



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Aislamiento y caracterización biológica de Fibroblastos Asociados a Cáncer (CAFs) y Fibroblastos Normales (NFs) de biopsias con Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas (NSCLC)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

Sandra Lizbeth Ramírez Rodríguez

DIRECTORA DE TESIS

M. en C. María Cristina Negrete García

ASESORA INTERNA

Dra. María Teresa Corona Ortega



CIUDAD DE MÉXICO

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Este trabajo fue desarrollado en el Departamento de Bioquímica de la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” de la Secretaría de Salud, bajo la dirección de la M. en C. María Cristina Negrete García.



AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” por fomentar la investigación y creer en las nuevas generaciones de egresados, proporcionándole nuevas herramientas para una mejor capacitación en el ámbito laboral.

Al Dr. Javier Kelly García del Departamento de Cirugía de Tórax del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por la proporción de las muestras de estudio. A la Histotecnóloga Guadalupe Hiriart Valencia del Departamento de Morfología y a la Dra. María Eugenia Vázquez Manríquez del Departamento de Patología, ambas personal del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” por su asistencia técnica.

A la Dra. Blanca Ortiz Quintero por haberme dado la oportunidad de participar en su equipo de trabajo, sus enseñanzas y por el apoyo durante todo el tiempo en el que se desarrolló el proyecto.

A la M. en C. María Cristina Negrete García por creer en mi y darme la oportunidad de trabajar en el proyecto a su cargo; por compartir y brindarme todos sus conocimientos, por la confianza depositada en mi para realizar cada experimento, por su tolerancia y apoyo, lo cual me ayudo a integrarme a la vida profesional de manera satisfactoria.

A mi asesora interna la Dra. María Teresa Corona Ortega y a los miembros del jurado la M. en C. Araceli García del Valle, el Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava y la

M. en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez por la revisión del manuscrito; ya que sus comentarios acertados fortalecieron, enriquecieron y mejoraron el trabajo de tesis.

A la señora Rosa Nieto por su apoyo técnico, por salvarme muchas veces con material que no tenía ni idea de donde podría sacar, por el rico café que preparaba todas las mañanas y por su cariño.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y principalmente a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza porque al convertirse en mi segundo hogar, me brindó las herramientas para prepararme en la vida laboral.

DEDICATORIAS

A mis PADRES, Antonio Ramírez Guzmán y Rosalba Rodríguez Pérez por todo el amor, el esfuerzo, la dedicación, la perseverancia, la constancia, las enseñanzas, la paciencia y el apoyo a lo largo de mi vida; ya que todo esto me ayudo a confiar en mi para alcanzar cada una de mis metas. Por que siempre estuvieron ahí, para ayudarme a levantarme todas esas veces en las que creí darme por vencida y por enseñarme que las caídas son buenas, ya que nos fortalecen y nos ayudan a enfrentar la vida. Gracias a todo esto, me enseñaron a ser una excelente persona. Los AMO!!!

A Francisco Fernández mi mejor amigo, mi alma gemela, porque siempre estuviste y estás conmigo apoyándome incondicionalmente en todo momento, por compartir conmigo tu vida, tu tiempo, tu paciencia, tu amor, y sobre todo por ser esa buena, dedicada, bondadosa, alegre, carismática, berrinchuda y amigüera persona que eres. Gracias por todas las experiencias vividas a tu lado (y las que nos faltan) y por dejarme ser parte de tu vida. TE AMO!!!

A mis HERMANAS Lesly y Natalia por ser mi compañía, mis amigas de juegos, por su paciencia y apoyo. Por todos esos momentos que compartimos juntas. Las quiero mucho y siempre estaré ahí para apoyarlas.

A TODA MI FAMILIA, principalmente a mi abuelita Trinidad, abuelito Abundio, tía Griselda, primo Ricardo, tía Roció y tío Mauricio, porque siempre han estado ahí para apoyarme, escucharme y aconsejarme; porque directa o indirectamente siempre influyeron en mí para seguir adelante. Y en especial a mi abuelita Susana,

que aunque ya esta en el cielo, quiero que sepa que fue y será uno de los principales pilares de mi vida, que siempre la llevo en mi corazón y en donde quiera que se encuentre, se que siempre nos esta cuidando.

A Cristina Negrete, en quien encontré una amiga, una persona directa de las cuales hay muy pocas, que te escucha y apoya sin pedir nada a cambio. Y sobre todo una excelente persona.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1. CÁNCER	5
3.2. SUPERVIVENCIA DEL CÁNCER PULMONAR	10
3.3. FACTORES ETIOLÓGICOS DEL CÁNCER PULMONAR	10
3.4. DIAGNÓSTICO Y PATOLOGÍA DEL CÁNCER PULMONAR.....	12
3.5. PATOGÉNESIS DEL CÁNCER PULMONAR	15
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
5. HIPÓTESIS	28
6. OBJETIVOS.....	29
6.1. OBJETIVO GENERAL	29
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
7. MATERIAL Y MÉTODOS	30
7.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	30
7.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO	30
7.3. VARIABLES	31
7.4. TÉCNICA.....	32
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
9. RESULTADOS.....	48
10. DISCUSIÓN.....	60
11. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	65
12. REFERENCIAS.....	66
APÉNDICE.....	76
A. MATERIAL Y EQUIPO	76
B. REACTIVOS Y SOLUCIONES	79
C. TÉCNICAS	86
D. GRÁFICAS.....	88

ABREVIATURAS

ALK	Cinasa de linfoma anaplásico (A naplastic L ymphoma K inase)
AD	A denocarcinoma
BSA	Albúmina de suero bovino (B ovine S erum A lbumin)
CAFs	Fibroblastos asociados a cáncer (C ancer A ssociated F ibroblasts)
CAFs-I	Fibroblastos asociados a cáncer- Interno (C ancer A ssociated F ibroblasts)- I nterno
CAFs-F	Fibroblastos asociados a cáncer-Frontal (C ancer A ssociated F ibroblasts)- F rontal
CLCF-1	Factor similar a la cardiotropina 1 (C ardiotrophin L ike C ytokine F actor- 1)
CMN SXXI	C entro M edico N acional S iglo XXI
CP	C áncer P ulmonar
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo (C onnective T issue G rowth F actor)
CXCLs	Quimiocinas CXC (CXC Chemokines)
CCLs	Quimiocinas CC (CC Chemokines)
D.E.	D esviación E stándar
ECM	Matriz extracelular (E xtra C ellular M atrix)
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (E pidermal G rowth F actor)
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (E pidermal G rowth F actor R eceptor)
EndMT	Transición mesénquima endotelio (E ndothelial- M esenchymal T ransition)
EPOC	E nfermedad P ulmonar O bstructiva C rónica

EMT	Transición mesénquima epitelio (E phitelial- M esenchymal T ransition)
F	F rontal o periférico
FAP	Proteína activadora de fibroblastos (F ibroblast Activation P rotein)
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2 (F ibroblast G rowth F actor-2)
FSP-1	Proteína específica de fibroblastos 1 (F ibroblast- S pecific P rotein 1)
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (I nsulin-like G rowth F actor-1)
HE	H ematoxilina- E osina
HIF	Factor inducido por hipoxia (H ypoxia I nducible F actor)
HGF	Factor de crecimiento hepatocitos (H epatocyte G rowth F actor)
I	I ntratumoral o intra
Ig	I mmunoglobulina/ anticuerpo
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (I nternational A gency for R esearch on C ancer)
IHC	Inmunohistoquímica (I mmunohistochemistry)
IL	Interleucina (I nterleukin)
INER	I nstituto N acional de E nfermedades R espiratorias
MC	M edio C ondicionado
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)
NCCN	N ational C omprehensive C ancer N etwork
NFs	Fibroblastos Normales (N ormal F ibroblasts)
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas (N on S mall C ell L ung C ancer)
OMS	O rganización M undial de la S alud

PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos (P hosphate B uffered S aline)
PDGF-R	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (P latelet- D erived G rowth F actor R eceptor)
PET	Tereftalato de polietileno (P olyethylene T eraphtalate)
RF	R ojo de F enol
S	S ano o normal
SCLC	Cáncer de pulmón de células pequeñas (S mall C ell L ung C ancer)
SFB	S uero F etal B ovino
SPARC	(S ecreted P rotein A cidic and R ich in C ysteine)
α-SMA	Alfa actina de músculo liso (A lpha S mooth M uscle A ctine)
T	T ween
TC	T omografía C omputarizada
TGF-β	Factor de crecimiento transformante-β (T ransforming G rowth F actor β)
VEFG	Factor de crecimiento endotelial vascular (V ascular E ndothelial G rowth F actor)

1. RESUMEN

Los fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) son el principal componente celular y de mayor proporción en el microambiente tumoral. Participan en la regulación de la promoción e invasión de las células tumorales mediante la secreción de factores de crecimiento, quimiocinas y proteínas de matriz extracelular (ECM). El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) es una neoplasia con alto índice de mortalidad debido a que se detecta en etapas avanzadas de metástasis. En la literatura, no existe información acerca de la participación de los CAFs asociada con la gran heterogeneidad espacial existente dentro un misma masa tumoral. El objetivo principal de este trabajo fue determinar si los CAFs aislados de dos diferentes regiones espaciales, la región frontal (CAF-F) y la región interna (CAF-I) de tumores de pacientes con NSCLC, presentaban características inmunofenotípicas y biológicas diferenciales. Ambas poblaciones fueron comparadas con los fibroblastos aislados de tejido sano adyacente (NFs). Se demostró que los CAFs-F presentaban una mayor inmunoreactividad a la α -actina del músculo liso (α -SMA) que los CAFs-I y NFs, pero una morfología similar. Se probó la capacidad proliferativa e invasiva en células epiteliales tumorales de carcinoma de pulmón (A549), los CAFs-F presentaron mayor actividad con respecto a los CAFs-I y a los NFs. Estos hallazgos en conjunto aportaron la evidencia de que la heterogeneidad espacial tumoral es una característica que si está asociada con la capacidad tumoral de sus diferentes componentes y se debe tomar en cuenta para futuras investigaciones, la búsqueda de posibles

marcadores asociados a la progresión tumoral y probables blancos terapéuticos en la enfermedad del NSCLC.

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer pulmonar (CP) es la principal causa de muerte por neoplasias en México y a nivel mundial ¹⁻³ con la tasa de sobrevivida más baja entre el total de las neoplasias ^{2,4}. La alta mortalidad del CP se atribuye principalmente a un diagnóstico tardío y a la ineffectividad de las terapias aplicadas al momento de su diagnóstico ^{1, 3, 5}. El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés), comprende aproximadamente el 85% del total del CP siendo el Adenocarcinoma el subtipo histológico más frecuente ^{6,7}. El proceso de metástasis es el principal causante de mortalidad del CP ⁸, el cual no depende solamente de las alteraciones genéticas intrínsecas de las células tumorales, sino además de la comunicación recíproca entre éstas y los diferentes componentes del microambiente o estroma tumoral ⁹. Los fibroblastos asociados a cáncer (CAFs, por sus siglas en inglés) son los componentes de mayor proporción en el estroma tumoral en el NSCLC ¹⁰. Se ha demostrado que los CAFs son protagonistas en la tumorigénesis a través de diversos mecanismos como la proliferación, inflamación, angiogénesis, invasión y necrosis celular ^{7, 11}. A la fecha los mecanismos moleculares que describen la participación de los CAFs en la promoción e invasión en el CP no han sido totalmente aclarados. En algunos otros tipos de cáncer sólido, se ha observado que los CAFs de la región frontal o periférica del tumor presenta diferente capacidad invasiva y migratoria con respecto a los CAFs de la región interna, donde al parecer la presencia o ausencia de ciertos factores de crecimiento o angiogénicos son los responsables de dicha diferencia ¹²⁻¹⁴. Por lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue conocer si

los CAFs de diferentes zonas topográficas del tumor pulmonar, presentaban alguna diferencia en su capacidad de promover la invasión de la célula tumoral.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Cáncer

El cáncer o neoplasia maligna es un grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo, caracterizada por el crecimiento incontrolado de células anormales y la diseminación de estas, las cuales se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos (metástasis), y si esta propagación no es controlada puede causar la muerte ¹⁵⁻¹⁷. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en el 2012 hubo 14.1 millones de nuevos casos de cáncer y 8.2 millones de muertes a nivel mundial ¹⁸.

3.1.1. Causas del Cáncer

El cáncer es causado por factores externos, tales como tabaco, organismos infecciosos, y una dieta poco saludable, y factores internos, tales como mutaciones genéticas heredadas, hormonas y condiciones inmunes. Estos factores pueden actuar juntos o en secuencia para causar cáncer. Diez o más años pasan a menudo entre la exposición a factores externos y el cáncer detectable ¹⁵.

3.1.2. Clasificación del cáncer

Los cánceres se clasifican de dos maneras: por el tipo de tejido en el que se origina el cáncer (tipo histológico) y por sitio primario, o la ubicación en el cuerpo donde el cáncer se desarrolló por primera vez ¹⁹.

Desde el punto de vista histológico hay cientos de diferentes tipos de cáncer, que se agrupan en cinco categorías principales:

1) Carcinoma: Neoplasia maligna que comienza en el tejido epitelial, este recubre el exterior del cuerpo (piel) o cubren y alinean todos los órganos dentro del cuerpo (sistema digestivo, cavidad torácica y abdominal); representan el 80 al 90% de cada 100 cánceres diagnosticados. La mayoría de los carcinomas afectan a órganos o glándulas capaces de secretar (los senos, que producen leche, o los pulmones, que secretan moco, o colon, próstata o vejiga).

Los carcinomas se dividen en varios subtipos:

- a) Adenocarcinoma: Comienza en células glandulares llamadas células adenomatosas que producen líquidos para mantener los tejidos húmedos.
- b) Carcinoma de células escamosas: Se origina en el epitelio escamoso y son células planas que cubren la superficie, en áreas como la piel o el revestimiento de la garganta o esófago.
- c) Carcinoma de células de transición: Las células de transición pueden estirarse a medida que un órgano se expande (revestimiento de la vejiga).
- d) Carcinoma basocelular: Las células basales se encuentran en la capa más profunda de las células de la piel.

2) Sarcoma: Cáncer maligno que comienzan en los tejidos conectivos o de apoyo tales como los huesos (osteosarcoma), cartílagos (condrosarcoma),

vasos sanguíneos (angiosarcoma), tejidos fibrosos (leiomiomasarcoma, rhabdomiosarcoma) y grasa (liposarcoma); estos constituyen menos de 1% de cada 100 cánceres diagnosticados.

- 3) Leucemia:** Cánceres maligno o líquido de la médula ósea (sitio de la producción de células sanguíneas), se asocia a menudo a la sobreproducción de glóbulos blancos inmaduros (leucemia granulocítica (granulocíticos), leucemia linfoblástica (linfocitos), policitemia vera (glóbulos rojos)) y por lo tanto, no funcionan correctamente para combatir infecciones, es poco frecuentes y representa el 3% por cada 100 casos de cáncer y se asocia más comúnmente a niños.
- 4) Mieloma:** Cáncer maligno que comienza en las células plasmáticas de la médula ósea, ya que estas se vuelven anormales y se multiplican de manera incontrolable, produciendo un solo tipo de anticuerpo (Ig), el cual no funciona correctamente para combatir infecciones, constituye aproximadamente el 1% de cada 100 casos de cáncer.
- 5) Linfoma:** El sistema linfático es un sistema de tubos y glándulas en el cuerpo (glándulas linfáticas, los vasos linfáticos, bazo y timo) que filtran los líquidos corporales y produce linfocitos que combate infecciones normalmente. El cáncer maligno (linfoma) comienza a dividir a los linfocitos antes de estar maduros y no mueren naturalmente (acumulan), por lo tanto no pueden combatir las infecciones; constituye aproximadamente el 5% de cada 100 casos de cáncer^{19, 20}.

3.1.3. Incidencia y mortalidad del Cáncer Pulmonar

El cáncer pulmonar (CP) es la neoplasia más frecuentemente diagnosticada con 1.8 millones de casos (tabla I), lo que representa alrededor del 12.9% de los diagnósticos por cáncer a nivel mundial en el 2012. Además, mundialmente constituyó la primera causa de muerte por neoplasia con 1.6 millones de decesos ² (tabla II).

Tabla I. Estimación de nuevos casos por neoplasias (miles), ASRs y el riesgo acumulativo a los 75 años por sexo de los 10 principales tipos de cáncer a nivel mundial en el 2012 ².

Sitio del cáncer	Ambos sexos				Masculino				Femenino			
	Casos	(%)	ASR*	Cum Risk (%)**	Casos	(%)	ASR*	Cum Risk (%)**	Casos	(%)	ASR*	Cum Risk (%)**
Pulmón	1825	12.9	23.1	2.7	1242	16.7	34.2	3.9	583	8.7	13.6	1.6
Mama	1677	11.9	43.3	4.6					1677	25.2	43.3	4.6
Colon y recto	1360	9.7	17.2	2.0	746	10.0	20.6	2.4	614	9.2	14.3	1.6
Próstata	1112	7.9	31.1	3.8	1112	15.0	31.1	3.8				
Estomago	951	6.8	12.1	1.4	631	8.5	17.4	2.0	320	4.8	7.5	0.8
Hígado	782	5.6	10.1	1.1	554	7.5	15.3	1.7	228	3.4	5.4	0.6
Cuello uterino	528	3.7	14.0	1.4					528	7.9	14.0	1.4
Esófago	456	3.2	5.9	0.7	323	4.3	9.0	1.1	133	2.0	3.1	0.4
Páncreas	338	2.4	4.2	0.5	178	2.4	4.9	0.6	160	2.4	3.6	0.4
Melanoma de la piel	232	1.6	3.0	0.3	121	1.6	3.3	0.4	111	1.7	2.8	0.3

* ASR =Indica una tasa estandarizada por edad por 100,000. Las tasas están estandarizadas a la Población Mundial Estándar.

**Cum Risk= Riesgo acumulativo en % (de 0 a 74 años)..

En los últimos 100 años el CP pasó de ser una enfermedad poco común a un problema de salud pública a nivel mundial. Se tienen registros donde se demuestra que la incidencia y la mortalidad del CP aumento considerablemente

durante la década de 1930, debido principalmente a la popularidad generada en el hábito del tabaquismo durante esa época ²¹.

Tabla II. Estimación de muertes por neoplasias (miles), ASRs y el riesgo acumulativo a los 75 años por sexo de los 10 principales tipos de cáncer a nivel mundial en el 2012 ².

Sitio del cáncer	Ambos sexos				Masculino				Femenino			
	Muertes	(%)	ASR*	Cum Risk (%)**	Muertes	(%)	ASR*	Cum Risk (%)**	Muertes	(%)	ASR*	Cum Risk (%)**
Pulmón	1590	19.4	19.7	2.2	1099	23.6	30.0	3.3	491	13.8	11.1	1.2
Hígado	745	9.1	9.5	1.0	521	11.2	14.3	1.6	224	6.3	5.1	0.6
Estomago	723	8.8	8.9	1.0	469	10.1	12.8	1.4	254	7.2	5.7	0.6
Colon y recto	694	8.5	8.4	0.9	374	8.0	10.0	1.0	320	9.0	6.9	0.7
Mama	522	6.4	12.9	1.4					522	14.7	12.9	1.4
Esófago	400	4.9	5.0	0.6	281	6.0	7.7	0.9	119	3.4	2.7	0.3
Páncreas	331	4.0	4.1	0.4	174	3.7	4.8	0.5	157	4.4	3.4	0.4
Próstata	307	3.7	7.8	0.6	307	6.6	7.8	0.6				
Cuello uterino	266	3.2	6.8	0.8					266	7.5	6.8	0.8
Leucemia	265	3.3	3.4	0.3	151	3.2	4.2	0.4	114	3.2	2.8	0.3

* ASR =Indica una tasa estandarizada por edad por 100,000. Las tasas están estandarizadas a la Población Mundial Estándar.

**Cum Risk= Riesgo acumulativo en % (de 0 a 74 años)..

Se ha observado que la edad media en la que se diagnostica el CP es de 70 años, aunque también se han llegado a registrar casos en personas menores de 55 años. En el año 2006 el 24% de todas las muertes atribuibles al CP fueron personas mayores de 80 años y se espera que a mediados de este siglo se cuadruplique el número de muertes por CP en personas de 85 años ²².

