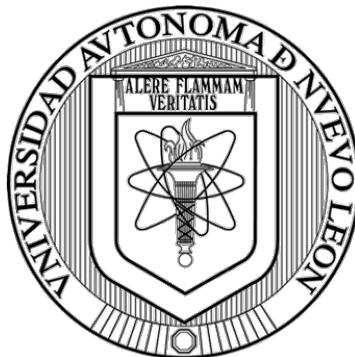


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE TRAIL SOLUBLE EN
COMBINACIÓN CON COMPUESTOS RESVERATROL Y EPIGALOCATEQUINA
GALATO EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER COLORRECTAL Y CARCINOMA
HEPATOCELULAR

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

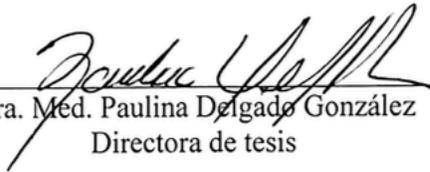
PRESENTA

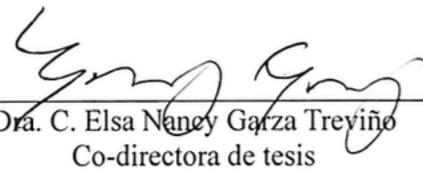
L.B.G. SERGIO IVÁN PADILLA TELLO

AGOSTO 2025

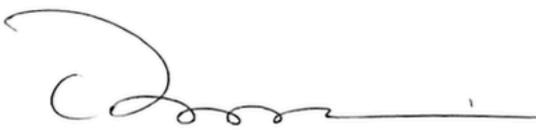
EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE TRAIL SOLUBLE EN
COMBINACIÓN CON COMPUESTOS RESVERATROL Y EPIGALOCATEQUINA
GALATO EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER COLORRECTAL Y CARCINOMA
HEPATOCELULAR

Aprobación de la tesis:


Dra. Méd. Paulina Delgado González
Directora de tesis


Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño
Co-directora de tesis


Dr. C. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez
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” Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular en el Laboratorio de Terapia Celular.

Bajo la dirección de:

- Dra. Med. Paulina Delgado González
Directora
- Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño
Co-directora
- Dr. C. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez
Miembro de la comisión

II. DEDICATORIA

A mis padres y mis hermanos, por su amor y apoyo incondicional.

III. AGRADECIMIENTOS

A mi comisión de tesis, Dra. Med. Paulina Delgado González, Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño y Dr. C. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez gracias por compartir su experiencia y conocimientos para el desarrollo de este proyecto, por la retroalimentación y la atención brindada, por dar siempre las mejores palabras en el momento adecuado y por contribuir de manera significativa a mi formación.

A los integrantes del laboratorio de Terapia Celular, Itzel, Juan de Dios, Antonio y Fernanda, agradezco su invaluable apoyo para la realización de ensayos, por brindar siempre las mejores palabras de aliento y motivación, así como los buenos momentos juntos como los cafés a media mañana para despejarnos.

A todo el personal del departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, gracias por permitirme formar parte de este durante los 2 años de mi estadía. Agradeciendo de manera especial a mis profesores por sus sugerencias, consejos y enseñanzas tanto durante clases como para la realización de este proyecto de tesis.

A mis amigos y compañeros de generación o de trabajo durante la maestría, Luis, Humberto, Jocelyn, Yareli, Armando, Alí y Julio les agradezco por compartir sus aprendizajes y retos, también por el intercambio de ideas que permitió enriquecer nuestro proceso formativo.

A mi familia, gracias por todo su amor y apoyo incondicional durante este proceso. En especial a mis padres Elba Tello e Iván Padilla les agradezco por la paciencia, comprensión y motivación para seguir adelante.

A Valeria, gracias por tu apoyo, por estar siempre para mí en los momentos más complicados y por convertir en buenos incluso los días más difíciles.

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

IV. TABLA DE CONTENIDO

V. ÍNDICE DE TABLAS	7
VI. ÍNDICE DE FIGURAS	8
VII. LISTA DE ABREVIATURAS	9
1. RESUMEN	10
1.1 Abstract.....	11
2. INTRODUCCIÓN	12
3. ANTECEDENTES	14
3.1 Cáncer del tracto gastrointestinal.....	14
3.2 Incidencia de cáncer colorrectal y hepático.....	14
3.3 Factores de riesgo asociados a cáncer colorrectal y hepático.....	14
3.4 Carcinogénesis.....	17
3.5 Diagnóstico.....	19
3.6 Tratamiento.....	21
3.7 Células madre mesenquimales para la entrega de moléculas antitumorales.....	23
3.8 TRAIL como terapia alternativa contra el cáncer.....	26
3.9 Mecanismos de resistencia a TRAIL.....	28
3.10 Compuestos que aumentan la actividad de TRAIL.....	30
3.11 Compuestos bioactivos.....	31
3.12 Resveratrol.....	32
3.13 Epigallocatequina galato.....	34
3.14 Antecedentes directos.....	36
4. JUSTIFICACIÓN	38
5. HIPÓTESIS	39
6. OBJETIVOS	40
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL	41
8. MATERIALES Y MÉTODOS	42
8.1 Expansión in vitro de líneas celulares.....	42
8.2 Preparación de soluciones stock de resveratrol y epigallocatequina galato.....	42
8.3 Tratamiento de células tumorales con RSV y EGCG.....	43
8.4 Ensayo de citotoxicidad.....	43
8.5 Validación de CMM para producción de TRAILS.....	44
8.6 Análisis de actividad antitumoral de CMM-TRAILS en co-cultivo con células de CCR y CHC pretratadas con RSV o EGCG.....	44
8.7 Extracción de ARN.....	45
8.8 Retrotranscripción.....	46
8.9 qPCR.....	47
8.10 Inmunofluorescencia.....	47
8.11 Análisis estadístico.....	48

9. RESULTADOS	49
9.1 Expansión in vitro de líneas celulares	49
9.2 Preparación de compuestos	50
9.3 Ensayos de citotoxicidad	50
9.4 Validación de expresión de GFP por CMM-TRAILS	57
9.5 Pretratamiento con RSV o EGCG y ensayos en co-cultivo.....	59
9.6 Expresión relativa de los receptores de muerte DR4 y DR5 en Caco-2.....	63
9.7 Detección de DR5 mediante inmunofluorescencia en Caco-2	64
10. DISCUSIÓN	66
11. CONCLUSIÓN	70
12. REFERENCIAS	71

V. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos que aumentan la actividad de TRAIL	30
Tabla 2. Antecedentes del uso de los compuestos RSV y EGCG en conjunto con TRAIL recombinante y su mecanismo de sensibilización observado.....	35
Tabla 3. Secuencias de primers.....	47

VI. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de inducción de apoptosis por TRAIL.	27
Figura 2. Mecanismos de resistencia a TRAIL.	29
Figura 3. Metodología general.	41
Figura 4. Cultivo celular de la línea Caco-2 (A) de adenocarcinoma colorrectal humano, CMT-93 (B) línea de cáncer colorrectal murino, Huh-7 (C) línea de carcinoma hepatocelular humano y CMM (D) de médula ósea murina (objetivo 10X).	49
Figura 5. Porcentaje de muerte celular a las 24 horas del tratamiento con las concentraciones de DMSO del 0.2 y 0.4% en las líneas celulares Caco-2, CMT-93, Huh-7 y CMM.....	50
Figura 6. PMC mostrados a las 48 horas del tratamiento con DMSO (0.2%).	51
Figura 7. PMC de CMM tratadas con RSV durante 24 horas.	52
Figura 8. CMM tratadas con RSV durante 24 horas	52
Figura 9. PMC de la línea Caco-2 tratada con RSV durante 24 horas.	53
Figura 10. PMC de la línea celular CMT-93 tratada con RSV durante 24 horas.	53
Figura 11. PMC de la línea celular Huh-7 tratada con RSV durante 24 horas.....	54
Figura 12. PMC de las líneas Caco-2 (A) y CMT-93 (B) tratadas con RSV durante 48 horas.	55
Figura 13. PMC de la línea celular Huh-7 tratada con RSV durante 48 horas.....	55
Figura 14. PMC de las líneas Caco-2 (A) y Huh-7 (B) tratadas con EGCG durante 24 horas.	56
Figura 15. PMC de las líneas Caco-2 (A) y Huh-7 (B) tratadas con EGCG durante 48 horas.	57
Figura 16. A) CMM-TRAILS expresando el gen reportero de GFP como indicador de la producción de TRAILS. B) Porcentaje de células que expresan GFP en comparación con el control no seleccionado.	58
Figura 17. Efecto del RSV o EGCG sobre las CMM-TRAILS durante 48 horas.	59
Figura 18. Pretratamiento de RSV y co-cultivo con CMM-TRAILS de la línea Caco-2. ...	60
Figura 19. Pretratamiento de RSV y co-cultivo con CMM-TRAILS de la línea CMT-93..	61
Figura 20. Pretratamiento de RSV y co-cultivo con CMM-TRAILS de la línea Huh-7.....	62
Figura 21. Pretratamiento de EGCG y co-cultivo con CMM-TRAILS de las líneas Caco-2 (A) y Huh-7 (B).	63
Figura 22. Expresión relativa de los receptores de muerte DR4 (A) y DR5 (B).....	64
Figura 23. A) Expresión de DR5 en Caco-2 posterior al tratamiento con RSV (100 μ M) durante 48 horas. B) Intensidad de fluorescencia (URF) de Caco-2 tratadas con RSV y no tratadas.....	65

VII. LISTA DE ABREVIATURAS

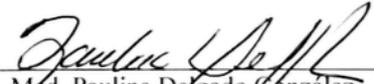
5-FU: 5-Fluorouracilo
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
APC: Poliposis adenomatosa coli
ARN: Ácido ribonucleico
c-FLIP: Proteína inhibidora de FLICE celular
CCR: Cáncer colorrectal
CHC: Carcinoma hepatocelular
CMM-TRAILS: Células madre mesenquimales productoras de TRAIL soluble
CMM: Células madre mesenquimales
CMT: Células madre de tumor
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DcR: Decoy receptor
DISC: Complejo de señalización inductor de muerte
DMEM: Medio Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO: Dimetilsulfóxido
DR: Death receptor
EGCG: Epigallocatequina galato
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico
GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GFP: Proteína verde fluorescente, Green Fluorescent Protein
KLF4: Kruppel-like factor 4
mM: Milimolar
ng: Nanogramos
OPG: Osteoprotegerina
PBS: Buffer de fosfatos
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PMC: Porcentaje de muerte celular
RPM: Revoluciones por minuto
RSV: Resveratrol
SEM: Error estándar de la media
SULT's: Sulfoniltransferasas
TBST: Tris buffer salino + Tween 20
TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta
TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral
TRAILc: TRAIL completo, forma completa de TRAIL anclada a membrana
TRAILr: TRAIL recombinante humano
TRAILS: TRAIL soluble
TRS: Buffer Tris hidroximetilaminometano
UGT's: UDP-glucuronosiltransferasas
VHB: Virus de hepatitis B
VHC: Virus de hepatitis C
XIAP: Inhibidor de la apoptosis ligado al cromosoma X
μM: Micromolar

1. RESUMEN

L.B.G. Sergio Iván Padilla Tello

Título: Evaluación del efecto citotóxico de TRAIL soluble en combinación con compuestos resveratrol y epigallocatequina galato en líneas celulares de cáncer colorrectal y carcinoma hepatocelular.

Introducción: El cáncer colorrectal (CCR) y el carcinoma hepatocelular (CHC) son neoplasias que afectan el tracto gastrointestinal con alta incidencia y mortalidad. Ambas neoplasias suelen presentar resistencia a los tratamientos convencionales y elevados porcentajes de recidivas, por lo que se requieren nuevas terapias alternativas. Recientemente se han implementado distintas estrategias como el uso de células madre mesenquimales (CMM) para la entrega de moléculas antitumorales como el ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL). TRAIL y su forma soluble (TRAILs) son capaces de inducir apoptosis de manera selectiva por la vía extrínseca en células tumorales, mediante la interacción con los receptores de muerte DR4 y DR5. Sin embargo, a su vez la terapia con TRAIL presenta limitantes como el desarrollo de mecanismos de resistencia. Los compuestos bioactivos del grupo de los polifenoles como el resveratrol (RSV) y la epigallocatequina galato (EGCG) han mostrado actividad antitumoral en diferentes líneas celulares y se han explorado como agentes sensibilizadores por sus efectos mostrados en vías de señalización clave. **Objetivo:** Evaluar el efecto de los compuestos RSV y EGCG sobre la expresión de los receptores DR4 y DR5 como mecanismo para sensibilizar a TRAIL soluble en líneas celulares de CCR y CHC. **Materiales y métodos:** Los compuestos RSV y EGCG fueron disueltos en DMSO (0.2%) y se evaluó la viabilidad celular a las 24 y 48 horas utilizando concentraciones en el rango de 1-100 μM . Posteriormente se seleccionaron las concentraciones de RSV o EGCG para el pre-tratamiento de células tumorales e implementar en los ensayos de co-cultivo con CMM-TRAILs. Las CMM-TRAILs fueron seleccionadas durante una semana con genética para asegurar la expresión de TRAILs, que se confirmó por la producción del gen reportero GFP mediante observación en el microscopio de epifluorescencia. De los ensayos de co-cultivo se evaluó la viabilidad celular a las 48 horas posteriores al pre-tratamiento con los compuestos. Finalmente se evaluó la expresión de los receptores de muerte DR4 y DR5 en Caco-2 después del pre-tratamiento con RSV como posible mecanismo de sensibilización a TRAILs mediante RT-qPCR, la expresión del receptor DR5 también fue confirmada mediante inmunofluorescencia. **Resultados:** El RSV (100 μM) mostró porcentajes de muerte celular (PMC) menores al 21% en las líneas Caco-2 y Huh-7 al evaluar la viabilidad celular a las 24h, mientras que para CMT-93 fue del 100%. En el caso del tratamiento con EGCG (60 μM) se alcanzó el 100% de PMC para Caco-2 y Huh-7 y se logró calcular la IC_{50} a las 24h. Se determinó que posterior a su selección el 89.59% de las CMM-TRAILs expresan GFP. En los ensayos de co-cultivo se observó que el pre-tratamiento con RSV (40 y 100 μM) aumentaron de manera significativa el PMC mostrado en Caco-2 y Huh-7 ($p \leq 0.05$), pero no en CMT-93. Los ensayos de co-cultivo con EGCG (15 μM) no mostraron diferencia significativa en Caco-2 y Huh-7. Finalmente se observó que el RSV (100 μM) reguló a la alza los receptores de muerte DR4 y DR5 en Caco-2 mostrando una expresión 7 veces mayor al control. Sin embargo, la diferencia de expresión del receptor DR5 evaluada mediante inmunofluorescencia no resultó significativa. **Conclusión:** Nuestros resultados sugieren que el RSV a la concentración de 100 μM fue capaz de sensibilizar a TRAILs a la línea Caco-2 mediante el aumento en la expresión de los receptores DR4 y DR5.

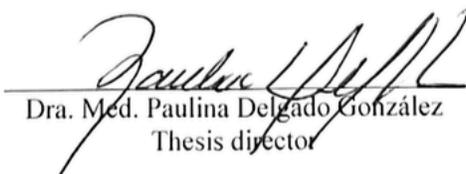

Dra. Med. Paulina Delgado González
Directora de tesis

1.1 Abstract

L.B.G. Sergio Iván Padilla Tello

Title: Evaluation of the cytotoxic effect of soluble TRAIL in combination with compounds resveratrol and epigallocatechin gallate in colorectal cancer and hepatocellular carcinoma cell lines.

Introduction: Colorectal cancer (CRC) and hepatocellular carcinoma (HCC) are neoplasms affecting the gastrointestinal tract with high incidence and mortality rates. Both tumors commonly exhibit resistance to conventional treatments and frequent recurrence, making the development of alternative therapies necessary. In recent years, different strategies have been implemented, such as the use of mesenchymal stem cells (MSCs) to deliver antitumor molecules like the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). TRAIL and its soluble form (sTRAIL) are capable of selectively inducing apoptosis in tumor cells via the extrinsic pathway through interaction with death receptors DR4 and DR5. However, TRAIL-based therapy also faces limitations due to the development of resistance mechanisms. Bioactive compounds from the polyphenol group, such as resveratrol (RSV) and epigallocatechin gallate (EGCG), have shown antitumor activity in various cell lines and have been explored as sensitizing agents due to their effects on key signaling pathways. **Objective:** Evaluate the effect of RSV and EGCG on the expression of death receptors DR4 and DR5 as a potential mechanism to sensitize tumor cells to soluble TRAIL in CRC and HCC cell lines. **Materials and Methods:** RSV and EGCG were solubilized in DMSO (0.2%), and cell viability was assessed at 24 and 48 hours using concentrations ranging from 1 to 100 μM . Selected concentrations of RSV or EGCG were used for pretreatment of tumor cells and subsequently applied in co-culture assays with MSC-sTRAIL. MSC-sTRAIL were selected for one week with geneticin to ensure sTRAIL expression, which was confirmed by GFP reporter gene expression under epifluorescence microscopy. Cell viability was evaluated 48 hours after pretreatment with the compounds in the co-culture assays. Finally, DR4 and DR5 expression was assessed in Caco-2 cells pretreated with RSV as a potential sensitization mechanism to sTRAIL using RT-qPCR, and DR5 expression was further evaluated by immunofluorescence. **Results:** RSV (100 μM) showed less than 21% cell death percentage (CDP) in Caco-2 and Huh-7 cell lines at 24 hours, while in CMT-93, CDP reached 100%. Treatment with EGCG (60 μM) resulted in 100% CDP in Caco-2 and Huh-7 and allowed IC_{50} determination at 24 hours. After selection, 89.59% of MSC-sTRAIL expressed GFP. In co-culture assays, pretreatment with RSV (40 and 100 μM) significantly increased CDP in Caco-2 and Huh-7 ($p \leq 0.05$), but not in CMT-93. Co-cultures with EGCG (15 μM) showed no significant differences in Caco-2 and Huh-7. Finally, RSV (100 μM) upregulated DR4 and DR5 expression in Caco-2 cells, with levels up to 7-fold higher than the control. However, the immunofluorescence analysis detected no statistically significant difference in DR5 expression. **Conclusion:** Our results suggest that RSV at a concentration of 100 μM was able to sensitize Caco-2 cells to sTRAIL by increasing the expression of DR4 and DR5 death receptors.



Dra. Med. Paulina Delgado González
Thesis director

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer se ha identificado como una de las principales causas de muerte en personas menores a los 70 años en el mundo. El aumento en su incidencia y mortalidad se asocia al incremento en la esperanza de vida y a los factores de riesgo que se asumen en conjunto con los cambios en el estilo de vida actual (Sung *et al.*, 2021).

El cáncer, según el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (NIH; NCI) se define como una enfermedad por la que algunas células del cuerpo se multiplican sin control y se diseminan a otras regiones. Este proceso inicia con un crecimiento anormal de células debido a una acumulación de mutaciones en genes reguladores clave como los supresores de tumor, oncogenes y aquellos involucrados en la estabilidad genómica. Las mutaciones adquiridas durante el tiempo son aquellas que determinan el paso de una proliferación no maligna a un tumor maligno mediante alteraciones en los procesos celulares relacionados a la proliferación, evasión de la apoptosis, inducción de la angiogénesis y generación de metástasis (Kontomanolis *et al.*, 2020).

El entorno en el que se desarrolla el cáncer comúnmente se le denomina microambiente tumoral y está compuesto por células tumorales, poblaciones de células no tumorales, vasos sanguíneos y matriz extracelular. La interacción dinámica entre estos componentes favorece la progresión tumoral, invasión de tejido adyacente, metástasis y la resistencia a tratamiento. (Anderson & Simon, 2020). La complejidad estructural y funcional del microambiente tumoral contribuye a la heterogeneidad del cáncer, que impacta directamente en la sensibilidad a las terapias utilizadas para su tratamiento (Dagogo-Jack & Shaw, 2018).

El tratamiento contra el cáncer depende en gran medida del órgano que se vea afectado y el estado de su progresión en que sea detectado. Las opciones de tratamiento convencionales son la remoción quirúrgica del tumor, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal o terapia inmunológica dirigida (Wang *et al.*, 2018). Sin embargo, se continua en la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas con la intención de que estas sean más precisas

y personalizadas a los requerimientos de cada paciente, tomando en cuenta las características moleculares del tumor y su posible evolución a futuro. Actualmente las terapias en desarrollo a grandes rasgos corresponden en: moléculas pequeñas, péptidos o proteínas, anticuerpos acoplados a medicamentos, terapia celular y terapia génica (Liu *et al.*, 2024).

Como resultado de los esfuerzos en busca de nuevos tratamientos contra el cáncer también ha cobrado relevancia el estudio de compuestos bioactivos de origen natural, debido a su baja toxicidad y capacidad de regular vías moleculares clave implicadas en la carcinogénesis, entre ellas las vías de AKT/PI3K, JAK/STAT y NF- κ B (Agrawal *et al.*, 2022). Con el estudio de estas moléculas, se han identificado compuestos polifenólicos como el resveratrol (RSV) y epigallocatequina galato (EGCG) que han sido ampliamente estudiados durante los últimos años por su potencial como agentes antitumorales de manera individual o en conjunto con otros agentes como quimioterapias.

En este proyecto se propone continuar en la búsqueda de terapias alternativas contra el cáncer y se pretende seguir un enfoque combinado utilizando la terapia celular con células madre mesenquimales (CMM), para la producción de la fracción soluble de una proteína inductora de la muerte celular programada como lo es el ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL). Además de esto, se propone utilizar a los compuestos bioactivos RSV y EGCG en una estrategia de pretratamiento para incrementar la susceptibilidad de las células tumorales a la fracción soluble de la proteína TRAIL (TRAILs) mediante el aumento en la expresión de los receptores de muerte celular DR4 y DR5.

