



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CUANTIFICACIÓN DE “HUMAN HEDGEHOG INTERACTING  
PROTEIN” DURANTE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMA  
INDUCIDA POR TGF- $\beta$ 1 EN CÉLULAS A549**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**MENA MUÑOZ TANIA ISADORA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
LOURDES MARÍA BARRERA RAMÍREZ**

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

1. Datos del alumno

Mena  
Muñoz  
Tania Isadora  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
305582777

2. Datos del tutor

Dra.  
Lourdes María  
Barrera Ramírez

3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Jorge Antonio  
García Álvarez

4. Datos del sinodal 2

Dr.  
José Guadalupe  
Cisneros Lira

5. Datos del sinodal 3

M. en C.  
Lilia Carina  
Becerril Berrocal

6. Datos del sinodal 4

M. en C.  
Iliana  
Herrera Fuentes

7. Datos del trabajo escrito

Cuantificación de "Human Hedgehog Interacting Protein" durante la transición epitelio-mesénquima inducida por TGF- $\beta$ 1 en células A549.

2017

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por todos los conocimientos adquiridos durante la carrera, las facilidades obtenidas en la Facultad de Ciencias y a todo el personal con el que alguna vez tuve contacto que me permitió tener un buen desarrollo durante mis estudios y seguir motivándome a continuar con el amor a la biología, particularmente a todos mis maestros.

Al Dr. Franck Raúl Gio por ser uno de los mejores maestros durante la licenciatura, además de ser humano el cual siempre me ha impulsado a continuar y creer en mis capacidades. Gracias por su confianza y amor.

Al Dr. Sour Tovar y su esposa por siempre tener una sonrisa a mi persona y creer en mis capacidades. Gracias por el conocimiento adquirido.

A la profra. Claudia Karina Torres por haberme involucrado con uno de los mejores temas que me apasionaron durante la carrera y me llevaron a la determinación de mi tema de especialización así como su excelente impartición de Biología del Desarrollo.

A la Dra. Lourdes Segura y al Dr. Luis Felipe por siempre tener tiempo para mí. Por considerarme capaz y creer en mí. Gracias por sus atenciones, sonrisas y momentos compartidos. Siempre tendrán un lugar especial para mí, además de admirarlos por sus conocimientos, por su gran valor humano.

Al Dr. Pepe Cisneros por todo el apoyo, conocimientos recibidos durante el taller Inmunología Molecular del Pulmón y después de este. Gracias por creer en mis capacidades y conocimientos durante este tiempo y en los que vienen a futuro, además de ello gracias por la calidez humana que siempre mostró hacia mí para continuar con los sueños y seguir adelante.

A la Dra. Lourdes María Barrera Ramírez por los conocimientos adquiridos durante el taller Inmunología Molecular del Pulmón, permitirme proponer un proyecto a desarrollar para tesis y financiarlo. También por inculcarme el interés a la Divulgación Científica la cual ahora considero parte importante en mi formación y desarrollo.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por haberme brindado las condiciones e instalaciones necesarias para llevar a cabo mi proyecto de tesis, así

como el personal que con el cual tuve la oportunidad de convivir, el cual siempre tuvo una sonrisa que brindarme.

Al laboratorio de Inmunología Integrativa del INER, particularmente a la Dra. Isabel Sada Ovalle y Lesly Chávez por todas las atenciones y conocimiento adquirido.

A Erick Alejandro García Trejo por haberme brindado material literario, ser un gran maestro y demostrar su pasión por la biología la cual contagia y ser un amigo el cual cree en mis capacidades y aptitudes. Gracias por seguir contagiándome de seguir con los sueños!

Al laboratorio de Biología Molecular del INER por haberme adoptado por unos meses, contarme como uno de ustedes y haberme permitido realizar experimentos.

Al Instituto Nacional de Cancerología por haber permitido tener facilidad de tomar clases dentro del instituto, así como de poder analizar muestras en sus citómetros y obtención de muestras.

A la Dra. Iliana por haberme escuchado y haberme brindado palabras e intercambiado experiencias. Ily muchas gracias por este tiempo brindado y creer en mi.

Al Dr. Jorge que aunque solo fue una plática corta, me brindó mucha confianza en mi para hacerlo mejor y de igual forma por escucharme.

Dra. Carina gracias por los Ab's utilizados y además de ello su sencillez y carisma. De igual forma por escucharme y querer que se diera lo mejor de principio a fin.

"It is not birth, marriage or death, but gastrulation which is truly the most important time in your life."

Lewis Wolpert

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

“A mi me encanta Dios. Ha puesto orden en las galaxias y distribuye bien el tránsito en el camino de las hormigas. Y es tan juguetón y travieso que el otro día descubrí que ha hecho –frente al ataque de los antibióticos- ¡bacterias mutantes!”

*Fragmento: “Me encanta Dios”*

**Jaime Sabines**

Ha sido un largo camino con un poco de todo alegrías, tristezas, pero sobretodo mucho mucho aprendizaje en muchos aspectos. Como refería un gran profesor de mi infancia (Rodolfo) “Todos a su paso, pero al final llegaron a la meta” y hoy en día vaya que lo veo reflejado, gracias a Dios primero que nada por permitirme estar, vivir, sentir y compartir con mis seres amados esta felicidad y las que vienen. Así como de las miles de bendiciones que siempre me provee.

En memoria

"Cancer may have started the fight, but I will finish it."

María Georgina Muñoz León, no perdiste una batalla... ganaste todas. Gracias por todo lo que nos diste en vida, en lo personal la perspectiva que me diste de la vida en el momento en el que más lo necesitaba, me nutriste, abriste mis ojos... en pocas palabras me salvaste. Siempre estaré vastamente agradecida por ello y siempre lo reconoceré con orgullo y amor. Estés donde estés nos sigues llenando de amor, protección y sobretodo nos dejas tu bello legado que conjunto a mi tío formaste y son su mayor bendición mis primos. En ellos se reflejan tus esfuerzos, tu dedicación, tu pasión, tu coraje, tus luchas, tus miedos, tus derrotas pero sobretodo tu amor, amor incomparable que siempre se vio demostrado de mil y un formas; lo más bello este se seguirá transmitiendo de generación en generación. Me siento afortunada de haberte conocido y vivido experiencias únicas, de llevar la misma sangre pero sobretodo de portar los mismos valores, amor y espiritualidad.

Te dedico este trabajo y los que vienen porque eres una guerrera, porque todo el tiempo fuiste valiente a pesar de algunas caídas siempre mostraste una buena cara a la vida, un gran ejemplo a seguir, continuar luchando por lo que uno ama lo que a uno le apasiona a siempre tener una sonrisa en cualquier adversidad, a reírse de la vida y en la vida.

Así fuiste y ERES ejemplo para muchas mujeres que sufren esta enfermedad y así como para los que no la sufren. Se totalmente muchas de ellas tomarán tu ejemplo de fuerza, valentía y amor. En lo personal me has hecho más fuerte y me comprometo a aportar lo más o mínimo que sea para que muchas y muchos conozcan de ti, aprendan de tu ejemplo, luchen y no se den por vencidos. No es casualidad que yo

haya llegado a este camino, a aportar a la investigación contra cáncer ahora más que nunca estoy convencida de la misión de vida que tengo y de nueva cuenta ten por seguro que haré lo más que esté en mis posibilidades humanas para que TU mensaje llegue al mayor número de corazones. Siempre serás emblema de mi trabajo y como te caracterizaba será con una gran sonrisa, humor y carisma. Te amo por siempre y gracias por todo de corazón <3.

La cosa más importante en la enfermedad es no perder nunca corazón.-Nikolai Lenin.

Toughness is in the soul and spirit, not in muscles. ~Alex Karras

A mis padres Beatriz Alicia Muñoz León y León Mena Córdova gracias por todo lo que me han brindado desde que estuve en su brazos para tener una formación completa en todo el contexto de lo que ello representa. Pero sobre todo gracias por su amor, valores, confianza, admiración, apoyo que me han dado día a día. Por creer en mis capacidades, por darme la libertad de aprender y tomar mis decisiones, aprender de mis errores levantarme y caerme. Porque aunque sabiendo que no han sido las correctas siempre han estado ahí para darme la mano cuando lo he necesitado. No los defraudaré y por siempre estaré infinitamente agradecida porque sean mis padres, me siento orgullosa de ser su hija y les agradezco por el legado más bello que me pudieron dar además de la vida, mi educación. De corazón infinitas gracias.

A mi hermana Tamara Christian, te amo con todo mi corazón. No se que haría sin ti, durante estos 28 años de vida compartiendo nuestros logros, nuestras derrotas y en general la vida. Eres un ser de gran importancia en mi vida y nunca quiero que te vayas, se que nunca lo harás. Gracias por todo lo que he aprendido de ti por el apoyo que me has brindado en momentos de crisis que han surgido. Te admiro por todo lo que eres, el ejemplo de pasión y amor que le tienes a lo que amas hacer. Gracias por tu paciencia y enseñanzas. Vamos por más cosas bellas, te quiero por siempre mi enano.

