



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO ANTINEOPLÁSCICO DE GK-1, AS1411 Y
LA COMBINACIÓN DE ESTOS EN CARCINOMA
PULMONAR MURINO INDUCIDO POR LA LÍNEA
CELULAR LEWIS LUNG CARCINOMA (LLC).**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

P R E S E N T A

DIANNE ESCARLETT

MENDOZA RODRÍGUEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Oscar Armando Pérez Méndez
VOCAL: Dr. Mario Adán Moreno Eutimio
SECRETARIO: Dr. Armando Pérez Torres
1er. SUPLENTE: QFB. Víctor Hugo Avilés Rosas
2° SUPLENTE: Mat. Manuel Esteban Enríquez Villeda

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE FILOGENIA DEL SISTEMA INMUNE DE PIEL Y MUCOSAS, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y TISULAR, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

DR. ARMANDO PÉREZ TORRES

SUPERVISOR TÉCNICO:

M EN C. EVELYN PULIDO CAMARILLO

SUSTENTANTE:

DIANNE ESCARLETT MENDOZA RODRÍGUEZ

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química y a todos mis profesores quienes con sus enseñanzas me hicieron crecer como profesional día a día.

A todas las vidas sacrificadas en beneficio de la ciencia, sin ellos esto no hubiera sido posible.

A mi tutor el Dr. Armando Pérez Torres por confiar en mí para desarrollar este proyecto, por su apoyo en todos los aspectos y su paciencia.

M en C Evelyn Pulido Caramillo por la guía, apoyo, la dedicación y paciencia que tiene con todos los que pasamos por el LFSIPM.

Al IQ. José Landeros Valdepeña y la Dra. Diana Torres por la asesoría en el análisis estadístico.

Al histotecnólogo Daniel Gutiérrez Castañeda, la QFB Verónica Rodríguez Mata, al Técnico Ricardo Hernández Trujillo y a la Técnico Araceli Castro por su apoyo y ayuda.

A mis compañeros y anexos del LFSIPM por el apoyo, por los momentos de dispersión y risas que hicieron que todo este proceso fuera más ameno y divertido.

Al candidato a doctorado Oscar Vivanco por la realización del inmunoblot de las células Lewis Lung Carcinoma (LLC).

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e innovación Tecnológicas DGAPA-PAPIIT, por el financiamiento otorgado a través del proyecto IT203418 y por la beca otorgada (029619).

ÍNDICE

ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Generalidades del cáncer	1
1.2. CÁNCER DE PULMÓN.....	3
1.3. Tratamientos para cáncer de pulmón.....	7
1.4. Modelos de cáncer de pulmón	8
1.5. Lewis Lung Carcinoma	9
1.6. Terapias experimentales en los modelos de cáncer de pulmón.....	11
1.7. Péptidos.....	13
1.8. GK-1.....	15
1.9. Aptámeros	16
1.10. AS1411	19
JUSTIFICACIÓN	27
2. HIPÓTESIS	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivo general.	29
3.2. Objetivos particulares.....	29
4. METODOLOGÍA	31
4.1. Cultivo celular	31
4.2. Inmunofluorescencia indirecta	32
4.3. Inmunoblot.....	33
4.4. Animales.....	34
4.5. Estudio piloto del modelo murino de cáncer pulmonar heterotópico. Curva de supervivencia, volumen tumoral e histopatología en ratones implantados con diferentes números de células LLC.....	35
4.6. Modelo murino de carcinoma de pulmón	36
4.7. Eutanasia de ratones.....	40

4.8.	Procesamiento de muestras	41
4.9.	Tinción con hematoxilina y eosina	42
4.10.	Histopatología	43
4.11.	Inmunohistoquímica	43
4.12.	Análisis estadístico	44
5.	RESULTADOS	45
6.	DISCUSIÓN	79
7.	CONCLUSIONES	85
8.	PERSPECTIVAS	86
9.	ANEXO.....	87
10.	REFERENCIAS	90

ABREVIATURAS

CTC	Células tumorales circulantes
LLC	Lewis Lung Carcinoma
MNP	Nanopartículas magnéticas
NCL	Nucleolina
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
SCLC	Cáncer de pulmón de células pequeñas
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

RESUMEN

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año se diagnostican 1.6 millones de casos nuevos de cáncer de pulmón y mueren por esta causa 1.38 millones. De los tipos de cáncer de pulmón el que representa el 35% de los casos es el epidermoide o escamoso; un modelo experimental de este tipo de cáncer es reproducido por la línea celular Lewis Lung carcinoma (LLC) derivada de ratones C57BL/6. Estos tumores desarrollados subcutáneamente, son altamente vascularizados y metastásicos a pulmones, ganglios linfáticos e hígado.

Una molécula con propiedades antitumorales es GK-1, péptido que incrementa significativamente la sobrevida en modelos murinos de cáncer de mama y melanoma. Por otro lado, el áptamero AS1411 se encuentra en estudios de fase II como tratamiento de cáncer de riñón donde se ha observado que se une específicamente a la nucleolina, proteína con funciones de regulación de la replicación del DNA y del crecimiento celular.

Por lo anterior, se decidió utilizar estas dos moléculas en el modelo de cáncer pulmonar inducido por la implantación subcutánea de la línea celular LLC. Se desarrolló la curva de sobrevida del modelo LLC, donde se obtuvo que la concentración ideal para probar los tratamientos era 2.5×10^4 células, además se observó que el modelo produce esplenomegalia hecho hasta donde se sabe no se había reportado antes en este modelo. Por otra parte, existe una relación directa con la concentración implantada y el tamaño tumoral, también existe una relación inversamente proporcional con el número de células implantadas y la sobrevida. Al probar los tratamientos se encontró que no aumentan la sobrevida, sin embargo, reducen el tamaño tumoral mejorando la calidad de vida de los ratones.

1. ANTECEDENTES

1.1. Generalidades del cáncer

La palabra cáncer proviene del latín *cancer*, traducción literal del griego *karkinos* que significa cangrejo, esto debido a la semejanza de un tumor alimentado por vasos sanguíneos con las pinzas o apéndices torácicos de los cangrejos, de acuerdo con las observaciones de Hipócrates (1,2). Cáncer es sinónimo de neoplasia o tumor maligno. Un tumor es un crecimiento relativamente autónomo y alterado de cualquier tipo de tejido, debido a la falla en algún mecanismo que regula su proliferación (2). El cáncer es un conjunto de enfermedades de origen multifactorial; es decir, que puede originarse por distintas causas incluyendo los hábitos de vida como la dieta o la ocupación profesional. Existen dos tipos de tumores: benignos y malignos (Cuadro 1) (2)

Cuadro 1 Comparación en varios aspectos de tumores benignos y malignos

<i>Características</i>	<i>Tumores benignos</i>	<i>Tumores malignos</i>
<i>Velocidad de crecimiento</i>	Lento	Rápido
<i>Modo de crecimiento</i>	Expansivo	Infiltrativo
<i>Efectos generales</i>	Poco común (excepción endocrinos)	Común
<i>Metástasis</i>	-	Común
<i>Recurrencia después de la eliminación</i>	Raro	Común
<i>Macroscópicamente</i>		
<i>Cápsula</i>	Común	Pseudocápsula

<i>Necrosis</i>	Raro	Común
<i>Ulceración</i>	Raro	Común
<i>Microscópicamente</i>		
<i>Pleomorfismo</i>	Leve	Severo
<i>Tejido atípico</i>	Leve	Severo
<i>Mitosis</i>	Pocas	Muchas
<i>Proporción núcleo/citoplasma</i>	Normal	Aumentado
<i>Ploidía</i>	Normal	Usualmente anormal
<i>Núcleos</i>	Normal	Prominente

Casi todos los tumores se caracterizan por una inestabilidad genética, por lo que pueden producir proteínas modificadas; éstas son reconocidas como no propias por el sistema inmunológico del hospedero, lo que permite la activación de la respuesta inmunológica y la subsecuente eliminación del tumor (3). Esta capacidad del sistema inmunológico de reconocer a las células transformadas se le conoce como inmunoección (3). A menudo aparecen células tumorales, pero normalmente el sistema inmunitario las reconoce y destruye antes de que puedan causar una neoplasia (3). La inmunoección se divide en tres fases: eliminación, equilibrio y escape (3).

En la fase de eliminación o inmunovigilancia, las respuestas inmunológicas innata y adaptativa colaboran para restablecer el tejido, eliminando las células tumorales mediante perforinas y la producción de varias citocinas, en especial IFN- γ , así como la participación de células NK, macrófagos, granulocitos, células dendríticas y linfocitos (3). En la

fase de equilibrio, la respuesta inmunológica no elimina por completo las células tumorales y establece un equilibrio que mantiene a estas células en estado de detención temporal del crecimiento y desarrollo o dormancia. Eventualmente, estas células entran a la fase de escape en la que las mutaciones adquiridas y acumuladas les permiten evadir la respuesta inmunológica y el tumor crece a niveles detectables (3).

En el proceso de inmunoedición la respuesta inmunológica innata y la adquirida colaboran para eliminar las células transformadas, lo que explica la razón de que exista un incremento en la formación de tumores en individuos inmunocomprometidos, y que en ciertas ocasiones se observa la regresión tumoral de forma espontánea en individuos inmunocompetentes (3).

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial y fue responsable de aproximadamente 9.6 millones de muertes en 2018 (4). En el mundo, aproximadamente 1 de cada 6 muertes se debe al cáncer (4).

1.2. CÁNCER DE PULMÓN

El mayor índice de mortalidad por cáncer a nivel mundial para ambos sexos corresponde al cáncer de pulmón (Figura 1) (4,5) Este tipo de cáncer causó aproximadamente 8 millones de muertes en el mundo.

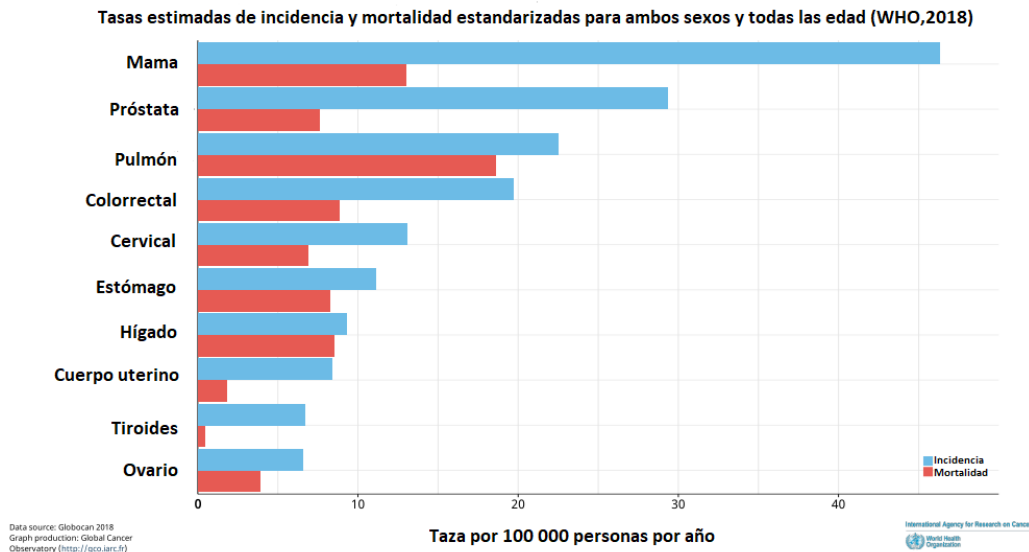


Figura 1. Incidencia y mortalidad de cáncer en el mundo. Se observa que el cáncer de pulmón se encontraba en tercer lugar en incidencia y en primer lugar en mortalidad a nivel mundial en el año 2018 (4)

A nivel nacional, de un total de 195925 casos de cáncer reportados en 2013, 10.9% correspondieron a cáncer de pulmón, ubicándose en sexto lugar de incidencia, precedido por cáncer de próstata (35.5%), cáncer de mama (23.6%), cáncer colorrectal (14.6%), cáncer de estómago (13.5%) y cáncer cervicouterino (12%) (6). En ese mismo año, de un total de 84 172 muertes por cáncer, el más alto índice de mortalidad correspondió a cáncer de pulmón con 10.3% (6).

El cáncer de pulmón se divide en dos grandes grupos: 1) Cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), que constituye el 20% de los cánceres pulmonares; incluye los subtipos: carcinoma de células pequeñas, carcinoma mixto de células pequeñas y grandes y carcinoma combinado de células pequeñas. 2) Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), que representa el 80% del total de cánceres de pulmón y que tiene tres subtipos: carcinoma de células escamosas o epidermoide (35%), adenocarcinoma (50%) y carcinoma indiferenciado de células grandes o no pequeñas (15%) (7).

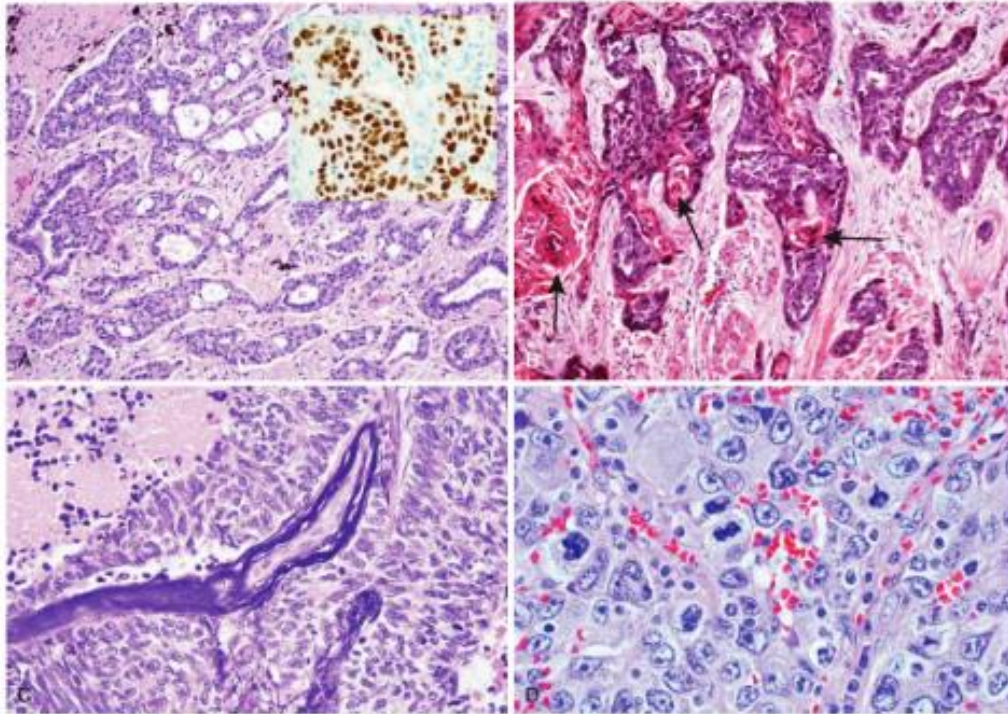


Figura 2. Variantes histológicas de cáncer de pulmón. A) Adenocarcinoma, con aspecto glandular (recuadro muestra positividad de las células neoplásicas al factor transcripcional tiroideo 1 (TTF-1). B) Carcinoma epidermoide o escamoso bien diferenciado queratinizado con cúmulos de queratina (flechas) C) Carcinoma de células pequeñas con islas de células basófilas y áreas de necrosis. D) Carcinoma de células no pequeñas, pleomórfico, anaplásico e indiferenciado (8).

Con base en la combinación de varias características como el tamaño, la ubicación y la diseminación a los ganglios linfáticos y/o a otras partes del cuerpo, al NSCLC se le describen 5 estadios:

Estadio 0: Corresponde a la "enfermedad *in situ*", lo que significa que el cáncer se encuentra "en el lugar" de origen y no ha invadido tejidos cercanos ni se ha diseminado fuera del pulmón.

Estadio I: Tumor pequeño que no se ha diseminado a ningún ganglio linfático, lo que hace posible que un cirujano lo extirpe completamente. El estadio I está dividido en 2 subestadios en función del tamaño del tumor:

- IA, los tumores miden 3 cm o menos, y se subdividen en IA1, IA2 y IA3 de acuerdo con el tamaño del tumor.
- IB, los tumores miden más de 3 cm, pero menos de 4 cm.

Estadio II se divide en 2 subestadios:

- IIA, describe un tumor que mide entre 4-5 cm y que no ha diseminado a los ganglios linfáticos regionales.
- IIB, describe un tumor que mide entre 4-5 cm y que ha diseminado a los ganglios linfáticos. Un cáncer en estadio IIB también puede ser un tumor de más de 5 cm de ancho, que no se ha diseminado a los ganglios linfáticos.

Estadio III: se clasifica en estadio IIIA, IIIB y IIIC. El estadio se basa en el tamaño del tumor y a qué ganglios linfáticos se ha diseminado.

Estadio IV: significa que el cáncer de pulmón se ha diseminado a más de un área en el otro pulmón, al líquido que rodea el pulmón o al corazón, o ha hecho metástasis distantes a través del torrente sanguíneo. Una vez que las células cancerosas ingresan a la sangre, el cáncer se puede diseminar a cualquier parte del cuerpo.

La hipótesis del preniño metastásico establece que la formación de metástasis es dirigida, no aleatoria, y que está determinada por la participación de glicoproteínas y moléculas de adhesión que definen el transporte y la direccionalidad celular (9); la presencia de estructuras sacarídicas favorecen la interacción con ligandos específicos entre proteína-carbohidrato o carbohidrato-carbohidrato (10). En el caso del NSCLC se conoce que es más probable que se establezcan metástasis en el cerebro, los huesos, el hígado y las glándulas suprarrenales (7).

El estadio IV del NSCLC se divide en 2 subestadios:

- El cáncer en estadio IVA se ha diseminado dentro del tórax y/o a un área fuera del tórax.
- El cáncer en estadio IVB se ha diseminado fuera del tórax a más de una zona de un órgano o a más de un órgano.

Se reconocen diferentes factores de riesgo para el desarrollo de esta neoplasia, siendo el tabaquismo el más importante, tanto en fumadores activos como pasivos (4,7).

1.3. Tratamientos para cáncer de pulmón

Por lo general, la detección del cáncer de pulmón en etapas tempranas es difícil y en el 90% de los casos se diagnostica en estadios avanzados, cuando el tratamiento ya no es tan eficaz (9).

El cáncer de pulmón se trata de diversas formas, dependiendo del tipo y de la extensión de la diseminación (9). En los primeros estadios, cuando el tumor no se ha extendido, la neumonectomía parcial o total puede ofrecer un pronóstico muy bueno (9). Sin embargo, cuando hay invasión de ganglios linfáticos o metástasis a distancia, el tratamiento quirúrgico no es útil y la opción es la combinación de quimioterapia y radioterapia (9).

La radioterapia es relativamente precisa y se usa para lograr el control local, mientras que la quimioterapia ejerce un efecto sistémico (9). Sin embargo, ambas terapias tienen índices terapéuticos bajos y a menudo son altamente tóxicas con un amplio espectro de efectos secundarios graves. Además, el desarrollo de resistencia es un problema clínico importante (2), observada en los pacientes que tienen recaídas o reincidencias y que presentan tumores que son más resistentes a la quimioterapia que el tumor primario (9). Una alternativa a las terapias citotóxicas es la inmunoterapia, que tiene como objetivo manipular al sistema inmune para crear un ambiente antitumoral (2). Sin embargo,

las inmunoterapias no están exentas de efectos colaterales y de ser ineficientes ya que están asociadas a toxicidad adversa, a autoinmunidad reversible, a la dificultad de penetración en las neoplasias blanco y a que se metaboliza con facilidad (9).

1.4. Modelos de cáncer de pulmón

Gran parte de los conocimientos de la fisiología (y de la patología) humana están basados en estudios realizados en otras especies, porque la experimentación en el hombre es, por razones obvias, difícil o imposible de realizar en muchos casos (10). Las analogías entre otras especies y el humano son, en muchas ocasiones, abundantes para justificar el estudio de los fenómenos biológicos en animales de laboratorio y para la extrapolación de los resultados obtenidos (10). Sin embargo, las diferencias que existen entre el hombre y otras especies, incluidos los monos antropoides, pueden ser tan marcadas, que la aplicación al humano, muchas veces, resulta ser aventurada (10). A pesar de esto, la construcción de modelos es una de las tareas esenciales de la labor científica (10).

Para generar y evaluar nuevas terapias para el cáncer de pulmón, los modelos preclínicos avanzados deberían imitar con precisión el tipo, la progresión, la invasión y la metástasis del cáncer de pulmón. Asimismo, debe predecirse, hasta donde sea posible, el beneficio clínico de la terapia para todos los tipos de cáncer de pulmón. Desde luego, es igualmente relevante estudiar mejor la prevención y las estrategias de diagnóstico y tratamiento (11).

Los modelos murinos de cáncer se pueden dividir en los siguientes grupos: sistemas de xenoinjerto, transgénicos, inducidos por carcinógenos o espontáneos y singénicos (11). Los modelos de xenoinjerto requieren la inyección de células cancerosas humanas en

ratones inmunocomprometidos, ya sea por vía subcutánea, ortotópica o sistémica (11). Por otra parte, los modelos de ingeniería genética se utilizan para inducir el crecimiento neoplásico espontáneo a través de mecanismos transgénicos, condicionales o inducidos por fármacos (11). Los ratones transgénicos se crean mediante microinyección de DNA en el pronúcleo de cigotos e inyección de células madre embrionarias en blastocitos para producir la pérdida o ganancia de mutaciones de la función deseada (11).

La susceptibilidad y la incidencia de tumores pulmonares espontáneos o inducidos por fármacos varían entre cepas de ratones y por la consanguineidad de los ratones. La incidencia de tumores pulmonares espontáneos e inducidos es mayor en cepas sensibles como A/J y SWR (11).

Los modelos murinos singénicos implican la inyección de células cancerosas inmunológicamente compatibles en ratones inmunocompetentes (11). La disponibilidad de modelos singénicos para estudiar el cáncer de pulmón es muy limitada (11). El único modelo singénico reproducible para el cáncer de pulmón hasta la fecha es el modelo de carcinoma de pulmón de Lewis (LLC). LLC es una línea celular establecida a partir del pulmón de un ratón C57BL/6, utilizada principalmente para modelar metástasis y para evaluar la eficacia de agentes quimioterapéuticos *in vivo* (11).

1.5. Lewis Lung Carcinoma

La línea celular tumoral Lewis Lung carcinoma (LLC) fue establecida en 1951 por la Dra. Margaret R. Lewis, proveniente de un carcinoma epidermoide espontáneo de pulmón en ratón (12). Crece rápidamente, alcanzando aproximadamente 18x19x9 mm 14 días después de la implantación de 1×10^6 células, con un 100 por ciento de éxito y cerca

del 4% de regresión. Es un tumor muy maligno de tipo epidermoide anaplásico extremadamente hemorrágico (Figura 3) (13).

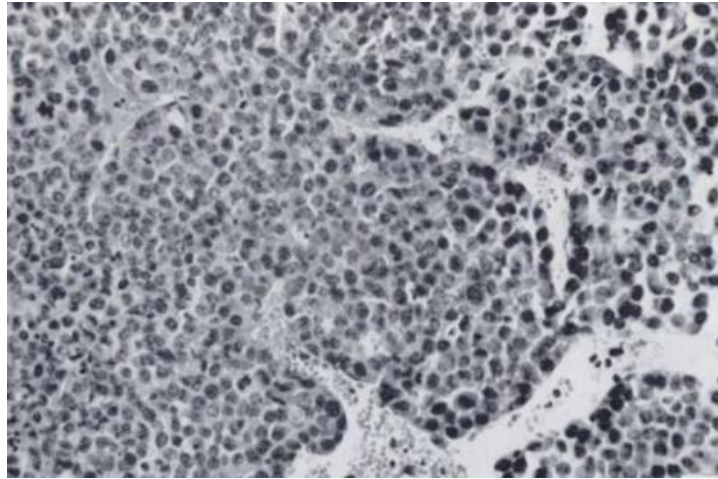


Figura 3. Histopatología del carcinoma de pulmón de Lewis. Es un carcinoma de tipo escamoso o epidermoide, poco diferenciado, cuyas células tienen núcleos grandes de forma irregular y cromosomía variable. (x200). Tomado y modificado de Segiura, 1954 (14).

La línea celular LLC ha sido un modelo preclínico exitoso para la evaluación del fármaco Navelbine *in vivo*, antes de su implementación en ensayos clínicos. (11). Generalmente, esta línea celular se inyecta en la cavidad peritoneal de ratones C57BL/6, a 1×10^7 células por ratón, y dentro de las dos semanas de implantación los tumores alcanzan 2.2 ± 0.4 mm (11).

A diferencia de los modelos de xenoinjerto ampliamente utilizados en los que células humanas se implantan en ratones a los que se induce inmunosupresión (11), el modelo LLC tiene de conveniente de que las células implantadas son inmunológicamente compatibles con la cepa de ratón C57BL/6. Se pueden evaluar las respuestas inmunes y de toxicidad verdaderas con respecto a las terapias dirigidas y el crecimiento tumoral (11). Además, debido a que el modelo LLC puede

ser tanto singénico como ortotópico, el microambiente tumoral se puede representar con mayor precisión (11).

Los modelos murinos de cáncer de mama y el de melanoma por transferencia de las líneas celulares 4T1 y B16, respectivamente, desarrollan esplenomegalia (15–17). La estimulación de mielopoyesis esplénica por factores crecimiento como GM-CSF, M-CSF secretados por las células tumorales explican el crecimiento del bazo. Lo anterior es relevante ya que se ha demostrado una relación inversa entre el crecimiento del bazo y la tasa de supervivencia (17). Uno de los factores más conocidos asociados a este hecho es el incremento de células mieloides supresoras de origen esplénico que favorecen el desarrollo del tumor primario y de metastasis (17).

A pesar de su superioridad como modelo animal para el cáncer de pulmón, el modelo LLC está asociado con varias limitaciones como que las respuestas a los tratamientos pueden no ser transferibles a las condiciones humana (11).

1.6. Terapias experimentales en los modelos de cáncer de pulmón

Actualmente se están implementando tecnologías de edición genética, como CRISPR/Cas9, para tratamientos *in vitro*, cuyas dianas de estudio incluyen oncogenes, genes supresores de tumor, genes de resistencia los medicamentos y genes relacionados con el sistema inmune del tumor (18).

Un ejemplo de esta tecnología es la edición del gen *EGFR* (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico) sobreexpresado en las líneas celulares H1975 (adenocarcinoma; NSCLC de humano) y A549

(Adenocarcinoma alveolar humano) y generar modelos de xenoinjerto en ratones. Se ha observado que la capacidad de estos animales para destruir a las células cancerosas mejora significativamente y el volumen del tumor es reducido (18). Otro gen que ha sido editado en las líneas celulares H460 (NSCLC) y H1299 (NSCLC obtenido de una metástasis en ganglio linfático) es el gen *RSF1*, cuya sobreexpresión determina la progresión del cáncer. Cuando estas líneas celulares son usadas como modelos de xenoinjerto, se ha observado la detención del ciclo celular en G1, disminución de la proliferación celular, aumento de la apoptosis y disminución de la migración celular (18). En un modelo singénico ha sido editado es el gen *CTNND2*, que codifica δ -catenina y cuya sobreexpresión promueve la carcinogénesis y las metástasis del adenocarcinoma pulmonar; dicha edición génica produce la pérdida de la capacidad tumorigénica y metastásica de las células tumorales *in vivo* (18).

Otro aspecto que se está evaluando es la modificación de las propiedades fisicoquímicas de los medicamentos o bien la unión a acarreadores como son las nanopartículas y las nanopartículas magnéticas (MNP). Estas últimas tienen varias ventajas como son las propiedades de liberación sostenida, la producción fácilmente escalable, la alta capacidad de encapsulación, modificación de superficie más fácil, biocompatibilidad con células y tejidos normales, y naturaleza magnética estable (19). En un estudio se observó que los tumores de pulmón tratados con óxido de hierro-nanopartícula magnética-cisplatino o cis-diaminodicloroplatino (Fe_3O_4 -MNP-DDP) tuvieron una disminución en las proteínas relacionadas con la resistencia a cisplatino y aumentó la citotoxicidad de éste (16). Los resultados de la citotoxicidad mostraron que DDP inhibió considerablemente el crecimiento de la línea celular A549 (Adenocarcinoma alveolar humano) y de las células A549

resistentes a DDP de una manera dependiente de la dosis. En el estudio concluyen que Fe₃O₄-MNP aumenta la actividad anticancerígena de DDP (19).