3. ANTECEDENTES

3.1 *Cáncer del tracto gastrointestinal*

El cáncer asociado al tracto gastrointestinal corresponde a una cuarta parte de la incidencia mundial del cáncer, además de un 35% de muertes relacionadas a esta patología (Wang *et al.*, 2021). Las neoplasias del tracto gastrointestinal comprenden aquellas que afectan al esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto, hígado y órganos accesorios como vesícula biliar y páncreas (Rock *et al.*, 2022). De acuerdo con la GLOBOCAN hasta 2022, en México el cáncer colorrectal (CCR) y hepático se encuentran entre las 10 neoplasias más comunes (Ferlay *et al.*, 2024).

3.2 *Incidencia de cáncer colorrectal y hepático*

El CCR es el tercero a nivel mundial en incidencia según la GLOBOCAN, hasta el 2022 registrando un aproximado de 1,926,425 nuevos casos por año, presentando una alta mortalidad, siendo el segundo a nivel mundial con 904,017 defunciones por año, sólo por detrás de cáncer de pulmón (Ferlay *et al.*, 2024). Este es uno de los tumores más agresivos debido a su capacidad de realizar metástasis a pulmón, hígado, ovarios y otros órganos del sistema gastrointestinal (Islam *et al.*, 2022).

Por otra parte, el cáncer hepático tiene una incidencia de aproximadamente 866, 136 nuevos casos por año, colocándolo en el sexto lugar a nivel mundial, sin embargo, el cáncer de hígado ocupa el tercer lugar de mortalidad en el mundo. Esto con aproximadamente 758, 725 defunciones al año, justo por debajo del CCR y cáncer de pulmón (Ferlay *et al.*, 2024).

3.3 *Factores de riesgo asociados a cáncer colorrectal y hepático*

Se han identificado múltiples factores de riesgo asociados a CCR, los cuales participan en el incremento de la tasa de aparición de mutaciones en oncogenes y/o genes supresores de tumor, así como modificaciones a nivel epigenético que favorecen la aparición

del cáncer (Ionescu *et al.*, 2023). Los factores de riesgo pueden agruparse en dos grupos, como los que no son modificables (sexo, edad etc.) y modificables, principalmente aspectos relacionados al estilo de vida (Roshandel *et al.*, 2024).

La edad se considera otro factor de riesgo importante para el desarrollo de CCR, adultos mayores de 65 años tienen 3 veces más posibilidades de desarrollarlo que aquellos mayores de 50 a 64 años (Rawla *et al.*, 2019). A su vez también se ha observado que la presencia de un caso de CCR en familiares de primer grado eleva al doble de riesgo de desarrollarlo en comparación a la población en general (Thanikachalam & Khan, 2019).

Otros factores de riesgo que se han asociado al CCR son la etnicidad afroamericana, sexo masculino, estilo de vida sedentario, consumo excesivo de carne roja y carne procesada, consumo de alcohol y tabaco, entre otros (Loke *et al.*, 2020). En el caso del sexo masculino, los hombres poseen 1.5 más probabilidades de desarrollar CCR que las mujeres, sin embargo, las mujeres suelen presentar este cáncer de forma más agresiva que los hombres (Rawla *et al.*, 2019).

El carcinoma hepatocelular (CHC) que representa aproximadamente el 90% de los casos, es el tipo más común de cáncer hepático. Los principales factores de riesgo corresponden a cirrosis y la infección por los virus de hepatitis B (VHB) y C (VHC), además del consumo abusivo de alcohol o la ingesta de la aflatoxina B1. Sin embargo, comúnmente el CHC se origina en pacientes con fibrosis o cirrosis hepática avanzada (Llovet *et al.*, 2016; Toh *et al.*, 2023).

El principal factor de riesgo asociado a CHC es la cirrosis, independientemente de su etiología; esta se presenta entre un 70% a 90% de los pacientes que desarrollan cáncer primario en hígado. De igual manera, aquellos factores de riesgo que influyen en el desarrollo de la cirrosis impactan de gran manera en la posible aparición del CHC, entre los cuales se destacan la edad, sexo, raza, ser fumador o no fumador y estar diagnosticado con diabetes (Trad *et al.*, 2017). El segundo factor de riesgo más importante para el desarrollo de CHC corresponde a la infección crónica con hepatitis viral ya sea debido al VHB o VHC. Se calcula

que de un 10 al 25% de los casos de VHB progresan a CHC anualmente. Mientras que de igual forma por año esta cifra corresponde de 2 al 4% de pacientes con cirrosis crónica a costa de VHC. Cabe destacar que el CHC tiene una mayor prevalencia en pacientes con cirrosis originada a causa de una infección por VHC que por otras causas (Toh *et al.*, 2023; Trad *et al.*, 2017).

El CHC es 3 veces más común en hombres que en mujeres y la mayoría de los pacientes que lo padecen son mayores de 45 años. El consumo de alcohol también es un factor de riesgo importante para el desarrollo del CHC, ya que las probabilidades de desarrollar cáncer aumentan en un 46% con la ingesta de 50g de etanol al día, esto en comparación con quienes no consumen alcohol (Turati *et al.*, 2014). Se destaca que a nivel global en el 2019 se asoció un 19% de las muertes totales por CHC al consumo de alcohol (Huang *et al.*, 2023).

Así como se habló de factores de riesgo asociados al desarrollo del CCR o CHC, también existen factores protectores, los cuales se centran principalmente en aquellos aspectos modificables y que corresponden principalmente al estilo de vida adoptado. Los factores protectores para evitar el desarrollo del CCR incluyen la realización de actividad física de manera habitual, una dieta alta en fibra, ácido fólico, calcio, un elevado consumo de frutas y verduras, pescado, entre otros alimentos (Loke *et al.*, 2020; Thanikachalam & Khan, 2019).

Se destaca que la dieta es uno de los componentes principales del estilo de vida de las personas, por lo que también tiene un papel importante como factor de riesgo o protector según sea el caso (Monllor-Tormos *et al.*, 2023). Una de las dietas mayormente estudiadas por sus beneficios a la salud corresponde a la dieta mediterránea, que se ha asociado a la reducción del riesgo de padecer afecciones cardíacas y cardiovasculares, así como de desarrollar cáncer (D'Alessandro *et al.*, 2016). Esta se caracteriza por el elevado consumo de frutas, verduras, cereales y el uso del aceite de oliva como principal fuente de grasas. La dieta mediterránea se destaca también por un consumo moderado de vino tinto y muy pocas carnes rojas así como azúcares (Mahmod *et al.*, 2022). Previamente se ha reportado a la dieta

mediterránea como factor protector contra varios tipos de cáncer, entre ellos el esofágico, prostático, cáncer de mama, CCR, entre otros.

El rol protector de la dieta mediterránea se debe principalmente al contenido elevado de ácidos grasos insaturados y compuestos polifenólicos con propiedades antioxidantes que contienen sus alimentos principales (Mahmod *et al.*, 2022; Maruca *et al.*, 2019). Además de su potencial antioxidante, se ha identificado que compuestos polifenólicos participan directamente en procesos como la angiogénesis o proliferación celular y su consumo se ha asociado como un factor protector tanto como para CCR como para CHC (Ruiz-Margáin *et al.*, 2021; Yammine *et al.*, 2021).

Los factores protectores a pesar de que no son un tratamiento como tal para el cáncer pueden retrasar su aparición o progresión, al igual que los factores de riesgo pueden aumentar o acelerar el avance de la enfermedad a través de los distintos estadios hasta llegar a la metástasis (Weeden *et al.*, 2023).

3.4 Carcinogénesis

El CCR usualmente comienza con una proliferación no cancerosa de células epiteliales mucosas, las cuales se conocen como pólipos y pueden pasar hasta 20 años antes de que estos puedan volverse cancerosos (Dekker *et al.*, 2019).

El riesgo de desarrollar CCR incrementa con el crecimiento anormal de los pólipos. Cuando el crecimiento de estos se vuelve invasivo, se origina un adenocarcinoma que corresponde al 96% de los casos de CCR detectados (Rawla *et al.*, 2019). La carcinogénesis involucra múltiples mecanismos patofisiológicos, como son la resistencia a apoptosis, diferenciación celular, proliferación anormal e invasión de estructuras adyacentes, así como de metástasis distal (Ionescu *et al.*, 2023).

El desarrollo y progresión del CCR generalmente se ve asociado a la acumulación de mutaciones en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), P53 y las vías

Wnt/ β -catenina y del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). En el contexto del cáncer, la vía del EGFR cuando se encuentra activa regula múltiples funciones celulares, entre ellas la proliferación, metástasis y angiogénesis. Específicamente en CCR suele encontrarse sobreexpresada la epiregulina, proteína que estimula la vía del EGFR mediante la unión con este receptor en la membrana celular. Se ha observado también la misma sobreexpresión para el cáncer de mama, ovario, próstata, hígado etc. Tratamientos con anticuerpos monoclonales como el cetuximab o el panitumumab (anti-EGFR) están dirigidos a impedir el estímulo de esta vía. Sin embargo, se ha observado que mutaciones en el gen KRAS mantienen una señal de activación río abajo, la cual vuelve resistentes a las células tumorales al tratamiento proporcionado ya que se mantiene activa la vía independientemente de si existe o no un estímulo extracelular (Cheng *et al.*, 2021).

La vía de Wnt/ β -catenina también es de gran importancia en CCR debido a que preserva la homeostasis en los tejidos manteniendo un equilibrio entre proliferación y diferenciación celular. Esta vía, involucra la traslocación al núcleo de la β -catenina, la cual va a interactuar con factores de transcripción específicos para la activación de genes diana (Zhao *et al.*, 2022). La vía de Wnt/ β -catenina es una de las principales afectadas en CCR mediante mutaciones en varios de sus componentes proteicos, en específico, se tienen reportes de que el gen APC perteneciente a esta vía funcionando como un componente del sistema de degradación de la β -catenina en el citoplasma, se encuentra mutado en el 80% de casos de CCR, teniendo de esta manera una menor regulación sobre la expresión génica (Liu *et al.*, 2022).

Por otra parte, en el CHC desarrollado a partir de la cirrosis suele seguir una secuencia de eventos, primeramente se suelen desarrollar nódulos cirróticos con un bajo grado de displasia, estos nódulos con el tiempo progresan a nódulos con displasia de alto grado, que pueden originar el CHC de estadios tempranos, para finalmente seguir con su progresión a estadios más avanzados (Llovet *et al.*, 2016).

Las vías que se ven afectadas en el caso del CHC están estrechamente relacionadas con la etiología del cáncer, ya que, en el caso de la infección por el VHB esta puede ser un

detonante de CHC sin la necesidad de presentar cirrosis, se ha observado que en la mayoría de los casos de CHC (90%) desarrollados a partir de VHB, su genoma viral se encuentra integrado en el hospedero (Chidambaranathan-Reghupaty *et al.*, 2021). En estos casos es posible que se desarrolle el CHC debido a una integración cercana o que interrumpa algún gen relacionado a la progresión del ciclo celular, proliferación o metabolismo. Además, la proteína reguladora viral HBx está involucrada en rutas oncogénicas. Se ha reportado que puede interactuar con la proteína supresora de tumores p53, formando un complejo que impide su translocación al núcleo celular, lo que resulta en la inactivación de su función como factor de transcripción (Chidambaranathan-Reghupaty *et al.*, 2021; Tarocchi, 2014).

En el caso del origen del CHC debido a hepatitis viral es más común una progresión en primer lugar a cirrosis hepática y un posterior avance al carcinoma. Debido a que tanto el VHB como el VHC inducen daño de doble cadena en el ADN de la célula hospedera suele presentarse una cantidad considerable de mutaciones en los genomas de CHC. En este contexto, se ha observado en un gran porcentaje de casos una activación de la vía de Wnt/ β -catenina mediante mutaciones en CTNNB1 (11% - 37%) que impiden la degradación normal de β -catenina vía proteasoma. Además, se ha observado también la inactivación de otros genes como Axina 1 y APC en un porcentaje menor de los casos 10% y 1% correspondientemente, las cuales a su vez interfieren con la formación del complejo de degradación de la β -catenina (Audard *et al.*, 2007; Tümen *et al.*, 2022).

Cabe destacar también que en la mayoría de los casos de CHC (90%) independientemente de su etiología suele haber una re-expresión de la telomerasa, que en los hepatocitos sanos no se encuentra expresada. Esta suele aumentar su expresión principalmente en los nódulos cirróticos displásicos y suele estar entre las primeras mutaciones adquiridas en dirección al fenotipo canceroso (Llovet *et al.*, 2016).

3.5 Diagnóstico

Los signos y síntomas más comunes que suelen presentar los pacientes con CCR incluyen sangrado rectal ya sea oculto o evidente, anemia, dolor abdominal, pérdida de peso

inexplicable y cambio en hábitos intestinales. Sin embargo, en un gran número de casos no se presentan signos o síntomas hasta que el CCR llega a un estadio avanzado (Dekker *et al.*, 2019).

El diagnóstico confirmatorio del CCR se realiza mediante la colonoscopia que permite la obtención de una biopsia para el diagnóstico histopatológico. Al tiempo del diagnóstico generalmente el 80% de casos son localizados y sólo el 20% restante presenta metástasis (Thanikachalam & Khan, 2019). Según el AJCC (American Joint Committee on Cancer) la forma de describir los estadios es mediante la numeración del 0-4, en esta, entre más alto es el número, más avanzado se encuentra el cáncer. Se considera estadio 0 a la existencia de células anormales, mientras no exista diseminación. En los estadios del 1-3 aumenta su diseminación conforme al número. Por último en el estadio 4 ya hay metástasis a distintas partes del cuerpo. Además de esta numeración se tienen sub-clasificaciones mediante letras, dependiendo de si el tumor se encuentra localizado o se invade tejido adyacente, si se ven afectados los ganglios linfáticos o si existe metástasis.

En el caso del CHC, los signos y síntomas más comunes son la pérdida de peso, molestia abdominal, anorexia y disfunción hepática. El diagnóstico suele realizarse mediante imagenología, ya sean tomografías computarizadas o resonancia magnética. Por otra parte, se requiere una biopsia de aquellos pacientes sin otros factores de riesgo mayor para confirmar el CHC. El diagnóstico se vuelve complicado cuando el CHC se encuentra en las primeras etapas, debido a que las lesiones son muy pequeñas y no se distinguen correctamente, además de que las biopsias hepáticas tienen baja sensibilidad para la detección de CHC (70%-90%) por lo que de igual manera se recomienda que aquellos pacientes de los que existan sospechas de CHC no confirmadas por biopsia, se mantengan en monitoreo constante y de ser necesario realizar una segunda biopsia (Llovet *et al.*, 2016).

Existen múltiples sistemas para determinar los estadios del CHC, sin embargo el más utilizado y mayormente aceptado corresponde al propuesto por la clínica del cáncer hepático de Barcelona (BCLC). Este consta de 5 estadios para agrupar las neoplasias, en estos se toma en cuenta la escala de Child-Pugh (que evalúa función hepática), tamaño del tumor y

estadísticas de desempeño. El estadio 0 hace referencia a un estadio muy temprano en el que el tumor es muy pequeño y se conserva prácticamente la funcionalidad hepática en su totalidad, mientras que un estadio 4 ya presenta daño hepático severo con funcionalidad muy deteriorada y sin posibilidad de un tratamiento curativo, por lo que se restringe únicamente a tratamiento sintomático (Chidambaranathan-Reghupaty *et al.*, 2021).

3.6 Tratamiento

El tratamiento con quimioterapia para el CCR, dependerá en gran medida del estadio en el que se encuentre el paciente, si se ven afectados los ganglios linfáticos o si existe metástasis. Esta se administra ya sea como un adyuvante o con fines paliativos. Los tratamientos de primera línea incluyen el 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina (Xeloda) y oxaliplatino. En el caso de que exista metástasis se recurre a esquemas como FOLFOX o FOLFIRI que consisten en la combinación del oxaliplatino e irinotecan con el 5-FU y leucovorina correspondientemente, esto para potenciar su efecto (Wu, 2018). Sin embargo dependiendo del estado de salud del paciente y la posibilidad de resistir dichas combinaciones de fármacos, puede optarse por mantener un tratamiento individual con 5-FU ya sea de manera oral (capecitabina; Xeloda) o intravenosa (Wu, 2018).

La quimioterapia es un tratamiento inespecífico que actúa mediante diferentes mecanismos citotóxicos. Por ejemplo el oxaliplatino distorsiona la estructura del ADN, lo que interfiere de manera directa con la síntesis de ácidos nucleicos y la transcripción. De manera similar, el irinotecan actúa como un inhibidor de la topoisomerasa I, de tal forma que las células cancerosas acumulan roturas en el ADN, lo que obstaculiza los procesos de replicación y transcripción del ADN (Naeem *et al.*, 2022). Mientras que el 5-FU es un análogo de nucleótido capaz de inhibir la timidilato sintasa, enzima necesaria para la síntesis de pirimidinas (Wu, 2018).

Las quimioterapias pueden ser combinadas con algunas terapias dirigidas según sean las necesidades específicas de los pacientes, debido al grado de progresión y agresividad del cáncer detectado. Son comunes en el tratamiento de CCR las combinaciones de

quimioterapias con anticuerpos monoclonales, por ejemplo el cetuximab o panitumumab dirigidos a bloquear el EGFR. Sin embargo, para la efectividad de estas terapias es de gran importancia conocer los perfiles individuales de los genes KRAS y NRAS, debido a que si se encuentran mutados como se mencionó anteriormente, la vía continúa activa (Folprecht *et al.*, 2022; Wu, 2018).

A pesar de que solo el 20% de los nuevos casos diagnosticados presentan metástasis el CCR presenta aproximadamente un 45% de recidivas en sus pacientes posteriores a cirugías de resección. Aquellos pacientes detectados y sometidos a cirugía en estadios menores (1 y 2) presentan menor riesgo de una recidiva, siendo este entre el 5 - 20% (Shanmugam *et al.*, 2011; Thanikachalam & Khan, 2019).

Las recidivas y la resistencia a quimioterapia en el cáncer son ocasionadas principalmente por la presencia de células madre tumorales (CMT) localizadas en el microambiente tumoral. Estas CMT poseen el potencial de generar líneas celulares heterogéneas, además de la autorrenovación y diferenciación, destacando que estas CMT no son erradicadas por completo con el tratamiento de elección originando nuevamente un tumor (Rezayatmand *et al.*, 2022).

Las CMT han sido identificadas en CCR y otros tipos de cáncer como mama, hígado y próstata. Uno de los mecanismos más estudiados por el cual las CMT son multidrogo resistentes es la sobreexpresión de bombas de eflujo, en concreto aquellas pertenecientes a la superfamilia de los transportadores ABC (Munro *et al.*, 2018). En CCR las más comunes corresponden a ABCB1, ABCC1 y ABCG2, cuando estas están presentes se acelera el eflujo de los fármacos reduciendo en gran medida su eficacia confiriendo a las células de CCR el fenotipo resistente (Lei *et al.*, 2021).

En México la mayoría de casos de CCR suelen detectarse en estados avanzados, solo el 25% de los casos son diagnosticados en un estadio local, de los cuales aproximadamente la mitad desarrollará metástasis. También es importante destacar que la supervivencia mayor a 5 años en pacientes diagnosticados con CCR es muy baja, debido a que la mayoría presenta

tumores con mecanismos de resistencia a fármacos, lo que corresponde a aproximadamente el 90% de las metástasis (Andrade-Meza *et al.*, 2023).

El CHC suele tener un índice refractario elevado, después de una intervención quirúrgica aproximadamente un 70% de los pacientes experimentan una recidiva en un tiempo no mayor a 5 años (Llovet *et al.*, 2016).

La heterogeneidad del cáncer ha limitado la eficacia de las terapias convencionales como quimioterapia o radioterapia debido a que estas, ocasionan daño tanto a células sanas como cancerosas, resultando en un daño importante a los tejidos involucrados (Sharifi-Rad *et al.*, 2021). Actualmente las terapias alternativas que se encuentran en desarrollo corresponden a distintos enfoques como moléculas pequeñas, péptidos o proteínas, anticuerpos monoclonales, anticuerpos conjugados, terapia celular, terapia génica, virus oncolíticos, terapia fototérmica, terapia inhibidora de la angiogénesis y nanomedicina. Todo esto con el objetivo del desarrollo de terapias más específicas y efectivas en la prevención del crecimiento tumoral y desarrollo de metástasis (Liu *et al.*, 2024).

Dentro del enfoque de la terapia celular, se ha propuesto el utilizar células como vehículos biológicos que permitan la entrega dirigida de moléculas antitumorales en el sitio específico de localización del tumor y de esta manera mejorar su eficacia terapéutica, así como los efectos no deseados que podrían darse en caso de que la terapia fuera administrada de manera sistémica (Vicinanza *et al.*, 2022).

3.7 Células madre mesenquimales para la entrega de moléculas antitumorales

Las células madre mesenquimales (CMM) son células multipotentes de interés terapéutico que pueden ser aisladas de distintos órganos en el cuerpo, como por ejemplo de la médula ósea, tejido adiposo y cordón umbilical. Las CMM poseen cualidades que las vuelven importantes alternativas a considerar para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, tal es el caso de su capacidad de diferenciación en distintos linajes celulares, inmunomodulación, tropismo tumoral y baja inmunogenicidad (Lin *et al.*, 2022).

Se ha observado que las CMM son capaces de migrar a los sitios donde se encuentra el tumor cuando estas son administradas en modelos murinos en distintos tipos de cáncer, sin embargo su mecanismo aún no está bien descrito, pero se cree que la migración es principalmente mediada por citocinas y quimiocinas (Lan *et al.*, 2021). Está descrito que probablemente la influencia del microambiente inflamatorio sea la que hace a las CMM migrar hacia el tumor. Se han detectado anteriormente elevadas concentraciones del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en tejido tumoral, el cual se ha relacionado a promover la regulación al alza de la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) en las CMM, lo que permite su adhesión a las células endoteliales como primer paso de la intravasación (Sun *et al.*, 2014).

De esta manera citocinas inflamatorias, factores de crecimiento, quimiocinas y otros tipos de moléculas se ven involucradas en la migración de las CMM hacia la localización del tumor. Debido a esta característica de las CMM denominada “tumor homing”, recientemente se ha explorado su potencial como terapia alternativa contra el cáncer, ya sea de manera directa o como vehículo de entrega de moléculas antitumorales.