3.2. Supervivencia del Cáncer Pulmonar

Solamente el 15% de los pacientes con CP son detectados en etapas tempranas de la enfermedad, debido a que como la mayoría de las neoplasias, suele ser asintomática “silenciosa” en su fase inicial ^{3, 23} y a que se carece de pruebas diagnósticas sensibles y específicas durante este periodo ²³. Por lo que cuando es detectada ya se encuentra en etapas avanzadas donde se presenta metástasis a diferentes órganos blanco. Aun así, la tasa general de supervivencia relativa a un año para el CP ha ido incrementándose con el paso del tiempo, así para el año 2009 su registro alcanzo del 42 a 44.7%. Este incremento en parte se ha atribuido entre muchos otros factores, a la introducción de novedosas técnicas quirúrgicas y a tratamientos de quimioterapia y radioterapia más específicos ^{21, 23}. Sin embargo, hay que resaltar que el porcentaje de supervivencia está relacionado directamente con la etapa de desarrollo de la enfermedad en el momento de su diagnóstico ²⁴ y para un periodo de cinco años el porcentaje es de 54.8% para el CP localizado, 27.4% para el regional, 4.2% para el distante y 7.5% para el que ya presenta metástasis ^{23, 24}.

3.3. Factores etiológicos del Cáncer Pulmonar

Se estima que el tabaco produce el 90% de las muertes por CP en hombres y del 75% al 80% en mujeres ^{21, 25}. El riesgo del CP aumenta de acuerdo al periodo de inicio de este hábito y el número de cigarrillos fumados al día ²⁶.

Se ha observado incremento en la incidencia de presentar CP en individuos que han fumado menos de 100 cigarrillos en toda su vida, la cual es considerada como la “población no fumadora” o pasiva ^{22, 26}. En el 2012, la población nominada como

“no fumadora” alcanzo porcentajes que van del 15% al 25% de toda la población con CP la cual provoca aproximadamente 300,000 muertes anualmente. Algunos de los factores desencadenantes de la enfermedad en esta población denominada pasiva, es la exposición a algunos componentes de la contaminación ambiental o propiamente a la convivencia con gente fumadora ²². Por otro lado, existe reportes donde manifiestan que el riesgo de CP en pacientes jóvenes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana, es de dos a cuatro veces mayor que en la población general ^{21, 27}.

Existe otro tipo de población con alto riesgo de contraer CP, se trata de las personas que durante algún periodo de su vida están o han estado expuestas al humo de leña; específicamente estos casos se han reportado en países como Japón, China y México, y la mayor incidencia se presenta en el género femenino ^{18, 28}. De acuerdo a los reportes hechos por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) se menciona que elementos como el arsénico, el asbesto, el berilio, el cadmio, los éteres de cloro metilo, el cromo, el níquel, el radón, el sílice y cloruro de vinilo son considerados como agentes carcinogénicos pulmonares ocupacionales altamente riesgosos para el desarrollo del CP. De hecho en un estudio realizado en el año 2000, informaron que el 10% de las muertes por CP entre los hombres (88,000 defunciones) y 5% entre las mujeres (14,300 defunciones) a nivel mundial, fue debido a la exposición de estos ²⁶.

Adicionalmente, se ha observado que algunos procesos inflamatorios crónicos como el enfisema pulmonar, asma, fibrosis idiopática y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) entre otras, promueven algún tipo de mutaciones

genéticas que pueden afectar el proceso de apoptosis e incrementar la angiogénesis, promoviendo así el riesgo a contraer CP ²².

3.4. Diagnóstico y Patología del Cáncer Pulmonar

Como ya se había mencionado, la mayor parte de los pacientes que presentan CP, son diagnosticados en etapas tardías y en el estado avanzado de la enfermedad. Esto es debido entre otros factores a la falta de síntomas en las primeras etapas de este padecimiento, ocasionando que el tratamiento con intención curativa sea difícil y poco efectivo ^{6, 29-31}.

La remisión urgente de una radiografía de tórax o una tomografía computarizada (TC), se debe indicar cuando un paciente presenta hemoptisis (expectoración con sangre) o cualquiera de los siguientes síntomas inexplicables y persistentes (es decir, que dure más de 3 semanas) como tos, dolor en el pecho u hombro, disnea (dificultad para respirar), pérdida de peso, ronquera, acropaquia (dedos de tambor), hinchazón de la cara, estridor (sonido respiratorio agudo) y derrame pleural ^{3, 29-32}; ya que es la primera línea de investigación para los pacientes con síntomas sospechosos.

Se deben solicitar estudios de laboratorio que incluyan al menos biometría hemática, química sanguínea, pruebas de funcionamiento hepático y tiempos de coagulación. Estos estudios ayudan a determinar el estado general del enfermo y son de utilidad en el caso de que requiera un diagnóstico eficaz mediante procesos invasivos ³³. Algunos estudios de imagen utilizados para un paciente con probable CP, es la Resonancia magnética, la Tomografía por emisión de protones y la Tomografía computarizada por emisión de fotón único, ya que tienen mayor

sensibilidad ²⁹. Sí los estudios de imagen no son suficientes para realizar el diagnóstico de CP, adicionalmente se deben realizar estudios histológicos y citológicos de biopsias de tejido pulmonar ^{6,34}.

La evaluación patológica es necesaria para clasificar el tipo histológico del CP, y determinar la extensión, invasión o metástasis de la enfermedad. Actualmente algunos centros hospitalarios de primer nivel ya cuentan con la infraestructura necesaria para realizar estudios de diagnóstico molecular en biopsias de tejido pulmonar para determinar si existe algún tipo de mutación ⁶. Entre las mutaciones más incidentes en este padecimiento se encuentra la del receptor del gen del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) y la cinasa de linfoma anaplásico (ALK, por su siglas en inglés) ³⁵.

Una vez que se tienen los resultados patológicos y los de imagenología, se propone el plan de tratamiento más adecuado y eficaz. La resección quirúrgica planificada (lobectomía), radioterapia o radiocirugía son un procedimiento ideal para pacientes con CP en etapas tempranas de la enfermedad ^{3, 6}. En etapa localmente avanzada, que es cuando el tumor no tiene posibilidades de resección quirúrgica y no se invaden estructuras importantes, el tratamiento es con radioterapia o quimioterapia para mejorar su calidad de vida, pero no curativo ³.

3.4.1. Clasificación del Cáncer Pulmonar

El CP es un tipo de cáncer que puede comenzar en las células que recubren los bronquios, bronquiolos y alvéolos pulmonares ³⁶. El CP está clasificado en función a sus características histológicas, biología, tratamiento y pronóstico en dos grandes grupos ⁶:

1) Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés), comprende el 10-15% de los casos de CP.

2) Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés), comprende el 80-85% de los casos de CP. El NSCLC está conformado a su vez en dos grupos con sus diferentes subtipos ^{6, 36}.

a) Carcinoma de células no escamosas

i) Subtipo Adenocarcinoma

El adenocarcinoma es un tumor epitelial maligno con diferenciación glandular o producción de mucina, se presenta en forma acinar, papilar, bronquioloalveolar (mucinoso, no mucinoso), sólido con mucina o una mezcla de estos patrones ³⁷; representan el 38-40 % de todos los CP ^{36, 38, 39}.

ii) Subtipo Carcinoma de células grandes y sus variantes

Estos tumores a menudo están situados en la periferia de la parénquima pulmonar y por lo general son grandes tumores necróticos. Sus variantes son neuroendocrino, basaloide, células tipo linfocarcinoma y rabdoide, representa el 3% de todos los CP.

b) Carcinoma de células escamosas o epidermoide

Dos tercios de los carcinomas de células escamosas se presentan como tumores centrales y el tercio restante en la periférica. Las características morfológicas que caracterizan diferenciación escamosa incluyen puente intercelular, queratinización de células individuales y formación de perlas córneas ^{38, 39}, son aproximadamente el 25-30% de los CP ^{36, 38}.

Debido a la alta incidencia del NSCLC comparado con los demás tipos, en este trabajo se enfocara solo a este tipo de cáncer y del subtipo de Adenocarcinoma.

3.5. Patogénesis del Cáncer Pulmonar

De acuerdo a la teoría genética de la carcinogénesis, se asume que la exposición a los carcinógenos es el detonante de las alteraciones genéticas que conducen a un fenotipo maligno ⁴⁰.

Se describen tres procesos etiológicos causantes del CP: la carcinogénesis química (exposición a benzopireno, asbesto y más de 800 productos químicos), la carcinogénesis física (causada por radiación ionizante, radiación ultravioleta) y la carcinogénesis biológica (promovida por virus, bacterias, hongos o algún otro tipo de microorganismos) ⁴¹. Estos carcinógenos inicialmente inducen una respuesta inflamatoria que puede finalizar en modificaciones genéticas y/o epigenéticas ^{11, 40,} ⁴² de las células epiteliales o de los componentes del estroma pulmonar ⁴⁰.

3.5.1. Microambiente tumoral

Recientemente, se han ido incrementando numerosas evidencias donde se sugiere que el proceso de carcinogénesis que comprende la invasión, la progresión y la metástasis del cáncer, se determina no solo por el comportamiento de las células epiteliales tumorales, sino también por la presencia de un microambiente tumoral favorable ^{43, 44}. Se ha demostrado que dichos procesos están influenciados y controlados por interacciones celulares entre los diferentes componentes del microambiente tumoral y las propias células epiteliales cancerosas, promoviendo así el desarrollo y la progresión tumoral ^{45, 46}.

Stephen Paget fue pionero en el concepto de microambiente tumoral en 1889, con la hipótesis de “la semilla y el suelo” ⁴⁷. Paget analizó 700 datos *post mortem* de mujeres con cáncer de mama y encontró que la distribución de metástasis a otros órganos blanco no era aleatorio; sino que el sitio de la metástasis preferido de las células cancerosas (semilla) era seleccionado de acuerdo a las características presentes en el microambiente tumoral (suelo) del órgano blanco, acuñando en ese entonces la hipótesis de la “semilla y el suelo”.

Un siglo después, en 1980 Hart y Fidler reintrodujeron la hipótesis de “la semilla y el suelo” a través de estudios realizados en ratones, inyectándoles células de melanoma B16 (semilla); ellos observaron que el crecimiento del tumor se presentaba preferentemente en el pulmón y ovarios pero no en los riñones; lo cual sugirió que la elección del órgano blanco para su metástasis se debía a características únicas del microambiente tumoral (suelo). Por lo que ahora, se sabe que el desarrollo, la invasión y metástasis de una célula tumoral, no sólo es dependiente de sus alteraciones genéticas, sino también a una serie de interacciones dinámicas que se dan entre éstas y los diferentes componentes del estroma tumoral ⁴⁸.

3.5.1.1. Características de microambiente tumoral

El microambiente o estroma tumoral está conformado principalmente por tres componentes; el estructural, el soluble y el celular ⁴⁹. El primer componente contiene proteínas del tipo estructural como la colágena, la elastina y la fibronectina principalmente, las cuales en conjunto conforman la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés); en la parte soluble se encuentran

todas aquellas proteasas, citocinas, quimiocinas y cualquier otro metabolito que es liberado por las células existentes en el estroma tumoral ^{49, 50}. Finalmente el componente celular, el cual está constituido por diferentes estirpes celulares las cuales son células de tipo inflamatorio, endoteliales, adipocitos, pericitos y fibroblastos, siendo estos últimos los reportados, como los de mayor proporción dentro del microambiente o estroma tumoral ^{43, 51, 52}.

3.5.1.2. Activación del microambiente tumoral

Se ha descrito que durante las etapas tempranas del desarrollo e invasión tumoral, la membrana basal epitelial tumoral es degradada por la presencia de metaloproteinasas adquiriendo mayor actividad celular ⁴⁹ (tabla III). Dentro de los diferentes fenómenos que se registran durante esta fase de activación se destaca primordialmente la de los fibroblastos residentes o normales (NFs, por sus siglas en inglés) presentes, a un nuevo subtipo denominado fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) ^{49, 50, 53}. Dicho proceso, se caracteriza por la formación de nuevos capilares (angiogénesis), lo cual provoca mayor contacto entre los CAFs y las células tumorales ⁴⁹. Se ha demostrado que existe incremento en la producción de mediadores solubles producidos por los CAFs como factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas (tabla III) estimulando así la promoción e invasión de las células tumorales ⁵².

La activación y el incremento en la síntesis de las proteínas estructurales y solubles en el microambiente tumoral también son conocidos con el término histológico de desmoplasia ⁵⁴, el cual se describe como mecanismo de defensa para prevenir el crecimiento tumoral ^{49, 55}, sin embargo en varios estudios recientes

se ha demostrado que tiene efectos contrarios, participando en varios aspectos de la progresión tumoral, tales como la angiogénesis, migración, invasión y metástasis del tumor ⁴⁹.

Tabla III. Principales factores de crecimiento y quimiocinas liberadas por CAFs en procesos de tumorigénesis ⁴⁹.

Factor	Función
TGF-β	Controla proliferación y diferenciación celular. En cáncer puede promover progresión y metástasis.
PDGF	Promoción en la proliferación de tejido conectivo. Regula crecimiento y división celular. Participa en angiogénesis. Regula la presión del fluido intersticial.
FGF2	Presente en medula ósea y en el subendotelio de la ECM. Promueve proliferación y diferenciación celular, Participa en angiogénesis.
EGF	Se une a EGFR, promoviendo proliferación, diferenciación y supervivencia.
VEGF	Incrementa permeabilidad celular. Participa en desmoplasia y angiogénesis.
HGF	Crecimiento paracrino celular, motilidad y factor morfogénico. Secretado por células mesénquima, actúa sobre el epitelio y el endotelio.
IGF-1	Factor de crecimiento. Tiene un efecto de crecimiento-promoción sobre casi todas las células corporales.
CTGF	Puede promover células de crecimiento endoteliales, migración, adhesión y supervivencia. Está implicado en la función de células endoteliales y angiogénesis.
CXCLs y CCLs	Quimiocinas tipo CXC y CL. Atraen leucocitos. Participan en angiogénesis y progresión celular.
SPARC	Asociación con migración e invasión de células tumorales.
ILs	Citocinas. Respuesta inflamatoria contra infección. Promueve trans migración de leucocitos. IL1 e IL6 pueden contribuir a la progresión tumoral.

Se ha observado que la cantidad relativa del estroma y su composición varía considerablemente de un tumor a otro y que no se relaciona con el grado de malignidad del tumor ⁵⁴; en el caso del CP se dice que la masa tumoral puede estar compuesta hasta por un 90% de estroma ⁵⁶.

3.5.1.3. Origen de los fibroblastos asociados a cáncer (CAFs)

Como ya se mencionó, todos aquellos fibroblastos activos o reactivos localizados en el estroma tumoral se les denomina CAFs o fibroblastos asociados a cáncer ^{57, 58}. Una de las principales fuentes de origen de los CAFs, son los fibroblastos locales normales (NFs) residentes en el estroma celular ^{51, 59} (figura I); sin embargo, también se ha reportado que pueden provenir de los pericitos, de células del músculo liso y adipocitos ^{43, 60}.

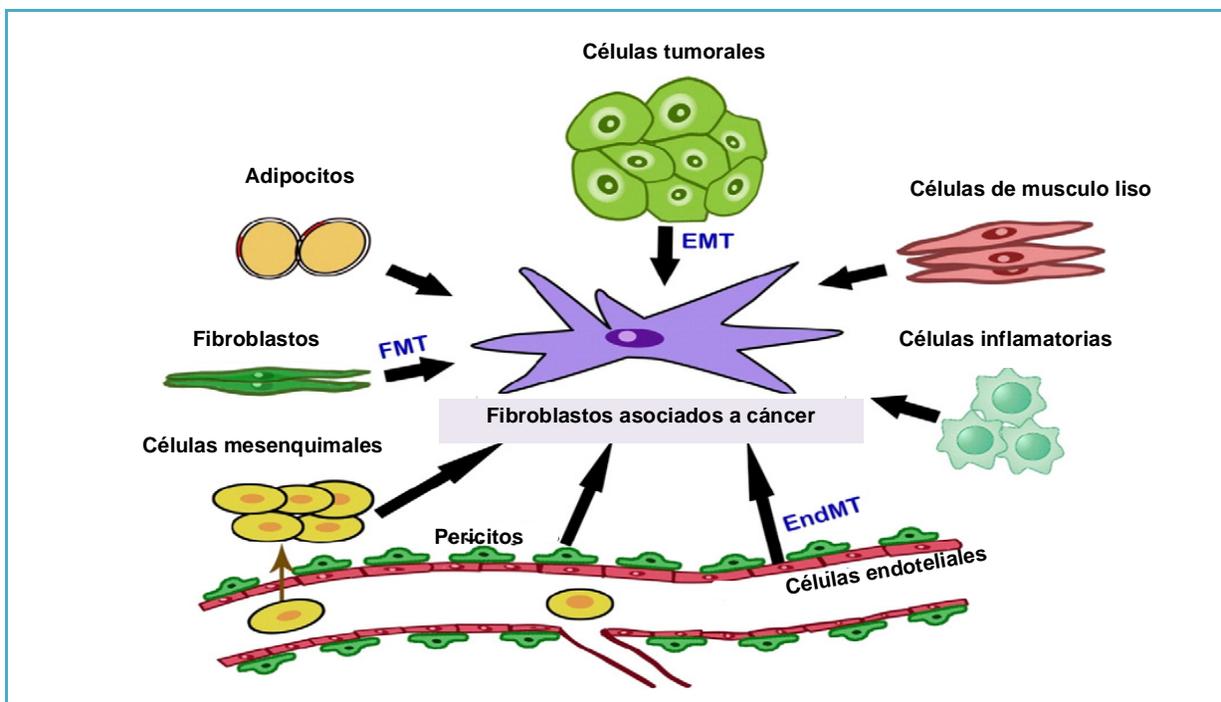


Figura I. Posibles orígenes de los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) en el microambiente tumoral tomada de Zhang y cols ⁴³.

Por otro lado, existen evidencias que tanto el proceso de transición endotelio mesénquima (EndMT, por sus siglas en inglés) y la transición epitelio mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés) derivadas de médula ósea pueden dar origen a los CAFs ^{46, 49, 61} (ver figura I).

3.5.1.4. Características de los CAFs

La definición molecular de los CAFs sigue siendo tema de debate, ya que los reportes de sus múltiples orígenes hacen que esta población sea considerada una población compleja y heterogénea ^{43, 60, 62, 63}. Los CAFs pueden ser identificados por la expresión de alfa actina de músculo liso (α -SMA, por sus siglas en inglés), sin embargo, debido a su alta heterogeneidad no se considera un marcador único y específico ⁶²; por lo que para caracterizarlos es necesario emplear combinaciones de una batería de marcadores celulares ^{54, 63, 64}, en PC se puede utilizar la proteína específica de fibroblastos-1 (FSP-1, por sus siglas en inglés), la proteína activadora de fibroblastos (FAP, por sus siglas en inglés), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas α/β (PDGFR, por sus siglas en inglés) ^{54, 65} o la vimentina ^{60, 66}.

Estudios recientes hechos sobre biopsias de pacientes con adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas y carcinoma de mama, identificaron que la sialo-glicoproteína denominada podoplanina presente en CAFs, puede actuar como marcador pronóstico de diferentes neoplasias ^{9, 67}.

Microscópicamente y morfológicamente los CAFs, se caracterizan por ser células alargadas en forma de huso ^{54, 58} o estrellas alargadas con núcleos dentados ⁶⁸. Contienen núcleo autocrómico con nucléolos prominentes, filamentos contráctiles citoplasmáticos y marcado retículo endoplásmico rugoso ^{43, 68}. En contraste, NFs o fibroblastos inactivos, contienen retículo endoplásmico menos abundante y el núcleo es aplanado y heterocromático ⁶⁸.

3.5.1.5. Funciones de los CAFs

Los CAFs es el tipo celular más prominente en el estroma tumoral ^{10, 52, 65}. Existen varios estudios donde se ha demostrado que los CAFs muestran grandes diferencias biológicas, funcionales y genéticas con respecto a los NFs ^{12, 69-75}.

En 1983, se hizo una primera distinción entre el comportamiento migratorio de las CAFs (células de rhabdomyosarcoma) y el de los NFs (fibroblastos de embriones humanos), cuando Mensing y cols. ⁶⁹ observaron que los CAFs dérmicos mostraron una respuesta quimiotáctica mayor a la fibronectina (quimioatrayente) con respecto a los NFs.

