

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR
E INGENIERÍA GENÉTICA**



TÍTULO:

**EVALUACIÓN DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL FACTOR KRÜPPEL-LIKE 15
COMO MECANISMO DE SENSIBILIZACIÓN A TRAIL EN CÁNCER
COLORRECTAL**

PRESENTADO POR:

GLADYS SELENE PÉREZ CONTRERAS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA**

Monterrey N.L., Septiembre 2024.

EVALUACIÓN DE LA SOBREENPRESIÓN DEL FACTOR KRÜPPEL-LIKE 15
COMO MECANISMO DE SENSIBILIZACIÓN A TRAIL EN CÁNCER
COLORRECTAL

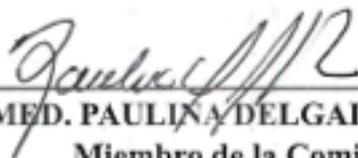
Aprobación de la tesis:



DRA. G. ELSA NANCY GARZA TREVIÑO
Directora de tesis



DRA. C. AURORA DE JESÚS GARZA JUÁREZ
Co-Director de tesis



DRA. MED. PAULINA DELGADO GONZÁLEZ
Miembro de la Comisión



DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ
Subdirector de Estudios de Posgrado

I. LUGAR DE TRABAJO

Esta investigación se llevó a cabo en la **Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL)**, *Facultad de Medicina y Hospital Universitario “José Eleuterio González”, Laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.*

Bajo la dirección de:

- Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño
Director
- Dra. C. Aurora de Jesús Garza Juárez
Codirector
- Dra. Med. Paulina Delgado González
Miembro de la comisión

Colaboradores:

- Dr. José Francisco Islas Cisneros
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.
- M.C. Adriana Quiroz Reyes
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.
- María Elena Vázquez Chávez
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el número de registro BI21-00005.

II. DEDICATORIA

A mi familia, gracias por motivarme a seguir mis sueños.

A mis hermanos y amigos, por creer en mí cuando más lo necesitaba y por estar siempre a mi lado, brindándome el apoyo y la fortaleza que necesitaba para alcanzar mis metas.

III. AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han sido parte de este logro:

En primer lugar, a mi comisión de tesis, la Dra. Paulina y Dra. Aurora; por su tiempo, dedicación y valiosas aportaciones a lo largo de este proceso. Especialmente, a la Dra. Elsa por darme la oportunidad de adentrarme en el mundo de la investigación y ser una excelente guía, siempre presente en los momentos en los que la necesitaba. Al Dr. Islas por su valiosa colaboración que hizo posible la realización de esta tesis.

Al departamento de Bioquímica y Medicina molecular y a mis maestros del Posgrado por sus consejos y enseñanzas.

Al laboratorio de Terapia Celular, Óscar, Itzel, Antonio, Sergio y Juan de Dios. Gracias por todos esos días de risas, chismecitos, cafecitos, y por las veces que me ayudaron con dudas. A Adri, porque además de enseñarme todo lo necesario y ayudarme siempre con una buena actitud, se convirtió en una gran amiga.

A Elena, por su invaluable ayuda y esfuerzo, y por hacer esas tardes de experimentos mucho más divertidas.

Agradezco a mi familia, a mi tía Myriam, mi hermano Roberto y mi hermana Diana porque siempre puedo contar con ellos.

A los amigos que logré hacer durante la maestría, Aldo y Rober, gracias por los momentos juntos y estar siempre presentes. Especialmente, a Dani, Larli y Luis, por todas esas noches de quintas, carnes asadas, karaokes y vinito, gracias por estar en las buenas y en las malas, hicieron esta experiencia inolvidable y divertida.

A Moka y Chimay, por ser mi razón para sonreír día a día y convertir días malos en buenos.

A Jorge Rocha, no tengo palabras para agradecerle por ser mi principal apoyo durante este proceso. Por ayudarme a creer en mí cuando me resultaba difícil. Por escucharme, por su cariño y compañía.

Por último a mis mejores amigos, Erick, Trejo, Bella y Aneth, gracias por estar siempre para mí, por apoyarme a pesar de estar siempre ocupada y animarme cuando lo necesitaba.

Cada uno de ustedes ha contribuido de manera significativa en este proceso. Gracias por ser una parte tan importante de mi vida y por ayudarme a alcanzar este logro.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades del cáncer	1
1.2. Cáncer colorrectal	1
1.2.1. Clasificación del cáncer colorrectal	2
1.2.2. Tratamiento del cáncer colorrectal	4
1.3. Ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL)	6
1.3.1. Mecanismo de apoptosis por TRAIL	7
1.3.2. Administración de TRAIL mediante células madre mesenquimales	9
1.3.3. Compuestos que aumentan la susceptibilidad a TRAIL	9
1.4. Factores de transcripción	12
1.4.1. Factores Krüppel-Like	12
1.4.2. Estructura y Función	13
1.4.3. Clasificación de los KLFs	14
1.4.4. KLFs en cáncer	15
1.4.5. Procesos en el cáncer regulados por los factores krüppel-like	15
1.4.5.1. Apoptosis	15
1.4.5.2. Proliferación celular	17
1.4.5.3. Transición epitelial-mesenquimal (TEM)	18
1.4.6. Factor Krüppel-Like 15	19
2. ANTECEDENTES DIRECTOS	22
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	25
5.1. Objetivo general	25
5.2. Objetivos específicos	25
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1. Obtención y expansión de CMM-MO y CMM-TRAILS	27
7.2. Validación de transducción de CMM-TRAILS	27
7.3. Expansión <i>in vitro</i> de células Caco-2	28
7.4. Purificación plásmido de KLF15	28
7.5. Cuantificación, pureza e integridad ADN plasmídico	28

7.6.	Transfección de células Caco-2 con el plásmido KLF15.....	29
7.7.	Transfección de KLF-15 en células Caco-2 y viabilidad celular.	29
7.8.	Síntesis de ADNc.....	30
7.9.	qPCR.	30
7.10.	Ensayo de susceptibilidad a TRAIL posterior a la expresión de KLF15 en las células tumorales.	32
8.	RESULTADOS.....	33
8.1.	Extracción y purificación del plásmido KLF15.	33
8.2.	Establecimiento y validación de la sobreexpresión transcripcional de KLF15 en las células Caco-2.	34
8.3.	Efecto de la sobreexpresión de KLF15 sobre genes implicados en la transición epitelial-mesenquimal y proliferación celular.	41
8.4.	Validación de la transducción de CMM-MO con transgén de TRAILS.....	44
8.5.	Evaluación de la viabilidad celular de CMM-TRAILS tratadas con quimioterapia. ...	45
8.6.	Evaluación del efecto de los tratamientos en las células Caco-2 que sobreexpresan KLF15. 46	
8.7.	Evaluación del efecto en la susceptibilidad a TRAILS en células Caco-2 que sobreexpresan KLF15 tratadas con quimioterapia.	49
1.	DISCUSIÓN	51
2.	CONCLUSIÓN	59
3.	REFERENCIAS.....	60

IV. GLOSARIO

5-FU	5-Fluorouracilo
ADNp	ADN plasmídico
APAF-1	Factor de activación de la proteasa apoptótica-1
Bak	Antagonista homólogo de Bcl-2
Bax	Bcl-2 asociado a X
Bak	Antagonista homólogo de Bcl-2
Bid	Dominio BH3 inhibidor de Bcl-2
CCR	Cáncer colorrectal
CDKs	Quinasas dependientes de ciclinas
CMM	Células madre mesenquimales
MO	Médula ósea
CtBP	Proteína de unión C-terminal
DD	Dominio de muerte
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DR	Death receptor o receptor de muerte
EF-1 α	Factor de elongación 1-alfa
EGFR	Factor de crecimiento epidérmico
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
GFP	Proteína verde fluorescente
HDACs	Desacetilasas de histonas
IFN	Interferón
Kips	Proteínas inhibidoras de quinasa
KLF	Factores krüppel-like
OPG	Osteoprotegerina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMC	Porcentaje de Muerte celular
SFB	Suero fetal bovino
tBit	Bid truncado
TEM	Transición epitelial-mesenquimal
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAIL	Ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral
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
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

V. Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Estadios del cáncer colorrectal de acuerdo al TNM (NIH, 2022).	3
Figura 2. Tratamiento de elección para el CCR de acuerdo al estadio. Modificado de: (Figuero et al., 2021).	5
Figura 3. Mecanismo de apoptosis por TRAIL (Zhong et al., 2019).	8
Figura 4. Estructura proteica de los miembros de la familia de los factores krüppel-like (McConnell & Yang, 2010).	14
Figura 5. Resultado de la purificación del vector de expresión de KLF15. Análisis por espectrofotometría con Nanodrop 3000.	33
Figura 6. Resultados de validación del plásmido KLF15 mediante qPCR.	34
Figura 7. Imágenes de células Caco-2 posterior a 48 horas de transfección. Objetivo 10x.	35
Figura 8. Curvas de amplificación y curva melt. A) Amplificación de KLF15 en células Caco-2 transfectadas con KLF15 empleando 2 pares de primers y curva melt. B) Amplificación del control negativo y curva melt.	37
Figura 9. Curvas de amplificación de KLF15 de matriz de primers y curvas melt.	38
Figura 10. Representación de amplificación de KLF15. A) Amplificación de KLF15 y GAPDH en células transfectadas y no transfectadas. B) Amplificación de células transfectadas con 2.5 y 5 µg de ADN plasmídico.	39
Figura 11. Niveles de expresión relativa de KLF15 en las células Caco-2 transfectadas y viabilidad a las 48 horas.	40
Figura 12. Niveles de expresión relativa de marcadores epiteliales.	41
Figura 13. Niveles de expresión relativa de marcadores mesenquimales.	42
Figura 14. Niveles de expresión relativa del marcador de proliferación Ki67.	43
Figura 15. Niveles de expresión de los receptores de muerte de TRAIL, DR4 y DR5.	43

Figura 16. Imágenes de fluorescencia de CMM-MO transducidas con el transgén de TRAILS y GFP. Gen reportero GFP en verde y núcleo celular teñido con DAPI.....	45
Figura 17. Viabilidad celular de CMM-TRAILS sometidas a quimioterapia.....	46
Figura 18. Porcentaje de muerte celular producido por tratamientos en células Caco-2.	47
Figura 19. Porcentaje de muerte celular producido por tratamientos en células Caco-2 transfectadas con KLF15.....	48
Figura 20. Efecto del KLF15 sobre susceptibilidad a tratamientos.	50

VI. LISTA DE TABLAS

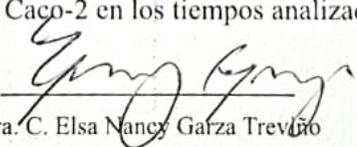
Tabla	Página
Tabla 1. Estadios de la carcinogénesis del cáncer colorrectal acorde al sistema TNM (American Cancer Society, 2018).....	2
Tabla 2. Compuestos que aumentan la susceptibilidad a TRAIL y su mecanismo.....	11
Tabla 3. Papel del KLF15 en cáncer colorrectal.....	21
Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos.....	31
Tabla 5. Secuencias de primers para amplificación de KLF15.....	36
Tabla 6. Concentraciones empleadas para matriz de primers.....	37

RESUMEN

QCB. Gladys Selene Pérez Contreras

Título: "Evaluación de la sobreexpresión del factor Krüppel-like 15 como mecanismo de sensibilización a TRAIL en cáncer colorrectal".

Introducción: El cáncer colorrectal (CCR) es la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial, lo que resalta la necesidad de nuevos tratamientos. El ligando inductor de la apoptosis ligado al factor de necrosis tumoral (TRAIL) induce apoptosis selectivamente en células tumorales, aunque posee la desventaja de tener una corta vida media. Para superar este obstáculo, se han empleado células madre mesenquimales (CMM) modificadas genéticamente, funcionando como sistemas de entrega continua capaces de migrar a tumores. Sin embargo, aún se presentan limitaciones como la resistencia a TRAIL, resaltando la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas con el fin de mejorar la eficacia de los tratamientos actuales. Se ha reportado que la combinación con quimioterapia y la modulación de factores de transcripción Kruppel-Like es capaz de incrementar la apoptosis por TRAIL en las células tumorales. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la sobreexpresión de KLF15 sobre la susceptibilidad a TRAILS en la línea celular de cáncer colorrectal Caco-2 tratada con quimioterapia. **Materiales y métodos:** Se realizó la sobreexpresión de KLF15 en células Caco-2 mediante transfección con lipofectamina y se validó mediante qPCR. Se analizó mediante qPCR el efecto de la sobreexpresión de KLF15 sobre la expresión de marcadores de TEM, EpCAM, E-cadherina, Snail, Slug y Vimentina; de proliferación, Ki67; y de los receptores de muerte de TRAIL, DR4 y DR5, empleando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y el GAPDH como endógeno. Posteriormente, se validó la transducción de CMM con el transgen de TRAILS mediante la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) por inmunofluorescencia. Se evaluó la susceptibilidad a TRAILS en células Caco-2 sometidas a tratamiento con 5-FU, Irinotecán y el efecto de la sobreexpresión de KLF15 sobre dicha susceptibilidad, empleando ensayos de citotoxicidad mediante luminiscencia. **Resultados:** La sobreexpresión del factor KLF15 en las células Caco-2 fue validada, alcanzando niveles de sobreexpresión elevados (>3,000 veces el nivel de expresión basal). Dicha sobreexpresión resultó en un aumento en la expresión de EpCAM ($p < 0.01$) y disminución de Vimentina a los 7 días ($p < 0.0001$), así como también, la sobreexpresión del receptor de muerte DR4 a las 48 horas ($p < 0.05$). El tratamiento con 5-FU demostró potenciar la muerte celular inducida por TRAIL 1:3 ($38\% \pm 11$ vs $65\% \pm 12$), tanto en células Caco-2 y Caco-2 que sobreexpresan KLF15. Existe un incremento en la muerte celular por Irinotecán en combinación con TRAIL en relación 1:3 y 1:6. La sobreexpresión del KLF15 únicamente potencia el efecto del tratamiento con Irino+TRAIL 1:3 ($p < 0.05$). **Conclusión:** El KLF15 es capaz de regular genes de TEM, sin embargo, no incrementa la sensibilidad a TRAILS en células Caco-2 en los tiempos analizados.


Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño

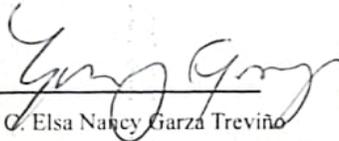
Directora de Tesis

ABSTRACT

QCB. Gladys Selene Pérez Contreras

Title: "Evaluation of Krüppel-like factor 15 overexpression as a mechanism of sensitization to TRAIL in colorectal cancer".

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is the second leading cause of cancer death worldwide, highlighting the need for new treatments. The apoptosis-inducing ligand associated with tumor necrosis factor (TRAIL) selectively induces apoptosis in tumor cells but has the drawback of a short half-life. To overcome this obstacle, genetically modified mesenchymal stem cells (MSCs) have been employed as continuous delivery systems capable of migrating to tumors. However, limitations such as TRAIL resistance still exist, emphasizing the need for new therapeutic strategies to enhance the effectiveness of current treatments. It has been reported that combining TRAIL with chemotherapy and modulating Kruppel-Like transcription factors can increase TRAIL-induced apoptosis in tumor cells. **Objective:** Analyze the effect of KLF15 overexpression on TRAIL susceptibility in the colorectal cancer cell line Caco-2 treated with chemotherapy. **Materials and Methods:** KLF15 was overexpressed in Caco-2 cells through lipofection and validated by qPCR. The effect of KLF15 overexpression on the expression of TEM markers (EpCAM, E-cadherin, Snail, Slug, and Vimentin), proliferation marker (Ki67), and TRAIL death receptors (DR4 and DR5) was analyzed using qPCR with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and GAPDH as the endogenous control. Subsequently, MSCs transduced with TRAIL transgene were validated by green fluorescent protein (GFP) expression through immunofluorescence. TRAIL susceptibility in Caco-2 cells treated with 5-FU and Irinotecan and the effect of KLF15 overexpression on this susceptibility were assessed using luminescence-based cytotoxicity assays. **Results:** KLF15 overexpression in Caco-2 cells was validated, achieving elevated expression levels ($>3,000$ times the basal level). This overexpression resulted in increased EpCAM expression ($p<0.01$) and decreased Vimentin at 7 days ($p<0.0001$), as well as increased DR4 death receptor expression at 48 hours ($p<0.05$). Treatment with 5-FU enhanced TRAIL-induced cell death in a 1:3 ratio ($38\% \pm 11$ vs $65\% \pm 12$) in both Caco-2 and Caco-2 cells overexpressing KLF15. An increase in cell death by Irinotecan in combination with TRAIL was observed in 1:3 and 1:6 ratio. KLF15 overexpression enhanced the effect of Irinotecan+TRAIL at a 1:3 ratio ($p<0.05$). **Conclusion:** KLF15 can regulate TEM genes; however, it does not increase TRAIL susceptibility in Caco-2 cells within the analyzed timeframes.



Dra. G. Elsa Nancy Garza Treviño

Thesis Director

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del cáncer

El cáncer posee un alto impacto en la salud global, siendo una de las principales causas de morbilidad y la principal causa de mortalidad en el mundo [1]. De acuerdo con el GLOBOCAN, en el año 2020 ocurrieron cerca de 10 millones de muertes atribuibles al cáncer [2]. El término cáncer comprende un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar diferentes órganos o tejidos de un organismo; y se caracteriza por la capacidad que adquieren las células para multiplicarse y dividirse descontroladamente, invadiendo y destruyendo tejidos adyacentes [3].

1.2. Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) se caracteriza por el desarrollo de células malignas en el colon o el recto, y su incidencia ha ido en aumento en las últimas décadas, tanto en países desarrollados como en desarrollo. Es uno de los cánceres más comunes a nivel mundial, ocupando el tercer lugar en términos de incidencia y el segundo lugar en mortalidad relacionada a cáncer; siendo reportado un estimado de más de 1.9 millones de casos nuevos y 935,000 muertes en el año 2020 [2]. Específicamente en México, ocupa los mismos puestos, generando 16,000 casos nuevos y más de 8,000 muertes al año.

El CCR afecta tanto a hombres como a mujeres, con una ligera predominancia hacia el sexo masculino. Aunque es más común en personas mayores de 50 años, en los últimos años se ha observado un aumento en la incidencia en personas menores a 50 años, resaltando la necesidad de una mayor atención y conciencia sobre este problema de salud [4]. Los factores de riesgo conocidos para el desarrollo de este cáncer incluyen la edad avanzada, antecedentes familiares de cáncer colorrectal o pólipos, historia personal de enfermedad inflamatoria intestinal, una dieta rica en grasas y carnes procesadas, obesidad, consumo de alcohol y tabaquismo [5].

1.2.1. Clasificación del cáncer colorrectal

El CCR se clasifica de varias maneras, no obstante, el sistema de estadificación que se emplea con más frecuencia es el sistema TNM (Tumor, Ganglios linfáticos, Metástasis), que describe la extensión del tumor primario (T), la presencia de afectación ganglionar (N) y la presencia de metástasis a distancia (M) del American Joint Committee on Cancer (AJCC).

Tabla 1. Estadios de la carcinogénesis del cáncer colorrectal acorde al sistema TNM [6].

Estadio	Características
0	Carcinoma <i>in situ</i>: Crecimiento anormal en la mucosa del colon, el cáncer se encuentra confinado a la capa más superficial del revestimiento del colon o el recto, sin invadir las capas más profundas de la pared intestinal ni diseminarse.
I	Cáncer localizado: Crecimiento del tumor hacia la capa de tejido conectivo que rodea la mucosa (submucosa) o hacia la capa muscular externa gruesa del colon o el recto (muscular propia).
II	Cáncer localmente avanzado, etapas tempranas: Crecimiento a través de la capa muscular propia del colon o el recto y puede haber invadido estructuras cercanas, no hay diseminación.
III	Cáncer localmente avanzado, estadios tardíos: Existe diseminación a ganglios linfáticos cercanos, pero aún no a otros órganos.
IV	Cáncer metastásico: Existe diseminación desde el colon a órganos y tejidos distantes, siendo más frecuente la propagación al hígado.

Estas etapas van desde la etapa 0 (carcinoma *in situ*) hasta la etapa IV (cáncer metastásico avanzado), tal como se representa en la Figura 1. Esta clasificación ayuda a los médicos a determinar el tratamiento más adecuado para cada paciente y proporciona información importante sobre el pronóstico de la enfermedad [6].