El uso de las CMM de manera directa como terapia alternativa contra el cáncer ha presentado una dualidad en la que bien se puede promover o inhibir el desarrollo tumoral, por lo que actualmente aun queda la duda de si esta terapia celular puede fungir como tratamiento contra el cáncer (Lan *et al.*, 2021). Por otro lado, es más aceptado el uso de CMM como vehículo para la entrega de moléculas con potencial antitumoral en el sitio específico del tumor. Esta estrategia, propone el uso de CMM modificadas genéticamente para expresar o secretar agentes que impidan la progresión del cáncer (Vicinanza *et al.*, 2022).

Se tienen registros de modificaciones genéticas diversas en CMM con el objetivo de la producción y/o la entrega de moléculas con potencial antitumoral, sin embargo, estas pueden dividirse en 4 grupos: Producción de miRNA's, producción de fármacos o profármacos, producción de virus oncolíticos y producción de proteínas (Shi *et al.*, 2025).

Un ejemplo de la modificación de MSC para la producción de miRNA's es el artículo publicado por Xie y colaboradores en el 2019, donde se transfectaron CMM con lipofetamina 2000 para sobreexpresar el miR-101-3p, ya que este fue identificado con un rol supresor de tumores, este miRNA fue excretado mediante exosomas que fueron aislados y caracterizados. La liberación de este miRNA en el microambiente tumoral tuvo como consecuencia la disminución en la expresión de COL10A1 en las células de carcinoma oral escamoso TCA8113, además de una menor capacidad de invasión y migración observada en ensayos Transwell (Xie *et al.*, 2019).

En el 2023 Klimova y colaboradores realizaron la exposición de CMM a gemcitabina, un agente quimioterapéutico, para que estas consecuentemente pudieran excretarla en vesículas extracelulares como alternativa al tratamiento de cáncer pancreático. Se observó en modelos murinos que estas vesículas fueron capaces de reducir el crecimiento tumoral mas eficientemente que la gemcitabina administrada de manera convencional (Klimova *et al.*, 2023).

En el caso de la producción de proteínas con potencial antitumoral, Studeny y colaboradores (2002) realizaron la modificación genética de CMM mediante un vector adenoviral para la expresión transitoria de IFN- β en el sitio del tumor, esperando que esta citocina ejerciera su rol antitumoral e inmunomodulador. Se reportó que las CMM-IFN- β inhibieron el crecimiento de células de melanoma *in vitro* (A375SM), así como el crecimiento de tumores inducidos en ratones desnudos. Comparando con la administración sistémica de IFN- β en los ratones desnudos, esto no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento del tumor, lo que indica la importancia de la producción de la molécula en el microambiente tumoral.

Existen otras opciones que se han explorado en cuanto a la modificación de CMM para la producción de proteínas con potencial antitumoral, tal es el caso de los interferones IFN- α , IFN- β , IFN- γ o las interleucinas IL-2, IL-12, IL-18 e IL-21 (Shi *et al.*, 2025). Sin embargo, en este trabajo se destaca el uso de TRAIL como terapia alternativa contra el cáncer.

3.8 TRAIL como terapia alternativa contra el cáncer

El ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) también conocido como Apo2L es una proteína transmembrana que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). TRAIL participa de manera importante en la inducción de apoptosis específicamente en células cancerosas mediante su trimerización e interacción con los receptores de muerte celular DR4 y DR5. Como se muestra en la Figura 1, los dominios de muerte citoplásmicos de DR4 y DR5 son capaces de inducir la activación de las caspasas-8/-10 (iniciadoras) que a su vez, pueden activar a las caspasas-3/-7 que son las efectoras de la apoptosis. Además de DR4 y DR5 los receptores “decoy” DcR1 y DcR2 son capaces de interactuar con TRAIL, sin embargo, estos carecen de dominio citoplásmico o poseen un dominio citoplásmico trunco no funcional correspondientemente, por lo que no tienen la capacidad de transducir la señal para la activación de la caspasa 8. Estos receptores funcionan como “señuelos” ya que son expresados normalmente en células sanas para protegerlas de la inducción de apoptosis mediante el secuestro de TRAIL. A los receptores señuelos mencionados anteriormente se suma la osteoprotegerina, que es una glicoproteína soluble también capaz de interactuar con TRAIL (Alizadeh Zeinabad & Szegezdi, 2022; Thapa *et al.*, 2020).

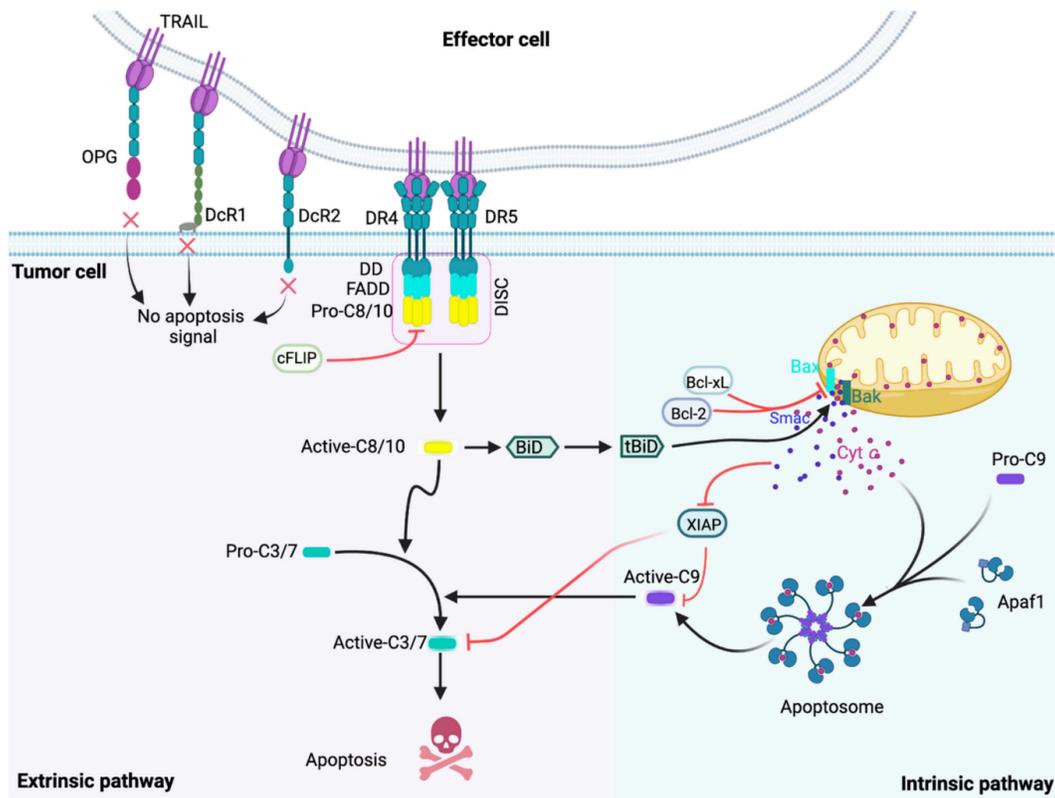


Figura 1. Mecanismo de inducción de apoptosis por TRAIL. TRAIL es capaz de activar tanto la vía extrínseca como intrínseca de la apoptosis al interactuar con los receptores de muerte DR4 y DR5 mediante la activación de la procaspasa 8. También se muestran los receptores señuelo, como estos compiten por el ligando TRAIL y como estos no son capaces de inducir la apoptosis (Alizadeh Zeinabad & Szegezdi, 2022).

Es de importancia mencionar que además de ser capaz de inducir la apoptosis, TRAIL también ha mostrado la capacidad de activar algunas vías antiapoptóticas como ERK, AKT y NF- κ B (Pimentel *et al.*, 2023). Se ha observado que TRAIL puede promover la formación de un complejo proteico secundario similar al complejo DISC con la diferencia de que este recluta proteínas para la activación de cinasas (Thapa *et al.*, 2020; Varfolomeev *et al.*, 2005). No obstante, las condiciones en las que se suelen activar estos mecanismos no están muy bien descritas y aun se encuentran en estudio (Guerrache & Micheau, 2024; Pimentel *et al.*, 2023).

TRAIL es normalmente expresado como una proteína transmembrana (TRAIL completo: TRAILc), sin embargo, su dominio extracelular puede ser escindido y en esta forma mantener su capacidad de inducir la apoptosis (TRAIL soluble: TRAILs), de esta

manera, al ya no ser imprescindible el contacto célula-célula TRAILs se ha vuelto un candidato importante en la terapia alternativa contra el cáncer (Cha *et al.*, 2004).

Se ha implementado con anterioridad el uso de TRAIL recombinante humano como potencial monoterapia antitumoral, este, corresponde a la fracción soluble de la proteína TRAIL. Sin embargo, existen algunas limitaciones como su corta vida media y rápida eliminación, además de que es posible que las células tumorales desarrollen resistencia a este (Quiroz-Reyes *et al.*, 2021; Thapa *et al.*, 2020). Los mecanismos de resistencia a TRAIL mejor descritos son la regulación a la baja de los receptores de muerte celular DR4 y DR5, incremento en la expresión de receptores “señuelo” o baja en la expresión de E-cadherina mediante la transición epitelial – mesenquimal (TEM), ya que se ha observado que la pérdida de esta tiene un efecto directamente en el ensamblado del complejo de señalización inductor de muerte (DISC). Este último mecanismo se ha reportado principalmente en CMT’s (De Looff *et al.*, 2019).

3.9 Mecanismos de resistencia a TRAIL

La resistencia a TRAIL puede ser intrínseca o adquirida y puede localizarse en distintos puntos de la ruta de señalización inductora de apoptosis. Se han reportado polimorfismos en los receptores de muerte celular (DR4 y/o DR5) las cuales se traducen en una menor unión con el ligando TRAIL, además de que también se han documentado mutaciones de pérdida de función principalmente en el receptor DR5, lo que confiere protección ante la señal proapoptótica (Gampa, 2023).

También la expresión de los receptores señuelo juega un papel importante en la resistencia a TRAIL, debido a que compiten directamente por la interacción con el ligando, cabe mencionar que además de este mecanismo de competencia, el receptor señuelo 2 se ha visto relacionado con la activación de la vía de NF- κ B promoviendo el crecimiento tumoral. De igual manera el receptor señuelo 1 está relacionado con la interrupción de la formación del complejo DISC (Gampa, 2023; Pimentel *et al.*, 2023).

Además de los distintos mecanismos que se pueden observar en cuanto a la expresión de los receptores de muerte y señuelos. También puede ejercerse regulación sobre la vía de transducción de señal ya que aunque TRAIL se una a los receptores de muerte celular, la proteína antiapoptótica c-FLIP puede unirse al complejo DISC formando un complejo inactivo impidiendo la activación de las caspasas. La proteína c-FLIP se ha mostrado sobreexpresada en líneas de cáncer de próstata, mama, pulmón entre otras, asociándose a un mal pronóstico (Gampa, 2023; Krueger *et al.*, 2001).

Otro mecanismo de resistencia a TRAIL son las mutaciones o silenciamiento génico en las caspasas-8/-10 (iniciadoras de la apoptosis), comprometiendo de esta manera su función (Jäger & Zwacka, 2010). De las caspasas iniciadoras, principalmente se ve afectada por mutaciones la caspasa-10. Estas mutaciones están asociadas con resistencia a TRAIL, y se han observado en células de cáncer de colon, gástrico y linfoma no Hodgkin, sin embargo, no se observa comúnmente en CHC (Jäger & Zwacka, 2010; Pimentel *et al.*, 2023). Por otra parte, como se observa en la Figura 2, proteínas antiapoptóticas como BCL-2, XIAP y survivina también han sido asociadas con la resistencia a TRAIL debido a su rol como reguladores negativos en esta vía (Pimentel *et al.*, 2023).

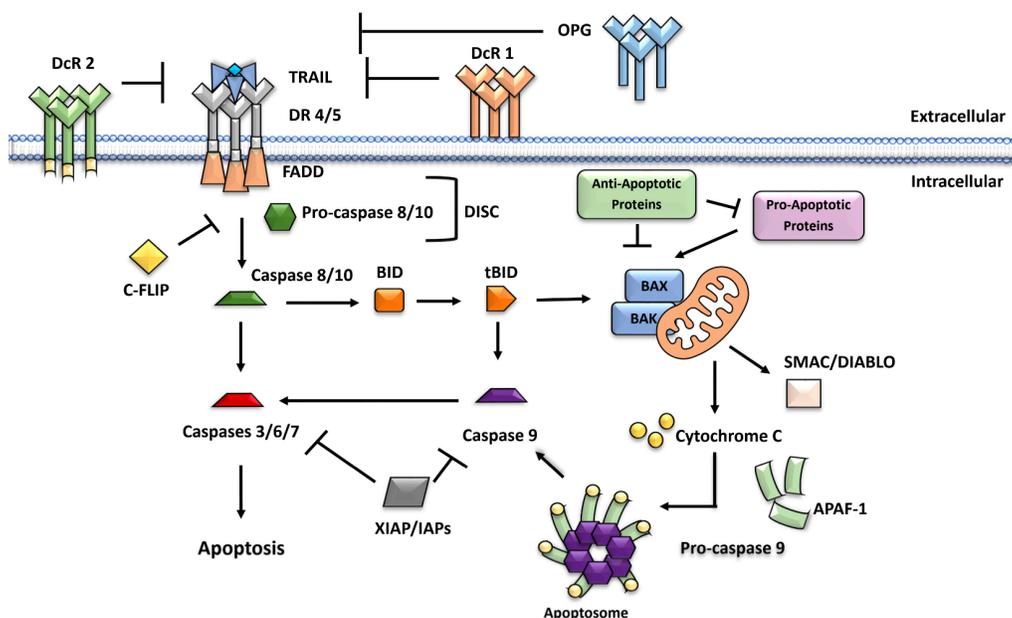


Figura 2. Mecanismos de resistencia a TRAIL. Los mecanismos de resistencia a TRAIL se pueden presentar en cualquier punto de la vía de señalización de TRAIL, se destacan a los

receptores señuelo 1, 2 y osteoprotegerina (DcR1, DcR2 y OPG), además de las proteínas (Pimentel *et al.*, 2023).

TRAIL representa una terapia alternativa contra el cáncer en desarrollo que posee ventajas como la inducción de apoptosis de manera selectiva en células tumorales, sin embargo debido a las limitantes y mecanismos de resistencia descritos anteriormente, actualmente se tiene interés en identificar moléculas que sean capaces de potenciar la actividad de TRAIL o de sensibilizar a las células tumorales resistentes, con el fin de mejorar su eficacia terapéutica.

3.10 Compuestos que aumentan la actividad de TRAIL

Dentro de las moléculas exploradas para incrementar la actividad de TRAIL (Tabla 1), se destacan los agentes quimioterapéuticos, factores de transcripción, terapias alternativas y los compuestos bioactivos. Siendo estos últimos a los que se les dará seguimiento en ese papel para este trabajo.

Tabla 1. Compuestos que aumentan la actividad de TRAIL

Compuesto	Mecanismo	Tipo de cáncer	Referencias
<i>Agentes quimioterapéuticos</i>			
Platino (IV) - LA12 o Cisplatino	Estimulación de la vía intrínseca de la apoptosis.	Colorrectal	(Jelínková <i>et al.</i> , 2014).
5-FU	Sobreexpresión de DR5 y regulación a la baja de survivina.	Hepático	(Yang <i>et al.</i> , 2017).
<i>Compuestos bioactivos</i>			
Icariin	Sobreexpresión de DR4 y DR5.	Colorrectal	(Kim <i>et al.</i> , 2020).
Epigallocatequina galato, Apigenina, Silibinina	Sobreexpresión de DR5.	Colorrectal Hepático	(Kwon <i>et al.</i> , 2020).

Resveratrol	Aumento en la co-localización de DR4 en balsas lipídicas.	Colorrectal	(Greenlee <i>et al.</i> , 2021).
<i>Otros agentes</i>			
Anticuerpo E-TR1-419	Sobreexpresión de DR4 y activación de caspasa 8.	Colorrectal	(Hao <i>et al.</i> , 2016).
Sorafenib	Regulación a la baja la forma activa de STAT3 y regulación a la baja de pJAK2.	Colorrectal Hepático	(Abdulghani <i>et al.</i> , 2013; Chen <i>et al.</i> , 2010).
KLF4	Sobreexpresión de DR4 Y DR5.	Gástrico	(To <i>et al.</i> , 2022).

3.11 Compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos se refieren a moléculas con actividad biológica en concentraciones específicas, recientemente han sido estudiados en mayor manera aquellos procedentes de plantas y alimentos como frutas y verduras. Estos compuestos poseen un gran número de ventajas, destacando su diversidad química y de procedencia, así como baja toxicidad y alta biodisponibilidad, por lo que han ganado popularidad y se presentan como alternativas atractivas, económicas y de fácil acceso para el tratamiento del cáncer en combinación con la quimioterapia o terapias alternativas (Naeem *et al.*, 2022).

Los compuestos bioactivos han demostrado con anterioridad efectos antitumorales en cáncer de pulmón, mama, ovario, colorrectal, entre otros (Naeem *et al.*, 2022). Además se ha demostrado su influencia en distintas rutas de señalización importantes en cáncer de manera simultánea y que las señales intracelulares generadas son las que propician eventos que llevan a la muerte celular de las células cancerosas (Naeem *et al.*, 2022). Algunos compuestos bioactivos, han mostrado gran potencial para aumentar la apoptosis inducida por TRAIL

mediante la modulación de las rutas de NF-kB, JAK/STAT, MAPKs y p53 entre otras (Dai *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2025).

Se considera que actualmente el 70% de las quimioterapias disponibles en el mercado y utilizadas en el área clínica han sido derivadas de compuestos bioactivos. Algunos ejemplos pueden corresponder al irinotecan, taxanos como el paclitaxel, etopósido etc. Sin embargo, estos tratamientos poseen la desventaja de que están dirigidos a un solo blanco terapéutico, por lo que es plausible que se adquieran mutaciones que desarrollen algún mecanismo de resistencia (Cragg & Newman, 2013). Un grupo de compuestos bioactivos de interés actual corresponde al de los polifenoles incluyendo a sus subclases estilbenoides, flavonoides, antocianinas, isoflavonas entre otros, ya que se tiene registro de su actividad antitumoral *in vitro*, por la inhibición de procesos como la proliferación, invasión, metástasis y la activación de la apoptosis. Los estilbenos y flavonoides corresponden a una parte importante de los compuestos bioactivos que forman parte de la dieta mediterránea que como se mencionó anteriormente se considera un factor protector para el desarrollo de CCR (Maruca *et al.*, 2019).

3.12 Resveratrol

El resveratrol ($C_{14}H_{12}O_3$) es un compuesto bioactivo polifenólico que forma parte del grupo de los estilbenoides, tiene un peso molecular de 228.24 g/mol y se encuentra principalmente en la piel de la uva (*Vitis vinifera*), por lo que también se encuentra dentro de la dieta mediterránea principalmente en el consumo del vino tinto. Investigaciones previas, han relacionado al RSV con el aumento de la expresión de la proteína apoptótica Bax, la glutatión reductasa y el factor de transcripción NRF2 que regula la expresión de enzimas antioxidantes en respuesta a estrés (Ko *et al.*, 2017). De esta manera se infiere que el RSV promueve la apoptosis y disminuye el crecimiento tumoral. También se ha observado que el RSV regula a la baja la expresión de COX-2 y TNF- α reduciendo de esta manera el microambiente inflamatorio tumoral (Ko *et al.*, 2017). Al modular la expresión de estas proteínas clave, el RSV tiene influencia en vías moleculares como NF-kB, Wnt/ β -catenina, EGFR y PI3K/AKT.

Debido a las cualidades de la molécula, se sabe que el RSV es sensible a la luz, al cambio de pH y al aumento de temperatura. Su isomero *trans*, al que se le atribuyen los efectos biológicos observados, es estable a temperatura ambiente y corporal a pH ácido, sin embargo este puede degradarse cuando el pH se vuelve alcalino (Tian & Liu, 2020). La absorción de la molécula de RSV se da mayormente por difusión pasiva, sin embargo se ha observado que también podría intervenir el transportador GLUT1 ya que cuando este fue inhibido, se disminuyó el consumo de RSV de manera significativa (Zhang *et al.*, 2023). En el metabolismo del RSV participan en gran medida el hígado y el intestino delgado, en estos órganos ocurre la formación de productos sulfatados y glucuronidados mediante la participación de enzimas como las UDP-glucuronosiltransferasas (UGT's) y sulfotransferasas (SULT's) (Wang & Sang, 2018). El colon participa en menor medida en el metabolismo del RSV; sin embargo se destaca que la microbiota es capaz de formar productos hidroxilados con el RSV no absorbido anteriormente. Principalmente los microorganismos *Adlercreutzia equolifaciens* y *Slackia equolifaciens* producen estos productos como el 3,4'-dihidroxi-trans-estilbeno (Wang & Sang, 2018).

La eliminación del RSV implica el procesamiento renal de los compuestos sulfonados y glucuronidados, que al ser más polares que el compuesto parental se facilita el filtrado glomerular y excreción en la orina (Riccio *et al.*, 2020).

Con anterioridad se ha utilizado este compuesto para sensibilizar líneas de melanoma (LU1205, WM9 y WM35) a TRAIL recombinante, encontrando que el RSV administrado a una concentración de 50 μ M mostraba una modulación de la vía NF- κ B y aumento de expresión de DR5 (Ivanov *et al.*, 2008). En cuanto a la actividad del RSV (30 μ M) en cáncer colorrectal (HCT116 y HT29) se ha observado que este no modula directamente la expresión de los receptores de muerte celular, sin embargo, favorece la trimerización de estos receptores en la superficie celular, así como a la formación del complejo DISC que está involucrado en el proceso de activación de la procaspasa 8 sensibilizando de esta manera las células cancerosas a TRAIL (Delmas *et al.*, 2004).