Ya para 1999 Olumi y cols. ⁷⁰ demostraron la capacidad que tienen los CAFs con respecto a los NFs de promover la invasión tumoral en cocultivo con la línea celular epitelial de próstata no tumoral (TAg-HPE) en un modelo *in vivo*. Esto fue gracias a un estudio donde aislaron fibroblastos de una masa tumoral de próstata (CAFs) y fibroblastos normales (NFs) provenientes de tejido adyacente sano. Cada población fue cocultivada con la TAg-HPE y cada cocultivo se colocó en geles de colágeno, que se injertaron en la capsula renal de los ratones con inmunodeficiencia. Los injertos se eliminaron de 20 a 85 días después de la inoculación. Al paso del tiempo ellos registraron un mayor crecimiento de masa tumoral en aquellos ratones inoculados con CAFs/TAg-HPE. Este efecto no se detectó en los ratones que fueron inoculados con los NFs/TAg-HPE, en las mismas condiciones experimentales.

Zhong y cols. en 2008 ⁷¹, se demostró la capacidad de los CAFs de incrementar la actividad migratoria de las células tumorales donde cocultivaron una línea celular de adenocarcinoma de pulmón mutante K-ras murino (LKR-13) con CAFs

provenientes de un tumor de pulmón murino. Entre varios fenómenos observados, los que mas destacaron fueron el de mayor migración y proliferación celular de la línea LKR-13 cuando eran cocultivadas en presencia de los CAFs, también se observó incremento en la secreción de proteínas implicadas en los procesos de angiogénesis, inflamación y proliferación celular.

Otro trabajo que demostró el incremento en la capacidad migratoria de los CAFs, se realizó en el 2010 por Ishii y cols.⁷², en dicho estudio se cultivaron fibroblastos asociados a cáncer de tejido pulmonar humano (CAF) y fibroblastos procedentes de tejido pulmonar no canceroso (NF) humano; y se compararon sus actividades migratorias en placas con cámaras de policarbonato. Los CAFs mostraron una actividad migratoria significativamente mayor en respuesta al quimioatrayente PDGF-BB que los de NFs.

En el 2012 se realizó una caracterización funcional entre CAFs y NFs de pulmón humano, en el cual Vicent y cols.⁷³ demostraron por inmunocitoquímica que los CAFs tienen mayor nivel de expresión de la alfa actina de músculo liso (α -SMA) con respecto a los NFs, en cultivo celular. Se realizaron ensayos *in vitro* con dos líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar de ratón (LKR10 y LKR13) y los medios condicionados (MC) de los CAFs y NFs, donde la proliferación de ambas líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar se incrementó significativamente con los MC de los CAFs cuando se comparó con los NFs.

Se hicieron microarreglos de expresión génica, para identificar los cambios entre los NFs y CAFs que pudieran contribuir a diferenciar la capacidad tumoral. Una vez analizados los resultados, se validaron los genes sub-expresados y sobre-expresados y se realizaron pruebas *in vitro*; se concluyó que los CAFs secretaron

mayor concentración de un factor similar a cardiotropina 1 (CLCF-1, por sus siglas en inglés) e IL-6, los cuales tuvieron mayor capacidad de ejercer efectos paracrinos específicos en la promoción del crecimiento tumoral con respecto a los NFs⁷³.

En el 2013 Kim y cols.⁷⁴ establecieron los cultivos primarios de CAFs aislados de pulmón tumoral de sujetos con NSCLC y de NFs aislados de tejido adyacente no tumoral. La reactividad con el anticuerpo α -SMA fue más intensa en la población de CAFs con respecto a los NFs a pesar de que la morfología fue muy similar. Para examinar el papel de los CAFs en la progresión y el crecimiento tumoral, se cocultivo la población de CAFs y NFs con dos diferentes líneas celulares de carcinoma pulmonar del tipo epitelial, la A549 y H358; sus resultados indicaron que después del cocultivo con CAFs, las células epiteliales adquirieron una morfología tipo fibroblastoide, en cambio las crecidas junto con los NFs no se modificaba de forma notoria su morfología original. Los autores atribuyeron sus resultados a que la presencia de los CAFs promovía el proceso de EMT; adicionalmente, en este trabajo se compararon los niveles de proliferación de ambas líneas tumorales en presencia del MC de CAFs o de NFs, donde se informó mayor capacidad proliferativa de las células tumorales cultivadas con el MC de los CAFs. En conjunto, estos resultados sugirieron que las CAFs de cultivo primario derivadas de pacientes con CP son más potentes para inducir el fenotipo EMT y la proliferación de células A549 y H358, lo que sugirió una mayor actividad con respecto a los NFs.

Ese mismo año Shintani y cols.⁷⁵ también obtuvieron cultivos primarios de CAFs aislados de biopsia pulmonar de sujetos con NSCLC y su contra parte de NFs

aislados de tejido normal del mismo paciente. La caracterización fenotípica de ambas poblaciones se realizó con el marcador α -SMA, pero además con la proteína activadora de fibroblastos (FAP, por su sigla en inglés). Ambos marcadores reflejaron una mayor reactividad en los CAFs en comparación con los NFs, incluso después de cinco pasajes. Al igual que en el trabajo de Kim del 2013⁷⁴ descrito anteriormente, se observó que el MC proveniente de CAFs inducía el fenotipo EMT de la línea epitelial A549, pero a diferencia del trabajo mencionado, tanto el MC proveniente de los CAFs y NFs producían cambios morfológicos similares, por lo que adicionalmente se determinó la inducción de la expresión de la proteína N-caderina en las células A549; para evaluar más específicamente el proceso de EMT, resultando un mayor y significativo cambio en las células A549 incubadas con el MC de CAFs, en comparación con el de NFs. Hay que resaltar que en este trabajo, adicional a la proliferación también se realizaron ensayos de migración en los cuales se observó una mayor y significativa actividad funcional inducida por el MC de CAFs. Estos resultados reforzaron lo que previamente ya se había propuesto sobre la comunicación que existe entre los fibroblastos y las células cancerosas⁷⁵.

An y cols.¹² realizaron un trabajo muy interesante donde estudiaron la expresión diferencial de genes en las células A549, en presencia de MC obtenido de CAFs y de NFs de un paciente con CP. Ellos observaron que algunos genes involucrados en el proceso de adhesión y apoptosis, se encontraban sobre expresados en la línea celular A549 cultivada con el MC de CAFs, con respecto a las cultivadas con el MC de los NFs. Por lo que los autores decidieron estudiar por inmunohistoquímica la expresión de la proteína Bcl-2, TGF- β y de algunas

integrinas en biopsias de pacientes con CP. Los resultados demostraron que algunas integrinas y la proteína Bcl-2, estaban claramente más expresadas en las células contenidas en la parte frontal o periférica de las biopsias pulmonares con respecto a las células contenidas en la parte central del tejido; y se observaba una tendencia en la correlación entre la expresión de dichas proteínas solamente en la parte periférica y no en la parte central del tejido, lo que sugería mayor progresión tumoral o metástasis a los nódulos linfoides registrada en los pacientes probados. Finalmente, ellos concluyeron que los CAFs participan en la progresión tumoral a través de la regulación de la expresión de algunos genes presentes únicamente en las células de la parte frontal o periférica de un nicho tumoral.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CP es la principal causa de muerte por neoplasias a nivel mundial, con una tasa de supervivencia del 17.7% para 5 años. Su alto índice de mortalidad se debe principalmente a un diagnóstico tardío, en etapas con un alto grado de metástasis, por lo que ya no existen opciones de tratamiento.

En el CP existen estudios donde se demuestra que el contacto y comunicación constante entre los fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) y la células tumorales promueven su supervivencia, proliferación, invasión, angiogénesis y metástasis a diferentes órganos blanco ⁹, sin que, a la fecha el total de los mecanismos moleculares que participan en dichos fenómenos estén totalmente esclarecidos. Existen investigaciones sobre el estudio de las diferencias funcionales entre los CAFs de la masa tumoral de pacientes con CP con respecto a los NFs de tejido sano adyacente ^{71, 72, 75}. Sin embargo, hasta donde se tiene conocimiento, no existe ningún estudio donde específicamente analicen las propiedades y comportamiento biológico de los CAFs provenientes de diferentes regiones topológicas o espaciales del tumor en pacientes con CP a pesar de que en algunos reportes se ha sugerido que el microambiente que rodea a la célula tumoral presenta una alta heterogeneidad celular y genética promovida por su propio entorno espacial, mostrándose muy diferente la zona frontal o periférica tumoral de la central o interna tumoral ^{76, 77}. Adicionalmente, An y cols. en 2012, sugirieron que podrían existir diferencias celulares en diferentes regiones de un nicho tumoral ¹² por lo que nuestros resultados podrían repercutir en conocer si alguna región tumoral está específicamente involucrada en el proceso de invasión

y metástasis en el NSCLC; información que a mediano plazo podría ser de gran utilidad en la generación de novedosos tratamientos terapéuticos dirigidos a blancos específicos en este padecimiento.

5. HIPÓTESIS

Los fibroblastos asociados a cáncer de la región frontal tumoral (**CAFs-F**) y los de la región interna tumoral (**CAFs-I**) de pacientes con NSCLC, tienen características físicas y actividad biológica funcional tumoral diferente debido a la alta heterogeneidad espacial que existe en un nicho tumoral.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Aislar, caracterizar y realizar ensayos biológicos de los fibroblastos asociados a cáncer de la región frontal (**CAFs-F**) e interna (**CAFs-I**) de tejido tumoral de pacientes con NSCLC y compararlos entre sí y con fibroblastos normales (**NFs**) provenientes de tejido adyacente sano.

6.2. Objetivos específicos

- ❖ Recolectar muestras tumorales de pulmón de pacientes con NSCLC subtipo adenocarcinoma, de la zona frontal e interna, así como su correspondiente tejido adyacente sano.
- ❖ Estandarizar ensayos de aislamiento de cultivo primario CAFs-F y CAFs-I de biopsias de tumor pulmonar.
- ❖ Estandarizar ensayos de aislamiento de cultivo primario de NFs proveniente de tejido adyacente no tumoral de pacientes con CP.
- ❖ Caracterizar fenotípicamente la población de CAFs-F, CAFs-I y NFs de cada una de las muestras en estudio.
- ❖ Analizar y comparar la capacidad de inducción de la proliferación e invasión celular de cada una de las poblaciones aisladas de CAFs-F, CAFs-I y NFs sobre la línea celular tumoral A549.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Diseño experimental

Este estudio es experimental, prospectivo, comparativo y transversal; es una investigación de ciencia básica.

7.2. Población de estudio

El grupo de estudio estuvo conformado por cuatro pacientes con diagnóstico de Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas (NSCLC) del subtipo adenocarcinoma. El diagnóstico clínico de cada uno de los pacientes lo realizó el Jefe del Departamento de Cirugía de Tórax del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN SXXI); y el histopatológico por el personal de Patología tanto del CMN SXXI, como del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER). El proyecto fue aprobado, siguiendo las normas establecidas por el comité de Bioética del Hospital de Oncología del CMN SXXI y por el comité de Ciencia y Bioética del INER.

7.2.1. Criterios de Inclusión

- ❖ Pacientes con diagnóstico confirmatorio por histopatología de NSCLC subtipo Adenocarcinoma.
- ❖ Pacientes mayores de 30 y menores de 80 años.
- ❖ Pacientes de género indistinto.
- ❖ Pacientes con cáncer pulmonar en etapas quirúrgicas (I, II y III-A).
- ❖ Pacientes que sean programados para tratamiento quirúrgico.

- ❖ Pacientes que hayan aceptado firmar la carta de consentimiento informado por los Comités de Bioética correspondientes.

7.2.2. Criterios de No Inclusión

- ❖ Pacientes femeninas embarazadas.
- ❖ Pacientes con infección pulmonar asociada al cáncer de pulmón.
- ❖ Pacientes con tratamiento oncológico previo a la cirugía.
- ❖ Pacientes con cáncer pulmonar en etapas quirúrgicas (I, II y III-A) que no sean candidato para tratamiento quirúrgico.

7.2.3. Criterios de Exclusión

- ❖ Pacientes que por alguna razón el tamaño de la muestra quirúrgica extraída no fuera suficiente para el estudio del proyecto.
- ❖ Pacientes en quienes no se haya logrado aislar los cultivos de CAFs o NFs, consecuencia de contaminación de origen.

7.2.4. Criterios de Eliminación

- ❖ Pacientes que retiren su consentimiento.

7.3. Variables

7.3.1. Independiente

- ❖ Muestra tumoral de pulmón de pacientes con NSCLC subtipo adenocarcinoma de la zona frontal tumoral.
- ❖ Muestra tumoral de pulmón de pacientes con NSCLC subtipo adenocarcinoma de la zona interna tumoral.

- ❖ Muestra de pulmón de pacientes con NSCLC subtipo adenocarcinoma de la zona adyacente sana.

7.3.2. Dependiente

- ❖ Diferencias fenotípicas de la población de CAFs-F, CAFs-I y NFs de cada una de las muestras en estudio.
- ❖ Diferencias proliferativas e invasivas de cada una de las poblaciones aisladas de CAFs-F, CAFs-I y NFs sobre la línea celular tumoral A549.

7.4. Técnica

7.4.1. Resección quirúrgica

Con previa autorización del Comité local de Investigación, en la Consulta Externa del Servicio de Tórax, del CMN SXXI se seleccionaron a todos los pacientes con diagnóstico histopatológico de NSCLC del subtipo Adenocarcinoma, que fueron programados para resección quirúrgica; se les explicó el propósito del proyecto y se les solicitó su participación en el estudio firmando una carta de consentimiento informado, respetando la voluntad de los pacientes y familiares.

A todos los pacientes que aceptaron se les realizó una entrevista para contestar un cuestionario tipo historia clínica. Cuando se encontraron en el quirófano bajo anestesia y después de que el Cirujano Oncólogo resecara el tumor y extrajera la pieza quirúrgica; se tomaron dos biopsias tumorales, una de la parte central tumoral y otra de la parte frontal tumoral, además se tomó una tercera biopsia de la zona adyacente no tumoral (3 cm de distancia como mínimo).

7.4.1.1. Recolección de la muestra

Cada una de las biopsias se colocó en un tubo estéril de 50 mL debidamente etiquetado, ver lista de material y equipo en apéndice A.1. El fragmento central del tumor se denominó Interno (I), el fragmento de la zona frontal del tumor se denominó Frontal (F) y el fragmento de la zona adyacente no tumoral del mismo paciente se denominó Sano (S).

Las muestras se transportaron inmediatamente al Laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Investigación del INER para su procesamiento y análisis en condiciones de esterilidad, en un gabinete de bioseguridad A2. Cada muestra de tejido se dividió en dos partes, una parte para el análisis histológico y otra parte para cultivo primario de fibroblastos y su subsecuente caracterización fenotípica y biológica.

7.4.2. Procesamiento de las muestras tisulares

Ya en el laboratorio y en condiciones de esterilidad, en cajas Petri debidamente etiquetadas (I, F y S) y sobre una cama de hielo, se colocó cada uno de los fragmentos de tejido y con la ayuda de un bisturí se cortó un fragmento de cada tejido, de no más de 3 o 5 mm de espesor, ver lista de material y equipo en apéndice A.2.

7.4.2.1. Fijación del tejido

Cada fragmento (I, F y S) se embebió en una solución de formalina al 10% de pH neutro (Sigma Aldrich, Cat. n.º HT501128), se incubó a temperatura ambiente de 24 a 72 horas, en aproximadamente 35 mL de la solución.

7.4.2.2. Deshidratación del tejido

Cada fragmento fijado (I, F y S) se colocó en un cassette debidamente etiquetado, para su deshidratación en un tren de solventes con etanol al 70% (ver apéndice B.1), etanol al 90% (ver apéndice B.2), etanol absoluto (J.T. Baker, Cat. n.º 9000-03), etanol absoluto-xilol (ver apéndice B.3), xilol (J.T. Baker, Cat. n.º 9490-03); cada solvente se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos en una campana de extracción.

7.4.2.3. Inclusión y corte del tejido

Los fragmentos deshidratados (I, F y S) fueron embebidos en parafina líquida (McCormick, Cat. n.º 39501006) ($56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 1 hora. Después se le adicionó parafina líquida ($56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) a cada cassette hasta cubrirlo y se dejaron endurecer en una plancha fría hasta su corte. Se realizaron cortes de $4\text{ }\mu\text{m}$ de espesor en portaobjetos silanizados (ver apéndice C.1) debidamente etiquetados.

7.4.2.4. Tinción y montaje del tejido

Las laminillas con los cortes (I, F y S) se colocaron en un cestillo y se desparafinizaron en una estufa a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 30 minutos. Se hidrataron las laminillas, en un tren de solventes bajo las siguientes condiciones: xilol, xilol, etanol absoluto, etanol absoluto, etanol 96% (ver apéndice B.4), etanol 96%; cada solvente se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos en una campana de extracción y se lavaron en un baño de agua corriente (meter y sacar). Se tiñeron con hematoxilina de Harris (Merck, Cat. n.º 1.09253.1000) durante 5 minutos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Se decoloraron con 3 baños de etanol-ácido al 1% (ver apéndice B.5), se lavaron con 5 baños de agua amoniacal

al 1% (ver apéndice B.6) y un lavado de agua corriente durante 5 minutos; para después teñirlas con eosina (ver apéndice B.7) durante 1 minuto.

Se deshidrataron colocando el cestillo con las laminillas en un tren de solventes bajo las siguientes condiciones: etanol 96%, etanol 96%, etanol absoluto, etanol absoluto, etanol absoluto-xilol, xilol, xilol; se realizaron 10 baños (meter y sacar) en cada solvente, en campana de extracción. Se retiró el exceso de xilol a cada laminilla y a cada portaobjetos se le colocó unas gota de Entellan (Merck, Cat. n.º 107961) para montar y se cubrió con un cubreobjetos.

Las tinciones con HE (Hematoxilina-Eosina) de las diferentes porciones (I, F y S), se llevaron con el patólogo del INER, para confirmar la presencia o ausencia de tejido tumoral (I y F) y no tumoral (S).

7.4.3. Cultivo primario de CAFs y NFs

Cada fragmento de tejido (I, F y S) se lavó exhaustivamente con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en ingles) 1X frío (ver apéndice B.8) para retirarles los restos de sangre. Con ayuda de un bisturí y pinzas de disección, cada uno de ellos y por separado, fueron cortados en pequeñísimas partes hasta que se obtuvo un macerado fino, ver lista de material y equipo en apéndice A.3.

7.4.3.1. Digestión enzimática con solución de colagenasas

A cada macerado (I, F y S) se le adicionó el volumen necesario (20 mL/5 g de tejido macerado) de la solución de colagenasa fría (ver apéndice B.9). La suspensión obtenida se incubó a 37 °C en baño de agua y agitación constante durante 30 minutos, transcurrido el tiempo se le adicionó un volumen similar de

medio DMEM-F12 con suero fetal bovino (SFB) al 10% (ver apéndice B.10), con la finalidad de detener la reacción de la digestión. Se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se retiró el sobrenadante.

7.4.3.2. Lisis de eritrocitos

A todos aquellos sedimentos celulares que se les observó una gran cantidad de eritrocitos, se les dio un tratamiento con el buffer de lisis comercial (BD Falcón, Cat. n.º 555899). A cada tubo se le adicionó 5 mL de la solución de lisis 1X (ver apéndice B.11) e inmediatamente se agitó suavemente e incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos protegido de la luz, se centrifugó a 1400 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se retiró el sobrenadante. Para detener la reacción de la Solución de Lisis se le adicionaron 5 mL de PBS 1X con SFB al 1% (ver apéndice B.12), se agitó y centrifugó a 1400 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se retiró el sobrenadante.

7.4.3.3. Cultivo mixto celular

Cada uno de los paquetes celulares (I, F y S) libre de eritrocitos, se resuspendió en aproximadamente 4 mL de DMEM-F12 con SFB al 20% (ver apéndice B.13) y se sembró en cajas T-25, las cuales se incubaron a 37 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se les retiró el medio a cada caja T-25, con la finalidad de eliminar todas las células muertas y se le adicionó a cada caja T-25, aproximadamente 4 mL de medio DMEM-F12 con SFB al 10% que contiene las células adheridas y se volvieron a incubar a 37 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad.