A mi familia que aunque estemos lejos siempre nos hemos mantenido unidos. Los amo mucho mucho en verdad no saben cuanto Milo, Ulises, Yajna, Idania, Shawn, Tío Lucio, Isabella, Dante y Khayali. Gracias por siempre recibirnos con mucho amor y darnos todo su amor ! Ustedes han sido parte importante de este desarrollo a motivarme, creer en mi y de igual forma como grandes ejemplos de superación como lo son ustedes. Gracias siempre por todo, los extraño con todo mi corazón pero siempre estamos y estaremos unidos. Gracias a Chabe y Dante en especial por

llenarme de brillo y luz para continuar y echarle mil ganas, no saben lo bien que me hicieron.

A mi familia espiritual que adoro con todo mi corazón! Giovanna, Sra. Gloria, Sr. Leonardo Fernanda, Eli, Libi, Rafa y Reno. Ustedes se han convertido en una parte fundamental en mi vida! Gracias a Dios por haberlos puesto en mi camino! No tengo más que palabras de agradecimiento de corazón. Gracias por siempre tener el tiempo el amor y la dedicación para levantarme e impulsarme a continuar. Siempre tendrán un lugar en mi corazón y vida esté en donde esté! Nelly Cid Rocha y Guadalupe Colín las incluyo en este apartado ya que son parte de ella, agradezco infinitamente toda la luz y fuerza que me dan día con día para seguir adelante. Gracias por creer en mí y en lo que soy, siempre estaré para ustedes y recuerden nada es casualidad. Las adoro de corazón. Mi adorado A. Miguel que siempre me ha cuidado y protegido te amo de corazón gracias por tu amor y bendiciones.

A Giovanna Díaz del Toro, infinitas gracias por ser mi amiga! Mi hermana. No tengo palabras para describir lo orgullosa que me siento de ser tu amiga y poder compartir bellos momentos a tu lado y al mismo tiempo ir creciendo. Agradezco en todo lo que me has apoyando de diversas y mil maneras y así mismo por el gran ejemplo que siempre me has dado. Eres una gran mujer te admiro y te quiero y siempre estaremos juntas hasta trascender recuérdalo siempre!!! Agradezco por el gran valor de la amistad y por poder creer en el, se que si estamos lejos de igual forma nunca lo estaremos porque va mas allá de. Best friends till the end no matter distance <3

Mi adorada Kat Munguía gracias por siempre estar a mi lado además de ser mi hermana gracias por todas las buenas experiencias que hemos compartido. Más allá de todo crecido conmigo en este tiempo a través de pérdidas y ganancias. Eres un ser del cual he aprendido a saber que los cambios son tangibles, siempre estaremos juntas! De corazón agradezco porque estemos compartiendo este momento de vida, así que venga que alguien tiene que prescribirme siempre te amo ! Gracias por siempre cuidarme y procurarme. Best friends till the end no matter distance <3

Mi adorada Mayarí no tengo más que agradecer por todos los momentos increíbles y memorables que hemos vivido! Esas pláticas duraderas y el crecimiento que hemos enfocado. He encontrado en ti un ser sumamente especial y siempre estaré para ti. Eres mi hermana y me siento realmente bendecida por compartir algo muy grande lo que es esa experiencia de amor lejano. Ahora que estas allá no me queda duda aún



más que no importa que tan lejos estés de alguien, siempre que ambas partes quieran el amor se mantendrá. Siempre juntas por siempre de corazón. Best friends till the end no matter distance <3 Gracias a ti y a Alden por todo los quiero mucho.

A mis padrinos Enriqueta Olivares y Rubén Muñoz conjunto con mi primo Rubi, siempre han estado pendiente de como estamos y que haremos, así como de nuestros logros. Gracias por compartir bellos momentos con nosotros!

A mi tío Eduardo Muñoz, María Laura Muñoz Barrera, Dany, Pau por siempre tener una sonrisa y haberse interesado siempre de nuestros logros. En particular tío gracias por creer en mi! Y por las bellas experiencias compartidas juntos.

A mis primos Ana Muñoz, Memo y Pollo por siempre hacerme el mejor bullying del mundo pero al mismo tiempo creer en mi! Siempre estar al pie del cañón y apoyarme! Los quiero muchísimo, no sería lo mismo sin ustedes de corazón gracias infinitas!

Lore, Su, Andre, Betito y Pao gracias por las experiencias compartidas durante estos años de arduo trabajo el estar con ustedes me ayudó a que todo fuera más leve! Gracias por la diversión y amor!

Tías Paty y Lety gracias de corazón por siempre compartir con mi familia y conmigo su alegría y festejos! Las quiero mucho, gracias por ayudarme a quitar el estrés con tan emotivos momentos y su amor!

A la familia Labandeira Fresnedo en particular a Alfonso Labandeira por haber compartido gran parte de mis logros durante esta etapa de mi vida y haber aprendido en mil y un formas. Siempre tendrás un lugar especial, gracias a toda tu familia por todo el apoyo recibido y los bellos momentos compartidos. Siempre deseándoles lo mejor de corazón, bendiciones.

Angeles García Vicente eres literal un ángel para mí, compartimos miles de experiencias juntas de tono académico, pero más allá de solo eso te convertiste en alguien muy especial gracias por las largas pláticas y el apoyo que siempre recibí de tu parte. Siempre estaré para ti de corazón este donde este !

Fer Toscano mil e infinitas gracias por siempre tener ese bello carácter y animarme a continuar! Te quiero y admiro mucho eres una guerrera. Gracias por tu ejemplo para saber que se puede y más!

Marco Espina muchas gracias por tu apoyo y explicaciones! Así también los momentos divertidos que pasamos en el laboratorio. Eres un gran amigo que vale mucho, te quiero mucho.

Ángel muchas gracias por tu ayuda retro alimentación, te quiero mucho y sigue adelante.

Marco Ornelas Cruces gracias por compartir conmigo tus planes experiencias y vida. Siempre he admirado tu amor a salir adelante a continuar y saber ser autosuficiente. Te quiero muchísimo y siempre contarás conmigo. Gracias porque en los momentos en los que te he necesitado has estado ahí. Te adoro con todo mi corazón siempre estaré para ti. Y a mi querido cuñado Hiro gracias por permitirme conocerte y brindarme tu amistad, te quiero mucho y siempre los apoyaré!

Samanta Contreras eres una persona que siempre definí como mi "pon los pies sobre la Tierra" y agradezco que seas parte de mi vida. Nunca olvidaré esas palabras, han sido de las cosas más fuertes y bellas que me han dicho y que al mismo tiempo me han sacado adelante. Gracias por dejar huella, no los defraudaré! Te quiero mucho.

Mis "Lobas adoradas" gracias a cada una de ustedes por siempre escucharme y darme lo mejor de cada una todas unas guerreras y ejemplos de mujeres. Me siento tan orgullosa de tener amigas como ustedes que inspiran cada día a seguir luchando, con objetivos, con valores y con mucho amor. No tengo palabras suficientes para agradecer todo el apoyo que me han brindado durante todo este tiempo y se que estarán ahí para sostenernos las unas a las otras con su carisma con su amor con sus risas. Gracias por alegrar mi vida de una forma irreal Andrea, Silvana, Marel, Lina y Giovanna.

Christian Lambarri y familia, Cosa muchas muchas gracias por siempre estar ahí para Tamo y para mí por siempre vernos con una gran sonrisa y querernos tanto. Eres un eslabón súper importante en nuestras vidas y me siento más que bendecida por que estés! Gracias a tu familia por compartir el mismo sentimiento y sabes que también siempre estaremos para ustedes. Ha sido increíble el haber compartido la carrera contigo y poder entendernos en este bello lenguaje te quiero y admiro.

Santi te quiero muchísimo gracias por todo tu apoyo en este último año! Te has convertido en una de las personas más importantes, que entregan todo de corazón y defienden lo que quiere. Siempre voy a estar para ti de corazón y gracias por siempre

impulsarme a ser mejor persona amiga y ser humano! Recuerda que el tiempo no determina cuanto tan unidos están los amigos! Gracias por enseñarme ello!

Hugui Molina eres un ser invaluable gracias por siempre tener una sonrisa para mi. motivarme, escucharme y siempre siempre ver las cosas con ese gran carisma que tienes! Gracias por siempre estar disponible a ayudarme sabes que siempre voy a estar contigo de corazón eres uno de mis mejores amigos por siempre Thunder Buddy!!

David Pussy hahaha tenía que escribirlo! Gracias por convertirte en uno de mis bests! Y demostrarme igualmente que aunque estemos lejos quien te quiere estará ahí de la forma que sea se manifestará. Gracias por tus bellas palabras, apoyo y creer en mí. Siempre estaré agradecida y siempre tendrás mi apoyo esté donde esté. Te adoro por siempre.

Valeria, Paco, Beto, Yanixel, Mariana, Bob gracias por ser mis amigos y siempre contarme un extra incluido de Tamo los valoro mucho. Gracias por su apoyo y siempre al vernos reírnos y pasarla bien. Gracias por compartir estas etapas tan padres que serán siempre momentos memorables.