Mientras que en la línea celular Caco-2 se observó que el tratamiento con RSV ocasiona una sobreexpresión del receptor DR5 (Li *et al.*, 2015). En la línea celular de hepatocarcinoma HepG2 se observó que el tratamiento con RSV aumentó la sensibilidad a TRAIL mediante la regulación a la baja de la proteína antiapoptótica survivina. Este efecto se observó utilizando concentraciones de 50 μM – 100 μM de RSV (Tameda *et al.*, 2014).

El RSV (50 μM) también ha sido utilizado previamente como agente sensibilizador a quimioterapias como el oxaliplatino, sin embargo, se han encontrado resultados contrastantes ya que en células HCT116 se observó un efecto citoprotector, por lo que se sugiere precaución al desconocer si este es un efecto único de la línea celular empleada (Park, 2014).

3.13 Epigallocatequina galato

La EGCG ($\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$) también es un compuesto bioactivo que se encuentra dentro del grupo de los flavonoides, este tiene un peso molecular de 458.7 g/mol y es la catequina que se encuentra en mayor medida en el té verde (*Camellia sinensis*). Esta molécula es conocida principalmente por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales. Previamente EGCG ha mostrado actividad antitumoral en CCR inhibiendo proteínas participantes de las rutas de señalización dependientes de EGFR, JAK/STAT o mTOR mostrando múltiples blancos en contraste con agentes quimioterapéuticos (Kciuk *et al.*, 2023).

La EGCG debido a su estructura molecular es altamente susceptible a la oxidación en altas temperaturas, así como a pH neutral o básico. La degradación de este compuesto está ligada al decremento en su actividad antioxidante, sin embargo se requieren aún estudios en los productos de degradación de la EGCG para verificar si algunos de estos aún son de interés biológico o preservan algunas otras de sus cualidades iniciales y que posean un poco más de estabilidad (Wang *et al.*, 2022). La absorción de este compuesto se da principalmente en el intestino, además de que al igual que con el RSV una parte de su metabolismo lo realiza el hígado y la otra requiere la participación de la microbiota. La ruta primaria de metabolismo de la EGCG comprende la participación de la catecol-*O*-metiltransferasa (COMT),

posteriormente la catequina ya metilada se somete a procesos de glucuronidación por las UGT's o sulfonación por las SULT's para facilitar su transporte y eliminación por la orina al aumentar su solubilidad (Capasso *et al.*, 2025).

También es importante mencionar que se ha observado anteriormente que el tratamiento con EGCG (20, 40, 60 μ M) es capaz de aumentar la expresión del receptor DR5 en la línea celular de CCR SW480 y de esta manera suceptibilizar a TRAIL (Kwon *et al.*, 2020). De igual manera, se ha observado que en la línea HCT116 disminuye la expresión de los receptores DR4 y DR5 cuando se trata con EGCG 20 μ M. Los resultados mencionados anteriormente dan indicios de una respuesta diferente al tratamiento con EGCG según la línea celular utilizada (Kim *et al.*, 2016). En el caso de la línea celular HepG2, el tratamiento con EGCG reguló a la baja la proteína antiapoptótica c-FLIP (Abou El Naga *et al.*, 2013).

A continuación, se muestra en la Tabla 2 a manera de un breve resumen los antecedentes mencionados anteriormente sobre el uso de los compuestos RSV y EGCG como potenciadores de la actividad de TRAIL en experimentos *in vitro* en líneas de CCR y CHC destacando a grandes rasgos el mecanismo de acción observado. Se destaca que la mayoría de estos obtuvieron un efecto positivo, sin embargo no existe un consenso en los mecanismos identificados aunque los mayormente representados se refieren a la modificación en la expresión de los receptores de muerte celular DR4 y DR5.

Tabla 2. Antecedentes del uso de los compuestos RSV y EGCG en conjunto con TRAIL recombinante y su mecanismo de sensibilización observado.

Tipo de Cáncer	Mecanismo	Referencia
Resveratrol + TRAIL recombinante		
Hepático (HepG2)	Aumento de sensibilidad a TRAIL mediante una regulación a la baja de survivina.	(Tameda <i>et al.</i> , 2014).
Colorrectal (Caco-2)	Sobreexpresión de DR5.	(Li <i>et al.</i> , 2015).

Colorrectal (HT-29)	Distribución de receptores de muerte celular en balsas lipídicas aumentan la sensibilidad a TRAIL.	(Delmas <i>et al.</i> , 2004).
Epigalocatequina galato + TRAIL recombinante		
Colorrectal (HCT116, SW480)	Aumentó la expresión de DR5 a nivel transcripcional y de proteína.	(Kwon <i>et al.</i> , 2020).
Hepático (HepG2)	Regulación a la baja de c-FLIP.	(Abou El Naga <i>et al.</i> , 2013).
Colorrectal (HCT116)	Activación de la vía autofágica. Regulación a la baja de DR4 y DR5.	(Kim <i>et al.</i> , 2016).

3.14 Antecedentes directos

Nuestro equipo de trabajo previamente diseñó y caracterizó sistemas de expresión constitutiva de la fracción soluble de la proteína TRAIL (TRAILS) y de la proteína TRAIL completa (TRAILc). Esto se logró mediante la transducción de células madre mesenquimales de médula ósea murinas, utilizando un vector lentiviral, también se incluyó el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP) y el marcador de selección de resistencia a la genética.

Debido a la intención de implementar este sistema *in vivo* en el futuro, se continuó con la línea de investigación principalmente utilizando la línea celular productora de TRAILS debido a que de esta manera no se tiene la limitante de un forzoso contacto célula – célula para la inducción de apoptosis. De igual manera aunque la proteína se sabe que posee una corta vida media, esta se produciera de manera constante.

Las CMM's productoras de TRAILS previamente han demostrado tener un efecto citotóxico y apoptótico en las líneas celulares de cáncer colorrectal Caco-2 y CMT-93. La línea celular de CCR Caco-2 fue caracterizada previamente por Quiroz-Reyes y colaboradores (2023) como moderadamente resistente a TRAIL, lo que la hace ideal para

estudiar los compuestos bioactivos que pudieran potenciar la actividad de TRAILs. Por otra parte, la línea celular CMT-93 fue caracterizada como susceptible a TRAILs.

Quiroz-Reyes y colaboradores (2023) mediante un ensayo de activación de caspasas confirmaron que la muerte celular que induce el sistema de expresión de TRAILs es la apoptosis. En su proyecto de investigación, se utilizó oxaliplatino como agente quimiosensibilizador aumentando el efecto apoptótico mediado por TRAILs en las líneas celulares de CCR Caco-2 y CMT-93, quimiorresistente y quimiosensible respectivamente (Quiroz-Reyes *et al.*, 2023).

De tal manera que el estudio aquí propuesto consistió en evaluar si los compuestos bioactivos RSV y EGCG son capaces de sensibilizar las líneas celulares de CCR (Caco-2, CMT-93) y CHC (Huh-7) a TRAIL soluble mediante un posible aumento en la expresión de receptores de muerte celular DR4 y DR5. Cabe destacar que, hasta antes de este trabajo, los compuestos propuestos solo habían sido evaluados en combinación con TRAIL recombinante y no con un sistema de producción continua como el de CMM transducidas para producción de TRAILs implementado anteriormente por nuestro equipo de trabajo. Debido a esto, se desconoce si las CMM-TRAILs serán capaces de inducir apoptosis posterior a una sensibilización con los compuestos previamente mencionados.

4. JUSTIFICACIÓN

El adenocarcinoma colorrectal y el carcinoma hepatocelular son neoplasias agresivas que representan alta incidencia y mortalidad en el mundo. Los tratamientos convencionales contra el cáncer tienen desventajas, como el daño no selectivo a tejido y el desarrollo de resistencia.

Se ha demostrado previamente la capacidad de la proteína TRAIL para inducir apoptosis selectiva en células cancerosas mediante la interacción con receptores de muerte celular (DR4 y DR5). Sin embargo, a su vez esta alternativa presenta limitantes por lo que se requieren tratamientos que mejoren o potencien la actividad de TRAIL.

Los compuestos bioactivos resveratrol y epigallocatequina galato han mostrado actividad antitumoral en distintas líneas celulares mediante múltiples mecanismos de acción y modulación de vías relacionadas con la proliferación celular y apoptosis. Por lo que se propone evaluar el posible efecto citotóxico de TRAIL soluble expresado por CMM en combinación con los compuestos resveratrol y epigallocatequina galato en líneas celulares de cáncer colorrectal y carcinoma hepatocelular.

5. HIPÓTESIS

Los compuestos bioactivos resveratrol y epigallocatequina galato son capaces de sensibilizar líneas de cáncer colorrectal a TRAIL soluble mediante el aumento de expresión de receptores de muerte celular DR4 y DR5 en líneas celulares de cáncer colorrectal y carcinoma hepatocelular.

6. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de los compuestos resveratrol y epigallocatequina galato sobre la expresión de los receptores DR4 y DR5 como mecanismo para sensibilizar a TRAIL soluble en líneas celulares de cáncer colorrectal y carcinoma hepatocelular.

Objetivos Específicos

1. Determinar las concentraciones inhibitorias medias (IC_{50}) para RSV y EGCG en líneas celulares de cáncer colorrectal y carcinoma hepatocelular.
2. Analizar el efecto citotóxico de los compuestos en células tumorales mediante un sistema de co-cultivo basado en células madre mesenquimales que sobreexpresan TRAIL soluble.
3. Evaluar los niveles de expresión de los receptores de muerte celular DR4 y DR5 mediante RT-qPCR e inmunofluorescencia a distintas concentraciones de RSV y EGCG.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL

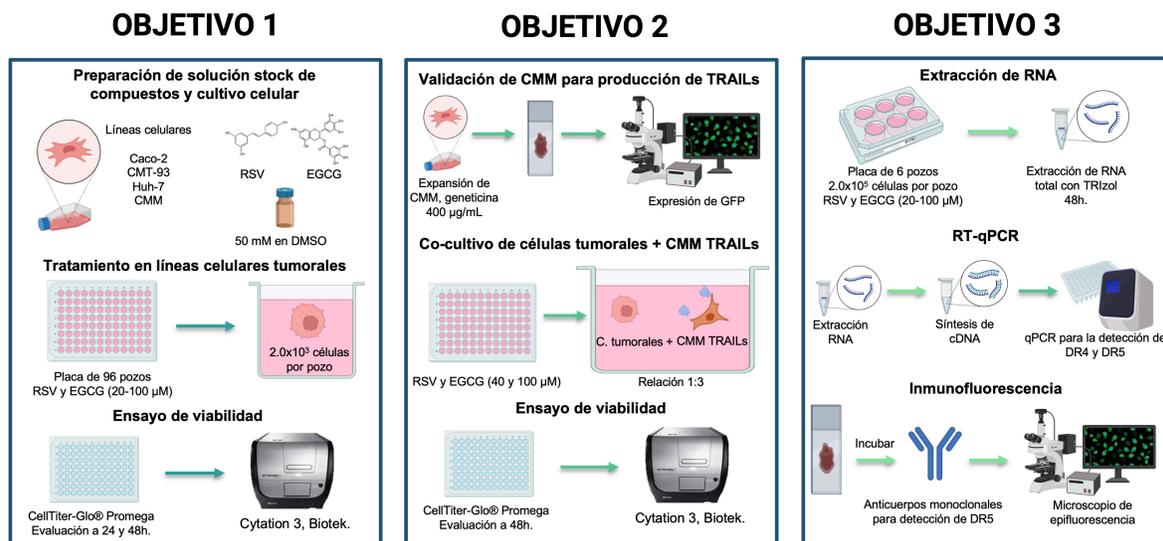


Figura 3. Metodología general. **Objetivo 1:** Se prepararon soluciones stock de los compuestos RSV y EGCG a 50 mM utilizando DMSO como solvente, estas fueron almacenadas hasta su tiempo de uso en oscuridad a -20 °C. Se administró un tratamiento con los compuestos RSV o EGCG en un rango de 1-100 µM sembrando 2.0x10³ células por pozo en placas de 96 pozos y se evaluó la viabilidad celular mediante el kit CellTiter-Glo® a las 24 y 48 horas. **Objetivo 2:** Se seleccionaron las CMM-TRAILs con geneticina y se validó la expresión de TRAILs en las CMM transducidas, esto mediante microscopía de fluorescencia observando la expresión del gen reportero GFP. Se implementó un sistema de co-cultivo entre CMM-TRAILs y células de CCR o CHC tratadas con RSV o EGCG. Se evaluó la viabilidad celular mediante el kit CellTiter-Glo® a las 48 horas. **Objetivo 3:** Se realizó la extracción de ARN total mediante TRIzol™, para posteriormente realizar la retrotranscripción y qPCR utilizando primers específicos para la detección de los receptores DR4 y DR5. Finalmente, se realizó un ensayo de detección por inmunofluorescencia para confirmación de la expresión del receptor DR5 en la membrana celular.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 *Expansión in vitro de líneas celulares*

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo, fueron las de cáncer colorrectal Caco-2 (ATCC[®] HTB-37) y CMT-93 (ATCC[®] CCL-223) humana y murina correspondientemente. También fue incluida la línea celular de carcinoma hepatocelular humano, Huh-7 (JCRB Cell Bank[®] JCRB0403).

Para los experimentos de co-cultivo, se empleó un sistema de producción de la fracción soluble de la proteína TRAIL (TRAILS) expresada por parte de células madre mesenquimales de médula ósea murinas (CMM-TRAILS) las cuales fueron modificadas genéticamente por medio de transducción lentiviral para este propósito (Quiroz-Reyes *et al.*, 2022). También se emplearon como control CMM no modificadas genéticamente.

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) 100 µg/mL gentamicina y 2.5 µg/mL de anfotericina B, todos provenientes de la casa comercial Gibco[™] y fueron incubadas en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37 °C.

8.2 *Preparación de soluciones stock de resveratrol y epigallocatequina galato*

Los compuestos resveratrol (RSV) y epigallocatequina galato (EGCG) fueron adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich (R5010; E4143) y se solubilizaron en DMSO a una concentración de 50 mM. Estas soluciones se resguardaron de la luz a -20 °C en refrigeración constante. A partir de estas soluciones stock se prepararon las diluciones pertinentes en el medio de cultivo para la administración de tratamientos a las células tumorales en los rangos de 1-100 µM.

8.3 Tratamiento de células tumorales con RSV y EGCG

El tratamiento de las líneas celulares tumorales se realizó utilizando rangos de concentraciones entre 1-100 μM de RSV y EGCG. Primeramente, se sembraron por triplicado para cada control o grupo experimental 2.0×10^3 células por pozo en placas 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. Posteriormente se agregaron los compuestos RSV o EGCG en las concentraciones deseadas diluidos en el medio de cultivo, alcanzando un volumen final de 100 μL . Las células se incubaron a 37 °C en atmósfera con 5% de CO_2 .

Durante cada determinación se incluyó un blanco por triplicado, consistente de pocillos con únicamente medio de cultivo para realizar la resta de la luminiscencia de fondo. Asimismo, se utilizaron los siguientes controles normalizadores: control de viabilidad de células tumorales y un control para evaluar el efecto del DMSO (0.2%).

Los grupos experimentales de tratamiento en el caso del RSV para la lectura a las 24 horas se incluyeron las concentraciones de: 20, 40, 60, 80 y 100 μM . Mientras que para el tratamiento con RSV a las 48 horas: 40 y 100 μM . Para los grupos experimentales de tratamiento con EGCG en la línea Caco-2 para la lectura a las 24 horas se incluyeron las concentraciones de: 1, 5, 10, 15, 20, 40 y 60 μM . Mientras que para la línea Huh-7 en la lectura a las 24 horas se incluyeron: 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 40 y 60 μM . Para las lecturas a las 48 horas con el tratamiento de EGCG se incluyeron las concentraciones de: 10, 15 y 20 μM . Cabe destacar que la concentración de 10 μM fue únicamente utilizada para la línea Huh-7 mientras que la de 20 μM únicamente se utilizó en Caco-2.

8.4 Ensayo de citotoxicidad

El porcentaje de muerte celular (PMC) se evaluó a las 24 y 48 horas posteriores a los tratamientos con RSV o EGCG mediante la medición de luminiscencia utilizando el kit CellTiter-Glo[®] Luminiscent Cell Viability Assay de la casa comercial Promega (G7572), siguiendo las instrucciones del fabricante. Describiendo de manera breve el protocolo, este

consistió en que al momento de finalizar la incubación del ensayo y realizar la lectura de la placa se agregó un volumen del reactivo de CellTiter-Glo[®], en este caso 100 µL a cada pocillo debido a que el volumen final de nuestros tratamientos fue también de 100 µL. Posteriormente se agitó la placa durante 2 minutos, después se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se realizó la lectura de la placa en el equipo Cytation 3 (BioTek).

Para el análisis de resultados se determinó el PMC mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de muerte celular} = 1 - \left(\frac{\text{Luminiscencia del tratamiento} - \text{luminiscencia promedio del blanco}}{\text{Luminiscencia promedio del control}} \right) \times 100.$$

8.5 Validación de CMM para producción de TRAILs

En la construcción empleada para la transducción de las CMM-TRAILs se contenía la secuencia del transgen de TRAILs bajo el promotor del factor de elongación 1-alfa (EF1-a), de esta manera se permite una expresión constitutiva y elevada. Además el vector también contiene el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP) por lo que la expresión de esta, fue indicadora de la proteína TRAILs. Se descongeló un vial de CMM-TRAILs y se realizó la selección durante 1 semana con 400 µg de geneticina por mililitro de medio de cultivo, posteriormente se validó la señal de GFP como indicador de la expresión de TRAILs utilizando un microscopio de epifluorescencia (ZEISS - AXIO imager.A2). Finalmente se cuantificó el porcentaje de células que expresan la GFP mediante análisis de imágenes en el software Image J.

8.6 Análisis de actividad antitumoral de CMM-TRAILs en co-cultivo con células de CCR y CHC pretratadas con RSV o EGCG

Se analizó si la actividad antitumoral de CMM-TRAILs (en relación 1:3) se ve potenciada al implementar un sistema de co-cultivo con las células de CCR o CHC tratadas con RSV o EGCG. Previo al ensayo, se realizó una prueba con CMM no transducidas para verificar que los compuestos RSV o EGCG no las afectaran en gran medida a las 24 horas de

agregado el compuesto como tratamiento, esto para asegurarnos de que al momento de agregar las CMM-TRAILs estas pudieran mantenerse en el medio y producir la proteína TRAILs.

Se sembraron por triplicado para cada control o grupo experimental 2×10^3 células tumorales por pozo en una placa de 96 pozos en 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. Posteriormente, se llevó a cabo una estrategia de pretratamiento con RSV y EGCG durante 24 horas, empleando dos concentraciones para cada compuesto (RSV: 40 μM y 100 μM) y (EGCG: 10 μM , 15 μM y 20 μM). Transcurrido el tiempo del pretratamiento (24 h), se agregaron las CMM-TRAILs (en relación 1:3) y se incubaron durante 24 horas más, para finalmente evaluar el PMC como fue previamente descrito a las 48 horas del pretratamiento con los compuestos RSV o EGCG.

Al igual que en el ensayo de citotoxicidad inicial se incluyó un blanco para la obtención de la luminiscencia de fondo. También se incluyeron controles normalizadores: control de viabilidad de células tumorales, control de efecto del DMSO (0.2%). Además se incluyó el control de muerte celular con DMSO al 40%.

En el caso del RSV los grupos experimentales para el co-cultivo de las células tumorales fueron: RSV 40 μM , RSV 40 μM + CMM-TRAILs, RSV 100 μM , RSV 100 μM + CMM-TRAILs y CMM-TRAILs (1:3) como único tratamiento; todos estos realizados por triplicado. Los grupos experimentales para el co-cultivo de los pretratamientos con EGCG en células tumorales fueron: EGCG 15 μM , EGCG 15 μM + CMM-TRAILs, EGCG 20 μM (Caco-2), EGCG 20 μM + CMM-TRAILs (Caco-2), EGCG 10 μM (Huh-7), EGCG 10 μM + CMM-TRAILs (Huh-7) y CMM-TRAILs (1:3) como único tratamiento; todos estos realizados por triplicado.

8.7 Extracción de ARN

Se realizó la extracción de ARN total con el reactivo de TRIzol™ adquirido de la casa comercial Invitrogen™ (15596026). Se sembraron por duplicado 2.0×10^5 células tumorales

por pozo en placas de 6 pozos (Corning™, 10146810). Las extracciones de ARN fueron realizadas a partir de una muestra compuesta de ambos pocillos a las 48 horas posteriores a la administración del tratamiento de RSV o EGCG. Brevemente, la técnica de extracción de ARN consistió en el agregado de 40 µL de cloroformo por cada 200 µL de TRIzol™ empleados, se mezcló e incubó en hielo. Posteriormente las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 13,000 rpm a 4 °C, después se recuperó la fase acuosa y se adicionaron 500 µL de isopropanol por cada mL de TRIzol™ empleado. A continuación las muestras fueron incubadas durante 1 hora a -80 °C y se centrifugó nuevamente utilizando las mismas condiciones iniciales. Finalmente se removió el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol frío por cada mL de TRIzol™ empleado, se volvió a centrifugar con las mismas condiciones para después retirar el etanol, dejar secar la pastilla y resuspender en agua DEPC. El ARN total obtenido fue cuantificado mediante espectrofotometría UV/Vis evaluando su absorbancia a 260 nm utilizando el equipo NanoDrop™ 2000 (Thermo scientific) y se verificó su calidad y pureza mediante el cálculo de los coeficientes A260/280 y A260/230. Posteriormente el ARN fue sometido a tratamiento con DNasa I (Invitrogen™, 18068015) siguiendo las instrucciones del fabricante para eliminar el ADN genómico previo a la retrotranscripción.

8.8 Retrotranscripción

Se realizó la retrotranscripción del ARN obtenido (partiendo desde 100 ng de ARN) mediante el kit comercial SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit de la casa comercial Invitrogen™ (11754050). De manera breve, para una reacción se utilizaron 4 µL de 5X VILO™ Reaction Mix, 2 µL de 10X SuperScript™ Enzyme Mix, 100 ng de ARN y se aforó a 20 µL con agua libre de nucleasas. La reacción se mezcló y se incubó en el termociclador siguiendo el programa de temperaturas: 25 °C durante 10 minutos, 42 °C durante 60 minutos y 85 °C durante 5 minutos. Posteriormente el ADNc obtenido fue nuevamente cuantificado mediante espectrofotometría UV/Vis evaluando su absorbancia a 260 nm en el NanoDrop™ 2000 para tomando en cuenta su concentración preparar las diluciones para la qPCR en la cual se agregaron 100 ng de ADNc.