1.7. Péptidos

Las terapias contra el cáncer basadas en péptidos, dirigidas a las células cancerosas, producen menos efectos colaterales y podrían ser más efectivos que los tratamientos actuales basados en fármacos o combinaciones (9). Los péptidos son cadenas lineales cortas de aminoácidos, por lo general menores a 50 aminoácidos de longitud, a menudo estabilizados con enlaces disulfuro (20). Tienen una alta especificidad para unir y modular una interacción proteica (20), con varias ventajas importantes sobre las proteínas o anticuerpos: son pequeños, fáciles de sintetizar, tienen la capacidad de penetrar las membranas celulares, además de tener alta actividad, especificidad y afinidad, con interacciones mínimas con otros medicamentos y tienen una diversidad química y biológica (20).

Los péptidos no se acumulan en órganos (por ejemplo, riñón o hígado), lo que puede ayudar a minimizar efectos secundarios, pueden sintetizarse rápidamente, modificarse fácilmente y son menos inmunogénicos que los anticuerpos o proteínas recombinantes (9).

Existen péptidos cargados positivamente que se unen a la fosfatidilserina y a mucinas *O*-glicosiladas, ambas con carga neta negativa y sobreexpresadas en las células tumorales, en comparación con células no tumorales; esta interacción rompe las membranas se rompen por micelización o por formación de poros y en consiguiente la células cancerosas mueren (9). Otros péptidos como la lactoferina bovina y Magainina 2 son inductores de la apoptosis al permeabilizar la

membrana celular y perturbar la integridad de las membranas mitocondriales cargadas negativamente, lo que resulta en la liberación del citocromo C. Éste se une a caspasa 9 y a su vez con el inductor de apoptosis-1, formándose el apoptosoma que promueve la activación de proteínas involucradas en la apoptosis (9).

Existen otros péptidos que inhiben la unión ligando-receptor, o inhiben proteínas de adhesión celular, a las proteínas quinasas o proteasas. Al examinar una biblioteca de péptidos, se descubrió que los miembros de un grupo de péptidos inhiben la interacción entre el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) y su receptor. Lo anterior origina que se altere la regulación positiva de la angiogénesis promovida por VEGF. De esta manera, ese grupo de péptidos ejercerían propiedades antitumorales (9).

Otros péptidos pueden actuar como inhibidores de la formación de nuevos vasos sanguíneos. La trombospondina-1 (TSP-1) es una proteína que actúa como regulador negativo de la angiogénesis, básicamente porque induce apoptosis de las células endoteliales, mediada por el receptor CD36. Ya que en principio su acción es fisiológica, TSP-1 tiene una regulación diferencial (9). ABT-510 es un péptido sintético derivado TSP-1 que mimetiza la actividad antiangiogénica de ésta al inhibir las acciones proangiogénicas de VEGF, bFGF (basic fibroblast growth factor, HGF (hepatocyte growth factor (HGF) e IL-8, relevantes en la neovascularización de neoplasias. TSP-1 se usa en el tratamiento de tumores sólidos, linfoma y melanoma (9).

También existen péptidos estimuladores del sistema inmune (9). Estos son de interés debido a que el microambiente tumoral contiene una amplia gama de moléculas inmunosupresoras que evitan la erradicación eficiente del tumor por parte del sistema inmune (9). Por lo tanto, la respuesta del hospedero a las terapias contra el cáncer podría

ser estimulada por la administración simultánea de inmunoadyuvantes, que activan el sistema inmunitario innato y adquirido de tipo 1 (inmunidad celular) mediado por IL-2 y IFN- γ (1,11).

Algunos péptidos pequeños de origen microbiano inducen una respuesta inmunoestimuladora inespecífica. Se sabe desde hace mucho tiempo que el dipéptido de muramilo (MDP) de *mycobacterium* actúa como adyuvante de la vacuna y tiene potencial en la terapia del cáncer. Otro ejemplo es el tetrapéptido tuftsina natural de la región Fc de la inmunoglobulina G (IgG) leucofílica; este péptido se une específicamente a macrófagos, monocitos y leucocitos polimorfonucleares y estimula su actividad inmunomoduladora en hospedadores con supresión tumoral (9).

1.8. GK-1

GK-1 (por las iniciales de sus descubridores: Gohar Gevorkian y Karen Manoutcharian) es un péptido de 18 aminoácidos identificado y clonado a partir de la subunidad KETc7 de la proteína KE7 que está relacionada con varios procesos vitales de membrana del cisticerco de *Taenia crasseiceps* (21). Este péptido está clasificado dentro de los péptidos con actividad inmunoestimuladora (21).

Se ha demostrado que GK-1 aumenta la sobrevida en diferentes modelos de cáncer. En el modelo de melanoma murino inducido por la implantación subcutánea de la línea celular B16-F0 en ratones C57BL/6 machos, una dosis semanal de 10 μ g de GK-1 aumentó la sobrevida en un 42.58% en comparación con el grupo control (16); además, la coadministración de GK-1 y el anticuerpo Anti-PD-L1 (PD-L1; ligando 1 de muerte programada) aumentó la sobrevida en 47.82 % en comparación con los ratones sin tratamiento, y superior a la obtenida con tratamientos no combinados (22).

En el modelo de cáncer de mama murino inducido por la implantación subcutánea de la línea celular 4T1 en ratones BALB/c hembras, 50µg de GK-1 a la semana aumentó la supervivencia en un 23.8% en comparación con el grupo control; el tratamiento con 10µg o 100µg no provocó diferencia significativa en la supervivencia observada con la dosis de 50µg (17).

Por otra parte, GK-1 aumenta significativamente IFN-γ en sangre, IL-12p70 en tumor primario y pulmones, y disminuye significativamente IL-17, IL-4, IL-22, IL-23 e IL12p40 en sangre y pulmones. Estos resultados sugieren que GK-1 podría estar promoviendo una respuesta inmune Th1 y disminuyendo células T reguladoras (17,22,23).

1.9. Aptámeros

La palabra aptámero deriva del latín *aptus* que significa para encajar/adaptarse. Son ácidos nucleicos de cadena sencilla (ssDNA y RNA) de longitud corta (15-30 bases) que *in vivo*, dependiendo de su secuencia y de las condiciones en las que se encuentran, adoptan estructuras tridimensionales definidas, lo que les permite unirse de manera estable y muy específica a sus dianas, similar a la de un anticuerpo contra un epítipo. De ahí su descripción como "anticuerpos químicos" (24,25).

Tanto los anticuerpos como los aptámeros se han descrito con afinidades de unión en el rango bajo de nanomolar a picomolar (24). Sin embargo, algunas propiedades de los aptámeros los hacen terapéuticos atractivos en comparación con los anticuerpos (24). Entre estos destacan su estabilidad (pueden calentarse a 80°C o almacenarse en varios solventes y ambientes hostiles y vuelven a su conformación original) que proporciona una larga vida útil. En segundo lugar, los aptámeros parecen carecer de inmunogenicidad, mientras que los

anticuerpos son altamente inmunogénicos, lo que impide su administración repetida a menos que se "humanicen" o se produzcan completamente humanos (24).

Los aptámeros son oligonucleótidos ricos en guanina que se unen de manera específica a proteínas y a otras moléculas. Su actividad biológica está asociada a las estructuras tridimensionales que adquieren debido a los cuádruplex de guanina (26).

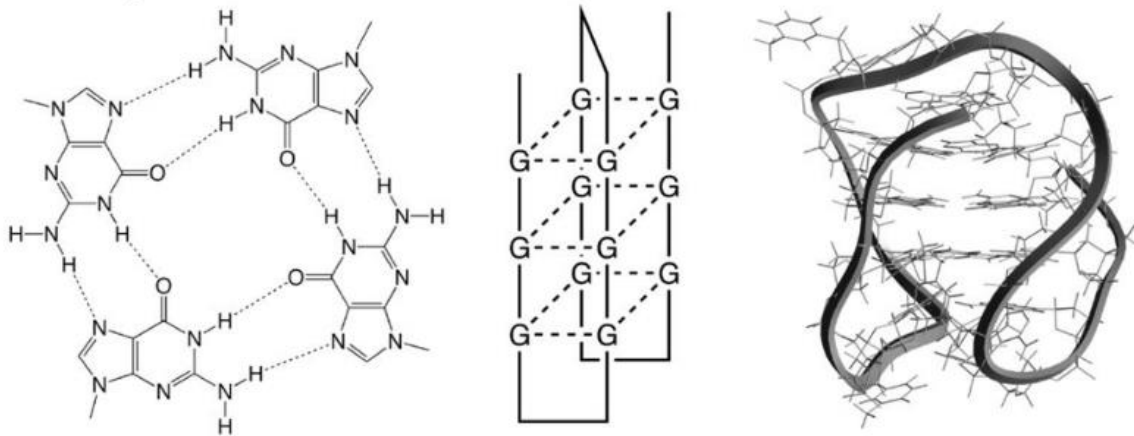


Figura 4 Conformación del cuádruplex de guanina. Esta figura muestra los arreglos de enlaces de hidrógeno para un cuarteto G (izquierda), así como el modelo esquemático (al centro) y el modelo molecular (derecha) para DNA cuádruple. El cuádruplex mostrado es una posible conformación de la secuencia de telómeros humanos (código de acceso PDB 143d) Tomado de Bates P, et al, 2009 (26).

A diferencia de las cadenas de oligonucleótidos que tienen vida media corta (minutos), los aptámeros son menos susceptibles a la degradación por exonucleasas y requieren pocas modificaciones para ser menos susceptibles a degradación (26).

Una cadena de oligonucleótidos que forma cuádruplex sin modificación tiene un promedio de vida media de 5 h, mientras que una cadena de oligonucleótidos que no forma cuádruplex tiene un tiempo de vida media de 3 min. Los aptámeros pueden ser modificados en los enlaces fosfodiéster (PO) realizando enlaces fosforotioatos (PS) y cambiando el O⁻ por S⁻. Esto aumenta su vida media hasta 4 días, dependiendo del aptámero (26).

Por otra parte, la internalización de los aptámeros a las células es muy eficiente. La línea celular HeLa de carcinoma cervical son capaces de concentrar de 8 a 10 veces un aptámero cuádruplex con respecto al presente en el medio. mayor que la del medio. (26).

Los efectos biológicos que se han reportado para los aptámeros incluyen la inhibición de la proliferación celular, la inducción de la muerte celular, los cambios en la adhesión celular, la inhibición de la agregación de proteínas y la actividad antiviral. De hecho, ciertos tipos de células, incluidas las células cancerosas y algunas células inmunitarias, internalizan preferentemente oligonucleótidos que forman G-cuádruplex, en comparación con las secuencias no estructuradas. Sin embargo, el mecanismo de su internalización sigue sin estar claro. La captación parece depender de la concentración de oligonucleótidos y el tipo de célula, y la mayoría de los investigadores creen que la endocitosis mediada por receptores es el mecanismo predominante (26).

Los efectos biológicos que se han reportado para los aptámeros incluyen la inhibición de la proliferación celular, la inducción de la muerte celular, los cambios en la adhesión celular, la inhibición de la agregación de proteínas y la actividad antiviral (28).

En la figura 5 se muestran las estrategias principales de la terapéutica basada en aptámeros en el ámbito oncológico. Básicamente,

actúan como antagonistas o bloqueadores de las interacciones proteína-proteína o receptor-ligando (Morita et al., 2018). En consecuencia, los aptámeros han sido utilizados como antagonistas contra las oncoproteínas o sus ligandos (27).

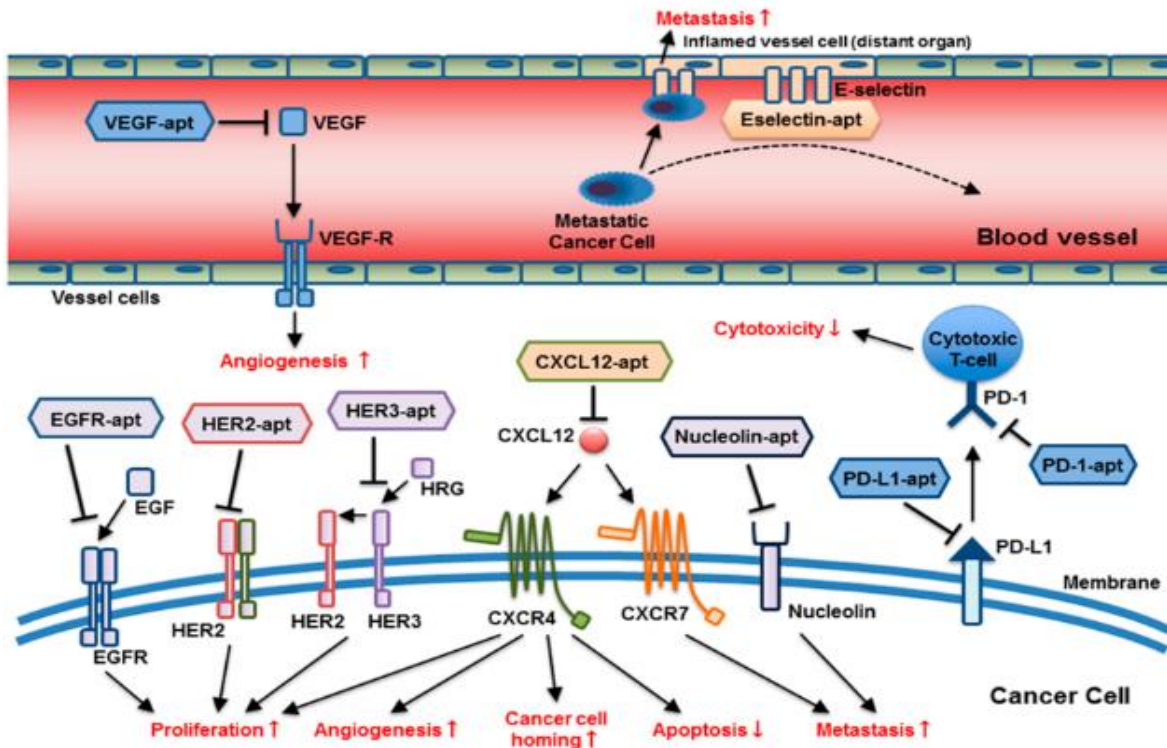


Figura 5. Objetivos moleculares y selección de los aptámeros anticancerígenos. Los aptámeros afectarían múltiples vías moleculares involucradas en la progresión tumoral y las metástasis: proliferación de células cancerosas, supresión de apoptosis, metástasis, deterioro de la citotoxicidad de células T y angiogénesis en diferentes lugares. (apt = aptámero) Tomado de Morita Y et al, 2018 (27).

1.10. AS1411

El aptámero más estudiado y el primero en ser usado en humanos es AS1411, anteriormente conocido como AGRO100. AS1411 es un aptámero de DNA rico en guanina. Una concentración de 10µmol/L de este aptámero puede inhibir en un 50% (IC₅₀) el crecimiento de una línea celular de leucemia después de 7 días de exposición, y un tiempo

de vida media (tiempo en el que el 50% del fármaco es eliminado del cuerpo) de 2 días (25).

La toxicología de AS1411 ha sido evaluada en ratas (100mg/kg) y en perros utilizando un régimen de infusión intravenosa (i.v.) continua de 96 h a dosis hasta 10mg/kg/día (25). De acuerdo con la evaluación anatomopatológica y al examen general de tejidos, este aptámero no tiene toxicidad significativa (25).

AS1411 ha sido probado en más de 80 líneas celulares tumorales humanas, demostrando actividad antiproliferativa en casi todas. Por lo tanto, parece tener un amplio potencial terapéutico. Los valores típicos de GI₅₀ (la concentración requerida para una inhibición del crecimiento del 50%) están en el rango micromolar bajo para las líneas cancerosas con una ventana terapéutica significativa.(26)

Otro aspecto intrigante de la actividad de AS1411 es la evolución temporal de sus efectos sobre las células cancerosas. A diferencia de la mayoría de los agentes de quimioterapia, AS1411 no causa citotoxicidad rápida cuando se agrega a las células. En cambio, la citostasis ocurre como resultado de la inhibición de la división celular, y la inducción de la muerte celular ocurre solo después de una exposición prolongada a AS1411 de 2 a 4 días, dependiendo de la línea celular (26).

Los datos de prueba de concepto para la eficacia *in vivo* de AS1411 se generaron utilizando ratones desnudos con xenoinjertos subcutáneos derivados de células DU145 de cáncer de próstata refractario a hormonas humanas. En estos experimentos piloto, el tratamiento de ratones con tumores establecidos ~ 100 mm³ mediante inyección intraperitoneal de AS1411 en dosis equivalentes a aproximadamente 5 mg / kg / día, durante los primeros tres días y luego cada dos días durante tres tratamientos adicionales condujo a una

reducción significativa en el crecimiento del tumor, mientras que un oligonucleótido de control no tuvo ningún efecto (26).

En cuanto a su mecanismo de acción, los primeros estudios revelaron que la actividad antiproliferativa se debe a que la formación de cuádruplex rico en guanina de AS1411 se une a nucleolina (NCL), una proteína celular específica detectable tanto en extractos nucleares como citoplasmáticos y, en particular, en la membrana plasmática de células tumorales (28).

Nucleolina es una proteína multifuncional que se expresa altamente en células cancerígenas tanto intracelular como en la superficie celular (26). La NCL se encuentra de manera ubicua en las células y es la principal proteína asociada a la cromatina intranucleolar y a partículas pre-ribosómicas en células eucariotas en crecimiento (28). Induce la descondensación de cromatina al unirse a la histona H1 y se cree que juega un papel en la transcripción del pre-rRNA y en el ensamblaje de ribosomas, además de que puede desempeñar un papel en el proceso de elongación transcripcional. Conjuntamente, la NCL está involucrada en la nucleogénesis, la actividad DNA/RNA helicasa, entre otras funciones (Figura 5) (29).

La expresión de la NCL está relacionada con el incremento de la división celular y se ha observado que se expresa en mayores concentraciones en células tumorales. Se sabía muy poco sobre el papel específico de esta proteína en el cáncer. Está bien establecido que los altos niveles de nucleolina nucleolar indican una alta tasa de proliferación celular y un mal pronóstico clínico. Aunque la NCL es una proteína predominantemente nucleolar, se reconoció que podía desplazarse entre el núcleo y el citoplasma en condiciones normales, y que también está presente en niveles elevados en las membranas

plasmáticas de las células cancerosas. La presencia de NCL en la membrana plasmática fue controvertida inicialmente, ya que la proteína no contiene dominio transmembranal y se transporta a la superficie a través de un mecanismo no clásico, pero ahora hay numerosos estudios que proporcionan pruebas convincentes adicionales de la presencia de NCL en la superficie celular (28).

La NCL de la superficie celular se expresa selectivamente en las células cancerosas en comparación con las células normales, y media la unión y la captación de AS1411 en las células cancerosas. La mayoría de las células normales contienen poca o ninguna nucleolina de superficie y no podrían unirse o internalizar AS1411, lo que explica sus efectos selectivos de tumores (26).

Además, su participación en la mediación de una amplia gama de vías, incluida la endocitosis, la adhesión celular, la transducción de señales y como receptor de varios patógenos, ya ha sido establecida (26).

Se sabe que la nucleolina se expresaba a niveles elevados en la superficie de las células cancerosas y las células endoteliales angiogénicas asociadas a tumores, además la nucleolina de la superficie celular funciona como un receptor que media los efectos antiangiogénicos y antitumorales de la endostatina, un inhibidor endógeno de la angiogénesis, en un modelo de ratón de melanoma (26).

La sobreexpresión de nucleolina en general puede desempeñar un papel directo en el proceso de transformación y progresión maligna (26).

Para que favorezca la proliferación celular la NCL debe encontrarse fosforilada en la superficie celular; se conoce que un

inductor de la fosforilación de la NCL puede ser VEGF (30). Esta forma de la NCL también funciona como una proteína de unión para varios ligandos, desde factores de crecimiento hasta microorganismos y partículas virales (29). Existen reportes que relacionan ligandos (virus, citocinas, nanopartículas de DNA) de la NCL de superficie con la diferenciación, proliferación celular, migración leucocitaria, inflamación y angiogénesis (29,31).

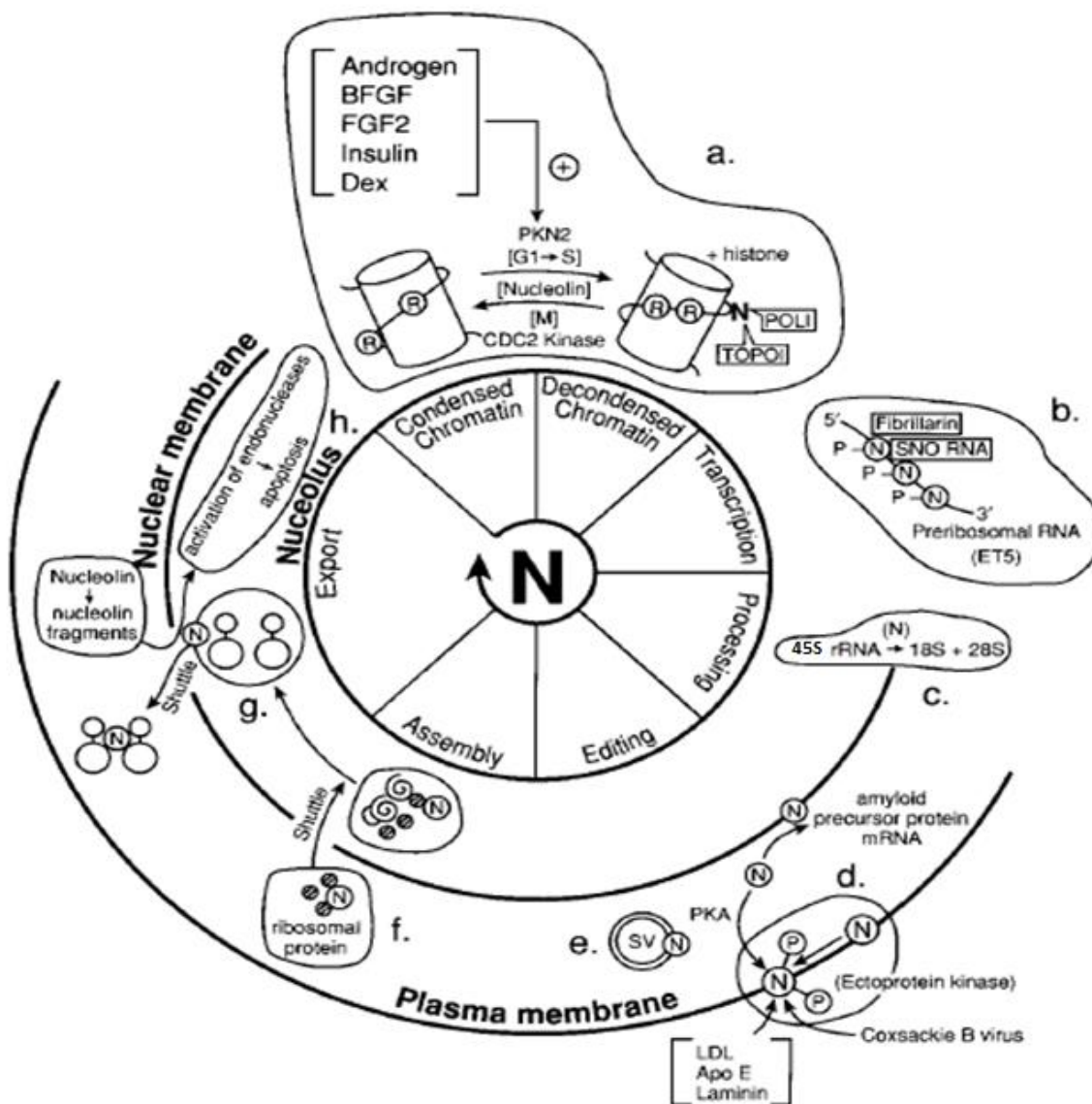


Figura 6. Control del ciclo celular por NCL y la biogénesis ribosómica.

a.) Condensación y descondensación de cromatina. NCL descondensa la cromatina reemplazando las histonas. Los andrógenos, el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), el FGF-2, la dexametasona y la insulina regulan la expresión y el estado de fosforilación de la NCL mediado por la proteína quinasa NII (PKN2), lo que aumenta la transcripción de rDNA (DNA ribosomal) por RNA polimerasa 1 de la fase G1 a S del ciclo celular. Durante la mitosis, la NCL es fosforilada por cdc2 quinasa y condensa la cromatina.

b.) NCL y pre-ARN. NCL se une al extremo 5' de la región espaciadora externa para la transcripción de pre-ARN y participa en el procesamiento de pre-RNA junto con fibrilarina y snoRNA (small nucleolar RNA).

c.) Maduración de 45S RNA La participación de NCL durante el proceso de maduración del RNA 45S, que se escinde rápidamente para producir el 18S maduro, se muestran las especies 28S y 5.8S de rRNA durante la transcripción de rDNA por la RNA polimerasa I.

d.) Funciones de la superficie celular. NCL se expresa en la superficie celular y se une al virus LDL, apoE, laminina y Coxsackie B, y se fosforila por ectoproteína quinasa específica de la superficie celular.

e.) Expresión de vesículas secretoras. NCL se expresa en pequeñas vesículas secretoras.

f.) Actividades de traslado. NCL actúa como una proteína lanzadera de la proteína ribosómica, desde el citoplasma al núcleo durante el ensamblaje de ribosomas.

g.) Actividades de exportación. NCL podría estar involucrada en la exportación del núcleo al citoplasma de las unidades ribosomales ensambladas

h.) Muerte celular y apoptosis. NCL está involucrada en el proceso de muerte celular. NCL es fragmentada por granzima A; los fragmentos activan las endonucleasas autolíticas que escinden el ADN para causar apoptosis.

Tomado y modificado de Srivastava M et al,1999 (29).

Se han reconocido varios mecanismos de acción del aptámero AS1411. Uno de ellos está relacionado con el secuestro de la proteína NEMO (también llamada IKK), cuya función es esencial en la vía de señalización canónica del NF- κ B (Figura 7), estrechamente relacionada con la quimiorresistencia de las células cancerosas. Otros tipos de aptámeros G-ricos también pueden inhibir esta vía (26)

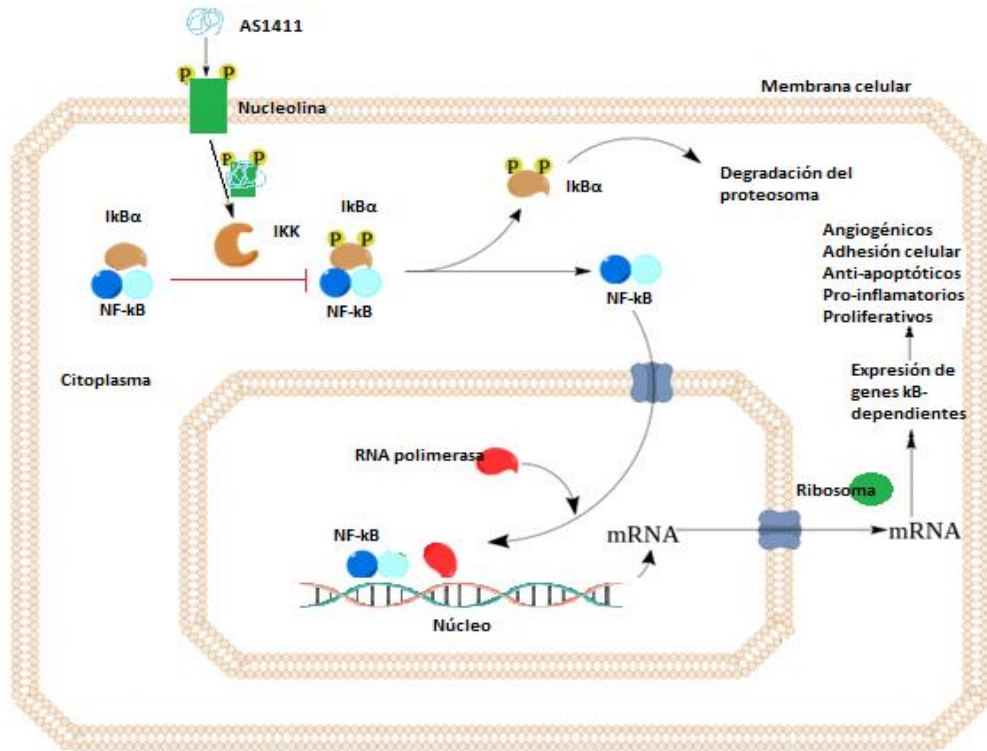


Figura 7 Posible mecanismo de acción del aptámero AS1411. Inicialmente AS1411 se une a la NCL fosforilada expresada en la membrana celular. El complejo AS1411/NCL es internalizado al citoplasma y une con el complejo IKK o NEMO e inhibe la activación de NF-κB, lo que impide la expresión de genes dependientes de este factor de transcripción. Con ello, se bloquearían los efectos angiogénicos, antiapoptóticos, proinflamatorios, proliferativos y de adhesión celular promovidos por las células tumorales.

