/biology10111103.
- [151] M. Ibrahim, S. Kntayya, N. Mohd Ain, R. Iori, C. Ioannides, and A. Abdull Razis, "Induction of Apoptosis and Cytotoxicity by Raphasatin in Human Breast Adenocarcinoma MCF-7 Cells," *Molecules*, vol. 23, no. 12, p. 3092, Nov. 2018, doi: 10.3390/molecules23123092.
- [152] H.-F. Lu *et al.*, "Apigenin induces apoptosis in human lung cancer H460 cells through caspase- and mitochondria-dependent pathways," *Hum. Exp. Toxicol.*, vol. 30, no. 8, pp. 1053–1061, Aug. 2011, doi: 10.1177/0960327110386258.
- [153] Y. Kojima *et al.*, "Importin β1 protein-mediated nuclear localization of Death Receptor 5 (DR5) limits DR5/Tumor Necrosis Factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced cell death of human tumor cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 50, pp. 43383–43393, 2011, doi:

10.1074/jbc.M111.309377.

- [154] L. Ma, L. Dong, and P. Chang, "CD44v6 engages in colorectal cancer progression," *Cell Death Dis.*, vol. 10, no. 1, p. 30, Jan. 2019, doi: 10.1038/s41419-018-1265-7.
- [155] M. Mokhtari and Z. Zakerzade, "EPCAM Expression in Colon Adenocarcinoma and its Relationship with TNM Staging," *Adv. Biomed. Res.*, vol. 6, no. 1, p. 56, 2017, doi: 10.4103/2277-9175.205529.