8.9 qPCR

Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando el kit comercial SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems™, 4309155) en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems™, N8010560), utilizando el instrumento 7500 Fast de Applied Biosystems. Para una reacción de 10 µL se agregaron 5 µL de SYBR™ Green Master Mix (2X), 1 µL de FWD primer 200 nM, 1 µL de REV primer 200 nM, 100 ng de ADNc y se aforó a 10 µL con agua libre de nucleasas. Como parte de la programación del equipo se incluyeron las temperaturas de desnaturalización inicial con 2 minutos a 50 °C, seguido de 10 minutos a 95 °C. A continuación, se muestra el programa de temperaturas para la fase de extensión con una duración de 40 ciclos: 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Finalmente para terminar la reacción se utilizó un Se analizó la expresión relativa de los receptores DR4 y DR5 empleando el método de Livak $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen endógeno. Se muestra en la tabla 3 las secuencias de los primers utilizados.

Tabla 3. Secuencias de primers

Gen	Secuencia	Referencia
GAPDH	Forward: TCACCACCATGGAGAAGGCTG Reverse: GCATGGACTGTGGTCATGAGT	(Liu <i>et al.</i> , 2001)
DR4	Forward: CTGACCCCACTGAGACTCTGA Reverse: TGCTGTACCAGCTCTGACCAC	N/A
DR5	Forward: GTGCCCTTTGACTCCTGGGAG Reverse: GCACCAAGTCTGCAAAGTCA	(Mashayekhi <i>et al.</i> , 2020)

8.10 Inmunofluorescencia

Se utilizaron anticuerpos policlonales específicos para la detección del receptor de membrana DR5 (ab8416; abcam). Se cultivaron las células sobre un portaobjetos recubierto previamente con poly-L-lisina, se fijó con metanol-acetona durante 10 minutos y posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar el fijador. A continuación se

lavó con buffer TBST durante 3 minutos y se incubó con buffer TRS para mejorar la exposición de los antígenos durante 20 minutos. De manera subsecuente se lavó nuevamente con TBST y se incubó con una solución de bloqueo de proteínas durante 30 minutos a 37 °C. Como siguiente paso, se realizó la incubación con el anticuerpo primario (ab8416, 1:1000; abcam) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se lavó con TBST durante 5 minutos (2x) y se adicionó el anticuerpo secundario (ab150113, 1:1000; abcam) con el cual se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Después se lavó con TBST (5 min; 2x) y se aplicó el medio de montaje DAPI para teñir los núcleos celulares. Finalmente se analizó la presencia del receptor mediante visualización en el microscopio de epifluorescencia y análisis de imágenes mediante el software ImageJ.

8.11 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software de GraphPad Prism (Versión 9.00). Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $P < 0.05$.

9. RESULTADOS

9.1 Expansión *in vitro* de líneas celulares

En la Figura 4 se muestran imágenes representativas del cultivo celular. Se siguieron las recomendaciones de ATCC para el cultivo de las células Caco-2 (A), CMT-93 (B), Huh-7 (C) y CMM (D). Las células Caco-2 mostraron la morfología epitelial heterogénea característica descrita por ATCC como células cuboidales (Figura 4A). Las células CMT-93 son descritas con morfología epitelial cuboide o poligonal (Figura 4B). Por otra parte, Huh-7 es descrita con morfología epitelial, poligonal a ovalada (Figura 4C). Por último, las CMM, presentan morfología mesenquimal fibroblastoide (Figura 4D).

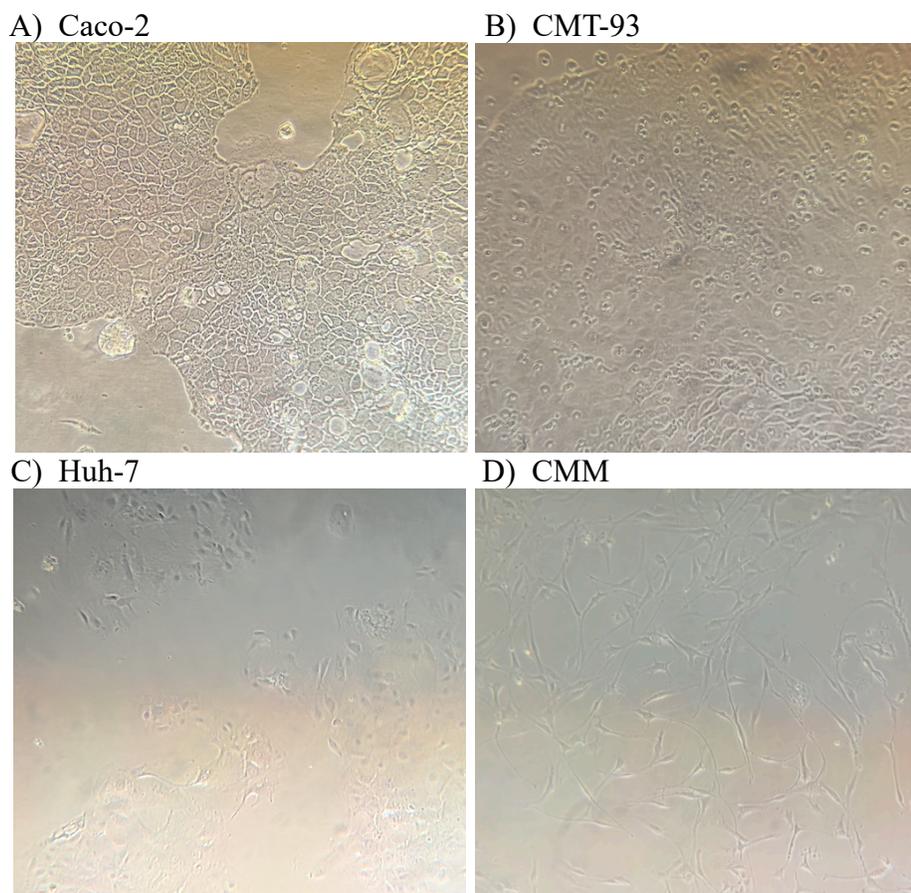


Figura 4. Cultivo celular de la línea Caco-2 (A) de adenocarcinoma colorrectal humano, CMT-93 (B) línea de cáncer colorrectal murino, Huh-7 (C) línea de carcinoma hepatocelular humano y CMM (D) de médula ósea murina (objetivo 10X).

9.2 Preparación de compuestos

Los compuestos RSV y EGCG fueron solubilizados en DMSO a la concentración de 50 mM y posteriormente diluidos en el medio de cultivo (DMEM) hasta alcanzar las concentraciones deseadas en el rango de 1-100 μ M. Debido a que el DMSO es un agente citotóxico, se decidió verificar la seguridad de la concentración final de DMSO alcanzada para los experimentos preparando controles.

9.3 Ensayos de citotoxicidad

Como se observa en la Figura 5, se le aplicó el tratamiento con DMSO a las concentraciones del 0.2 y 0.4% a las células y se comparó su PMC con el control no tratado y cultivado bajo las mismas condiciones. Se muestra como el DMSO a la concentración del 0.4% presentó un PMC mayor al 20% (21.67%), mientras que la concentración del 0.2% fue más segura para todas las líneas celulares utilizadas en esta investigación, mostrando PMC menores al 12% (CMM: 0.09%, Caco-2: 4.68%, CMT-93: 11.29%, Huh-7: 5.71%; Figura 5). Debido a esto, se determinó que para los experimentos subsecuentes, la concentración máxima de DMSO alcanzada sería del 0.2%.

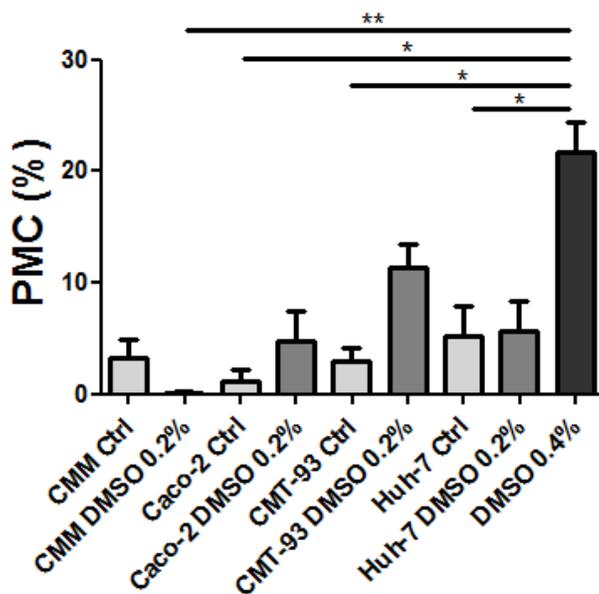


Figura 5. Porcentaje de muerte celular a las 24 horas del tratamiento con las concentraciones de DMSO del 0.2 y 0.4% en las líneas celulares Caco-2, CMT-93, Huh-7 y CMM. Prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn, los datos se muestran como promedio \pm

SEM. Se encontró diferencia significativa entre los grupos (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$). Experimento realizado 3 veces por triplicado.

Ya que los experimentos posteriores, requieren de al menos 48 horas, también se verificó la seguridad del DMSO a este tiempo. Como se muestra en la Figura 6, no existió diferencia significativa entre los PMC de las líneas celulares Caco-2, CMT-93 y Huh-7 tratadas con DMSO a la concentración final del 0.2% durante 48 horas contra su control no tratado. Se observaron PMC menores al 7% (Caco-2: 4.84%, CMT-93: 5.70% y Huh-7: 6.30%; Figura 6).

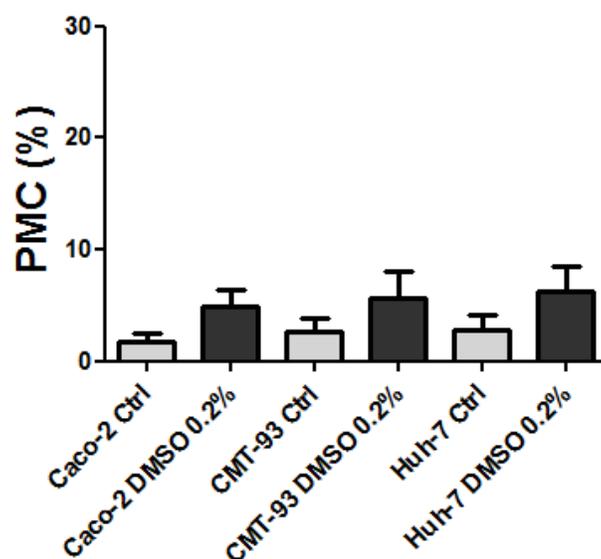


Figura 6. PMC mostrados a las 48 horas del tratamiento con DMSO (0.2%). Prueba de Kruskal-Wallis, los datos se muestran como promedio \pm SEM. No se encontró diferencia significativa entre los grupos ($p = 0.3462$). Experimento realizado 2 veces por triplicado.

El RSV mostró actividad citotóxica en el rango de 20 - 100 μM siendo esta, dosis dependiente. Se destaca en la Figura 7 que a las 24 horas en las CMM los PMC más elevados se obtuvieron a las concentraciones de 80 y 100 μM (80.01% y 76.19%) correspondientemente. También cabe mencionar que, en base a los resultados de estos ensayos se calculó la IC_{50} para las CMM a las 24 horas del tratamiento con RSV ($\text{IC}_{50} = 36.8 \mu\text{M}$; Figura 8).

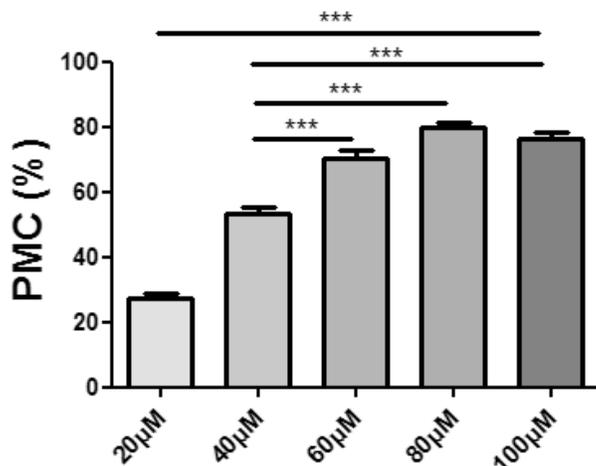


Figura 7. PMC de CMM tratadas con RSV durante 24 horas. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Tukey. Los datos se muestran como promedio \pm SEM. Se encontró diferencia significativa entre los grupos (***) $p \leq 0.001$). Experimento realizado 3 veces por triplicado.

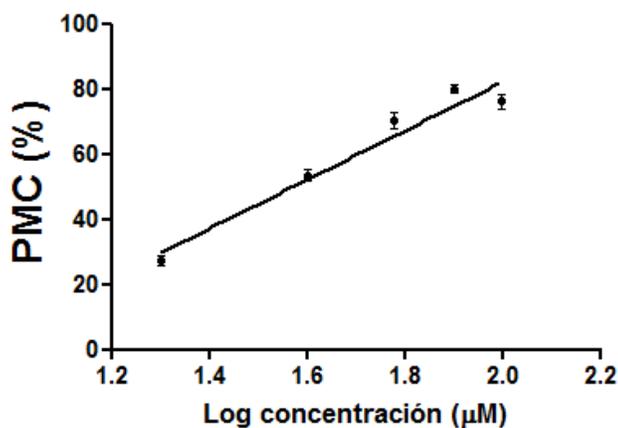


Figura 8. CMM tratadas con RSV durante 24 horas. $IC_{50} = 36.8 \mu M$.

En Caco-2 no se observaron efectos citotóxicos significativos a las 24 horas del tratamiento con RSV ya que el PMC más elevado registrado fue a la concentración de 100 μM y este fue menor al 6% (5.79%; Figura 9).

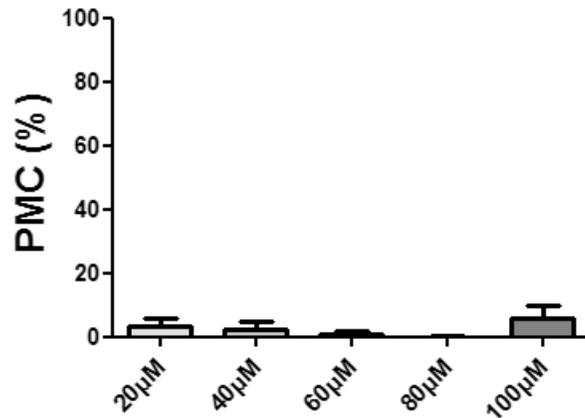


Figura 9. PMC de la línea Caco-2 tratada con RSV durante 24 horas. Prueba de Kruskal-Wallis, los datos se muestran como promedio \pm SEM, no se encontró diferencia significativa entre los grupos ($p = 0.4858$). Experimento realizado 2 veces por triplicado.

A pesar de ambas ser líneas de CCR, en contraste con la línea Caco-2, CMT-93 fue más sensible al tratamiento con RSV durante 24 horas (Figura 9; 10). En CMT-93 el PMC más elevado registrado fue del 99.35% a la concentración de 100 μ M (Figura 10).

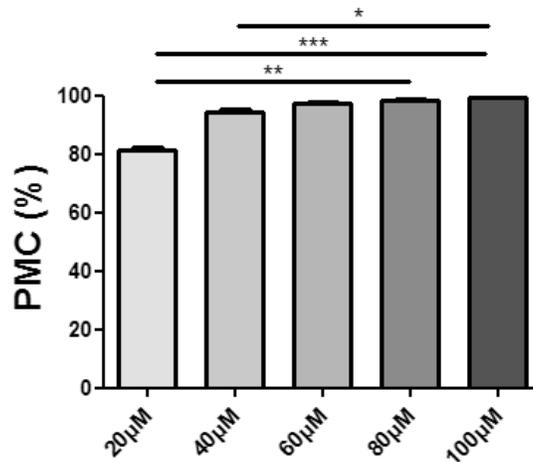


Figura 10. PMC de la línea celular CMT-93 tratada con RSV durante 24 horas. Prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn, los datos se muestran como promedio \pm SEM. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$). Experimento realizado 2 veces por triplicado.

En Huh-7 se observó citotoxicidad dosis-dependiente donde el PMC más elevado registrado correspondió a la concentración de 100 μ M (21.22%; Figura 11). Los ensayos a 24 horas proporcionaron información con respecto a la sensibilidad al RSV de las líneas

celulares utilizadas. Por lo que tomando en cuenta estos valores se procedió a realizar los experimentos subsecuentes durante 48 horas.

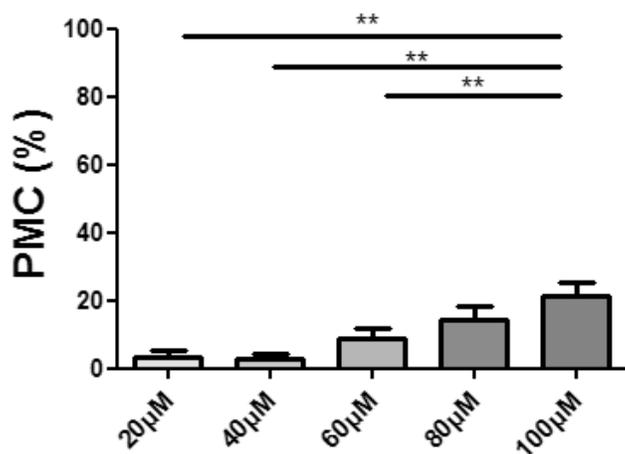


Figura 11. PMC de la línea celular Huh-7 tratada con RSV durante 24 horas. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Tukey, los datos se muestran como promedio \pm SEM. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos (** $p \leq 0.01$). Experimento realizado 2 veces por triplicado.

A las 48 horas del tratamiento con RSV la línea Caco-2 y Huh-7 respondieron de manera similar a la concentración más alta (100 μ M) con PMC = 47.04% y 45.17% respectivamente (Figura 12; 13). En el caso de la línea CMT-93 ésta, mostró una sensibilidad similar a ambas concentraciones de RSV (40 μ M y 100 μ M) con PMC cercanos al 40% (41.16% y 37.50%; Figura 12).

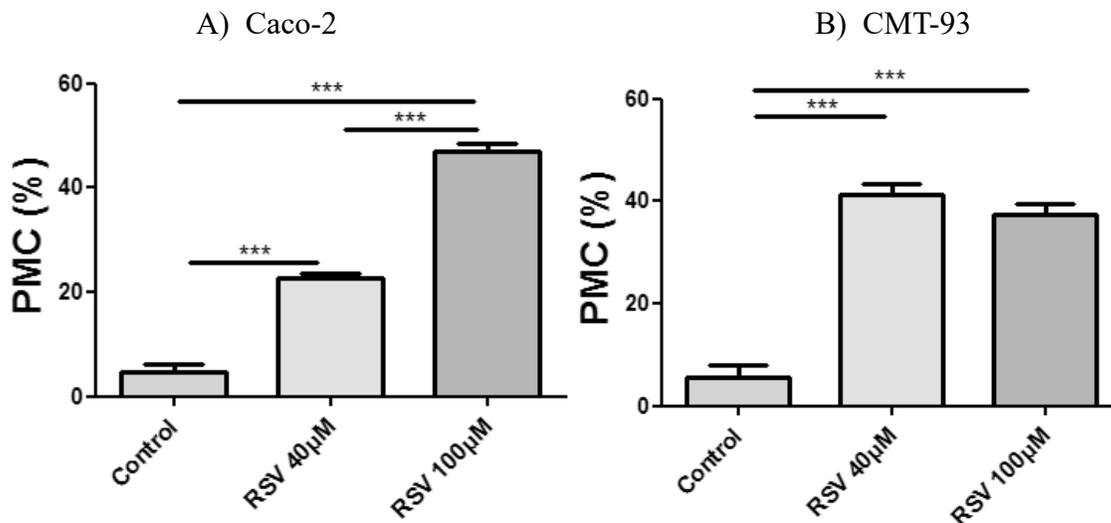


Figura 12. PMC de las líneas Caco-2 (A) y CMT-93 (B) tratadas con RSV durante 48 horas. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Tukey, los datos se muestran como promedio \pm SEM. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($***p \leq 0.001$). Experimento realizado 3 veces por triplicado.

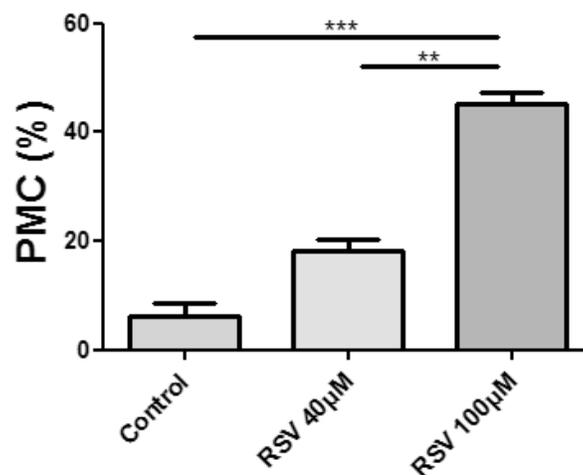


Figura 13. PMC de la línea celular Huh-7 tratada con RSV durante 48 horas. Prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn, los datos se muestran como promedio \pm SEM. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($**p \leq 0.01$; $***p \leq 0.001$). Experimento realizado 3 veces por triplicado.

El tratamiento con EGCG, por su parte demostró ser más citotóxico que el tratamiento con RSV durante 24 horas, por lo que se amplió el rango de concentraciones utilizado desde 1 μ M hasta 60 μ M (Figura 14). En la línea Caco-2 la IC_{50} calculada para las 24 horas fue de 17.84 μ M, mientras que la línea Huh-7 mostró mayor sensibilidad con una IC_{50} de 9.84 μ M.