7.4.3.4. Cultivo primario de fibroblastos

El cultivo de células mixtas adherentes fue mantenido bajo las mismas condiciones de cultivo descritas, por el tiempo necesario hasta que se observaron los primeros indicios de células fibroblastoide. En ese momento se modificó el medio de cultivo a uno selectivo de fibroblastos, el medio FGM-2 (Lonza, Cat. n.º CC-3132). Con este medio, se cultivó la primera generación, y en los pasajes subsecuentes se regresó al medio de cultivo DMEM-F12 con SFB al 10%.

7.4.4. Caracterización fenotípica de los CAFs y NFs por inmunocitoquímica

Una vez obtenidos los cultivos primarios de población completa de células fibroblastoides observadas al microscopio, se prosiguió a determinar su fenotipo con ayuda de anticuerpos dirigidos a componentes de superficie e intracelulares propios de los fibroblastos, ver lista de material y equipo en apéndice A.4. La caracterización de los CAFs y de los NFs se realizó con cuatro diferentes anticuerpos monoclonales primarios: Anti- α SMA (Abcam, Cat. n.º ab-119952), Anti-PDGFR β (Abcam, Cat. n.º ab-32570), Anti-Vimentina (Abcam, Cat. n.º ab-92547) y Anti-Citoqueratina (Santa Cruz, Cat. n.º CS-58826). Además se utilizó la línea celular epitelial de carcinoma de pulmón A549 (ATCC, CCL-185) como control positivo de células epiteliales.

7.4.4.1. Cultivo celular en cubreobjetos

Los cultivos primarios (CAFs-I, CAFs-F y NFs) se cultivaron en medio DMEM-F12, y la línea celular A549 en medio DMEM (ver apéndice B.14) ambos con SFB al 10%, hasta que se obtuvo una confluencia del 80 al 90%. Se les tripsinizó (ver

apéndice C.2) y se sembraron en cajas de 6 pozos con cubreobjetos previamente tratados (ver apéndice C.3), a cada portaobjetos se le sembraron 10 000 células contenidas en 200 μ L del medio correspondiente e incubaron a 37 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad durante 3 horas, para permitir que las células se adhirieran al cubreobjetos. Transcurrido el tiempo se cubrió cada pozo de la placa con 1 mL más del medio correspondiente e incubaron hasta obtener cultivos con una confluencia del 80 al 90%.

7.4.4.1. Fijación del cultivo celular en cubreobjetos

Sobre una cama de hielo, a cada pozo de la placa se le aspiró el medio de cultivo y se lavaron 2 veces rápidamente con 2 mL de PBS 1X frío. Posteriormente se fijaron con 1 mL de metanol frío (J.T. Baker, Cat. n.º 9070-02) durante 2 minutos y luego con 1 mL de acetona fría (J.T. Baker, Cat. n.º 9006-02) durante 3 minutos y finalmente 3 lavados rápidos con 1 mL de PBS 1X frío. A cada pozo se le adicionó 3 mL de PBS 1X, cada caja se selló con Parafilm™ y se guardaron a 4 °C hasta su uso (no más de 2 meses).

7.4.4.2. Recuperación antigénica

A partir de este paso, no se necesitó trabajar en condiciones de esterilidad, cada cubreobjetos con el cultivo primario (CAFs-I, CAFs-F, NFs y A549) se colocó sobre un portaobjetos limpio y etiquetado; colocando el cubreobjetos con las células hacia arriba con la ayuda de unas pinzas curvas, teniendo cuidado de no picar la laminilla, además de no permitir que las células se secan mediante el uso de una cámara húmeda. A cada cubreobjetos se le hizo un tratamiento con 300 μ L de Tritón X-100 al 0.01% (ver apéndice B.15) durante 30 segundos y se lavaron 2

veces con PBS-Tween (PBS-T) al 0.05% frío (ver apéndice B.16) en un vaso Coplin durante 5 minutos con agitación suave a temperatura ambiente (se acomodó el cubreobjetos con el cultivo celular hacia el frente con la ayuda de las pinzas curvas).

7.4.4.3. Bloqueo celular

Se retiró el PBS-T con la ayuda de una pipeta transfer (por una esquina de atrás) a cada vaso Coplin y a cada vaso se le adicionó 15 mL de la solución bloqueadora de peroxidasa al 3% fría (ver apéndice B.17) e incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se hizo el cambio por 15 mL más de la solución bloqueadora de peroxidasa fría e incubó durante 15 minutos más. Se lavó 3 veces con PBS-T al 0.05% frío durante 10 minutos con agitación suave a temperatura ambiente. Se retiró exceso de PBS-T de cada cubreobjetos con la ayuda de una gasa y se colocaron en los portaobjetos. Se continuó el bloqueo con 300 μ L del suero bloqueador (ver apéndice B.18) e incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempos se retiró el exceso de suero bloqueador y se adicionó 300 μ L de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en ingles) al 1% (ver apéndice B.19) e incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

7.4.4.4. Anticuerpo primario

A partir de este paso las incubaciones con los anticuerpos se hicieron en oscuridad y se continuó con el uso de cámara húmeda. Se les retiro el exceso de solución bloqueadora y se le adicionó 300 μ L del anticuerpo primario: Anti- α SMA (1:10000), Anti-PDGFR β (1:500), Anti-Vimentina (1:4000) y Anti-Citoqueratina

(1:6000) en BSA al 1% como diluyente. Se aseguró que todos los cubreobjetos quedaran cubiertos e incubó durante toda la noche a 4 °C. Además se tuvo un control negativo (CAFs-I, CAFs-F, NFs y A549) para descartar reacciones inespecíficas entre los reactivos con BSA al 1%. Al día siguiente, se les retiró el exceso de anticuerpo y se lavaron 4 veces con PBS-T al 0.05% frío durante 10 minutos con agitación suave a temperatura ambiente.

7.4.4.5. Anticuerpo secundario

A cada cubreobjetos se le retiró el exceso de PBS-T y se le adicionó 300 µL del anticuerpo biotilnado (ver apéndice B.18) e incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces con PBS-T al 0.05% frío durante 10 minutos con agitación suave a temperatura ambiente.

7.4.4.6. Complejo Avidina-Biotina

A cada cubreobjetos se le retiró el exceso de PBS-T y se le adicionó 300 µL del Reactivo ABC (ver apéndice B.18) e incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces con PBS-T al 0.05% frío y 1 vez con PBS 1X, durante 10 minutos con agitación suave a temperatura ambiente.

7.4.4.7. Revelado

A cada cubreobjetos se le retiró el exceso de PBS y se le adicionó de 5 a 6 gotas del substrato diaminobencidina (DAB) preparado al momento (ver apéndice B.20) e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, revisando periódicamente en el microscopio la intensidad de la reacción (color café); para detener la

reacción, estas se sumergían en agua de paso y después se les cambiaba por más para eliminar cualquier rastro de DAB.

7.4.4.8. Contratación y montaje

Se le retiró el exceso de agua de cada cubreobjetos, se tiñeron con Hematoxilina de Harris (Merck, Cat. n.º 1.09253.1000) durante 1 minutos y se les realizó 3 baños con agua corriente (meter y sacar). Se le retiró el exceso de agua a cada cubreobjetos, se colocó sobre el portaobjetos y se dejaron secar en la estufa a 56 °C durante 15 a 20 minutos. A cada cubreobjetos se le colocó una gota de Entellan (Merck, Cat. n.º 107961) para montar y se colocó sobre un portaobjetos.

7.4.5. Caracterización biológica de los CAFs y NFs

Se evaluó la capacidad del CM del cultivo celular (CAFs-I, CAFs-F y NFs) de inducir proliferación celular o invasión celular, en la línea de células epiteliales de carcinoma de pulmón (A549), ver lista de material y equipo en apéndice A.5.

7.4.5.1. Medio condicionado (MC)

El cultivo celular (CAFs-I, CAFs-F y NFs) de cada paciente que se encontró entre los pasajes 3º y 4º, se creció en medio DMEM-F12 con SFB al 10%, hasta que se obtuvo una confluencia del 80 al 90%. Se lavó la monocapa celular 10 veces con solución salina amortiguadora de fosfatos con calcio y magnesio (PBS Ca/Mg) 1X (ver apéndice B.21) para retirar el exceso SFB y se le adicionó 15 mL de medio DMEM-F12 (Gibco, Cat. n.º 11039-021) sin rojo de fenol (RF) a una caja de cultivo T-75 e incubó nuevamente a 37 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad durante 48 horas. Transcurrido el tiempo el MC se recolectó y centrifugó a 15,000 rpm

durante 10 minutos a 4 °C, para eliminar cualquier resto celular. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo estéril de 15 mL, se etiquetó y guardó a -80 °C hasta su uso.

7.4.5.2. Sincronización celular

La línea celular A549, se cultivó en medio DMEM con SFB al 10 % hasta que se obtuvo una confluencia del 80 al 90%. La monocapa celular se lavó 3 veces con PBS 1X para retirar el exceso SFB y se le adicionó aproximadamente 12 mL de medio DMEM-F12 sin RF e incubó a 37 °C, 5 % de CO₂ y 100% humedad durante 24 horas.

7.4.5.3. Ensayo de proliferación celular

Se utilizó el kit comercial no radiactivo (Promega, Cat. n.º G-4100), el cual se basa en la conversión celular de la sal de tetrazolium en el producto formazan.

7.4.5.3.1. Preparación de placas de 96 pozos

Se sembraron 5,000 células sincronizadas contenidas en 50 µL de medio DMEM-F12 sin RF. A cada pozo con la suspensión celular (cuadruplicado) se le adicionó 50 µL del MC del cultivo celular (CAFs-I, CAFs-F y NFs). Al control negativo (blanco) se le adicionó DMEM-F12 sin RF. La placa de 96 pozos se incubó a 37 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad durante 72 horas.

7.4.5.3.2. Desarrollo de color

A las 72 horas, a cada pozo se le adicionó 15 µL de la Solución Dye (MTT, Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Promega, Cat. n.º G-4101) e incubó a 37 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad durante 4 horas.

Transcurrido el tiempo, a cada pozo se le adicionó 100 μ L de solución solubilizadora/stop mix (Promega, Cat. n.º G-4102) e incubó a 37 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad durante 1 hora. Se homogenizó con la ayuda de una pipeta multicanal, se tuvo cuidado de que no se hicieran burbujas. Finalmente se midió la absorbancia de la solución colorida a 590 nm, en un lector de ELISA (BioRad, Cat. n.º imark). Los resultados se expresaron como la media de las absorbancia de los cuadruplicados.

7.4.5.4. Ensayo de invasión celular

Para el ensayo de invasión celular se utilizaron cámaras de invasión que contenían una membrana de tereftalato de polietileno (PET, por sus siglas en inglés) de 8 μ m de tamaño, cubierta de una mezcla de proteínas de colágena y fibronectina (Matrigel BioCoat BD, Cat. n.º 354480). Adicionalmente y de forma paralela, se hizo el ensayo de migración celular en cámaras de migración que contenían insertos con membrana de PET del mismo tamaño de poro, pero sin matrigel es decir, sin la mezcla de proteínas (Falcón, Cat. n.º 354578).

7.4.5.4.1. Hidratación de las Cámaras de Matrigel

Antes de su uso, las cámaras de invasión (matrigel) fueron hidratadas con 500 μ L de medio DMEM-F12 sin RF, durante 2 horas a 37 °C, 5% CO₂ y 100% de humedad.

7.4.5.4.2. Estudio de invasión y migración celular

Los insertos que contenían tanto las membranas de matrigel como las que no lo contenían, se colocaron en cajas de cultivo de 24 pozos. En cada caso se sembraron 25,000 células de la línea celular tumoral A549 previamente

sincronizadas, contenidas en 500 μ L de medio DMEM-F12 sin RF. Una vez sembradas las células, la caja completa se agitó suavemente (movimientos en forma de ocho) durante 5 minutos a temperatura ambiente y se incubó durante otros 15 minutos a 37 °C, 5% CO₂ y 100%, para permitir la adherencia de las células epiteliales tumorales. Pasado este tiempo, tanto en las cámaras de migración como de invasión celular, se le adicionó a cada pozo de la placa 500 μ L del MC de los cultivo celular (CAFs-I, CAFs-F y NFs) que se usó como quimioatrayente e incubó durante 24 horas a 37 °C, 5% CO₂ y 100% de humedad.

7.4.5.4.3. Eliminación de células no invasivas

Después de la incubación, se removió el medio de los insertos y pozos de la placa, succionando suavemente con una pipeta para no maltratar o romper la membrana. Para eliminar las células que no migraron y no invadieron del otro lado de la membrana, se limpió suavemente la superficie superior del inserto con un hisopo y después con un hisopo húmedo en DMEM-F12 sin RF.

7.4.5.4.4. Fijación celular

Para realizar el conteo de las células tumorales que fueron capaces de atravesar los dos tipos de membrana, fue necesario realizar su fijación y tinción. La fijación y tinción se realizó en cajas de 24 pozos y con la ayuda de unas pinzas de disección los insertos de matrigel y control se movieron, siempre teniendo cuidado de no tocar la parte inferior de los insertos, ya que en esta parte de la membrana se encontraban las células invasivas o las células migratorias. Las células que lograron atravesar los diferentes tipos de membrana (matrigel y control), los insertos se fijaron con etanol al 70% durante 10 minutos a temperatura ambiente;

transcurrido el tiempo se eliminó el exceso de etanol con un hisopo en la parte superior del inserto.

7.4.5.4.5. Tinción celular

Inmediatamente se pasó cada inserto a otro pozo con cristal violeta al 0.2% (ver apéndice B.22), se tiñó durante 10 minutos a temperatura ambiente; transcurrido el tiempo se eliminó el exceso de colorante con un hisopo en la parte superior del inserto. Se lavó cada inserto con agua destilada estéril fría, tantas veces fue necesario para quitar el exceso de colorante y se dejaron secar a temperatura ambiente (invirtiendo el inserto hacia arriba).

7.4.5.4.6. Montaje celular

Se removió la membrana (matrigel y control) invirtiendo el inserto e insertando la punta del bisturí lentamente por debajo de la membrana, despegando poco a poco y en el último punto de unión se jaló con una pinzas. En un portaobjetos se colocó una gota de aceite de inmersión (Merck, Cat. n.º 1.04699.0100) y se colocó la membrana de la parte inferior (células invasivas o migratorias) hacia arriba, se le colocó una segunda gota de aceite de inmersión y se cubrió con un cubreobjetos, se presionó para eliminar las burbujas. Se sellaron las orillas del cubreobjetos, con barniz transparente y se dejó secar.

7.4.5.4.7. Conteo de células invasivas

Se observaron las laminillas en el microscopio óptico en el objetivo de 40x y se contaron cinco campos de la membrana con las células invasivas y cinco campos de las células migratorias, tanto de la orilla como del centro de la membrana. Los

datos fueron expresados como el porcentaje de invasión, se calculó con la siguiente formula:

$$\% \text{ Invasión} = \frac{\text{Media del número de células invasoras a través de los insertos de la membrana de matrigel}}{\text{Media del número de células que migran a través de la membrana de insertos control}} \times 100$$

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los cambios estadísticamente significativos entre los grupos de estudio se evaluaron mediante la prueba U de Mann-Whitney. Dicha prueba es el equivalente, no paramétrica de la prueba t de Student de grupos independientes, el cual compara las distribuciones (mediana) de dos grupos. Los datos presentados como $P \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos⁷⁸. Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad PRISM versión 6.0c (San Diego, CA, EUA).

9. RESULTADOS

9.1. Características demográficas del grupo de estudio

El grupo de estudio de este trabajo estuvo conformado por cuatro pacientes con CP. Las características clínicas y demográficas de cada uno de los participantes del estudio se resumen en la tabla IV.

Tabla IV. Características demográficas y clínicas de las muestras tratadas

ID	Edad (años)	Genero (F/M)	Fumador (si/no)	Humo de leña (si/no)	Perdida de peso (kg/mes)	Entidad federativa	Diagnostico*
CM1	46	F	no	si	4/1	Puebla	NSCLC/AD
CM2	59	F	si	no	no	CDMX	NSCLC/AD
CM3	58	F	no	si	5/2	CDMX	NSCLC/AD
CM4	68	F	no	si	6/3	CDMX	NSCLC/AD

*NSCLC, cáncer de pulmón de células no pequeñas; AD, adenocarcinoma

9.2. Patología de los tejidos en la resección quirúrgica

Se realizaron laminillas de los tejidos incluidos en parafina, obtenidos en la resección quirúrgica realizada en el CMN SXXI de las porciones denominadas como I, F y S. Dichos cortes fueron teñidos con HE, los cuales fueron llevados al servicio de patología en el INER, para la confirmación por patología de que la muestra era tumoral (I y F), así como también el tejido sano adyacente, ver tabla V.

Tabla V. Características patológicas observadas en cortes histológicos con tinción HE en el INER.

ID	Patología		
	INTRA	FRONTAL	SANO
CM1	Tumoral	Tumoral	No tumoral
CM2	Tumoral	Tumoral	No tumoral
CM3	Tumoral	No tumoral	No tumoral
CM4	Tumoral	No tumoral	No tumoral

9.3. Aislamiento e Identificación de CAFs y NFs

Los CAFs-F, CAFs-I y los NFs fueron aislados exitosamente de cuatro pacientes diagnosticados con NSCLC del subtipo adenocarcinoma. Todos los CAFs-F, CAFs-I y NFs crecidos en cultivo primario mostraron una morfología tipo fibroblastoide, es decir alargados y en forma de huso. Lo que sugiere el éxito del aislamiento de cultivos primarios de fibroblastos provenientes de las diferentes regiones (figura IIA, III, IV y V). También se determinó la pureza de cada población mediante la tinción por inmunocitoquímica, con los anticuerpos α -SMA, PDGFR- β , Vimentina y pan-Citoqueratina. Todos los fibroblastos fueron negativos para el biomarcador de células epiteliales pan-Citoqueratina (figura IIA y IIB), lo que indica la ausencia de células epiteliales provenientes del tejido tumoral. En cuanto a la batería de anticuerpos específicos de fibroblastos α -SMA, PDGFR- β y Vimentina; se observó que las tres poblaciones de fibroblastos registraron reactividad positiva (figura III, IV y V); aunque se observa claramente una intensidad de expresión diferencial para dichos marcadores, pues fue mayor en la población de CAFs-F

con respecto a los CAFs-I y débil o casi nula reactividad para los NFs. Este hallazgo es importante porque si bien en la literatura ya había información de mayor reactividad de marcadores de superficie en los CAFs versus NFs, no existía evidencia de la diferencia de reactividad de los fibroblastos aislados de la parte frontal e intratumoral de pacientes con NSCLC.

pan-Citoqueratina

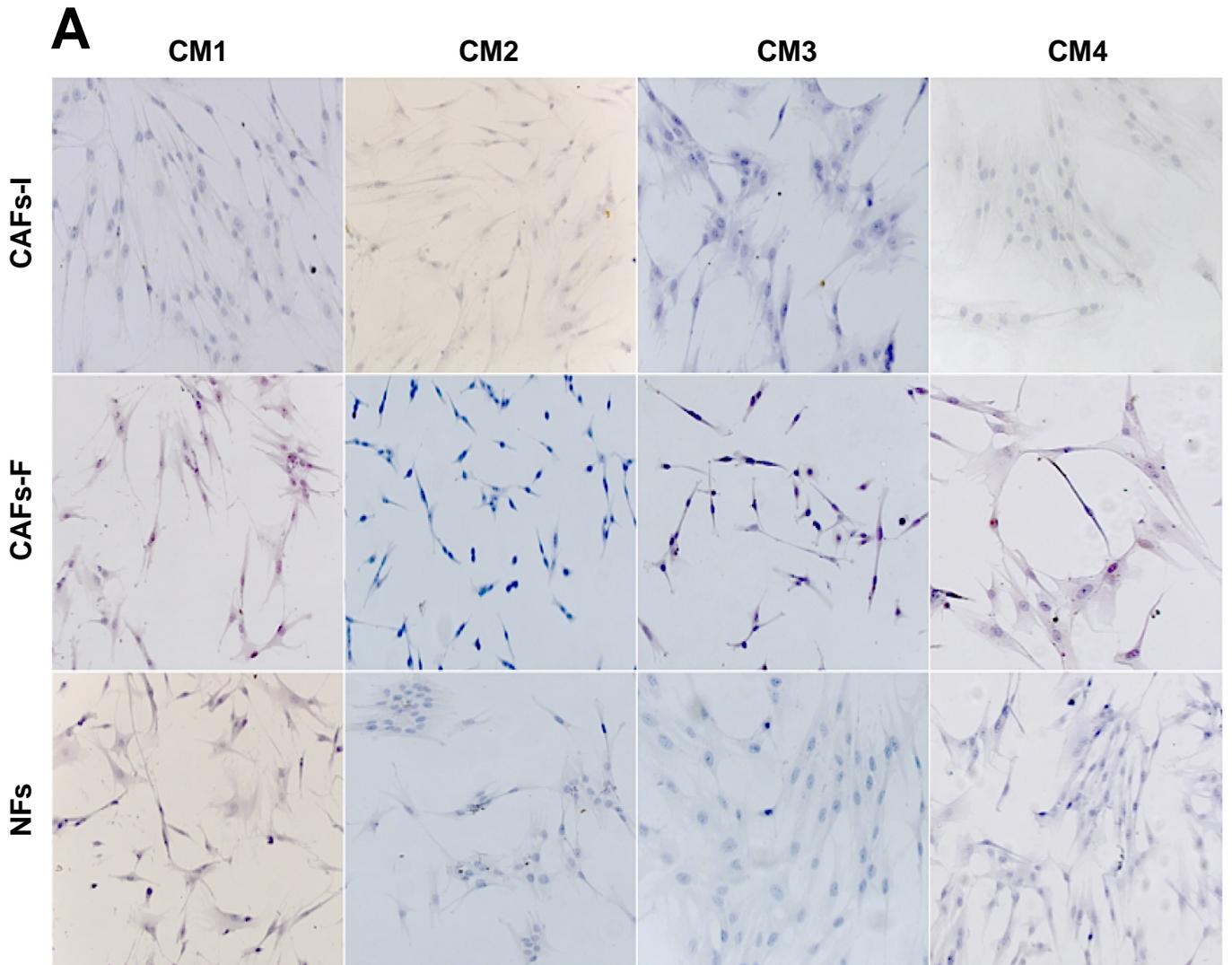
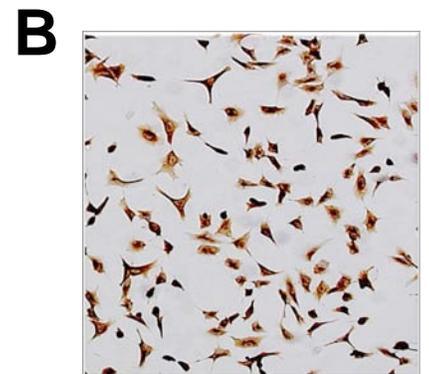


Figura II. El anticuerpo pan-Citoqueratina es un biomarcador de células epiteliales. A) Las imágenes muestran la tinción inmunocitoquímica con el anticuerpo pan-Citoqueratina de los cultivos primarios de CAFs-F, CAFs-I y NFs de cuatro pacientes. B) La imagen muestra la tinción inmunocitoquímica con el anticuerpo pan-Citoqueratina del cultivo de la línea celular de carcinoma de pulmón del tipo epitelial (A549), como control positivo de la reacción. Imágenes de microscopía óptica, magnificación 200x.