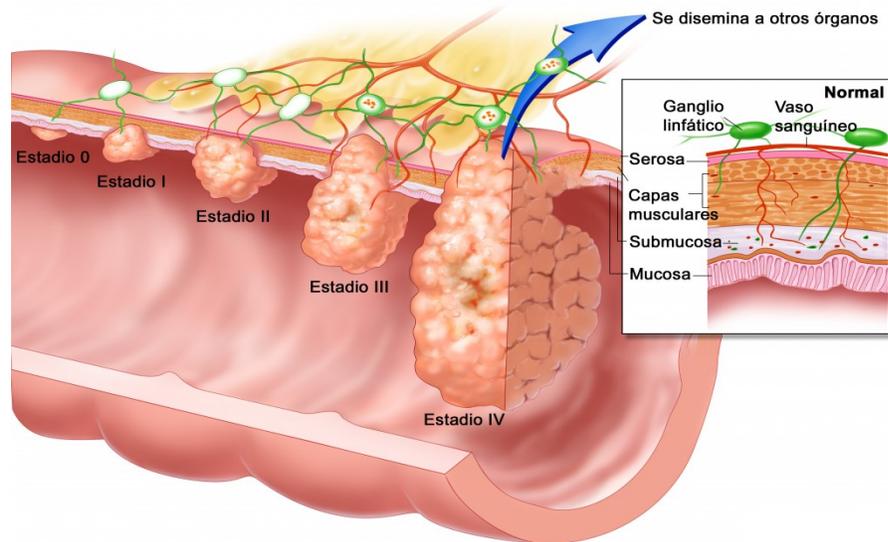


Figura 1. Estadios del cáncer colorrectal de acuerdo al TNM [84].

La detección temprana del CCR es fundamental para mejorar los resultados del tratamiento y reducir la mortalidad. Las pruebas de detección recomendadas incluyen la detección de sangre oculta en heces y la colonoscopia, que pueden identificar pólipos precancerosos o cánceres en etapas tempranas cuando son más tratables [7].

Además, se pueden realizar pruebas de imagen, como tomografías computarizadas (TC), resonancias magnéticas o ultrasonidos, para evaluar la extensión del cáncer y la presencia de metástasis a otros órganos. La biopsia del tejido sospechoso es crucial para confirmar el diagnóstico de CCR y determinar el tipo histológico del tumor [6].

A pesar de la disponibilidad de estas pruebas de detección, la participación de la población en los programas de detección sigue siendo subóptima en muchos países. Sumado a esto, los síntomas presentados en etapas tempranas suelen ser inespecíficos resultando en la detección en estadios tardíos de la enfermedad, la cual sigue siendo difícil de tratar. El pronóstico de supervivencia a cinco años depende del estadio de la enfermedad,

mostrando una supervivencia mayor al 90% en los pacientes con CCR en etapa I y de apenas 10% para los pacientes en etapa IV [8].

1.2.2. Tratamiento del cáncer colorrectal

En la actualidad se cuenta con diversas estrategias para el tratamiento del CCR; la elección de la más adecuada depende de ciertos factores como: la salud del paciente, el tamaño del tumor, y su ubicación [5]. Dentro de los tratamientos estándar se incluyen la resección quirúrgica, la quimioterapia y radiación, los cuales se resumen en la Figura 2 representando el tratamiento de elección según el estadio en el que se detecte.

La cirugía es una de las opciones más frecuentemente empleadas, donde la mayoría de los pólipos y algunos casos de cáncer que se encuentran en etapa inicial (etapa 0 y algunos etapa I), pueden ser extirpados durante colonoscopías mediante procedimientos quirúrgicos como la polipectomía o la escisión local. En los casos un poco más avanzados, en los que se presenta cierto grado de invasión, se puede realizar una colectomía en la cual se extirpa todo o parte del colon, junto con ganglios linfáticos cercanos [6].

Algunos tratamientos alternativos son la ablación por radiofrecuencia o crioablación, quimioterapia, radioterapia o terapias dirigidas. En la ablación por radiofrecuencia o crioablación, se emplea energía en forma de ondas de radiofrecuencia para destruir los tumores con calor o congelarlos. El tratamiento con quimioterapia requiere el uso de fármacos para impedir el crecimiento del cáncer o eliminar las células cancerosas.

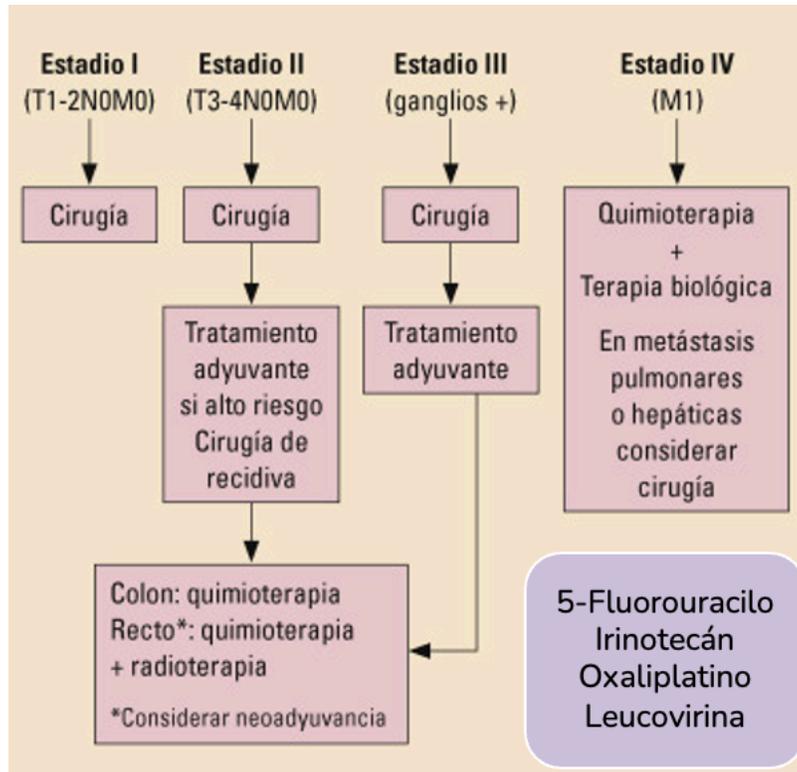


Figura 4. Tratamiento de elección para el CCR de acuerdo al estadio. Modificado de: [85].

Entre las quimioterapias frecuentemente empleadas se encuentra el Oxaliplatino, uno de los agentes anti-tumorales de primera línea, típicamente en combinación con el 5-Fluorouracilo (5-FU) y Leucovorina en el régimen conocido como FOLFOX. Este esquema se utiliza frecuentemente como tratamiento adyuvante después de la cirugía o como tratamiento de primera línea en el cáncer metastásico [9]. Otro régimen, llamado FOLFIRI, incluye el uso de Irinotecán en combinación con 5-FU y leucovorina. Estos tienen tasas de respuestas entre 54% y 56% con supervivencia libre de enfermedad entre 8 a 8.5 meses, respectivamente [10].

Es común el uso de terapias adyuvantes con anticuerpos monoclonales, como Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que bloquea la formación de nuevos vasos sanguíneos que

alimentan al tumor [11]. Así como Cetuximab y Panitumumab, que bloquean el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), inhibiendo la proliferación y supervivencia de las células cancerosas.

A la fecha, son necesarios múltiples abordajes para obtener una mejor respuesta al tratamiento del CCR y evitar la resistencia. Una estrategia inmunológica que ha ganado interés es el uso del ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL).

1.3. Ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL)

El ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral, o TRAIL, es una proteína transmembranal de tipo II que posee la capacidad de inducir apoptosis en células tumorales sin afectar células normales mediante la activación de la apoptosis por la vía extrínseca o dependiente de receptor. Esta proteína pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y se encuentra expresada constitutivamente en una amplia variedad de tejidos, principalmente hígado, pulmón y próstata; y en ciertas células inmunes como linfocitos B, NK, monocitos y células dendríticas [12].

La proteína en su forma completa (TRAILc) posee 281 aminoácidos (40 kDa) y está conformada por una fracción transmembranal, que comprende los aminoácidos 1 a 113; y una fracción extracelular, la cual puede ser escindida proteolíticamente como TRAIL soluble (TRAILs) que comprende los aminoácidos 114 a 281 (24 kDa) [13]. De manera similar a otros elementos de la familia del TNF, TRAIL forma homotrímeros capaces de unirse a tres receptores moleculares; no obstante, difiere en que el trímero se encuentra estabilizado por un átomo de zinc interno que interactúa de forma no covalente con tres residuos de cisteína (uno de cada monómero TRAIL), lo cual resulta crucial para la estabilidad, solubilidad y bioactividad del trímero [14].

Tanto TRAIL soluble como el completo pueden unirse a cuatro receptores transmembrana DR4 (Death receptor 4 o TRAIL-R1), DR5 (Death receptor 5 o TRAIL-R2), TRAIL-R3/DcR1, TRAIL-R4/DcR2; así como también al receptor soluble, osteoprotegerina (OPG) [12]. Sin embargo, únicamente los receptores DR4 y DR5 son capaces de desencadenar la apoptosis tras la unión de TRAIL, mientras el resto funciona como señuelos inhibiéndola. Esto se debe a que DR4 y DR5 poseen un dominio de muerte (DD) citoplásmico funcional, requerido para la inducción de apoptosis [15]. Las células tumorales sobreexpresan los receptores DR4 y DR5, mientras que las células sanas sobreexpresan los receptores señuelo; dándole a TRAIL la ventaja de ser selectivo [15].

1.3.1. Mecanismo de apoptosis por TRAIL

El mecanismo por el cual TRAIL desencadena la apoptosis por la vía extrínseca mediante la unión del trímero a los receptores DR4 y/o DR5, resultado en la trimerización y activación de los receptores. Este proceso conlleva al reclutamiento de una molécula adaptadora, el dominio de muerte asociado a Fas (FADD), interaccionando mediante sus dominios de muerte [16]. Posteriormente, FADD recluta la pro-caspasa 8 y la pro-caspasa-10 interactuando con sus respectivos dominios efectores de muerte. De esta manera se genera un complejo multiproteico conformado por los receptores de muerte de TRAIL, FADD y las caspasas 8 y 10, denominado como complejo de señalización inductor de muerte (DISC) [13]. Al reclutarse las pro-caspasas al DISC forman homodímeros, lo cual induce cambios conformacionales que exponen sus sitios activos proteolíticamente, generando la forma activa de caspasa-8 y 10.

En ciertos tipos celulares la activación de la caspasa-8 es suficiente para inducir la activación de la caspasa-3 efectora y resultar en la ejecución de la apoptosis; no obstante, otros tipos celulares requieren igualmente la activación de la vía mitocondrial (vía intrínseca). En dicho caso, la caspasa-8 conduce a la escisión de la proteína que interacciona mediante el dominio BH3 inhibidor de Bcl-2 (Bid), generando Bid truncado (tBid). tBid interactúa con las proteínas antagonista homólogo de Bcl-2 (Bak) y Bcl-2

asociado a X (Bax) generando su oligomerización y translocación a la membrana mitocondrial externa, lo cual tiene como consecuencia la pérdida del potencial de membrana y la liberación de factores apoptóticos al citoplasma como el citocromo c [13]. Dichos factores se unen al factor de activación de la proteasa apoptótica-1 (APAF-1) y pro-caspasa-9, formando un apoptosoma funcional y eventualmente activar las caspasas efectoras 3, 6 y 7 de apoptosis. El mecanismo de apoptosis por TRAIL se muestra en la Figura 3.

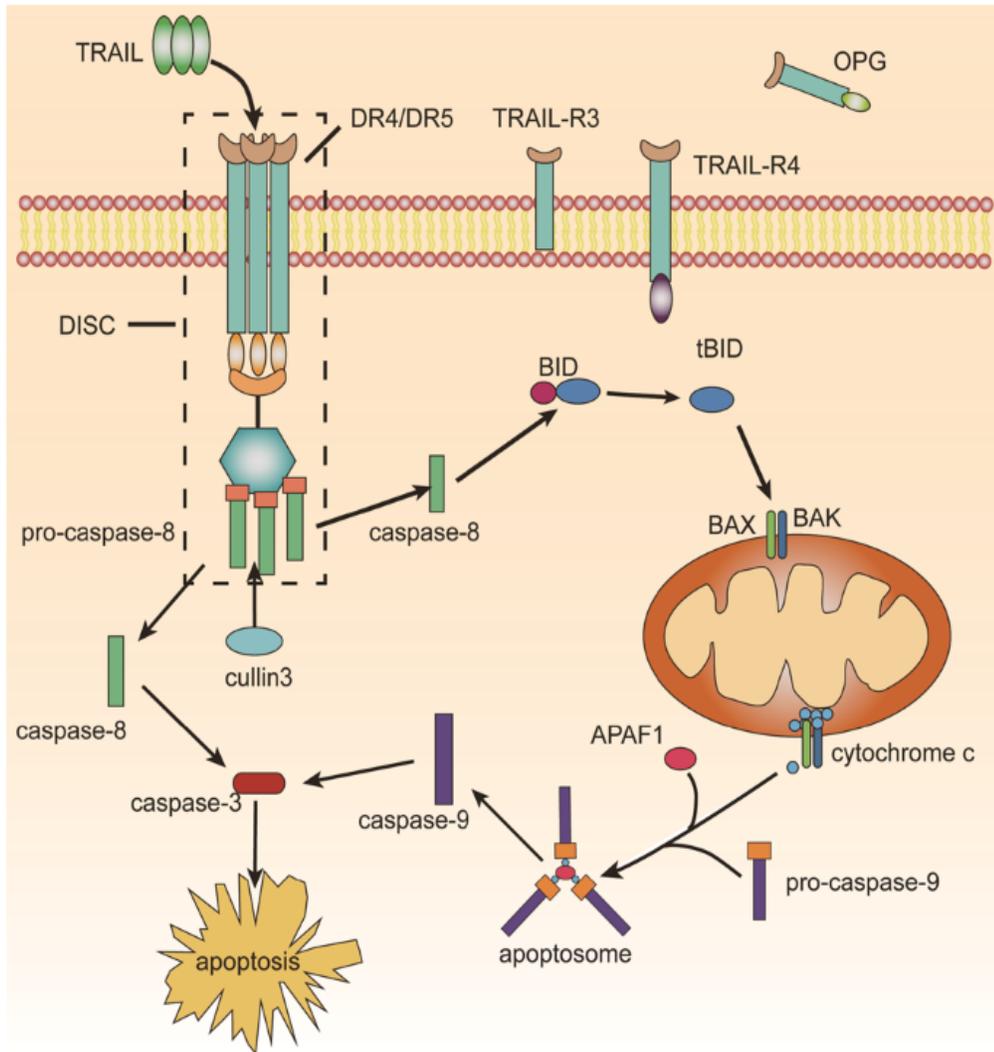


Figura 3. Mecanismo de apoptosis por TRAIL [15].

1.3.2. Administración de TRAIL mediante células madre mesenquimales

TRAIL posee una corta vida media, por lo cual, se han desarrollado estrategias para la entrega de esta proteína. Entre estas estrategias, se encuentra el uso de vectores celulares para la administración de medicamentos, como glóbulos blancos, macrófagos, células dendríticas y células madre. No obstante, las células madre mesenquimales (CMM) han sido las más estudiadas, considerándose vehículos prometedores para la administración precisa y selectiva de tratamientos contra el cáncer. Esto se debe a sus potentes efectos inmunomoduladores, la capacidad de migrar a sitios inflamatorios y tumorales (homing), y pueden modificarse genéticamente para producir proteínas antitumorales específicas como TRAIL, permitiendo una administración continua. Adicionalmente, se ha reportado que las CMM pueden regular el crecimiento de células madre de tumor mediante mecanismos parácrinos [17].

Como se ha mencionado previamente, la baja respuesta del cáncer a la terapia convencional está asociada con la resistencia a los fármacos. Además, el uso continuo de quimioterapia convencional se asocia con efectos secundarios y de toxicidad. Cabe mencionar, que es posible que se presente resistencia a la apoptosis inducida por TRAIL en ciertas células tumorales. En el desarrollo de terapias contra las células resistentes el incremento de la farmacorresistencia y el microambiente tumoral representan blancos terapéuticos importantes. El conocimiento de la genética del tumor y las vías de señalización brindan herramientas valiosas para el desarrollo de tratamientos. Por lo cual, han surgido estrategias con el objetivo de incrementar la susceptibilidad de células a TRAIL; entre los cuales se han propuesto diferentes compuestos.

1.3.3. Compuestos que aumentan la susceptibilidad a TRAIL

Dado a la limitación de la efectividad de TRAIL como monoterapia y la generación de resistencia, se han planteado estrategias terapéuticas administradas en combinación con

TRAIL que permitan aumentar o potenciar su actividad apoptótica. Algunos de los compuestos reportados se muestran resumidos en la Tabla 2.

Los compuestos que muestran un efecto sinérgico con TRAIL en la inducción de apoptosis en células tumorales han sido ampliamente estudiados. Se han identificado varios compuestos naturales y agentes sintéticos que mejoran la apoptosis inducida por TRAIL a través de diversos mecanismos. Por ejemplo, el compuesto ginsenoside K sensibiliza las células de cáncer de colon a la apoptosis inducida por TRAIL al aumentar el receptor de muerte 5 (DR5) [18]. De manera similar, se ha demostrado que el ácido metilselenínico (MSA) induce sinérgicamente la apoptosis en células de cáncer de próstata cuando se combina con TRAIL [19].

Los agentes de quimioterapia igualmente permiten potenciar la actividad de TRAIL, como el uso de la doxorubicina. Este fármaco, un agente de quimioterapia comúnmente utilizado, puede aumentar la sensibilidad de las células cancerosas a TRAIL al inducir la expresión de receptores de muerte como DR4 y DR5 en células de carcinoma renal y otros tipos de cáncer [20], [21].

Recientemente, se reportó el uso de factores de transcripción como mecanismo para sensibilizar a TRAIL. Específicamente, se empleó un factor de transcripción perteneciente a la familia de los Krüppel-Like, el cual al ser sobreexpresado provocó un aumento de los receptores de muerte de TRAIL, DR4 y DR5, aumentando así la susceptibilidad a TRAIL [22].

Tabla 2. Compuestos que aumentan la susceptibilidad a TRAIL y su mecanismo.

Cmpuesto	Mecanismo	Cáncer	Referencias
Agentes quimioterapéuticos			
Platinum(IV) LA-12 o cisplatino	Estimula apoptosis por vía mitocondrial	Cáncer de colon	[23]
Microesferas con TRAIL y doxorubicina	Actividad antitumoral	CCR in vivo e in vitro	[14]
Productos naturales			
Compuesto Ginsenoside K (CK)	Aumenta DR5	Cáncer de colon	[23]
Polifenoles (resveratrol, wogonina)	Aumento DR5 y efecto pro- oxidante que activa p53 mediada por ROS y proteína pro-apoptótica PUMA.	CCR	[24]
Otros agentes			
Capsazepina	Aumenta DR4 y DR5	Cáncer de colon	
Anticuerpos (DS-8273a con nivolumab (anti-PD1))		CCR avanzado	[24]
Factores de transcripción			
Sobreexpresión KLF4	Aumenta DR4 y DR5	Cáncer gástrico	[22]

1.4. Factores de transcripción

Los factores de transcripción son proteínas que interaccionan con el ADN para regular la expresión de diversos genes blanco, mediante su unión a promotores o elementos potenciadores cercanos al sitio de inicio de la transcripción. La mayoría de estos cuentan con dos dominios estructurales necesarios para sus funciones reguladoras. Estos poseen un dominio de unión al ADN específico para una secuencia, como dedos de zinc, cremalleras de leucina y hélice-giro-hélice. Por otro lado, poseen un dominio activador o represor transcripcional que tiene la capacidad de interactuar con varios cofactores, como coactivadores o correpresores [25].

Ciertos factores de transcripción pueden carecer de una función efectora específica y únicamente actuar bloqueando la unión de otras proteínas a el sitio de unión de dicho factor. Sin embargo, la mayoría actúa reclutando cofactores, por tanto, mediando su actividad efectora. Entre dichos cofactores se encuentran grandes complejos proteicos de múltiples subunidades o proteínas de múltiples dominios [26]. Comúnmente, estos dominios se encuentran involucrados en la unión a la cromatina, remodelación de nucleosomas y la modificación de histonas u otras proteínas; modulando la transcripción de genes.