Debido a la elevada sensibilidad observada ante el RSV por parte de la línea CMT-93 en experimentos subsecuentes se optó por no incluirla en los tratamientos con EGCG debido a que las líneas Caco-2 y Huh-7 mostraron IC_{50} menores a $20 \mu M$.

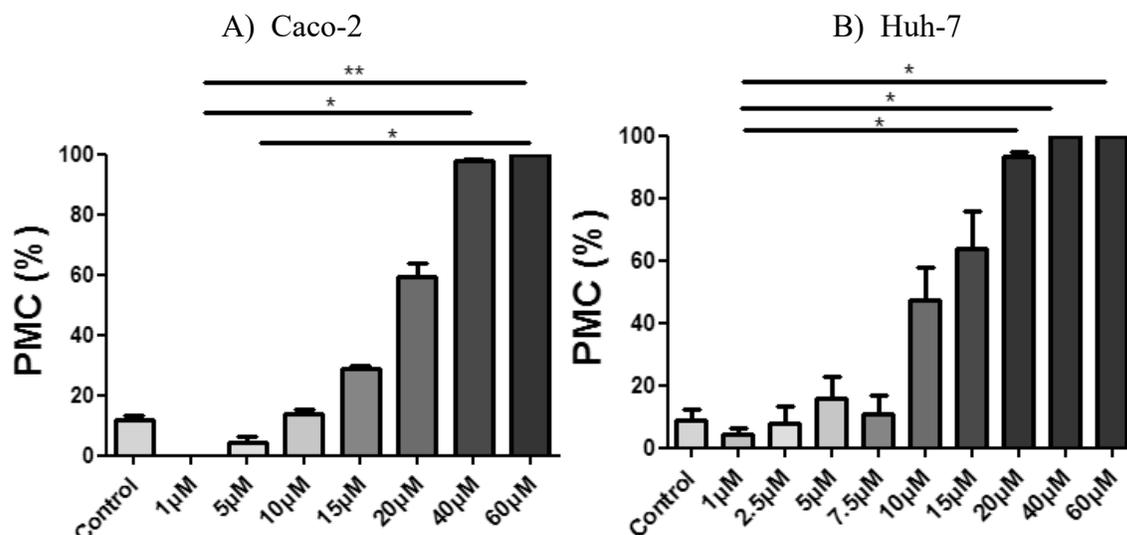


Figura 14. PMC de las líneas Caco-2 (A) y Huh-7 (B) tratadas con EGCG durante 24 horas. Prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn, los datos se muestran como promedio \pm SEM. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$). Experimento realizado 2 veces por triplicado.

A las 48 horas del tratamiento con EGCG se observó disminución en la citotoxicidad observada para ambas líneas celulares Caco-2 y Huh-7 en comparación con los experimentos a 24 horas (Figura 15). En Caco-2 el PMC más elevado fue observado a la concentración de $20 \mu M$ (20.76%) mostrando estas diferencias significativas en comparación al control (9.10%). Mientras que para Huh-7 no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control (Control: 6.30% vs $15 \mu M$: 6.93%; Figura 15).

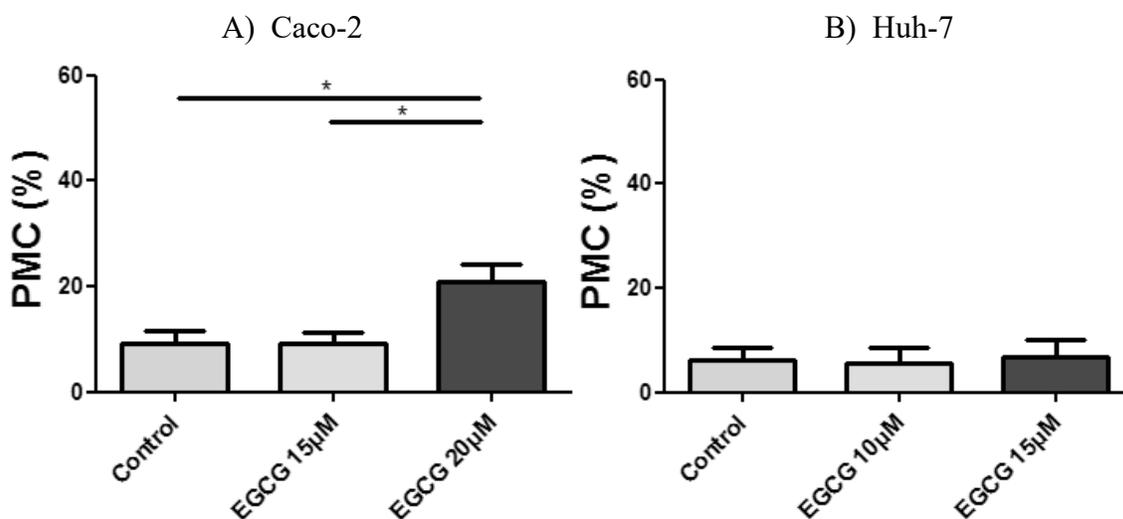


Figura 15. PMC de las líneas Caco-2 (A) y Huh-7 (B) tratadas con EGCG durante 48 horas. Prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn, los datos se muestran como promedio \pm SEM. A) Se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($*p \leq 0.05$). B) No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Experimento realizado 3 veces por triplicado.

9.4 Validación de expresión de GFP por CMM-TRAILS

En la Figura 16 (A) se muestran campos representativos de la confirmación de expresión de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) como gen reportero de la expresión de TRAILS. Debido a que el sistema de expresión de TRAILS posee el marcador de selección de geneticina, las CMM-TRAILS fueron seleccionadas durante 1 semana y se calculó el porcentaje de células que expresan la GFP, comparando contra el control no seleccionado (Control n/s). Como se muestra en la Figura 16 (B), aproximadamente el 90% (89.59%) de CMM-TRAILS expresan GFP cuando estas son seleccionadas con geneticina, lo que fue significativamente superior al control no seleccionado.

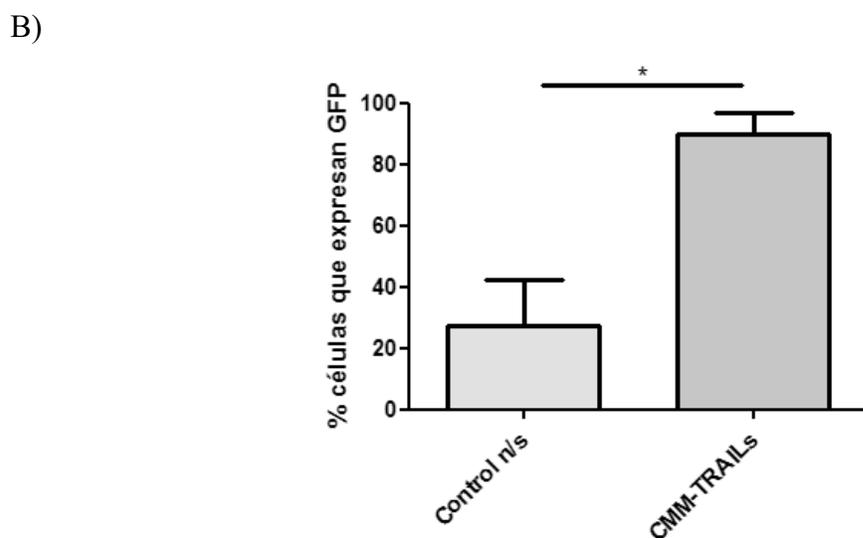
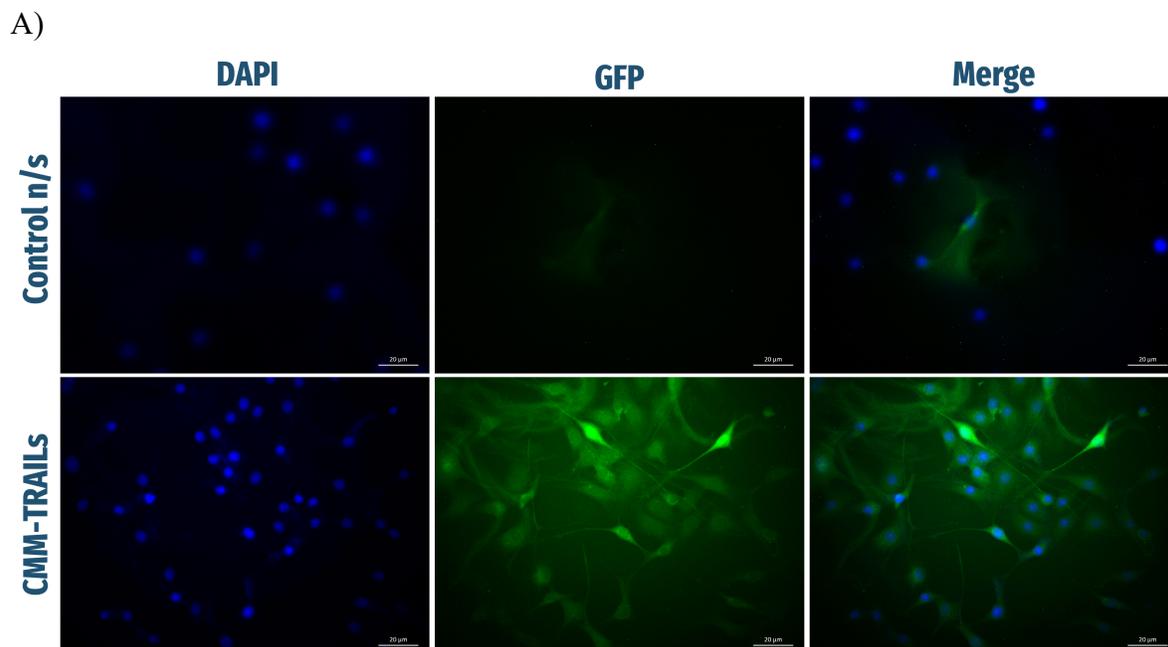


Figura 16. A) CMM-TRAILS expresando el gen reportero de GFP como indicador de la producción de TRAILS. B) Porcentaje de células que expresan GFP en comparación con el control no seleccionado. Prueba U de Mann-Whitney, los datos se muestran como promedio \pm SEM. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($*p \leq 0.05$). Análisis de 5 campos.

Antes de implementar el co-cultivo, se optó por verificar el efecto que tienen los compuestos RSV y EGCG sobre las CMM-TRAILS. Se midió el PMC a las 48 horas utilizando las concentraciones que fueron elegidas para el tratamiento de las líneas tumorales en los experimentos de co-cultivo. En la Figura 17 se muestra el PMC de las CMM-TRAILS y como este fue menor al 25% (RSV max: 21.21%, EGCG max: 3.44%) para ambos

compuestos, por lo que se infiere que al presentar bajos PMC, TRAILs se estaría entregando de manera continua.

9.5 Pretratamiento con RSV o EGCG y ensayos en co-cultivo

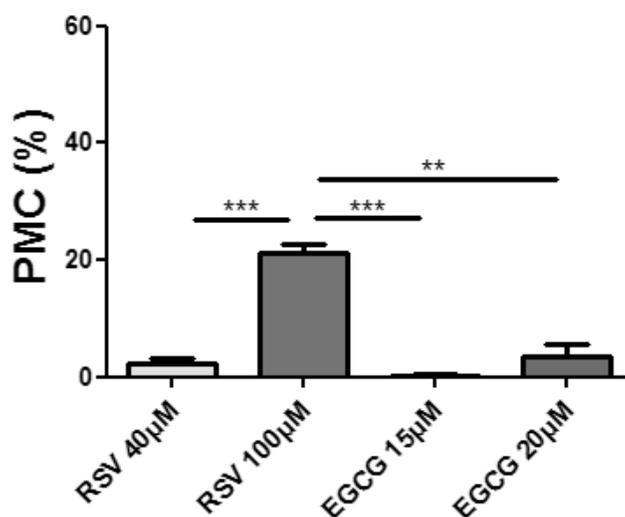


Figura 17. Efecto del RSV o EGCG sobre las CMM-TRAILs durante 48 horas. Prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn, los datos se muestran como promedio \pm SEM. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$). Experimento realizado 3 veces por triplicado.

Observando que el RSV y EGCG afectaron mínimamente a las CMM-TRAILs, se procedió con el co-cultivo de Caco-2 sometidas a un pretratamiento durante 24 horas con RSV antes de agregar las CMM-TRAILs. Los resultados indican que aquellos grupos pretratados con RSV mostraron significativamente mayor muerte celular una vez agregadas las CMM-TRAILs que el co-cultivo de manera individual (39.18% y 61.46% vs 20.69%; Figura 18). De igual manera el PMC observado para las concentraciones de RSV utilizadas se vio aumentado significativamente cuando se implementó el co-cultivo (40 μ M: 22.82% \rightarrow 39.18% y 100 μ M: 47.04% \rightarrow 61.46%; Figura 18).

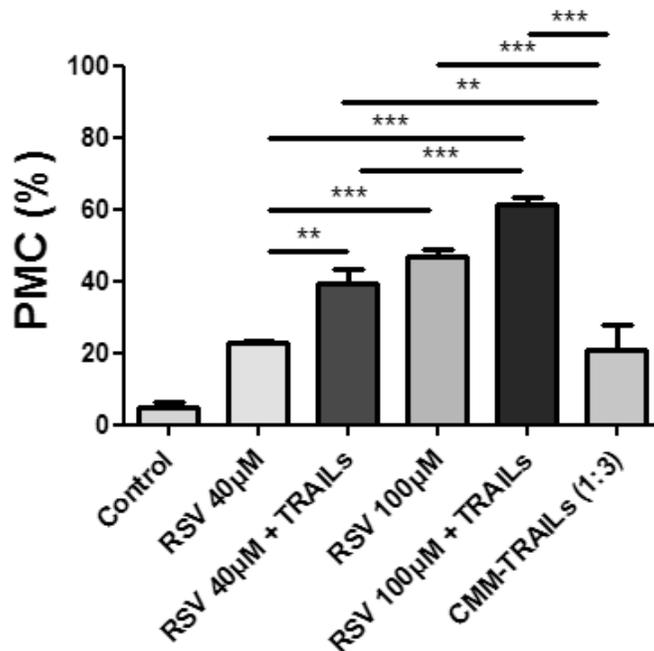


Figura 18. Pretratamiento de RSV y co-cultivo con CMM-TRAILs de la línea Caco-2. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Tukey, los datos se muestran como promedio \pm SEM. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$). Experimento realizado 3 veces por triplicado.

En el caso del pretratamiento de RSV en CMT-93, se observó que al igual que en Caco-2 se aumentó el PMC de manera significativa cuando se realizó el co-cultivo (40 μ M: 41.16% \rightarrow 65.64% y 100 μ M: 37.50% \rightarrow 75.79%; Figura 19). Sin embargo, se infiere que la mayor parte de este incremento en el PMC se debe únicamente al efecto del co-cultivo con CMM-TRAILs, debido a que el co-cultivo de manera individual mostró 65.83% de muerte celular y no se observó diferencia significativa entre los grupos del co-cultivo (Figura 19).

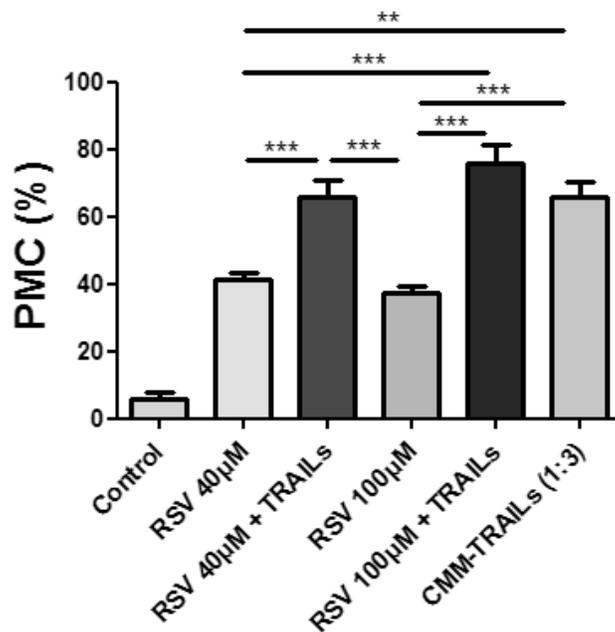


Figura 19. Pretratamiento de RSV y co-cultivo con CMM-TRAILS de la línea CMT-93. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Tukey, los datos se muestran como promedio \pm SEM. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$). Experimento realizado 3 veces por triplicado.

Huh-7 demostró una sensibilidad similar a Caco-2 ante las CMM-TRAILS en el co-cultivo (PMC = 18.76%). De igual manera también se observaron diferencias estadísticas entre los grupos pretratados con RSV en co-cultivo y aquellos con únicamente el tratamiento con RSV (40 μ M: 18.09% \rightarrow 53.85% y 100 μ M: 45.17% \rightarrow 71.14%; Figura 20).

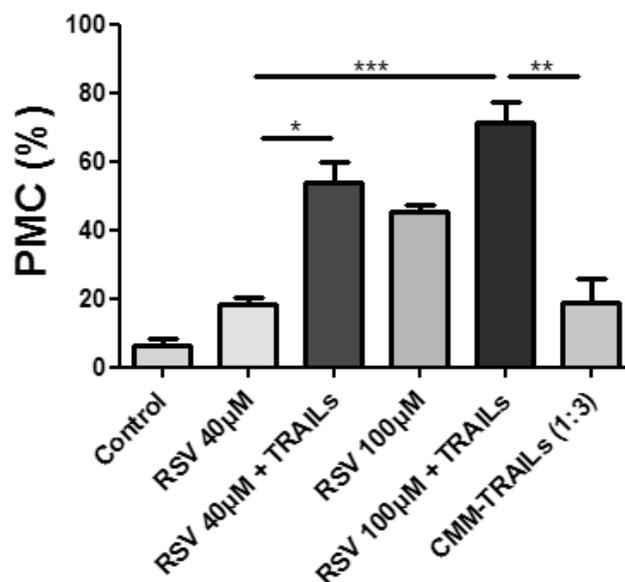


Figura 20. Pretratamiento de RSV y co-cultivo con CMM-TRAILs de la línea Huh-7. Prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn, los datos se muestran como promedio \pm SEM. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$). Experimento realizado 3 veces por triplicado.

En cuanto al pretratamiento de las células tumorales Caco-2 y Huh-7 con EGCG este, fue realizado utilizando concentraciones más bajas que las de RSV debido al perfil de susceptibilidad observado anteriormente (Figura 14; 15). Al igual que con el RSV, se observó que el co-cultivo con pretratamiento de EGCG aumentó el PMC (Figura 21). En la línea Caco-2 el pretratamiento con EGCG y co-cultivo mostró mayor PMC que el co-cultivo solo (15 μ M: 27.63% y 20 μ M: 27.31% vs 20.69%; Figura 21A) aunque de igual manera esto no fue significativo. En el caso de Huh-7 el pretratamiento con EGCG no aumentó el PMC cuando se realizó el co-cultivo, con relación al co-cultivo individual (10 μ M: 6.86% y 15 μ M: 16.86% vs 18.76%; Figura 21B).

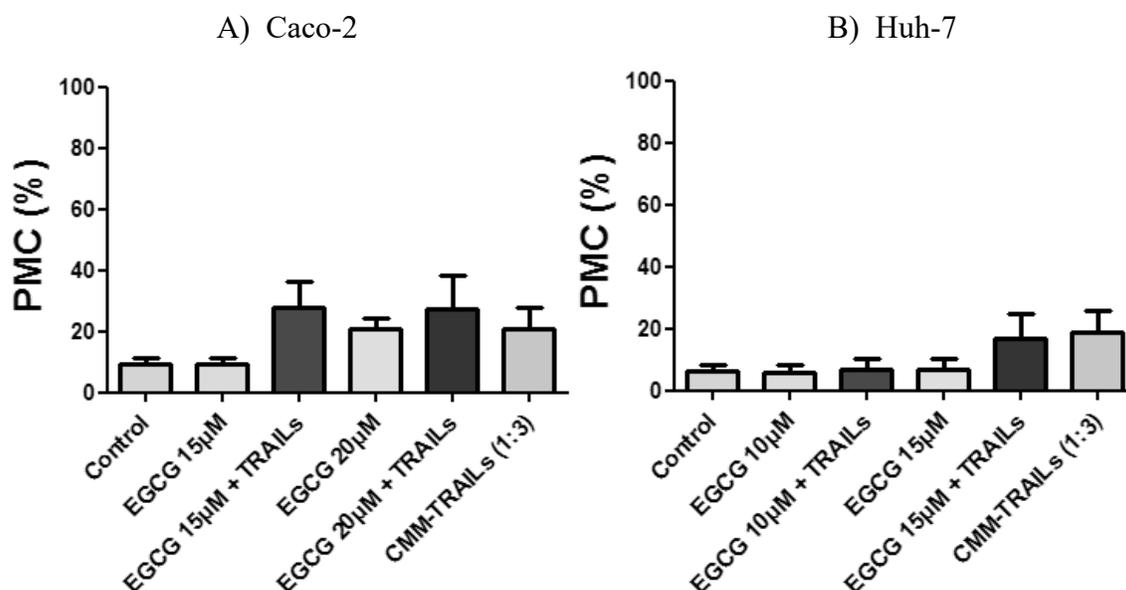


Figura 21. Pretratamiento de EGCG y co-cultivo con CMM-TRAILS de las líneas Caco-2 (A) y Huh-7 (B). A) ANOVA de una vía ($p = 0.1982$). B) Prueba de Kruskal-Wallis ($p = 0.4742$). Los datos se muestran como promedio \pm SEM. Experimento realizado 3 veces por triplicado.

9.6 Expresión relativa de los receptores de muerte DR4 y DR5 en Caco-2

En la Figura 22 se observa como los receptores de muerte celular DR4 y DR5 en la línea Caco-2 presentaron un aumento cuando ésta fue tratada con RSV a la concentración de 100 μ M. Se observó una expresión de 7 veces más que el control para ambos receptores de muerte, siendo estadísticamente significativo solo el aumento de DR4 (Control: 1 vs RSV: 7.29 veces más; Control: 1.04 vs DR5: 7.61 veces más; Figura 22).