α -SMA

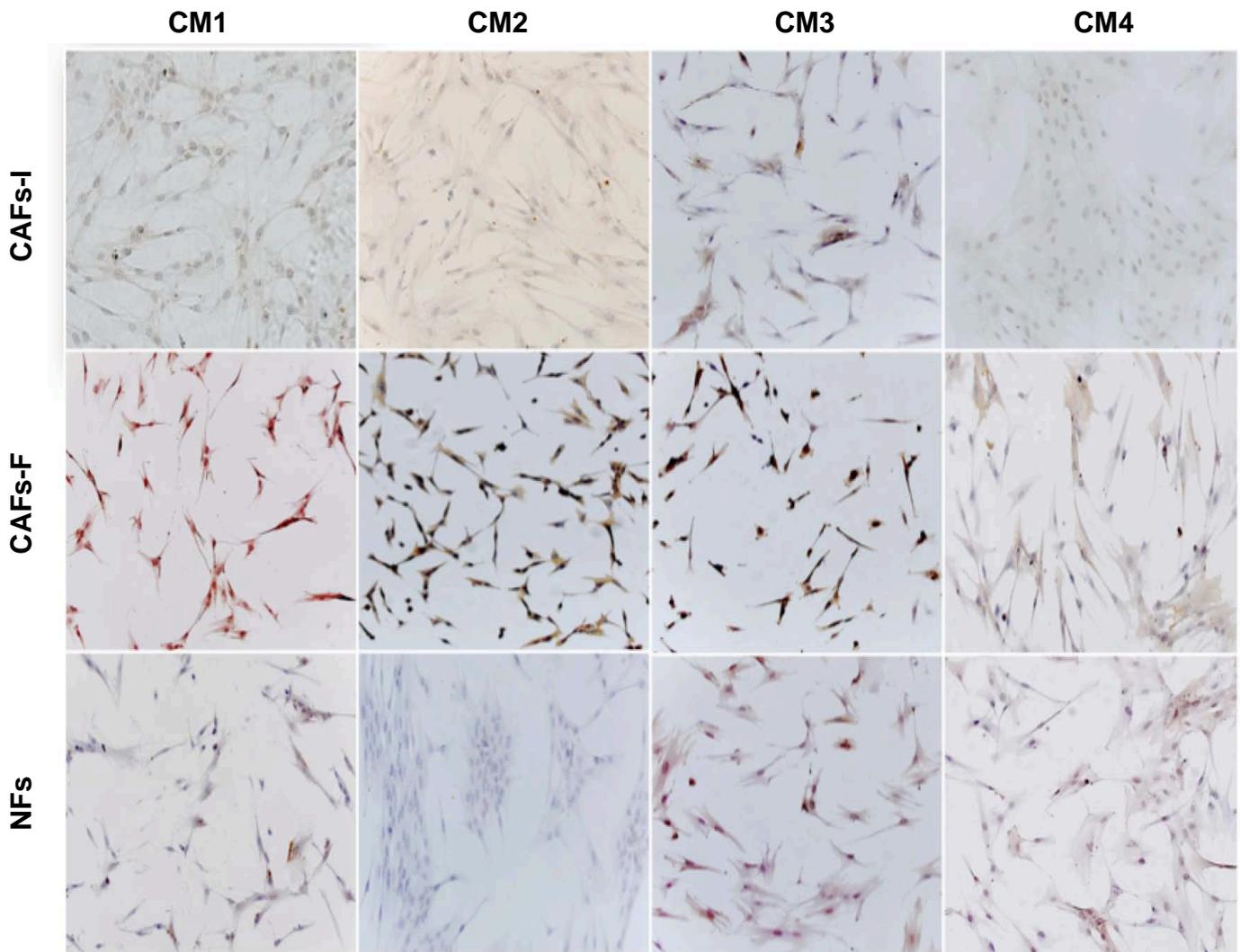


Figura III. El anticuerpo α -SMA es un biomarcador de células fibroblastoides. Las imágenes muestran la tinción inmunocitoquímica con dicho anticuerpo en cultivos primarios de CAFs-F, CAFs-I y NFs de cuatro pacientes. Imágenes de microscopía óptica, magnificación 200x.

PDGFR- β

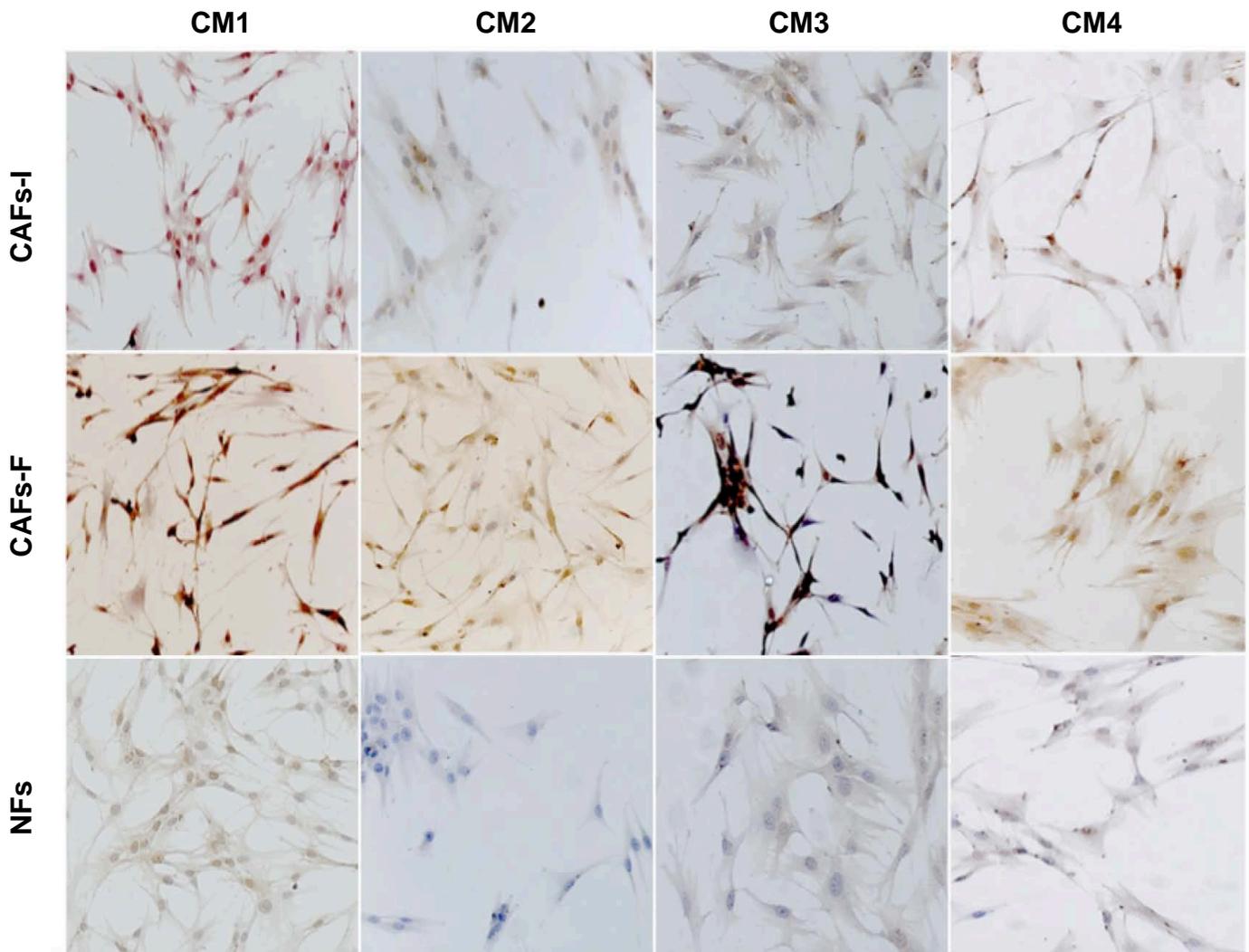


Figura IV. El anticuerpo PDGFR- β es un biomarcador de células fibroblastoides. Las imágenes muestran la tinción inmunocitoquímica con dicho anticuerpo en cultivos primarios de CAFs-F, CAFs-I y NFs de cuatro pacientes. Imágenes de microscopía óptica, magnificación 200x.

Vimentina

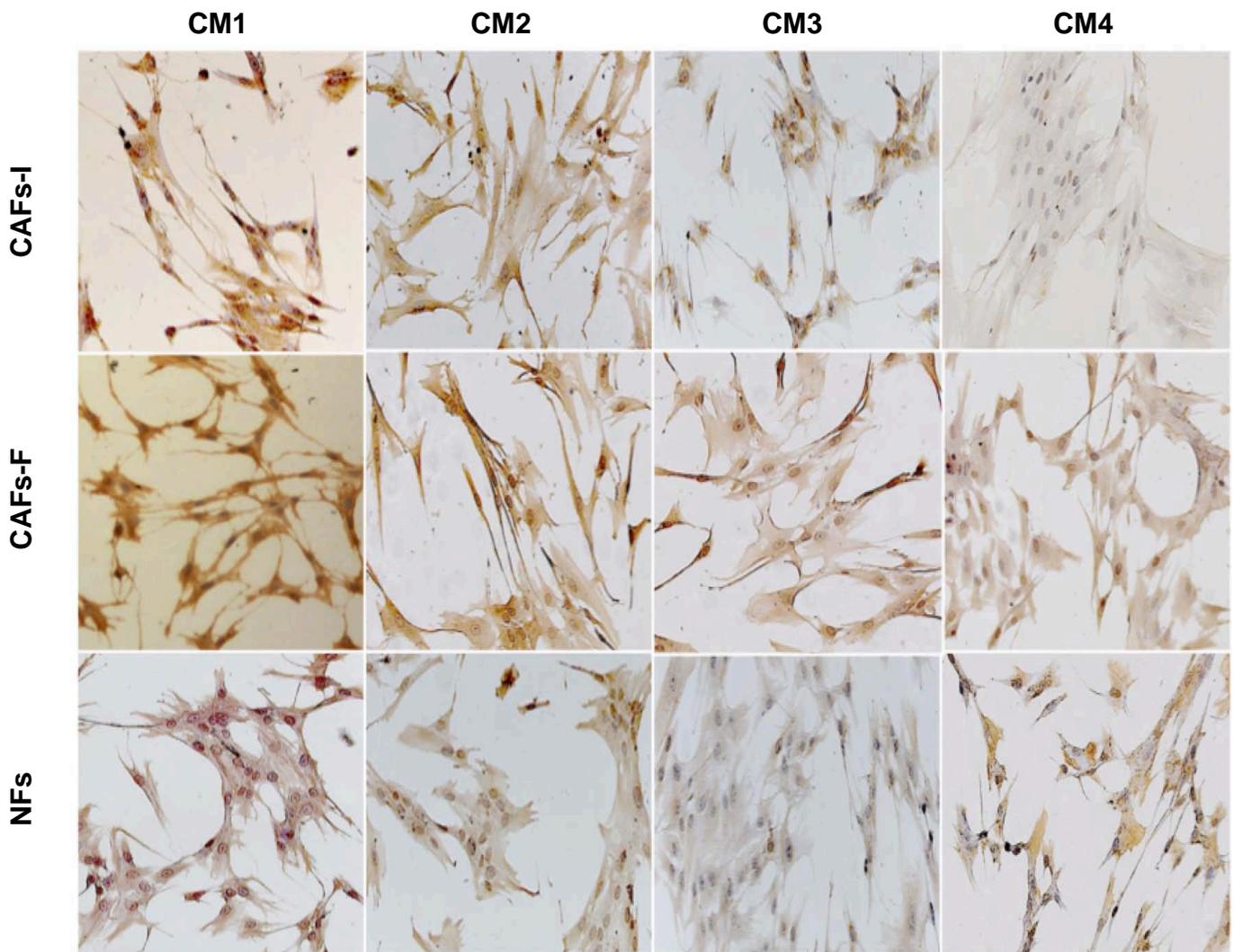


Figura V. El anticuerpo Vimentina es un biomarcador de células fibroblastoides. Las imágenes muestran la tinción inmunocitoquímica con dicho anticuerpo en cultivos primarios de CAFs-F, CAFs-I y NFs de cuatro pacientes. Imágenes de microscopía óptica, magnificación 200x.

9.4. CAFs-I y CAFs-F promueven diferencialmente la proliferación e invasión de células de adenocarcinoma de pulmón

Como ya se mencionó los CAFs están directamente involucrados con la activación de la promoción e invasión de las células tumorales en varios tipos de neoplasias; sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en dicha activación no están totalmente esclarecidos ^{79, 80}. Al observar que las diferentes poblaciones topográficas, frontales e intratumorales, mostraron diferente inmunoreactividad, se hizo imperativo estudiar si existían diferencias en algunas de sus principales características biológicas como la capacidad de inducir la proliferación y el poder invasivo de las células tumorales. Para ello, se realizaron ensayos de proliferación e invasión celular sobre la línea celular tumoral epitelial A549 con el MC proveniente de cada población de CAFs y sus respectivos NFs (tabla VI).

Los resultados indican que hubo mayor y significativa capacidad proliferativa de las células tumorales que fueron expuestas al MC proveniente de los CAFs-F con respecto a los CAFs-I (figura VI, VIII, IX X y XI). Es importante resaltar que ambas poblaciones mostraron tener mayor actividad proliferativa con respecto a los NFs, pero el MC de los CAFs-F fue el que registro mayor actividad proliferativa de los tres MC estudiados.

<u>Ensayo</u>	1			2		
Muestra	CAFs-I	CAFs-F	NFs	CAFs-I	CAFs-F	NFs
CM1	0.416±0.0060	0.62±0.0144	0.2730±0.0008	0.365±0.0021	0.64±0.0008	0.311±0.0014
CM2	0.547±0.0073	0.73±0.0081	0.261±0.0014	0.524±0.0035	0.738±0.0524	0.263±0.0014
CM3	0.384±0.0034	0.648±0.0082	0.201±0.0016	0.398±0.0014	0.688±0.0268	0.197±0.0014
CM4	0.395±0.0008	0.6840.0036	0.25±0.0021	0.384±0.0021	0.688±0.0024	0.248±0.0045
<u>Ensayo</u>	3			4		
Muestra	CAFs-I	CAFs-F	NFs	CAFs-I	CAFs-F	NFs
CM1	0.38±0.0027	0.656±0.0024	0.295±0.0011	0.384±0.0066	0.676±0.0029	0.307±0.0039
CM2	0.512±0.0008	0.712±0.0008	0.271±0.0008	0.496±0.0106	0.736±0.0016	0.267±0.0025
CM3	0.394±0.0054	0.668±0.0008	0.158±0.0014	0.407±0.0018	0.65±0.0091	0.176±0.0014
CM4	0.376±0.0098	0.704±0.0016	0.23±0.0063	0.368±0.0008	0.682±0.0014	0.247±0.0021

Tabla VI. La proliferación celular de las celulares A549 tratadas con los MC de cultivos primarios de CAFs-I, CAFs-F y NFs se analizó mediante MTT después de 72 horas de tratamiento (590 nm). Los resultados se representaron como la media de las absorbancias de cuatro experimentos independientes (ensayos), cada experimento se realizó por cuadruplicado y se determinó la desviación estándar (D.E.) de cada experimento.

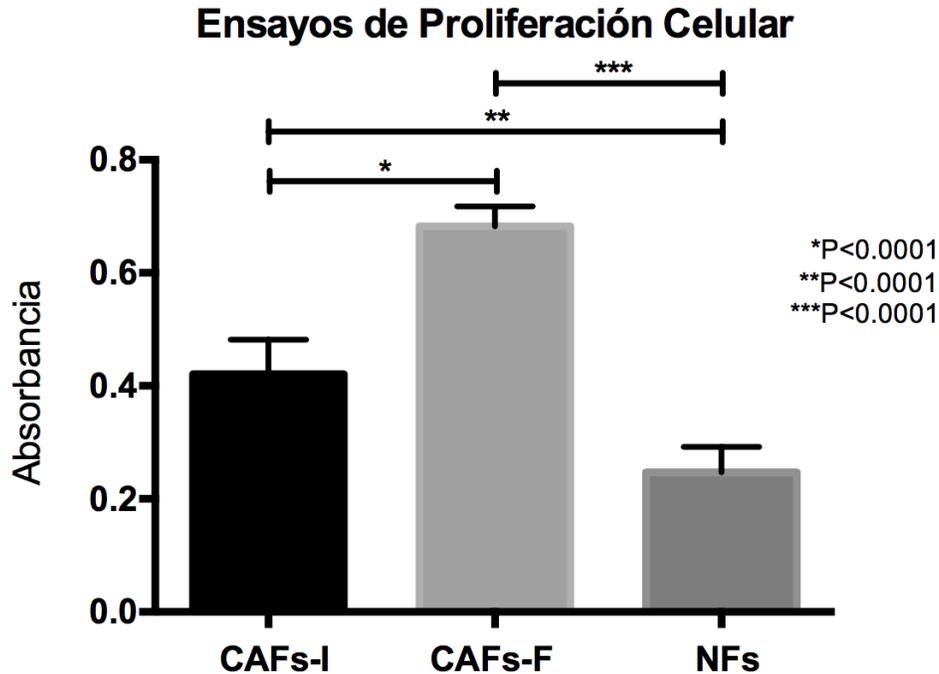


Figura VI. Proliferación celular con MTT de los cultivos de células A549 inducida con los MC de CAFs-I, CAFs-F y NFs. Los histogramas representan los resultados obtenidos de tres ensayos independientes. Las barras de error indican la D.E., obtenidos por la prueba de dos colas por Mann-Whitney.