1.4.1. Factores Krüppel-Like

Los factores krüppel-like (KLF) son una familia de factores de transcripción altamente conservados en mamíferos que desempeñan un papel crucial en la regulación de la expresión génica; regulando procesos celulares esenciales, como la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis [27]. Ciertos miembros poseen una expresión restringida a determinados tejidos, mientras que otros tienen una expresión ubicua. La actividad de los KLFs depende en gran manera del tipo celular o tejido en el que se exprese.

Los KLFs están involucrados en el desarrollo de diversos tejidos, incluyendo vasos sanguíneos y nervios. Además, juegan un papel crucial en la regulación de procesos de defensa del organismo, como anti-inflamación, anti-fibrosis y anti-trombosis [28].

1.4.2. Estructura y Función

La estructura proteica de los KLFs se puede dividir en dos dominios, un dominio carboxilo terminal (C-terminal) y uno amino terminal (N-terminal). El extremo C-terminal de estas proteínas presenta homología entre todos los miembros, debido a que posee tres “dedos de zinc” altamente conservados del tipo C_2H_2 ; en los cuales un átomo de zinc se encuentra coordinado tetraédricamente por dos residuos de cisteína y dos residuos de histidina permitiendo el plegamiento del dominio en una estructura $\beta\beta\alpha$. El primer y segundo dedo de zinc contienen 25 aminoácidos y el tercero contiene 23, y cada uno reconoce 3 pares de bases [29]. La ubicación dentro de la proteína se muestra en la Figura 4. Es por esta homología estructural que diferentes KLFs pueden regular un mismo gen blanco.

Estos dedos de zinc les permiten a los KLFs unirse al ADN en sitios ricos en las bases GC o elementos 5'-CACCC-3' en regiones de los promotores o potenciadores de los genes que regulan, actuando como activadores o represores transcripcionales. Además, esta región es importante para la importación del KLF al núcleo ya que contiene la señal de localización nuclear.

Por otro lado, el extremo N-terminal es altamente variable y lo que hace la diferencia entre los miembros de los KLFs. Contiene regiones para interacciones proteína-proteína, con la capacidad de unirse a coactivadores, represores y modificadores, lo cual les permite tener diversas funciones. A pesar de su variabilidad, algunos KLFs poseen cierta homología estructural en el extremo N-terminal y funciones similares, lo cual permite clasificarlos.

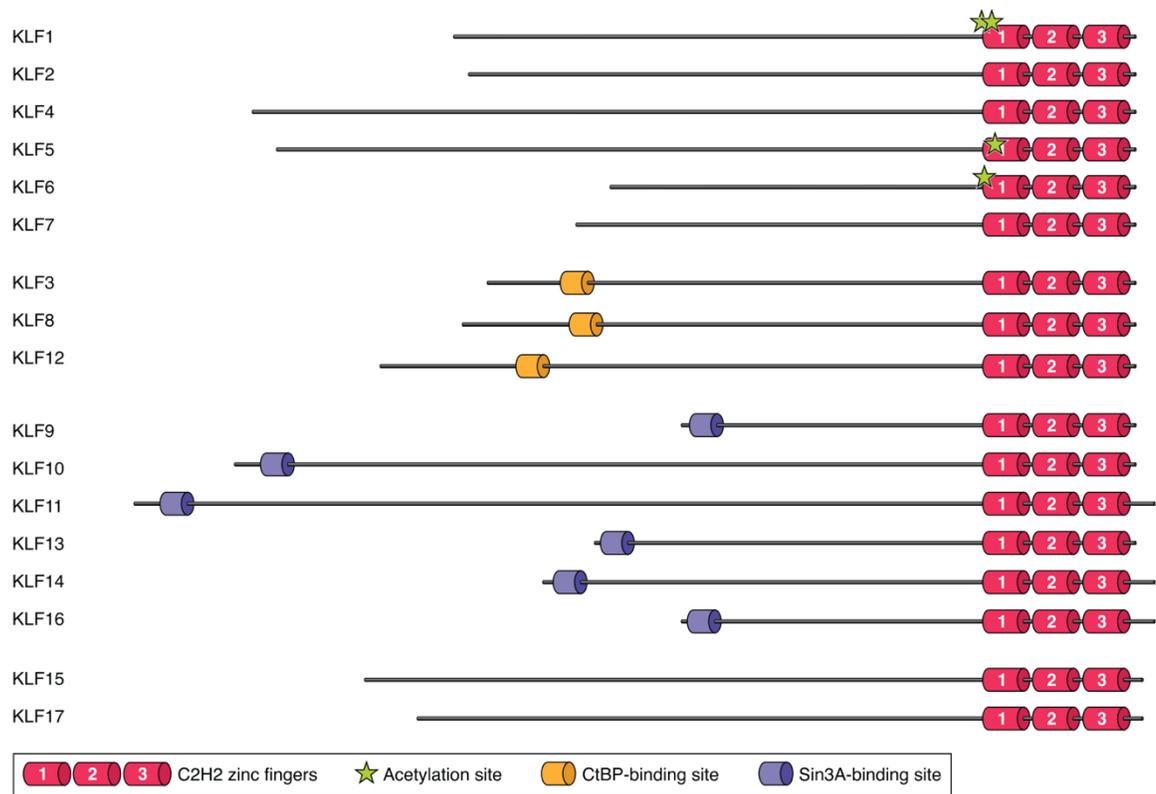


Figura 4. Estructura proteica de los miembros de la familia de los factores krüppel-like [29].

1.4.3. Clasificación de los KLFs

Actualmente, se conocen 17 isoformas que se encuentran divididas en 3 grupos de acuerdo con su similitud estructural y funcional, tal como se observa en la Figura 4 [30]. El grupo

1 se encuentra conformado por el KLF3, 8 y 12; los cuales se ha reportado que actúan como represores transcripcionales uniéndose a la proteína de unión C-terminal (CtBP) la cual promueve el silenciamiento de genes reclutando desacetilasas de histonas (HDACs) y metiltransferasas. El grupo 2 integrado por el KLF1, 2, 4, 5, 6 y 7, funcionan como activadores transcripcionales mediante la unión a coreguladores con actividad de acetiltransferasa; y el grupo 3 por KLF9, 10, 11, 13, 14 y 16, y actúan como represores,

reclutando al co-represor Sin3A que se une con HDACs [29]. El KLF15 y 17 no poseen motivos definidos de interacción proteica, por lo cual no se encuentran agrupados [27].

1.4.4. KLFs en cáncer

Existen diversos tipos de cáncer que se han visto asociados con los KLFs, se ha demostrado que están implicados en el desarrollo del cáncer, regulando la expresión de proteínas que participan en la formación de estos [28]; de igual manera, se han relacionado con la resistencia a tratamientos al encontrarse alterada su expresión.

Se ha demostrado que la regulación de la expresión de estos permite sensibilizar a tratamientos; tales como el KLF5, que se encuentra sobreexpresado en CCR y al ser inhibido devuelve la sensibilidad a oxaliplatino restaurando la respuesta apoptótica [9]; el KLF8, cuya represión induce apoptosis, inhibe el crecimiento del tumor, y potencia el efecto antitumoral del 5-FU [31]; el KLF9, que se encuentra subexpresado en melanoma y al ser sobreexpresado se potencian las propiedades antitumorales del Paclitaxel [32]; el KLF17, que se ha mostrado subexpresado en cáncer gástrico y al ser regulado a la alza mostró un incremento en la sensibilidad a 5-FU [33], entre otros.

1.4.5. Procesos en el cáncer regulados por los factores krüppel-like

Los KLFs se han visto implicados en la progresión del cáncer y la resistencia a tratamientos mediante la regulación de tres principales procesos.

1.4.5.1. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada, es un mecanismo intrínseco de la maquinaria biológica de las células sanas que desempeña un papel fisiológico en diversos procesos. En este ocurre contracción celular, la condensación de la cromatina y una extensa

fragmentación nuclear y celular, con el fin de eliminar células no deseadas o innecesarias [34].

Este proceso puede ser inducido mediante dos vías de señalización: la vía intrínseca, activada por la liberación de factores pro-apoptótico mitocondriales (como el citocromo c y la proteína Smac/diablo); y la vía extrínseca, activada mediante la unión de factores de necrosis tumoral a receptores de muerte [35]. Dichas vías convergen en la activación de las caspasas y proteasas intracelulares.

Durante el desarrollo del cáncer, este mecanismo se puede ver alterado favoreciendo la progresión tumoral y la resistencia a las terapias antitumorales habituales [36]. Las células tumorales pueden adquirir resistencia a la apoptosis mediante la expresión de proteínas anti-apoptótica como Bcl-2 o mediante la regulación negativa o mutación de proteínas pro-apoptótico como BAX. Tanto la expresión de Bcl-2 como de BAX, se encuentra regulada por el gen supresor de tumores p53; este se encuentra mutado en ciertos tipos de cáncer, ocasionando la sobreexpresión de Bcl-2 y contribuyendo al desarrollo de cáncer [37].

Se ha investigado el papel de los KLFs en la apoptosis mediante la regulación a la baja y al alza de estos. El KLF15 es capaz de regular la apoptosis en células cancerosas, este se reporta como subexpresado en el cáncer de mama triple negativo; al sobreexpresarlo en líneas celulares tumorales ocurre el arresto del ciclo celular y aumento en el número de células apoptóticas. Esto debido a que el KLF generaba una disminución de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y aumentaba la proteína pro-apoptótica Bax [38]. De igual manera, el KLF5 se ha reportado como un supresor de tumores; al disminuir su expresión en células de leucemia disminuye la survivina (una proteína inhibidora de apoptosis) y sensibiliza a la apoptosis inducida por quimioterapéuticos [39].

Un estudio demostró que el KLF4 es capaz de regular la apoptosis seguida de daño al ADN por radiación gamma γ ; en el cual, las células irradiadas llevan a cabo el proceso apoptótico al estar ausente el KLF4 y en presencia de este, se disminuye [40]. El

mecanismo por el cual sucede es mediante la activación en la expresión del gen de arresto del ciclo celular, p21, así como también inhibiendo la capacidad de p53 activar la expresión del gen pro-apoptótico, BAX.

1.4.5.2. Proliferación celular

La proliferación celular tiene un papel importante en el desarrollo y progresión del cáncer, debido a que durante este ocurren mutaciones que generan una expresión o actividad alterada de proteínas relacionadas con el ciclo celular; resultando en una proliferación celular descontrolada.

La progresión del ciclo celular es regulada por la formación de complejos de ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). De igual manera, se incluye a la proteína p21 que interactúa con cdk, proteínas inhibidoras de quinasa (Kips) p27 y p57, e inhibidores de CDK4 (INK4), como p16, p15, p18 y p19; los cuales pueden activar o inhibir dichos complejos [41].

Existen diversos miembros de los KLFs que regulan el crecimiento celular, como el KLF5 que se encuentra altamente expresado en el intestino; específicamente, en las células que proliferan activamente [29]. Además de su papel fisiológico en la proliferación, es capaz de regular este proceso durante el cáncer; demostrándose que el KLF5 en células de cáncer gástrico puede inhibir la proliferación celular mediante la regulación al alza de p21 [42].

El KLF15 es otro de los miembros que se ha reportado que tienen la capacidad de regular la proliferación celular durante procesos carcinogénicos; la sobreexpresión de dicho KLF en el cáncer de mama triple negativo produce un arresto del ciclo celular y disminuye la proliferación [38]. Adicionalmente, se ha reportado este mismo efecto sobre líneas celulares de cáncer gástrico, mediante la regulación de CDKN1A/p21 y CDKN1C/p57 [43].

1.4.5.3. Transición epitelial-mesenquimal (TEM)

Este es un proceso en el cual ocurre una transformación del destino de una célula, pasando de un estado estacionario y estable a un estado migratorio o mesenquimal; asociado a resistencia a la apoptosis y baja susceptibilidad a tratamientos en células tumorales [44]. Durante la TEM las células pierden sus características epiteliales; incluyendo la polaridad celular apical-basal y el contacto célula-célula; y adquieren propiedades mesenquimales, como una mayor motilidad, facilitando la diseminación metastásica [45].

Dicho proceso juega un papel importante durante la implantación, desarrollo de órganos y formación de los embriones; así como también durante la transformación neoplásica. En el CCR, la TEM se ha visto implicada en la progresión tumoral, la metástasis y la resistencia a los medicamentos. Particularmente, la vía de señalización WNT es una de las principales vías asociadas a TEM; en donde las moléculas de Wnt interactúan con otras vías de señalización, como con los receptores TGF- β y FGF regulando la TEM [44]. Sin embargo, se ha reportado que se presenta una mutación activadora de la vía canónica en la mayoría de pacientes con CCR [46].

En el CCR, la TEM se ha visto implicada en la progresión tumoral, la metástasis y la resistencia a los medicamentos. Este proceso se lleva a cabo mediante dos eventos dinámicos separados: 1) regulación a la baja de la proteína epitelial adhesiva E-cadherina y proteínas de unión como ocludinas y claudinas, lo que conduce a la desestabilización de la adhesión celular; y 2) ganancia de proteínas mesenquimales como N-cadherina, vimentina y fibronectina, que impulsan la motilidad y la invasión celular. Por lo cual, se suele emplear el análisis de dichas proteínas como marcadores del proceso de transición. Existen algunos otros marcadores implicados en otras etapas de la TEM, como β -catenina, Snail, Zeb1, CD133, CK-19 y EpCAM [45].

Anteriormente, se ha demostrado que los KLFs son capaces de regular la TEM; tal es el caso del KLF15, cuya expresión se encuentra disminuida en cáncer de mama y cáncer de mama triple negativo (tanto en líneas celulares como en tejidos). La expresión exógena

del KLF15 es capaz de suprimir la capacidad de invasión y migración de células de cáncer de mama triple negativo mediante la modulación de la TEM; aumentando la expresión de E-cadherina y disminuyendo la expresión de vimentina [38]. De igual manera, el KLF17 se ha propuesto como un regulador negativo de la TEM y metástasis en cáncer de mama. Al inhibir la expresión de este, existe una disminución de marcadores epiteliales como E-cadherina; en cambio, ocurre un aumento en los marcadores mesenquimales como fibronectina, vimentina y N-cadherina, correlacionándose con el proceso de TEM [47][47].

1.4.6. Factor Krüppel-Like 15

El factor de transcripción KLF15 es uno de los 17 miembros de esta familia de proteínas, el cual no ha sido categorizado en algún grupo puesto que no se cuenta con suficiente información acerca de sus motivos de interacción proteica. Éste ha demostrado tener actividad en múltiples tejidos; como riñones, hígado, pulmón, tejido adiposo y corazón [30].

Específicamente en cáncer, el KLF15 ha mostrado tener niveles bajos de expresión en tejidos de cáncer gástrico comparado con tejidos normales adyacentes; lo cual se correlacionó negativamente con el estadio clínico y la presencia de metástasis. Al sobreexpresar dicho KLF se presentó una inhibición de la proliferación celular mediante la regulación de CDKN1A/p21 y CDKN1C/p57 [43].

Adicionalmente, el KLF15 se ha reportado como un gen supresor de tumor cuya expresión se encuentra disminuida en cáncer de mama e incluso en cáncer de mama triple negativo, tanto en líneas celulares como en tejidos. La expresión exógena del KLF15 ha logrado inducir apoptosis, y suprimir la proliferación y metástasis de las células de cáncer de mama mediante la disminución de ligando 2 y 7 de quimiocina (CCL2 y CCL7) [38].

Cabe mencionar que en el adenocarcinoma de pulmón la expresión de KLF15 se ha encontrado incrementada en comparación con los tejidos normales, contrario a lo ocurrido

en los casos anteriores [48]; mostrando que la función de los KLFs varía según el contexto. Por lo cual, en la Tabla 3 se encuentra de manera resumida la expresión del KLF15 y su papel en diferentes tipos de cáncer.

Recientemente, se ha demostrado que la expresión del KLF15 en CCR se encuentra disminuida respecto a tejidos adyacentes. La sobreexpresión de dicho KLF fue capaz de disminuir la proliferación, migración e invasión de células de CCR, inhibiendo la TEM mediante la disminución en la expresión de proteínas como Vimentina y Slug [49].

Tabla 3. Papel del KLF15 en cáncer colorrectal.

Proceso	Expresión	Cáncer	Papel
Proliferación celular	↓KLF15	Cáncer gástrico	KLF15 inhibe la proliferación mediante el arresto del ciclo celular en fase G1/S y la regulación positiva de p21 y P57. [43]
		Adenocarcinoma de pulmón	Regulación positiva de CDKN1 A/p21 y CDKN2A/p15. [50]
		Cáncer de mama.	Disminución de la proliferación celular y una detención en la fase G0/G1 del ciclo celular. [51]
Apoptosis	↑KLF15	Células de cáncer de pulmón	Disminución de KLF15 aumentó los niveles de caspasa-3, caspasa-7, caspasa-8 y PARP escindidas, lo que indujo la apoptosis. [48]
	↓KLF15	Cáncer de mama triple negativo	Apoptosis inducida por KLF15 y detención del ciclo celular en fase G2/M mediante disminución de ligandos de quimiocinas CCL2 y CCL7. [38]
Transición Epitelial Mesenquimal (TEM)	↓KLF15	Cáncer de tiroides	Subexpresado en cáncer de tiroides y genera un aumento de N-cadherina y disminución de E-cadherina, favoreciendo TEM. [52]
		Cáncer de mama triple negativo	KLF15 exógeno provocó un aumento de E-cadherina y disminución de vimentina. [38]

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

En nuestro laboratorio de Terapia Celular previamente se ha trabajado con nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer empleando células madre mesenquimales (CMM) modificadas genéticamente. En el 2014, Borrego-Terrazas obtuvo CMM a partir de tejido adiposo humano y las modificó genéticamente por transfección empleando plásmidos portadores de los ADNc de TRAIL e IFN β , los cuales también tenían el marcador reportero de proteína verde fluorescente (GFP) [53]. La transfección se verificó por medio del porcentaje de células verde fluorescentes; así mismo, se colectaron los medios condicionados de las CMM transfectadas y se validó la expresión de las proteínas por medio de ELISA.

Posteriormente, en el 2018, González-Villareal diseñó vectores lentivirales para la expresión de las proteínas TRAILc, TRAILS e IFN β , y como reportero el gen de la GFP. Por medio de ellos, modificó CMM murinas de médula ósea para sobreexpresar estas proteínas y evaluar su actividad antitumoral en un modelo *in vivo* de linfoma (tumor sólido murino) [54]. Se validó la eficiencia de transducción por medio de porcentaje de células fluorescentes; y la expresión de los productos proteicos de las CMM transducidas se confirmó por medio de Western Blot, empleando los medios condicionados. Se indujo el desarrollo de un tumor sólido en el gastrocnemio derecho de nueve grupos de ratones hembra BALB/c con la línea L5178Y y se implantaron intratumoralmente los tratamientos de CMM transducidas con TRAILc, TRAILS o IFN β , o sus combinaciones. Siendo el tratamiento combinado de TRAILS e IFN β el más eficaz de los tratamientos para la eliminación de tumores.

De igual manera, en el 2023, Quiroz-Reyes demostró que las CMM son una estrategia prometedora como vehículo para administrar las proteínas antiapoptóticas TRAILS y TRAILc, las cuales pueden inducir la muerte celular y apoptosis en líneas celulares de CCR. Se observó que tanto las CMM naïve como aquellas modificadas para expresar TRAILS y TRAILc fueron capaces de inducir muerte celular y apoptosis en células

tumorales resistentes al TRAIL recombinante. Además, se encontró que el pre-tratamiento con oxaliplatino aumentó la actividad antitumoral de las CMM que expresan TRAILs. El tratamiento con CMM-TRAILs como monoterapia demostró ser eficaz en inducir apoptosis en células de CCR que expresan marcadores de células madre de tumor e incluso en líneas celulares quimiorresistentes [55].

De igual manera, en el 2023, Quiroz-Reyes logró potenciar el efecto apoptótico de TRAIL, entregado mediante CMM, en células de cáncer colorrectal quimioresistentes. Esto se logró realizando un pre-tratamiento con Oxaliplatino en dichas células resistentes, representando una nueva estrategia terapéutica [55].

Esto nos indica que las CMM sobreexpresando la proteína pro-apoptótica TRAILs son capaces de inducir la muerte en células tumorales. No obstante, el efecto puede ser bajo, por lo que es necesario el desarrollo de estrategias que permitan aumentar la susceptibilidad a TRAIL; como la modulación de los factores Krüppel-Like.

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) ocupa el tercer lugar en incidencia y segundo en mortalidad por cáncer a nivel mundial. A pesar de que existe una metodología estandarizada para su tratamiento, se presentan limitaciones principalmente por la alta resistencia a fármacos.