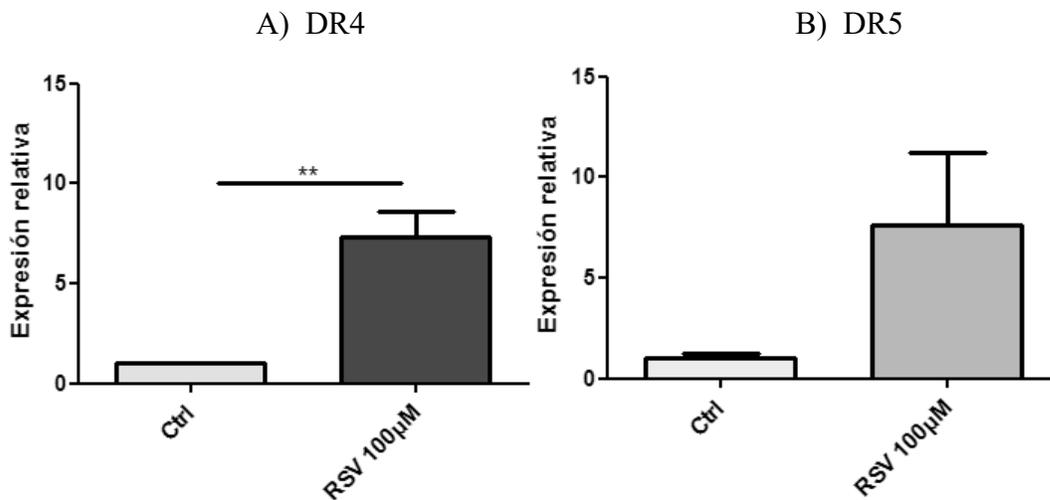
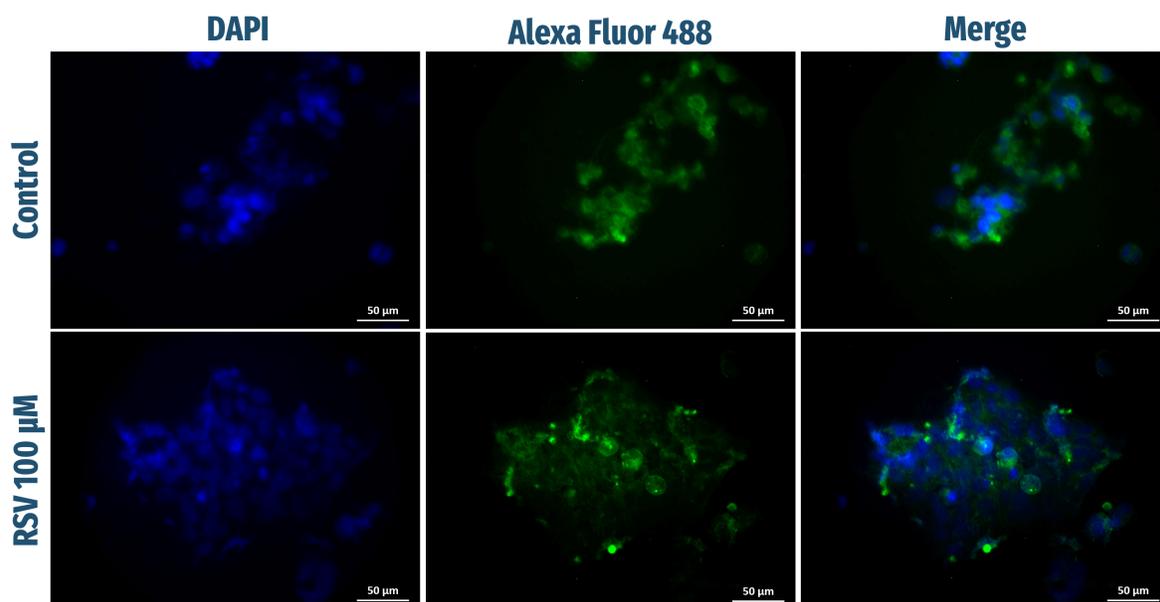


Figura 22. Expresión relativa de los receptores de muerte DR4 (A) y DR5 (B). Prueba *t*-Student, los datos se muestran como promedio \pm SEM. A) Se encontraron diferencias significativas entre los grupos (** $p \leq 0.01$). B) No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($p = 0.1420$). Experimento realizado por triplicado.

9.7 Detección de DR5 mediante inmunofluorescencia en Caco-2

Se muestra en la Figura 23 (A) la selección de campos representativos que muestran la expresión del receptor DR5 en la línea Caco-2 con y sin pretratamiento de RSV a la concentración de 100 μ M. El análisis de imágenes con el software de ImageJ mostró que no existió diferencia estadística en la intensidad de fluorescencia entre los grupos (Control: 1853.27 URF vs RSV 100 μ M: 1975.39 URF; Figura 23B).

A)



B)

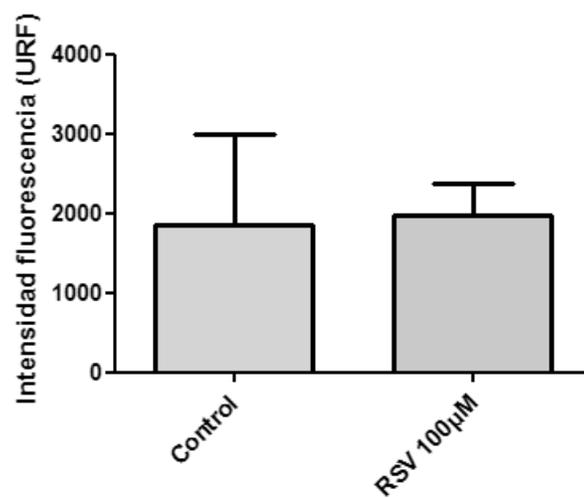


Figura 23. A) Expresión de DR5 en Caco-2 posterior al tratamiento con RSV (100 μ M) durante 48 horas. B) Intensidad de fluorescencia (URF) de Caco-2 tratadas con RSV y no tratadas. Prueba U de Mann-Whitney, los datos se muestran como promedio \pm SEM. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($p = 0.500$). Análisis de 5 campos.

10. DISCUSIÓN

El cáncer del tracto gastrointestinal es una de las principales causas de muerte por cáncer, siendo el más común de esta índole el cáncer colorrectal (CCR) y en tercer lugar el cáncer hepático (Tong *et al.*, 2021). Cabe destacar que la mayoría de los pacientes desarrollan resistencia a los tratamientos convencionales como la radioterapia y quimioterapia, por lo que se requiere que se continúen explorando nuevas opciones de tratamientos para estas neoplasias. En este trabajo se evaluó el efecto de los compuestos bioactivos resveratrol y epigallocatequina galato como sensibilizadores del efecto citotóxico de TRAILs utilizando CMM genéticamente modificadas como sistema de expresión continua (Quiroz-Reyes *et al.*, 2022) en líneas celulares moderadamente resistentes a TRAIL recombinante.

En trabajos anteriores se demostró que el RSV posee actividad antitumoral y esto es dependiente de la concentración utilizada (Ren *et al.*, 2021). En la línea celular SW480 de CCR humano el RSV en el rango de concentraciones de 10 - 100 μM no induce más del 30% de apoptosis después de 48 horas de tratamiento, esto determinado mediante citometría de flujo (Delmas *et al.*, 2003). En nuestro estudio, en la línea Caco-2 a la concentración de 100 μM observamos 47% de muerte celular a las 48 horas de tratamiento con RSV (Figura 12A), sin embargo como es mencionado por Ghasemi y colaboradores (2021) en ensayos de viabilidad como el MTT o en nuestro caso el uso del ensayo basado en luminiscencia de Cell-titer-Glo se presenta una multitud de factores que pueden afectar el resultado, por ejemplo la cantidad de mitocondrias presentes en la muestra, además de que la interpretación no siempre es la adecuada.

En concreto para esta investigación, se sabe que compuestos como el RSV o EGCG son capaces de modificar la actividad mitocondrial de las células disminuyendo la producción de ATP (Saunier *et al.*, 2017) variable medida en nuestros ensayos. Al modificar la producción de ATP pueden verse alteradas diversas rutas metabólicas relacionadas a la proliferación y apoptosis (Yegutkin & Boison, 2022). Debido a lo anteriormente mencionado se recomienda para futuros ensayos el incorporar técnicas adicionales como la tinción con

FIT-C y yoduro de propidio seguida de citometría de flujo para confirmar la apoptosis de manera específica presente en la muestra.

Tameda y colaboradores (2014), reportan que a las 24 horas de tratamiento con RSV a la concentración de 50 μM , en la línea celular de CHC humano HepG2 solo se indujo un 3.4% de apoptosis, comprobado mediante citometría de flujo. En contraste, en nuestros resultados se observan a las concentraciones de 40 y 60 μM PMC menores al 20%. Se tienen reportes también de que a la concentración de 43 μM en la línea Huh-7 el tratamiento con RSV durante 48 horas mostró un 32.4% de muerte celular en un ensayo de MTT (Liao *et al.*, 2010), mientras que en nuestros resultados observamos a la concentración de 40 μM , 19% de muerte celular.

En el caso de tratamientos con EGCG, se han observado efectos como el arresto del ciclo celular y apoptosis (Kciuk *et al.*, 2023). Comparando con la literatura, se han reportado resultados variables en las líneas HCT116 y HT-29 de CCR. Por ejemplo, (Kwon *et al.*, 2020) reportan que el tratamiento con EGCG durante 24 horas resultó en la pérdida del 50% de la viabilidad celular aproximadamente a las concentraciones de 75 μM o 100 μM para ambas líneas celulares. Sin embargo, bajo condiciones similares (Khiewkamrop *et al.*, 2022) reportan que la IC_{50} para estas se encuentra en el rango de 400 - 600 μM .

Es importante destacar en este caso que la EGCG es un compuesto muy inestable debido a la naturaleza de su molécula, lo que podría explicar los resultados variables reportados en la literatura (Krupkova *et al.*, 2016). En esta investigación los tratamientos con EGCG fueron preparados al momento de montar el ensayo, descongelando únicamente una vez la solución stock de 50 mM, lo que se espera que contribuya a la exactitud de los resultados mostrados (Caco-2, IC_{50} : 17.84 μM y Huh-7, IC_{50} : 9.84 μM).

Para los ensayos de co-cultivo que involucran el RSV, se ha observado en la línea Caco-2 que bajo un esquema de co-tratamiento durante 24 horas, el RSV a la concentración de 40 μM y TRAIL recombinante (50 ng/mL) indujo aproximadamente un 65% de apoptosis determinada mediante citometría de flujo (Li *et al.*, 2015). En contraste en esta investigación

no se alcanzaron PMC tan elevados, sin embargo podría deberse a lo comentado anteriormente respecto a la posible disminución del ATP intracelular afectando de manera directa el PMC observado.

Para la línea HepG2, se ha reportado que al combinar los tratamientos de RSV (50 μM) y TRAIL recombinante (10 ng) se vio aumentada la apoptosis hasta un 49.6% (RSV 50 μM : 3.4% \rightarrow RSV 50 μM + 10 ng TRAILr: 49.6%), confirmado mediante citometría de flujo (Tameda *et al.*, 2014). En nuestros resultados, pese a que no se determinó específicamente la apoptosis celular, se observó que aquellos grupos en co-cultivo con CMM-TRAILs expuestos a un pretratamiento con RSV en concentraciones similares (40 y 100 μM) aumentaron el PMC en un 20% aproximadamente al momento de realizar la medición en comparación con los grupos únicamente tratados con RSV (Caco-2, RSV 40 μM : 22.82% \rightarrow RSV 40 μM + CMM-TRAILs: 39.18% y RSV 100 μM : 47.04% \rightarrow RSV 100 μM + CMM TRAILs: 61.46%; Figura 18). Por su parte CMT-93 mostró los siguientes PMC (RSV 40 μM : 41.16% \rightarrow RSV 40 μM + CMM-TRAILs: 65.64% y RSV 100 μM : 37.50% \rightarrow RSV 100 μM + CMM-TRAILs: 75.79%; Figura 19). Mientras que la línea Huh-7 se comportó de la siguiente manera (RSV 40 μM : 18.09% \rightarrow RSV 40 μM + CMM-TRAILs: 53.85% y RSV 100 μM : 45.17% \rightarrow RSV 100 μM + CMM-TRAILs: 71.14%; Figura 20).

Para los ensayos de EGCG en co-cultivo, se destaca el trabajo de Kwon *et al* (2020) en el que se planteó un esquema de tratamiento en conjunto de EGCG y TRAIL recombinante durante 24 horas en líneas de CCR humano (HCT116 y SW480) en el que se observó sinergia entre los tratamientos utilizados alcanzando aproximadamente un 25% de muerte celular (60 μM + 25 ng/mL TRAIL recombinante) verificado por MTT. Comparando con nuestros resultados, para la línea Caco-2 (Figura 21A), se obtuvo un PMC de 27.63% a las 48 horas después de un pretratamiento de 24 horas seguido de 24 horas en co-cultivo con CMM-TRAILs. Cabe destacar que se observó un efecto similar en la disminución de la viabilidad, sin embargo, el sistema de expresión de CMM-TRAILs produce menores cantidades de la molécula TRAILs, esto en el orden de picogramos como lo reportaron anteriormente Quiroz-Reyes y colaboradores (2023). Se infiere que probablemente la liberación constante de

TRAILs es lo que permite observar este efecto, ya que la corta vida media de la proteína deja de ser una limitante al secretarse de forma continua al medio.

Li y colaboradores (2015) reportaron que el tratamiento con RSV a la concentración de 40 μM aumentó la expresión del receptor de muerte DR5, pero no de DR4 después de 24 horas en la línea Caco-2 mediante Western-blot. En este estudio el pretratamiento de RSV (100 μM) demostró una sobreexpresión de los receptores DR4 y DR5 en Caco-2 a las 48 horas al menos a nivel transcripcional (Figura 22) mientras que en la confirmación mediante inmunofluorescencia de la expresión de DR5 (Figura 23B) no se observó significancia estadística contra el control.

Este trabajo propone al RSV como una alternativa para mejorar la actividad de TRAIL, una terapia en desarrollo contra el cáncer, la cual en nuestro equipo de trabajo ha sido adecuada como terapia celular con CMM-TRAILs. Reportamos que nuestro sistema de expresión para el cual se observó que la cantidad de TRAILs producida es suficiente para incrementar la muerte celular tumoral posterior al pretratamiento con RSV en contraste con el grupo sin pretratamiento. Uno de los mecanismos que identificamos aquí es la sobreexpresión a nivel transcripcional de los receptores de muerte DR4 y DR5 después de 48 horas del tratamiento con RSV, aunque los resultados a nivel traduccional no fueron concluyentes. Cabe mencionar que existen otros mecanismos de sensibilización a TRAIL que no fueron explorados en este proyecto y pudiera ser que alguno tenga influencia en los resultados aquí reportados.

11. CONCLUSIÓN

El pretratamiento con RSV potenció el efecto citotóxico de TRAILs a las 48 horas en Caco-2 y Huh-7, pero no en CMT-93.

No se observó un efecto sensibilizador a TRAILs por el pretratamiento con EGCG a las 48 horas en las líneas Caco-2 y Huh-7.

Se demostró que el RSV a la concentración de 100 μ M fue capaz de incrementar la expresión de los receptores DR4 y DR5, la cual se mantiene hasta las 48 horas. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa en la expresión proteica del receptor DR5.

Existen otros mecanismos que pudieran aumentar o disminuir la susceptibilidad a TRAIL que no involucran un cambio en la expresión de los receptores de muerte celular, y no fueron explorados en este proyecto, por lo que resulta pertinente considerar su evaluación en investigaciones posteriores.

12. REFERENCIAS

- Abdulghani, J., Allen, J. E., Dicker, D. T., Liu, Y. Y., Goldenberg, D., Smith, C. D., Humphreys, R., & El-Deiry, W. S. (2013). Sorafenib Sensitizes Solid Tumors to Apo2L/TRAIL and Apo2L/TRAIL Receptor Agonist Antibodies by the Jak2-Stat3-Mcl1 Axis. *PLoS ONE*, 8(9), e75414. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075414>
- Abou El Naga, R. N., Azab, S. S., El-Demerdash, E., Shaarawy, S., El-Merzabani, M., & Ammar, el-S. M. (2013). Sensitization of TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by phytochemicals. *Life Sciences*, 92(10), 555-561. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.01.017>
- Andrade-Meza, A., Arias-Romero, L. E., Armas-López, L., Ávila-Moreno, F., Chirino, Y. I., Delgado-Buenrostro, N. L., García-Castillo, V., Gutiérrez-Cirlos, E. B., Juárez-Avelar, I., Leon-Cabrera, S., Mendoza-Rodríguez, M. G., Olguín, J. E., Perez-Lopez, A., Pérez-Plasencia, C., Reyes, J. L., Sánchez-Pérez, Y., Terrazas, L. I., Vaca-Paniagua, F., Villamar-Cruz, O., & Rodríguez-Sosa, M. (2023). Mexican Colorectal Cancer Research Consortium (MEX-CCRC): Etiology, Diagnosis/Prognosis, and Innovative Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/IJMS24032115>
- Agrawal, M. Y., Gaikwad, S., Srivastava, S., & Srivastava, S. K. (2022). Research Trend and Detailed Insights into the Molecular Mechanisms of Food Bioactive Compounds against Cancer: A Comprehensive Review with Special Emphasis on Probiotics. *Cancers*, 14(22), 5482. <https://doi.org/10.3390/cancers14225482>
- Alizadeh Zeinabad, H., & Szegezdi, E. (2022). TRAIL in the Treatment of Cancer: From Soluble Cytokine to Nanosystems. *Cancers*, 14(20), 5125. <https://doi.org/10.3390/cancers14205125>
- Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current Biology*, 30(16), R921-R925. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>
- Audard, V., Grimber, G., Elie, C., Radenen, B., Audebourg, A., Letourneur, F., Soubrane, O., Vacher-Lavenu, M., Perret, C., Cavard, C., & Terris, B. (2007). Cholestasis is a marker for hepatocellular carcinomas displaying β -catenin mutations. *The Journal of Pathology*, 212(3), 345-352. <https://doi.org/10.1002/path.2169>
- Capasso, L., De Masi, L., Sirignano, C., Maresca, V., Basile, A., Nebbioso, A., Rigano, D., & Bontempo, P. (2025). Epigallocatechin Gallate (EGCG): Pharmacological Properties, Biological Activities and Therapeutic Potential. *Molecules*, 30(3), 654. <https://doi.org/10.3390/molecules30030654>
- Cha, S.-S., Song, Y.-L., & Oh, B.-H. (2004). *Specificity of Molecular Recognition Learned from the Crystal Structures of TRAIL and the TRAIL:sDR5 Complex*.
- Cheng, W. L., Feng, P. H., Lee, K. Y., Chen, K. Y., Sun, W. L., Van Hiep, N., Luo, C. S., & Wu, S. M. (2021). The Role of EREG/EGFR Pathway in Tumor Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/IJMS222312828>
- Chidambaranathan-Reghupaty, S., Fisher, P. B., & Sarkar, D. (2021). Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification. En *Advances in Cancer Research* (Vol. 149, pp. 1-61). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2020.10.001>

- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1830, Issue 6, pp. 3670–3695). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
- Dagogo-Jack, I., & Shaw, A. T. (2018). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *15*(2), 81-94. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>
- Dai, X., Zhang, J., Arfuso, F., Chinnathambi, A., Zayed, M. E., Alharbi, S. A., Kumar, A. P., Ahn, K. S., & Sethi, G. (2015). Targeting TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor by natural products as a potential therapeutic approach for cancer therapy. *Experimental Biology and Medicine*, *240*(6), 760–773. <https://doi.org/10.1177/1535370215579167>
- D'Alessandro, A., De Pergola, G., & Silvestris, F. (2016). Mediterranean Diet and cancer risk: an open issue. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *67*(6), 593–605. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1191444>
- De Loeff, M., De Jong, S., & Kruyt, F. A. E. (2019). Multiple Interactions Between Cancer Cells and the Tumor Microenvironment Modulate TRAIL Signaling: Implications for TRAIL Receptor Targeted Therapy. *Frontiers in Immunology*, *10*(JULY). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01530>
- Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M., & Wallace, M. B. (2019). Colorectal cancer. *www.TheLancet.Com*, 1467. www.thelancet.com
- Delmas, D., Rébé, C., Lacour, S., Filomenko, R., Athias, A., Gambert, P., Cherkaoui-Malki, M., Jannin, B., Dubrez-Daloz, L., Latruffe, N., & Solary, E. (2003). Resveratrol-induced Apoptosis Is Associated with Fas Redistribution in the Rafts and the Formation of a Death-inducing Signaling Complex in Colon Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(42), 41482-41490. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304896200>
- Delmas, D., Rébé, C., Micheau, O., Athias, A., Gambert, P., Grazide, S., Laurent, G., Latruffe, N., & Solary, E. (2004). Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells. *Oncogene*, *23*(55), 8979–8986. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208086>
- Folprecht, G., Martinelli, E., Mazard, T., Modest, D. P., Tsuji, A., Esser, R., Cremolini, C., & Falcone, A. (2022). Triplet chemotherapy in combination with anti-EGFR agents for the treatment of metastatic colorectal cancer: Current evidence, advances, and future perspectives. *Cancer Treatment Reviews*, *102*, 102301. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102301>
- Gampa, S. C. (2023). Nano-TRAIL: A promising path to cancer therapy. *Cancer Drug Resistance*, *6*(1), 79-103. <https://doi.org/10.20517/cdr.2022.82>
- Greenlee, J. D., Lopez-Cavestany, M., Ortiz-Otero, N., Liu, K., Subramanian, T., Cagir, B., & King, M. R. (2021). Oxaliplatin resistance in colorectal cancer enhances TRAIL sensitivity via death receptor 4 upregulation and lipid raft localization. *eLife*, *10*, e67750. <https://doi.org/10.7554/eLife.67750>
- Guerrache, A., & Micheau, O. (2024). TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand: Non-Apoptotic Signalling. *Cells*, *13*(6), 521. <https://doi.org/10.3390/cells13060521>
- Gupta, J., Abed, H. S., Uthirapathy, S., Kyada, A., Rab, S. O., Shit, D., Janney, B., Nathiya, D., Kadhim, A. J., & Mustafa, Y. F. (2025). Beyond TRAIL resistance: Novel strategies for potentiating TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Experimental Cell Research*, *450*(1), 114619. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2025.114619>