Para evaluar la capacidad migratoria e invasiva de los factores solubles liberados de los diferentes cultivos de CAFs aislados, se utilizó un ensayo in vitro, usando la línea celular de carcinoma de pulmón epitelial (A549) y como quimioatrayente los MC obtenidos de cada tipo de CAFs y sus respectivos NFs. El ensayo se realizó usando cámaras de invasión recubiertas con una matriz hecha de proteínas constituyentes de matriz extracelular como colágeno y fibronectina. En este tipo de ensayos no solo se evalúa la capacidad migratoria de las células tumorales promovida por los factores solubles liberados en el MC de cada población de CAFs, sino también la capacidad invasora de dichas células tumorales de

atravesar la barrera de proteínas como la colágena y fibronectina, componentes base de la matriz de Matrigel (tabla VII).

Ensayo		1			2		
Muestra	ID	Control	Matrigel	% Invasión	Control	Matrigel	% Invasión
CAFs-I	CM1	598±8	163±20.22	27.23±3.02	554±12.76	177±7.21	31.94±0.57
	CM2	1130±34.04	300±21.28	26.58±2.34	998±8.54	310±6	31.06±0.33
	CM3	451±13.74	127±19.69	28.22±4.98	485±7.21	160±11.78	33.01±2.93
	CM4	1011±12.76	276±7.59	27.29±0.54	982±8.18	300±4.58	30.54±0.21
CAFs-F	CM1	848±29.30	433±39.12	51.20±6.44	875±9.53	485±6.55	55.42±0.21
	CM2	649±24.97	339±30.19	52.39±6.52	578±8.54	398±3.60	68.86±0.48
	CM3	1802±10,58	887±24.26	49.22±1.52	1723±9.16	847±7	49.15±0.47
	CM4	1205±14	94837.32	78.61±3.29	1213±8.71	984±6.24	81.12±0.09
NFs	CM1	677±14.10	147±12.48	21.74±2.27	653±6.55	100±6.55	15.30±0.84
	CM2	501±9.53	88±3	17.56±0.26	487±11.13	96±6.08	19.73±1.59
	CM3	1100±8.54	147±9.84	13.36±0.99	918±5	170±2.64	18.51±0.22
	CM4	996±12.52	215±5.29	21.58±0.35	1132±3.60	183±6	16.16±0.49

Tabla VII. La invasión celular de las celulares A549 tratadas con los MC de cultivos primarios de CAFs-I, CAFs-F y NFs en cámaras con matriz de Matrigel después de 24 horas de tratamiento. Los resultados se representaron como la media del % de invasión de dos experimentos independientes (ensayo), cada experimento se realizó por triplicado; se determino la desviación estándar (D.E.) de cada experimento.

Los resultados mostraron que los MC provenientes de los CAFs-F y los CAFs-I, tuvieron mayor y significativa capacidad de inducción en el poder de invasión de las células tumorales A549 en comparación con el MC proveniente de los NFs (figura VII); siendo el MC de CAFs-F, el que mostró, tener mayor actividad sobre las células tumorales A549 (figura VII, XII y XIII).

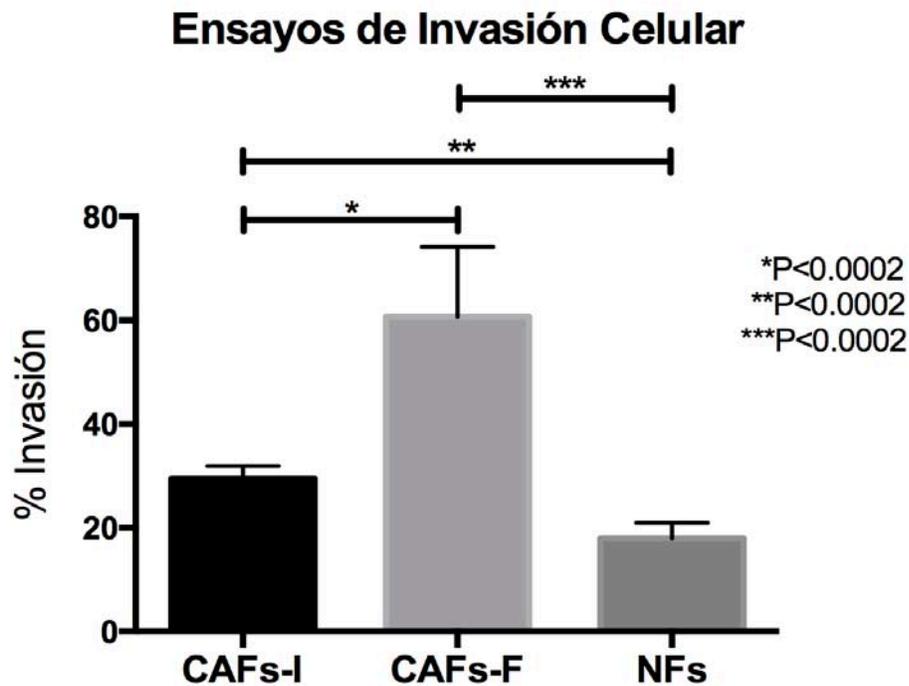


Figura VII. Ensayos de invasión celular en cámaras de matriz de Matrigel de los cultivos de células A549 con los MC de CAFs-I, CAFs-F y NFs. Los histogramas representan los resultados obtenidos de tres ensayos independientes. Las barras de error indican la D.E., obtenidos por la prueba de dos colas por Mann-Whitney.

10. DISCUSIÓN

Los CAFs es la estirpe celular de mayor proporción del estroma tumoral ⁶⁴ y participan activamente durante el proceso de promoción, invasión y metástasis en la mayoría de los tipos de cáncer como el NSCLC. Durante estos procesos los fibroblastos en reposo se activan secretando factores de crecimiento y diferentes tipos de citocinas, quimiocinas y metaloproteinasas ^{49, 64, 81}. Algunos reportes han sugerido que el microambiente que rodea a la célula tumoral presenta una alta heterogeneidad celular y genética promovida por su propio entorno espacial, mostrándose muy diferente la zona frontal tumoral de la intratumoral ^{76, 77}. Por ejemplo un nicho tumoral en la región intratumoral o central presenta pobre vascularización y en consecuencia bajo aporte de oxígeno, el cual promueve que su población celular mantenga un estado pobremente diferenciado, semejante al de células madre tumoral ocasionado por la presencia de factores como el factor inducido por hipoxia (HIF, por sus siglas en inglés) el cual inhibe su diferenciación. En consecuencia estas nuevas subpoblaciones generarán nuevos mecanismos de resistencia tumoral debido a la adquisición de novedosas habilidades proliferativas, migratorias e invasivas. Se ha sugerido que dichas subpoblaciones pueden estar presentes a la vez, en diferentes regiones geográficas dentro de un mismo tumor (heterogeneidad espacial), o modificarse durante la evolución tumoral (heterogeneidad temporal) ⁸².

Por lo anterior, el objetivo principal del presente trabajo fue estudiar algunas propiedades biológicas de los CAFs de diferentes zonas o regiones tumorales y así lograr obtener evidencias que nos indiquen la posible existencia de

heterogeneidad en el microambiente pulmonar en el NSCLC, como se ha sugerido para otros tipos de cáncer ^{77, 83}. De acuerdo a los resultados obtenidos se logró aislar con éxito los CAFs de la región intratumoral y frontal de todas y cada una de las muestras, a pesar de que la mayoría de las evidencias refieren a la existencia solamente de fibroblastos en la zona periférica tumoral ⁸⁴. Además también se lograron aislar poblaciones puras de NFs de tejido adyacente sano de cada sujeto en estudio. Microscópicamente las tres poblaciones aisladas mostraron tener una morfología alargada en forma de huso, en donde en algunos casos los CAFs mostraban ser más alargados en comparación con los NFs ⁷⁴.

Al igual que en la mayoría de los estudios donde caracterizan la población aislada de CAFs y los datos que reporta la bibliografía, en este trabajo también se utilizó una batería de anticuerpos (α -SMA, PDGFR- β y Vimentina) para lograr con certeza la pureza e identidad de cada población aislada ^{54, 63, 64}. Se observó que la población de CAFs-F tuvo una mayor reactividad en comparación con los CAFs-I, para el total de los inmunomarcadores utilizados y a pesar de que hay una gran ambigüedad sobre la existencia de marcadores específicos que distingan un CAF de un NF, se observó que la intensidad de tinción fue capaz de diferenciar claramente una población de otra; ya que ambos grupos fueron positivos para el total de los anticuerpos probados, la reactividad fue marcadamente mayor para los CAFs en comparación con los NFs, sobre todo con el marcador de superficie α -SMA. Estos resultados concuerdan con la información que la bibliografía citada, lo cual indica la existencia de una mayor capacidad reactiva de los CAFs con respecto a los NFs contenidos en el estroma tumoral en varios tipos de cáncer ^{12,}

⁷³⁻⁷⁵. Por otro lado, ya se encuentra bien documentado el efecto promotor tumoral de los CAFs sobre las células epiteliales tumorales, sin embargo el enfoque de este trabajo fue conocer si tal efecto se modificaba con respecto a la zona espacial de donde provenían los CAFs aislados, por lo que se realizaron ensayos de migración e invasión que para cada población de CAFs y sus respectivos NFs. Los CAFs de las dos diferentes zonas topográficas tumorales de los pacientes probados, mostraron tener mayor capacidad proliferativa tumoral e invasiva en comparación con los NFs. Y comparando solamente las dos poblaciones de CAFs, se demostró que aquellos provenientes de la zona frontal, tuvieron mayor actividad biológica sobre las células A549, lo cual sugiere claramente que los CAFs de esta zona podrían tener una mayor actividad promotora tumoral en comparación con los CAFs intratumorales. Tomando en cuenta la teoría descrita sobre el proceso de metástasis, la cual denomina a las células tumorales de la zona frontal como “líderes”, debido a que se teoriza como las que “abren el camino” hacia los órganos blanco; entonces los resultados de este trabajo sobre una mayor capacidad invasiva de los CAFs-F reforzaría y apoyaría dicho fenómeno ⁸⁵.

Estos resultados apoyan la información que describen al NSCLC como un cáncer altamente invasivo y metastásico, donde algunas investigaciones ya han probado la gran comunicación que hay entre las células tumorales y los diferentes componentes del estroma tumoral y en especial con los CAFs, generando cambios que promueven y aceleran su invasión ^{7, 11}.

Debido a que la activación de los fibroblastos en reposo para transitar al fenotipo de CAF requieren de diferentes señales de activación tanto autocrinas como paracrinas otorgadas por la propia célula epitelial cancerígena, se podría suponer

que no solo los componentes del estroma tumoral, en este caso los CAFs muestran diferencias funcionales sino también la propia célula epitelial tumoral componente de cada región. Ya en la literatura más reciente se reporta que los CAFs versus los NFs en diferentes tipos de tumores, muestran expresión diferencial a nivel transcripcional y postranscripcional ^{45, 73}, como diferencia en expresión de genes, microRNAs y alteraciones epigenéticas entre una población y otra. Pero tales hallazgos, en su mayoría solo se han demostrado partiendo del estroma tumoral completo versus el estroma no tumoral, sin embargo, actualmente esta tomando gran relevancia los estudios enfocados a las posibles alteraciones que se presentan a nivel postranscripcional los grandes protagonistas del microambiente tumoral involucrados en la progresión tumoral, que son los CAFs. Lo que al haber poca información al respecto y nula información a nivel de heterogeneidad espacial tumoral y los CAFs, este trabajo puede generar nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de invasión, progresión y metástasis del cáncer pulmonar. Repercutiendo en la generación de nuevas alternativas de blancos terapéuticos dirigidos a zonas o áreas específicas del tumor.

Siendo el NSCLC un tipo de cáncer con gran poder invasivo y metastásico, con un alto índice de mortalidad ^{6, 86}, se creyó interesante estudiar algunas propiedades de los CAFs y compararlas con los fibroblastos obtenidos de tejido adyacente sano. Y finalmente, hasta la fecha de publicación de este trabajo no se encontró en la bibliografía ninguna investigación donde se aislen y estudien las diferencias fenotípicas y biológicas de CAFs obtenidos de diferentes zonas o regiones de un mismo tumor en NSCLC, a pesar de las evidencias reportadas sobre las

diferencias que existen en la parte central con respecto a la frontal en diferentes tumores^{76, 82, 87, 88.}

11. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- ❖ Este es el primer trabajo donde se aislaron CAFs de diferentes regiones tumorales; intratumoral y frontal de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.
- ❖ Los hallazgos experimentales evidenciaron que los CAFs provenientes de determinada zona o microambiente tumoral muestran capacidad de carcinogénesis diferencial. Siendo los CAFs frontales o periféricos (CAF-F), los de mayor actividad biológica sobre las células epiteliales de carcinoma pulmonar A549, en comparación con los CAFs intratumorales.
- ❖ Es necesario realizar más investigaciones para generar conocimiento sobre los factores o mediadores responsables de la comunicación que se da entre la célula tumoral y los CAFs dentro de zonas espaciales específicas del microambiente tumoral, para conocer más acerca de los mecanismos moleculares precisos que promueven la promoción tumoral mediada por los CAFs en el NSCLC y en un futuro plantear blancos terapéuticos más específicos.

12. REFERENCIAS

1. Arrieta O, Guzmán-de Alba E, Alba-López LF, Acosta-Espinoza A, Alatorre-Alexander J, Alexander-Meza JF, Allende-Pérez SR, Alvarado-Aguilar S, Araujo-Navarrete ME, Argote-Greene LM, Aquino-Mendoza CA, Astorga-Ramos AM, Austudillo-de la Vega H, Avilés-Salas A, Barajas-Figueroa LJ, Barroso-Quiroga N, Blake-Cerda M, Cabrera-Galeana PA, Calderillo-Ruíz G, Campos-Parra AD, Cano-Valdez AM, Capdeville-García D, Castillo-Ortega G, Casillas-Suárez C, Castillo-González P, Corona-Cruz JF, Correa-Acevedo ME, Cortez-Ramírez SS, de la Cruz-Vargas JA, de la Garza-Salazar JG, de la Mata-Moya MD, Domínguez-Flores ME, Domínguez-Malagón HR, Domínguez-Parra LM, Domínguez-Peregrina A, Durán-Alcocer J, Enríquez-Aceves MI, Elizondo-Ríos A, Escobedo-Sánchez MD, de Villafranca PE, Flores-Cantisani A, Flores-Gutiérrez JP, Franco-Marina F, Franco-González EE, Franco-Topete RA, Fuentes-de la Peña H, Galicia-Amor S, Gallardo-Rincón D, Gamboa-Domínguez A, García-Andreu J, García-Cuéllar CM, García-Sancho-Figueroa MC, García-Torrentera R, Gerson-Cwilich R, Gómez-González A, Green-Schneeweiss L, Guillén-Núñez Mdel R, Gutiérrez-Velázquez H, Ibarra-Pérez C, Jiménez-Fuentes E, Juárez-Sánchez P, Juárez-Ramiro A, Kelly-García J, Kuri-Exsome R, Lázaro-León JM, León-Rodríguez E, Llanos-Osuna S, Llanos-Osuna S, Loyola-García U, López-González JS, López y de Antuñano FJ, Loustaunau-Andrade MA, Macedo-Pérez EO, Machado-Villarreal L, Magallanes-Maciel M, Martínez-Barrera L, Martínez-Cedillo J, Martínez-Martínez G, Medina-Esparza A, Meneses-García A, Mohar-Betancourt A, Morales Blanhir J, Morales-Gómez J, Motola-Kuba D, Nájera-Cruz MP, Núñez-Valencia Cdel C, Ocampo-Ocampo MA, Ochoa-Vázquez MD, Olivares-Torres CA, Palomar-Lever A, Patiño-Zarco M, Pérez-Padilla R, Peña-Alonso YR, Pérez-Romo AR, Aquilino Pérez M, Pinaya-Ruíz PM, Pointevin-Chacón MA, Poot-Braga JJ, Posadas-Valay R, Ramirez-Márquez M, Reyes-Martínez I, Robledo-Pascual J, Rodríguez-Cid J, Rojas-Marín CE, Romero-Bielma E, Rubio-Gutiérrez JE, Sáenz-Frías JA, Salazar-Lezama MA, Sánchez-Lara K,

- Sansores Martínez R, Santillán-Doherty P, Alejandro-Silva J, Téllez-Becerra JL, Toledo-Buenrostro V, Torre-Bouscoulet L, Torecillas-Torres L, Torres M, Tovar-Guzmán V, Turcott-Chaparro JG, Vázquez-Cortés JJ, Vázquez-Manríquez ME, Vilches-Cisneros N, Villegas-Elizondo JF, Zamboni MM, Zamora-Moreno J, Zinser-Sierra JW. Consenso nacional de diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas. *Revista de Investigación Clínica*. 2013;65(1):s5-s84.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*. 2015;136:E359-86.
 3. Arrieta O. Tabaquismo, principal causa de cáncer de pulmón. En: Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad de la Secretaría de Salud. Boletín Informativo: Día mundial del Parkinson. Abril, 2017.
 4. National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013. 2016. Fecha de consulta: 6 de abril del 2017; Accesible desde: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/revisions.html
 5. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*. 2010;127(12):2893-917.
 6. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Non-Small Cell Lung Cancer V.4.2016, 2013. National Comprehensive Cancer Network, 2016. Fecha de consulta: 22 de septiembre del 2016; Accesible desde: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf
 7. Navab R, Strumpf D, Bandarchi B, Zhu CQ, Pintilie M, Ramnarine VR, Ibrahimov E, Radulovich N, Leung L, Barczyk M, Panchal D, To C, Yun JJ, Der S, Shepherd FA, Jurisica I, Tsao M-S. Prognostic gene-expression signature of carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(17):7160-5.

8. Organización Mundial de la Salud. Cáncer. Fecha de consulta: 5 de abril del 2017; Accesible desde: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
9. Ishii G, Ochiai A, Neri S. Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;99:186–96.
10. Kuninty PR, Schinittert J, Storm G, Prakash J. Micro RNA targeting to modulate tumor microenvironment. *Frontiers in Oncology*. 2016;6(3):1-6.
11. Kitamura H, Yazawa T, Okudela K, Shimoyamada H, Sato H. Molecular and genetic pathogenesis of lung cancer: differences between small-cell and non-small-cell carcinomas. *The Open Pathology Journal*. 2008;2:106-14.
12. An J, Enomoto A, Weng L, Kato T, Iwakoshi A, Ushida K, Maeda K, Ishida-Takagishi M, Ishii G, Ming S, Sun T, Takahashi M. Significance of cancer-associated fibroblasts in the regulation of gene expression in the leading cells of invasive lung cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2013;139(3):379-88.
13. Deli G, Jin C-H, Mu R, Yang S, Liang Y, Chen D, Makuuchi M. Immunohistochemical assessment of angiogenesis in hepatocellular carcinoma and surrounding cirrhotic liver tissues. *World Journal Gastroenterology*. 2005;11(7):960-3.
14. Wikberg ML, Edin S, Lundberg IV, Van Guelpen B, Dahlin AM, Rutegård J, Stenling R, Öberg A, Palmqvist R. High intratumoral expression of fibroblast activation protein in colon cancer is associated with poorer patient prognosis. *Tumor Biology*. 2013;34(2):1013–20.
15. American Cancer Society. Cáncer facts & figures 2017. Atlanta: American Cancer Society; 2017. Fecha de consulta: 24 de mayo del 2016; Accesible desde: <///Users/Sandy/Desktop/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>.
16. Sudhakar A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of cancer science & therapy*. 2009;1(2):1-4.
17. Organización Mundial de la Salud. Cáncer. Febrero, 2017. Fecha de consulta: 26 de mayo del 2017; Accesible desde: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

18. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA: A Cancer Journal Clinicians. 2015;65(2):87–108.
19. SEER Training Modules, Module Name. U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute. Day Month Year. Fechas de búsqueda: 25 de mayo del 2017. Accesible desde: <<https://training.seer.cancer.gov/>>
20. Cáncer Research UK. Types of cancer. London: 2014. Fechas de búsqueda: 26 de mayo del 2017. Accesible desde: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer#main>
21. Ridge CA, McErlean AM, Ginsberg MS. Epidemiology of lung cancer. Seminars in Interventional Radiology. 2013;30(2):93-8.
22. De Groot P, Munder RF. Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention. Radiologic Clinics of North America. 2012;50(5):863-76.
23. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, Alteri R, Robbins AS, Jemal A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. CA: Cancer Journal Clinicians. 2014;64(4):252-71.
24. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Non-Small Cell Lung Cancer V.2.2013. National Comprehensive Cancer Network, 2013.
25. McCarthy WJ, Meza R, Jeon J, Moolgavkar S. Lung cancer in never smokers epidemiology and risk prediction models. Risk Analysis. 2012;32(1):S69-S84.
26. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. Clinics in Chest Medicine. 2011;32(4):605–44.
27. Mani D, Haigentz MJr, Aboulafia DM. Lung cancer in HIV infection. Clinical Lung Cancer. 2012;13(1):6-13.
28. Samet JM, Avila-Tang E, Boffetta P, Hannan LM, Olivo-Marston S, Thun MJ, Rudin CM. Lung cancer in never smoker: clinical epidemiology and environmental risk factors. Clinical Cancer Research. 2009;15(18):5626-45.
29. NICE Clinical Guidelines. The Diagnosis and Treatment of Lung Cancer (Update). National Collaborating Centre for Cancer. National Institute for Health and Clinical Excellence: guidance. 2011;(21):25-33.