Isa muchas gracias por todo el apoyo que siempre me brindaste al trabajar juntas! Ha sido maravilloso conocerte y tenerte como amiga. Gracias por las bellas pláticas y risas que tuvimos y siempre creer en mi e impulsarme a lograr mis sueños. Gracias siempre por tus bendiciones y sabes que siempre estaré para ustedes.

Rafael Regalado mi adorado Rafa gracias siempre por impulsarme por tener las palabras correctas. Eres un ser al que admiro en todos aspectos eres un gran amigo, hijo estudiante y trabajador. Se que llegarás ms lejos y lograras cosas increíbles. Gracias de corazón siempre estaré para ti y espero que podamos vivir en el extranjero juntos :).

Arturo Ubish mi querido estoy muy orgullosa de ti siempre que nos vemos es un gusto enorme, te quiero mucho sé que llegarás muy lejos con esa pasión y amor que le tienes a lo que haces gracias por contagiarme. Gracias por siempre darme ánimos y luz cuando. Siempre contarás conmigo.

Arielito gracias por siempre brindarme tu tiempo y cariño eres un niño que logrará sus metas recuerda nunca dejes de soñar! Gracias por compartir conmigo tus sueños y motivarme a seguir. Gracias por confiar en mí en saber que puedo más, por permitirme entrar de otra forma al mundo de la música y explotar otra pasión. Jamás olvidaré esta oportunidad de corazón.

Manu, Pani y Ana Pani los quiero mucho gracias por haber compartido conmigo este tiempo de la carrera lo hicieron muy llevadero y siempre gracias gracias por su apoyo por creer en mí y sobretodo las risas que siempre pasamos. Los quiero y extraño mucho.

Olinca hermosa se que aunque no te vea mucho para mí siempre serás un eslabón importante te quiero mucho gracias por compartir muchos momentos profesionales como del corazón. Siempre estaré para ti gracias por todo.

Maritza bella siempre que te veo me das una palabra clave! Gracias por siempre motivarme y verme con esa alegría te quiero muchísimo.

Diana Espadas infinitas gracias por tu confianza y apoyo eres una mujer a la que admiro mucho y se que vas por más. Gracias por brindarme las oportunidades y creer en mi te quiero mucho.

Jules Ramone eres un ser súper especial en mi vida te quiero irreal. Gracias por compartir muchos momentos juntos, siempre creer en mí, estar conmigo y siempre estar al pendiente de mí. En verdad no tengo palabras por todos esos detalles sinceros. Te adoro y te admiro mucho, ese amor a la música pero sobre todo al cine se contagia para seguir continuando con los sueños. Así que el próximo eres tu y no olvides Glastonbourny.

Betito Vargas gracias por inspirarme cada día con tu bella música para saber que se puede, a veces nos ponemos solos los obstáculos pero con amor y constancia. De corazón gracias.

Miroslava Torres gracias por convertirte en una lucecita para compartir emociones experiencias y amor. Gracias por escucharme y confiar en mi y siempre hacerme sentir bella. Te adoro con todo mi corazón.

A todos mis amigos y compañeros de la carrera que puedo nombrar agradezco infinitamente el haberlos conocido, por su apoyo y retroalimentación en todo sentidos. Nunca hubiera sido lo mismo sin ustedes. Liz Rubio, Manuel Tavares, Amalia Teresa, Olivia, Fernanda, Nelía, Pao Peña, Yas Dávila, David Arias, Dalia, Pablo Colunga, Kevin Morales, Beto Barahona, Emiliano, Christina, Patito, Tomás Franco, Paty Santillán, Moi, Luis Fer, Paola Vazquez, Adrián RD, . Y a los que no mencioné por olvido pero estuvieron les agradezco por las experiencias y tiempo compartido.

Mami gracias por siempre apoyarme y escucharme cuando lo he necesitado te quiero mucho. De igual forma por creer en mi y compartir muchos momentos divertidos.

Boris Kuhn Santillán se que nos vemos poco pero eres un ejemplo de soñador, te quiero mucho gracias por tu inspiración al amor y al arte.

Guadalupe Colín gracias por recibirme en tu equipo tener la paciencia, pero sobretodo el apoyo y amor brindado. Aunque no lo creas eres parte de este proyecto ya que personas como tu son ejemplos a seguir irradiando luz a donde quiera que van. Gracias por darme mucho de ello y dejarme aprender de ti en la vida personal y profesional. Te admiro y quiero, siempre tendrás mis bendiciones y agradecimiento.

A todo el equipo VIRLIX gracias porque de cada uno he aprendido infinitas cosas, particularmente Xanat quiero agradecerte en demasía la oportunidad que me brindaste siempre estaré agradecida de por vida y se que llegarás más alto. Lya, Clau, Gaby, Armando, Nelly gracias por sus enseñanzas y trabajo en equipo es un placer aprender juntos.

May I know you might be so far ! But I really know that you have always trusted in me, in who I am, even tough distance we know we have each other. I love you sister with all my heart and I miss you so so much. Thanks for have believed in me since the first moment. It's been 10 years now.. since we were studying English in Montreal, yeah time flies.

Juan Puget no sabes lo importante que te has vuelto en mi vida, ese ejemplo de superación y amor a lo que uno hace pero sobretodo amor a la familia que siempre estará ahí apoyándote. Te quiero mucho y se que lograremos nuestros sueños, eres una persona que siempre me recuerda la humildad tangiblemente. Vas a lograr estar allá. Gracias por esa pasión compartida de querer crecer y cuidarme siempre.

A todo el equipo en su momento que se formó en el laboratorio de Inmunología Integrativa. Ranferi, Eugenio, Renato, José Luis, Fany, Fernanda, Emiliano, Eduardo, Edgar, fueron momentos divertidos y de crecimiento, gracias por ellos.

Ángel Santillán te has convertido en una persona muy inspiradora, agradezco ello porque me has motivado con tu pasión por la música a seguir adelante. Gracias por compartir uno de los mejores conciertos juntos y dejarme aprender te quiero mucho.

Marieto te quiero muchísimo, aunque estes a km siempre has tenido bellas palabras para mi y me has apoyado con las justas y necesarias. Gracias por tu luz y amor. Pronto en Europa feito.

Mary Carmen se que es poquito pero agradezco tu gran apoyo y disposición, eres una mujer que llegará lejos. Gracias por tu luz y bendiciones.

Pero sobretodo quiero agradecer a aquellos que NO creyeron en mí, que dudaron o que de cierta forma en el transcurso se alejaron. Gracias porque ustedes me han hecho más fuerte, valorarme pero sobretodo creer en mi misma. Y gracias por las personas que en algún momento tuvieron una palabra de aliento y motivación para que continuara. Bendiciones a todos.

El orden de los factores no altera.. 😊

“Without music, life would be a mistake.”  
Friedrich Nietzsche

## ÍNDICE

Índice .....	14
LISTA DE ABREVIATURAS .....	15
INDICE DE FIGURAS .....	16
INDICE DE TABLAS .....	17
RESUMEN .....	18
INTRODUCCIÓN .....	19
I ANTECEDENTES .....	20
i.  Cáncer .....	20
ii.  Cáncer Pulmonar .....	20
iii.  Etiología del cáncer de pulmón .....	22
iv.  Clasificación del cáncer de pulmón .....	24
v.  Epidemiología .....	25
vi.  Estadificación del cáncer del pulmón .....	25
vii.  Estadificación molecular del cáncer de pulmón .....	26
viii.  Tratamiento .....	26
ix.  Transición Epitelio Mesénquima .....	27
x.  TGF- $\beta$ .....	33
xi.  Vía de señalización de Hedgehog .....	36
xii.  HHIP- molécula inhibidora de la vía de Hedgehog .....	41
II JUSTIFICACIÓN .....	43
III ANTECEDENTES .....	44
IV HIPÓTESIS .....	45
V OBJETIVOS .....	46
i.  Objetivo general .....	46
ii.  Objetivos específicos .....	46
VI MÉTODOS .....	47
i.  Cultivo celular .....	47
ii.  Extracción de proteínas .....	48
iii.  Cuantificación de proteínas .....	48
iv.  Western Blot .....	48
v.  Caracterización fenotípica de los marcadores epiteliales y mesenquimatosos por citometría de flujo .....	49
VII RESULTADOS .....	50
I.  Morfología .....	50
II.  Citometría de flujo .....	50
III.  WB .....	54
VII DISCUSIÓN .....	57
IX CONCLUSIÓN .....	63
X BIBLIOGRAFÍA .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

Hh- Hedgehog

Sh- Sonic Hedgehog

NSCL- Non Small Cell Lung Cancer / Cáncer de Células No Pequeñas

TGF- $\beta$  - Transforming Growth Factor  $\beta$

HHIP- Human Hedgehog Interacting Protein

TEM- Transición Epitelio Mesénquima

SCLC- Small Cell Lung Cancer/Cáncer de Células Pequeñas

SCC- Squamous Cell Carcinoma/Carcinoma de Células Escamosas

TNM- método de clasificación de tumores malignos en donde la T- significa el tamaño del tumor, N- los nódulos linfáticos envueltos en el desarrollo de este y M- la metástasis distante si hay presencia de esta.