Otro posible mecanismo de acción de AS1411 unido a NCL después de ser trasladados al citoplasma está relacionado con su unión a arginina metiltransferasa 5 (PRMT5), proteína de localización nuclear y citoplásmicas que desempeña funciones críticas en numerosas vías reguladoras que subyacen al desarrollo, la progresión y la respuesta a la terapia del cáncer. PRMT5 se ha encontrado elevada en diferentes tipos de cáncer y su expresión correlaciona con un peor pronóstico para los pacientes. Bates y colaboradores observaron que el complejo formado por AS1411/NCL/PRMT5 induce la reexpresión de genes silenciados por

PRMT5 y de esa manera contribuye a los efectos antiproliferativos de AS1411 (26).

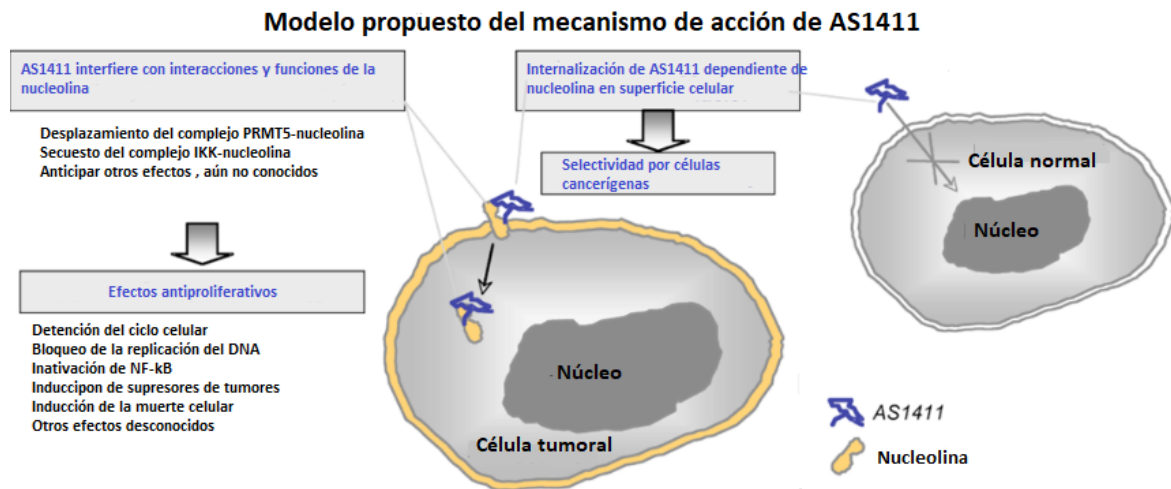


Figura 8 Modelo propuesto para el mecanismo de acción AS1411. La captación celular de AS1411 depende de la NCL altamente expresada en la superficie celular de las células cancerosas, lo que explicaría la captación y actividad preferenciales de AS1411 en estas células y no en las células normales. AS1411 causa efectos antiproliferativos pleiotrópicos porque interfiere con algunas de las funciones normales de la NCL, que juega un papel en muchas vías asociadas al cáncer. Algunos de los complejos de NCL que se ven afectados por AS1411 incluyen a los de RNAm de PRMT5 y IKK. Tomado y modificado de Bates P et al , 2009 (26)

El empleo del aptámero AS1411 se ha reportado en fase II para el tratamiento de cáncer renal(26,32).

JUSTIFICACIÓN

Los procedimientos clásicos para tratar el cáncer de pulmón como la quimioterapia y radioterapia tienen efectos adversos, pueden causar resistencia, además de ser costosos. Por ello, es primordial la búsqueda permanente de nuevos tratamientos debido al impacto que tiene el cáncer de pulmón en salud pública tanto a nivel mundial como nacional. Por esta razón, y por los antecedentes del efecto antitumoral de péptido GK-1 en modelos murinos de melanoma y cáncer de mama, así como los de la acción antiangiogénica y antiproliferativa del aptámero AS1411, se considera pertinente probar estas moléculas de bajo costo en un modelo murino de cáncer de pulmón.

2. HIPÓTESIS

El péptido GK-1 y el aptámero AS1411, como monoterapia o terapia combinada, tendrán un efecto antineoplásico en un modelo de carcinoma pulmonar en ratones C57BL/6 inducido por la línea celular tumoral LLC.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto antineoplásico de GK-1 y del aptámero AS1411 y la combinación de ambos tratamientos en el modelo de cáncer pulmonar en ratones C57BL/6 inducido por la línea celular Lewis Lung Carcinoma (LLC).

3.2. Objetivos particulares.

1. Establecer el número mínimo de células de la línea celular tumoral LLC para replicar el modelo de cáncer de pulmón por implantación heterotópica subcutánea en ratones C57BL/6.
2. Conocer la sobrevida de los ratones implantados subcutáneamente con diferente número de células de la línea celular tumoral LLC.
3. Demostrar la expresión de nucleolina en la línea celular tumoral LLC.
4. Replicar el modelo de cáncer pulmonar con el menor número de células de la línea celular tumoral LLC y con mayor sobrevida para evaluar la tasa de crecimiento tumoral en ratones C57BL/6.
5. Conocer los sitios de metástasis del cáncer pulmonar subcutáneo inducido por la línea celular tumoral LLC en ratones C57BL/6.
6. Evaluar la sobrevida de ratones con cáncer pulmonar subcutáneo inducido por la línea celular LLC y tratados con GK-1, AS1411 y la combinación de ambos, así como en los controles.
7. Evaluar la tasa de crecimiento tumoral de ratones con cáncer pulmonar subcutáneo inducido por línea celular LLC y tratados con

GK-1, AS1411 y la combinación de ambos, así como en los controles.

8. Evaluar el número y extensión de metástasis en ratones con cáncer pulmonar subcutáneo inducido por la línea celular LLC y tratados con GK-1, AS1411 y la combinación de ambos, así como en los controles.
9. Identificar la expresión de nucleolina en ratones con cáncer pulmonar subcutáneo inducido por la línea celular LLC y tratados con GK-1, AS1411 y la combinación de ambos, así como en los controles.

4. METODOLOGÍA

4.1. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular Lewis Lung Carcinoma (LLC) obtenida del ATCC. Inmediatamente a su llegada al laboratorio, las células fueron descongeladas y cultivadas en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con suero fetal bovino al 10% previamente inactivado a 56°C por media hora y penicilina y estreptomicina al 1%. Las células se mantuvieron en una estufa con CO₂ al 5%, con humedad relativa del 95% y a 37°C. Después de tres pases las células en cultivo fueron cosechadas por tripsinización (Tripsina 0.02% + EDTA en PBS), durante 3 min en una estufa con CO₂ al 5%, una humedad relativa del 95% y a 37°C; luego fueron lavadas 3 veces con DMEM frío libre de suero. Se realizó un conteo en un cámara de Neubauer con tinción vital con azul de tripán. Para el conteo después de los lavados, las células se resuspendieron en solución salina estéril y se hizo una dilución 1:20 en azul de tripán, es decir, 1 µL de la suspensión celular y 19 µL de azul de tripán. Después, dicha dilución fue colocada en una cámara de Neubauer para contabilizar las células en 4 cuadrantes de la cámara (anexo figura 28). Se calculó la cantidad de células con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Células contadas}}{4} \times 10000 \text{ (Factor de la cámara de Neubauer)} \times$$

Factor de dilución x Volumen total (µL) = Número de células. El volumen total se refiere al volumen en el que se encuentran las células suspendidas y con un factor de conversión se calculó el volumen necesario para hacer la alícuotas dependiendo de la concentración necesaria para implantar y el volumen se completa con solución salina estéril para finalmente realizar su implantación subcutánea a nivel de la región caudal del dorso de los ratones.

Ejemplo

Para el grupo de 7.5×10^4 necesitamos una concentración de 7.5×10^4 células/0.1mL es decir 7.5×10^5 células/mL suponiendo que se tenían 7.5×10^6 células/mL del recuento de células:

$C_1V_1 = C_2V_2$, sustituyendo:

$$(7.5 \times 10^6 \text{ células/mL})(V_1) = (7.5 \times 10^5 \text{ células/mL})(1\text{mL})$$

Despejando

$$V_1 = \frac{(7.5 \times 10^5 \text{ células/mL})(1\text{mL})}{7.5 \times 10^6 \text{ células/mL}} = 0.01\text{mL} = 10\mu\text{L}$$
 y se agregan 990 μL de solución

salina para tener un volumen final de 1mL y con ese volumen se podían administrar 10 ratones.

4.2. Inmunofluorescencia indirecta

Antinucleolina

Una suspensión de 2.5×10^4 células LLC/50 μL de solución salina fue distribuida sobre portaobjetos electrocargados e incubada durante 30 min a 35°C , en cámara húmeda, para permitir la adherencia de las células al vidrio. Posteriormente, las células adheridas fueron lavadas con Tris-HCl, 2 veces durante 5 min, y luego fueron fijadas con paraformaldehído al 0.1% en solución salina durante 10 min a 4°C . Después de lavarse como se mencionó, se realizó un bloqueo de proteínas inespecíficas con leche deslactosada al 4% diluida en Tris-HCl con Tritón X-100 al 0.01% durante una 1h a 37°C . Nuevamente fueron lavadas las células en Tris-HCl y luego fueron incubadas durante 1h a 37°C con un anticuerpo policlonal hecho en conejo antiNCL de ratón (Abcam) diluido 1:250 en Tris-HCl /Albúmina Sérica Bovina (ABS) al 0.1%. Después de realizar 3 lavados de 2 min con Tris-HCl, las células fueron incubadas durante 1h a 37°C , en cámara oscura y en oscuridad, con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo hecho en cabra y

acoplado a FITC, diluido 1:100 en Tris-HCl /ASB al 0.1% y Tritón X-100 0.001%. Después de ser lavadas 3 veces por inmersión en Tris-HCl, las células fueron montadas con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para su observación con el microscopio confocal Zeiss LSM 880.

AntiVEGF

Algunas preparaciones de células adheridas fueron procesadas como se describió para realizar la inmunofluorescencia antinucleolina, con algunas variaciones. La solución de bloqueo de proteínas inespecíficas fue adicionada con suero normal de ratón al 10%, el anticuerpo primario fue un anticuerpo monoclonal hecho en ratón anti-VEGF AFL4 (Thermo Fisher Scientific) diluido 1:100 Tris-HCl /ASB al 0.1% y el anticuerpo secundario fue anti-IgG de ratón hecho en cabra acoplado a FITC, diluido 1:250 en Tris-HCl /Albúmina Sérica Bovina (ASB) al 0.1% y Tritón X-100 0.001% Después ser lavadas 3 veces por inmersión en Tris-HCl, las células fueron montadas con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para su observación con el microscopio confocal Zeiss LSM 880.

4.3. Inmunoblot

Las células LLC fueron cosechadas e incubadas con el anticuerpo policlonal de conejo antiNCL (Abcam), sin fijarse ni permeabilizarse, durante 15 min a 4°C; posteriormente las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 5 min. Después de ser lavadas en PBS, las células fueron incubadas durante 15 min con anticuerpo anti-IgG de conejo-AlexaFluor 488 (LLC) y nuevamente fueron lavadas de la misma manera para contrateñir los núcleos con VectaShield-DAPI. Se montaron y se observaron con el microscopio ApoTome II (Carl Zeiss, Jena Germany). A partir de sangre periférica fueron obtenidas células mononucleares (como controles) por centrifugación de sangre periférica

en Ficoll-Hypaque® Plus, siguiendo instructivo de la marca Eppendorf; luego fueron estimuladas con 10 µg/ml del mitógeno PHA (Phytohemmaglutinin) durante 48 h, para inducir la expresión de NCL en superficie. Posteriormente, fueron procesados de la misma manera que las LLC para identificar la expresión de NCL de superficie.

Para realizar el inmunoblotting de NCL en las células LLC fueron lavadas tres veces con PBS frío y se añadió una solución recién preparada de un agente biotinizador impermeable a las células (sulfo-NHS-biotin, Pierce, Rockford, IL) (0,5 mg/ml en PBS). Después de 30 min de incubación a 4°C, las células se lavaron una vez con TBS helado (50 mM Tris-HCl, 150 mM de NaCl, pH 7,5), se incubaron con un medio completo frío, durante 10 min a 4°C, y luego se lavaron dos veces con TBS. Las células fueron sometidas al tampón de lisis y extracción RIPA para obtener las proteínas totales, las cuales fueron prefiltradas con proteína-A agarosa durante 3 h a 4°C con agitación suave; después, las proteínas biotinizadas se precipitaron incubando con avidina-agarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante la noche a 4°C con agitación suave, y luego se lavaron con el buffer de radioinmunoprecipitación (RIPA) helado. Las muestras se resolvieron mediante electroforesis de gel de poliacrilamida 10% SDS-Tris y luego se electrotransferieron a membrana de nitrocelulosa con grosor de 0,45 µm (BioRad, Hércules, CA) en el buffer de tris-glicina que contiene un 20% de metanol. Las proteínas se detectaron por inmunotransferencia de NCL, tubulina e histona.

4.4. Animales

Ratones isogénicos C57BL/6, machos de 8 a 12 semanas de edad, fueron tratados de acuerdo con las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio según la Norma

Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999 y los lineamientos establecidos por the United Kingdom Coordinating Committe on Cancer Research (UKCCCR) segunda edición (33).

Los ratones fueron donados por el bioterio de la unidad de medicina experimental, de la Facultad de Medicina, UNAM. Los animales fueron trasladados a las instalaciones del bioterio del departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM, donde se mantuvieron en cajas medianas de acrílico, con camas de viruta de madera, con 6 animales en cada una y con ciclo de luz invertido El agua, el enriquecimiento ambiental (conos de cartón, tubos de policloruro de vinilo, torceduras de papel tisú grueso) y el alimento a base de pellets de purina estuvieron disponibles ad libitum. Cada tres días la viruta de madera, el enriquecimiento ambiental, el agua y el alimento fueron renovados.

4.5. Estudio piloto del modelo murino de cáncer pulmonar heterotópico. Curva de sobrevivida, volumen tumoral e histopatología en ratones implantados con diferentes números de células LLC

Como experimento piloto, fueron conformados grupos experimentales compuestos por 6 ratones cada uno, para ser implantados subcutáneamente con las siguientes cantidades de células LLC: grupo 1: 7.5×10^4 células, grupo 2: 5×10^4 células, grupo 3: 2.5×10^4 células, grupo 4: 1×10^4 células y grupo 5: 5×10^3 células.

Durante todo el experimento, los ratones fueron observados para registrar signos clínicos como erizamiento del pelo, peso corporal, actividad motora y aislamiento. A partir que el tumor fue palpable se inició la medición del crecimiento tumoral y con esto con ayuda de la

fórmula *Volumen tumoral* (mm^3) = $\frac{\pi LW^2}{6}$ donde L es el lado más largo y W es el lado más corto (22), se calculó el volumen tumoral. Los tumores primarios y diferentes órganos con metástasis fueron procesados para el análisis histopatológico (ver 4.8, 4.9)

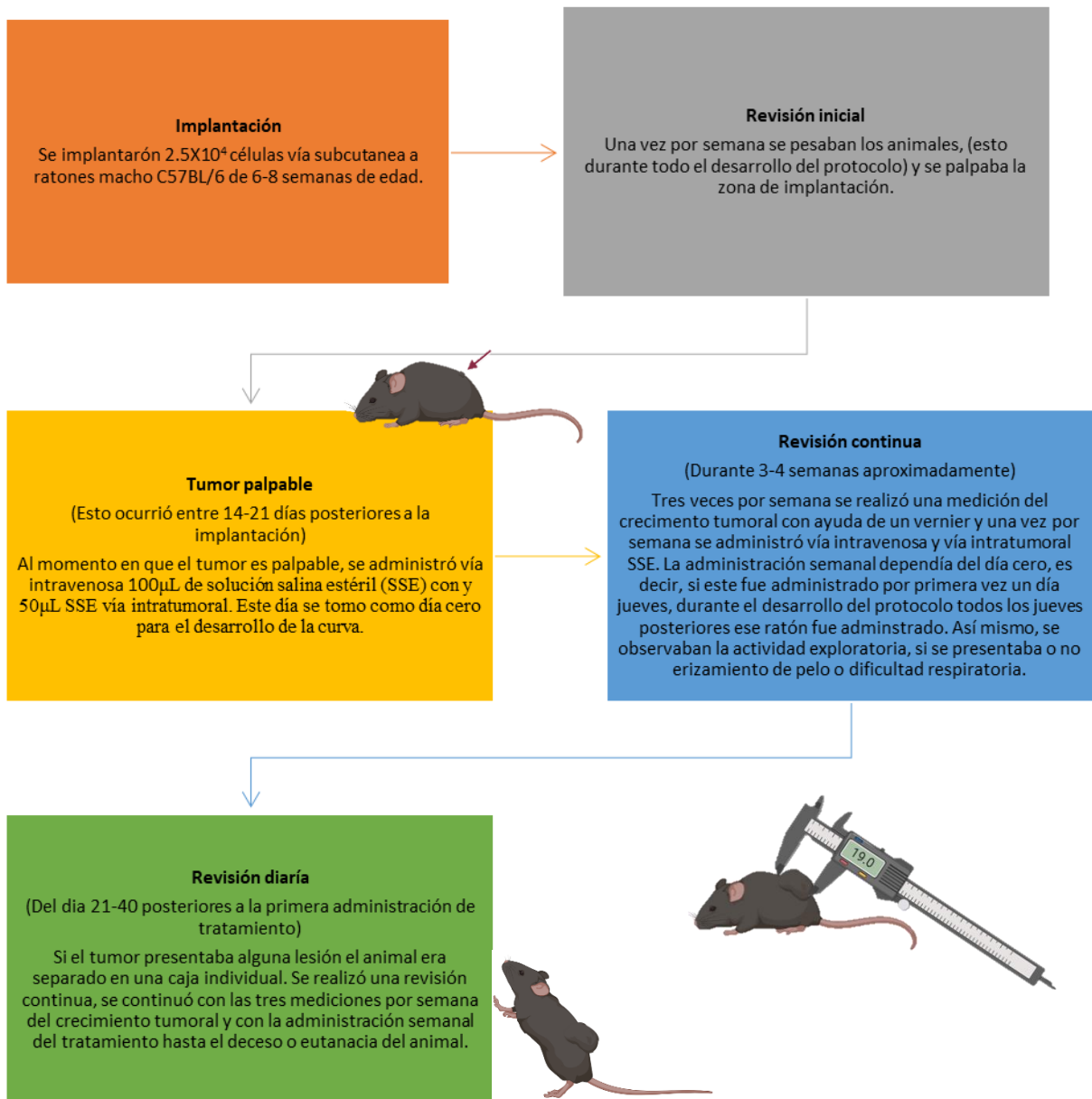
4.6. Modelo murino de carcinoma de pulmón

Con base a los resultados del experimento piloto, fueron formados 4 grupos experimentales compuestos por 7 ratones cada uno, implantados con 2.5×10^4 células LLC cada uno.

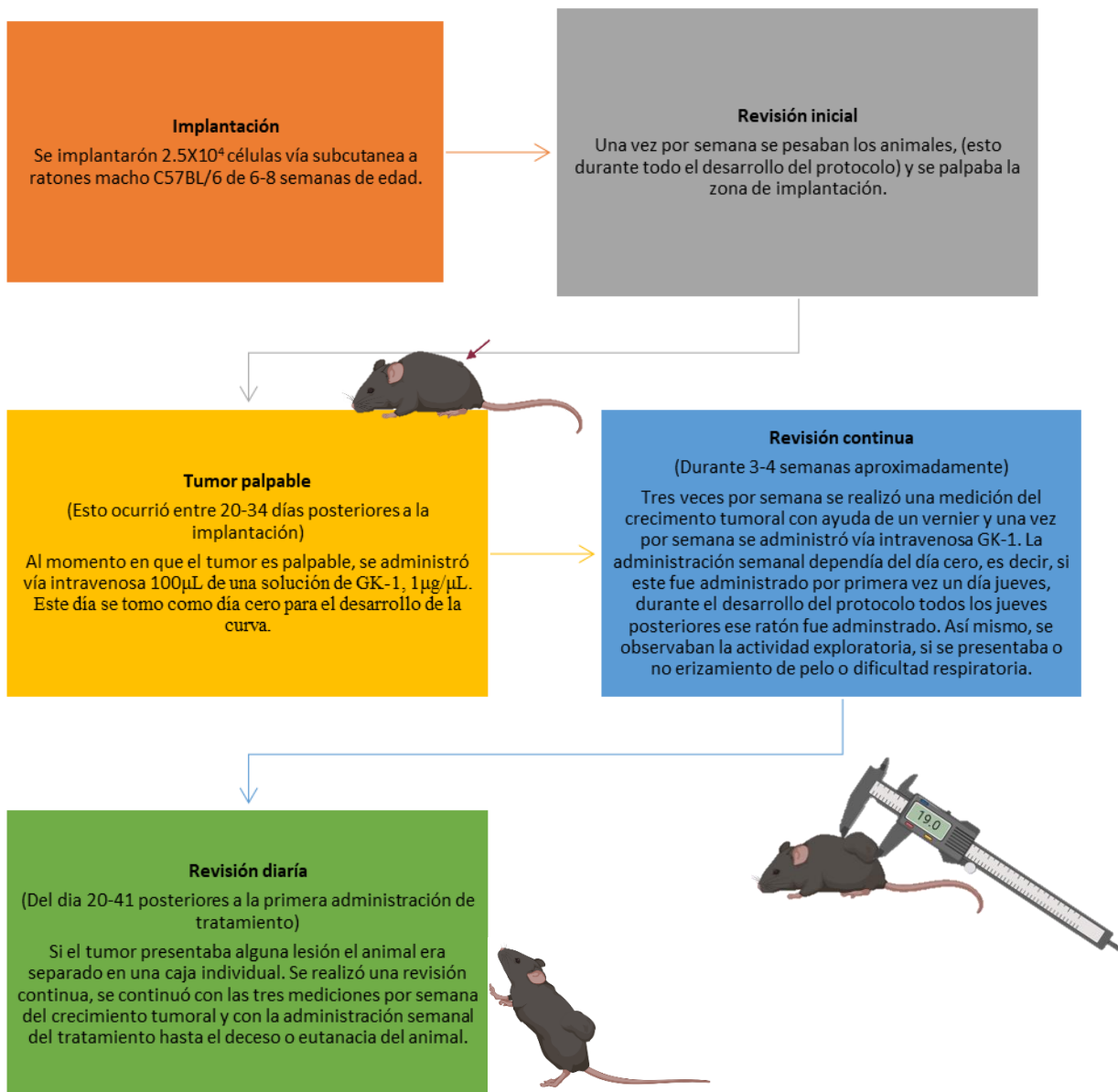
Aproximadamente 10-15 días post-implantación celular, se desarrollaron los tumores sólidos medibles (1mm x 1mm) y a partir de ese momento (día 0) inició el tratamiento con GK-1, con AS1411 o con la combinación de ambos. Al grupo 1 o control se le administró 100µL de solución salina estéril vía intravenosa una vez por semana y 50µL de solución salina estéril vía intratumoral ; al grupo 2 se le administró vía intravenosa 100 µL de una solución 1µg/µL de GK-1 una vez por semana; al grupo 3 se le administró una vez por semana vía intratumoral 20 µmol de AS1411 en 50µL de solución salina durante aproximadamente 1 mes; al grupo 4 se le administró vía intravenosa 100 µL de una solución 1µg/µL de GK-1 una vez por semana durante aproximadamente un mes y una vez por semana vía intratumoral 20µmol de AS1411 en 50µL de solución salina durante aproximadamente un mes.

Durante todo el experimento, los ratones fueron observados para registrar signos clínicos (crecimiento tumoral, erizamiento del pelo, peso corporal, actividad motora y aislamiento). Al inicio del estudio 3 veces por semana y en la etapa final diariamente.