A la fecha, son necesarios múltiples abordajes para obtener una mejor respuesta al tratamiento. TRAIL ha ganado interés debido a su capacidad de eliminar selectivamente células tumorales, sin embargo, su efecto puede ser bajo en ciertas células tumorales.

Con el objetivo de incrementar la susceptibilidad a TRAIL, se ha propuesto la regulación de la expresión de los factores de transcripción krüppel-like (KLFs). Se ha reportado que la modulación de los KLFs es capaz de producir un aumento en la sensibilidad a tratamientos en diferentes tipos de cáncer. En CCR, se ha reportado una subexpresión de KLF15 en comparación con el epitelio normal, que se asocia con la progresión de la enfermedad.

Debido a los altos niveles de resistencia a fármacos es importante la búsqueda de nuevas estrategias que mejoren la susceptibilidad a tratamientos actuales. Por lo que se propone explorar si la sobreexpresión de KLF15, en una línea de cáncer colorrectal sensibilizada con quimioterapia, es capaz de promover la susceptibilidad a la muerte celular por TRAILS en un sistema de cocultivo.

4. HIPÓTESIS

La sobreexpresión del factor de transcripción KLF15 en una línea celular de cáncer colorrectal tratada con quimioterapia es capaz de aumentar la susceptibilidad a TRAILs.

5. OBJETIVOS

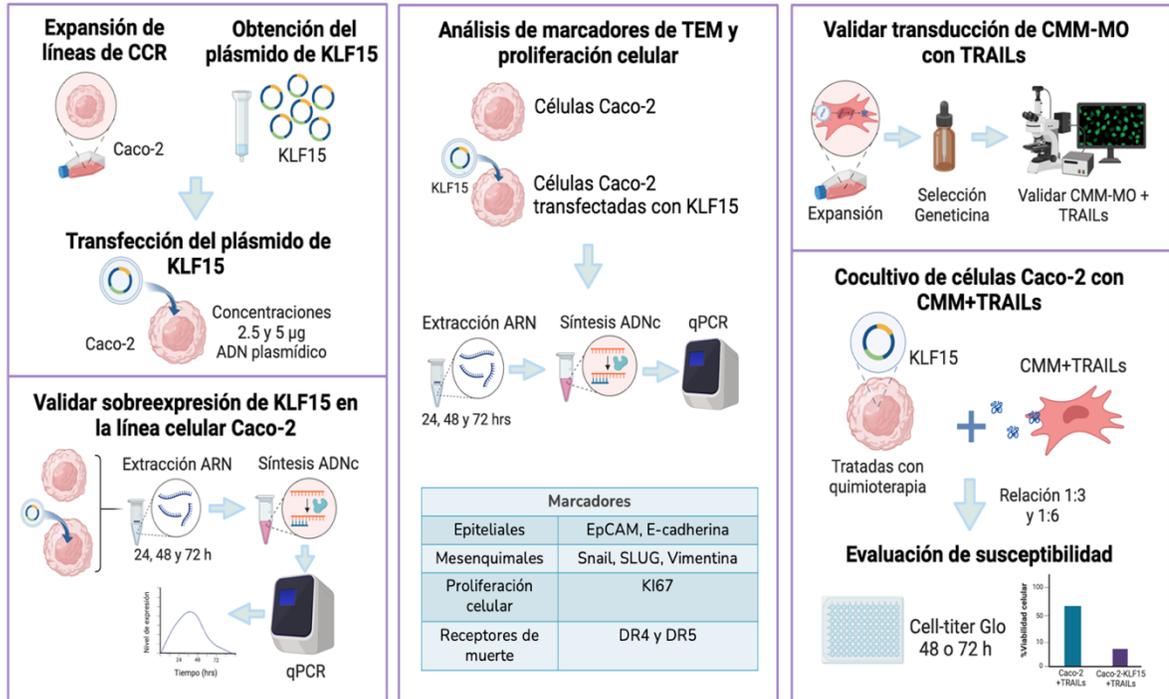
5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la sobreexpresión de KLF15 sobre la susceptibilidad a TRAILs en la línea celular de cáncer colorrectal Caco-2 tratada con quimioterapia.

5.2. Objetivos específicos

1. Establecer y validar la sobreexpresión transcripcional de KLF15 en líneas celulares de cáncer colorrectal, Caco-2.
2. Determinar si la sobreexpresión de KLF15, en la línea celular de cáncer colorrectal Caco-2, regula la expresión de genes implicados en la transición epitelial mesenquimal y proliferación celular.
3. Evaluar el efecto en la susceptibilidad a TRAILs en la línea celular Caco-2, que sobreexpresa KLF15, tratada con quimioterapia.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Fase 1: Expansión de la línea celular CCR moderadamente resistente a TRAIL, Caco-2, y obtención de plásmido de KLF15 mediante purificación. Se realizó la transfección del plásmido empleando dos concentraciones para seleccionar la óptima. Se validó la sobreexpresión de KLF15 mediante extracción de ARN y síntesis de ADNc para analizar la expresión relativa del KLF15 mediante qPCR.

Fase 2: Análisis de genes implicados en la TEM, proliferación celular y recetores de muerte de TRAIL en células no transfectadas y transfectadas con plásmido de KLF15.

Fase 3: Expansión de línea celular de CMM-MO transducidas con transgen de TRAILS que tienen como gen reportero GFP. Posteriormente, se seleccionaron con geneticina y se validó la transducción mediante la señal verde-fluorescente (GFP) bajo el microscopio de epifluorescencia. Se evaluó el efecto en la susceptibilidad a TRAIL sobre líneas celulares de CCR que sobreexpresan KLF15 y los controles, por medio de la medición de muerte evaluada mediante luminiscencia con el kit CellTiter-Glo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Obtención y expansión de CMM-MO y CMM-TRAILS.

Se partió de un stock de CMM-MO que se obtuvieron de ratones BALB/c y fueron previamente caracterizadas (con los marcadores CD90 y CD105, y su capacidad multilínea diferenciándolas a adipocitos y osteocitos) como se describió previamente [56]. Igualmente, se partió de un stock de CMM-MO transducidas con los transgenes TRAILS, que poseen como gen reportero GFP. Todas las construcciones del transgén contenían las secuencias murinas del gen de interés, un casete promotor para el factor de elongación 1-alfa (EF1- α) para permitir una expresión proteica constitutiva elevada, y la secuencia consenso de Kozak (GCC GCC ACC). Dichas células fueron cultivadas en medio DMEM 1X glutamax (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY 14072, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino estéril (SFB) (Gibco), en atmósfera de CO₂ al 5% a 37 °C.

7.2. Validación de transducción de CMM-TRAILS.

Para confirmar la expresión del transgén, las CMM-MO transducidas con TRAILS fueron seleccionadas durante 1 semana empleando 400 μ g de geneticina/mL en el medio de cultivo. Posterior a la semana de selección, se tomó una alícuota de las CMM-MO modificadas y fueron incubadas en portaobjetos recubiertos de Poli-L-Lisina por 12 horas con medio DMEM para permitir la adherencia a la laminilla. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS al 10% y se fijaron las células empleando metanol-acetona (4:1) por 10 minutos a 4 °C; seguido de esto, se lavó nuevamente con PBS al 10%, se añadió una gota (7 μ L) de medio de montaje Vectashield con DAPI (Vecta Mount, Vector laboratories), y se colocó un cubreobjetos sobre la laminilla.

Se validó la transducción observando los núcleos por fluorescencia con DAPI (señal azul) y las células verde-fluorescentes indicativas del transgén de TRAILS. Se tomaron

fotografías digitales de cuatro campos con una cámara acoplada al microscopio de epifluorescencia a 40x.

7.3. Expansión *in vitro* de células Caco-2

Se empleó la siguiente línea celular de CCR: Adenocarcinoma colorrectal humano Caco-2 (ATCC® HTB-37). Esta fue cultivada en botellas de cultivo de 25 cm², empleando medio DMEM 1X 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) en atmósfera de CO₂ al 5% a 37 °C.

7.4. Purificación plásmido de KLF15.

Se partió de un stock de bacterias *E. coli* DH5α calcio-competentes previamente transformadas con ADN plasmídico de KLF15 (Addgene, Trono Lab (EF1a_KLF15 cat. No #120501)); y validadas [57]. Se realizó un subcultivo de bacterias transformadas en 500 mL de medio Luria Bertani (LB) a 37 °C en presencia del antibiótico de resistencia incluido en el plásmido (Ampicilina). Posteriormente, se llevó a cabo la purificación del plásmido de expresión de KLF15 utilizando el kit comercial QIAGEN plasmid maxi kit®.

7.5. Cuantificación, pureza e integridad ADN plasmídico.

El ADN obtenido tras la extracción fue cuantificado mediante la lectura de absorbancia a 260 nm, y se analizó su pureza empleando los coeficientes de absorbancia 260/230 y 280/260; utilizando el instrumento Nanodrop3000® (Thermo Fisher Scientific, Inc.). El análisis de la integridad y la caracterización del ADN plasmídico fueron realizados anteriormente, por medio de una electroforesis en gel de agarosa y cortes con enzimas de restricción [57].

7.6. Transfección de células Caco-2 con el plásmido KLF15.

Se estandarizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante para realizar el ensayo de transfección con Lipofectamina 3000® (Invitrogen®). Brevemente, se parte de la línea celular Caco-2 en cultivo. A continuación, se muestra el procedimiento de transfección a través del tiempo; Día 0: Las células Caco-2 son sembradas en cajas de cultivo celular de 6 pozos a una densidad de 250,000 células por pozo, y cultivadas en medio de cultivo hasta el 70-90% de confluencia. Se obtuvo una confluencia del 80% a las 48 horas. Día 1: Se realiza la dilución de la lipofectamina en un tubo, empleando 7.5 µL de Lipofectamina 3000® con 125 µL de medio OPTI-MEM® y se mezcla en vortex durante 2-3 segundos; en otro tubo, se prepara la dilución del ADN plasmídico (2.5 y 5.0 µg) con 125 µL de OPTIMEM® + 2µL de P300 reagent® por cada 1 µg de ADN plasmídico (ADNp). El contenido de ambos tubos fue mezclado, y posteriormente incubado por 10-15 minutos a temperatura ambiente. Se retira el medio de crecimiento de cada pozo, se realiza un lavado con OPTIMEM, y se añaden 250 µL de los complejos lípidos (Lipofectamina + ADNp + P300) en cada pozo. Las células se incuban en condiciones estándar de crecimiento y transcurridas 4 horas de la transfección se añade el volumen restante de medio de crecimiento a cada pozo (750 µL). Se incluyeron 3 grupos experimentales: grupo experimental 1, control negativo de células Caco-2 con protocolo de transfección sin vector plasmídico; grupo experimental 2, Caco-2 transfectadas con 2.5 µg ADNp de KLF15 y grupo experimental 3, Caco-2 transfectadas con 5.0 µg ADNp de KLF15. Se seleccionó la concentración con la que se obtuviera una mayor eficiencia de transfección para ensayos posteriores.

7.7. Transfección de KLF-15 en células Caco-2 y viabilidad celular.

Con el fin de elegir la concentración de plásmido a la cual se realizarían los ensayos posteriores, se realizaron extracciones de ARN total utilizando el kit comercial QIAGEN RNeasy® Mini Kit a diferentes tiempos: posterior a la transfección a las 24, 48 y 72 horas de cultivo en adherencia y empleando como control ARN de células sometidas al

protocolo de transfección sin vector plasmídico. Se realizarán controles adicionales para validar que la expresión de KLF15 no afecte la viabilidad celular en las líneas tumorales a las 24, 48 y 72 h. Sembrando 2,000 células/pozo en placas de 96 pozos mediante la medición del ATP con el protocolo de Cell-titer Glo (PROMEGA).

7.8. Síntesis de ADNc.

La síntesis de la cadena sencilla de ADN complementario se realizó utilizando el kit comercial SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). Empleando hasta 2.5 µg de RNA total extraído con A260/280 de 1.8-2.0 como templado. La reacción se llevó a cabo en frío mezclando 4 µL de 5X VILO™ Reaction Mix, 2 µL 10X SuperScript™ Enzyme Mix, RNA y agua libre de nucleasas para una reacción de 20 µL. La reacción se mezcla gentilmente y se incuba en un termociclador con el siguiente programa de temperaturas: 25 °C por 10 minutos, 42 °C por 60 minutos, 85 °C por 5 minutos.

7.9. qPCR.

Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando el kit comercial FAST SYBR® Green Master Mix empleando el instrumento 7500 Fast de Applied Biosystems. Para una reacción de 10 µL en tubos de 0.6 mL se añaden 5 µL de Fast SYBR® Green Master Mix (2×), 1 µL de FWD primer 200 nM, 1 µL de REV primer 200 nM, 100 ng de cDNA, y H₂O libre de nucleasas. A continuación, se indica el programa de temperaturas: 95 °C por 20 segundos, 95 °C por 3 segundos, 60 °C por 30 segundos por 40 ciclos. Se analizó la expresión relativa de KLF15, E-cadherina, Vimentina, Snail, SLUG, EpCAM, Ki67, DR4 y DR5 con el empleo del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Ecuación 1) y utilizando los niveles del gen endógeno gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para normalizar la expresión de los genes diana. La secuencia de los primers empleados se encuentra descrita en la Tabla 4.

Ecuación 1. Cálculo de expresión relativa mediante el método de 2- $\Delta\Delta Ct$

$$\Delta Ct = Ct (\text{Gen interés}) - Ct (\text{Endógeno})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Muestra}) - \Delta Ct (\text{Media del Control})$$

$$\text{Fold change} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos.

Gen	Secuencia Primer	REF.
KLF15	Forward: GTGAGAAGCCCTTCGCCTGCA	[58]
	Reverse: ACAGGACACTGGTACGGCTTCA	
EpCAM	Forward: GCTGGAATTGTTGTGCTGGTTA	[59]
	Reverse: AGATGTCTTCGTCCCACGC	
E-cadherina	Forward: ATTTTCCCTCGACACCCGAT	[60]
	Reverse: TCCCAGGCGTAGACCAAGA	
Snail (SNAIL)	Forward: CTCTCTGAGGCCAAGGATCTC	F: [61]
	Reverse: TTCGGATGTGCATCTTGAGGG	
Slug	Forward: TGCATATTCGGACCCACACATTA	[62]
	Reverse: AAAAGGCTTCTCCCCCGTGTG	
Vimentina	Forward: TGCCGTTGAAGCTGCTAACTA	[63]
	Reverse: CCAGAGGGAGTGAATCCAGATTA	
Ki67	Forward: AGGTTCCCTAAGAGAGGAGGGA	F: [64]
	Reverse: GCACCAAGTTTTACTACATCTGCC	
DR4	Forward: CTGACCCCACTGAGACTCTGA	N/A
	Reverse: TGCTGTACCAGCTCTGACCAC	
DR5	Forward: GTGCCCTTTGACTCCTGGGAG	R: [65]
	Reverse: GCACCAAGTCTGCAAAGTCA	
GAPDH	Forward: TCACCACCATGGAGAAGGCTG	[66]
	Reverse: GCATGGACTGTGGTCATGAGT	

7.10. Ensayo de susceptibilidad a TRAIL posterior a la expresión de KLF15 en las células tumorales.

Este procedimiento se llevó a cabo a partir de la línea Caco-2 transfectadas (24h posterior a la transfección). Para ello, fueron inoculadas 2×10^3 células tumorales/pozo tanto transfectadas como no transfectadas en una placa de 96 pozos con medio DMEM suplementado con 10 % de SFB, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B. Posterior a la siembra, las células tumorales fueron tratadas con CMM-MO TRAILs (inicialmente en relación 1:1 que finalmente fue ajustada a relación 1:3 y 1:6) y la concentración máxima en plasma de 5-Fluorouracilo y de Irinotecán, dejándose incubar por 24 horas en cocultivo a 37°C, 5% CO₂. La muerte celular fue evaluada mediante luminiscencia con el kit CellTiter-Glo (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadió un volumen de reactivo CellTiter-Glo igual al medio de cultivo en la placa (100 μL) y se mezcló por dos minutos para lisar las células. Posteriormente, se incubó la placa por 10 minutos a temperatura ambiente para estabilizar la señal luminiscente y leer en lector de placas Cytation 3 (BIOTEK). El ensayo se llevó a cabo 3 veces por triplicado para cada tratamiento. Se incluyeron controles normalizadores del método: CMM-TRAILs, Caco-2 no transfectadas, Caco-2 transfectadas; Controles negativos: Caco-2 no transfectadas+CMM-TRAILs, Caco-2 no transfectadas+Quimioterapia+CMM-TRAILs, Caco-2 transfectada con KLF15+CMM-TRAILs; y el grupo del tratamiento siendo: Caco-2 transfectada con KLF15+Quimioterapia+CMM-TRAILs. Se determinará la susceptibilidad a TRAIL mediante el porcentaje de viabilidad celular con la siguiente fórmula:

Ecuación 2. Fórmula para la determinación de la viabilidad celular.

$$\% \textit{Viabilidad celular} = 1 - ((\text{Luminiscencia promedio tratamiento} - \text{luminiscencia promedio del efector}) / (\text{Luminiscencia promedio control})) \times 100$$

8. RESULTADOS

8.1. Extracción y purificación del plásmido KLF15.

Se realizó la extracción y purificación para obtener el material genético plasmídico a emplear en los ensayos posteriores de transfección. Se partió del cultivo de las bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con el plásmido EF1a_KLF15 durante 12 horas en cultivo a 37 °C en agitación y en presencia del antibiótico de resistencia ampicilina. Se realizó subcultivo en un mayor volumen con el objetivo de obtener una mayor cantidad de biomasa. Posteriormente, se procedió a realizar la extracción del plásmido empleando el kit comercial QIAGEN plasmid maxi kit®, del cual se obtuvieron 1,447 ng/ μ L y en cuanto al índice de pureza evaluado mediante la relación 260/280 y 260/230 se obtuvieron índices de 1.92 y 2.29 respectivamente, tal como se muestra en la Figura 5. Este proceso se realizó por triplicado para contar con la cantidad suficiente de plásmido de KLF15 purificado para realizar los ensayos posteriores.

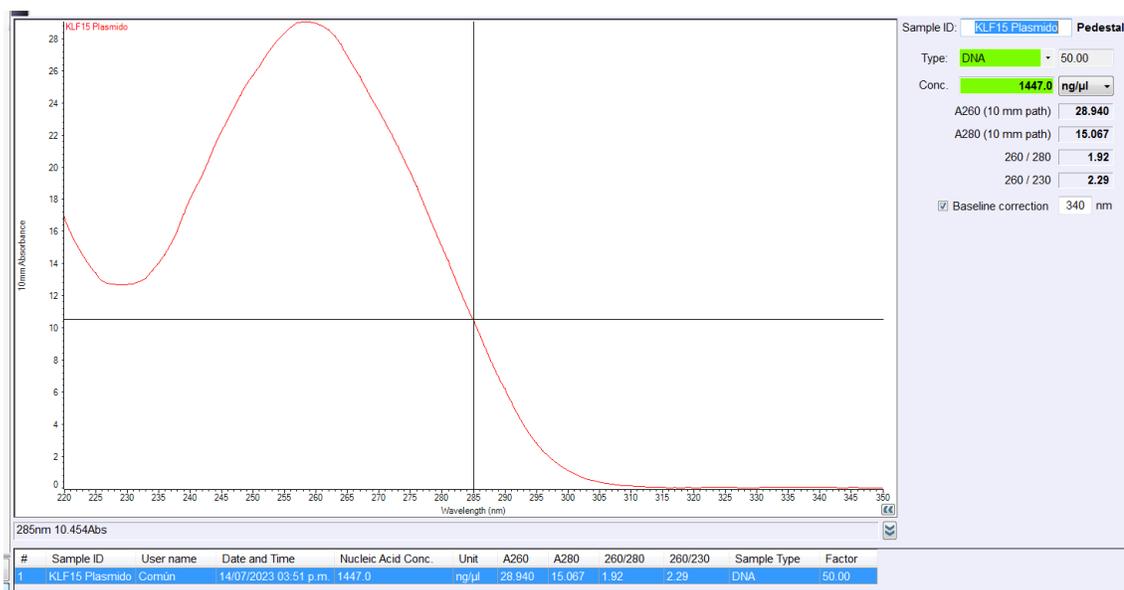


Figura 5. Resultado de la purificación del vector de expresión de KLF15. Análisis por espectrofotometría con Nanodrop 3000.