TME- Transición Mesenquimatosa Epitelial

SMO- Smoothened

PTCH- Patch

ATCC- American Type Culture Collection

IMF- Intensidad media de fluorescencia

GAPDH- Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase/Gliceraldehído-3-fosfato  
deshidrogenasa

EGF- Epidermal Growth Factor / Factor de Crecimiento Epidermal



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Mapa que representa la mortalidad mundial de cáncer de pulmón en el mundo, así como otros tipos de cánceres. ....	<b>21</b>
<b>Figura 2.-</b> Ciclo de eventos que suceden durante la transformación de células epiteliales a mesenquimatosas y viceversa .....	<b>28</b>
<b>Figura 3.-</b> Sitios de la TEM y TME en el desarrollo y progresión de carcinoma. ....	<b>31</b>
<b>Figura 4.-</b> Vía de señalización de Hedgehog .....	<b>37</b>
<b>Figura 5.-</b> Vía de señalización de Hedgehog y cáncer. La desregulación de la vía de Hh causa cáncer en diversos tejidos. ....	<b>38</b>
<b>Figura 6.-</b> La vía de señalización de Hh puede ser bloqueada a diversos niveles, por diversos inhibidores específicos de ésta.....	<b>40</b>
<b>Figura 7.-</b> Esquema de la organización del receptor de HHIP .....	<b>42</b>
<b>Figura 8.-</b> Propuesta en la que el receptor de TGF- $\beta$ se activa por medio de la unión de su ligando lo que lleva al aumento en la regulación de la expresión de Shh.....	<b>44</b>
<b>Figura 9.-</b> Modelo experimental.....	<b>47</b>
<b>Figura 10.-</b> Imágenes representativas de cultivos de células A549 en medio sin suero (Control) y tratadas con TGF- $\beta$ (5ng/ml) a diferentes tiempos.....	<b>51</b>
<b>Figura 11.-</b> Dot plots representativos del análisis de vimentina y E-caderina en células A549 tratadas con TGF- $\beta$ a 72 horas.....	<b>52</b>
<b>Figura 12.-</b> Gráfica del porcentaje de células que expresan E-caderina.....	<b>53</b>
<b>Figura 13.-</b> Gráfica del porcentaje de células que expresan vimentina .....	<b>53</b>
<b>Figura 14.-</b> Análisis de Shh por Western Blot. A) Fotos representativas de blots en dos experimentos independientes. B) grafica del análisis densitométrico de los blots comparando la intensidad media de Shh vs la intensidad media de GAPDH como control de carga. ....	<b>55</b>
<b>Figura.-15</b> Análisis de HHIP por Western Blot. A) Foto representativa del western blot contra HHIP y GAPDH como control de carga. B) Gráfica del análisis densitométrico.....	<b>56</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.- Características de las células alveolares tipo I y tipo II .....</b>	<b>29</b>
---	-----------

## RESUMEN

La segunda causa de muerte en México es debida al cáncer de pulmón en varones y la quinta en mujeres. Debido a su alta letalidad, la cifra de mortalidad es muy parecida a la incidencia. Actualmente se sabe que la biología del desarrollo y el cáncer comparten diversas similitudes en cuanto a las bases de sus orígenes moleculares y se sabe en particular que la proliferación celular y la diferenciación comparten aproximaciones en las vías de señalización requeridas para estos procesos.

La vía de desarrollo embrionaria de Hedgehog (Hh), el Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y el fenómeno denominado Transición epitelio Mesénquima TEM se han visto implicados trabajando independiente o en conjunto en el desarrollo de ésta enfermedad aumentando la proliferación, crecimiento, migración y agresividad del tumor. En particular la vía de Hh, la cual mantiene una estabilidad para controlar la proliferación y crecimiento celular en el embrión puede ser inhibida por la proteína Human Hedgehog Interacting Protein HHIP.

El objetivo del presente trabajo fue identificar si HHIP se ve aumentado o disminuido en células de adenocarcinoma pulmonar A549 al ser estimuladas con TGF- $\beta$ 1 y por lo tanto obtener un fenotipo TEM.

Las células se estimularon con TGF- $\beta$  5ng/ml durante 72 horas para obtener el fenotipo de TEM. El fenotipo de transición se analizó por medio de microscopía observando su cambio morfológico, por medio de citometría de flujo midiendo los marcadores E-caderina y vimentina. El análisis de la proteína Shh y HHIP se hizo por western blot.

Las observaciones de la morfología y los resultados por citometría indican que el estímulo con TGF- $\beta$  indujo la transición epitelio-mesénquima en las células A549.

Se pudo observar la expresión de la proteína Shh y de la proteína HHIP. Se sabe que Shh está altamente expresado en células cancerosas y su expresión aumenta al tener un fenotipo TEM. En particular el inhibidor endógeno se mostró aumentado en las 24 y 48 horas, lo cual no concuerda con estudios previos en los cuales se ha visto que éste disminuye. Esto puede estar hablando que diversas vías están actuando permitiendo la expresión de los factores de transcripción GLI los cuales permiten la expresión de la molécula y no requieren del axis de la vía canónica de Hh. Se pudo observar la disminución de la proteína a las 72 horas lo cual era lo esperado, indicando que probablemente el aumento de la malignidad celular durante la TEM pueda estar disminuyendo aún más la expresión de esta proteína.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo, la tasa de supervivencia máxima de 5 años es aproximadamente de un 15%. Los pacientes por lo general son diagnosticados en etapas avanzadas y menos del 25% son considerados para una terapia quirúrgica. (Xiao & He, 2010) Diversos pacientes son diagnosticados con metástasis distantes y muchos de estos mueren por causa de ésta en lugar del tumor primario. (Wang & Su, 2011)

Las vías de señalización que son responsables de la embriogénesis conllevan un papel muy importante en el mantenimiento de células troncales en la vida del adulto y en las respuestas celulares al daño. La disfuncionalidad de estas vías durante la homeostasis en el adulto conllevan a diversos eventos resultantes en neoplasia. (Velcheti & Govindan, 2007)

Algunas de estas vías de señalización son la Hedgehog Hh o la conversión fenotípica denominada Transición Epitelio mesénquima (TEM) de la cual uno de los inductores más estudiado es TGF-  $\beta$ . Durante un desarrollo embrionario normal han sido de las más estudiadas y en los últimos años enfocándose en particular en el desarrollo de cáncer, particularmente la relación entre estas dos vías y el proceso de TEM y su implicación en el crecimiento tumoral, metástasis etc.

Particularmente la vía de señalización de Hh consta de diversos componentes que permiten que los genes blanco se transcriban, uno de los cuales es Human Hedgehog Interacting Protein HHIP, el cual es un inhibidor endógeno, atenúa la señalización a través de un mecanismo de retro-alimentación negativa por medio de la interacción con las proteínas de ésta. Se conoce que HHIP se encuentra disminuida en diversos tipos de cáncer hepático, gástrico y meduloblastoma, otros reportes indican que la des-acetilación y remodelación de la cromatina contribuyen al silenciamiento de HHIP en cáncer pancreático y gastrointestinal (Kobune et al., 2012)(Shahi et al., 2014) lo que indica que este inhibidor al encontrarse disminuido en cáncer junto con otros factores, permite la proliferación, crecimiento tumoral por tanto la presencia de metástasis.

En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de la proteína HHIP en la línea celular A549 previamente estimuladas con TGF-  $\beta$ 1 para que estas llevaran a cabo una transición epitelio mesénquima (TEM).

## **I ANTECEDENTES**

### **i. Cáncer**

El cáncer es definido como el crecimiento anormal de células causado por múltiples cambios en la expresión de los genes, lo que conlleva a una desregulación de la proliferación y muerte celular y en último término evolucionando a una población de células que puede invadir tejidos y hacer metástasis a distintos sitios, causando morbilidad y si no es tratado, la muerte del hospedero. Este proceso puede aparecer en cualquier tejido u órgano (Ruddon, 2007). El Cáncer comienza cuando las células en una parte localizada del cuerpo comienzan a crecer sin control; existen diversos tipos de cáncer, pero todos comienzan por el crecimiento anormal y descontrolado de las células. (Dna.,2013)

A nivel mundial se estima que en 2008 ocurrieron aproximadamente 12.7 millones de casos de cáncer y 7.6 millones de muertes. En mujeres el cáncer que más predomina es el de mama, mientras que en hombres el que más frecuentemente se diagnostica es el de pulmón. En países desarrollados la incidencia del cáncer es muy alta, pero en los países en desarrollo la mortalidad es mayor. Estas diferencias se deben a diversos factores, incluyendo tipo de cáncer, diferencias regionales en la prevalencia y distribución de los factores de mayor riesgo, las prácticas de detección y/o la disponibilidad y uso de tratamientos, entre otros. Se ha sugerido que el incremento en la prevalencia e incidencia de cáncer en países desarrollados puede ser resultado de una mayor longevidad y estilos de vida incluyendo el fumar, falta de actividad física y diversidad de dietas. Por el contrario la mortalidad en países en desarrollo se ve reflejada por la carencia de acceso a los servicios médicos para su diagnóstico temprano y por el pobre recurso de terapias apropiadas y medicinas. (Siegel, Naishadham, & Jemal, 2013)