- Hao, Z., Han, X., Sun, X., Shen, M., Huang, J., Li, Y., Ozawa, T., Pang, D., Jin, S., Kishi, H., Muraguchi, A., & Jin, A. (2016). Fully human monoclonal antibodies to TRAIL-R1 enhance TRAIL-induced apoptosis via activation of caspase-8 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 475(2), 238-244. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.089>
- Huang, D. Q., Mathurin, P., Cortez-Pinto, H., & Loomba, R. (2023). Global epidemiology of alcohol-associated cirrhosis and HCC: Trends, projections and risk factors. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 20(1), 37-49. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00688-6>
- Ionescu, V. A., Gheorghie, G., Bacalbasa, N., Chiotoroiu, A. L., & Diaconu, C. (2023). Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 59(9). <https://doi.org/10.3390/MEDICINA59091646>
- Islam, M. R., Akash, S., Rahman, M. M., Nowrin, F. T., Akter, T., Shohag, S., Rauf, A., Aljohani, A. S. M., & Simal-Gandara, J. (2022). Colon cancer and colorectal cancer: Prevention and treatment by potential natural products. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 368). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110170>
- Ivanov, V. N., Partridge, M. A., Johnson, G. E., Huang, S. X. L., Zhou, H., & Hei, T. K. (2008). Resveratrol sensitizes melanomas to TRAIL through modulation of antiapoptotic gene expression. *Experimental Cell Research*, 314(5), 1163–1176. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.12.012>
- Jäger, R., & Zwacka, R. M. (2010). The Enigmatic Roles of Caspases in Tumor Development. *Cancers*, 2(4), 1952-1979. <https://doi.org/10.3390/cancers2041952>
- Jelínková, I., Šafaříková, B., Vondálová Blanářová, O., Skender, B., Hofmanová, J., Sova, P., Moyer, M. P., Kozubík, A., Kolář, Z., Ehrmann, J., & Hyršlová Vaculová, A. (2014). Platinum(IV) complex LA-12 exerts higher ability than cisplatin to enhance TRAIL-induced cancer cell apoptosis via stimulation of mitochondrial pathway. *Biochemical Pharmacology*, 92(3), 415-424. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.09.013>
- Kciuk, M., Alam, M., Ali, N., Rashid, S., Głowacka, P., Sundaraj, R., Celik, I., Yahya, E. B., Dubey, A., Zerroug, E., & Kontek, R. (2023). Epigallocatechin-3-Gallate Therapeutic Potential in Cancer: Mechanism of Action and Clinical Implications. *Molecules*, 28(13). <https://doi.org/10.3390/molecules28135246>
- Khiewkamrop, P., Surangkul, D., Srikumool, M., Richert, L., Pekthong, D., Parhira, S., Somran, J., & Srisawang, P. (2022). Epigallocatechin gallate triggers apoptosis by suppressing de novo lipogenesis in colorectal carcinoma cells. *FEBS Open Bio*, 12(5), 937-958. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13391>
- Kim, B., Seo, J. H., Lee, K. Y., & Park, B. (2020). Icariin sensitizes human colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via ERK-mediated upregulation of death receptors. *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.4970>
- Kim, S.-W., Moon, J.-H., & Park, S.-Y. (2016). Activation of autophagic flux by epigallocatechin gallate mitigates TRAIL-induced tumor cell apoptosis via down-regulation of death receptors. *Oncotarget*, 7(40), 1–9. www.impactjournals.com/oncotarget
- Klimova, D., Jakubechova, J., Altanerova, U., Nicodemou, A., Styk, J., Szemes, T., Repiska, V., & Altaner, C. (2023). Extracellular vesicles derived from dental mesenchymal stem/stromal cells with gemcitabine as a cargo have an inhibitory effect on the growth of pancreatic carcinoma cell lines in vitro. *Molecular and Cellular Probes*, 67, 101894. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2023.101894>

- Ko, J.-H., Sethi, G., Um, J.-Y., Shanmugam, M. K., Arfuso, F., Kumar, A. P., Bishayee, A., & Ahn, K. S. (2017). The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(12), 2589. <https://doi.org/10.3390/ijms18122589>
- Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., Pagkalos, A., Ntounis, T., & Fasoulakis, Z. (2020). Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Research*, *40*(11), 6009-6015. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14622>
- Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P. H., & Kirchhoff, S. (2001). FLICE-Inhibitory Proteins: Regulators of Death Receptor-Mediated Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(24), 8247-8254. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.24.8247-8254.2001>
- Krupkova, O., Ferguson, S. J., & Wuertz-Kozak, K. (2016). Stability of (–)-epigallocatechin gallate and its activity in liquid formulations and delivery systems. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *37*, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.01.002>
- Kwon, O. S., Jung, J. H., Shin, E. A., Park, J. E., Park, W. Y., & Kim, S. H. (2020). Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis as a TRAIL sensitizer via activation of caspase 8 and death receptor 5 in human colon cancer cells. *Biomedicines*, *8*(4). <https://doi.org/10.3390/biomedicines8040084>
- Lan, T., Luo, M., & Wei, X. (2021). Mesenchymal stem/stromal cells in cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, *14*(1), 195. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01208-w>
- Lei, X., He, Q., Li, Z., Zou, Q., Xu, P., Yu, H., Ding, Y., & Zhu, W. (2021). Cancer stem cells in colorectal cancer and the association with chemotherapy resistance. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, *38*(4). <https://doi.org/10.1007/S12032-021-01488-9>
- Li, X.-B., Deng, Y.-G., Hu, J.-P., Wang, Z., Xie, R.-Z., Luo, H., & Hu, X.-Y. (2015). Resveratrol overcomes TRAIL resistance in human colon cancer cells. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, *10*(3), 568. <https://doi.org/10.3329/bjp.v10i3.21208>
- Liao, P.-C., Ng, L.-T., Lin, L.-T., Richardson, C. D., Wang, G.-H., & Lin, C.-C. (2010). Resveratrol Arrests Cell Cycle and Induces Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma Huh-7 Cells. *Journal of Medicinal Food*, *13*(6), 1415-1423. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.1126>
- Lin, Z., Wu, Y., Xu, Y., Li, G., Li, Z., & Liu, T. (2022). Mesenchymal stem cell-derived exosomes in cancer therapy resistance: Recent advances and therapeutic potential. *Molecular Cancer*, *21*(1), 179. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01650-5>
- Liu, B., Zhou, H., Tan, L., Siu, K. T. H., & Guan, X.-Y. (2024). Exploring treatment options in cancer: Tumor treatment strategies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *9*(1), 175. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01856-7>
- Liu, C., Dib-Hajj, S. D., & Waxman, S. G. (2001). Fibroblast Growth Factor Homologous Factor 1B Binds to the C Terminus of the Tetrodotoxin-resistant Sodium Channel rNav1.9a (NaN)*. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(22), 18925-18933. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101606200>
- Liu, J., Xiao, Q., Xiao, J., Niu, C., Li, Y., Zhang, X., Zhou, Z., Shu, G., & Yin, G. (2022). Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 7, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>

- Llovet, J. M., Zucman-Rossi, J., Pikarsky, E., Sangro, B., Schwartz, M., Sherman, M., & Gores, G. (2016). Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 16018. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.18>
- Loke, Y. L., Chew, M. T., Ngeow, Y. F., Lim, W. W. D., & Peh, S. C. (2020). Colon Carcinogenesis: The Interplay Between Diet and Gut Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 603086. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.603086>
- Mahmod, A. I., Haif, S. K., Kamal, A., Al-ataby, I. A., & Talib, W. H. (2022). Chemoprevention effect of the Mediterranean diet on colorectal cancer: Current studies and future prospects. *Frontiers in Nutrition*, 9, 924192. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.924192>
- Maruca, A., Catalano, R., Bagetta, D., Mesiti, F., Ambrosio, F. A., Romeo, I., Moraca, F., Rocca, R., Ortuso, F., Artese, A., Costa, G., Alcaro, S., & Lupia, A. (2019). The Mediterranean Diet as source of bioactive compounds with multi-targeting anti-cancer profile. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 181. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111579>
- Mashayekhi, A., Forouzesh, F., & Mashayekhi, M. (2020). Promotion of extrinsic apoptosis pathway in HCT-116 human colorectal cancer cell line by sodium butyrate as histone deacetylase inhibitor. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. <https://doi.org/10.32592/ircmj.2021.23.1.190>
- Monllor-Tormos, A., García-Vigara, A., Morgan, O., García-Pérez, M.-Á., Mendoza, N., Tarín, J. J., & Cano, A. (2023). Mediterranean diet for cancer prevention and survivorship. *Maturitas*, 178, 107841. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2023.107841>
- Munro, M. J., Wickremesekera, S. K., Peng, L., Tan, S. T., & Itinteang, T. (2018). Cancer stem cells in colorectal cancer: a review. *Journal of Clinical Pathology*, 71(2), 110–116. <https://doi.org/10.1136/JCLINPATH-2017-204739>
- Naeem, A., Hu, P., Yang, M., Zhang, J., Liu, Y., Zhu, W., & Zheng, Q. (2022). Natural Products as Anticancer Agents: Current Status and Future Perspectives. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27238367>
- Park, D. G. (2014). Antichemosensitizing effect of resveratrol in cotreatment with oxaliplatin in HCT116 colon cancer cell. *Annals of Surgical Treatment and Research*, 86(2), 68–75. <https://doi.org/10.4174/astr.2014.86.2.68>
- Pimentel, J. M., Zhou, J.-Y., & Wu, G. S. (2023). The Role of TRAIL in Apoptosis and Immunosurveillance in Cancer. *Cancers*, 15(10), 2752. <https://doi.org/10.3390/cancers15102752>
- Quiroz-Reyes, A. G., Delgado-Gonzalez, P., Islas, J. F., Gallegos, J. L. D., Martínez Garza, J. H., & Garza-Treviño, E. N. (2021). Behind the Adaptive and Resistance Mechanisms of Cancer Stem Cells to TRAIL. *Pharmaceutics* 2021, Vol. 13, Page 1062, 13(7), 1062. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13071062>
- Quiroz-Reyes, A. G., Delgado-González, P., Islas, J. F., Soto-Domínguez, A., González-Villarreal, C. A., Padilla-Rivas, G. R., & Garza-Treviño, E. N. (2023). Oxaliplatin Enhances the Apoptotic Effect of Mesenchymal Stem Cells, Delivering Soluble TRAIL in Chemoresistant Colorectal Cancer. *Pharmaceutics*, 16(10), 1448. <https://doi.org/10.3390/ph16101448>
- Quiroz-Reyes, A. G., Gonzalez-Villarreal, C. A., Limon-Flores, A. Y., Delgado-Gonzalez, P., Martinez-Rodriguez, H. G., Said-Fernandez, S. L., Soto-Dominguez, A., Rivas-Estilla, A. M., Islas, J. F., Molina-De la Garza, J. F., & Garza-Treviño, E. N. (2023). Mesenchymal Stem Cells Genetically Modified by Lentivirus-Express Soluble TRAIL

- and Interleukin-12 Inhibit Growth and Reduced Metastasis-Related Changes in Lymphoma Mice Model. *Biomedicines*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES11020595>
- Quiroz-Reyes, A., González-Villarreal, C., Martínez-Rodríguez, H., Said-Fernández, S., Salinas-Carmona, M., Limón-Flores, A., Soto-Domínguez, A., Padilla-Rivas, G., Montes De Oca-Luna, R., Islas, J., & Garza-Treviño, E. (2022). A combined antitumor strategy of separately transduced mesenchymal stem cells with soluble TRAIL and IFN β produces a synergistic activity in the reduction of lymphoma and mice survival enlargement. *Molecular Medicine Reports*, 25(6), 206. <https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12722>
- Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 14(2), 89–103. <https://doi.org/10.5114/PG.2018.81072>
- Ren, B., Kwah, M. X.-Y., Liu, C., Ma, Z., Shanmugam, M. K., Ding, L., Xiang, X., Ho, P. C.-L., Wang, L., Ong, P. S., & Goh, B. C. (2021). Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives. *Cancer Letters*, 515, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.05.001>
- Rezayatmand, H., Razmkhah, M., & Razeghian-Jahromi, I. (2022). Drug resistance in cancer therapy: the Pandora's Box of cancer stem cells. In *Stem Cell Research and Therapy* (Vol. 13, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02856-6>
- Riccio, B. V. F., Spósito, L., Carvalho, G. C., Ferrari, P. C., & Chorilli, M. (2020). Resveratrol isoforms and conjugates: A review from biosynthesis in plants to elimination from the human body. *Archiv Der Pharmazie*, 353(12), 2000146. <https://doi.org/10.1002/ardp.202000146>
- Rock, C. L., Thomson, C. A., Sullivan, K. R., Howe, C. L., Kushi, L. H., Caan, B. J., Neuhausser, M. L., Bandera, E. V., Wang, Y., Robien, K., Basen-Engquist, K. M., Brown, J. C., Courneya, K. S., Crane, T. E., Garcia, D. O., Grant, B. L., Hamilton, K. K., Hartman, S. J., Kenfield, S. A., ... McCullough, M. L. (2022). American Cancer Society nutrition and physical activity guideline for cancer survivors. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(3), 230–262. <https://doi.org/10.3322/caac.21719>
- Roshandel, G., Ghasemi-Kebria, F., & Malekzadeh, R. (2024). Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Cancers*, 16(8), 1530. <https://doi.org/10.3390/cancers16081530>
- Ruiz-Margáin, A., Román-Calleja, B. M., Moreno-Guillén, P., González-Regueiro, J. A., Kúsulas-Delint, D., Campos-Murguía, A., Flores-García, N. C., & Macías-Rodríguez, R. U. (2021). Nutritional therapy for hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 13(10), 1440–1452. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v13.i10.1440>
- Saunier, E., Antonio, S., Regazzetti, A., Auzeil, N., Laprévotte, O., Shay, J. W., Coumoul, X., Barouki, R., Benelli, C., Huc, L., & Bortoli, S. (2017). Resveratrol reverses the Warburg effect by targeting the pyruvate dehydrogenase complex in colon cancer cells. *Scientific Reports*, 7(1), 6945. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07006-0>
- Shanmugam, C., Hines, R. B., Jhala, N. C., Katkoori, V. R., Zhang, B., Posey, J. A., Bumpers, H. L., Grizzle, W. E., Eltoum, I. E., Siegal, G. P., & Manne, U. (2011). Evaluation of lymph node numbers for adequate staging of Stage II and III colon cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 4. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-4-25>

- Sharifi-Rad, J., Quispe, C., Patra, J. K., Singh, Y. D., Panda, M. K., Das, G., Adetunji, C. O., Michael, O. S., Sytar, O., Polito, L., Živković, J., Cruz-Martins, N., Klimek-Szczykutowicz, M., Ekiert, H., Choudhary, M. I., Ayatollahi, S. A., Tynybekov, B., Kobarfard, F., Muntean, A. C., ... Calina, D. (2021). Paclitaxel: Application in Modern Oncology and Nanomedicine-Based Cancer Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/3687700>
- Shi, Y., Zhang, J., Li, Y., Feng, C., Shao, C., Shi, Y., & Fang, J. (2025). Engineered mesenchymal stem/stromal cells against cancer. *Cell Death & Disease*, 16(1), 113. <https://doi.org/10.1038/s41419-025-07443-0>
- Sun, Z., Wang, S., & Zhao, R. C. (2014). The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *Journal of Hematology & Oncology*, 7(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-7-14>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tameda, M., Sugimoto, K., Shiraki, K., Inagaki, Y., Ogura, S., Kasai, C., Yoneda, M., Okamoto, R., Yamamoto, N., Takei, Y., Ito, M., & Nobori, T. (2014). Resveratrol sensitizes HepG2 cells to TRAIL-induced apoptosis. *Anti-Cancer Drugs*, 25(9), 1028-1034.
- Tarocchi, M. (2014). Molecular mechanism of hepatitis B virus-induced hepatocarcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(33), 11630. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i33.11630>
- Thanikachalam, K., & Khan, G. (2019). Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/NU11010164>
- Thapa, B., Kc, R., & Uludağ, H. (2020). TRAIL therapy and prospective developments for cancer treatment. *Journal of Controlled Release*, 326, 335-349. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.013>
- Tian, B., & Liu, J. (2020). Resveratrol: A review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(4), 1392-1404. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10152>
- To, H. T. N., Le, Q. A., Bui, H. T. T., Park, J.-H., & Kang, D. (2022). Modulation of Spheroid Forming Capacity and TRAIL Sensitivity by KLF4 and Nanog in Gastric Cancer Cells. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(1), 233-248. <https://doi.org/10.3390/cimb45010018>
- Toh, M. R., Wong, E. Y. T., Wong, S. H., Ng, A. W. T., Loo, L.-H., Chow, P. K.-H., & Ngeow, J. (2023). Global Epidemiology and Genetics of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 164(5), 766-782. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2023.01.033>
- Tong, Y., Gao, H., Qi, Q., Liu, X., Li, J., Gao, J., Li, P., Wang, Y., Du, L., & Wang, C. (2021). High fat diet, gut microbiome and gastrointestinal cancer. *Theranostics*, 11(12), 5889-5910. <https://doi.org/10.7150/thno.56157>
- Trad, D., Bibani, N., Sabbah, M., Elloumi, H., Gargouri, D., Ouakaa, A., & Kharrat, J. (2017). Known, new and emerging risk factors of hepatocellular carcinoma (review). *La Presse Médicale*, 46(11), 1000-1007. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2017.09.025>
- Tümen, D., Heumann, P., Gülow, K., Demirci, C.-N., Cosma, L.-S., Müller, M., & Kandulski, A. (2022). Pathogenesis and Current Treatment Strategies of Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines*, 10(12), 3202. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123202>

- Turati, F., Galeone, C., Rota, M., Pelucchi, C., Negri, E., Bagnardi, V., Corrao, G., Boffetta, P., & La Vecchia, C. (2014). Alcohol and liver cancer: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Annals of Oncology*, 25(8), 1526-1535. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu020>
- Varfolomeev, E., Maecker, H., Sharp, D., Lawrence, D., Renz, M., Vucic, D., & Ashkenazi, A. (2005). Molecular Determinants of Kinase Pathway Activation by Apo2 Ligand/Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand. *Journal of Biological Chemistry*, 280(49), 40599-40608. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509560200>
- Vicinanza, C., Lombardi, E., Ros, F. D., Marangon, M., Durante, C., Mazzucato, M., & Agostini, F. (2022). Modified mesenchymal stem cells in cancer therapy: A smart weapon requiring upgrades for wider clinical applications. *World Journal of Stem Cells*, 14(1), 54-75. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v14.i1.54>
- Wang, D.-K., Zuo, Q., He, Q.-Y., & Li, B. (2021). Targeted Immunotherapies in Gastrointestinal Cancer: From Molecular Mechanisms to Implications. *Frontiers in Immunology*, 12, 705999. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.705999>
- Wang, J. J., Lei, K. F., & Han, F. (2018). Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments. *Tumor Microenvironment*, 22, 3855-3864. https://doi.org/10.26355/eurev_201806_15270
- Wang, M., Zhang, H., Yi, L., Högger, P., Arroo, R., Bajpai, V. K., Prieto, M.-A., Simal-Gandara, J., Wang, S., & Cao, H. (2022). Stability and antioxidant capacity of epigallocatechin gallate in Dulbecco's modified eagle medium. *Food Chemistry*, 366, 130521. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130521>
- Wang, P., & Sang, S. (2018). Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene. *BioFactors*, 44(1), 16-25. <https://doi.org/10.1002/biof.1410>
- Weeden, C. E., Hill, W., Lim, E. L., Grönroos, E., & Swanton, C. (2023). Impact of risk factors on early cancer evolution. *Cell*, 186(8), 1541-1563. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.013>
- Wu, C. (2018). Systemic Therapy for Colon Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 27(2), 235-242. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.11.001>
- Xie, C., Du, L.-Y., Guo, F., Li, X., & Cheng, B. (2019). Exosomes derived from microRNA-101-3p-overexpressing human bone marrow mesenchymal stem cells suppress oral cancer cell proliferation, invasion, and migration. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 458(1-2), 11-26. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03526-7>
- Yamine, A., Namsi, A., Vervandier-Fasseur, D., Mackrill, J. J., Lizard, G., & Latruffe, N. (2021). Polyphenols of the Mediterranean Diet and Their Metabolites in the Prevention of Colorectal Cancer. *Molecules*, 26(12), 3483. <https://doi.org/10.3390/molecules26123483>
- Yang, L., Wang, Y., Zheng, H., Zhang, D., Wu, X., Sun, G., & Yang, T. (2017). Low-dose 5-fluorouracil sensitizes HepG2 cells to TRAIL through TRAIL receptor DR5 and survivin-dependent mechanisms. *Journal of Chemotherapy*, 29(3), 179-188. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2016.1277048>
- Yegutkin, G. G. & Boison, D. (2022). ATP and Adenosine Metabolism in Cancer: Exploitation for Therapeutic Gain. *Pharmacological Reviews*, 74(3), 799-824. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000528>
- Zhang, Z.-D., Tao, Q., Bai, L.-X., Qin, Z., Liu, X.-W., Li, S.-H., Yang, Y.-J., Ge, W.-B., & Li, J.-Y. (2023). The Transport and Uptake of Resveratrol Mediated via Glucose

Transporter 1 and Its Antioxidant Effect in Caco-2 Cells. *Molecules*, 28(12), 4569.
<https://doi.org/10.3390/molecules28124569>

Zhao, H., Ming, T., Tang, S., Ren, S., Yang, H., Liu, M., Tao, Q., & Xu, H. (2022). Wnt signaling in colorectal cancer: Pathogenic role and therapeutic target. *Molecular Cancer*, 21(1), 144. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01616-7>