30. Alva LLF, Corcho VA, García-Sancho FC, Salazar FM, Rébora-Togno F, Franco MF, Falcón SV, Sotelo RR. Epidemiología del cáncer pulmonar en México; hallazgos por imagen. *Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 2003;16(4):197-204.
31. Arias CAM, Fernández AD, Almunia LA, Acosta RL, Llana RM. Neoplasia de pulmón: comportamiento epidemiológico *Revista Cubana Oncológica* 2001;17(2):101-4.
32. Travis WD. Classification of Lung Cancer. *Seminars in Roentgenology*. 2011;178-84.
33. Spiro SG, Gould MK, Colice GL. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory test, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines. 2nd Edition. *Chest*. 2007;132(3):149S-60S.
34. Gurrola-Díaz CM, Gonzales-Santiago AE, Troyo-Sanromán R, Mendoza-Topete LA. Tipos histológicos y método diagnóstico en cáncer pulmonar en un centro hospitalario de tercer nivel. *Gaceta Médica de México*. 2009;146(2):97-101.
35. Cheng L, Alexander RE, MacLennan GT, Cummings OS, Montironi R, Lopez-Beltran A, Cramer HM, Davidson DD, Zhang S. Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Modern Pathology*. 2012;25(3):347-69.
36. American Cancer Society, 2016. Fecha de consulta: 27 de septiembre del 2016; Accesible desde: <http://www.cancer.org/treatment/understandingyourdiagnosis/understandingyourpathologyreport/lungpathology/lung-cancer-pathology>
37. Kerr KM. Pulmonary adenocarcinomas: classification and reporting. *Histopathology*. 2009;54(1):12–27.
38. Travis WD. Pathology of Lung Cancer. *Clinics in Chest Medicine*. 2011;32(4):669-92.
39. Pujol JL, Jacot W, Boher JM, Quantin X. Malignant tumors of the lung: pathology of lung cancer. In: Sculier JP, Fry WA. *Malignant tumors of the lung*. New York: Springer; c2004. p. 39-40.

40. Gadgeel SM, Kalemkerian GP. Lung cancer: overview. In: Keshamouni V, Arenberg D, Kalemkerian G. Lung cancer metastasis: novel biological mechanisms and impact on clinical practice. New York: Springer; c2009. p. 7-8.
41. Bukhtoyarov OV, Samarin DM. Pathogenesis of cancer: cancer reparative trap. *Journal of Cancer Therapy*. 2015;6(5):399-412.
42. Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signaling pathways: roadmap for therapies. *The European Respiratory Journal*. 2009;33(6):1485-97.
43. Zhang J, Liu J. Tumor stroma as targets for cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 2013;137(2):200-15.
44. Hu M, Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2008;18(1):27-34.
45. Navab R, Bandarchi B, Tsao MS. Carcinoma-associated fibroblasts in lung cancer. In: Keshamouni V, Arenberg D, Kalemkerian G. Lung cancer metastasis: novel biological mechanisms and impact on clinical practice. New York: Springer; c2009. p. 193-4.
46. Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer. *Cell Cycle*. 2006;5(15):1597-601.
47. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Review* 1889;8(2):98-101.
48. Tripathi M, Billet S, Bhowmick. Understanding the role of stromal fibroblasts in cancer progression. *Cell Adhesion & Migration*. 2012;6(3):231-5.
49. Brenmes RM, Dønnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Andersen S, Sirera R, Camps C, Marinez I, Busund LT. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2011;6(1):209-17.
50. Werb Z, Lu P. The role of stroma in tumor development. *Cancer Journal*. 2015;21(4):250–53.
51. Yamaguchi H, Sakai R. Direct interaction between carcinoma cells and cancer associated fibroblasts for the regulation of cancer invasion. *Cancers*. 2015;7(4):2054-62.

52. Li H, Fan X, Houghton JM. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007;101(4):805-15.
53. Fromigue O, Louis K, Dayem M, Milanini J, Pages G, Tartare-Deckert S, Ponzio G, Hofman P, Barbry P, Auberger P, Mari B. Gene expression profiling of normal human pulmonary fibroblasts following coculture with non-small-cell lung cancer cells reveals alterations related to matrix degradation, angiogenesis, cell growth and survival. *Oncogene*. 2003;22(52):8487-97.
54. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes-bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(11):839-49.
55. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *The Journal of Pathology*. 2003;200(4):429-47.
56. Elenbaas B, Weinberg RA. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Experimental Cell Research*. 2001;264(1):169-84.
57. Tlsty TD. Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Seminars in Cancer Biology*. 2001;11(2):97-104.
58. Gonda TA, Varro A, Wang TC, Tycko B. Molecular biology of cancer-associated fibroblasts: can these cells be targeted in anti-cancer therapy? *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2010;21(1):1-10.
59. Mahale J, Smagurauskaitė G, Brown K, Thomas A, Howells LM. The role of stromal fibroblasts in lung carcinogenesis: a target for chemoprevention? *International Journal of Cancer*. 2016;138(1):30-44.
60. Marsh T, Pietras K, McAllister SS. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Molecular Basis of Disease*. 2013;1832(7):1070-8.
61. Räsänen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Experimental Cell Research*. 2010;316(17):2713-22.
62. Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *The Journal of Experimental Medicine*. 2014;211(8):1503-23.
63. De Veirman K, Rao L, De Bruyne E, Menu E, Van Valckenborg E, Van Riet I, Frassanito MA, Di Marzo L, Vacca A, Vanderkerken. Cancer associated

- fibroblasts and tumor growth: focus on multiple myeloma. *Cancers*. 2014;6(3):1363-81.
- 64.** Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Tekeyama H. Cancer-associated fibroblasts: their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers*. 2015;7(4):2443-58.
- 65.** Pietras K, Östman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Experimental Cell Research*. 2010;316(8):1324-31.
- 66.** De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *International Journal of Cancer*. 2008;123(10):2229-38.
- 67.** Paulsson J, Micke P. Prognostic relevance of cancer-associated fibroblasts in human cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2014;25:61-8.
- 68.** Movot HZ, Fernando NVP. The fine structure of connective tissue: I. The fibroblast. *Experimental and Molecular Pathology*. 1962;1(6):509-34.
- 69.** Mensing H, Pontz BF, Müller PK, Gauss- Müller V. A study on fibroblast chemotaxis using fibronectin and conditioned medium as chemoattractants. *European Journal of Cell Biology*. 1983;29(2):268-73.
- 70.** Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Research*. 1999;59(19):5002-11.
- 71.** Zhong I, Roybal J, Chaerkady R, Zhang W, Choi K, Alvarez CA, Tran H, Creighton CJ, Yan S, Strieter RM, Pandey A, Kurei JM. Identification of secreted proteins that mediate cell-cell interactions in an in vitro model of the lung cancer microenvironment. *Cancer Research*. 2008;68(17):7237-45.
- 72.** Ishii G, Hashimoto H, Asada K, Ito T, Hoshino A, Fujii S, Kojima M, Kuwata T, Harigaya K, Nagai K, Ushijima T, Ochiai A. Fibroblasts associated with cancer cells keep enhanced migration activity after separation from cancer cells: a novel character of tumor educated fibroblasts. *International Journal of Oncology*. 2010;37(2):317-25.
- 73.** Vicent S, Sayles LC, Vaka D, Khatri P, Gevaert O, Chen R, Zheng Y, Gillespie AK, Clarke N, Xu Y, Shranger J, Hoang CD, Plevritis S, Butte AJ, Sweet-

- Cordero A. Cross-species functional analysis of cancer-associated fibroblasts identifies a critical role for CLCF1 and IL-6 in non-small cell lung cancer in vivo. *Cancer Reserch*. 2012;72(22):5744-56.
- 74.** Kim SH, Choe C, Shin YS, Jeon MJ, Choi SJ, Lee J, Bae GY, Cha HJ, Kim J. Human Lung cancer-associated fibroblasts enhance motility of non-small cell lung cancer cells in co-culture. *Anticancer Research*. 2013;33(5):2001-9.
- 75.** Shintani Y, Abulaiti A, Kimura T, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Morii E, Okumura M. Pulmonary fibroblasts induce epithelial mesenchymal transition and some characteristics of stem cells in non-small cell lung cancer. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2013;96(2):425-33.
- 76.** Bissell MJ, Hines WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature Medicine*. 2011;17(3):320-9.
- 77.** Quill DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*. 2013;19(11):1423-37.
- 78.** Hart A. Mann-Whitney test is not just a test of medians: differences in spread can be important. *Clinical Rerearch*. 2001;323(7309):391-3.
- 79.** Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate tumor-promoting inflammation in an NF-kappaB-dependent manner. *Cancer Cell*. 2010;17(2):135-47.
- 80.** Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121(3):335-48.
- 81.** Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Frontiers in Bioscience*. 2010;15:166-79.
- 82.** Esparza-López J, Escobar-Arriaga E, Soto-Germes S, Ibarra-Sánchez MJ. Breast Cancer Intra-Tumor Heterogeneity: One Tumor, Different Entities. *Revista Investigación Clínica*. 2017;69(2):66-76.
- 83.** Halama N, Michel S, Kloor M, Zoerning I, Benner A, Spille A, Pommerencke T, von Knebel DM, Folprecht G, Luber B, Feyen N, Martens UM, Beckhove P,

- Gnjatic S, Schirmacher P, Herpel E, Weitz J, Grabe N, Jaeger D. Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. *Cancer Research*. 2011;71(17):5670-7.
- 84.** Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature Review Cancer*. 2006;6(5):392-401.
- 85.** Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(7):445-57.
- 86.** Reck M, Popat S, Reinmuth N, De Ruyscher D, Kerr KM, Peters S. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2014;23(7):27-39.
- 87.** Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nature Review Cancer*. 2012;12(5):323-34.
- 88.** Stanta G, Jahn SW, Bonin S, Hoefler G. Tumour heterogeneity: principles and practical consequences. *Virchows Archiv*. 2016;469(4):371-84.

APÉNDICE

A. Material y Equipo

1. Resección quirúrgica

- ❖ Tubos de plástico de 50 mL (Axygen, Cat. n.º SCT-50ML-RS)
- ❖ Plumón Sharpie
- ❖ Hielera
- ❖ Refrigerantes (-20°C)
- ❖ Gabinete de Bioseguridad A2 (Labconco, Cat. n.º 302411100)

2. Cortes histológicos

- ❖ Cajas Petri (Sarstedt, Cat. n.º 82.1194.500)
- ❖ Plumón Sharpie
- ❖ Hojas de bisturí (Braun, Cat. n.º BB522)
- ❖ Pinzas curvas de disección (Miltex, Cat. n.º 18-788)
- ❖ Pipeta de 25 mL (Santa Cruz, Cat. n.º SC-200283)
- ❖ Propipeta Easypet (Eppendorf, Cat. n.º 22230204)
- ❖ Tubos de plástico de 50 mL (Axygen, Cat. n.º SCT-50ML-RS)
- ❖ Casetes (Daigger, Cat. n.º EF16061B)
- ❖ Tren de solventes con cestillo (Sakura, Cat. n.º 4451)
- ❖ Campana de extracción (Veco, Cat. n.º EG8)
- ❖ Plancha fría (Leica, Cat. n.º Jung CM 1800)
- ❖ Lápiz
- ❖ Inclusión/Centro de embebimiento de tejidos (Tissue-Tek II)
- ❖ Cortes/Micrótomo de rotación (Leica, Cat. n.º RM2125RT)
- ❖ Portaobjetos silanizados
- ❖ Estufa/Horno de hibridación (Boekel, Cat. n.º 230400)
- ❖ Cubreobjetos 24 x 50 mm (Corning, Cat. n.º 6776322)

3. Cultivo primario de CAFs y NFs

- ❖ Hojas de bisturí (Braun, Cat. n.º BB522)
- ❖ Pinzas curvas de disección (Miltex, Cat. n.º 18-788)
- ❖ Pipetas de 5 mL (Santa Cruz, Cat. n.º SC-200279)
- ❖ Pipetas de 10 mL (Santa Cruz, Cat. n.º SC-200281)
- ❖ Propipeta Easypet (Eppendorf, Cat. n.º 22230204)
- ❖ Tubos de plástico de 50 mL (Axygen, Cat. n.º SCT-50ML-RS)
- ❖ Plumón Sharpie
- ❖ Baño de agua (Polyscience, Cat. n.º WD10A11B)
- ❖ Gradilla tubos de 50 mL (Heathrow Scientific, Cat. n.º HS27505D)
- ❖ Centrifuga refrigerada (Thermo Scientific, Cat. n.º 75005448)
- ❖ Papel aluminio
- ❖ Cajas de cultivo T-25 (Santa Cruz, Cat. n.º SC-200262)
- ❖ Incubadora de CO₂ (Panasonic Healthcare, Cat. n.º MCO-19AIC-PA)
- ❖ Microscopio Invertido (Velab, Cat. n.º VE-403)

4. Caracterización fenotípica de los CAFs y NFs por inmunocitoquímica (ICC)

- ❖ Microscopio Invertido (Velab, Cat. n.º VE-403)
- ❖ Cajas de 6 pozos (Santa Cruz, Cat. n.º SC-204443)
- ❖ Cubreobjetos tratados
- ❖ Pinzas curvas de disección (Stainless, Cat. n.º 61332140)
- ❖ Plumón Sharpie
- ❖ Pipeta de 20-200 µL (Eppendorf, Cat. n.º 3120 000.054)
- ❖ Puntas con filtro de 200 µL (Axygen, Cat. n.º TF-200-RS)
- ❖ Incubadora de CO₂ (Panasonic Healthcare, Cat. n.º MCO-19AIC-PA)
- ❖ Pipetas de 5 mL (Santa Cruz, Cat. n.º SC-200279)
- ❖ Pipetas de 10 mL (Santa Cruz, Cat. n.º SC-200281)
- ❖ Propipeta Easypet (Eppendorf, Cat. n.º 22230204)
- ❖ Parafilm (Parafilm, Cat. n.º PM-999)

- ❖ Refrigerador/ REVCO (Thermo Scientific, Cat. n.º RCRF192A17)
- ❖ Portaobjetos 25 x 75 mm (Corning, Cat. n.º 2947B)
- ❖ Lápiz
- ❖ Bandeja
- ❖ Cámara húmeda (Heathrow Scientific, Cat. n.º HS-15951A)
- ❖ Pipeta de 100-1000 µL (Eppendorf, Cat. n.º 3120 000.062)
- ❖ Puntas con filtro de 1000 µL (Axygen, Cat. n.º TF-1000-RS)
- ❖ Papel aluminio
- ❖ Vaso Coplin para cubreobjetos (Wheaton, Cat. n.º W-900181)
- ❖ Shaker/Agitador orbital (Lab Line, Cat. n.º 3520)
- ❖ Pipetas transfer (Sarstedt, Cat. n.º 1055001)
- ❖ Gasas estériles (Galia, Cat. n.º 2660)

5. Caracterización biológica de los CAFs y de los NFs

- ❖ Microscopio Invertido (Velab, Cat. n.º VE-403)
- ❖ Pipetas de 10 mL (Santa Cruz, Cat. n.º SC-200281)
- ❖ Propipeta Easypet (Eppendorf, Cat. n.º 22230204)
- ❖ Cajas de cultivo T-75 (Corning, Cat. n.º 4306414)
- ❖ Incubadora de CO₂ (Panasonic Healthcare, Cat. n.º MCO-19AIC-PA)
- ❖ Ultracentrífuga (Beckman Coulter, Cat. n.º J2-21M/E)
- ❖ Tubos de plástico de 15 mL (Axygen, Cat. n.º SCT-15ML-RS)
- ❖ Tubos de vidrio fondo redondo (Corex, Cat. n.º 8446)
- ❖ Gradilla tubos de 50 mL (Heathrow Scientific, Cat. n.º HS27505D)
- ❖ Ultracongelador/REVCO (Thermo Scientific, Cat. n.º ULT1386-3-A42)
- ❖ Pipeta de 20-200 µL (Eppendorf, Cat. n.º 3120 000.054)
- ❖ Puntas con filtro de 200 µL (Axygen, Cat. n.º TF-200-RS)
- ❖ Plumón Sharpie
- ❖ Placa 96 pozos (Corning, Cat. n.º 3599)
- ❖ Pipeta de 2-20 µL (Eppendorf, Cat. n.º 3120 000.097)
- ❖ Puntas con filtro de 20 µL (Axygen, Cat. n.º TF-20-RS)

- ❖ Pipeta multicanal de 10-100 µL/8 canales (Eppendorf, Cat. n.º 3122 000.035)
- ❖ Lector de ELISA (BioRad, Cat. n.º iMark Microplate reader)
- ❖ Cámaras de Matrigel BioCoat de 24 pozos(Corning, Cat. n.º 354480)
- ❖ Insertos Control de 24 pozos (Corning, Cat. n.º 354576)
- ❖ Pipeta de 100-1000 µL (Eppendorf, Cat. n.º 3120 000.062)
- ❖ Puntas con filtro de 1000 µL (Axygen, Cat. n.º TF-1000-RS)
- ❖ Hisopos estériles (Deltalab, Cat. n.º 01-300201)
- ❖ Pinzas curvas de disección (Miltex, Cat. n.º 18-788)
- ❖ Hojas de bisturí (Braun, Cat. n.º BB515)
- ❖ Cajas de 24 pozos (Sarstedt, Cat. n.º 83.1836.300)
- ❖ Portaobjetos 25 X 75 mm (Corning, Cat. n.º 2947B)
- ❖ Cubreobjetos 22 x 22 mm (Corning, Cat. n.º 2865-22)
- ❖ Lápiz
- ❖ Microscopio (Lauka)
- ❖ Gasas (Galia, Cat. n.º 2660)

B. Reactivos y Soluciones

1. Etanol al 70%

Se midieron 70 mL de etanol absoluto (J.T. Baker, Cat. n.º 9000-03) para histoquímica o (Sigma Aldrich, Cat. n.º E7023) para cultivo, se llevó a un volumen final de 100 mL con agua destilada (histoquímica) o estéril (cultivo), se conservó en oscuridad a temperatura ambiente y en oscuridad a 4 °C respectivamente hasta su uso.

2. Etanol al 90%

Se midieron 90 mL de etanol absoluto (J.T. Baker, Cat. n.º 9000-03), se llevó a un volumen final de 100 mL con agua destilada y se conservó en oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso.

3. Etanol absoluto-Xilol

Se midieron 50 mL de etanol absoluto (J.T. Baker, Cat. n.º 9000-03), se llevó a un volumen final de 100 mL con xilol (J.T. Baker, Cat. n.º 9490-03) y se conservó en oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso.

4. Etanol al 96%

Se midieron 96 mL de etanol absoluto (J.T. Baker, Cat. n.º 9000-03), se llevó a un volumen final de 100 mL con agua destilada y se conservó en oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso.

5. Etanol-Acido al 1%

A 50 mL de etanol al 70%, se adiciono lentamente por una orilla 4 mL de Acido Clorhídrico concentrado (J.T. Baker, Cat. n.º 9535-02), se llevó a un volumen final de 100 mL y se conservó en oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso.

6. Agua amoniacal

Se disolvió 1 mL de Hidróxido de Amonio (J.T. Baker, Cat. n.º 9535-02) en aproximadamente 50 mL de agua destilada, se llevó a un volumen final de 100 mL y se conservó en oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso.