Se realizaron las reacciones de amplificación mediante qPCR con primers específicos para KLF15 con el fin de validar la identidad del plásmido que contiene la secuencia del gen KLF15 humano. En la Figura 6 podemos observar que los primers diseñados fueron capaces de amplificar KLF15 utilizando 100 ng de DNA plásmidico y no se presentó problemas de contaminación en los reactivos ya que el control negativo no amplificó.

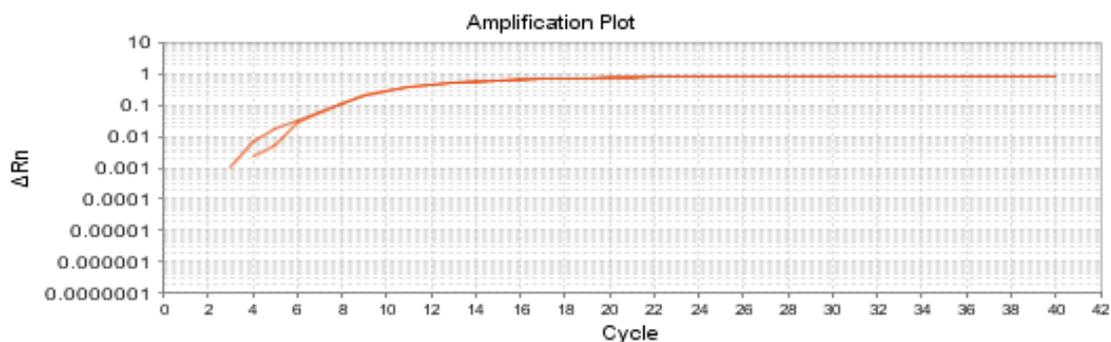


Figura 6. Resultados de validación del plásmido KLF15 mediante qPCR.

8.2. Establecimiento y validación de la sobreexpresión transcripcional de KLF15 en las células Caco-2.

Se muestran imágenes representativas de las células Caco-2 posterior a la transfección con KLF15, a las 0, 24 y 48 horas de transfección, tanto controles como células transfectadas con 2.5 y 5 μ g de ADN plasmídico (Figura 7), cabe mencionar que para el control únicamente se llevó a cabo el protocolo de lipofección sin el ADN plasmídico. En dicha figura se muestra una aparente reducción en la cantidad de células adheridas al ser transfectadas con el plásmido de KLF15, tanto con 2.5 como 5 μ g de ADNp, posiblemente indicando cierto porcentaje de muerte celular debido a la presencia del KLF15 en la célula tumoral. De igual manera, se puede apreciar una mayor cantidad de restos celulares. Sin embargo, no se observan alteraciones morfológicas evidentes por el KLF15 en los tiempos analizados. Cabe resaltar que la morfología de esta línea celular no es homogénea, ya que

presenta en su mayoría una morfología cuboidal y de tipo epitelial, junto con células de apariencia gigante. Por este motivo, puede resultar complicada la identificación de cambios morfológicos.

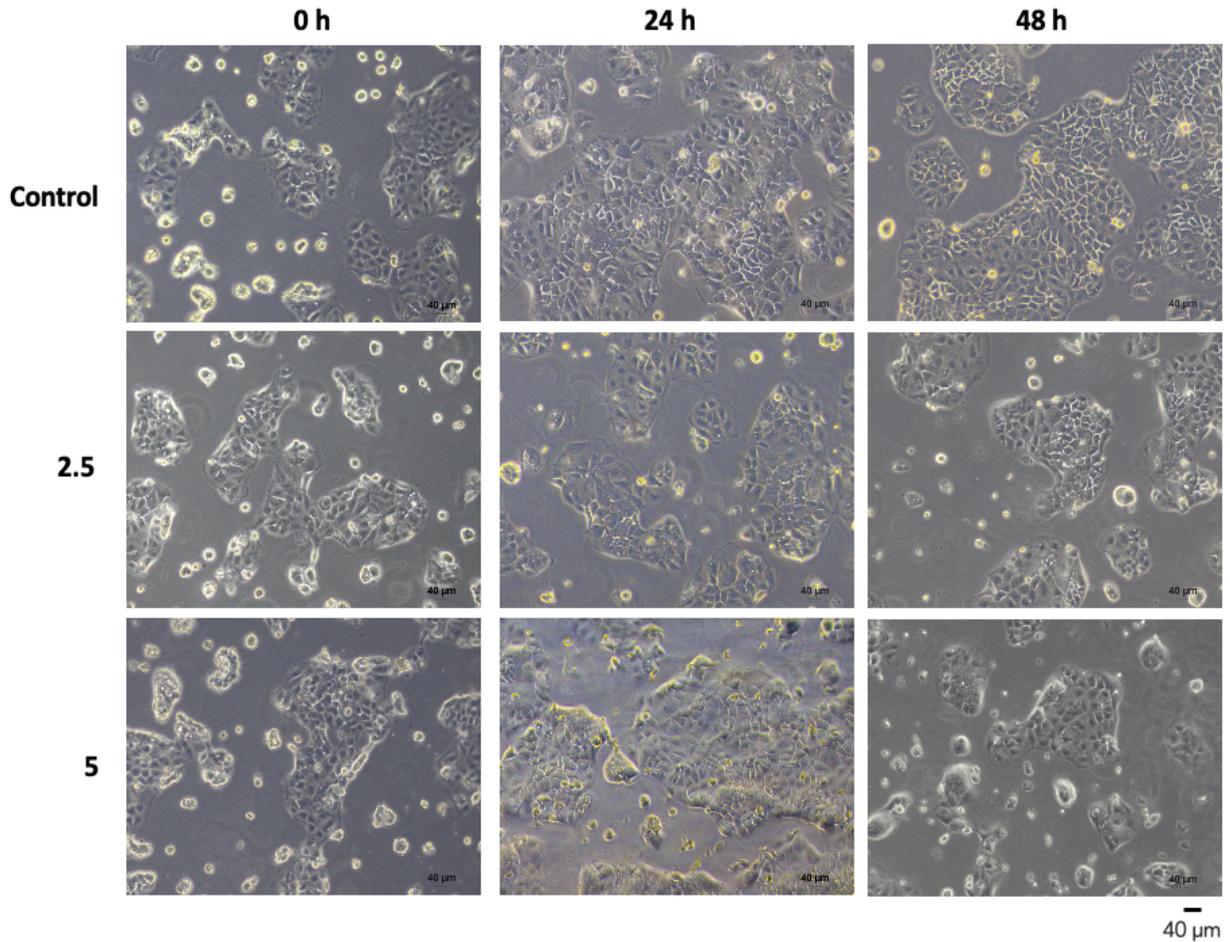


Figura 7. Células Caco-2 transfectadas con KLF15. Se muestran imágenes representativas de las células Caco-2 control y Caco-2 sobreexpresando KLF15 a las 0, 24 y 48 horas. Objetivo 10x.

Se procedió a realizar el análisis de expresión relativa de KLF15 sobre las células Caco-2 transfectadas y no transfectadas, no obstante, se contaba con dos pares de primers

específicos, mostrados en la Tabla 5, diseñados para KLF15 previamente validados mediante análisis *in silico* en la plataforma de Oligo7 y BLAST. Dichos primers fueron analizados para seleccionar el más adecuado para ensayos posteriores.

Tabla 5. Secuencias de primers para amplificación de KLF15.

	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
KLF15 Par 1	GTGAGAAGCCCTTCGCCTGCA	ACAGGACACTGGTACGGCTTCA
KLF15 Par 2	GGTGGTACCCTCCTCCAACCTT	GGTGTACATCTTGCTGCAGCC
GAPDH	TCACCACCATGGAGAAGGCTG	GCATGGACTGTGGTCATGAGT

Se realizó la amplificación de KLF15 empleando ambos pares de primers, por medio de qPCR con 100 ng de ADN complementario de las células Caco-2 transfectadas con 5 µg de ADN plasmídico de KLF15. Como se observa en la Figura 8A, ambos primers permiten la amplificación de KLF15 en ciclos similares. No obstante, al analizar el resultado obtenido en la curva melt, el par 2 de primers presenta dos picos, mientras que el par 1 muestra un único pico en la temperatura de desnaturalización esperada para el fragmento amplificado. La curva melt proporciona una manera de verificar que la fluorescencia detectada en la corrida proviene de un único amplicón y que, por lo tanto, la amplificación es específica. Además, permite identificar la formación de dímeros de primers. Dado a que el par 1 mostraba un solo pico, sugiriendo una amplificación específica, se seleccionó este par para la realización de ensayos posteriores.

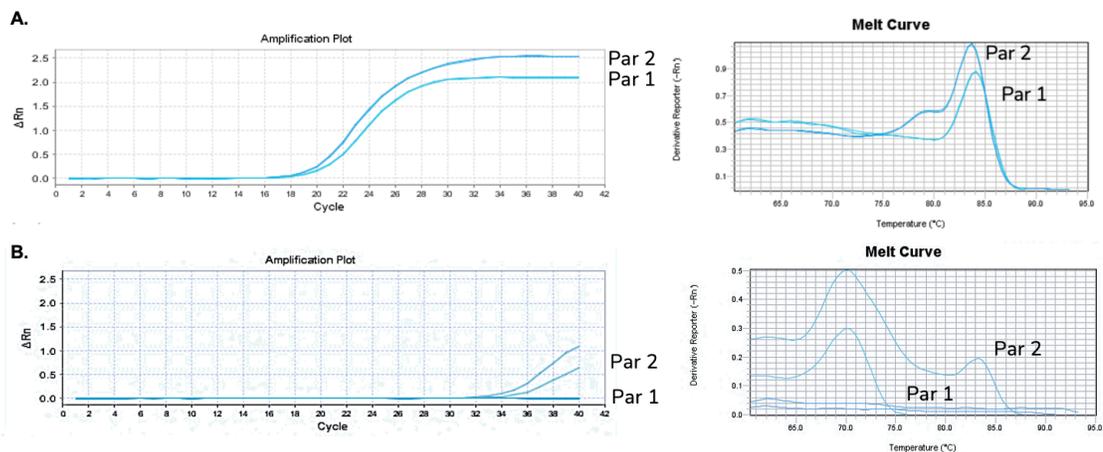


Figura 8. Curvas de amplificación y curva melt. A) Amplificación de KLF15 en células Caco-2 transfectadas con KLF15 empleando 2 pares de primers y curva melt. B) Amplificación del control negativo y curva melt con ambos pares de primers.

Tabla 6. Concentraciones empleadas para matriz de primers.

		Forward Primer		
		100 nM	150 nM	200 nM
Reverse Primer	100 nM	100/100	100/150	100/200
	150 nM	150/100	150/150	150/200
	200 nM	200/100	200/150	200/200

A pesar de que el par 1 de primers mostró una amplificación para KLF15, se observó en la curva melt del control negativo, al cual no se le añadió ADNc (Figura 8B), que el par 1 mostraba un pico en la curva melt indicativo de formación de dímeros de primers. Por esta razón, se decidió realizar una matriz de primers con diferentes concentraciones para disminuir la formación de dímeros (Tabla 6).

Una vez que se realizó la detección de KLF15 mediante qPCR con las concentraciones de primer forward y reverse correspondientes a la matriz de primers, se obtuvieron los resultados de amplificación mostrados en la Figura 9. A partir de este análisis se seleccionó la concentración de 100 nM para las siguientes determinaciones, tanto para el primer Forward como para el Reverse, proporcionando amplificación de un único producto sin formación de dímeros de primers.

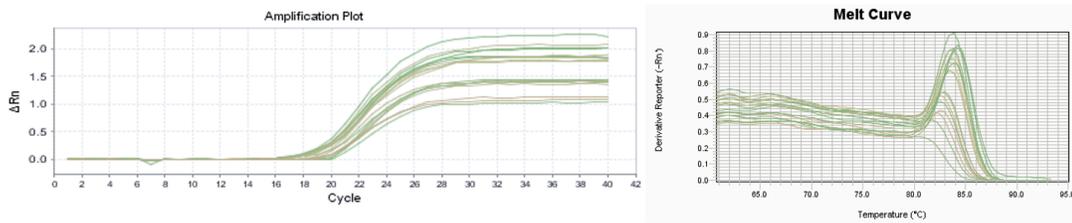


Figura 9. Curvas de amplificación de KLF15 de matriz de primers y curvas melt.

Una vez determinadas las concentraciones óptimas de los primers de KLF15 para la qPCR se procedió a validar la sobreexpresión de dicho factor de transcripción en las células transfectadas. Se realizó el análisis de expresión empleando 100 ng de ADN complementario de las células Caco-2 transfectadas con ambas concentraciones y un control a las 48 horas. En la Figura 10 se muestra una imagen representativa de la amplificación de KLF15 en células transfectadas y no transfectadas. Como se observa, las células que han sido transfectadas muestran una amplificación del KLF15 en ciclos más tempranos que las células Caco-2 no transfectadas, mientras el gen endógeno GAPDH permanece constante, esto nos indica un aumento en la expresión del KLF15 a nivel transcripcional, y por lo tanto, una transfección exitosa.

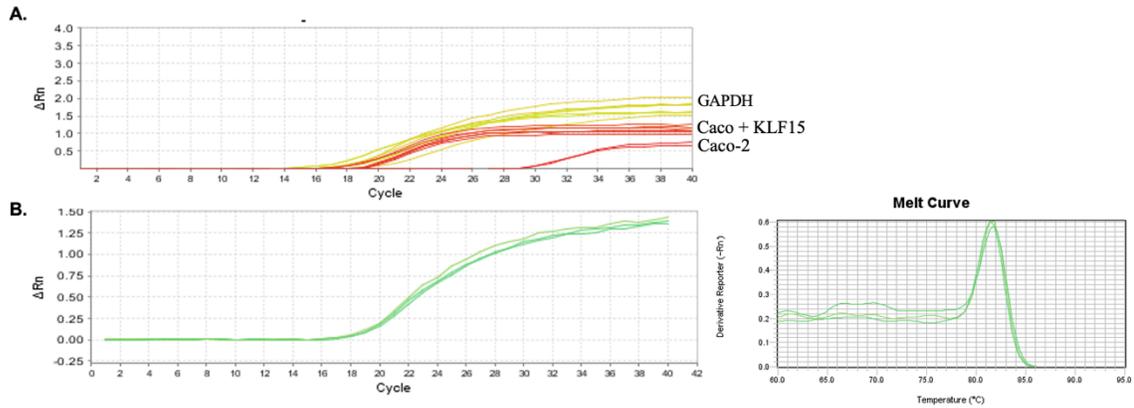


Figura 10. Representación de amplificación de KLF15. A) Amplificación de KLF15 y GAPDH en células transfectadas y no transfectadas. B) Amplificación de células transfectadas con 2.5 y 5 μ g de ADN plasmídico.

La Figura 10 muestra la amplificación de KLF15 en células transfectadas con 2.5 y 5 μ g de ADNp, donde no se observa diferencia en la expresión del KLF15, indicando que no es dependiente de la concentración transfectada; sin embargo, se seleccionó la concentración de 5 μ g de ADNp para ensayos posteriores debido a que en el momento de la selección de la concentración no contábamos con este análisis y esperábamos contar con un mayor efecto biológico en los ensayos de citotoxicidad al emplear una mayor concentración de este factor.

Una vez establecidos los primers, sus concentraciones y la concentración de plásmido para las transfecciones se realizó el análisis de expresión relativa de KLF15 empleando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Inicialmente se planteó determinar su expresión hasta las 72 horas debido a que se realiza mediante una transfección transitoria, no obstante, observamos altos niveles de expresión aún a las 72 horas por lo que decidimos extender los tiempos de análisis a los 4 y 7 días posteriores a la transfección (Figura 11).

En la Figura 11A se muestran los resultados de los niveles de expresión relativa de KLF15 en las células transfectadas empleando como endógeno el GAPDH. Se obtuvieron niveles de expresión elevados desde el primer día de transfección hasta el cuarto día, los cuales

mostraron un cambio estadísticamente significativo respecto al nivel basal de expresión, siendo hasta 3,500 veces mayor su expresión. Al séptimo día no se obtuvo una sobreexpresión estadísticamente significativa, sin embargo, los niveles de expresión siguen considerándose relativamente altos, siendo superiores 800 veces del nivel basal.

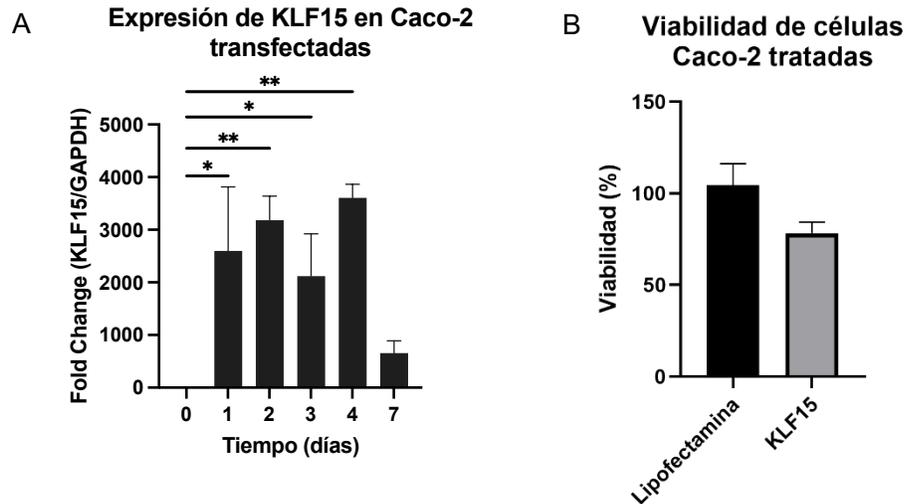


Figura 11. Niveles de expresión relativa de KLF15 en las células Caco-2 transfectadas y viabilidad a las 48 horas. A) Análisis de los niveles de expresión de KLF15 en células Caco-2 transfectadas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (Prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn). B) Viabilidad de células Caco-2 posterior al tratamiento con lipofectamina y transfección con KLF15.

Posteriormente, se analizó si las células transfectadas con KLF15 presentaban una reducción en su viabilidad. Dicho resultado se muestra en la Figura 11B, en la cual se demuestra que el protocolo de transfección con lipofectamina por si solo no posee un efecto en la viabilidad celular respecto a células no transfectadas. Al transfectar el plásmido de KLF15 en las células Caco-2 se obtiene una disminución cercana al 20% de la viabilidad celular, no obstante, esta no es estadísticamente significativa.

8.3. Efecto de la sobreexpresión de KLF15 sobre genes implicados en la transición epitelial-mesenquimal y proliferación celular.

Una vez establecidos los parámetros óptimos para inducir la sobreexpresión de KLF15 sobre las células Caco-2, se procedió a transfectarlas y evaluar el efecto que dicha modulación generaba sobre genes involucrados en la transición epitelial-mesenquimal, proliferación celular y se decidió incluir el análisis de la expresión de los receptores de muerte de TRAIL (DR4 y DR5). Para evaluar la TEM se seleccionaron como marcadores epiteliales EpCAM y E-cadherina, y como marcadores del fenotipo mesenquimal a Snail, Slug y Vimentina. Para la evaluación de la proliferación se incluyó la expresión de Ki67.

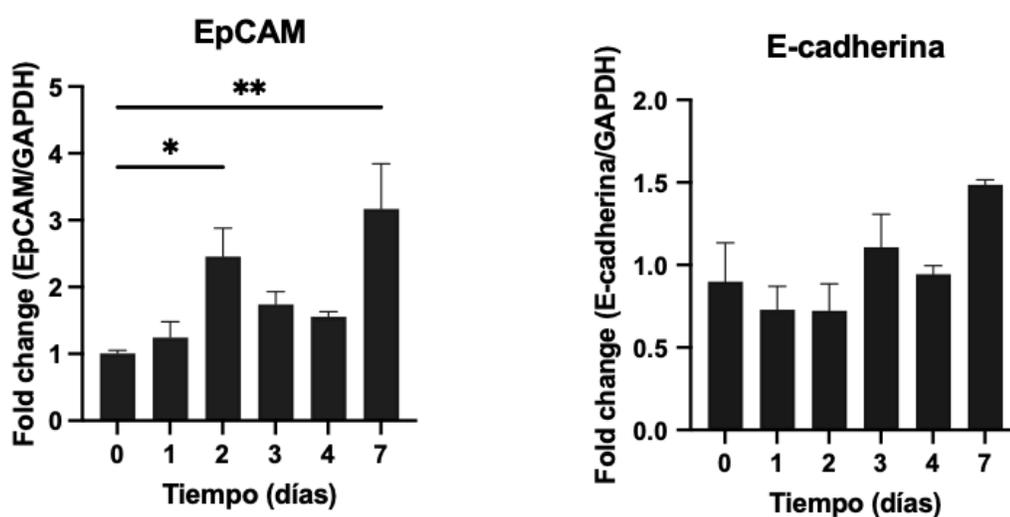


Figura 12. Niveles de expresión relativa de marcadores epiteliales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn).