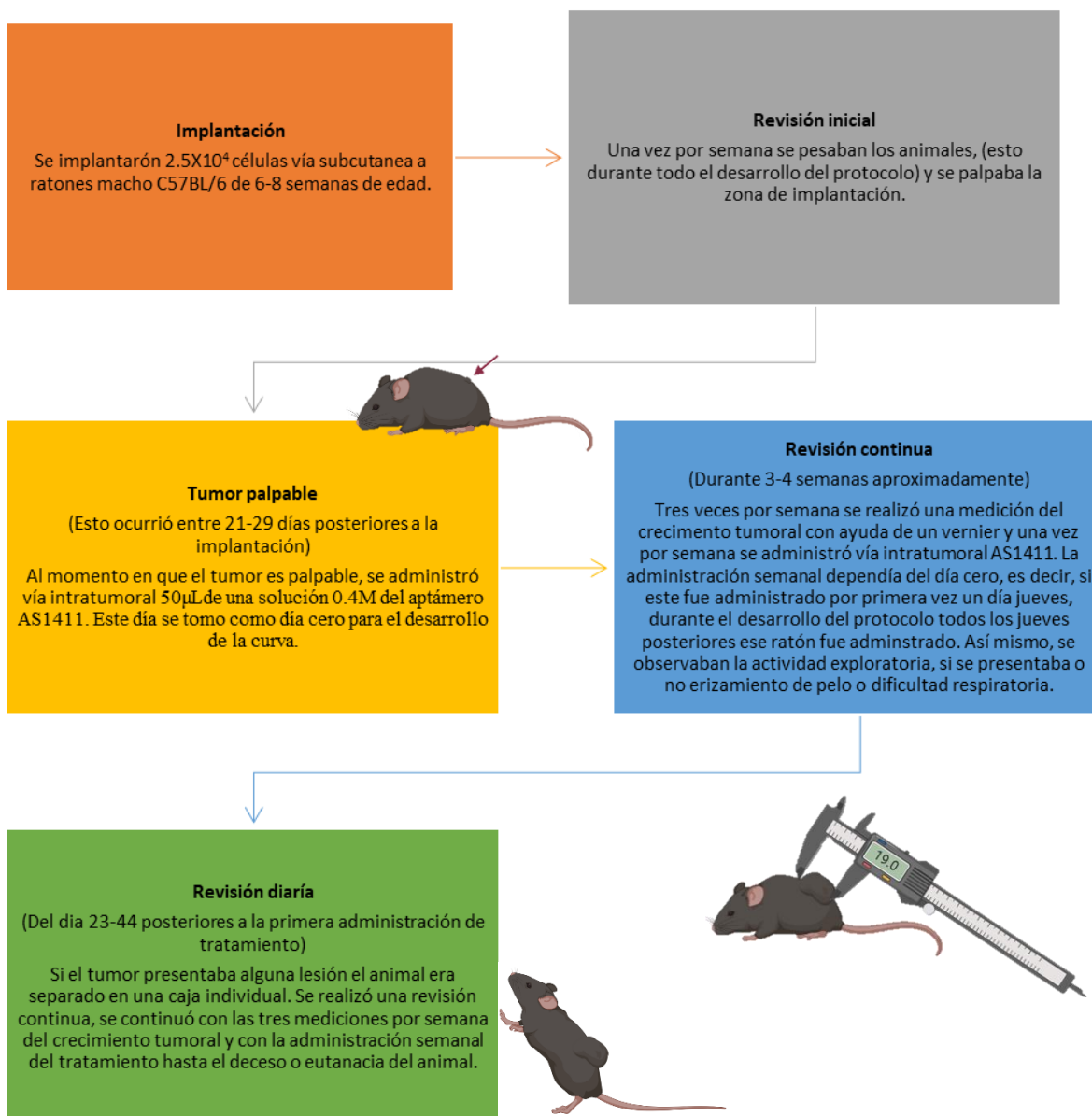
CONTROL



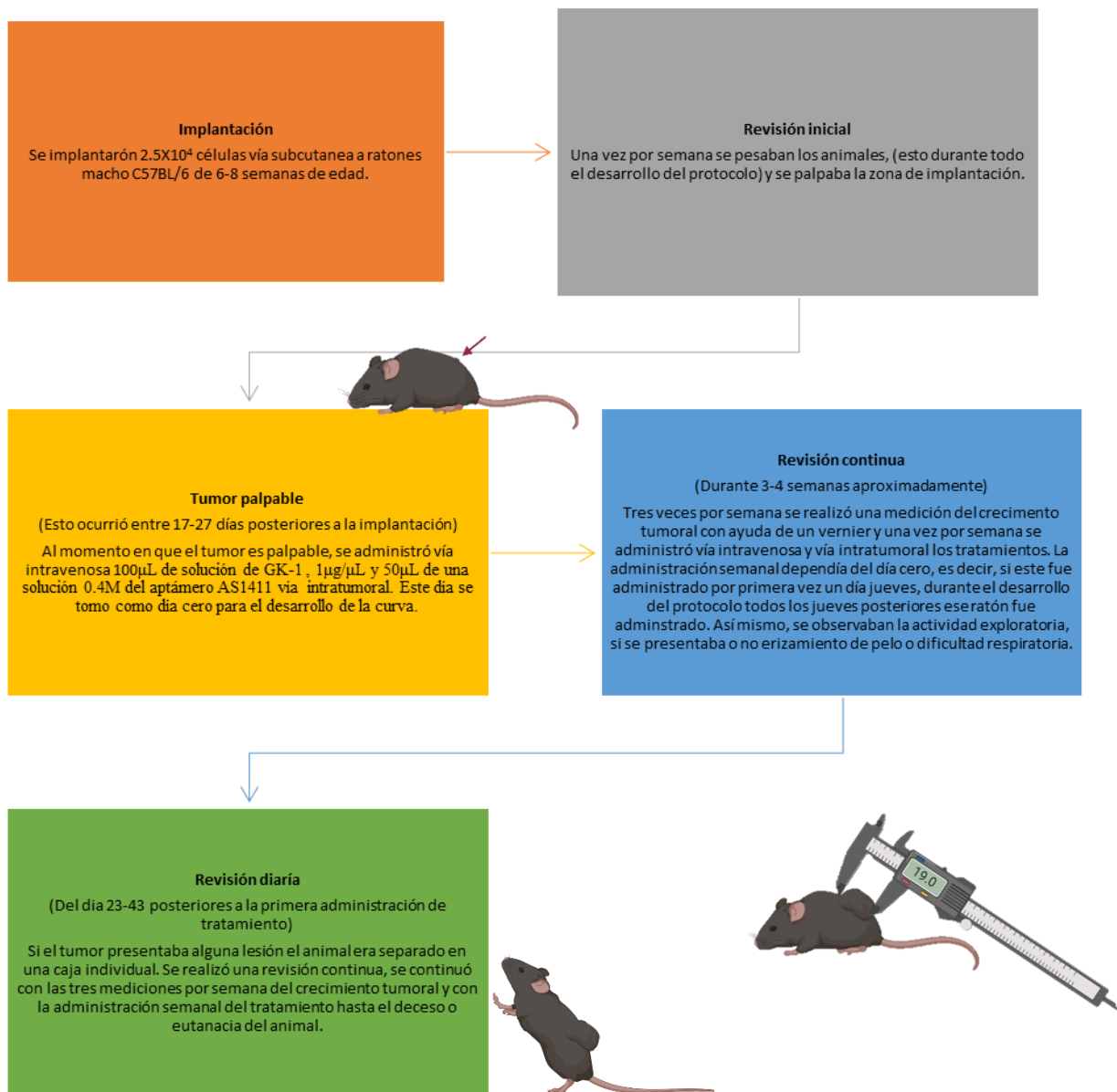
GK-1



AS1411



COMBINACIÓN



4.7. Eutanasia de ratones

La eutanasia de los ratones se llevó a cabo de acuerdo con la calidad de vida de cada animal, definida por la presencia de signos clínicos e identificando el estado letárgico o moribundo, o cuando no mostraron reactividad al manejo o a estímulos suaves, todo lo anterior de acuerdo

con los lineamientos establecidos por the United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) y los lineamientos de investigación con animales de la Universidad de Boston (33,34).

La eutanasia se realizó por sobredosis de isofluorano conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Una vez confirmado que no había signos vitales, se realizó una dislocación cervical para garantizar la muerte del animal e inmediatamente se realizó una necropsia, sujetando, al animal por los miembros en una base de caucho tamaño carta. Se utilizó un estuche de disección convencional para realizar toracotomía media y una laparotomía exploratoria, realizando la incisión en la línea media de la piel del cuello hasta el abdomen, que incluyó todos los planos, exponiéndose los órganos. Después de disecar la tráquea, los pulmones fueron perfundidos por esta vía con 350µL del fijador de Zamboni modificado utilizando una aguja para insulina y ligadura de la tráquea. El tumor primario y pulmones, corazón, hígado y bazo, así como otros sitios que tuvieran lesiones sugerentes de metástasis fueron extraídos para ser fijados por inmersión en el fijador de Zamboni modificado, durante 48 h a temperatura ambiente. Todas las muestras fueron procesadas para inclusión y corte en parafina para análisis histopatológico con tinción de hematoxilina & eosina e inmunohistoquímica enzimática para NCL.

4.8. Procesamiento de muestras

Los órganos y el tumor primario fueron lavados con agua y luego en etanol al 20% para eliminar el exceso de fijador. Posteriormente, se depositaron en un cassette de plástico con su respectiva identificación y colocados en un procesador de tejidos para deshidratarlos en diferentes grados de etanol, 70%, 80%, 96%, 1h en cada uno para los órganos; 3h en el caso de los tumores, esto por el grosor de la muestra del tumor, se realizaron dos cambios en etanol absoluto. El aclaramiento de

las muestras se realizó con dos cambios de xilol y la infiltración se hizo con dos cambios de parafina a 60°C, de una 1h cada uno. Finalmente, las muestras fueron incluidas en parafina para obtener cortes de 4 µm de grosor, colocados en portaobjetos convencionales para ser teñidos con hematoxilina-eosina y realizar el análisis histopatológico.

De las mismas muestras también fueron obtenidos cortes en blanco de 4 µm de grosor, colocados en portaobjetos electrocargados, destinados a la técnica de inmunohistoquímica para demostrar inmunorreactividad de NCL.

4.9. Tinción con hematoxilina y eosina

Los cortes fueron desparafinados dentro de una estufa a 56°C, durante 20 minutos, completado este paso por inmersión en xilol durante 10 minutos. Posteriormente, fueron rehidratados hasta agua corriente, siguiendo de manera reversa los procedimientos mencionados en 6.8. En seguida, los cortes fueron sumergidos en hematoxilina de Harris por 12 minutos, luego fueron lavados con agua corriente hasta eliminar el exceso de colorante, el cual fue diferenciado con alcohol ácido. Después de 4 cambios o lavados en agua corriente, los cortes fueron sumergidos 1 minuto en carbonato de litio y luego fueron lavados nuevamente para ser teñidos con eosina durante 4 minutos. Finalmente, este colorante fue lavado en 6 cambios de agua corriente, los cortes fueron deshidratados, aclarados y montados con resina sintética. Después de 24h a temperatura ambiente la resina polimerizó las preparaciones histológicas fueron observadas al microscopio Olympus BX50 equipado con una cámara digital lumenera 1 y con el software Infinity Analyze 6.3.0.

4.10. Histopatología

El análisis histopatológico del tumor primario, de los órganos muestreados y con metástasis potenciales incluyó el diagnóstico del tipo de cáncer inducido por la implantación de la línea celular tumoral LLC, la identificación del desarrollo de angiogénesis, la presencia de necrosis y apoptosis, del tipo de infiltrado inflamatorio y la identificación de las metástasis observadas, cuya área ocupada fue medida y expresadas en μm^2 . Las preparaciones histológicas fueron analizadas con un microscopio Olympus BX50 equipado con una cámara digital lumenera 1 y con el software Infinity Analyze 6.3.0.

4.11. Inmunohistoquímica

Los cortes en blanco fueron procesados como se mencionó en 6.9. Una vez rehidratados, los cortes fueron sumergidos en un vaso de Coplin con buffer de citrato de sodio pH 7.4, para hacer la reactivación antigénica dentro de una olla de presión eléctrica calentada a 120°C. Después de 24 min, la presión fue liberada, fue extraído el vaso de Coplin y después de llegar a la TA los cortes fueron lavados con Tris-HCl (0.05M, pH 7.6) durante 5 min. El bloqueo de la peroxidasa endógena se obtuvo sumergiendo los cortes en una solución de 5mL de H_2O_2 al 30% en 20mL de agua destilada durante 20 min a temperatura ambiente. Después de lavarlos con agua destilada durante un min, los cortes fueron tratados con leche en polvo deslactosada al 4% diluida en Tris-HCl con Tritón X-100 al 0.01% a 37°C durante 1h para el bloqueo de proteínas inespecíficas. Inmediatamente después, se escurrió la solución de bloqueo y sin lavado previo, los cortes fueron incubados durante 1 hora a 37°C con un anticuerpo policlonal anti-NCL (IgG de conejo) diluido 1:250 en Tris-HCl /ASB al 0.1%. Luego de tres lavados con Tris-HCl los cortes fueron cubiertos con un anticuerpo secundario (Goat anti-

rabbit IgG) acoplado a peroxidasa de raíz fuerte, diluido 1:100 en Tris-HCl con ASB al 0.1% y Tritón X-100 al 0.01%, durante 1 hora a 37°C. Luego de 5 lavados con Tris-HCl, el revelado de la unión del anticuerpo secundario se realizó con la mezcla de 5mg de 3,3-Diaminobenzidina (Sigma) en 10 mL de Tris-HCl con 3 gotas de H₂O₂ al 3% (3 gota de H₂O₂ puro en 7 gotas de AD), aplicada sobre los cortes durante 3 min, a TA. La reacción enzimática cromógena se detuvo con lavados en AD. Finalmente, se realizó la contratinción con Hematoxilina de Harris durante 15 s, se lavó con agua de la llave y las preparaciones se montaron con resina sintética. Para el análisis microscópico se empleó un microscopio Olympus BX50 equipado con una cámara digital lumenera 2.0.

4.12. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 8.0.1 y Excel 360 en todas las pruebas a excepción de la t de student para AUC (area under curve, por sus siglas en inglés, integral del área bajo la curva), se consideraron datos no pareados y no paramétricos, por lo que se realizaron pruebas Kruskal Wallis y pruebas post hoc U de Mann Whitney, con un $\alpha = 0.05$. Para medir el área de metástasis y el conteo de megacariocitos se utilizó la herramienta de medición de área del software Infinity Analyze 6.3.0. con el objetivo calibrado con una reglilla de 1mm. Se analizaron 10mm² (10 x 10⁶ μ m²) por muestra y el área de metástasis fue expresada en μ m² para el análisis se realizaron tres regresiones lineales múltiples con un $\alpha = 0.05$.

Para la búsqueda de correlación se utilizó Excel 360, se realizó una prueba de normalidad de datos Shapiro-Wilk con un alfa de significancia de 0.05 y posteriormente se realizó la correlación de Pearson por la normalidad de los datos.

5. RESULTADOS

Cultivo celular

Se requiere de una alta densidad (figura 9 lado derecho) para la cosecha celular y posterior implantación.

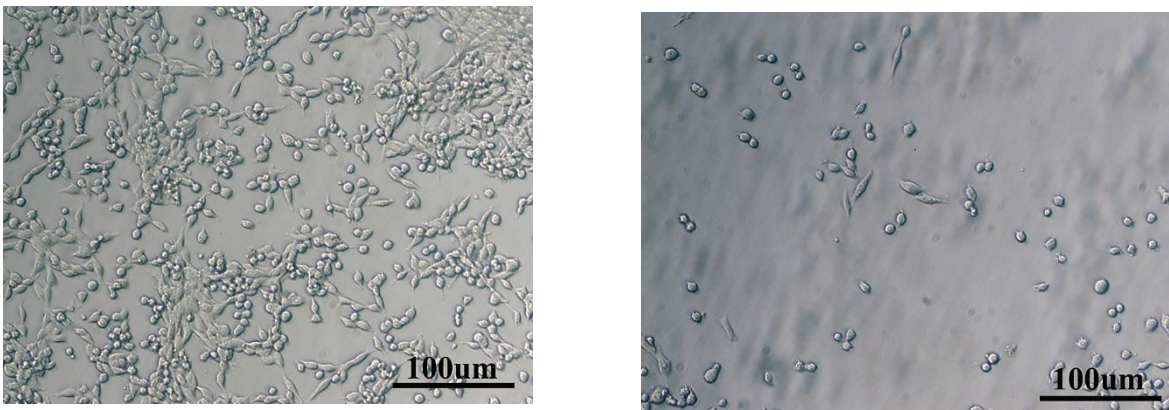


Figura 9. Cultivo celular Lewis Lung Carcinoma (LLC). Izquierda alta densidad, derecho baja densidad, pase 6 (después de subcultivar o resembrar 6 veces).

Inmunofluorescencia antiNCL

Se observó un marcaje intenso de anti-nucleolina, homogéneamente distribuido en la superficie de casi todas las células LLC (Figura 10B).

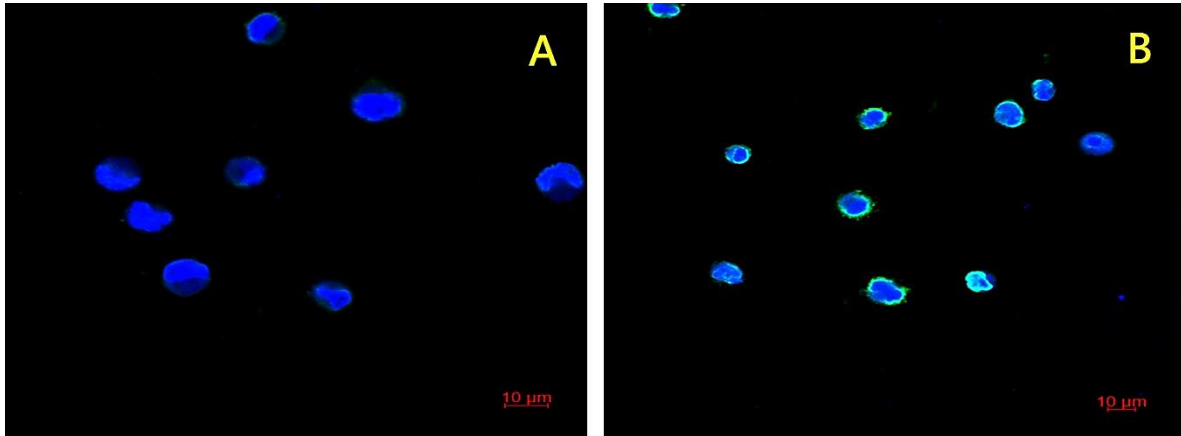


Figura 10. Inmunofluorescencia (IF) indirecta para NCL en células tumorales Lewis Lung Carcinoma (LLC). El control de la IF por omisión del anticuerpo primario es negativo (A). Empalme de anti-nucleolina (verde) y DAPI (tinción nuclear en azul).

Inmunofluorescencia antiNCL e inmunoblot

Inmunofluorescencia indirecta (aparte superior figura 11) se observó que NCL está expresada en la superficie de las células LLC y en células mononucleares de sangre periférica(control).

Con el inmunoblot (aparte inferior figura 11) se observó que la extracción de NCL ocurrió a partir del citoplasma y de membrana, mientras que tubulina e histona exclusivamente del citoplasma. se expresa en citoplasma.

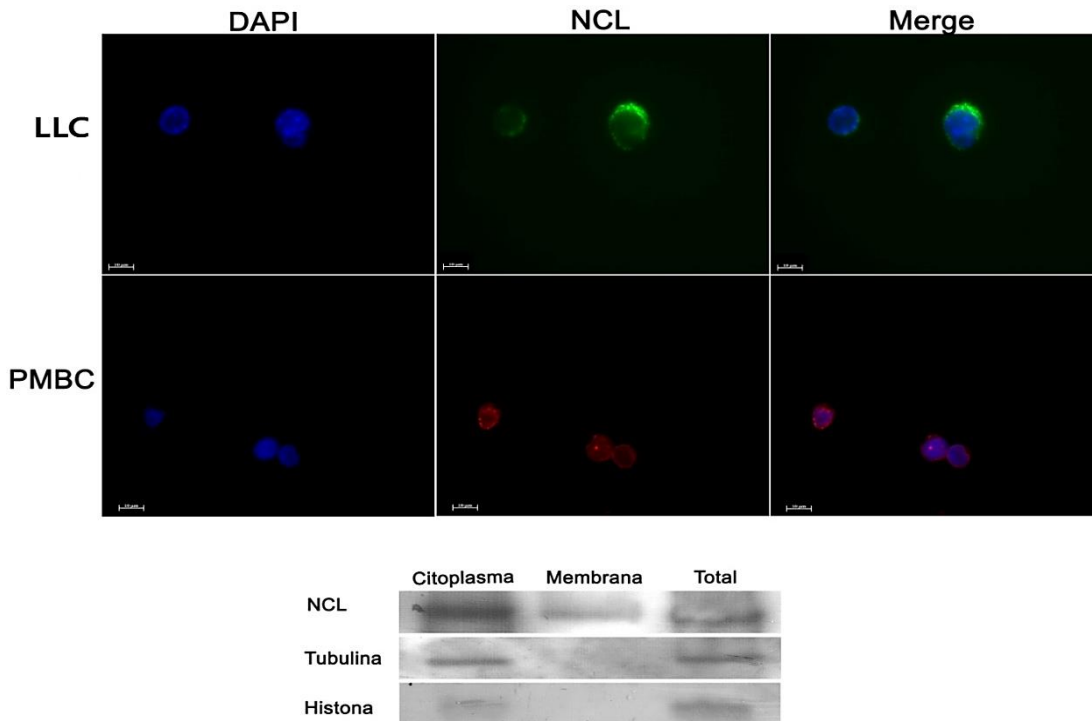


Figura 11. Inmunofluorescencia indirecta para nucleolina (NCL) en células tumorales Lewis Lung Carcinoma (LLC) y en células mononucleares de sangre periférica (PMBC) estimuladas con PTA como control positivo (panel superior).. En el panel inferior se muestra el inmunoblot para NCL, tubulina e histona en las células tumorales LLC.

Con la inmunofluorescencia y el inmunoblot se observó que la NCL se expresa en citoplasma y membrana celular de las células LLC.

Inmunofluorescencia antiVEGF

Se observó que la mayoría de las células LLC expresan débil y difuso el VEGF en la superficie (figura 12b); sin embargo, alrededor del 10% muestran un marcaje intenso difuso en membrana y formando cúmulos.

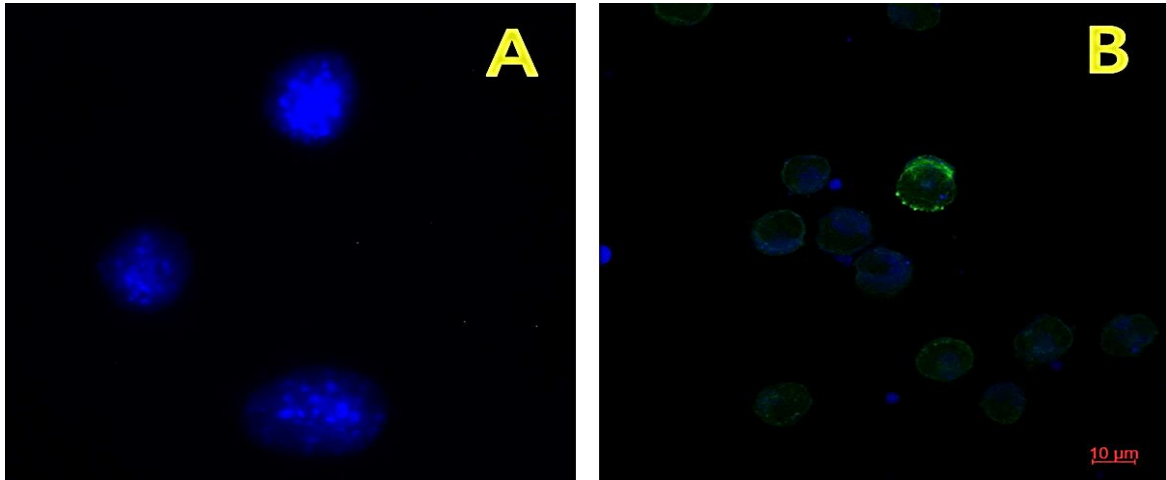
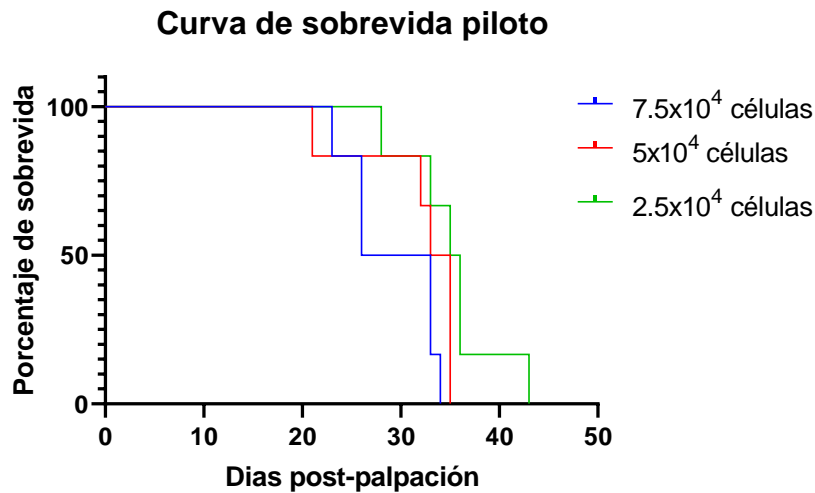


Figura 12. Inmunofluorescencia (IF) indirecta para VEGF en células tumorales Lewis Lung Carcinoma (LLC). El control de la IF por omisión del anticuerpo primario es negativo (A). Empalme de antiVEGF (verde) y DAPI (tinción nuclear en azul) (B).

Curva de sobrevida

Las curvas de sobrevida fueron definidas con los datos obtenidos de los grupos de 7.5×10^4 , 5×10^4 , 2.5×10^4 células implantadas ya que todos los animales desarrollaron un tumor primario (100% de éxito en la implantación de células tumorales). El día de inicio o bien día cero se consideró cuando el tumor fue palpable; con esto disminuía el error ante la posibilidad de regresión tumoral y aseguraba el uso de animales con implantación exitosa de células tumorales y del desarrollo de tumor. Ninguno de los grupos mostró regresión tumoral. Considerando al número total de animales implantados, en los 5 grupos de ratones ($n=30$), el éxito de desarrollo de un tumor fue del 67%. La mayor media de sobrevida fue observada en ratones implantados con 2.5×10^4 células LLC con 35.5 días (28-43 días), mientras que en los ratones implantados con 5×10^4 células LLC fue de 34 días (21-35 días) y con 7.5×10^4 células LLC fue de 29.5 días (23-34 días), los números entre paréntesis indican día del primer deceso y del último deceso.

Por lo anterior, estos dos grupos fueron descartados para el desarrollo de la curva de sobrevivencia y para la reproducción del modelo de cáncer de pulmón subcutáneo para las siguientes etapas del diseño experimental.



Gráfica 1. Curva de sobrevivencia Kaplan Meier. Cada escalón representa un deceso y la pendiente de estos es proporcional al número de deceso por día. La mayor media de sobrevivencia fue observada en ratones implantados con 2.5×10^4 células LLC con 35.5 días, mientras que en los ratones implantados con 5×10^4 células LLC fue de 34 días y con 7.5×10^4 células LLC fue de 29.5 días.

Adicionalmente se realizó un análisis de normalidad y correlación de los datos, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si los datos son normales o no; esta prueba se seleccionó por el número de datos que se manejaron. Los datos obtenidos siguieron una distribución normal, lo que nos permite calcular probabilidades de aparición de datos de esa distribución, y tener la posibilidad de inferir datos de la población a partir de los obtenidos de una muestra.

Posteriormente para calcular la correlación se realizó la prueba de Pearson, los resultados de dichas pruebas van del -1 a +1 como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 2 Interpretación correlación de Pearson

Correlación	Positiva	Negativa
Nula	0	0
Muy baja	$0 < R < 0.2$	$0 < R < -0.2$
Baja	$0.2 < R < 0.4$	$-0.2 < R < -0.4$
Moderada	$0.4 < R < 0.6$	$-0.4 < R < -0.6$
Alta	$0.6 < R < 0.8$	$-0.6 < R < -0.8$
Muy alta	$0.8 < R < 1$	$-0.8 < R < -1$
Perfecta	1	-1

Para este análisis sólo se tomaron los grupos de 7.5×10^4 , 5×10^4 y 2.5×10^4 y se obtuvo un comportamiento normal y una R de Pearson de correlación muy alta negativa de -0.90. Este resultado indica que hay una proporcionalidad inversa entre el número de células implantadas y la sobrevida, a mayor número de células implantadas, menor es la sobrevida.

Tabla 3 Test de Shapiro Wilk normalidad, piloto, concentración de células y sobrevida

	Grupo	Media de sobrevida
W-stat	1	0.812030075
P evaluada	1	0.143553089
α	0.05	0.05
normal	si	si

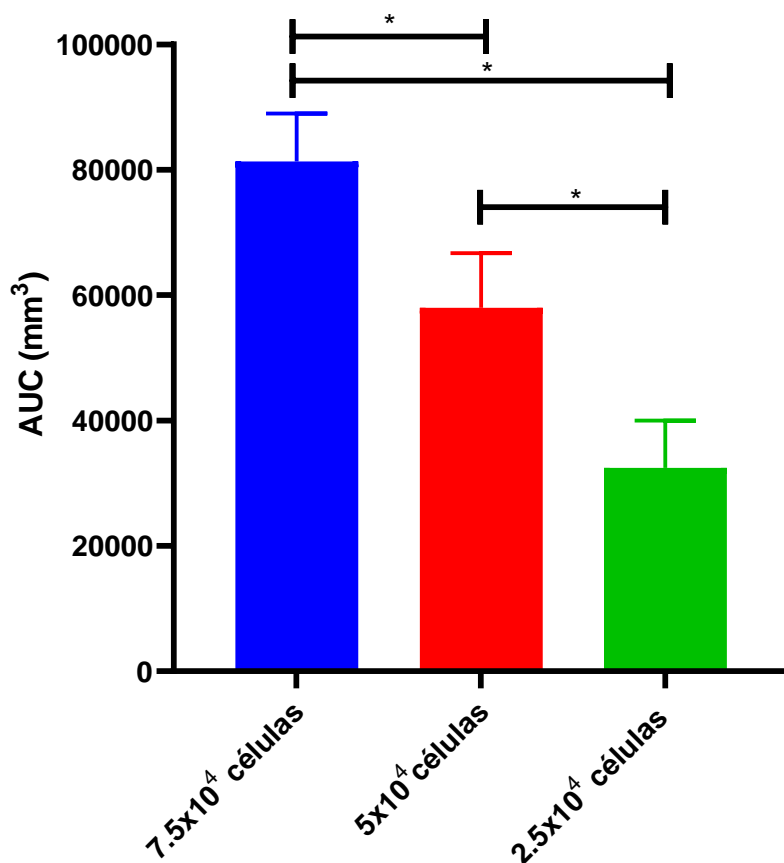
Tabla 4 Correlación de Pearson, piloto, concentración de células y sobrevida

Grupo	Media de sobrevida
--------------	---------------------------

Grupo	1	
Media de sobrevida	-0.90112	1

Con los datos obtenidos de las mediciones del crecimiento tumoral se realizó un análisis de área bajo la curva, donde se observa la tendencia de que a mayor número de células implantadas mayor es el tamaño tumoral, esta observación fue confirmada con el análisis de Shapiro-Wilk y posteriormente una correlación de Pearson; por otra parte, se observó que existe una diferencia significativa entre los tamaños tumorales de los grupos que desarrollaron tumor primario.