### **ii. Cáncer Pulmonar**

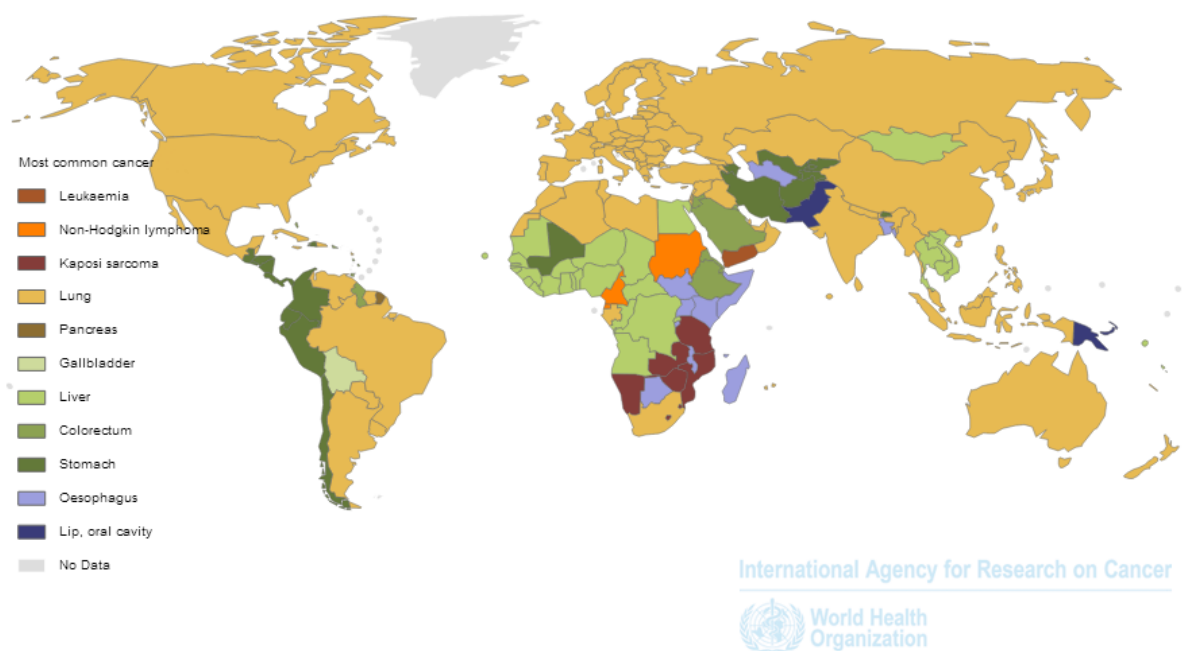
El cáncer de pulmón, es la primera causa de muerte por cáncer en el mundo, con la particularidad de que este tipo se diagnostica en etapas avanzadas. Histológica y biológicamente es una neoplasia compleja, con diferentes tipos y subtipos celulares. Este puede comenzar en las células que revisten los bronquios y partes que

componen al pulmón como son los alveolos y bronquiolos. (Dna, 2013) De los más frecuentes son el cáncer de células no pequeñas NSCLC (non-small cell lung cancer, por sus siglas en inglés) dentro del cual se encuentra el adenocarcinoma. Cerca de un 40% del cáncer de pulmón son adenocarcinomas, estos ocurren en uno o múltiples focos y forman tumores con una gran variedad de tamaños. (Kernstine & Reckamp, 2010)

En 2008, el cáncer de pulmón fue el más diagnosticado como la principal causa de muerte por cáncer en hombres, mientras que en mujeres fue el cuarto con más diagnósticos y la segunda causa de muerte por cáncer.

El cáncer de pulmón tuvo una incidencia del 13% (1.6 millones) del total de casos y un 18% (1,4 millones) de las muertes en este año. Los países con mayor incidencia de cáncer de pulmón se presentaron en el sur y este de Europa, Norte América, Micronesia y Polinesia, y Asia del este, mientras que las tasas fueron bajas en África. En mujeres, la mayor tasa de incidencia se encontró en Norte América, norte de Europa, Australia y Nueva Zelanda.

La OMS estima que las muertes por cáncer de pulmón a nivel mundial continuarán en aumento, esto debido al incremento del consumo de tabaco. (Dela Cruz, Tanoue, & Matthay, 2011)



**Figura 1.-** Mapa que representa la mortalidad de cáncer de pulmón en el mundo, así como otros tipos de cánceres. Globocan 2012 (Ferlay, 2010)

De los factores de riesgo más conocidos causantes de cáncer de pulmón son: la exposición a diversos carcinógenos ya sea en el ambiente o por ocupación como el asbesto, arsénico, radón e hidrocarburos aromáticos policíclicos. Solo para el caso de mujeres, se sabe que uno de los mayores factores de riesgo es la contaminación en el interior de los hogares, causados por el cocinar con estufas de carbón y otros combustibles orgánicos. (Siegel et al., 2013)

### **iii. Etiología del cáncer de pulmón**

Hace un siglo no se conocía ninguna causa ocupacional del cáncer de pulmón. Una asociación entre esta enfermedad y el trabajo en las minas de Schneeberg en Alemania fue descrita por Harting y Hesse en 1879. Subsecuentemente, a principios del siglo XX se encontraron altos niveles del gas radón en las minas y se asoció etiológicamente con el tabaco como una posible causa de cáncer de pulmón ya que hubo un aumento en el número de pacientes con esta rara enfermedad para este entonces casualmente coincidía en que todos eran fumadores de cigarro. (Miller, 2005)

El humo de tabaco es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de cáncer de pulmón. Aproximadamente el 85% de los casos de este tipo de cáncer están relacionados al hábito de fumar. Hay una fuerte relación de la respuesta a la dosis, entre el tiempo y frecuencia de fumar cigarro y desarrollar cáncer de pulmón. Los fumadores tiene diez veces más probabilidad de tener cáncer de pulmón que los no fumadores.

Los fumadores pasivos tienen un 30% más de probabilidades de contraer cáncer de pulmón, comparados con aquellos que habitan en lugares libres de humo de tabaco. Las estimaciones indican que 3000 de las muertes por cáncer de pulmón en los Estados Unidos son de fumadores pasivos. En fumadores pasivos se han identificados cambios que son únicos en comparación con aquellos relacionados con fumadores activos. Estos incluyen anomalías cromosómicas, activación de oncogenes, inactivación de genes supresores de tumores y mutaciones de genes envueltos en la reparación del ADN.

El cáncer de pulmón en fumadores pasivos afecta predominantemente a mujeres, con un 20% de mujeres afectadas que en su vida han fumado. El adenocarcinoma, particularmente el subtipo *in situ* (anteriormente conocido como cáncer bronquio

alveolar, BAC por sus siglas en inglés) es la histología más común en los fumadores pasivos, siendo el 60% de los casos. En contraste, el cáncer de células pequeñas ocurre casi exclusivamente en pacientes que son fumadores activos. (Miller, 2005)(Dela Cruz et al., 2011)(Molina, Yang, Cassivi, Schild, & Adjei, 2008)

Otros compuestos y factores que pueden inducir cáncer de pulmón incluyen a los asbestos, la radiación ionizante y el radón. En el caso de asbestos, la exposición ocurre por la inhalación de partículas de asbesto, la continua exposición puede incrementar el número de fibras que se quedan en el pulmón incrementando el riesgo de daño. El periodo de latencia oscila entre 10 y 40 años. Los fumadores que están expuestos a partículas de asbesto tienen un efecto multiplicativo en el desarrollo de cáncer de pulmón. (Ganti & Gerber, 2013) (P. N. Lee, 2001) (Levine, 1989)

Estudios han demostrado una asociación entre el cáncer de pulmón y la exposición a la radiación ionizante. Sin embargo, la exposición a bajas dosis de radiación como los rayos X y tomografías computarizadas han sido difíciles de caracterizar.