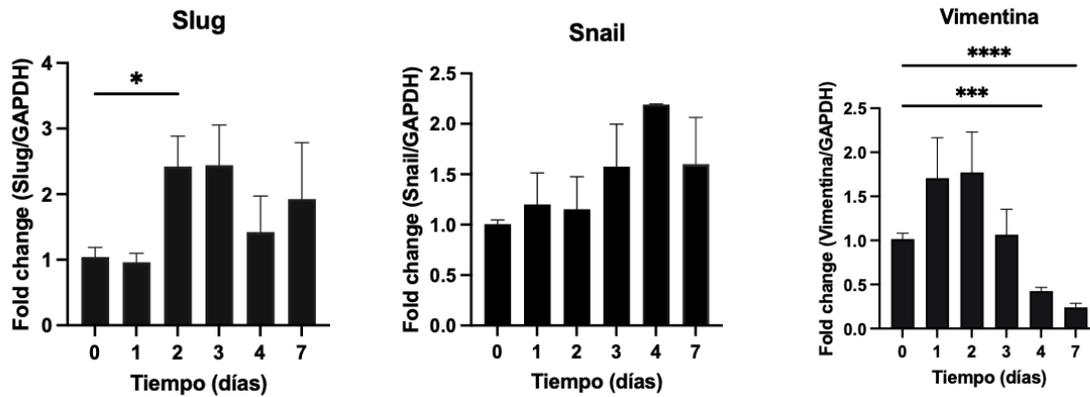


Figura 13. Niveles de expresión relativa de marcadores mesenquimales. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$. (Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn).

Como se muestra en la Figura 12, el KLF15 fue capaz de regular la expresión de uno de los marcadores epiteliales, EpCAM, mostrando una sobreexpresión estadísticamente significativa al segundo día de transfección con el KLF15 y al séptimo día; siendo casi 3 veces mayor el nivel de expresión en comparación con el nivel basal. Por otro lado, la expresión de E-cadherina no mostró cambios significativos, aunque aparentemente se muestra un ligero aumento al séptimo día de transfección.

En cuanto a los marcadores de tipo mesenquimal mostrados en la Figura 13, Slug y Vimentina mostraron diferencia en su expresión al encontrarse sobreexpresado el KLF15. El factor de transcripción Slug presentó un aumento en su expresión al segundo día, mayor al doble de los niveles de expresión basal, sin embargo, no se mantuvo dicha sobreexpresión en tiempos prolongados. El factor de transcripción Snail no presenta cambios estadísticamente significativos en su expresión a los tiempos analizados.

El análisis de la expresión relativa de Vimentina indica una disminución estadísticamente significativa a partir del cuarto día analizado, así como también al séptimo día analizado.

Por lo cual, el KLF15 podría estar teniendo efectos sobre este gen a tiempos prolongados, reduciendo más de la mitad de la expresión en comparación con los niveles basales.

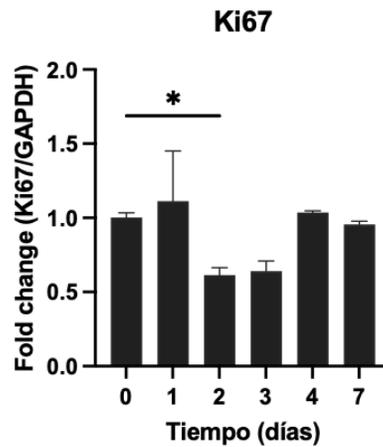


Figura 14. Niveles de expresión relativa del marcador de proliferación Ki67. * $p < 0.05$. (Prueba ANOVA de Welch).

Se incluyó un marcador de proliferación (Figura 14), Ki67, con el fin de determinar si el KLF15 es capaz de regular este proceso siendo útil como terapia contra el cáncer, sin embargo, únicamente se obtuvo una disminución significativa en la expresión del Ki67 al segundo día de transfección, que no fue conservada a tiempos más prolongados.

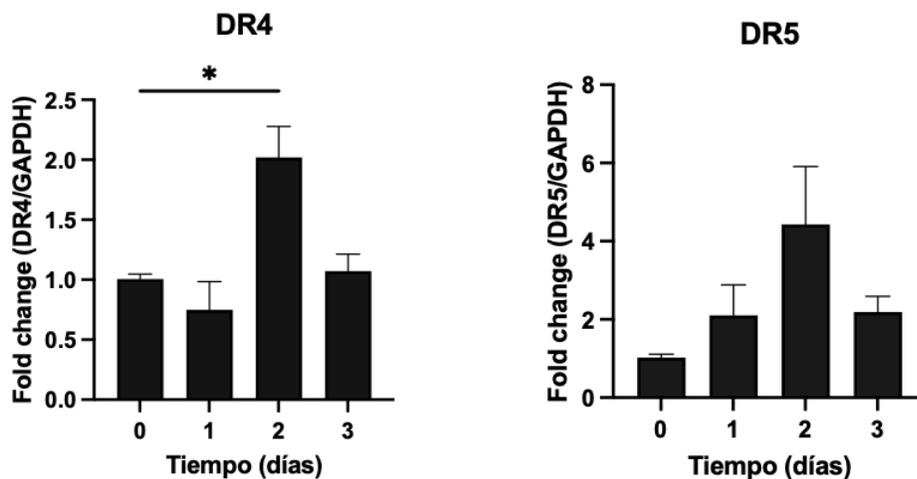
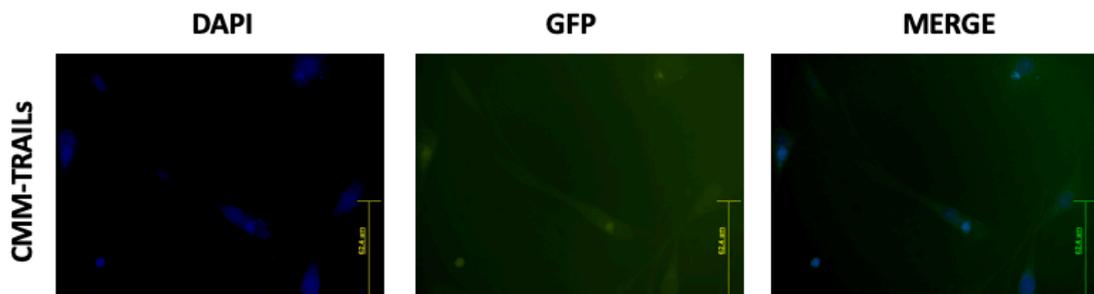


Figura 15. Niveles de expresión de los receptores de muerte de TRAIL, DR4 y DR5. * $p < 0.05$. (ANOVA de una vía con comparación múltiple de Tukey, ANOVA de una vía con comparación múltiple de Dunnett).

Se determinó la expresión relativa de los receptores de muerte para TRAIL, DR4 y DR5, los cuales son los únicos capaces de desencadenar la apoptosis (Figura 15). El receptor DR4 presenta una regulación significativa al alza a los 2 días posteriores a la transfección con KLF15, lo que podría indicar una mayor susceptibilidad a TRAIL. En cambio, el receptor DR5 no muestra cambios estadísticamente significativos, pero aparentemente se observa una tendencia en aumento con pico máximo de expresión al segundo día de sobreexpresión.

8.4. Validación de la transducción de CMM-MO con transgén de TRAILS.

Se evaluó la expresión del transgen de TRAILS, que tiene como gen reportero GFP en CMM-MO previamente modificadas genéticamente, mediante transducción empleando vectores lentivirales. Posterior al periodo de selección de células transducidas durante una semana con geneticina, se validó la eficiencia de la transducción por medio de microscopía de epifluorescencia mediante la presencia del gen reportero GFP observado en el citoplasma de las células (Figura 16).



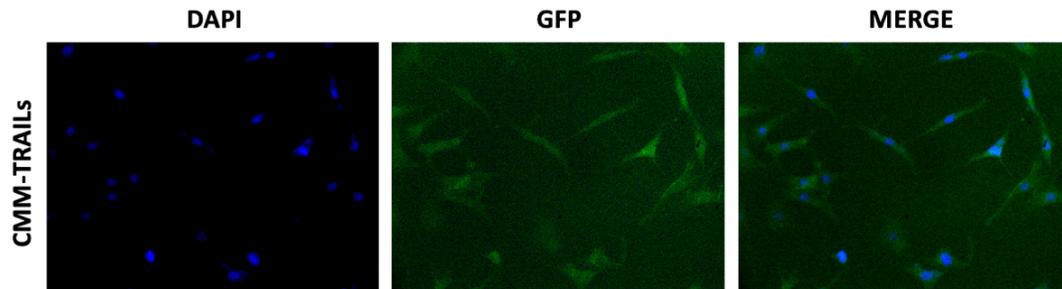


Figura 16. CMM sobreexpresando la proteína GFP. Se validó la transducción de las CMM-MO con el transgén de TRAILS mediante la expresión del marcador fluorescente GFP. Gen reportero GFP en verde y núcleo celular teñido con DAPI. CMM: células madre mesenquimales; TRAILS: TRAIL soluble. DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol; GFP: Proteína verde fluorescente.

8.5. Evaluación de la viabilidad celular de CMM-TRAILS tratadas con quimioterapia.

Considerando el diseño experimental seleccionado para los ensayos, en los cuales se añadirían las células en cocultivo junto con las concentraciones máximas en plasma de los agentes de quimioterapia seleccionados por 24 horas, se procedió a evaluar la viabilidad de las CMM que sobreexpresan TRAILS sometidas al tratamiento con quimioterapia para determinar si se mantienen viables para tener un efecto biológico entregando la proteína de interés.

Inicialmente, se había planteado el cocultivo de células Caco-2 y CMM-TRAILS en relación 1:1, es decir, emplear 2,000 células de cada una. Sin embargo, como se observa en la Figura 17, al analizar la viabilidad de las células en esta relación sometidas a quimioterapia se presenta una reducción considerable, permaneciendo viables menos del 50% de las células. En consecuencia, se decidió aumentar la relación de células a 1:3 y 1:6 (6,000 y 12,000 células respectivamente) esperando obtener un mayor porcentaje de células viables.

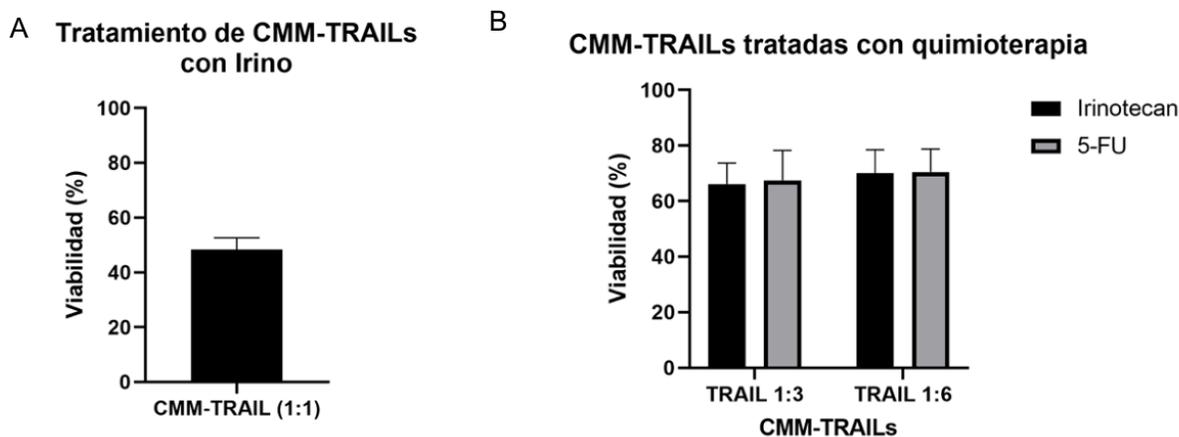


Figura 17. Viabilidad celular de CMM-TRAILS sometidas a quimioterapia. A) Porcentaje de viabilidad, respecto al control, de 2,000 células de CMM-TRAIL tratadas con Irino (n=1). B) Viabilidad de CMM-TRAILS en relación 1:3 y 1:6 (n=3). 1:3= 6,000 CMM-TRAILS. 1:6= 12,000 CMM-TRAILS.

Al analizar la viabilidad de las células en relación 1:3 y 1:6 tratadas tanto con la concentración máxima en plasma de Irinotecán como de 5-FU (1.97 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente), resultaron porcentajes de viabilidad mayores al 60% siendo similar para ambos grupos.

8.6. Evaluación del efecto de los tratamientos en las células Caco-2 que sobreexpresan KLF15.

Se evaluó el efecto de los tratamientos empleados en células no transfectadas y transfectadas con KLF15 por sí solas. Se evaluó el efecto citotóxico mediante la lectura de luminiscencia que es proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra, que a su vez es directamente proporcional al número de células viables. El reactivo Celltiter-Glo produce la lisis de las células, y el ATP liberado permite la reacción con la luciferasa generando la señal luminiscente.

Tratamientos sobre células Caco-2

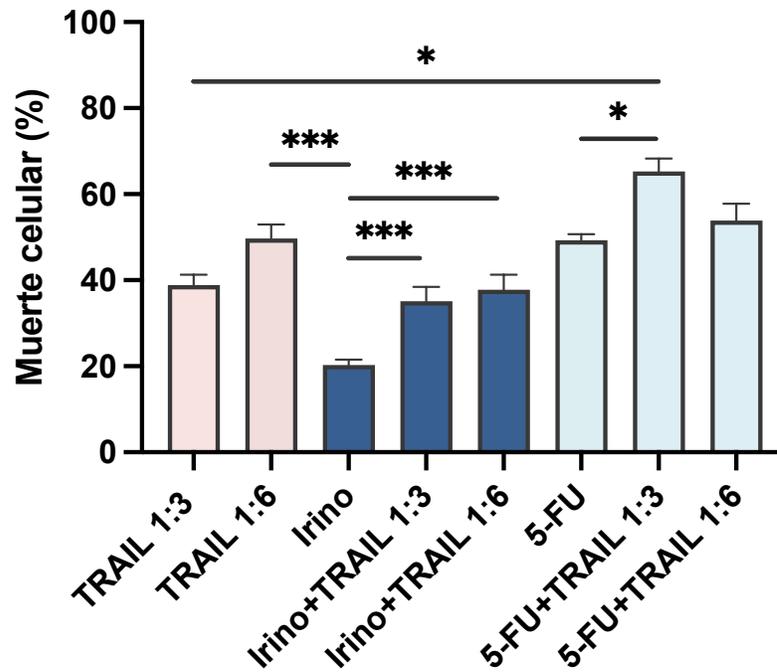


Figura 18. Análisis del porcentaje de muerte celular producido por tratamientos en células Caco-2. Evaluación del porcentaje de muerte celular sobre células Caco-2 sometidas a cocultivo con TRAIL, Irino y 5-FU. Lectura a las 48 horas de transfección. Irino: Irinotecán; 5-FU: 5-Fluorouracilo; 1:3= 6,000 CMM-TRAILs. 1:6= 12,000 CMM-TRAILs. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn).

En la Figura 18 se muestra el efecto que tuvieron los tratamientos sobre las células Caco-2, empleando el sistema de entrega de TRAILs en relación 1:3 y 1:6, los dos agentes de quimioterapia, y los agentes de quimioterapia en combinación con TRAILs. Estos resultados muestran cuales son los tratamientos más efectivos sobre la línea celular Caco-

2, siendo los que produjeron un mayor porcentaje de muerte celular el tratamiento con CMM-TRAILs en relación 1:6 y la combinación de 5-FU con TRAIL en relación 1:3 ($p > 0.05$); produciendo un 49.6% y 65% ± 12 de muerte, respectivamente.

Asimismo, se indican los tratamientos con Irinotecán de color azul oscuro. Se obtuvo resistencia a Irinotecán en esta línea celular produciendo un bajo porcentaje de muerte celular, dicho porcentaje presentó un aumento estadísticamente significativo al ser administrado Irinotecán en conjunto con ambas relaciones de TRAIL; cabe mencionar que el efecto fue similar al obtenido únicamente por la administración de dichas células.

Por último, en cuanto a los tratamientos que incluyeron 5-FU, mostrados de color azul claro, se destaca el porcentaje de muerte celular por encima de un 60% producido por la combinación de 5-FU con TRAIL 1:3. Este efecto resultó incluso superior a lo obtenido con el 5-FU por sí solo o por las células TRAIL 1:3.

Tratamientos sobre células Caco+KLF15

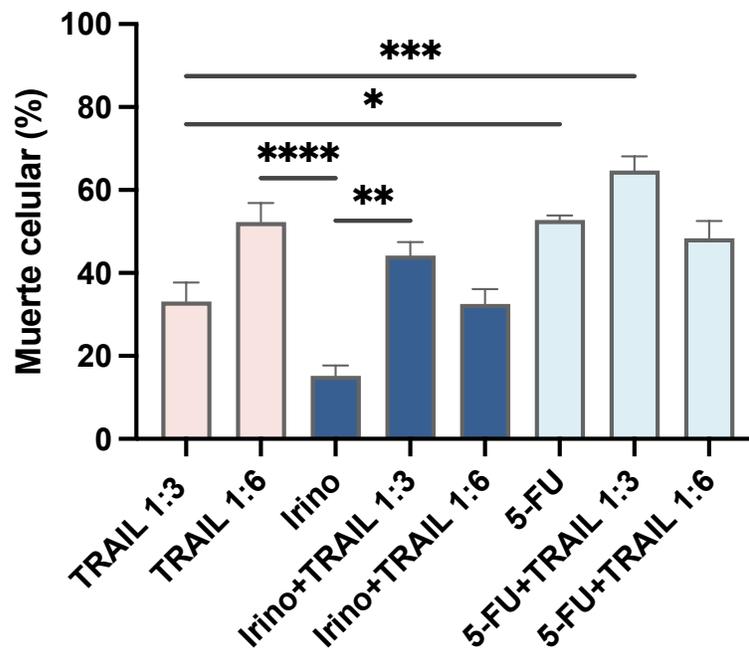


Figura 19. Porcentaje de muerte celular producido por tratamientos en células Caco-2 transfectadas con KLF15. Lectura a las 48 horas de transfección. Irino: Irinotecán; 5-FU: 5-Fluorouracilo; 1:3= 6,000 CMM-TRAILs. 1:6= 12,000 CMM-TRAILs. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn).

El efecto producido por los tratamientos investigados sobre las células Caco-2 transfectadas con KLF15 se muestra en la Figura 19. Similar a lo obtenido en las células sin transfectar, los tratamientos más efectivos fueron TRAIL en relación 1:6 y la combinación de 5-FU+TRAIL 1:3 agregándose únicamente el 5-FU por sí solo que genera cerca del 60% de muerte celular sobre estas células.

Las células que sobreexpresan KLF15, al igual que Caco-2, demostraron resistencia al tratamiento con Irinotecán; incluso pareciera mostrar mayor resistencia al encontrarse sobreexpresado el KLF15. No obstante, se supera esta resistencia al implementarse el cotratamiento con TRAIL únicamente en la relación 1:3, teniendo un efecto mayor que TRAIL 1:3 por sí solo pero no es estadísticamente significativo.

Al igual que en las células Caco-2, en este caso se observa un efecto potenciado del 5-FU al administrarse junto con TRAIL 1:3, resultando un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de muerte celular producido por TRAIL 1:3 pero no por el 5-FU por sí solo; aunque se observa una tendencia.

8.7. Evaluación del efecto en la susceptibilidad a TRAILs en células Caco-2 que sobreexpresan KLF15 tratadas con quimioterapia.

Finalmente, en la Figura 20 se muestra el resultado del cocultivo de las células Caco-2 que sobreexpresan KLF15 con los tratamientos seleccionados a fin de determinar si este

factor de transcripción es capaz de jugar un papel importante en la susceptibilidad a tratamientos evaluados.