Área bajo la curva del crecimiento tumoral



Gráfica 2. Crecimiento tumoral después de la implantación subcutánea de tres cantidades diferentes de células LLC, expresado como área bajo la curva. El crecimiento tumoral mostró diferencia significativa entre los 3 grupos. Diferencia significativa entre 7.5×10^4 células LLC vs 5×10^4 células LLC (*); entre 7.5×10^4 células LLC vs 2.5×10^4 células LLC (*) y entre 5×10^4 células LLC vs 2.5×10^4 células LLC (*).

Tabla 5 Test de Shapiro-Wilk, piloto, crecimiento tumoral y concentración implantada

	Grupo	Volumen tumoral
W-stat	0.9939557	0.96768148
p-evaluada	0.97675583	0.827077385
α	0.05	0.05
normal	si	si

Tabla 6 Correlación de Pearson, piloto, crecimiento tumoral y concentración implantada

	Grupo	Volumen tumoral
Grupo	1	
Volumen tumoral	-0.98590818	1

Con esto se obtuvo que existe una relación directa muy alta entre el número de células implantadas y el tamaño tumoral es decir el tamaño tumoral es proporcional al número de células implantadas.

Anatomopatóloga e histopatología curva piloto

A continuación, se muestran fotomicrografías representativas de cada grupo y los diferentes sitios de metástasis encontrados: cerebro, corazón, pulmones, hígado y linfonodos.

En el caso el cerebro, solo los ratones del grupo implantado con 7.5×10^4 células presentaron metástasis y en el corazón solo los ratones del grupo implantado con 2.5×10^4 células.

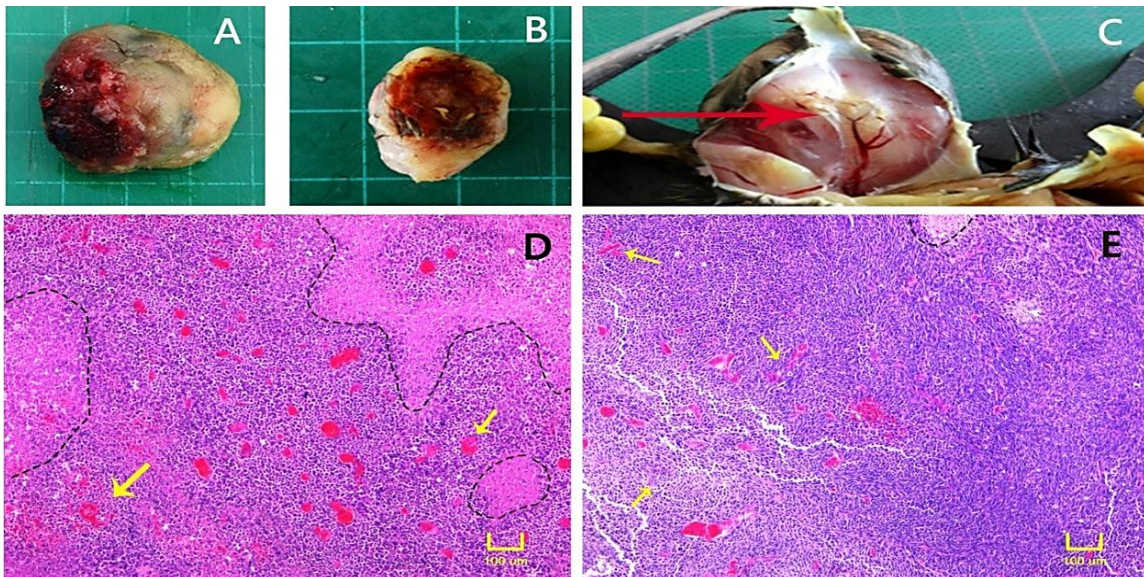
Al realizar la necropsia de los ratones que desarrollaron tumor primario, se observó que el modelo de carcinoma pulmonar inducido por la línea celular Lewis Lung Carcinoma produce esplenomegalia, dato del que no se tenía reporte. Por ello, se decidió realizar algunas pruebas para conocer si este tenía significancia en los resultados obtenidos.

En los modelos murinos de cáncer no se ha reportado la presencia de metástasis al bazo.

Otro resultado que se observó al realizar el análisis histopatológico fue la presencia de células similares a megacariocitos o a células gigantes multinucleadas. En el anexo se muestran células similares encontradas en otras patologías.

Tumores

Todos los tumores primarios mostraron vascularización prominente (Figura 13C) Las fotomicrografías muestran la histopatología típica del tumor primario, independientemente de la cantidad de células LLC implantadas, caracterizada por la presencia de zonas de necrosis (Figuras 13D y 13E), vascularización abundante (Figura 13D y 13E), y el aspecto de un carcinoma epidermoide poco diferenciado, formado por células de diferentes tamaños con núcleos grandes de forma irregular y nucleolos prominentes (Figuras 13F, 13H, 13I), anaplásico. Es destacable la presencia de células tumorales gigantes, con núcleos lobulados o múltiples, ubicados en la periferia celular o en forma de herradura (Figuras 13G, 13H). De igual manera se observó que las figuras mitóticas fueron frecuentes.



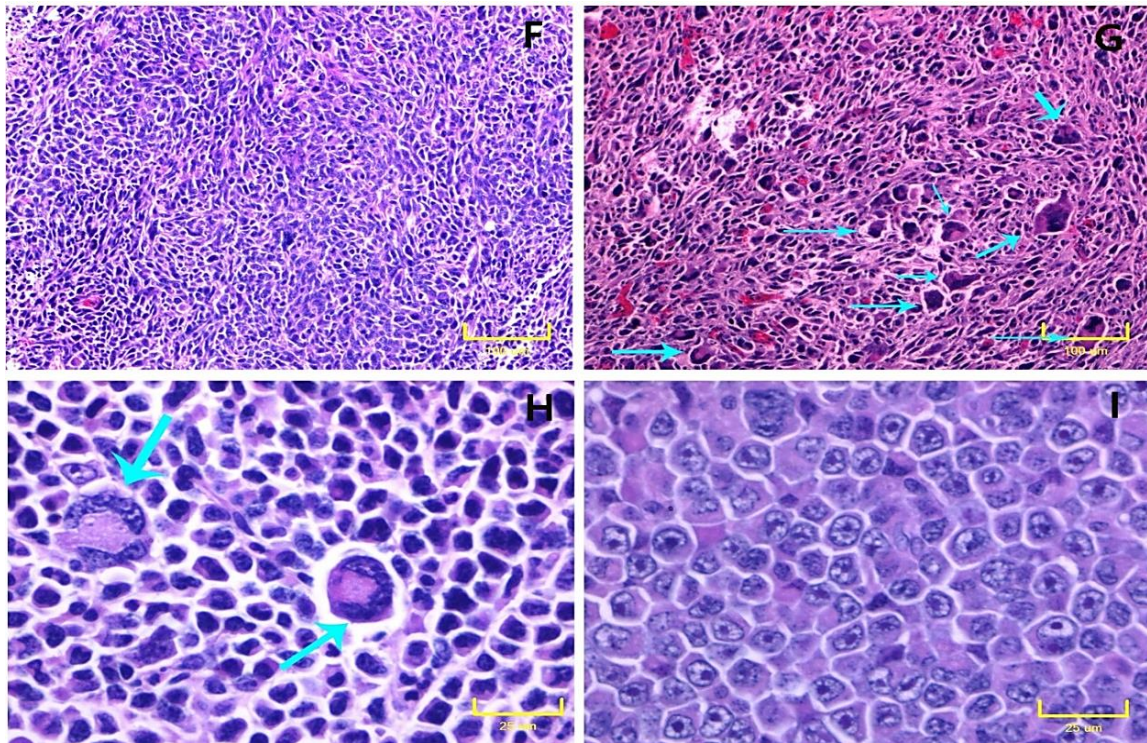


Figura 11. Estudio piloto del modelo murino de cáncer pulmonar heterotópico. Tumores primarios por implantación subcutánea de LLC. Aspecto macroscópico, al momento de la necropsia de tumores primarios disecados de un ratón del grupo 2, 51 días posteriores a la implantación de 5×10^4 células LLC (A) y de un ratón del grupo 1, 42 días posteriores a la implantación de 7.5×10^4 células LLC (B). La flecha roja señala vasos sanguíneos. Los cuadros del fondo de 1x1cm. Zonas de necrosis (D y E, líneas punteadas). Células tumorales gigantes, con núcleos lobulados o múltiples, ubicados en la periferia celular o en forma de herradura (G, H, flechas verde agua). Tinción H&E.

Pulmones

Se observó la presencia de metástasis macroscópicas en la superficie de los pulmones. En aspecto histológico se observó la presencia de una metástasis bronquial e infiltrado inflamatorio de la pared alveolar (Figuras 14D,14E,14G); además fueron observadas metástasis grandes en el parénquima pulmonar. En todas las metástasis pulmonares observadas, la imagen histopatológica es similar a la del tumor primario, incluyendo la presencia de numerosas células gigantes, similares a

megacariocitos y a células gigantes multinucleadas (Figuras 14D, 14E, 14F, 14G).

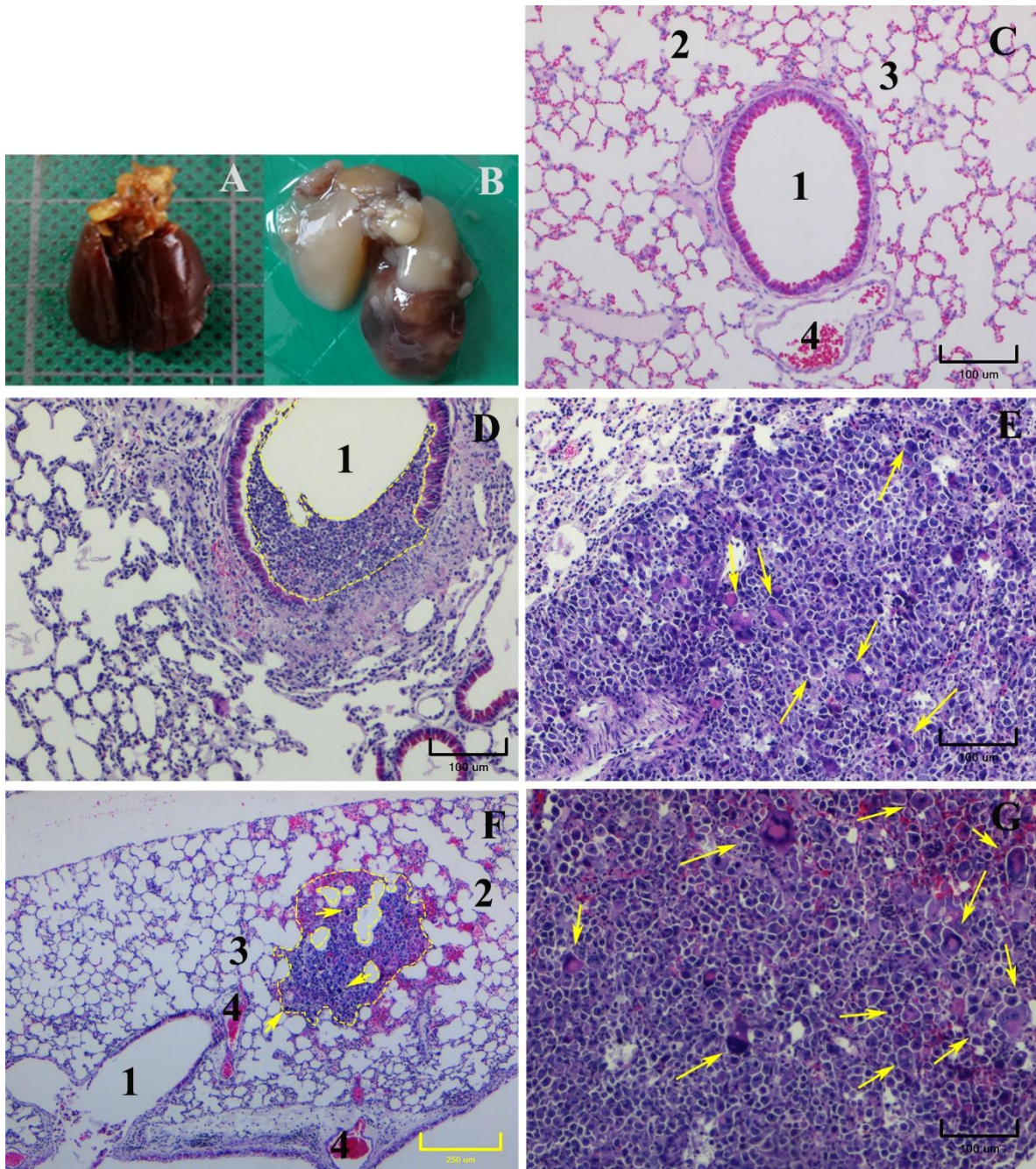


Figura 12. Estudio piloto del modelo murino de cáncer pulmonar heterotópico. Pulmones después de la necropsia de un ratón sano (A). Metástasis macroscópicas en la superficie de los pulmones de un ratón implantado con 5×10^4 células LLC sacrificado a los 51 días (B, flechas). Las fotomicrografías muestran un pulmón de ratón control con características histológicas normales, con adecuada perfusión y ventilación alveolares (C). Metástasis bronquiolar e

infiltrado inflamatorio de la pared alveolar en un ratón implantado con 5×10^4 células LLC y sacrificado a los 51 días (D, línea discontinua); en ratones implantados con 5×10^4 células LLC (E), 7.5×10^4 células LLC (F, línea discontinua), y 5×10^4 células LLC (G) fueron observadas metástasis grandes en el parénquima pulmonar, sacrificados a los 50, 49 y 50 días respectivamente. Células gigantes, similares a megacariocitos y a células gigantes multinucleadas (D, E, F, G, flechas amarillas). 1. Bronquiolo. 2. Conducto alveolar. 3. Alveolo pulmonar. 4. Vaso sanguíneo. Tinción H&E.

Cerebro

Solo los ratones del grupo implantado con 7.5×10^4 células de LLC desarrollaron metástasis a cerebro, la morfología se perdió por lo que no se pudo identificar a que zona del cerebro afecto.

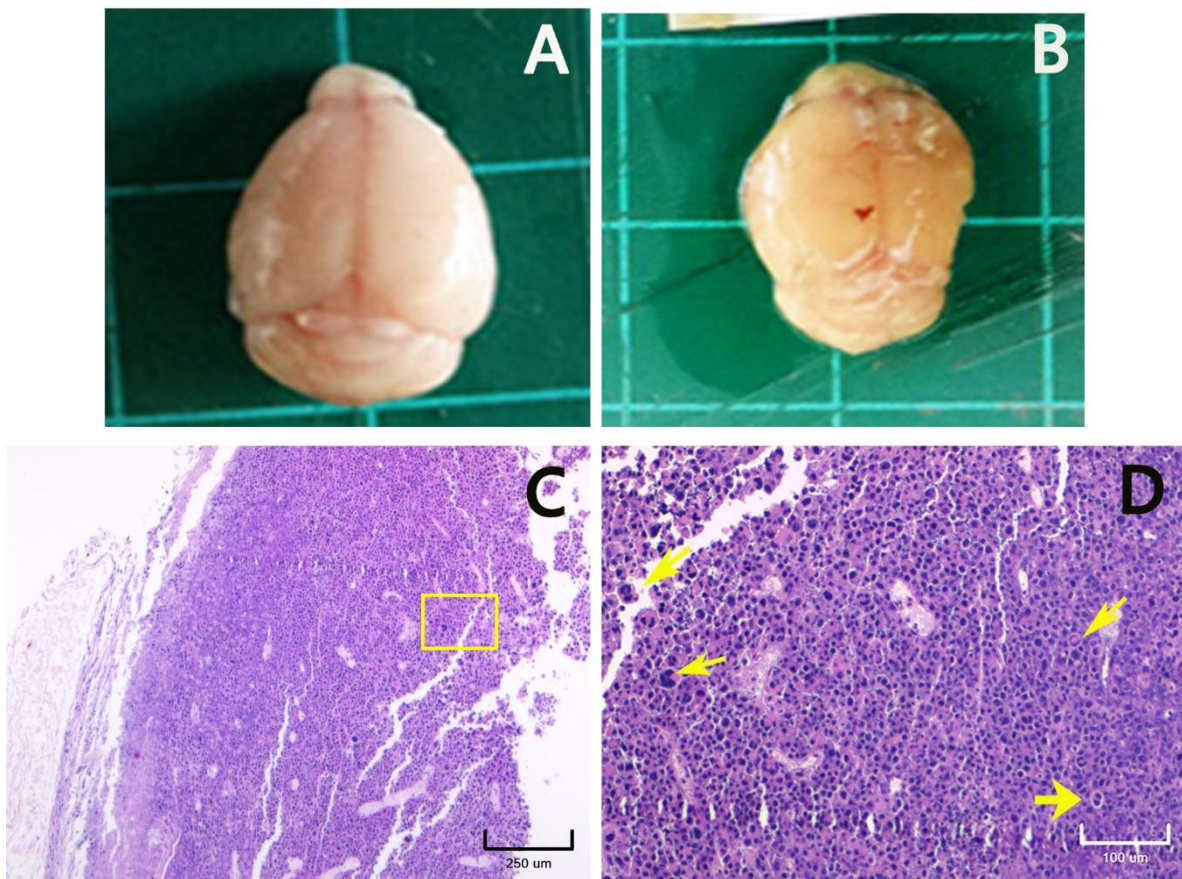


Figura 13. Estudio piloto del modelo murino de cáncer pulmonar heterotópico. Cerebro. Aspecto macroscópico del cerebro de ratón control (A) y del cerebro de un ratón al que se le implantaron subcutáneamente 7.5×10^4 células LLC, sacrificado 50 días después. Fotomicrografía a bajo aumento de la metástasis cerebral (C). El área del recuadro amarillo a mayor aumento permite identificar

el aspecto anaplásico de la metástasis y la presencia de células gigantes (D, flechas amarillas), características del tumor primario. Tinción H&E.

Corazón

Los grupos implantados con 7.5×10^4 , 5×10^4 y 2.5×10^4 células de LLC, desarrollaron metástasis en corazón, estas se encontraban en el pericardio y a diferencia de los otros sitios de metástasis no se encontrarlo las células gigantes multinucleadas.

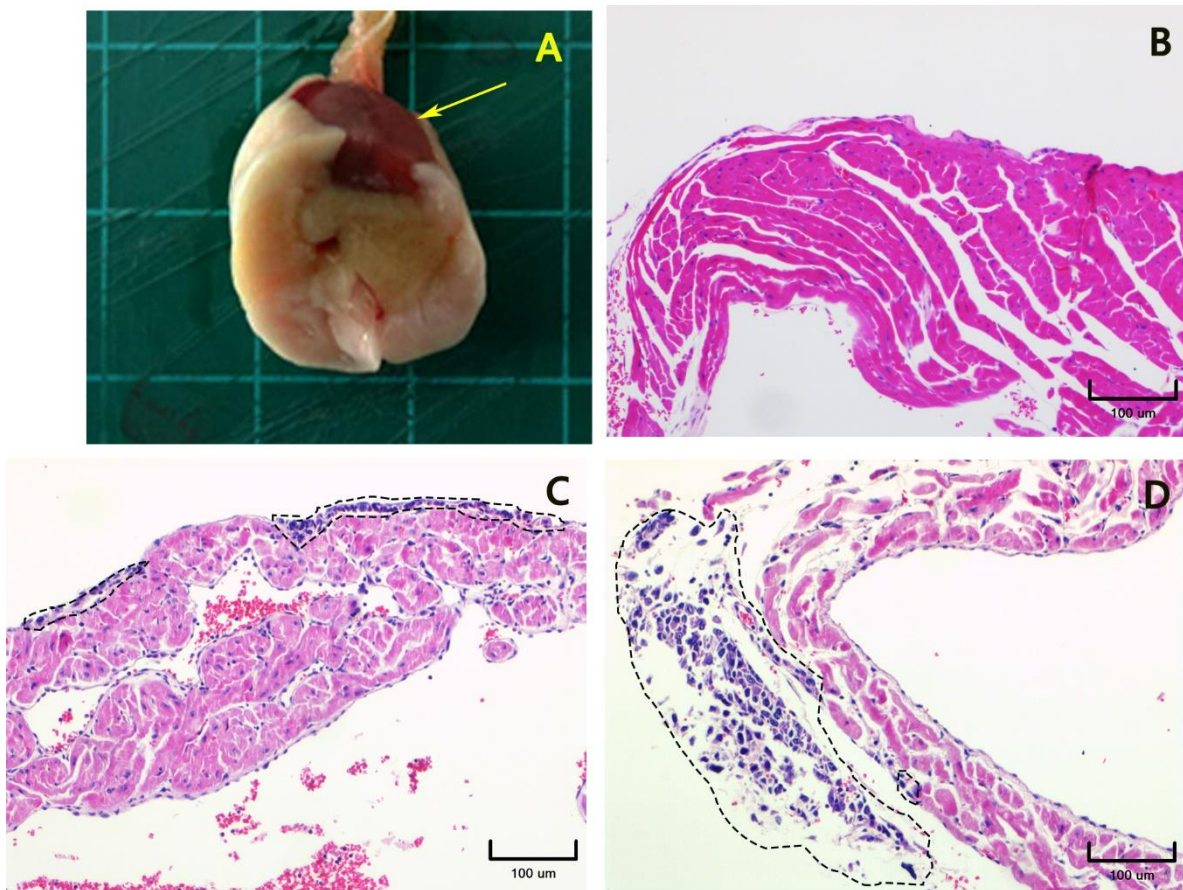
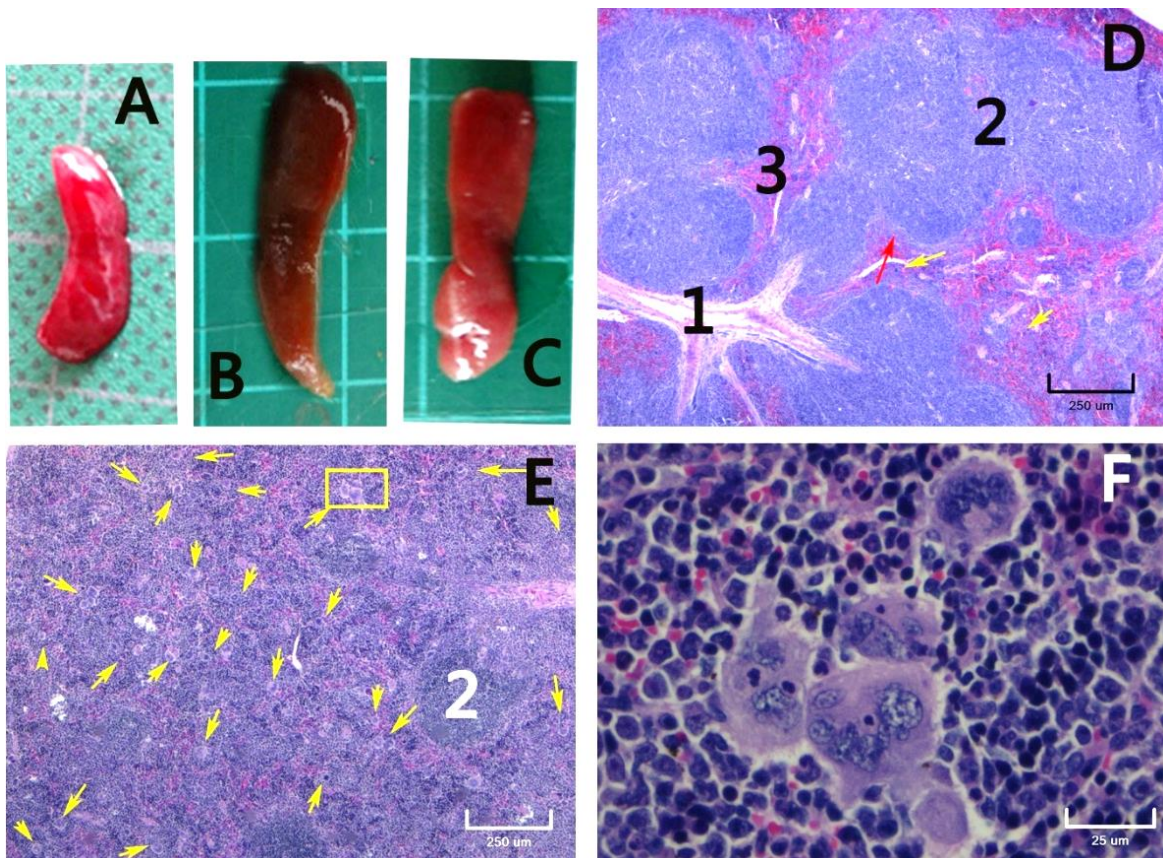


Figura 14. Estudio piloto del modelo murino de cáncer pulmonar heterotópico. A) Corazón (flecha amarilla) después de la necropsia. B) Corte histológico de corazón, pared atrial (miocardio atrial). C y D) Metástasis pericárdica de un ratón del grupo 3, implantado con 2.5×10^4 células LLC y sacrificado 58 días después. Tinción H y E.

Bazo

No se encontró una metástasis per se en bazo, sin embargo, este hecho fue acompañado con el desarrollo de esplenomegalia en los ratones con tumor primario inducido por las células y la coloración diferente del órgano (Figura 17B y 17C). Fue observado un aumento de neutrófilos y megacariocitos, lo que da la apariencia de desorganización o distribución difusa de la pulpa blanca y de la pulpa roja (Figura 17E). Los megacariocitos son fáciles de identificar y se asemejan a las células gigantes del tumor primario y de las metástasis (Figura 17F).



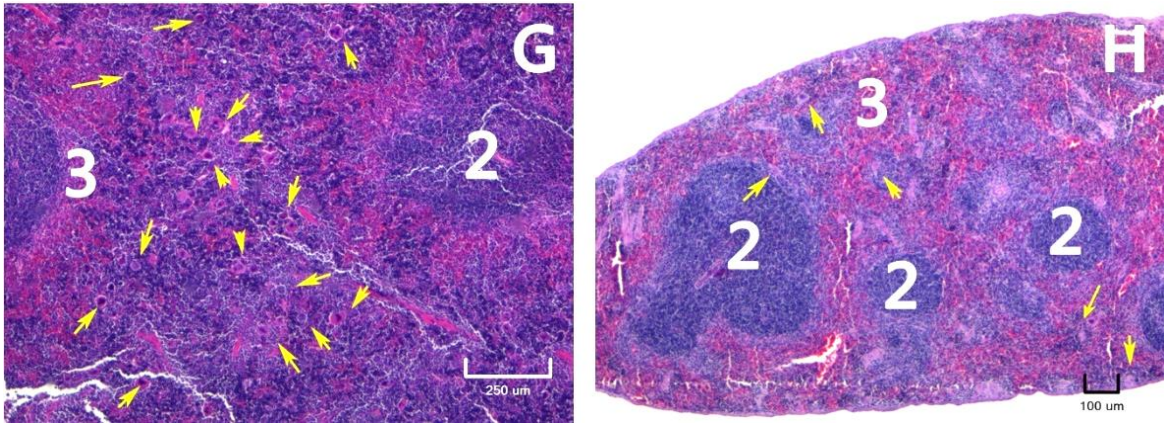


Figura 15. Estudio piloto del modelo murino de cáncer pulmonar heterotópico. Aspecto macroscópico de los bazo de ratón del grupo control negativo, 55 días después de la administración subcutánea de solución salina (A), de un ratón implantado con 5×10^4 células LLC (B) y de un ratón implantado con 7.5×10^4 células LLC (C). (Los cuadrados del fondo de la fotografía miden 1 cm^2). Las fotomicrografías del bazo de ratones controles negativos muestran una regionalización bien definida de la pulpa blanca, la pulpa roja y de la zona marginal, que limita a ambas. En la pulpa roja se identifican macrófagos, neutrófilos y megacariocitos (D). En el bazo de ratones implantados con 5×10^4 células y sacrificado 51 días después, fue observado un aumento de neutrófilos y megacariocitos (E, flechas amarillas señalan megacariocitos). Megacariocitos (F, mayor aumento del recuadro amarillo en E). G) Bazo de un ratón perteneciente al grupo implantado con 1×10^4 células de LLC. H) Bazo de un ratón perteneciente al grupo implantado con 1×10^4 células de LLC. Para estas dos últimas se observa que aún se conserva la conformación histológica del bazo, sin embargo, hay un aumento de megacariocitos. 1. Vaso sanguíneo. 2. Pulpa blanca. 3. Pulpa roja. Zona marginal (flecha roja). Tinción H&E.