El radón es un gas inerte producido por uranio. Estudios en mineros expuestos al radón han demostrado una asociación con el desarrollo de cáncer de pulmón. De igual forma el radón existe como un contaminante al interior de los edificios que entra a estos por el suelo. La exposición al radón en las casas se ha llegado a estimar en un 10% de las muertes por cáncer de pulmón en Estados Unidos cada año. (Ganti & Gerber, 2013)

Los factores ambientales, causan cáncer de pulmón en una pequeña proporción de los pacientes expuestos, llevando a la hipótesis que la susceptibilidad genética juega un papel muy importante en el riesgo de contraer cáncer de pulmón. Estudios epidemiológicos han demostrado que la historia familiar del cáncer de pulmón predice un incremento en el riesgo de contraer cáncer de pulmón. Alteraciones en los genes supresores de tumores y oncogenes han sido asociados con el desarrollo del cáncer de pulmón. Asimismo, polimorfismos de ciertos genes específicamente aquellos involucrados en el metabolismo carcinógeno y la reparación del ADN, se piensa que alteran la capacidad de reparación del ADN y están asociado un alto riesgo de contraer cáncer. Estudios han demostrado diferentes interacciones entre estas variaciones genéticas y el fumar en el riesgo de contraer cáncer de pulmón. (Ganti & Gerber, 2013) (Dela Cruz et al., 2011)(Molina et al., 2008)



Se ha sugerido que la dieta es causante de un 30% de todos los cánceres, diversos reportes indican que los factores que complementan una dieta contribuyen el riesgo de tener cáncer de pulmón. De igual forma el llevar una vida más activa disminuye el riesgo de tener cáncer de pulmón, se registró que el llevar a cabo una actividad de impacto moderada a alta conllevó a una disminución del riesgo de tener cáncer de pulmón de un 13% a 30%. (Dela Cruz et al., 2011)(Molina et al., 2008)

#### **iv. Clasificación del cáncer de pulmón**

Por sus diferencias en cuanto a su historia natural, supervivencia y tipo de tratamiento, los carcinomas primarios broncogénicos son comúnmente divididos en dos grupos: cáncer de pulmón de células no-pequeñas NSCLC (non-small cell lung cancer por sus siglas en inglés) y cáncer de pulmón de células pequeñas SCLC (small cell lung cancer por sus siglas en inglés).

Por su histología el cáncer NSCLC se puede subdividir en cáncer de células escamosas (SCC, 30%) carcinoma de células grandes (9%) y adenocarcinoma (45%). El cáncer de pulmón de células no pequeñas equivale de un 75% a 80% de todos los cánceres de pulmón. Las células en estos subtipos difieren en tamaño, forma y composición química al ser observadas al microscopio. (American Cancer Society). El cáncer de células escamosas llegó a ser el tipo más común de NSCLC en Estados Unidos, sin embargo ha habido un aumento considerable en casos de adenocarcinoma. (Kernstine & Reckamp, 2010)

##### *Adenocarcinoma*

El adenocarcinoma es el tipo de cáncer más común con cerca del 40% de todos los cánceres de pulmón. La OMS clasifica al adenocarcinoma en cinco subtipos: acinar, papilar, sólido con producción de mucina, BAC y adenocarcinomas mixtos. La mayoría de los adenocarcinomas se categorizan como mixtos porque consisten en uno o más subtipos histológicos. Los adenocarcinomas ocurren en focos simples o múltiples y tienen un amplio rango de tamaños, los más comunes ocurren en la periferia del pulmón con invasión de la pleura y tienen una diseminación primaria por rutas linfáticas y hematógenas. Tiende a crecer lentamente en comparación con otros tipos de cáncer y es más común encontrarlo externo al pulmón. (Dna, 2013)

### *Cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC)*

Aproximadamente el 15% de los cánceres de pulmón son de células pequeñas (SCLC) Estos se caracterizan porque las células tumorales epiteliales son pequeñas, más pequeñas que el diámetro de dos o tres linfocitos maduros, con cromatina granular y sin nucleolo. La presencia de necrosis es frecuente y extensiva. Menos del 10% de este tipo de carcinomas muestran una mezcla con carcinomas de tipo histológico de células no-pequeñas. Pero cuando esto llega a ocurrir, estas combinaciones generalmente consisten en adenocarcinoma, SCC o carcinoma de células grandes.

La mayoría de los carcinomas de células pequeñas presentan un perihilio largo de masas con una necrosis extensiva y una metástasis extensiva a los ganglios linfáticos. Estos tumores se localizan frecuentemente en una región peri-bronquial con infiltración de la submucosa bronquial y el tejido peri-bronquial. (Kernstine & Reckamp, 2010)  
Este tipo de cáncer por lo general comienza en el bronquio cerca del pecho y tiende a extenderse por todo el cuerpo en etapas tempranas de la enfermedad. (Dna, 2013)

#### **v. Epidemiología**

El carcinoma pulmonar es actualmente la primera causa de muerte por cáncer en el mundo. La enfermedad se ha convertido en una epidemia por las tasas de incidencia y las muertes a causa de este cáncer han aumentado considerablemente en el último siglo, lo que correlaciona con un incremento en el consumo del cigarro. (de Groot & Munden, 2012)

#### **vi. Estadificación del cáncer del pulmón**

El estado del cáncer describe que tan rápido se disemina o se ha diseminado. En particular se ha utilizado un sistema denominado TNM (por sus siglas en inglés) el cual sirve para describir el crecimiento y diseminación. La información que provee este sistema es:

T: Indica el tamaño del tumor primario y hacia donde ha crecido en las áreas cercanas.

N: Describe la diseminación del cáncer a los nódulos linfáticos cercanos.

M: Indica hacia que órganos del cuerpo el cáncer se ha diseminado (metástasis).

Números y letras después de la TNM proveen de más detalle acerca de estos factores. Por ejemplo del cero al 4 indican el incremento de la severidad del cáncer. Este sistema puede ser complejo y difícil de entender. (Dna, 2013)

#### **vii. Estadificación molecular del cáncer de pulmón**

La estadificación de tumores se ha establecido y ha sido validada como la mejor forma de predecir la supervivencia del paciente. Sin embargo el criterio actual de estadificación se basa en características morfológicas y anatómicas y estas no capturan la complejidad total que tiene el NSCLC.

Los subtipos morfológicos están pobremente correlacionados con el pronóstico de cada paciente y los tumores con características histológicas similares seguido prosiguen diferentes cursos clínicos o responden diferente a la quimio o radio terapias. Cerca de un tercio de pacientes en estadio I de NSCLC mueren ya que la enfermedad recurre a pesar de la resección curativa. Esto indica que diversos pacientes con un alto grado de recaída no fueron identificados en la clasificación temprana TNM.

La clasificación molecular ha sido exitosamente utilizada para identificar, diferenciar y clasificar diversos tipos de cáncer, así como resolver diversos dilemas en cuanto a diagnósticos. El perfil molecular de un tumor es una técnica de diagnóstico promisorio para determinar el tejido de origen en pacientes con metástasis de sitios primarios desconocidos. La diferenciación del cáncer de pulmón con metástasis intrapulmonar es esencial para que los médicos guíen las diferentes estrategias de tratamiento. (Yu & He, 2013)

#### **viii. Tratamiento**

La cirugía sigue siendo la opción más consistente y exitosa para la cura de los pacientes con cáncer de pulmón. Para poder llevar a cabo ésta opción, el cáncer debe ser completamente resecable y el paciente debe ser capaz de soportar la intervención quirúrgica.

La quimioterapia es otra de las opciones más utilizadas, esto se debe a que cerca del 70% de los casos de pacientes presentan estadios avanzados o metastásicos al tiempo del diagnóstico. La quimioterapia es benéfica para la paliación en los pacientes que presentan la enfermedad local-avanzada o metastásica.

También se utiliza terapia dirigida, esto se refiere a utilizar ciertos compuestos o moléculas que vayan dirigidos a contrarrestar algún cambio que hayan sufrido las células por ejemplo alteraciones en vías de señalización y regulación celular, así como sobre-expresión o variación de secuencias de genes. (Molina et al., 2008)

#### **ix. Transición Epitelio Mesénquima**

Los organismos multicelulares han desarrollado tipos celulares especializados así como una diversificación de diferentes fenotipos celulares. Una de las divergencias más primitivas en cuanto al fenotipo celular es la distinción entre células epiteliales y mesenquimales.

Las células epiteliales proveen a la interacción célula-célula la cohesión esencial para mantener la integridad de un organismo multicelular y funcionan como una barrera necesaria para establecer un ambiente interno regulado e independiente del externo.