Efecto de KLF15 sobre la susceptibilidad a tratamientos a las 48h

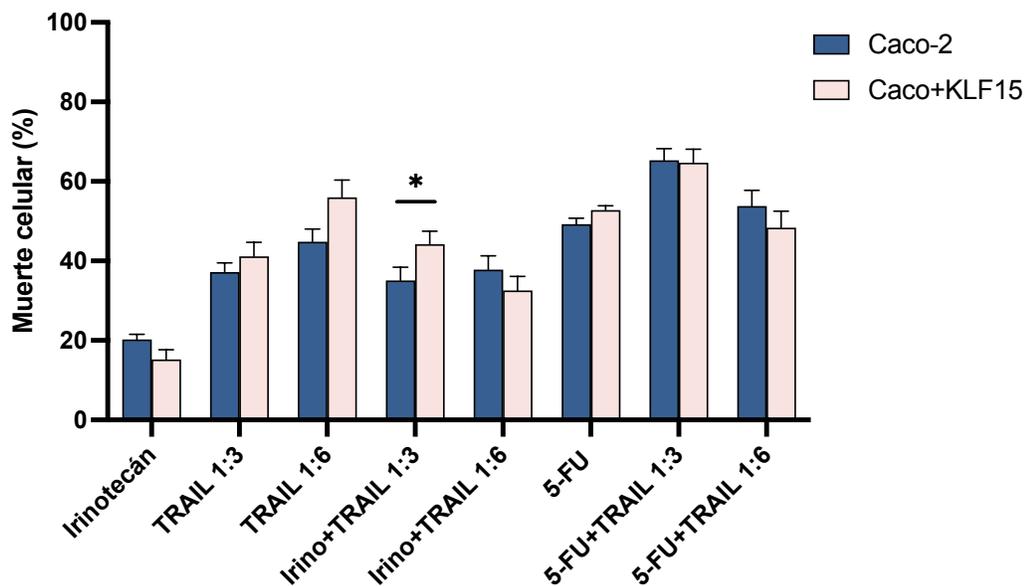


Figura 20. Efecto del KLF15 sobre susceptibilidad a tratamientos en células Caco-2 y Caco+KLF15. Lectura a las 48 horas de transfección. Irino: Irinotecán; 5-FU: 5-Fluorouracilo; 1:3= 6,000 CMM-TRAILs. 1:6= 12,000 CMM-TRAILs. * $p < 0.05$. (Prueba de Mann-Whitney).

No se obtuvieron cambios estadísticamente significativos en la respuesta a tratamientos por la sobreexpresión de KLF15. Únicamente, se vio potenciada la respuesta a Irinotecán +TRAIL 1:3 en las células con sobreexpresión de KLF15 en el tiempo de 48 horas.

1. DISCUSIÓN

El CCR sigue siendo una de las principales causas de mortalidad por cáncer a nivel mundial. A pesar de los avances en diagnóstico y tratamiento, los pacientes enfrentan un pronóstico desafiante, especialmente en etapas avanzadas con metástasis. Una estrategia inmunológica que ha ganado interés es el uso del ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) debido a la selectividad y baja toxicidad de este agente [15].

Actualmente, se encuentran en desarrollo diversos estudios clínicos para el uso de agonistas de TRAIL como terapia en diferentes tipos de cáncer, incluyendo ligandos de TRAIL o anticuerpos contra DR4 y DR5. Tal como el uso de la proteína recombinante humana de TRAIL (rhTRAIL), conocida como dulanermin, que ha mostrado actividad por sí sola o en combinación en cánceres como el de pulmón o en CCR [67], [68]. Sin embargo, su eficacia se ve limitada por su corta vida media y la presencia de receptores señuelo que pueden neutralizar su efecto.

Para superar estas limitaciones, se desarrollaron anticuerpos agonistas de los receptores de muerte que ofrecen una unión específica, alta afinidad y una mayor estabilidad. Estos están principalmente dirigidos hacia el receptor DR5, entre los cuales se encuentran LaDR5, lexatumumab y tigatuzumab, empleados en cánceres como el cáncer de mama triple negativo, el CCR, entre otros [12], [69]. Han mostrado ser bien tolerados, no obstante, no siempre son efectivos y se presenta una alta variabilidad en la respuesta. Algunos pacientes pueden no mostrar un efecto significativo y en otros casos adquieren resistencia, demostrando la complejidad de su aplicación clínica.

Estos obstáculos resaltan la necesidad de desarrollar métodos de entrega seguros y efectivos. Avances recientes muestran resultados prometedores haciendo uso de sistemas de entrega como vectores virales, nanopartículas y vectores celulares, aumentando la estabilidad, la vida media y mejorando el microambiente tumoral [70].

Entre los vectores celulares, las CMM modificadas genéticamente han sido ampliamente estudiadas debido a sus propiedades; tales como una baja inmunogenicidad, una alta capacidad de ser transducidas, facilidad de obtención y, especialmente, su habilidad de migrar a tumores [15]. Por lo cual, en este proyecto fueron empleadas CMM modificadas genéticamente para la entrega de TRAILS, dicho sistema había sido probado anteriormente por el grupo de trabajo, logrando la inhibición del crecimiento tumoral y metástasis en un modelo de linfoma en ratones [71].

A pesar de las ventajas mencionadas anteriormente, aún se presentan limitaciones como la resistencia a TRAIL, resaltando la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas con el fin de mejorar la eficacia de los tratamientos actuales y desarrollando enfoques innovadores que puedan superar la resistencia tumoral y aumentar la calidad de vida de los pacientes. Entre estos enfoques se ha optado por el uso de terapias combinadas para aumentar la susceptibilidad a TRAIL, como el uso de quimioterapias, productos naturales, moléculas pequeñas y, recientemente, se planteó la modulación de un factor de transcripción perteneciente a la familia de los KLFs [22].

Los KLFs son una familia de factores de transcripción capaces de regular procesos celulares esenciales, como la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis [27].

El KLF15 es un factor de transcripción poco estudiado, clave en regular procesos como la diferenciación, proliferación celular y apoptosis. Se ha investigado principalmente su función como regulador de la hipertrofia cardíaca, gluconeogénesis y diferenciación de adipocitos, y se encuentra expresado en una variedad de tejidos como hígado, riñones, corazón, entre otros [72].

En la actualidad existe una cantidad limitada de estudios acerca del KLF15 en CCR. Sin embargo, en el presente año, fue reportado por primera vez el uso de la sobreexpresión del KLF15 con el objetivo de inhibir el desarrollo de CCR. Se reportó que la sobreexpresión de KLF15 fue capaz de reprimir la expresión de Slug y Vimentina, genes

característicos del linaje mesenquimal, y por tanto, tener un papel clave en evitar la progresión tumoral [49].

En nuestro trabajo para realizar la sobreexpresión de KLF15 en las células Caco-2 se realizó una transfección con ADN plasmídico, con parámetros óptimos [73].

Se demostró que la sobreexpresión de KLF15 en las Caco-2 a las 48 horas analizadas afectó la viabilidad celular pero estos cambios no fueron significativos con respecto a Caco-2 tratado con lipofectamina, pero sí contra el control negativo resultando en una disminución del % de la viabilidad celular. En otros trabajos se reportó que la sobreexpresión de KLF15 por sí sola induce el arresto celular e induce apoptosis en cáncer de mama triple negativo y cáncer gástrico [38], [43].

Seguido de la validación de la sobreexpresión del KLF15 sobre las células Caco-2 y su efecto sobre el crecimiento celular, se procedió a evaluar el efecto sobre genes involucrados en la transición epitelial-mesenquimal (TEM). Este es un proceso crucial en el cual las células epiteliales, que normalmente son adherentes y polarizadas, adquieren características mesenquimales, aumentando su capacidad migratoria e invasiva. Este fenómeno juega un papel importante en la progresión del cáncer y la metástasis [45].

Dicho lo anterior, se analizaron dos marcadores epiteliales del proceso de TEM, E-cadherina y EpCAM (Figura 12). E-cadherina es una proteína de adhesión celular presente en las uniones adherentes entre células epiteliales. En la TEM ocurre una disminución de esta proteína, reduciendo la adhesión entre células y favoreciendo la motilidad [74].

El segundo marcador epitelial analizado fue EpCAM, una glicoproteína de membrana que se asocia con la proliferación, diferenciación y la adhesión celular. Su papel puede variar según el contexto celular y el tipo de cáncer, ya que la sobreexpresión de EpCAM se ha asociado tanto con la inducción de la TEM, como con la supresión [75].

De igual manera, se evaluaron marcadores del estirpe mesenquimal, mostrados en la Figura 13, se incluyeron dos factores de transcripción reguladores de la TEM, Snail y

Slug. Snail es un factor de transcripción cuya expresión conduce a la represión de genes que codifican proteínas de adhesión celular, como la E-cadherina, lo que resulta en la pérdida de la integridad del epitelio. En este caso, Snail no se vio modificado por el KLF15.

Por otro lado, el marcador de Slug resultó sobreexpresado al segundo día de transfección con KLF15 en células Caco-2. Éste es otro factor de transcripción capaz de mediar la TEM, su sobreexpresión ha demostrado inducir otros reguladores de la TEM (Zeb1 y Zeb2) [45].

Se incluyó un tercer marcador mesenquimal, la Vimentina, que es una proteína del citoesqueleto expresada típicamente en células mesenquimales, que le confiere resistencia e integridad a las células (Figura 13). Durante la TEM, la expresión de Vimentina aumenta, lo que facilita la reorganización del citoesqueleto y la adquisición de una morfología más alargada y móvil [45].

La aparente reversión del proceso de transición epitelial-mesenquimal (TEM) inducido por la sobreexpresión de KLF15 en células Caco-2 (Caco+KLF15) al séptimo día de transfección representa un hallazgo de relevancia significativa. El aumento del marcador EpCAM y la disminución de Vimentina observados en las células Caco-2 tras la sobreexpresión de KLF15 sugieren una restauración de la polaridad celular y la supresión de la capacidad invasiva, lo que podría tener implicaciones terapéuticas importantes en la inhibición de la progresión tumoral y la mejora de la respuesta al tratamiento.

Los resultados obtenidos a los 7 días de sobreexpresión de KLF15 coinciden con los hallazgos previamente reportados en el artículo de Cao y colaboradores en 2024, donde se investigó el papel de KLF15 en la regulación de la TEM mostrando que la sobreexpresión de KLF15 resultó en la reversión de la TEM en dos líneas celulares de CCR; evidenciado mediante la disminución en la expresión de marcadores mesenquimales como la Vimentina y un aumento en la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina a nivel traduccional [49].

La proliferación celular es otro proceso que juega un papel importante en el cáncer ya que permite a las células cancerosas replicarse de manera descontrolada, evadiendo los mecanismos normales de regulación del ciclo celular. Anteriormente, el KLF15 ha mostrado tener la capacidad de regular este proceso, correlacionándose negativamente su expresión con la presencia de metástasis en el cáncer gástrico y la sobreexpresión de este, fue capaz de inhibir la proliferación celular mediante la regulación de CDKN1A/p21 y CDKN1C/p57 [43].

El marcador de proliferación Ki67 es una proteína nuclear que se une al ADN y está asociada con el crecimiento y la proliferación celular tumoral. Se utiliza comúnmente como un indicador pronóstico y predictivo en el diagnóstico y tratamiento del cáncer [76].

Se evaluó también el nivel de expresión relativa de los receptores de muerte para TRAIL, DR4 y DR5, dado que su expresión se ha vinculado con la sensibilidad a TRAIL [12], [18], [77].

Hasta la fecha, solo se ha documentado un factor de la familia Krüppel-Like capaz de regular la expresión de los receptores de TRAIL y aumentar la susceptibilidad. Este hallazgo se reportó en el año 2022 y se demostró mediante la modulación de KLF4 en células de cáncer gástrico [22]. Nuestros resultados sugieren que el KLF15 podría desempeñar un papel similar al de KLF4, dado que se observó un cambio en la expresión relativa de los receptores de muerte al sobreexpresarlo.

Se desconoce el mecanismo exacto por el cual el KLF4 aumenta los receptores de muerte de TRAIL. Sin embargo, se sabe que su expresión suele estar disminuida en el CCR y se ha sugerido como un potencial supresor de tumores [78].

Una vez evaluado el efecto de KLF15 sobre la expresión de los genes de interés, se procedió a investigar si la sobreexpresión de este factor podría constituir un blanco terapéutico viable para aumentar la susceptibilidad a tratamientos como TRAIL o quimioterapia, en la línea de Caco-2, que es moderadamente resistente a TRAIL y a oxaliplatino [55].

Para ello, se validó el sistema de administración de la proteína TRAIL mediante CMM-MO modificadas genéticamente, siguiendo la metodología reportada por Quiroz Reyes y colaboradores, seleccionando las células con geneticina durante una semana para luego analizar la presencia de TRAIL indirectamente mediante la detección de la proteína GFP en el citoplasma de las células modificadas mediante fluorescencia [55].

Posterior a la validación del sistema de entrega de TRAIL se evaluó el efecto en la susceptibilidad a TRAILS en la línea Caco-2 que sobreexpresa KLF15 añadiendo también un tratamiento con quimioterapias (5-FU e Irinotecán), dado que el tratamiento con quimioterapia ha mostrado aumentar la sensibilidad a TRAIL en el células quimioresistentes de CCR [55].

En las Figuras 18 y 19 se presenta el porcentaje de muerte celular producido por diversos tratamientos en células Caco-2 y Caco-2+KLF15, respectivamente, con el fin de identificar el mejor tratamiento para cada uno. Para las células Caco-2, el tratamiento con CMM-TRAIL 1:6 y la combinación de 5-FU con TRAIL 1:3 mostraron los mejores resultados, alcanzando un elevado porcentaje de muerte celular. Estos tratamientos también demostraron ser los más efectivos en las células Caco-2 KLF15, además del tratamiento exclusivo con 5-FU. Además, se destaca la eficacia del tratamiento con TRAIL, que por sí solo indujo un alto porcentaje de muerte celular, incluso superior al provocado por irinotecán y comparable al del 5-FU.

Curiosamente, al realizar el tratamiento con CMM-TRAILS se muestra un mayor efecto citotóxico por la administración en la relación 1:6 que relación 1:3, es decir, administrando una mayor cantidad de células y, por lo tanto, una mayor cantidad de TRAIL. Sin embargo, esto no se mantiene al realizar un cotratamiento con quimioterapia, obteniéndose un mayor efecto al emplear la relación 1:3 de células (6,000 células CMM-TRAILS). Esto podría ocurrir debido a la disminución de las CMM-TRAILS viables ocasionado por la quimioterapia. Una perspectiva de este trabajo sería investigar la razón por la que esto sucede.

Tanto Caco-2 como Caco+KLF15 mostraron resistencia al tratamiento con Irinotecán, con un porcentaje de muerte celular inferior al 20%. Sin embargo, al aplicar una estrategia combinada de irinotecán con TRAIL en relaciones de 1:3 y 1:6, se observó un aumento estadísticamente significativo en la muerte celular. A pesar de ello, no se encontraron diferencias significativas respecto al tratamiento exclusivo con TRAIL.

La sinergia entre irinotecán y TRAIL ha sido previamente documentada en células HT-29 de cáncer de colon resistentes a TRAIL mediante la administración en conjunto durante 48 horas, empleando una concentración de irinotecán por debajo del IC₅₀. Dicho tratamiento resultó en un aumento de la sensibilidad a TRAIL debido a la sobreexpresión del receptor DR5 y las proteínas Bax y caspasa-9 [79].

En nuestro estudio también empleamos una concentración de irinotecán por debajo del IC₅₀ en células Caco-2, no obstante, lo administramos en conjunto con TRAIL únicamente durante 24 horas. Es probable que prolongar el tiempo de cotratamiento nos hubiera permitido detectar la sinergia entre estos tratamientos potenciando aún más el efecto citotóxico. Igualmente, la administración repetitiva de Irinotecán antes de TRAIL podría ser una estrategia prometedora dado que ha mostrado ser más efectivo que el tratamiento inverso o en conjunto, en otros tipos de cáncer [20].

Por otro lado, se obtuvo un incremento significativo del porcentaje de muerte celular producido por TRAIL 1:3 en combinación con 5-FU (Figura 18), lo cual sugiere una posible sinergia entre estos tratamientos dado que fue mayor que el efecto por sí solos. Este hallazgo es relevante debido a que anteriormente se ha reportado sinergia entre estos tratamientos en hepatocarcinoma tanto *in vivo* como *in vitro* [80].

En este trabajo se utilizó la concentración máxima en plasma de 5-FU (10 µg/mL) a la cual las células mostraron sensibilidad con una inducción de aproximadamente un 45% de muerte celular. Además, a diferencia de lo reportado por Yang y colaboradores, el 5-FU no fue administrado como pretratamiento, sino directamente con TRAIL. Es posible que el pretratamiento con quimioterapia hubiera incrementado la susceptibilidad a

TRAIL, dado que otros estudios han reportado esto al ser pretratadas durante 12 horas con quimioterapia, permitiendo la activación de mecanismos de sensibilización como la sobreexpresión del receptor DR5 y la disminución de la proteína anti-apoptótica survivina [80].

Es crucial validar la sobreexpresión de los receptores de muerte de TRAIL, DR4 y DR5, a nivel proteico y determinar si se presenta un efecto biológico que modifique la susceptibilidad a TRAIL. Se ha documentado que la expresión del ARNm de los receptores de TRAIL no siempre coincide con la presencia de proteínas funcionales, dado que estas atraviesan complejas modificaciones postraduccionales, como la glicosilación, procesos de tráfico y endocitosis [81].

La glicosilación se ha identificado como un proceso que incrementa la estabilidad de estos receptores en la membrana celular, previniendo la endocitosis y facilitando su translocación en clusters. La deficiencia de DRs en la membrana plasmática puede atribuirse a defectos en la translocación de proteínas a la membrana o a su internalización y degradación [82], [83].

Por último, se determinó si la sobreexpresión de KLF15 en células Caco-2 aumentaba la sensibilidad a tratamientos respecto a las células basales, tal como se muestra en la Figura 20. No se obtuvieron diferencias en las respuestas a tratamientos por la sobreexpresión de KLF15 a las 48 horas, mas que en el grupo sometido a Irrinotecán + TRAIL en relación 1:3. Cabe mencionar que en el momento en el que fueron agregados los tratamientos, las células únicamente llevaban 24 horas de transfección, por lo cual es probable que aún no ocurrieran cambios sobre las células. Lo cual podemos corroborar con lo obtenido en los ensayos por PCR en los que los cambios en la expresión de genes ocurren a partir de las 48 horas de expresión, como el aumento de los receptores de muerte para TRAIL.

2. CONCLUSIÓN

La sobreexpresión de KLF15 fue validada hasta las 96 horas utilizando una concentración de 5 µg de ADN plasmídico. En células tumorales Caco-2, esta sobreexpresión de KLF15 modifica la expresión de marcadores de transición epitelial-mesenquimal (TEM) y de proliferación, lo que sugiere un posible efecto de reversión del proceso de TEM a tiempos prolongados.

Además, se observó que el 5-FU potencia la muerte celular inducida por TRAIL en una proporción de 1:3 tanto en las células Caco-2 control como en las que sobreexpresan KLF15 (38%±11 vs 65% ±12). Sin embargo, parece que KLF15 no desempeña un papel significativo en la modulación de la susceptibilidad a TRAIL y la quimioterapia en los tiempos evaluados.

3. REFERENCIAS

- [1] SMeO, “Prevención y diagnóstico oportuno en cáncer,” 2016.
- [2] 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, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/CAAC.21660.
- [3] World Health Organization, “Cáncer.” Accessed: May 19, 2023. [Online]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- [4] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Cancer statistics, 2020,” *CA Cancer J Clin*, vol. 70, no. 1, pp. 7–30, Jan. 2020, doi: 10.3322/CAAC.21590.
- [5] A. R. Marley and H. Nan, “Epidemiology of colorectal cancer,” *Int J Mol Epidemiol Genet*, vol. 7, no. 3, p. 105, 2016, doi: 10.3109/9781420016307-2.
- [6] American Cancer Society, “Cáncer colorrectal.” Accessed: May 22, 2023. [Online]. Available: <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/cirugia-del-colon.html>
- [7] M. Świdarska *et al.*, “The diagnostics of colorectal cancer,” *Contemp Oncol*, vol. 18, no. 1, p. 1, 2014, doi: 10.5114/WO.2013.39995.
- [8] K. Van Der Jeught, H. C. Xu, Y. J. Li, X. Bin Lu, and G. Ji, “Drug resistance and new therapies in colorectal cancer,” *World J Gastroenterol*, vol. 24, no. 34, p. 3834, Sep. 2018, doi: 10.3748/WJG.V24.I34.3834.
- [9] X. Shen *et al.*, “KLF5 inhibition overcomes oxaliplatin resistance in patient-derived colorectal cancer organoids by restoring apoptotic response,” *Cell Death Dis*, vol. 13, no. 4, Apr. 2022, doi: 10.1038/S41419-022-04773-1.