Hígado

Se encontraron macrometástasis en hígado (figura 18A y 18B) en los grupos implantados con 7.5×10^4 , 5×10^4 y 2.5×10^4 células de LLC, microscópicamente se encontraron sitios de metástasis con presencia de células gigantes.

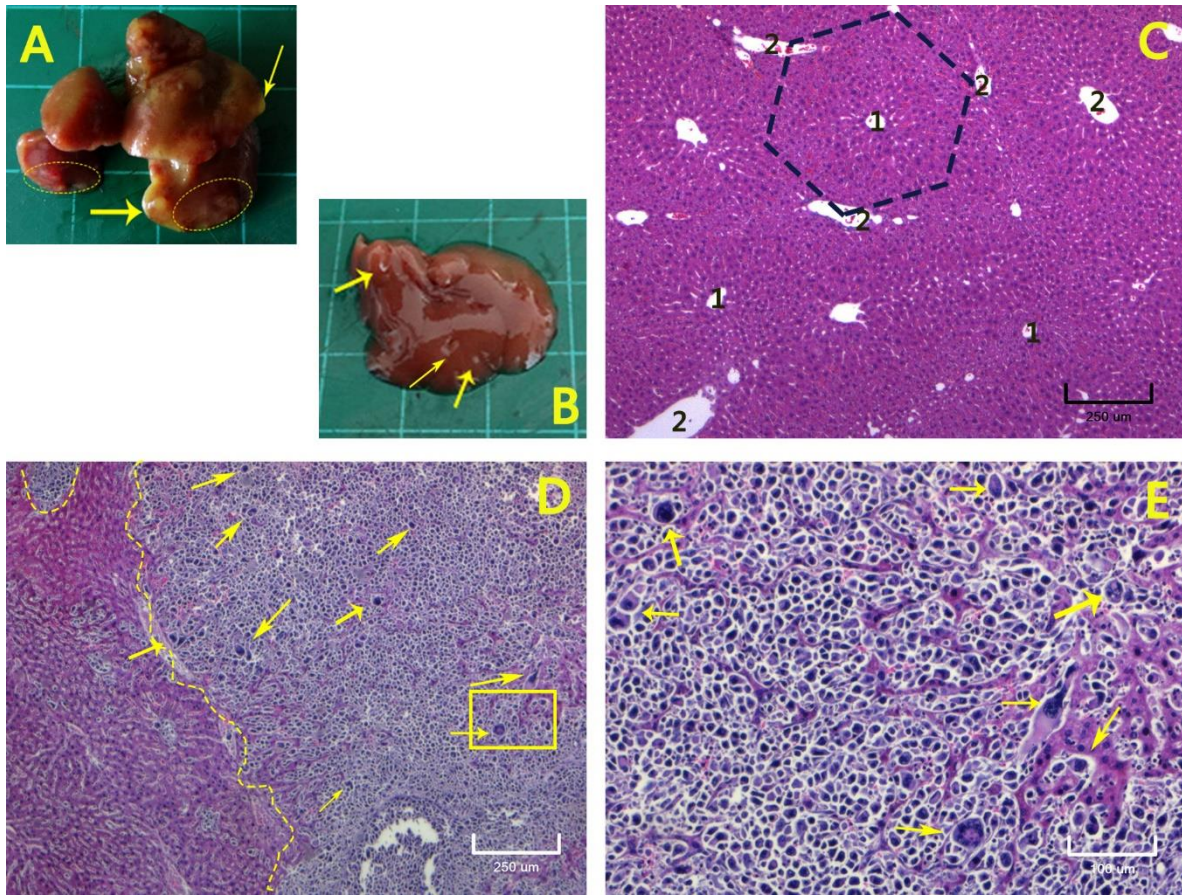


Figura 16. Estudio piloto del modelo murino de cáncer pulmonar heterotópico. Macrometástasis (A y B, flechas y líneas punteadas amarillas) en hígados de ratones del grupo 3 (A), sacrificado 44 días después de la implantación de 2.5×10^4 células LLC, y del grupo 2 (B), sacrificado 51 días después de la implantación de 5×10^4 células LLC. En C se observa la fotomicrografía del hígado de un ratón del grupo control negativo implantado con solución salina estéril y sacrificado a los 55 días no presentó cambios histológicos: 1. Vena central, 2. Triadas portales; Lobulillo hepático (líneas punteadas negras). D muestra el aspecto histopatológico de una metástasis en hígado (líneas punteadas amarillas), con células gigantes (flechas amarillas). El rectángulo amarillo está representado a mayor aumento en E, donde se observan con más detalles dichas células (flechas amarillas). Tinción H& E.

Linfonodo inguinal

Del grupo implantados con 1×10^4 sólo dos ratones (33%) desarrollaron tumor primario. El grupo implantado con 5×10^3 células no desarrolló tumor primario; sin embargo, en la necropsia se encontró que dos

ratones tenían linfadenopatía inguinal derecha, este se encuentra cercano a la zona de implantación y por los hallazgos histológicos sugiere tratarse de una metástasis a pesar de no haber desarrollado tumor primario.

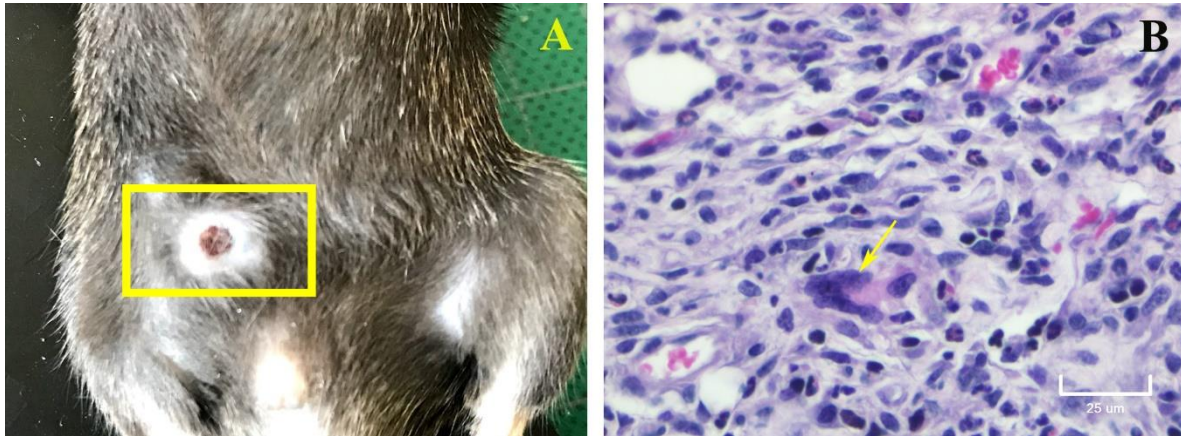


Figura 17. Estudio piloto del modelo murino de cáncer pulmonar heterotópico. A) Fotografía del ratón 3 del grupo implantado con 5×10^3 . Linfonodo inguinal derecho (rectángulo amarillo), cercano a la zona de implantación. B) Fotomicrografía del linfonodo inguinal derecho crecido en la que se observan células gigantes metastásicas, similares a las encontradas en los tumores primarios y en las metástasis hepáticas (flechas amarillas), rodeadas en un infiltrado de neutrófilos. Tinción H&E

Curva de sobrevida en grupos con monoterapias y terapia combinada.

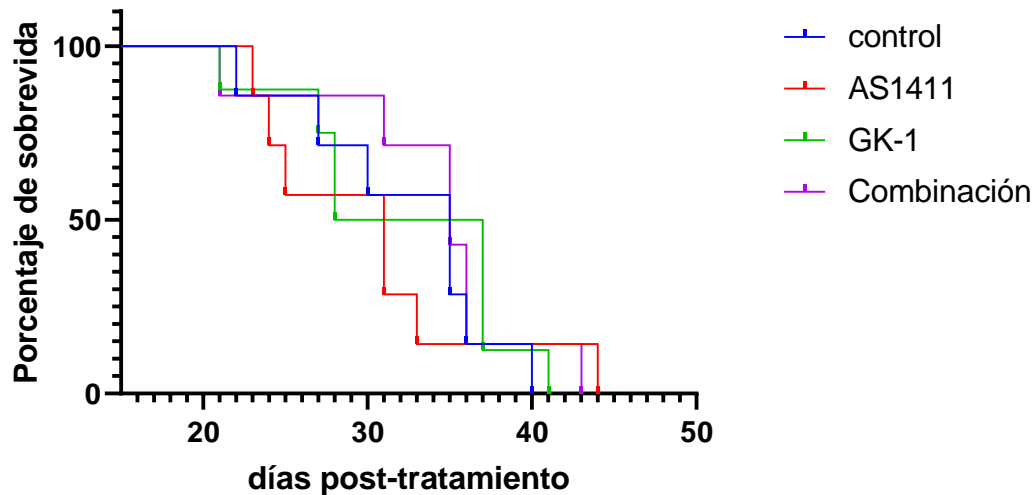
La curva de sobrevida en los animales del grupo control y en los de los grupos que recibieron alguno de los tratamientos fue definida con los mismos criterios del estudio piloto. Adicionalmente, se realizó un análisis de área bajo del volumen tumoral de los grupos.

Así mismo se seleccionaron fotomicrografías representativas de cada grupo.

Se obtuvo una media de sobrevida para grupo control fue de 35 días (22-40 días), para el grupo tratado con GK-1 32.5 días (21-41 días), para el grupo tratado con AS1411 31 días (24-44 días) y grupo tratado

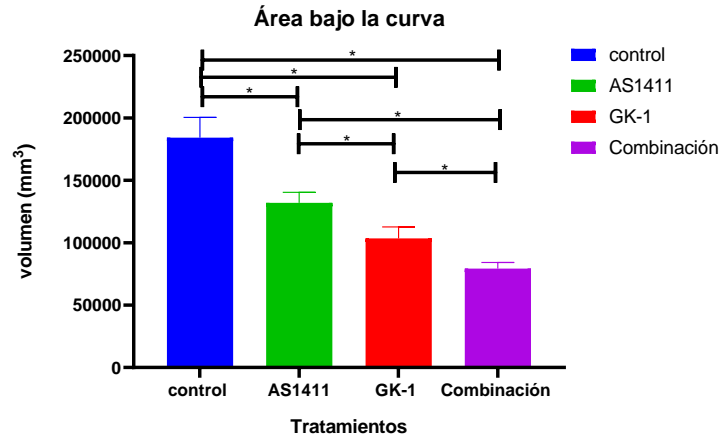
con GK-1 + AS1411 de 35 días (21-43 días). Los números entre paréntesis indican día del primer deceso y del último deceso.

Curva de sobrevida monoterapias y terapia combinada



Gráfica 3. Curva de sobrevida de ratones C57BL/6 después de la implantación subcutáneas de 2.5×10^4 células LLC y efecto de los tratamientos probados. Se obtuvo que no existe diferencia significativa entre el grupo control y los grupos con tratamiento, ni entre ellos. Se obtuvo una media de sobrevida para grupo control fue de 35 días, para el grupo tratado con GK-1 32.5 días, para el grupo tratado con AS1411 31 días y grupo tratado con GK-1 + AS1411 de 35 días. Curva Kaplan Meier.

Se realizó un análisis de área bajo la curva con los datos obtenidos durante las mediciones de los ratones donde se obtuvo que existe una diferencia significativa con los grupos que recibieron un tratamiento y el grupo control.



Gráfica 4. Crecimiento tumoral después de la implantación subcutáneas de 2.5×10^4 células LLC en ratones C57BL/6, expresado como área bajo la curva. El crecimiento tumoral mostró diferencia significativa entre los tratamientos y el control, así como entre los tratamientos y la combinación. *Diferencia significativa entre control vs tratamiento con GK-1. *control vs AS1411. *control vs combinación, *GK-1 vs combinación. *AS1411 vs combinación.

Anatomopatología e histopatología en grupos con monoterapias y terapia combinada.

Tumores

Se observó una diferencia entre los tamaños tumorales con los diferentes tratamientos (figura 20A, 20B, 20C, 20D) además de observar una disminución de las células gigantes multinucleadas en los grupos que recibieron tratamiento en comparación con el grupo control.

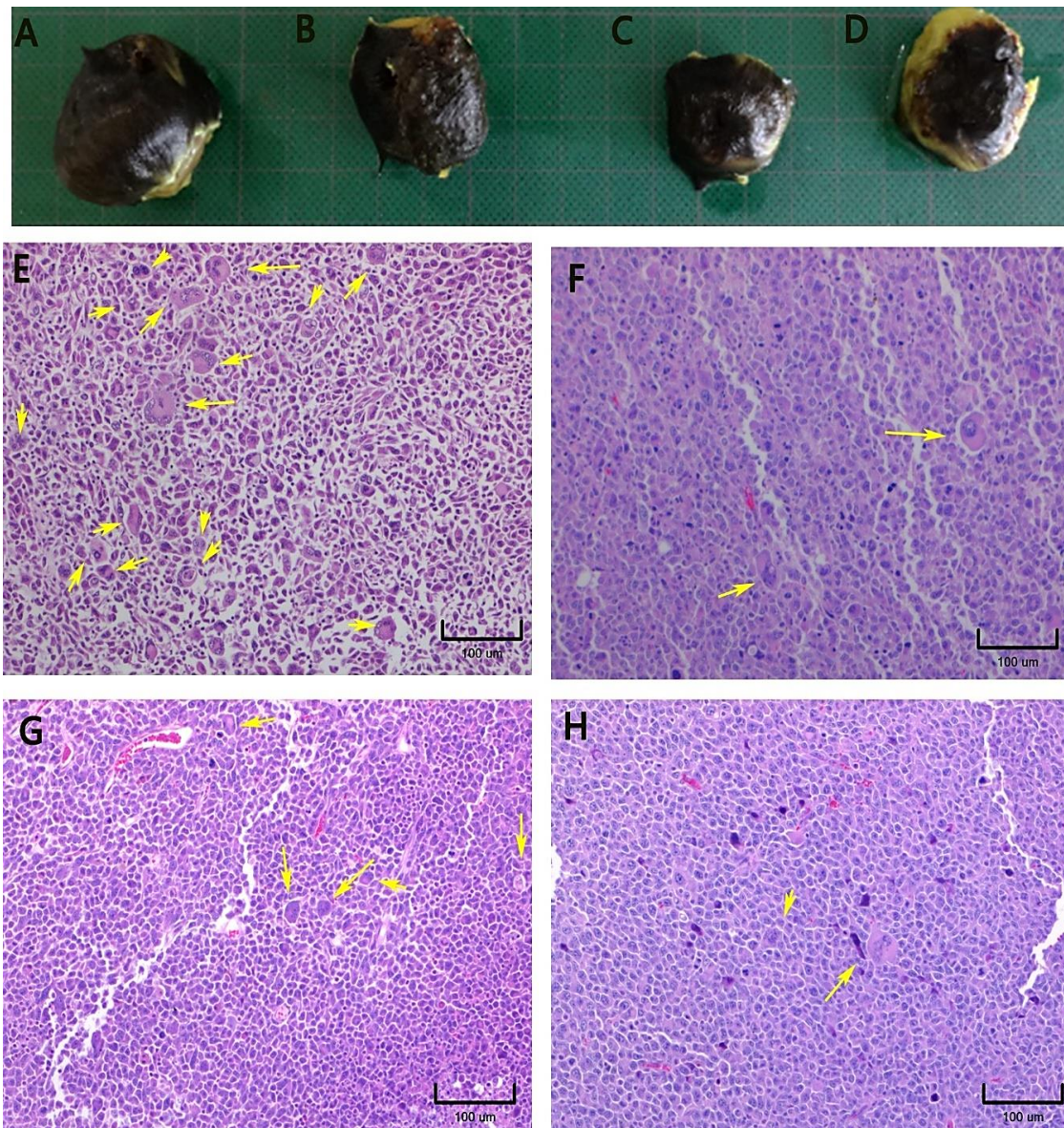
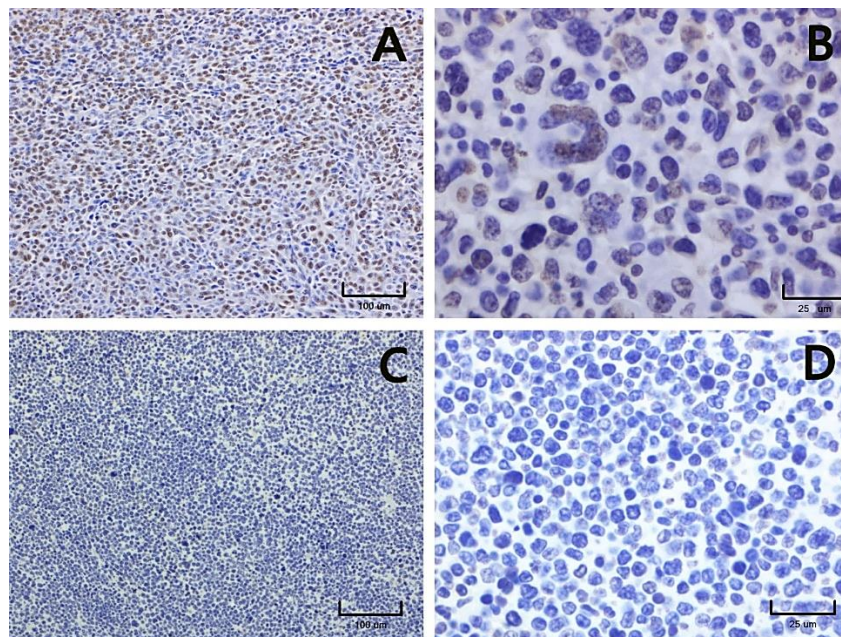


Figura 18. Tumores primarios después de la implantación subcutáneas de 2.5×10^4 células LLC en ratones C57BL/6. Efectos del tratamiento. Tumores primarios de un ratón del grupo control después de 44 días posteriores a la implantación (A); de un ratón del grupo tratado con AS1411 después de 63 días posteriores a la implantación (B); de un ratón del grupo tratado con GK-1 después de 44 días posteriores a la implantación (C) y de un ratón del grupo tratado con GK-1/AS1411 después de 44 días posteriores a la implantación (D). Macroscópicamente se observan diferencia de tamaño tumoral tomando como referencia la cuadrícula del fondo (cada cuadro de la superficie del fondo es 1cm^2). El aspecto histológico de las células tumorales es similar en todos los grupos de ratones: grupo control (E), grupo tratado con AS1411 (F), grupo tratado con GK-1 (G) y grupo tratado con la combinación de GK-1 y AS1411

(H). Flechas amarillas, células gigantes con núcleos multilobulados o multinucleadas. Tinción H&E.

Inmunohistoquímica antiNCL

Las células tumorales en el grupo control (figura 21A y 21B) mostraron reactividad a NCL en núcleo, citoplasma o en ambos compartimientos celulares. En los tumores primario de los ratones tratados con el aptámero AS1411 no se observó inmunorreactividad a NCL en núcleos y citoplasma (figura 21C y 21D), mientras que en los animales tratados con GK-1 la distribución tumoral de la inmunorreactividad a NCL es similar a la del grupo control, aunque con menor intensidad (figura 21E, 21F) y casi confinada exclusivamente en los núcleos. Las células tumorales de los ratones tratados con la combinación GK-1+AS1411 (figura 21G y 21H) mostraron inmunorreactividad predominantemente nuclear, ocasionalmente en citoplasma y aparentemente en un número menor de células en comparación con el grupo control y con el grupo tratado con GK-1.



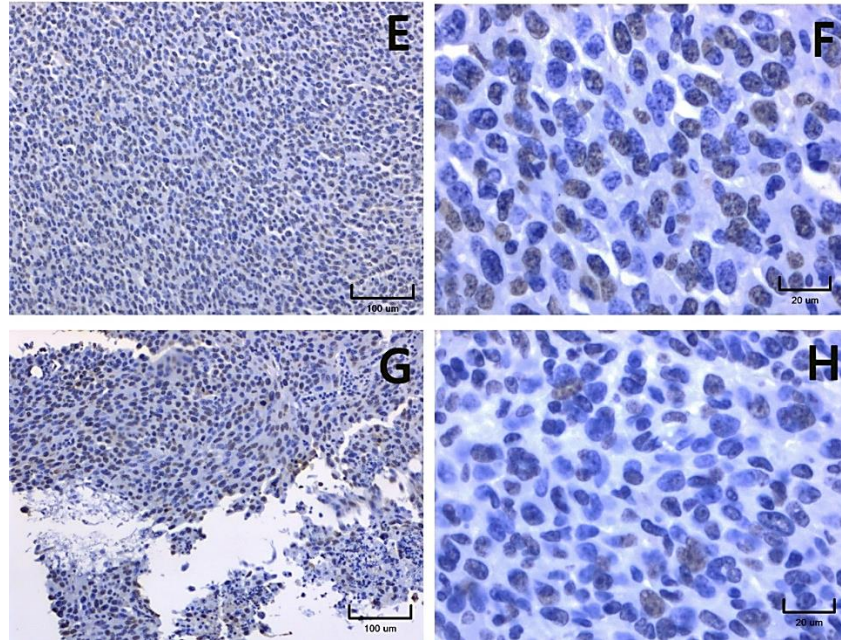


Figura 19. Inmunohistoquímica enzimática para NCL en tumores primarios después de la implantación subcutáneas de 2.5×10^4 células LLC en ratones C57BL/6. Las células tumorales en el grupo control (A y B). En los tumores primario de los ratones tratados con el aptámero AS1411(C, D), tratados con GK-1 (E, F) y. Las células tumorales de los ratones tratados con la combinación GK-1+AS1411 (G, H).

Pulmones

En todos los grupos se encontraron metástasis ya sea circulantes o implantadas, el grupo control fue el que tuvo menor área de implantación pulmonar con $1.29 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ promedio; seguido por los que recibieron la combinación de tratamiento con $2.66 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ promedio AS1411 con $4.59 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ promedio, y finalmente GK-1 con $2.64 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ promedio.

Algo destacable fue la ausencia de las células gigante encontradas en el tumor y en el estudio piloto.

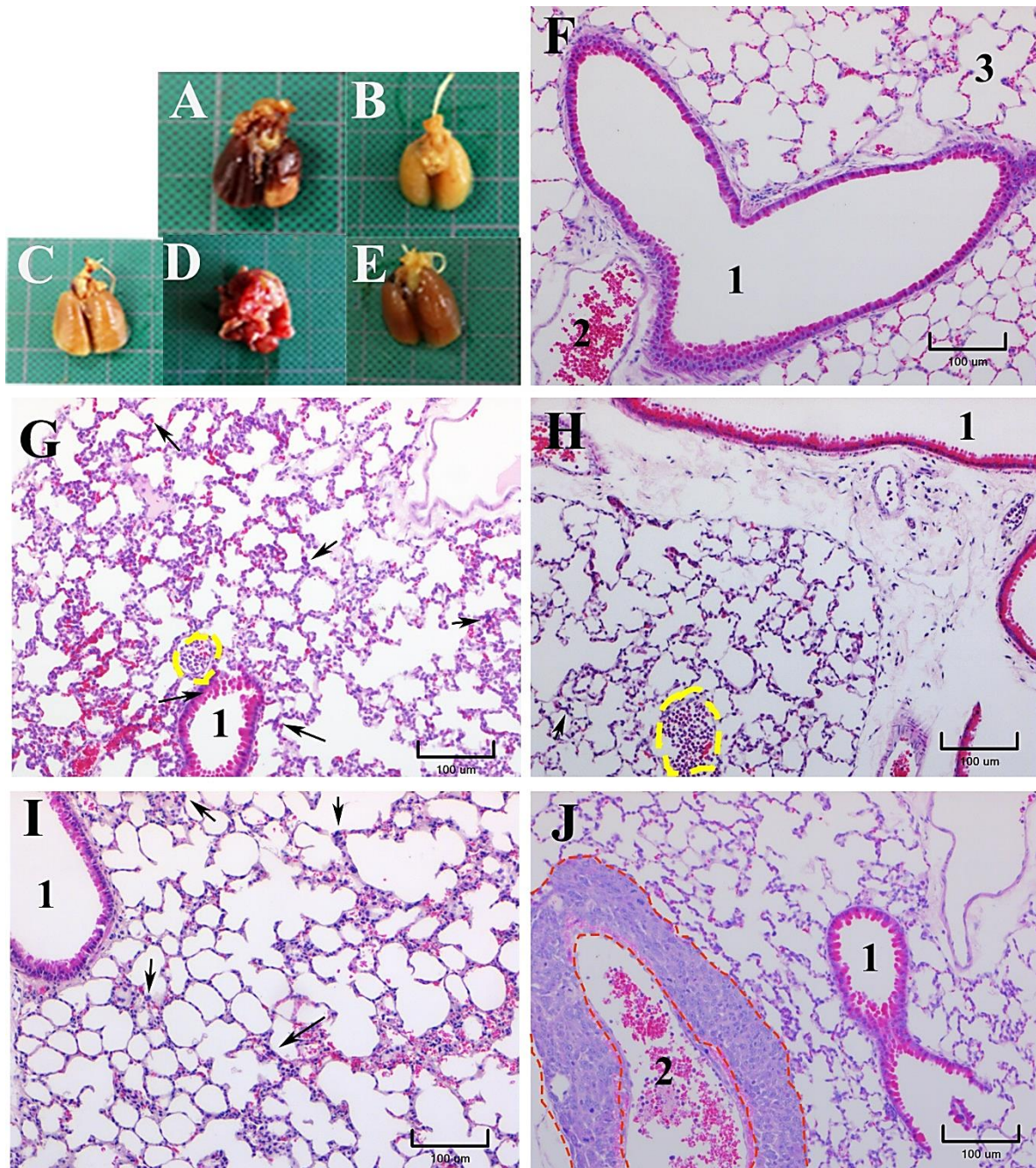
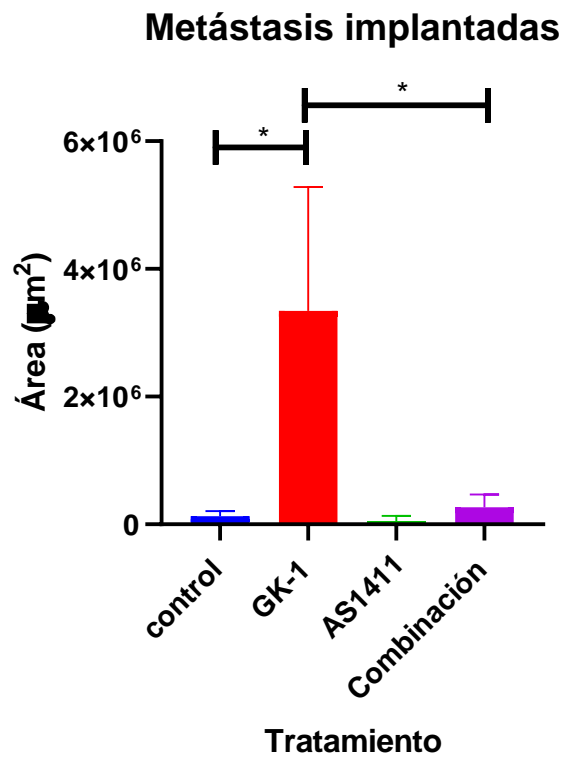


Figura 20. Pulmones de ratones C57BL/6 después de la implantación subcutánea de 2.5×10^4 células LLC. Aspecto macroscópico (A) e histológico (F) de un pulmón de ratón sano; asimismo de un ratón del grupo control con 45 días posteriores a la implantación (B, G), de un ratón del grupo tratado con AS1411 y 63 días posteriores a la implantación (C, H), de un ratón tratado con GK-1 y 47 días posteriores a la implantación (D, I) y de un ratón tratado con GK-1/AS1411 y 45 días de evolución posterior a la implantación (E, J). 1. Bronquiolo 2. Vaso sanguíneo. 3. Conducto alveolar. Células metastásicas circulantes en capilares alveolares (flechas negras). Focos de neutrófilos

(líneas discontinuas amarillas) Metástasis fijas (líneas discontinuas rojas).
Tinción H&E.