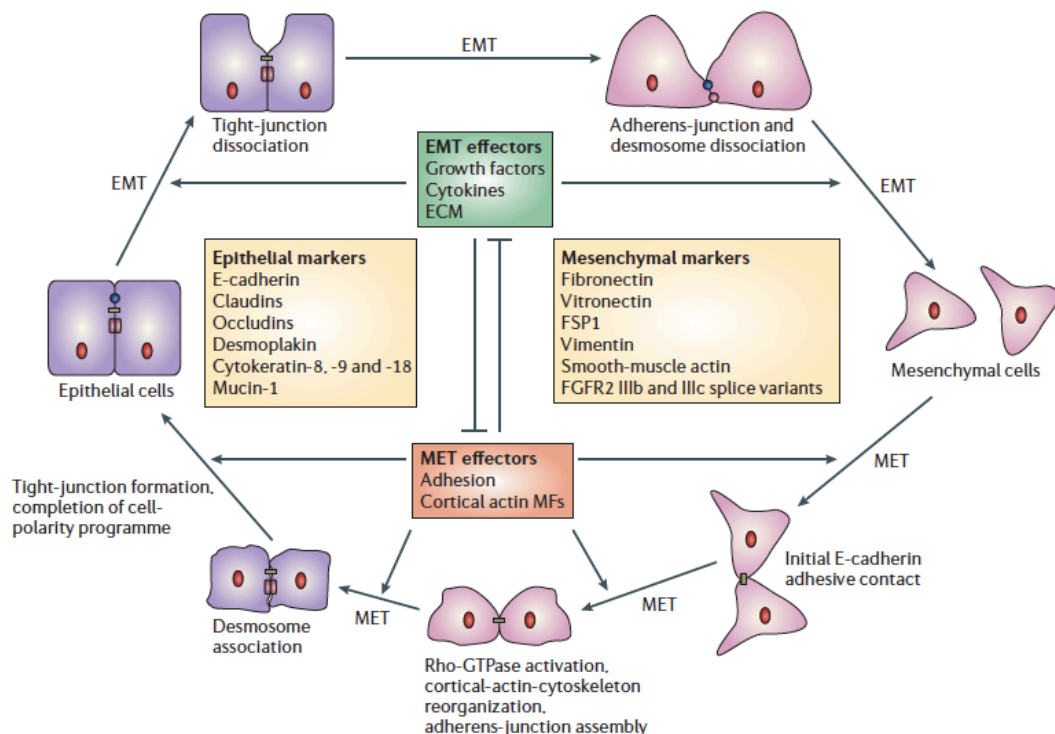
El desarrollo de estructuras y ciertas funciones requiere de flexibilidad, la cual la provee la célula mesenquimatosas. Las células que exhiben un fenotipo mesenquimal proveen de soporte y estructura a las células epiteliales particularmente a través de la producción de una matriz extracelular. (Micalizzi, Farabaugh, & Ford, 2010)

Dependiendo del tipo celular y de su ambiente particular, los fenotipos epiteliales y mesenquimatosos pueden ser muy dinámicos. Existe una conversión entre estos fenotipos denominada Transición Epitelio-Mesénquima (TEM) así como su forma reversible Transición Mesenquimal-Epitelial (TME) esto provee una flexibilidad particular adicional durante la embriogénesis; así mismo, permite una remodelación dinámica durante la cicatrización de heridas o regeneración de cierto número de tejidos diferenciados. (Micalizzi et al., 2010)

La TEM se caracteriza por pérdida de proteínas asociadas con un fenotipo epitelial polarizado y la síntesis *de novo* de proteínas asociadas con células mesenquimatosas de morfología migratoria o transitorias. La demostración de la ausencia o presencia de proteínas epiteliales y mesenquimales específicas es usada para denotar etapas de la plasticidad epitelial de células en transición *in vivo* e *in vitro* en el desarrollo embrionario, homeostasis del tejido, estrés epitelial, daño en órganos maduros y en la progresión de carcinoma. (Jiri Zavadil & Böttinger, 2005)

La transición epitelio mesénquima es un cambio de fenotipo que ocurre en las células epiteliales. Estas pierden la polaridad ápico-basal, las uniones y adherencias célula-célula (adherentes y uniones gap) comienzan a romperse, la membrana basal y hay remodelación del citoesqueleto (Micalizzi et al., 2010)(Kang & Massagué, 2004)(Klymkowsky & Savagner, 2009)

Para que suceda el cambio de una célula epitelial a una mesenquimatosa se requieren de alteraciones en morfología, arquitectura celular, adhesión y la capacidad migratoria. (J. M. Lee, Dedhar, Kalluri, & Thompson, 2006). Las proteínas de superficie de membrana de las células epiteliales también sufren cambios, la E-caderina (la más estudiada) e integrinas se ven afectadas ya que estas median las conexiones con las células aledañas y la membrana basal. (Kang Y., 2004). Las células sufren un cambio morfológico y pasan de un fenotipo cúbico a tener forma ovalada o de estrella. (Micalizzi D., 2010). Las células obtienen la expresión de marcadores mesenquimatosos como fibronectina, vimentina,  $\alpha$ -actina de músculo liso y N-caderina, que proveen a las células propiedades motiles, por lo que la célula obtiene un fenotipo migratorio. (Micalizzi D., 2010, Kang Y., 2004).



**Figura 2.-** Ciclo de eventos que suceden durante la transformación de células epiteliales a mesenquimatosas y viceversa (Thiery & Sleeman, 2006)

### *Células epiteliales*

Un epitelio normal es un conjunto (capa) de células, epiteliales individuales apoyadas unas contra otras en una matriz uniforme. Las uniones y adhesiones célula-célula entre células epiteliales colindantes les permite unirse fuertemente y evitar el movimiento de células individualmente lejos de la monocapa epitelial. La adhesividad interna le permite a la capa epitelial formar un espacio tridimensional, lo que le provee definición estructural y rigidez mecánica. La capa está polarizada, lo que significa que las superficies basales y apicales son visualmente diferentes, se adhieren a diferentes substratos o tienen diferentes funciones. (J. M. Lee et al., 2006)

El epitelio pulmonar está compuesto por células alveolares epiteliales tipo I y tipo II. También denominadas neumocitos, estos tipos celulares se diferencian por características morfológicas y funcionales. (Tabla 1)

Las células alveolares tipo I son escamosas, contienen pocas mitocondrias e inclusiones celulares y componen el 90% de la superficie epitelial. (Wise, 2002)

Las células alveolares epiteliales tipo II constituyen un 60% del epitelio alveolar y un 15% de todas las células del parénquima pulmonar y cubren un 5% de toda la superficie alveolar en mamíferos. Su función principal es la síntesis y secreción de material activo de superficie, contienen organelos distintivos denominados cuerpos lamelares que contienen capas de fosfolípidos sufactantes rodeados por una membrana limitante. Además conllevan el mantenimiento del epitelio alveolar por su capacidad de diferenciarse en células alveolares tipo I. (Fehrenbach, 2001)

	Células tipo II	Células tipo I
Descripción	Células cuboidales que contienen cuerpos lamelares distintivos e inclusiones citoplasmáticas.	Células escamosas con un citoplasma extendido y pequeñas inclusiones citoplasmáticas.
Funciones	Transporte activo de iones. Procesamiento alveolar surfactante. Progenitor de células tipo I	Constituyen la delgada interface de la región de intercambio gaseoso.

**Tabla 1.-** Características de las células alveolares tipo I y tipo II Modificada de (Wise, 2002)

### *Células mesenquimatosas*

Por otro lado las células mesenquimatosas no presentan una estructura definida como tal ni una adhesión intercelular, de igual manera no son uniformes en su composición o densidad. En estos tipos celulares las uniones son mucho más laxas lo que permite que éstas tengan una capacidad migratoria. Tienen una forma más alargada y elongada. La estructura irregular de las células mesenquimales no permiten una especialización topológica rígida y su movimiento o migración es mecánicamente diferente al movimiento epitelial. Estas células tienen la capacidad de moverse individualmente y pueden dejar atrás la región de donde provienen. (J. M. Lee et al., 2006) Las principales moléculas que llegan a expresar este tipo de células son los arreglos en microfilamentos (actinas) N-caderina, vimentina, etc.

### *Transición Epitelio Mesénquima en Cáncer*

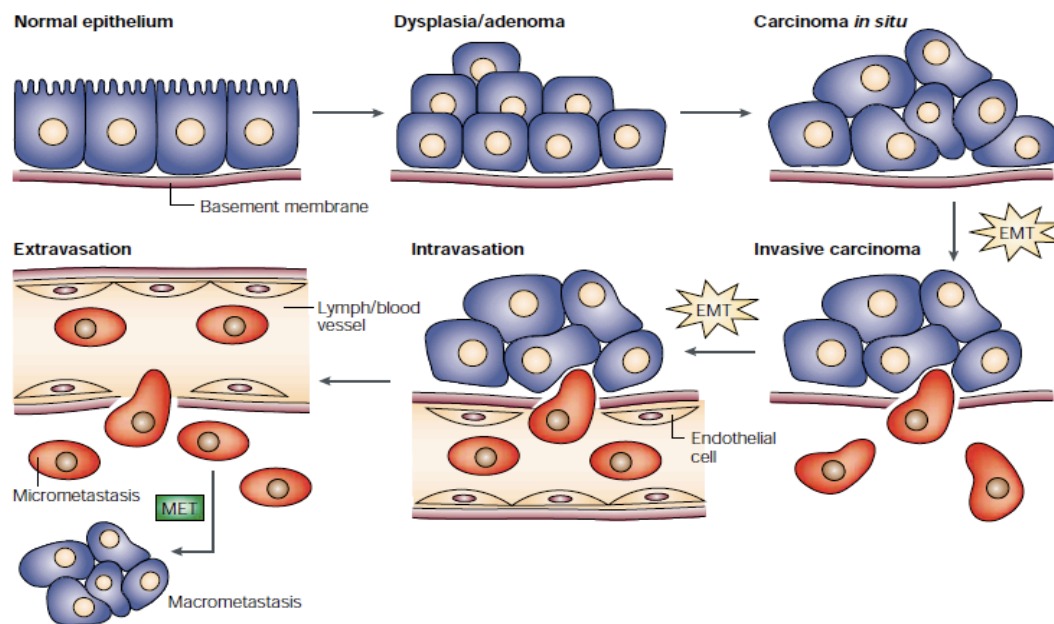
Durante el desarrollo tumoral algunas células adquieren nuevas características como la expresión de marcadores mesenquimatosos y pierden marcadores epiteliales, sufren profundos cambios morfogenéticos colectivamente denominados como Transición Epitelio-Mesénquima (TEM). La TEM originalmente fue descrita como una conversión fenotípica durante el desarrollo embrionario. (Shih & Yang, 2011)