- [10] A. I. Neugut *et al.*, “FOLFOX and FOLFIRI use in Stage IV Colon Cancer: Analysis of SEER-Medicare Data,” *Clin Colorectal Cancer*, vol. 18, no. 2, p. 133, Jun. 2019, doi: 10.1016/J.CLCC.2019.01.005.
- [11] K. Hwang, J. H. Yoon, J. H. Lee, and S. Lee, “Recent Advances in Monoclonal Antibody Therapy for Colorectal Cancers,” *Biomedicines*, vol. 9, no. 1, pp. 1–24, Jan. 2021, doi: 10.3390/BIOMEDICINES9010039.
- [12] X. Yuan, A. Gajan, Q. Chu, H. Xiong, K. Wu, and G. S. Wu, “Developing TRAIL/TRAIL-death receptor-based cancer therapies,” *Cancer Metastasis Rev*, vol. 37, no. 4, p. 733, Dec. 2018, doi: 10.1007/S10555-018-9728-Y.
- [13] G. Mellier, S. Huang, K. Shenoy, and S. Pervaiz, “TRAILing death in cancer,” *Mol Aspects Med*, vol. 31, no. 1, pp. 93–112, Feb. 2010, doi: 10.1016/J.MAM.2009.12.002.
- [14] D. De Miguel, J. Lemke, A. Anel, H. Walczak, and L. Martinez-Lostao, “Onto better TRAILs for cancer treatment,” *Cell Death Differ*, vol. 23, no. 5, p. 733, May 2016, doi: 10.1038/CDD.2015.174.
- [15] H.-H. Zhong, H.-Y. Wang, J. Li, and Y.-Z. Huang, “TRAIL-based gene delivery and therapeutic strategies,” *Acta Pharmacol Sin*, 2019, doi: 10.1038/s41401-019-0287-8.
- [16] R. Trivedi and D. P. Mishra, “Trailing TRAIL resistance: Novel targets for TRAIL sensitization in cancer cells,” *Front Oncol*, vol. 5, no. APR, 2015, doi: 10.3389/FONC.2015.00069/ABSTRACT.
- [17] T. Lan, M. Luo, and X. Wei, “Mesenchymal stem/stromal cells in cancer therapy,” *J Hematol Oncol*, vol. 14, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S13045-021-01208-W.

- [18] L. Chen *et al.*, “Ginsenoside compound K sensitizes human colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via autophagy-dependent and -independent DR5 upregulation,” *Cell Death Dis*, vol. 7, no. 8, 2016, doi: 10.1038/CDDIS.2016.234.
- [19] K. Yamaguchi *et al.*, “Methylseleninic acid sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis,” *Oncogene*, vol. 24, no. 38, pp. 5868–5877, Sep. 2005, doi: 10.1038/SJ.ONC.1208742.
- [20] X. X. Wu, X. H. Jin, Y. Zeng, A. M. A. El Hamed, and Y. Kakehi, “Low concentrations of doxorubicin sensitizes human solid cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-receptor (R) 2-mediated apoptosis by inducing TRAIL-R2 expression,” *Cancer Sci*, vol. 98, no. 12, pp. 1969–1976, Dec. 2007, doi: 10.1111/J.1349-7006.2007.00632.X.
- [21] X. X. Wu *et al.*, “Enhancement of TRAIL/Apo2L-mediated apoptosis by adriamycin through inducing DR4 and DR5 in renal cell carcinoma cells,” *Int J Cancer*, vol. 104, no. 4, pp. 409–417, Apr. 2003, doi: 10.1002/IJC.10948.
- [22] H. T. N. To, Q. A. Le, H. T. T. Bui, J. H. Park, and D. Kang, “Modulation of Spheroid Forming Capacity and TRAIL Sensitivity by KLF4 and Nanog in Gastric Cancer Cells,” *Curr Issues Mol Biol*, vol. 45, no. 1, pp. 233–248, Jan. 2023, doi: 10.3390/CIMB45010018/S1.
- [23] J. Zhao, Y. Lu, and H. M. Shen, “Targeting p53 as a therapeutic strategy in sensitizing TRAIL-induced apoptosis in cancer cells,” *Cancer Lett*, vol. 314, no. 1, pp. 8–23, 2012, doi: 10.1016/J.CANLET.2011.09.040.
- [24] D. Deng and K. Shah, “TRAIL of Hope Meeting Resistance in Cancer,” *Trends Cancer*, vol. 6, no. 12, p. 989, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.TRECAN.2020.06.006.
- [25] K. A. Papavassiliou and A. G. Papavassiliou, “Transcription Factor Drug Targets,” *J Cell Biochem*, vol. 117, no. 12, pp. 2693–2696, Dec. 2016, doi: 10.1002/JCB.25605.

- [26] S. A. Lambert *et al.*, “The Human Transcription Factors,” *Cell*, vol. 172, no. 4, pp. 650–665, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.CELL.2018.01.029.
- [27] Y. Zhang *et al.*, “Role of Krüppel-like factors in cancer stem cells,” *J Physiol Biochem*, vol. 71, no. 1, pp. 155–164, Feb. 2015, doi: 10.1007/S13105-015-0381-4/TABLES/2.
- [28] Z.-Y. Li, Y.-X. Zhu, J.-R. Chen, X. Chang, and Z.-Z. Xie, “The role of KLF transcription factor in the regulation of cancer progression,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 162, p. 114661, 2023, doi: 10.1016/j.biopha.2023.114661.
- [29] B. B. McConnell and V. W. Yang, “Mammalian Krüppel-Like Factors in Health and Diseases,” *Physiol Rev*, vol. 90, no. 4, p. 1337, Oct. 2010, doi: 10.1152/PHYSREV.00058.2009.
- [30] N. M. Pollak, M. Hoffman, I. J. Goldberg, and K. Drosatos, “Krüppel-Like Factors: Crippling and Uncrippling Metabolic Pathways,” *JACC Basic Transl Sci*, vol. 3, no. 1, p. 132, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.JACBTS.2017.09.001.
- [31] X. Shi *et al.*, “Suppression of KLF8 induces cell differentiation and sensitizes colorectal cancer to 5-fluorouracil,” *Oncol Rep*, vol. 34, no. 3, pp. 1221–1230, Sep. 2015, doi: 10.3892/OR.2015.4094/HTML.
- [32] M. O. Altonsy, G. X. Song-Zhao, M. M. Mostafa, and P. R. Mydlarski, “Overexpression of Krüppel-Like Factor 9 Enhances the Antitumor Properties of Paclitaxel in Malignant Melanoma-Derived Cell Lines,” *Pharmaceuticals*, vol. 16, no. 4, Apr. 2023, doi: 10.3390/PH16040557/S1.
- [33] Z. J. An *et al.*, “Up-regulation of KLF17 expression increases the sensitivity of gastric cancer to 5-fluorouracil,” *Int J Immunopathol Pharmacol*, vol. 35, 2021, doi: 10.1177/20587384211010925.

- [34] M. Hassan, H. Watari, A. Abualmaaty, Y. Ohba, and N. Sakuragi, "Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer," *Biomed Res Int*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/150845.
- [35] S. W. Lowe and A. W. Lin, "Apoptosis in cancer," *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 3, pp. 485–495, Mar. 2000, doi: 10.1093/CARCIN/21.3.485.
- [36] O. Morana, W. Wood, and C. D. Gregory, "The Apoptosis Paradox in Cancer," *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 3, Feb. 2022, doi: 10.3390/IJMS23031328.
- [37] M. Hassan, H. Watari, A. Abualmaaty, Y. Ohba, and N. Sakuragi, "Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer," *Biomed Res Int*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/150845.
- [38] Q. Kanyomse *et al.*, "KLF15 suppresses tumor growth and metastasis in Triple-Negative Breast Cancer by downregulating CCL2 and CCL7," *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, p. 19026, Dec. 2022, doi: 10.1038/S41598-022-23750-4.
- [39] N. Zhu *et al.*, "KLF5 Interacts with p53 in regulating survivin expression in acute lymphoblastic leukemia," *J Biol Chem*, vol. 281, no. 21, pp. 14711–14718, May 2006, doi: 10.1074/JBC.M513810200.
- [40] A. M. Ghaleb, J. P. Katz, K. H. Kaestner, J. X. Du, and V. W. Yang, "Krüppel-like factor 4 exhibits antiapoptotic activity following γ -radiation-induced DNA damage," *Oncogene*, vol. 26, no. 16, p. 2365, Apr. 2007, doi: 10.1038/SJ.ONC.1210022.
- [41] M. A. Feitelson *et al.*, "Sustained proliferation in cancer: mechanisms and novel therapeutic targets," *Semin Cancer Biol*, vol. 35, no. Suppl, p. S25, Dec. 2015, doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2015.02.006.

- [42] Y. Yang, B. G. Goldstein, H. H. Chao, and J. P. Katz, “KLF4 and KLF5 regulate proliferation, apoptosis and invasion in esophageal cancer cells,” *Cancer Biol Ther*, vol. 4, no. 11, pp. 1216–1221, 2005, doi: 10.4161/CBT.4.11.2090.
- [43] C. Sun *et al.*, “KLF15 Inhibits Cell Proliferation in Gastric Cancer Cells via Up-Regulating CDKN1A/p21 and CDKN1C/p57 Expression,” *Dig Dis Sci*, vol. 62, no. 6, pp. 1518–1526, Jun. 2017, doi: 10.1007/S10620-017-4558-2/FIGURES/4.
- [44] D. Huilgol, P. Venkataramani, S. Nandi, and S. Bhattacharjee, “Transcription Factors That Govern Development and Disease: An Achilles Heel in Cancer,” *Genes (Basel)*, vol. 10, no. 10, Oct. 2019, doi: 10.3390/GENES10100794.
- [45] N. Zhang, A. S. Ng, S. Cai, Q. Li, L. Yang, and D. Kerr, “Novel therapeutic strategies: targeting epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer,” *Lancet Oncol*, vol. 22, no. 8, pp. e358–e368, Aug. 2021, doi: 10.1016/S1470-2045(21)00343-0.
- [46] R. H. Giles, J. H. Van Es, and H. Clevers, “Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer,” *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, vol. 1653, no. 1, pp. 1–24, Jun. 2003, doi: 10.1016/S0304-419X(03)00005-2.
- [47] S. Li, Y. Li, B. Tan, and Z. An, “Effect of KLF17 overexpression on epithelial–mesenchymal transition of gastric cancer cells,” *Journal of International Medical Research*, vol. 49, no. 11, pp. 1–16, 2021, doi: 10.1177/03000605211051581.
- [48] L. Gao *et al.*, “KLF15 promotes the proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma cells and has potential as a cancer prognostic marker,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 66, p. 109952, Dec. 2017, doi: 10.18632/ONCOTARGET.21972.
- [49] Y. Cao, J. Li, G. Zhang, H. Fang, Y. Du, and Y. Liang, “KLF15 transcriptionally activates LINC00689 to inhibit colorectal cancer development,” *Commun Biol*, vol. 7, no. 1, Dec. 2024, doi: 10.1038/S42003-023-05757-3.

- [50] X. Wang, M. He, J. Li, H. Wang, and J. Huang, “KLF15 suppresses cell growth and predicts prognosis in lung adenocarcinoma,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 106, pp. 672–677, Oct. 2018, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2018.07.006.
- [51] T. Yoda *et al.*, “KLF15 in breast cancer: a novel tumor suppressor?,” *Cellular Oncology*, vol. 38, no. 3, pp. 227–235, Jun. 2015, doi: 10.1007/S13402-015-0226-8/METRICS.
- [52] C. X. Sun, B. J. Liu, Y. Su, G. W. Shi, Y. Wang, and J. F. Chi, “MiR-181a promotes cell proliferation and migration through targeting KLF15 in papillary thyroid cancer,” *Clinical and Translational Oncology*, vol. 24, no. 1, pp. 66–75, Jan. 2022, doi: 10.1007/S12094-021-02670-1/METRICS.
- [53] J. Borrego Terrazas, “Células Madre Humanas Modificadas Genéticamente Para Expresar TRAIL e Interferon Beta Con Efecto Antitumoral in Vitro,” Universidad Autónoma de Nuevo León, 2014.
- [54] C. A. González Villarreal, “Evaluación de la actividad antitumoral de células madre mesenquimales que sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma,” Universidad Autónoma de Nuevo León, 2018.
- [55] A. G. Quiroz-Reyes *et al.*, “Oxaliplatin Enhances the Apoptotic Effect of Mesenchymal Stem Cells, Delivering Soluble TRAIL in Chemoresistant Colorectal Cancer,” *Pharmaceuticals*, vol. 16, 2023, doi: 10.3390/ph16101448.
- [56] A. Quiroz Reyes, “Evaluación de la actividad antitumoral de células madre mesenquimales modificadas genéticamente con TRAIL soluble, IL-12 e IFN β en un modelo murino singénico de linfoma,” Universidad Autónoma de Nuevo León, 2020.
- [57] P. A. Carriquiry Chequer, “Optimización del proceso de diferenciación de células madre mesenquimales a cardiomiocitos mediante la sobreexpresión de los factores de transcripción MESP1 y KLF15,” UANL, 2022.

- [58] Z. Liao *et al.*, “Affinity-tagged SMAD1 and SMAD5 mouse lines reveal transcriptional reprogramming mechanisms during early pregnancy,” *Elife*, vol. 12, Mar. 2024, doi: 10.7554/ELIFE.91434.
- [59] E. A. Flores-Contreras *et al.*, “Overexpression of *lnc-ERP44-3:6* Causes Cell Death and Sensitivity to Cisplatin in Breast Cancer Cell Lines,” *Oncologie*, vol. 23, no. 3, pp. 373–392, Sep. 2021, doi: 10.32604/ONCOLOGIE.2021.017786.
- [60] X. Lv *et al.*, “Agrin para-secreted by PDGF-activated human hepatic stellate cells promotes hepatocarcinogenesis in vitro and in vivo,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 62, p. 105340, Dec. 2017, doi: 10.18632/ONCOTARGET.22186.
- [61] S. Shi *et al.*, “EMT Transcription Factors Are Involved in the Altered Cell Adhesion under Simulated Microgravity Effect or Overloading by Regulation of E-cadherin,” *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 4, Feb. 2020, doi: 10.3390/IJMS21041349.
- [62] E. A. FLORES CONTRERAS, “ANÁLISIS DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL ARN INC-ERP44-3:6 PARA IDENTIFICAR SU FUNCIÓN CELULAR, SU RELACIÓN EN CÁNCER DE MAMA Y EVALUAR SU POTENCIAL USO TERAPÉUTICO,” UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN, 2021.
- [63] Y. Shu *et al.*, “Aspirin-Triggered Resolvin D1 Inhibits TGF- β 1-Induced EndMT through Increasing the Expression of Smad7 and Is Closely Related to Oxidative Stress,” *Biomol Ther (Seoul)*, vol. 24, no. 2, p. 132, Mar. 2016, doi: 10.4062/BIOMOLTHER.2015.088.
- [64] Y. Luo and Q. Yao, “Circ_0085315 promotes cell proliferation, invasion, and migration in colon cancer through miR-1200/MAP3K1 signaling pathway,” *Cell Cycle*, vol. 21, no. 11, p. 1194, 2022, doi: 10.1080/15384101.2022.2044137.
- [65] A. Mashayekhi, F. Forouzes, and M. Mashayekhi, “Promotion of Extrinsic Apoptosis Pathway in HCT-116 Human Colorectal Cancer Cell Line by Sodium

- Butyrate as Histone Deacetylase Inhibitor,” *Iran Red Crescent Med J*, vol. 23, no. 1, p. 190, 2021, doi: 10.32592/ircmj.2021.23.1.190.
- [66] C. J. 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.
- [67] B. Besse *et al.*, “Phase 2 study of frontline bortezomib in patients with advanced non-small cell lung cancer,” *Lung Cancer*, vol. 76, no. 1, pp. 78–83, Apr. 2012, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2011.09.006.
- [68] S. C. Gampa, S. V. Garimella, and S. L. Pandrangi, “Nano-TRAIL: a promising path to cancer therapy,” *Cancer Drug Resistance*, vol. 6, no. 1, p. 78, 2023, doi: 10.20517/CDR.2022.82.
- [69] M. Ciprotti *et al.*, “Phase I Imaging and Pharmacodynamic Trial of CS-1008 in Patients With Metastatic Colorectal Cancer,” *J Clin Oncol*, vol. 33, no. 24, pp. 2609–2616, Aug. 2015, doi: 10.1200/JCO.2014.60.4256.
- [70] C. Luo, S. He, F. Shi, J. Zhou, and L. Shang, “The Role of TRAIL Signaling in Cancer: Searching for New Therapeutic Strategies,” *Biology 2024, Vol. 13, Page 521*, vol. 13, no. 7, p. 521, Jul. 2024, doi: 10.3390/BIOLOGY13070521.
- [71] A. 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*, 2023, doi: 10.3390/biomedicines11020595.
- [72] S. M. Haldar, O. A. Ibrahim, and M. K. Jain, “Kruppel-like Factors (KLFs) in muscle biology,” *J Mol Cell Cardiol*, vol. 43, no. 1, pp. 1–10, Jul. 2007, doi: 10.1016/J.YJMCC.2007.04.005.

- [73] Banco Nacional de ADN, “PROGRAMA CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN.” Accessed: Jun. 02, 2024. [Online]. Available: https://cit.ligue-cancer.net/CIT_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-%20QC%20PF%20Saint-
- [74] S. Lamouille, J. Xu, and R. Derynck, “Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 15, no. 3, p. 178, Mar. 2014, doi: 10.1038/NRM3758.
- [75] C. W. Lin, M. Y. Liao, W. W. Lin, Y. P. Wang, T. Y. Lu, and H. C. Wu, “Epithelial cell adhesion molecule regulates tumor initiation and tumorigenesis via activating reprogramming factors and epithelial-mesenchymal transition gene expression in colon cancer,” *J Biol Chem*, vol. 287, no. 47, pp. 39449–39459, Nov. 2012, doi: 10.1074/JBC.M112.386235.
- [76] L. T. Li, G. Jiang, Q. Chen, and J. N. Zheng, “Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review),” *Mol Med Rep*, vol. 11, no. 3, pp. 1566–1572, Mar. 2015, doi: 10.3892/MMR.2014.2914.
- [77] 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, 2021, doi: 10.7554/ELIFE.67750.
- [78] E. Lee, J. Cheung, and A. B. Bialkowska, “Krüppel-like Factors 4 and 5 in Colorectal Tumorigenesis,” *Cancers (Basel)*, vol. 15, no. 9, May 2023, doi: 10.3390/CANCERS15092430/S1.
- [79] H. Zhu *et al.*, “The synergistic effects of low-dose irinotecan and TRAIL on TRAIL-resistant HT-29 colon carcinoma in vitro and in vivo,” *Int J Mol Med*, vol. 30, no. 5, pp. 1087–1094, Nov. 2012, doi: 10.3892/IJMM.2012.1105.

- [80] L. Yang *et al.*, “Low-dose 5-fluorouracil sensitizes HepG2 cells to TRAIL through TRAIL receptor DR5 and survivin-dependent mechanisms,” *J Chemother*, vol. 29, no. 3, pp. 179–188, May 2017, doi: 10.1080/1120009X.2016.1277048.
- [81] J. D. Twomey, S. R. Kim, L. Zhao, W. P. Bozza, and B. Zhang, “Spatial dynamics of TRAIL death receptors in cancer cells,” *Drug Resistance Updates*, vol. 19, pp. 13–21, Mar. 2015, doi: 10.1016/J.DRUP.2015.02.001.
- [82] B. Zhang *et al.*, “Mislocalization of death receptors correlates with cellular resistance to their cognate ligands in human breast cancer cells,” *Oncotarget*, vol. 3, no. 8, pp. 833–842, Aug. 2012, doi: 10.18632/ONCOTARGET.542.
- [83] Y. Kojima *et al.*, “Importin β 1 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,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 50, pp. 43383–43393, Dec. 2011, doi: 10.1074/JBC.M111.309377.
- [84] NIH, “Tratamiento del cáncer de colon.” Accessed: Jun. 04, 2024. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/paciente/tratamiento-colorrectal-pdq>
- [85] L. Figuero *et al.*, “Cáncer colorrectal,” *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, vol. 13, no. 24, pp. 1335–1344, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.MED.2021.01.003.