Gráfica 5 Metástasis en pulmón después de la implantación subcutáneas de 2.5×10^4 células LLC en ratones C57BL/6. Se realizó una prueba de Kruskal Wallis y una prueba a posteriori de U de Mann Whitney de una cola $\alpha = 0.05$, donde se encontró que existe diferencia significativa entre el grupo control y el grupo tratado con GK-1 (*); entre los tratados con GK-1 y el grupo de Combinación (*).

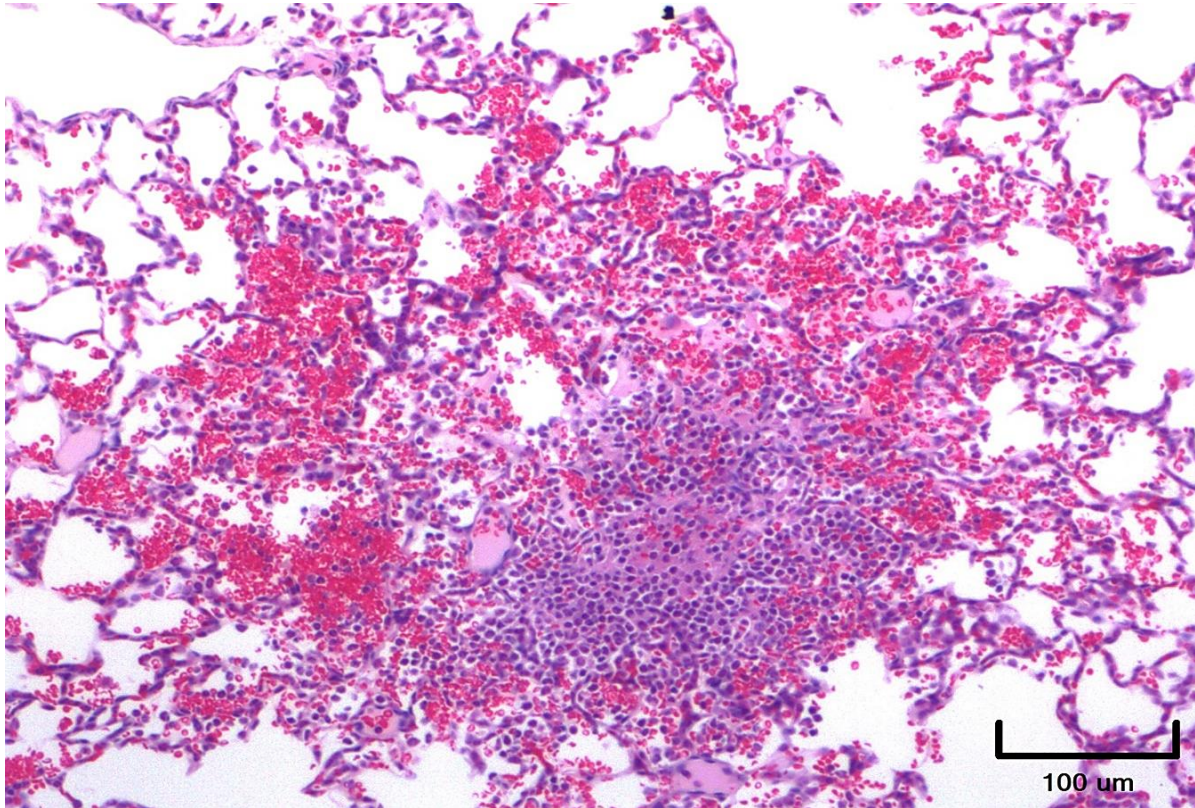


Figura 21. Foco de neutrófilos, hemorragias alveolares y células tumorales circulantes en el pulmón de un ratón C57BL/6 tratado con AS1411 y 63 días de evolución posterior a la implantación subcutáneas de 2.5×10^4 células LLC. Tinción H&E.

En los pulmones de los grupos control, GK-1 y terapia combinada, se observaron cúmulos o focos de neutrófilos en áreas donde circulaba células gigantes, probablemente metastásicas, pero fue en los ratones tratados con AS1411 en los que se observaron los cúmulos de mayor tamaño, también en relación con la presencia de células gigantes metastásicas circulando en los capilares alveolares y a zonas de congestión y hemorragia alveolares (Figura 23).

Hígado y corazón

El hígado y el corazón presentaron metástasis, pero sin células gigantes. No hubo diferencia entre los grupos en estos dos órganos. Ninguno de los grupos tuvo metástasis a cerebro.

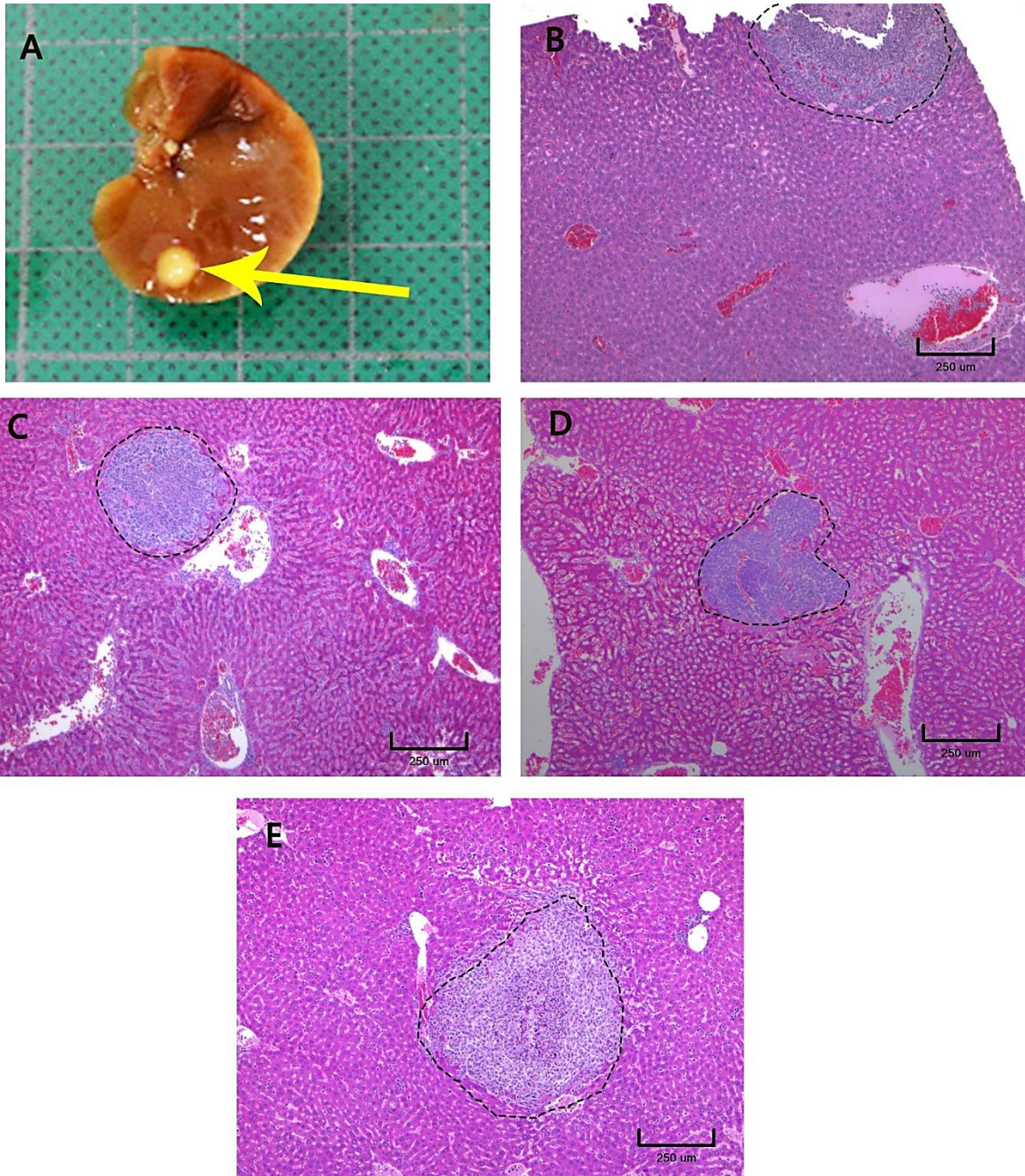


Figura 22. Metástasis en hígado después de la implantación subcutáneas de 2.5×10^4 células LLC en ratones C57BL/6. Macrometástasis en el lóbulo derecho hepático en un ratón tratado con AS1411 y 63 días de evolución (A, flecha amarilla). Nótese el área bien definida de las metástasis hepáticas (líneas discontinuas) en un ratón del grupo control con 49 días post-implantación (B), en un ratón tratado con AS1411 con 63 días post-implantación (C), en un ratón tratado con GK-1 con 57 días post-implantación (D) y en un ratón tratado con la combinación GK-1 /AS1411 después de 50 días post-implantación (E). Tinción H&E.

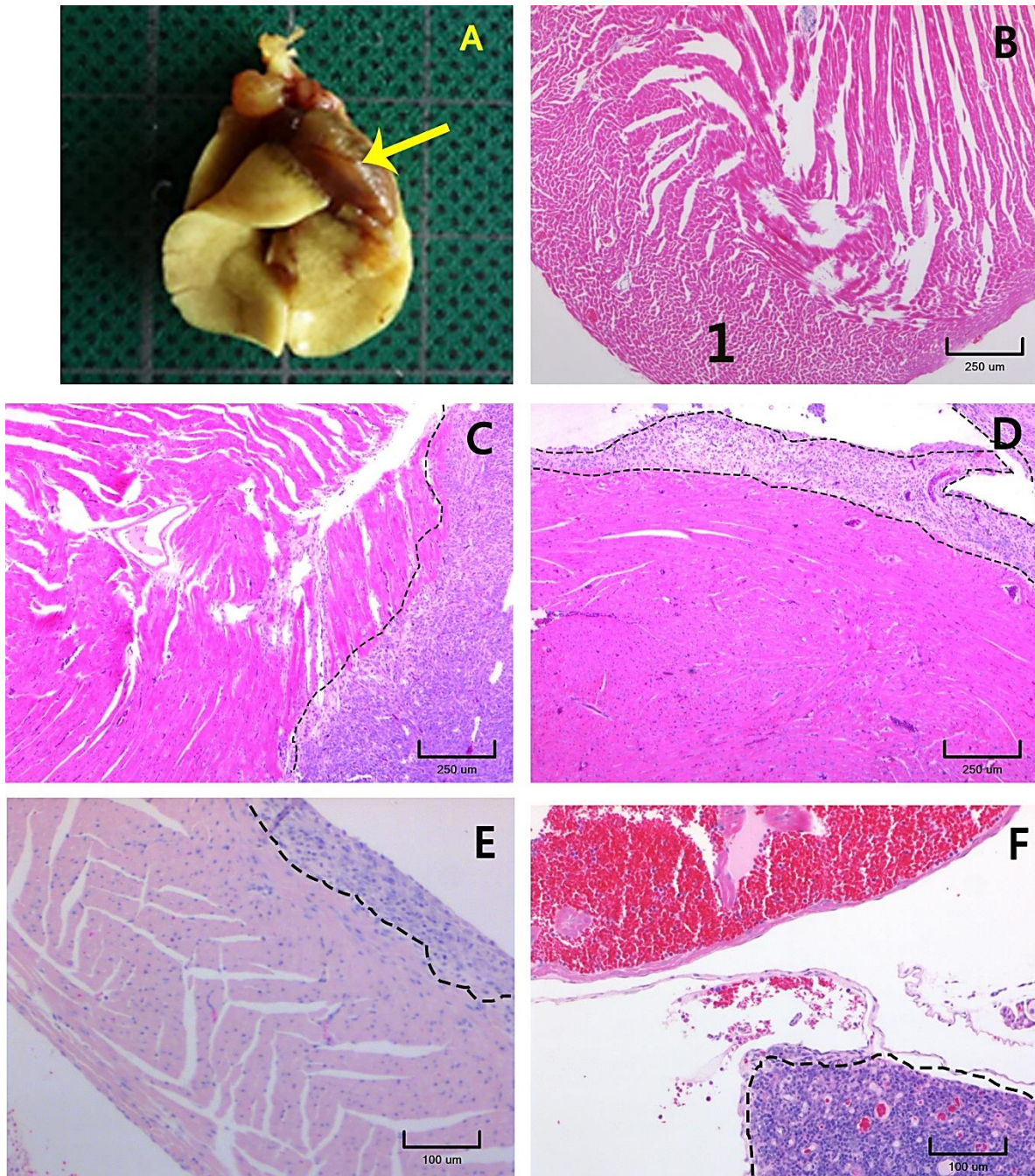


Figura 23. Corazón de ratón C57BL/6 después de la implantación subcutánea de 2.5×10^4 células LLC. Aspecto macroscópico (A) y microscópico (B) del corazón de ratón control. Las líneas discontinuas delimitan las metástasis en el miocardio (C) y el epicardio (D) de un ratón tratado con GK-1 y 47 días de evolución después de la implantación. En un ratón tratado con AS1411 se observó una metástasis en el miocardio (E) a los 41 días de evolución post-implantación y en otro animal de ese grupo, pero con 44 días de evolución post-implantación en el pericardio (F). 1. Ápice del corazón. Tinción H&E

Bazo

Un hallazgo frecuente fue la observación de numerosos megacariocitos en todos los animales, tanto controles como en los que recibieron algún tipo de tratamiento. La cuantificación de estas células demostró que había diferencias significativas entre todos los grupos, siendo los ratones del grupo tratado con AS1411 los que tuvieron mayor número de megacariocitos (figura 26).

Los ratones controles (con tumor primario y sin tratamiento) presentan un aumento de megacariocitos (figura 26G) con respecto al bazo de ratón sano (figura 26F); sin embargo, los bazos de ratones que recibieron alguno de los tratamientos tuvieron un incremento significativo de megacariocitos, principalmente con AS1411 (figura 26H) y en menor proporción los tratados con GK-1 (figura 26I) y con la combinación GK-1/AS1411 (figura 26J). Todos los grupos mostraron alteración en la regionalización y distribución de la pulpa blanca y de la pulpa roja, sobre todo en los animales tratados con la combinación GK-1/AS1411 y en menor grado los tratados con GK-1 (figura 26I).

En cuanto al peso del bazo también se observó una diferencia siendo el promedio de peso menor 0.34g para los que recibieron el tratamiento de GK-1, seguido de los tratados con AS1411 con un peso promedio de 0.43g, seguido del grupo control con un peso promedio de 0.53g y finalmente los tratados con la combinación tuvieron un peso promedio de 0.59g.

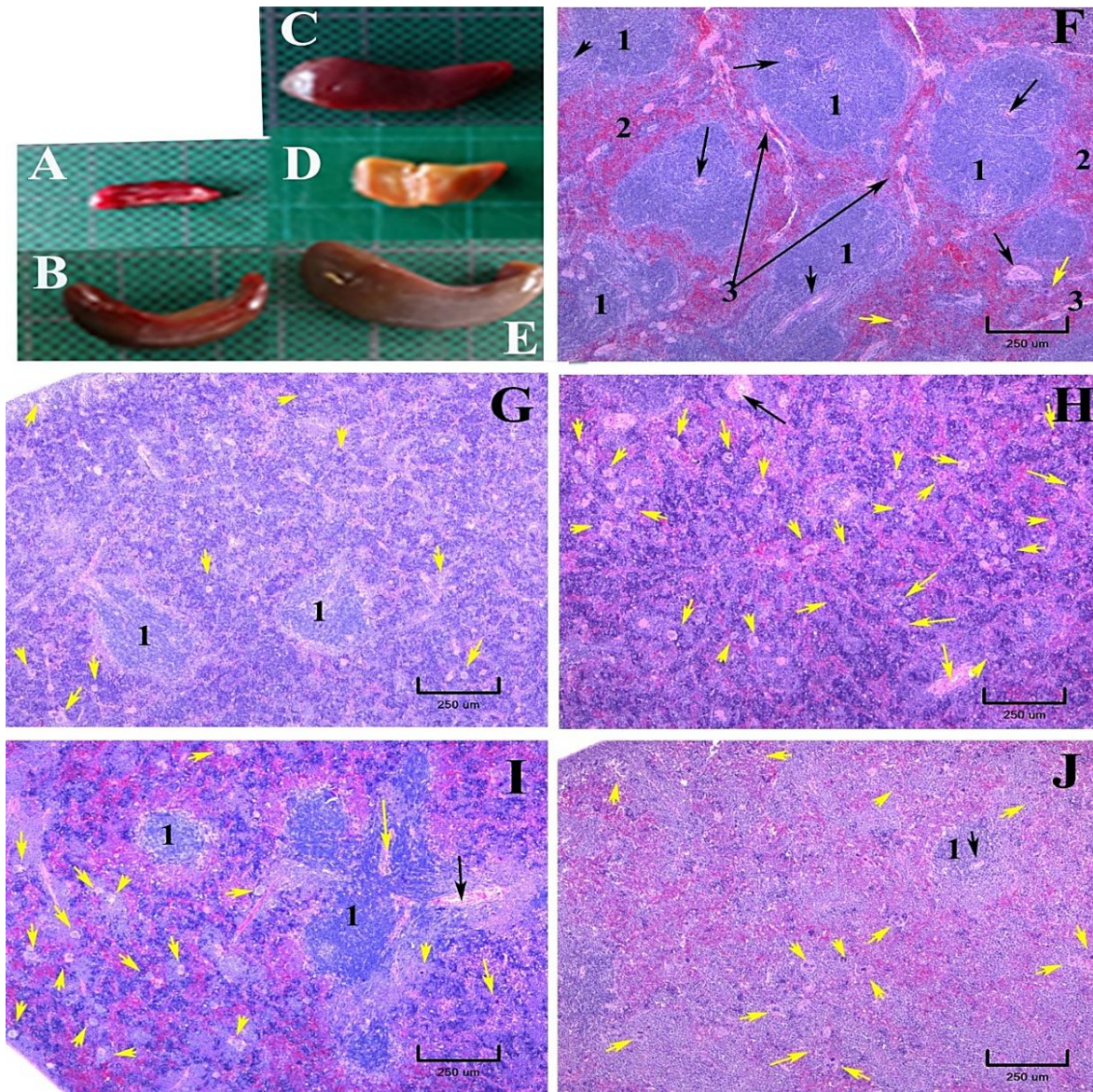
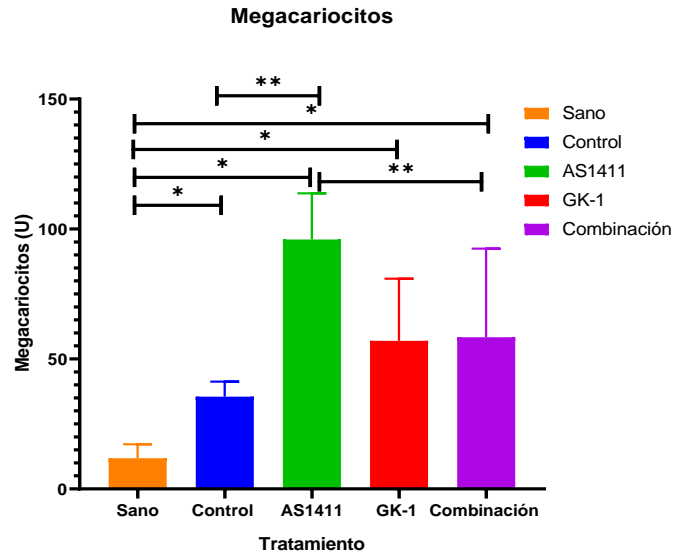


Figura 24. Bazos de ratón C57BL/6 después de la implantación subcutáneas de 2.5×10^4 células LLC. Aspecto macroscópico de bazo de ratón sano (A), de ratón del grupo control y 49 días después de la implantación (B), de ratón tratado con AS1411 y 44 días de evolución postimplantación (C), de ratón tratado con GK-1 y 57 días después de la implantación (D) y de ratón tratado con la combinación GK-1/AS141 y 50 días después de la implantación (E). Compare el aspecto histológico, normal, del bazo de ratón sano (F) con el de los ratones cuyos bazos muestran esplenomegalia (B-D, fondo con cuadrados de 1cm^2). 1. Pulpa blanca, 2. Pulpa roja, 3. Trabécula esplénica. Megacariocitos (flechas amarillas). Flechas negras arteriolas centrales rodeadas de pulpa blanca (Vaina linfática periarteriolar). Tinción H&E.



Gráfica 4. Megacariocitos esplénicos después de la implantación subcutánea de 2.5×10^4 células LLC. Se realizó una ANOVA Kruskal Wallis y una prueba a posteriori de U de Mann Whitney de dos colas $\alpha = 0.05$, y se encontró que existe diferencia significativa entre el número de megacariocitos en los bazo de los ratones sanos y los implantados con LLC (control, AS1411, GK-1 y Combinación, *) y existe diferencia significativa entre el número de megacariocitos de los bazo del grupo control y el grupo tratado con AS1411(**) y el grupo tratado con AS1411 y con Combinación (**).

Regresión lineal múltiple

La regresión lineal múltiple permite generar un modelo lineal en el que el valor de la variable dependiente o respuesta (Y) se determina a partir de un conjunto de variables independientes llamadas predictores ($X_1, X_2, X_3 \dots$).

Los modelos lineales múltiples siguen la siguiente ecuación:

$$Y_i = (\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n)$$

- β_0 : es la ordenada en el origen, el valor de la variable dependiente Y_i cuando todos los predictores son cero.
- β_i : es el efecto promedio que tiene el incremento en una unidad de la variable predictora X_i sobre la variable dependiente Y ,

manteniéndose constantes el resto de las variables. Se conocen como coeficientes parciales de regresión.

El programa GraphPad adicionalmente realiza una prueba F de suma de cuadrados. La prueba F compara la diferencia esperada por casualidad (el obtenido experimentalmente) En esta prueba para afirmar que existe una relación entre las variables la p tiene que ser menor a 0.05 y la F debe encontrarse entre 2 y 21 por los grados de libertad de las muestras.

Análisis de regresión lineal múltiple se asignaron diferentes valores dependiendo del tratamiento que recibió cada grupo de la siguiente manera: Control: 0; Tratado con AS1411: 1; Tratado con GK-1: 2 y Tratado con la combinación: 3

Asignado estos valores se realizaron diferentes análisis de regresión múltiple para buscar si existía una relación entre los diferentes valores obtenidos (peso del tumor, conteo de megacariocitos, área de metástasis implantadas en pulmón, peso del tumor y peso del bazo).

En la relación megacariocitos, peso del tumor y tratamiento se encontró que no existía una relación entre las variables (F: 0.9219, P: 0.4158); en la relación peso del bazo, número de megacariocitos y tratamiento se encontró que no existía relación entre las variables (F:0.1144, P:0.8925); para la relación con el número de megacariocitos, peso del bazo, las metástasis implantadas en los pulmones y el tipo de tratamiento (F: 0.5284 y P: 0.6009), no se encontró relación entre estas variables; para la relación entre el número de megacariocitos, peso del bazo y las metástasis implantadas en pulmón (F: 0.5191, P: 0.4823) no se encontró relación entre las variables. Finalmente se buscó si existía relación entre el tamaño tumoral, peso del bazo y el tratamiento donde

se obtuvo F:14.02 y P:0.00001 por lo que existe relación entre las variables y está representada por la siguiente ecuación:

Ecuación de la recta

Peso del tumor(Y)=10.17+3.92*Peso del bazo (X₁) -2.12*Tratamiento (X₂).

Donde Y es el peso tumoral, 10.17 es la ordenada al origen y el promedio de peso del tumor sin influencia de las variables, 3.92 el promedio del peso del bazo y -2.12 la disminución promedio del tamaño dependiendo del tratamiento.

Por otra parte, se realiza un análisis para cada variable (de manera automática) donde se obtuvo que tiene mayor significancia la variable tratamiento con una p<0.0001, el peso del bazo tiene menor significancia p 0.03111, pero la esplenomegalia sigue teniendo relación el peso del tumor.

De igual forma se realizó un análisis de correlación de Pearson donde se reafirma que el tratamiento tiene influencia sobre el tamaño tumoral con una relación inversa de -0.98 es decir disminuye el tamaño tumoral, se asignaron los mismos números para los tratamientos.

Tabla 7 Test Shapiro-Wilk, análisis de tratamiento y tamaño tumoral

	Grupo	Volumen tumoral
W-stat	0.9939557	0.96768148
p-evaluada	0.97675583	0.827077385
α	0.05	0.05
normal	si	si

Tabla 8 Correlación de Pearson, tratamiento y volumen tumoral

	Grupo	Volumen tumoral
Grupo	1	
Volumen tumoral	-0.98590	1

6. DISCUSIÓN

En este trabajo fue reproducido un modelo murino singénico de carcinoma epidermoide pulmonar de células no pequeñas por implantación heterotópica (subcutánea) de la línea tumoral LLC en ratones singénicos de la cepa C57BL/6. Inicialmente, fue definida la cantidad mínima de células implantadas que indujeran el desarrollo exitoso del tumor, con una sobrevida que permitiera la aplicación de intervenciones terapéuticas con el péptido GK-1 y con el aptámero AS1411. Este abordaje inicial, a manera de un estudio piloto de sobrevida y cantidad de células LLC implantadas no tiene antecedentes en la literatura. Fue identificado que la sobrevida es inversamente proporcional al número de células implantadas, es decir a menor número de células mayor el tiempo de sobrevida con diferencia significativa entre todos los grupos. También observamos que el tamaño del tumor tiene una relación directa con el número de células implantadas; a mayor número de células LLC implantadas mayor volumen tumoral.

Otro hallazgo importante fue la demostración de que la mayoría de las células LLC muestran inmunorreactividad a NCL en el citoplasma y en la membrana. Hasta donde sabemos, esta sería la primera demostración de la expresión de NCL de superficie en la línea celular tumoral LLC. Además, un porcentaje bajo de células tumorales mostró inmunorreactividad a VEGF, un proangiogénico inductor de la fosforilación de la NCL (30) con lo cual NCL favorece la proliferación celular tumoral (29). Estos resultados fueron relevantes para nuestro estudio porque justificó el empleo del aptámero AS1411, el cual se une e inhibe a NCL de superficie de células tumorales, y de células endoteliales de vasos tumorales, ejerciendo efectos antitumorales,

antiangiogénicos y antimetastásicos (32). Lo anterior parece haber ocurrido en los ratones tratados con el aptámero ya que tuvieron menor crecimiento tumoral con respecto a los animales controles. Adicionalmente, la disminución de inmunorreactividad a NCL en las células del tumor primario de ratones tratados con AS1411, sugiere que ocurrió la interacción entre estas dos moléculas y de allí los efectos antitumorales mencionados.

La prueba piloto arrojó otros resultados interesantes. Las tres implantaciones con número de células menores a las que se usan habitualmente para tener un 100% de éxito en la generación de tumor (1×10^6 células, 1×10^7 células) (11,12), también desarrollaron un tumor con 100% de éxito. En el grupo 4, en el que fueron implantadas 1×10^4 células de LLC, únicamente 2 ratones desarrollaron tumor, lo que representa un 33% de éxito. Creemos que este resultado podría ser considerado para el estudio de la respuesta inmunológica en la fase de iniciación y de equilibrio del desarrollo tumoral ya que, al parecer, la respuesta antitumoral de la mayoría de los ratones de este grupo impidió que las células tumorales llegaran a una fase de escape y desarrollaran un tumor primario y metástasis (3). En ninguno de los ratones que desarrollaron tumor hubo regresión tumoral, contrario a lo que se ha reportado (14).