7. Eosina

Solución Stock: Se disolvió 2 g de Eosina amarilla (Merck, Cat. n.º 1159350025) en 40 mL de agua destilada, se llevó a un volumen final de 200 mL con etanol al 96% y se conservó en oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso.

Para cada 100 mL de la Solución Stock adicional 300 mL de etanol al 80% y 2 mL de ácido acético glacial (J.T. Baker, Cat. n.º 9508-02) y se conservó en oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso.

8. Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) 1X

Se disolvieron 80 g de Cloruro de Sodio (NaCl/J.T. Baker, Cat. n.º 3624-05), 2 g de Cloruro de Potasio (KCl/ J.T. Baker, Cat. n.º 3040), 14.4 g de Fosfato de Sodio (Na_2HPO_4 /Sigma Aldrich, Cat. n.º S-0876) y 2.4 g de Fosfato de potasio (KH_2PO_4 /Sigma Aldrich, Cat. n.º P-5379) en 500 mL de agua destilada estéril y se llevó a un volumen final de 1000 mL, para obtener una solución 10X; se midió el pH y se ajustó a 7.2. Se filtró en condiciones de esterilidad por membrana de 0.22 μm y se conservó a 4 °C hasta su uso.

Se atemperó y se midieron 100 mL del PBS 10X se llevó a un volumen final de 1000 mL con agua destilada estéril, para obtener una solución 1X; se midió el pH y se ajustó a 7.2. Se filtró en condiciones de esterilidad por membrana de 0.22 μm y se conservó a 4 °C hasta su uso.

9. Solución de colagenasas

Se disolvió 0.5 g de Albumina Bovina (BSA, Equitech-Bio, Cat. n.º BAC65) en aproximadamente 50 mL de PBS 1X, se llevó a un volumen final de 100 mL con

PBS 1X en condiciones de esterilidad y se conservó a 4 °C hasta su uso. Se disolvieron 0.25 g de la colagenasa II (Worthington, Cat. n.º 4176) y 0.25 g de la colagenasa IV (Worthington, Cat. n.º 4188) en 20 mL BSA al 0.5% y se llevó a un volumen final de 40 mL, se filtró en condiciones de esterilidad por membrana de 0.22 µm y se conservó a 4 °C hasta su uso.

10. Medio DMEM-F12 con suero fetal bovino (SFB) al 10%

A 89 mL medio DMEM-F12 (Gibco, Cat. n.º 11330-032) se le suplementó con 1 mL de antibiótico-antimicótico (penicilina 10,000 U/estreptomicina 10 mg/anfotericina B 10 µg por mL; Sigma Aldrich, Cat. n.º A-5955) y 10 mL de SFB (Gibco, Cat. n.º 16000-044) descomplementado (ver apéndice C.4), para obtener un volumen final de 100 mL, en condiciones de esterilidad y se conservó a 4 °C hasta su uso.

11. Solución de lisis al 1X

Se diluyó 1 mL del concentrado de Buffer de Lisis 10X (BD, Cat. n.º 555899) en 9 mL de agua destilada estéril. El pH de la solución 1X debió, estar dentro del intervalo de pH 7.1-7.4 y se ajustó el pH si fue necesario. Se atemperó la solución 1X antes de usar.

12. PBS-SFB al 1%

A 99 mL de PBS 1X se le adicionó 1 mL de SFB (Gibco, Cat. n.º 16000-044) descomplementado, para obtener un volumen final de 100 mL, en condiciones de esterilidad y se conservó a 4 °C hasta su uso.

13. Medio DMEM-F12 con SFB al 20%

A 79 mL medio DMEM-F12 (Gibco, Cat. n.º 11330-032) se les suplementó con 1 mL de antibiótico-antimicótico (penicilina 10,000 U/estreptomicina 10 mg/anfotericina B 10 µg por mL; Sigma Aldrich, Cat. n.º A-5955) y 20 mL de SFB (Gibco, Cat. n.º 16000-044) descomplementado, para obtener un volumen final de 100 mL, en condiciones de esterilidad y se conservó a 4 °C hasta su uso.

14. Medio DMEM con SFB al 10%

A 89 mL medio DMEM (Gibco, Cat. n.º 11039-092) se les suplementó con 1 mL de antibiótico-antimicótico (penicilina 10,000 U/estreptomicina 10 mg/anfotericina B 10 µg por mL; Sigma Aldrich, Cat. n.º A-5955) y 10 mL de SFB (Gibco, Cat. n.º 16000-044) descomplementado, para obtener un volumen final de 100 mL, en condiciones de esterilidad y se conservó a 4 °C hasta su uso.

15. Tritón X-100 al 0.01%

Se disolvieron 10 µL de Tritón (Sigma Aldrich, Cat. n.º T8787) en 50 mL de PBS 1X, se llevó a un volumen final de 100 mL y se conservó a 4 °C hasta su uso.

16. PBS-Tween (PBS-T) al 0.05%

Se disolvieron 500 µL de Tween 20 (Sigma Aldrich, Cat. n.º P-1379) en 700 mL de PBS 1X, se llevó a un volumen final de 1000 mL y se conservó a 4 °C hasta su uso.

17. Solución bloqueadora de peroxidasa al 3%

Se disolvieron 10 mL de peróxido de hidrogeno al 30% (H₂O₂, Sigma Aldrich, Cat. n.º H-1009) en 50 mL de metanol frio (J.T. Baker, Cat. n.º 9070-02), se llevó a un volumen final de 100 mL y se uso al momento.

18. Kit Universal Vectastain ABC Elite (Vector, Cat. n.º PK-6200)

❖ Suero bloqueador

Se adicionó 1 gota (50 µL) del stock suero normal de caballo (Vector, Cat. n.º S-2000) en 5 mL de PBS-T al 0.05%, se agitó y se uso al momento.

❖ Anticuerpo biotilnado

Se adicionó 2 gotas (100 µL) del stock suero normal de caballo (Vector, Cat. n.º S-2000) en 5 mL de PBS-T al 0.05%, se agitó y adicionó 2 gotas (100 µL) del stock anticuerpo biotilnado (Vector, Cat. n.º BA-1400), se agitó y se uso al momento.

❖ Reactivo ABC

Se adicionó 2 gotas (100 µL) del reactivo A (Vector, Cat. n.º S-2000) en 5 mL de PBS-T al 0.05%, se agitó y adicionó 2 gota (100 µL) del reactivo B y se agitó. Se preparo 30 minutos antes de su uso.

19. Albúmina de suero bovino (BSA) al 1%

Se disolvió 1 g de albúmina bovina (BSA, Equitech-Bio, Cat. n.º BAC65) en aproximadamente 50 mL de PBS 1X, se llevo a un volumen final de 100 mL con PBS 1X en condiciones de esterilidad, se realizaron alícuotas y se conservó a -20 °C hasta su uso.

20. Kit Substrato DAB, Vector, Cat. n.º SK-4100)

Se adicionó 2 gotas del stock solución buffer en 5 mL agua destilada, se agitó y adicionó 4 gotas del stock solución DAB (Diamino bencidina), se agitó y adicionó 2 gotas del stock solución peróxido de hidrogeno y se agitó. Se filtro por membrana de 0.45 µm y se uso al momento.

21. Solución salina amortiguadora de fosfatos con calcio y magnesio (PBS Ca/Mg 1X)

Se disolvieron 80 g de Cloruro de Sodio (NaCl/J.T. Baker, Cat. n.º 3624-05), 2 g de Cloruro de Potasio (KCl/ J.T. Baker, Cat. n.º 3040), 14.4 g de Fosfato de Sodio (Na₂HPO₄/Sigma Aldrich, Cat. n.º S-0876), 2.4 g de Fosfato de potasio (KH₂PO₄/Sigma Aldrich, Cat. n.º P-5379), 0.39 g de Cloruro de Calcio (CaCl₂·2H₂O/J.T. Baker, Cat. n.º 1336-01) y 1 g de Cloruro de Magnesio (MgCl₂·6H₂O/Sigma Aldrich, Cat. n.º M-9272) en 500 mL de agua destilada estéril y se llevó a un volumen final de 1000 mL, para obtener una solución 10X; se midió el pH y se ajusto a 7.2. Se filtró en condiciones de esterilidad por membrana de 0.22 µm y se conservó a 4 °C hasta su uso.

Se atemperó y se midieron 100 mL del PBS Ca/Mg 10X se llevó un volumen final de 1000 mL con agua destilada estéril, para obtener una solución 1X; se midió el pH y se ajusto a 7.2. Se filtro en condiciones de esterilidad por membrana de 0.22 µm y se conservó a 4 °C hasta su uso.

22. Cristal violeta al 0.2%

Se disolvieron 0.2 g de Cristal Violeta (Sigma Aldrich, Cat. n.º C-3836) en 50 mL de metanol (J.T. Baker, Cat. n.º 9070-02), se llevó a un volumen final de 100 mL.

Se filtró por membrana de 0.45 μm y se conservó en oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso.

C. Técnicas

1. Silanización

Los portaobjetos se colocaron en un cestillo, se sumergieron en etanol a 70% y se secaron durante 1 hora a temperatura ambiente para limpiarlos. Se midieron 2 mL de Silano (Sigma Aldrich, Cat. n.º M6514-50ML), se disolvieron en 50 mL de acetona (J.T. Baker, Cat. n.º 9006-02) y se llevó a un volumen final de 100 mL. Se sumergieron los portaobjetos en el silano al 2% durante 3 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 10 veces (meter y sacar) en agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

2. Tripsinización

Toda solución que estuvo en contacto con los cultivos celulares primarios y la línea celular A549 fueron atemperadas a 37 °C. La monocapa celular se lavó 3 veces con 14 mL de PBS 1X, se le adiciono 1.2 mL de tripsina 1X e incubo a 37 °C, 5% de CO₂ Y 100% de humedad durante 3 minutos. Transcurrido el tiempo se observó la monocapa en el microscopio invertido (10X) para verificar que las celular se hubieran desprendido; sino no era así se le daban pequeños golpecitos en la base de la caja para mejorar su desprendimiento. Se adicionó 10 mL del medio correspondiente con SFB al 10% al cultivo o 10 mL de medio DMEM-F12 sin RF al cultivo de células sincronizadas (A549), se recolectó la suspensión celular y se paso a un tubo de 15 mL estéril y se centrifugó la suspensión celular a

1300 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y resuspendió el pellet celular en 5 mL del medio correspondiente para resembrar y/o contar las células.

3. Cubreobjetos tratados

Se preparó 50 mL de una mezcla 1:1 de Acido Sulfúrico (H_2SO_4 , Sigma Aldrich, Cat. n.º 9681-02) y Acido Clorhídrico (HCl, Sigma Aldrich, Cat. n.º 9535-02), se agregó el H_2SO_4 sobre el HCl, gota a gota y con precaución en la campana de extracción (suficiente para 2 cajas de cubreobjetos de 22 x 22 mm). Se introdujeron los cubreobjetos (Lauka, Cat. n.º 01030) en una caja de vidrio y se agregó la mezcla de ácidos, se agitó suavemente en shaker durante 30 minutos en la campana de extracción. Transcurrido el tiempo se eliminó el ácido y se lavó al chorro de agua corriente durante 20 minutos, para después hacer 2 lavados rápidos con etanol al 70%. Se transfirieron a un frascos estériles y se les agregó etanol al 70% hasta cubrir, para almacenar hasta su uso. Y cuando estos se usaban para cultivo en caja de 6 pozos, estos se tomaban con unas pinzas exclusivas, y secaban con gasa estéril antes de colocarlos en cada pozo.

4. Descomplementación de SFB

El SFB congelado (-20 °C) se atemperó 4 horas antes a 4 °C y después se atemperó en baño de agua a temperatura ambiente. Se inició el calentamiento en el baño de agua hasta que llegó a 56 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 30 minutos con agitación suave cada 10 minutos (se verificó la temperatura con un termómetro en el baño maría). Transcurrido el tiempo se dejó enfriar a

temperatura ambiente, se realizaron alícuotas en esterilidad y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

D. Gráficas

1. Proliferación celular de los CAFs y NFs

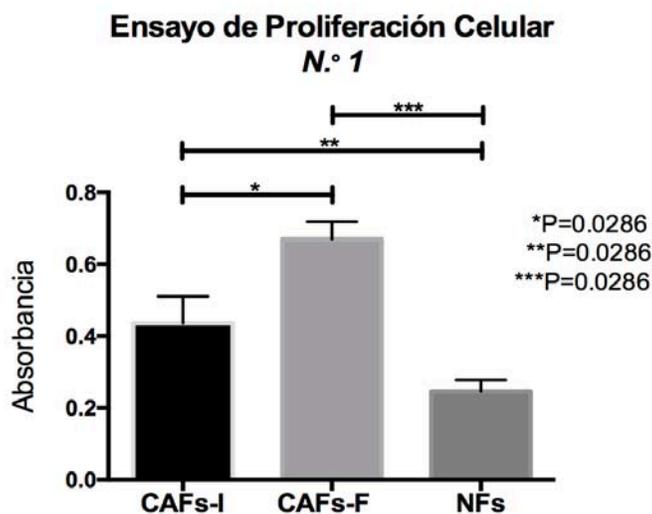


Figura VIII. Proliferación celular con MTT de los cultivos de células A549 inducida con los MC de CAFs-I, CAFs-F y NFs. Los histogramas representan los resultados obtenidos del ensayo 1. Las barras de error indican la D.E., obtenidos por la prueba de dos colas por Mann-Whitney.

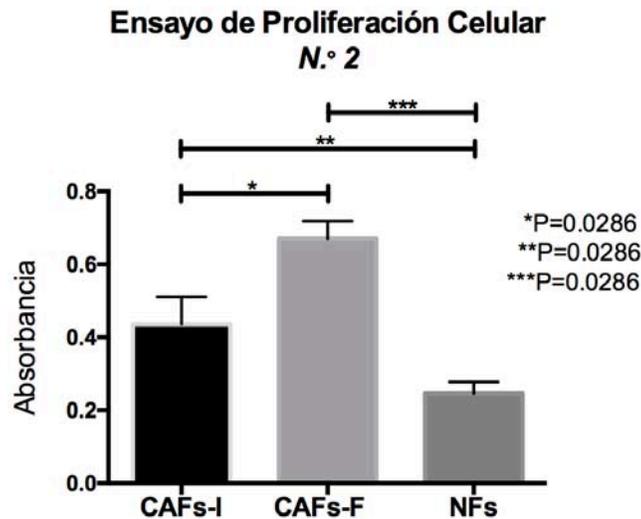


Figura IX. Proliferación celular con MTT de los cultivos de células A549 inducida con los MC de CAFs-I, CAFs-F y NFs. Los histogramas representan los resultados obtenidos del ensayo 2. Las barras de error indican la D.E., obtenidos por la prueba de dos colas por Mann-Whitney.

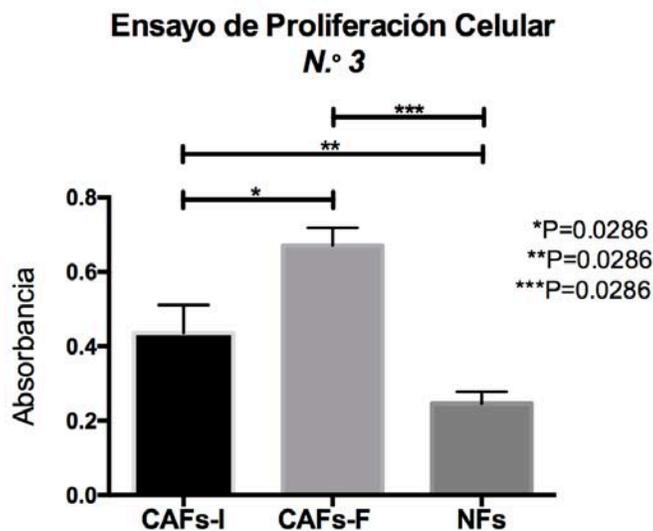


Figura X. Proliferación celular con MTT de los cultivos de células A549 inducida con los MC de CAFs-I, CAFs-F y NFs. Los histogramas representan los resultados obtenidos del ensayo 3. Las barras de error indican la D.E., obtenidos por la prueba de dos colas por Mann-Whitney.

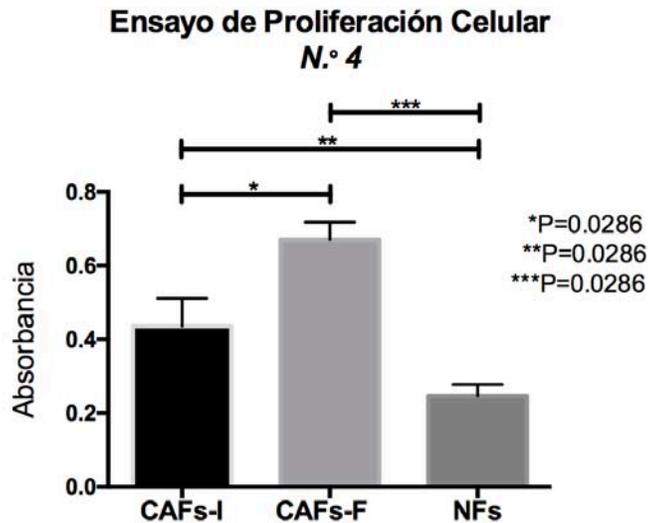


Figura XI. Proliferación celular con MTT de los cultivos de células A549 inducida con los MC de CAFs-I, CAFs-F y NFs. Los histogramas representan los resultados obtenidos del ensayo 4. Las barras de error indican la D.E., obtenidos por la prueba de dos colas por Mann-Whitney.

2. Invasión celular de los CAFs y NFs

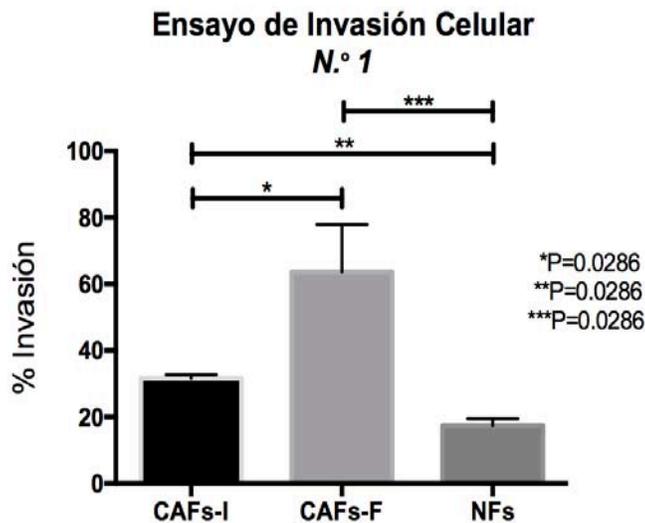


Figura XII. Invasión celular en cámaras de matriz de Matrigel de los cultivos de células A549 con los MC de CAFs-I, CAFs-F y NFs. Los histogramas representan los resultados obtenidos del ensayo 1. Las barras de error indican la D.E., obtenidos por la prueba de dos colas por Mann-Whitney.

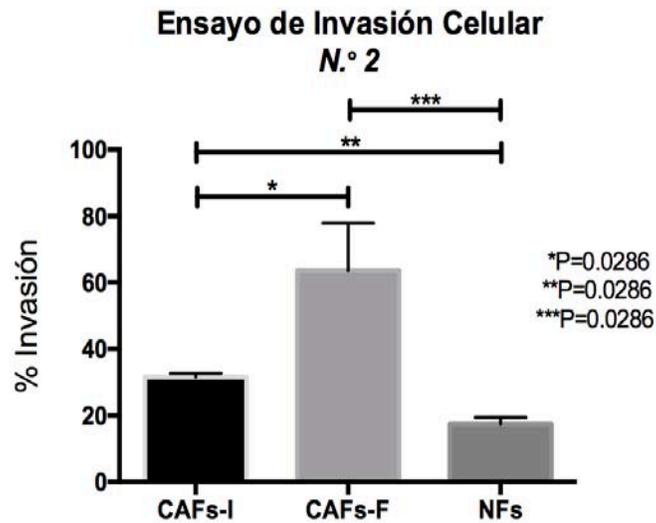


Figura XIII. Invasión celular en cámaras de matriz de Matrigel de los cultivos de células A549 con los MC de CAFs-I, CAFs-F y NFs. Los histogramas representan los resultados obtenidos del ensayo 2. Las barras de error indican la D.E., obtenidos por la prueba de dos colas por Mann-Whitney.