Las características histopatológicas de los tumores primarios, fueron similares a las de un NSCLC poco diferenciado de tipo epidermoide, lo que lo define como una neoplasia maligna (2). Las células del tumor primario desarrollado mostraron inmunorreactividad a NCL en núcleo, citoplasma o en ambos compartimientos celulares. Esto podría estar relacionado con la vascularización prominente observada ya que, NLC tiene efectos proangiogénicos en tumores (29). Sin embargo, algunos de los tumores de mayor tamaño presentaron áreas de necrosis

licuefactiva y ulceración, esto debido a la hipoxia en el área central del tumor.

Un hallazgo histopatológico, al parecer no descrito en trabajos previos en este modelo murino de cáncer pulmonar, fue la observación de células gigantes, con núcleos lobulados o múltiples, ubicados en la periferia celular o en forma de herradura, inmunorreactivas a NCL. Morfológicamente son parecidas a megacariocitos o a células gigantes multinucleadas de granulomas, aunque, dependiendo probablemente del plano de corte, también recuerdan a las células tipo Touton (Figura 24, 25) de tumores cutáneos no epiteliales (34) o a las células Reed-Sternberg (Figura 26) del linfoma de Hodgkin clásico (35). En el pulmón parecen ser las primeras células tumorales en asentarse como metástasis, esto porque se ha descrito que los megacariocitos pueden “imitar” una metástasis (36). El pulmón del ratón contiene megacariocitos de manera constitutiva (37). En este sentido, es probable que algunas de las células que identificamos como metastásicas en realidad correspondan a esas células formadoras de plaquetas. Por otra parte, se ha encontrado que en el 45% de los casos de cáncer de pulmón los megacariocitos se encuentran aumentados en pulmones, así como un aumento en circulación en distintos tipos de cáncer. También se han encontrado megacariocitos en vasos sanguíneos de diferentes órganos como hígado, bazo y ganglios linfáticos (36,38). No obstante, las células gigantes que se encontraron en el presente estudio no están cercanas a un vaso sanguíneo, por lo que esto no explicaría su presencia en otros sitios de metástasis, sugiriendo que se trata de verdaderas células tumorales circulantes (CTC) o metastásicas.

Además de las células gigantes, se encontraron focos de neutrófilos que podrían estar favoreciendo el desarrollo de metástasis. Algunos estudios han demostrado que los neutrófilos estabilizan la adhesión de las CTC a

la microvasculatura pulmonar y facilitan la formación de metástasis pulmonares, en donde los neutrófilos actúan como un puente que une las CTC al endotelio del sitio de metástasis, o mediante la secreción de factores solubles que activarían las células endoteliales y parenquimatosas, mejorando la adhesión de CTC en sitios distantes (39).

El hallazgo de este tipo celular en el tumor primario del modelo murino de carcinoma epidermoide y en las metástasis, ameritaría analizarse ya que si se trata de megacariocitos con actividad trombocitopoyética, el incremento de plaquetas circulantes podría estar implicado en el desarrollo de la enfermedad ya que ejercen las plaquetas acciones mitogénicas que estimulan el crecimiento tumoral, la angiogénesis, la intravasación de células tumorales, el arresto celular, la extravasación a distancia y las metastasis (40).

Todas las metástasis, excepto las pericárdicas, presentaron estas células gigantes. Notablemente, estas células gigantes del tumor primario disminuyeron en número con todos los tratamientos.

De acuerdo con los resultados del estudio piloto, la implantación de 2.5×10^4 células LLC fue elegida como la más apropiada para los estudios subsecuentes de intervenciones terapéuticas, ya que se observó una mayor media de supervivencia, con desarrollo de metástasis a pulmones, corazón e hígado, reproduciendo un buen modelo de cáncer pulmonar, y permitiría un mayor tiempo de uso de los tratamientos.

A pesar de que los tratamientos no aumentaron la supervivencia, ni disminuyeron el número de metástasis a pulmón, sí produjeron una disminución del crecimiento tumoral. Esto es relevante ya que se traduce a una mejor calidad de vida para el ratón al tener menor dificultad para moverse y por ende poder alimentarse debido a que el

alimento se encuentra en la parte superior de la caja en la que se mantienen durante el desarrollo del protocolo. Todos los tratamientos, en comparación con el control, tienen una diferencia significativa en el crecimiento tumoral por lo que se puede atribuir al tratamiento y no a una regresión tumoral espontánea. Los ratones tratados con la combinación de GK-1 y AS1114 fueron los que tuvieron menor crecimiento tumoral.

Con la ecuación de la recta obtenida $Y=10.17+3.92*\text{Tamaño del bazo}(\beta_1) -2.12*\text{Tratamiento}(\beta_2)$ se encontró la relación con el peso tumoral, peso del bazo y tratamiento; así, se obtuvo que el tamaño tumoral aumenta con la esplenomegalia y disminuye con los tratamientos, teniendo este último factor mayor efecto en la disminución del crecimiento tumoral.

La mayoría de los modelos murinos de cáncer cursan con esplenomegalia. El bazo crecido es un nicho de generación extramedular de células mieloides supresoras y hay una relación inversa entre esplenomegalia y sobrevida. Sin embargo, existe controversia sobre los efectos antitumorales de la esplenectomía en modelos experimentales de cáncer (41–44). Las principales causas de esta situación podrían ser el tipo de cáncer en el modelo murino, la administración de terapias antitumorales concomitantes y el momento de la esplenectomía con relación a la proporción entre el tamaño del bazo y el tumor.

Adicionalmente, el bazo puede ser un sitio de metástasis, contrario a la idea de “la resistencia del bazo a las metástasis”. Es interesante que en estudios de autopsias las metástasis esplénicas ocurrieron en un 7% de los casos, siendo el cáncer de mama, el cáncer pulmonar y el melanoma los orígenes primarios más comunes. En algunos casos de humanos, la esplenomegalia es la primera manifestación clínica de metástasis (45).

Aunque la esplenomegalia por metástasis esplénicas es rara, puede ser clínicamente significativa, especialmente cuando la metástasis es solitaria y no forma parte de la enfermedad generalizada. Ante una situación clínica de este tipo entorno clínico, se han realizado tratamientos agresivos, con esplenectomía seguida de un tratamiento de modalidad combinado para prevenir la diseminación de la enfermedad, como lo sugiere el resultado del incremento en la supervivencia de pacientes de más de 2 años, y uno de hasta 12 años después de la esplenectomía. Los pacientes que solo recibieron radioterapia en el área involucrada del bazo, no tuvieron recurrencia local pero finalmente murieron de metástasis distantes (46).

La evaluación clínica deficiente y no tener la sospecha del involucramiento del bazo en pacientes con cáncer puede explicar, en parte, que se desestime la participación de este órgano en la evolución y pronóstico de un paciente con cáncer.

El agrandamiento esplénico en pacientes con melanoma se encontró en el 50% de los pacientes con las exploraciones hepáticas y del bazo, pero el bazo no pudo palparse en la mayoría.

De acuerdo con lo anterior, la esplenomegalia puede ser un componente de diferentes tipos de cáncer, por la reactividad hematopoyética extramedular inducida por factores de crecimiento y citocinas producidas por las células tumorales del tumor primario y por células metastásicas en el bazo.

En un modelo murino inducido con 2×10^6 células implantadas por la línea celular LLC, la esplenectomía inhibió significativamente el crecimiento tumoral (44). La perspectiva de seguir analizando el papel de bazo en el desarrollo y pronóstico del cáncer en los modelos animales es interesante y fortalecería otras vertientes terapéuticas.

7. CONCLUSIONES

- ✓ La sobrevivencia de los ratones está relacionada inversamente con el número de células LLC implantadas subcutáneamente, la cual reproduce un carcinoma pulmonar de células no pequeñas, tipo epidermoide, poco diferenciado acompañado de células gigantes similares a megacariocitos, esplenomegalia y un aumento en los megacariocitos del bazo
- ✓ Las concentraciones de 7.5×10^4 , 5×10^4 y 2.5×10^4 células de Lewis Lung Carcinoma inducen un modelo de cáncer de pulmón con un 100% de éxito de implantación y sin regresión tumoral.
- ✓ La mayor media de sobrevivencia fue de 35.5 días con 2.5×10^4 células LLC implantadas.
- ✓ Las células de la línea celular Lewis Lung Carcinoma expresan NCL en el citoplasma y membrana celular, y VEGF.
- ✓ Los tratamientos de GK-1, AS1411 y la combinación de estos disminuyen el crecimiento tumoral pero no aumentan la sobrevivencia en el modelo de cáncer de pulmón murino inducido por la línea celular Lewis Lung Carcinoma.
- ✓ Existe una relación con el peso tumoral, peso del bazo y tratamiento que recibió el ratón dada por la ecuación $Y = 10.17 + 3.92 * \text{Tamaño del bazo}(\beta_1) - 2.12 * \text{Tratamiento}(\beta_2)$.
- ✓ El aptámero AS1411 disminuye la expresión de NCL en los tumores primarios.

8. PERSPECTIVAS

- Repetir el modelo con una dosificación más frecuente de todos los tratamientos, al menos dos veces por semana además de modificar la vía de administración.
- Realizar multiplex para conocer los valores séricos de TNF α , VEGF, b-FGF, GM-CSF, IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-17, IL-22, IL-23, CXCL9 y poder elucidar como están interactuando los tratamientos con el sistema inmunológico de los ratones con tratamiento
- Realizar una inmunohistoquímica antiCD61 para saber si las células grandes presentes en los tumores primarios y metástasis se tratan de megacariocitos.
- Esplenectomía sola y con los diferentes tratamientos

9. ANEXO

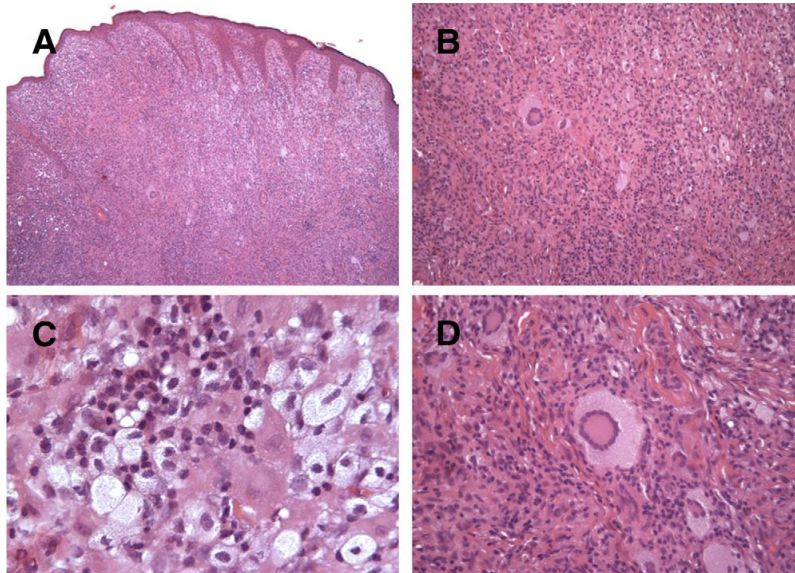


Figura 25 Xantogranuloma juvenil, que muestra una población heterogénea con células mononucleadas y multinucleadas (A). Células gigantes tipo Touton (B y D) están presentes junto con células espumosas, linfocitos y pocos eosinófilos y neutrófilos (C)(47).

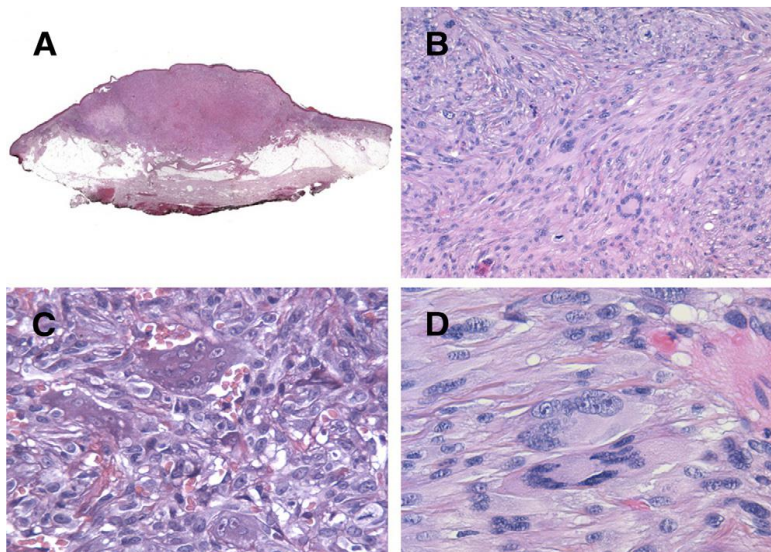


Figura 26 Fibroxantoma atípico. Neoplasia nodular superficial localizada en la piel dañada por el sol (A), compuesta de huso pleomórfico y células similares a histiocitos (B y D), con numerosas células multinucleadas extrañas (B y D), y ocasionalmente con células similares a osteoclastos (C)(47).

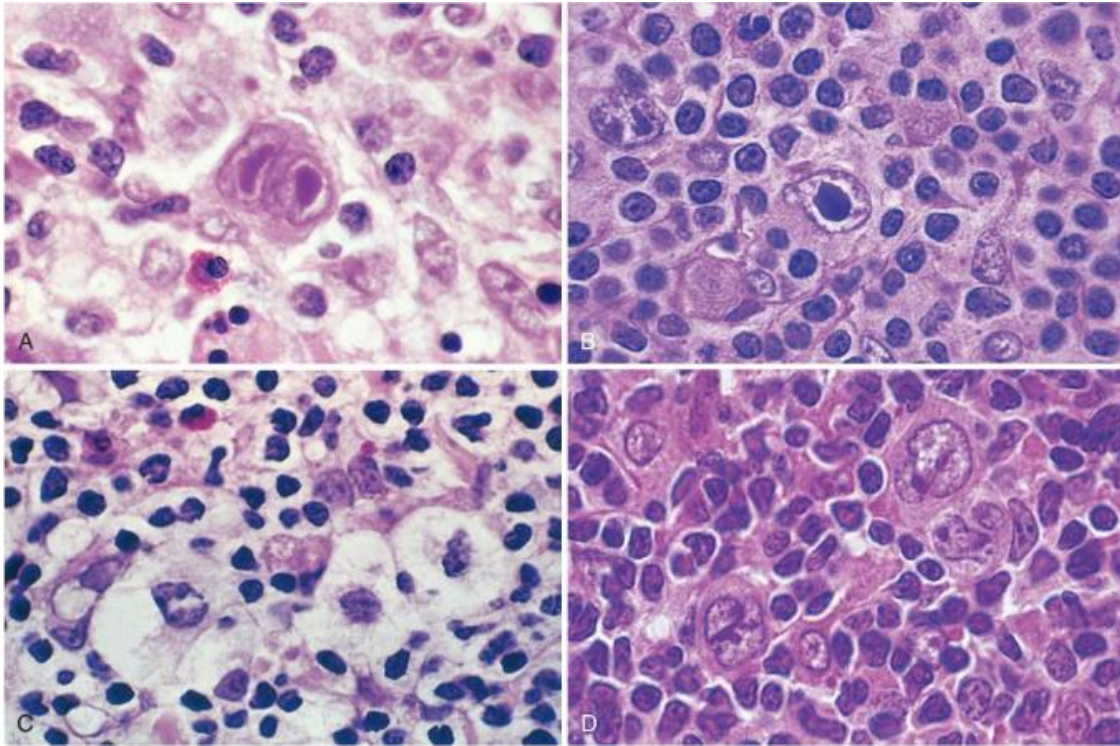


Figura 25 Células Reed-Sternberg y sus variantes. A) Células de Reed-Sternberg diagnóstica con dos lóbulos nucleares, grandes nucléolos a modo de inclusiones y abundante citoplasma, que se rodea de linfocitos, macrófagos y un eosinófilo. B) Célula de Reed-Sternberg, variante mononuclear. C) Célula de Reed-Sternberg, variante lacunar. En esta variante la célula tiene un núcleo plegado o multilobulado y se localiza dentro de un espacio abierto, que corresponde a un artefacto generado por la rotura del citoplasma al cortar el tejido. D) Célula de Reed-Sternberg, variante linfohistocítica, Se reconocen varias células de este tipo con membranas nucleares muy plegadas, pequeños nucléolos, cromatina fina y un citoplasma pálido abundante (Kumar, Abbas, Fausto, & Jon C, 2010).

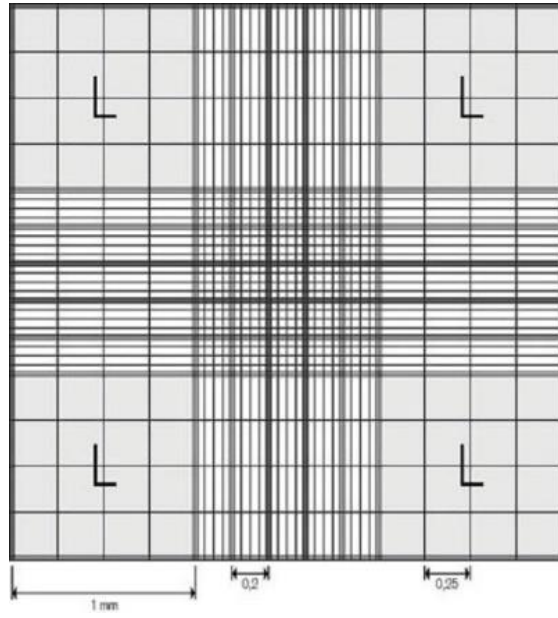


Figura 28 Cámara de Neubauer

10. REFERENCIAS

1. Ira Fox S. Sistema inmunitario. In: Fisiología Humana. Ciudad de México: McGrawHill; 2013. p. 493–530.
2. Guido M, Joris I. Part V Tumors. In: Cells, Tissues, and Disease. 2004. p. 730–935.
3. Yopez SH, Pérez RL, Vega MI. Respuesta inmunológica a tumores. In: Inmunología molecular, celular y traslacional. 2016. p. 508–23.
4. WHO. Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, worldwide, both sexes, all ages. Cancer Today [Internet]. 2018;2018. Available from: http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=15&grou
5. Ruíz-Godoy L, Rizo Rios P, Sánchez Cervantes F, Osornio-Vargas A, García-Cuellar C, Meneses García A. Mortality due to lung cancer in Mexico. Lung Cancer. 2007 Nov;58(2):184–90.
6. Gómez-Dantés H, Lamadrid-Figueroa H, Cahuana-Hurtado L, Silverman-Retana O, Montero P, González-Robledo MC, et al. The burden of cancer in Mexico, 1990-2013. Salud Publica Mex. 2016;58(2):118–31.
7. Zamora DE, Cristina Á/, Padilla R, Trejo Ávila L, Zapata P, El B, et al. EL CÁNCER DE PULMÓN Y LA TERAPIA GÉNICA. Cienc UANL. 2006;IX(Monterrey, México):236–40.
8. Aliya N. Husain. The lung. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Cotran RS, editors. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Elsevier; 2015. p. 670–724. Available from: <https://www.elsevier.com/books/robbins-and-cotran-pathologic-basis-of-disease/kumar/978-1-4557-2613-4>
9. Bhutia SK, Maiti TK. Targeting tumors with peptides from natural sources. Trends Biotechnol. 2008 Apr;26(4):210–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016777990800053X>
10. Rosenblueth A. Método Científico. Ciudad de México: La presa

medica mexicana; 1971. 94 p.

11. Kellar A, Egan C, Morris D. Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical Trial Applications. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26064932>
12. Rashidi B, Yang M, Jiang P, Baranov E, An Z, Wang X, et al. A highly metastatic Lewis lung carcinoma orthotopic green fluorescent protein model. *Clin Exp Metastasis.* 2000;18(1):57–60.
13. Sugiura K, Chester Stock C, Sugiura M. Studies in a tumor spectrum. VIII. The Effect of Mitomycin C on the Growth of a Variety of Mouse, Rat and Hamster Tumors. *Cancer.* 1959;5(5):979–91.
14. Sugiura. Studies in a Tumor Spectrum III. The Effect of Phosphoramides on the Growth of a Variety of Mouse and Rat Tumors* KANEMATSU SUGIURA AND C. CHESTER STOCK WITH THE ASSISTANCE OF MITONOM. 1954.
15. duPre' SA, Hunter KW. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: Association with tumor-derived growth factors. *Exp Mol Pathol.* 2007;82(1):12–24.
16. Pérez-Torres A, Vera-Aguilera J, Hernaiz-Leonardo JC, Moreno-Aguilera E, Monteverde-Suarez D, Vera-Aguilera C, et al. The Synthetic Parasite-Derived Peptide GK1 Increases Survival in a Preclinical Mouse Melanoma Model. *Cancer Biother Radiopharm.* 2013 Nov 7;28(9):682–90. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/cbr.2012.1438>
17. Torres-García D, Pérez-Torres A, Manoutcharian K, Orbe U, Servín-Blanco R, Fragoso G, et al. GK-1 peptide reduces tumor growth, decreases metastatic burden, and increases survival in a murine breast cancer model. *Vaccine.* 2017;35(42):5653–61.
18. Jiang C, Lin X, Zhao Z. Applications of CRISPR/Cas9 Technology in the Treatment of Lung Cancer. Vol. 25, *Trends in Molecular Medicine.* Elsevier Ltd; 2019. p. 1039–49.
19. Sadhasivam J, Sugumaran A. Magnetic nanocarriers: Emerging tool for the effective targeted treatment of lung cancer. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2020 Feb;55:101493. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224719317459>
20. Marqus S, Pirogova E, Piva TJ. Evaluation of the use of therapeutic

peptides for cancer treatment. *J Biomed Sci* 2017 Dec 21;24(1):21. Available from:
<http://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-017-0328-x>

21. Bobes RJ, Navarrete-Perea J, Ochoa-Leyva A, Anaya VH, Hernández M, Cervantes-Torres J, et al. Experimental and Theoretical Approaches To Investigate the Immunogenicity of *Taenia solium*-Derived KE7 Antigen. Appleton JA, editor. *Infect Immun*. 2017 Dec;85(12). Available from:
<http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.00395-17>
22. Vera-Aguilera J, Perez-Torres A, Beltran D, Villanueva-Ramos C, Wachtel M, Moreno-Aguilera E, et al. Novel Treatment of Melanoma: Combined Parasite-Derived Peptide GK-1 and Anti-Programmed Death Ligand 1 Therapy. *Cancer Biother Radiopharm*. 2017;32(2):49–56.
23. Pérez-Torres A, Vera-Aguilera J, Sahaza JH, Vera-Aguilera C, Moreno-Aguilera E, Pulido-Camarillo E, et al. Hematological effects, serum, and pulmonary cytokine profiles in a melanoma mouse model treated with GK1. *Cancer Biother Radiopharm*. 2015;30(6):247–54.
24. Nimjee SM, Rusconi CP, Sullenger BA. Aptamers: An Emerging Class of Therapeutics. *Annu Rev Med*. 2005 Feb;56(1):555–83.
25. Ireson CR, Kelland LR. Discovery and development of anticancer aptamers. Vol. 5, *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006. p. 2957–62.
26. Bates PJ, Laber DA, Miller DM, Thomas SD, Trent JO. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp Mol Pathol* [Internet]. 2009;86(3):151–64. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.01.004>
27. Morita Y, Leslie M, Kameyama H, Volk DE, Tanaka T. Aptamer Therapeutics in Cancer: Current and Future. *Cancers (Basel)*. 2018 Mar 19;10(3). Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29562664>
28. Reyes-Reyes EM, Šalipur FR, Shams M, Forsthoefel MK, Bates PJ. Mechanistic studies of anticancer aptamer AS1411 reveal a novel role for nucleolin in regulating Rac1 activation. *Mol Oncol*. 2015 Aug 1;9(7):1392–405. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157478911500>

29. Srivastava M, Pollard HB. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J*. 1999;13(14):1911–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10544174>
30. Figg WD, Folkman J. *Angiogenesis: An Integrative Approach from Science to Medicine - Google Libros*. 2008. p. 132. Available from: <https://books.google.com.mx/books?id=bkaiJabpguUC&pg=PA132&lpg=PA132&dq=VEGF+y+su+relaci3n+con+nucleolina&source=bl&ots=uyx93hlpZu&sig=ACfU3U3DejD9maAIC6zzEKUgrgCqt-q4Eg&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKewjgnqvJ0YzqAhVR7qwKHfzkBzcQ6AEwAnoECACQAQ#v=onepage&q=VEGF+y>
31. Ding Y, Song N, Liu C, He T, Zhuo W, He X, et al. Heat shock cognate 70 regulates the translocation and angiogenic function of nucleolin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Sep;32(9):e126-34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22743058>
32. Rosenberg JE, Bambury RM, Van Allen EM, Drabkin HA, Lara PN, Harzstark AL, et al. A phase II trial of AS1411 (a novel nucleolin-targeted DNA aptamer) in metastatic renal cell carcinoma. *Invest New Drugs*. 2014;32(1):178–87.
33. *Conducting Research | Research Support*. Available from: <https://www.bu.edu/researchsupport/project-lifecycle/conducting-research/>
34. Workman P, Balmain A, Hickman J, McNally N, Mitchison N, Pierrepont C, et al. United Kingdom Comordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia (Second Edition). *Br J Cancer*. 1998;77:1–10.
35. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Jon C A. Enfermedades de los leucocitos, ganglios linfáticos, bazo y timo. In: González JF, Fernández-Aceñero MJ, editors. *Robbins and Cotran Patología estructural y funcional*. España: Elsevier; 2010. p. 618.
36. Wilsher MJ, Bonar SF. Megakaryocytes in axillary lymph nodes mimicking metastatic breast carcinoma following neoadjuvant chemotherapy and Herceptin. *Pathology*. 2014;46(5):453–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/PAT.000000000000130>
37. Zucker-Franklin D, Philipp CS. Platelet production in the pulmonary

capillary bed: New ultrastructural evidence for an old concept. *Am J Pathol.* 2000;157(1):69–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10880377/>

38. Augusto Soares F. Increased numbers of pulmonary megakaryocytes in patients with arterial pulmonary tumour embolism and with lung metastases seen at necropsy F A Soares. Vol. 45, *J Clin Pathol.* 1992.
39. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest.* 2013 Aug 1;123(8):3446–58.
40. Menter DG, Kopetz S, Hawk E, Sood AK, Loree JM, Gresele P, et al. Platelet “first responders” in wound response, cancer, and metastasis. Vol. 36, *Cancer and Metastasis Reviews.* Springer New York LLC; 2017. p. 199–213. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28730545/>
41. Prehn RT. The paradoxical effects of splenectomy on tumor growth. Vol. 3, *Theoretical Biology and Medical Modelling.* BioMed Central; 2006. p. 23. Available from: </pmc/articles/PMC1538594/?report=abstract>
42. Sonoda K, Izumi K, Matsui Y, Inomata M, Shiraishi N, Kitano S. Decreased growth rate of lung metastatic lesions after splenectomy in mice. *Eur Surg Res.* 2006 Oct;38(5):469–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16940732/>
43. Higashijima J, Shimada M, Chikakiyo M, TOMOHIKO M, KOZO Y, MASANORI N, et al. Effect of splenectomy on antitumor immune system in mice. *Anticancer Res.* 2009;29:385–93.
44. Levy L, Mishalian I, Bayuch R, Zolotarov L, Michaeli J, Fridlender ZG. Splenectomy inhibits non-small cell lung cancer growth by modulating anti-tumor adaptive and innate immune response. *Oncoimmunology.* 2015;4(4). Available from: </pmc/articles/PMC4485806/?report=abstract>
45. Morgenstern L, Rosenberg J, Geller SA. Tumors of the spleen. *World J Surg.* 1985 Jun;9(3):468–76. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01655283>
46. Klein B, Stein M, Kuten A, Steiner M, Barshalom D, Robinson E, et al. Splenomegaly and solitary spleen metastasis in solid tumors. *Cancer.* 1987;60(1):100–2. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3581023/>

47. Gómez-Mateo M del C, Monteagudo C. Nonepithelial skin tumors with multinucleated giant cells. *Semin Diagn Pathol.* 2013 Feb 1;30(1):58–72.