La implicación de esta observación es que las células cancerosas fácilmente reactivan propiedades embriogénicas fuera de contexto del adulto, que después contribuyen a una tumorigénesis por medio de una proliferación acelerada, resistencia a la apoptosis y evasión a la senescencia. (Micalizzi et al., 2010)

Conforme progresa el tumor se desarrolla un fenotipo más agresivo. Estas células cancerosas más agresivas adquieren una forma estrellada, pierden desmosomas y uniones adherentes, comienzan a expresar vimentina y secretan gran cantidad de enzimas proteolíticas, como las metaloproteasas de matriz MMP-2, MMP-3 y MMP-9, para degradar la matriz extracelular e incrementar la habilidad de movimiento. La TEM es un paso clave en la progresión de tumores hacia metástasis e invasión. Además, se ha encontrado que las células cancerosas que experimentan TEM muestran un incremento en la resistencia a apoptosis y a drogas quimioterapéuticas. (Shih & Yang, 2011)

La TEM oncogénica se ha visto asociada con la pérdida de la polaridad ápico-basal, desintegración de uniones adherentes, cambios en el citoesqueleto, incluyendo la

desregulación de las citoqueratinas y el aumento en la vimentina, así como en la adquisición de un fenotipo móvil e invasivo. En el contexto de un cáncer epitelial, la TEM le provee un mecanismo a las células tumorales para abandonar el tumor primario e invadir el tejido local y los vasos sanguíneos estableciendo la etapa de esparcimiento metastásico.



**Figura 3.-** Sitios de la TEM y TME en el desarrollo y progresión de carcinoma. Un epitelio normal delimitado por la membrana basal puede proliferar localmente y dar lugar a un adenoma. Cambios epigenéticos y genéticos dan lugar a una transformación lo que desarrolla un carcinoma *in situ* que sigue delimitado por una membrana basal. Alteraciones consiguientes a esto pueden inducir una diseminación local de células de carcinoma posiblemente por la TEM y la membrana basal se comienza a fragmentar. Las células pueden llevar a cabo una intravasación a los vasos linfáticos o sanguíneos, lo que les permite transportarse a órganos distantes. En sitios secundarios, las células de carcinoma pueden llevar a cabo el proceso de extravasación y pueden permanecer solitarias o formar un nuevo carcinoma secundario a través de la TME. (Thiery, 2002)

Esta ocurre en un contexto de cambios genéticos impredecibles presentes en las células tumorales, así como un ambiente tumoral local anormal. En cáncer es más difícil de identificar y observar *in vivo*, ya que solo un número de células tumorales se someten a la TEM una sola vez. (Micalizzi et al., 2010)

Una excesiva proliferación de células epiteliales y angiogénesis son indicadores de iniciación y de un crecimiento temprano de cáncer epitelial primario. El control genético y los mecanismos bioquímicos que conllevan a la adquisición de un fenotipo invasivo y la subsecuente diseminación de la célula cancerígena se han convertido en áreas de



intenso estudio. En muchos de estos, la activación de la TEM se ha propuesto como un mecanismo crítico en la adquisición de fenotipos malignos por medio de células epiteliales cancerígenas. Se sabe que la TEM puede ser un mecanismo importante para la progresión del carcinoma a un estado metastásico que implica una TEM durante el subsecuente proceso de colonización. (Kalluri & Weinberg, 2009)

### *Moléculas implicadas en la transición Epitelio Mesénquima*

Se han identificado numerosos inductores de TEM en líneas celulares de cáncer incluyendo el Factor de crecimiento Transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Wnt, Snail/Slug, Twist y Six1. Estos inductores oncogénicos son igual de críticos durante la embriogénesis. (Micalizzi et al., 2010)

Actualmente se sabe que para que la TEM se lleve a cabo requiere de diferentes inductores. Por ejemplo por medio de factores oncogénicos como la mutación *K-Ras* o la sobre expresión de Her2, de igual forma estímulos externos que emanan del microambiente, de lo que está compuesta la matriz extracelular, fibroblastos asociados a cáncer, miofibroblastos, células del sistema inmune o factores solubles como Wnt, Hedgehog, el factor de crecimiento epidermal, citosinas etc. (Shih & Yang, 2011) Uno de los factores más importantes en este proceso es el TGF-  $\beta$ , Transforming Growth Factor (por sus siglas en inglés) el cual se describió por primera vez como inductor de la transición epitelio mesénquima en células epiteliales normales de glándulas mamarias, por medio de la señalización a través del complejo receptor serina/treonina cinasa. (Jiri Zavadil & Böttlinger, 2005)

Análisis de diferentes formas fenotípicas de la transición en células epiteliales estimuladas con TGF-  $\beta$ , sugieren que los cambios ocurren durante una secuencia temporal coordinada donde las uniones celulares pierden su estabilidad, reorganización del citoesqueleto, pérdida de la polaridad epitelial y remodelación de las adhesiones de la matriz extracelular. (J Zavadil et al., 2001) En cuanto a la remodelación del citoesqueleto, señales activadas por medio del TGF-  $\beta$  que tienen por blanco a los factores de guanina nucleotídica de intercambio (GEFs) para activar a las GTPasas de la familia Rho, regulan la remodelación asociada con la ganancia de la movilidad celular. (Bhowmick et al., 2001)

Otros Factores como el FGFs, HGF e IGF1/2 contribuyen a la transición epitelio mesénquima por medio de una producción de vía autocrina. Los niveles de  $\beta$ -catenina su estabilidad y función a través del factor de células T/ factor inductor de linfocitos

(TCF/LEF) reguladores transcripcionales, son aumentados si la E-caderina es degradada o se reprime transcripcionalmente. Otras vías como la de Notch, también están implicadas en la transición durante el desarrollo y la oncogénesis. (Huber, Kraut, & Beug, 2005) Adicionalmente, se ha demostrado que diversos represores dedos de zinc transcripcionales, como Snail pueden controlar la expresión de E-caderina en las células epiteliales. (Thiery, 2003)

### *Clasificación de la Transición Epitelio Mesénquima*

La TEM se puede clasificar en tres tipos que conllevan diferentes consecuencias funcionales. La TEM tipo 1 se asocia con la implantación, la formación del embrión y el desarrollo de los órganos. En este tipo se generan diversos tipos celulares que comparten fenotipos comunes mesenquimatosos.

La TEM tipo 2 se asocia con la cicatrización de heridas, regeneración del tejido y la fibrosis en los órganos, como parte de un evento de restauración/reparación que normalmente genera fibroblastos y otras células relacionadas con el fin de reconstruir tejidos, seguidos de trauma y daño inflamatorio.

La TEM tipo 3 ocurre en células neoplásicas que previamente han sufrido cambios genéticos y epigenéticos, específicamente en genes que favorecen el crecimiento clonal y en desarrollo de tumores locales. (Kalluri & Weinberg, 2009).

### **x. TGF- $\beta$**

Es una citosina ubiquitinada que se une a una célula blanco a través de los receptores tipo I y II, iniciando una cascada múltiple de señales incluyendo la vía canónica de señalización Smad, la cual regula la transcripción en combinación con cofactores. Es miembro de un grupo de factores diferentes con múltiples funciones en diversos órganos, es notable por su capacidad de modular diversos procesos celulares incluyendo la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. Las isoformas de esta citosina se saben son esenciales para un desarrollo embrionario y fetal normal así como en la homeostasis de los órganos; de igual forma se conoce de anomalías en la regulación o señalización de ésta molécula en enfermedades agudas y crónicas. Es el estimulador directo de la producción de colágena de igual manera induce la transcripción y síntesis de otros componentes de la matriz extracelular como la fibronectina, glicosaminoglicanos y proteoglicanos. (Micalizzi et al., 2010)

Análisis de modulaciones fenotípicas en la TEM estimuladas por TGF- $\beta$  en diferentes cultivos celulares epiteliales, sugieren que ocurre en una secuencia coordinada temporal de desmontaje de uniones celulares, reorganización del citoesqueleto, pérdida de la polaridad epitelial y la remodelación de adhesiones de la matriz celular. (Jiri Zavadil & Böttinger, 2005)

Tiene la habilidad de inhibir o estimular la proliferación celular. La actividad anti proliferativa es la que mejor se ha registrado en células epiteliales, mientras que el efecto de crecimiento estimulatorio se ha observado más en células de origen mesenquimatoso como los fibroblastos. (Miettinen, Ebner, Lopez, & Derynck, 1994)

### *TGF- $\beta$ y cáncer*

La expresión del TGF-  $\beta$  se ha estudiado en casi todos los tipos del cáncer incluyendo próstata, mama, pulmón, colorectal, pancreático y piel. A través de estos estudios se ha demostrado que esta molécula funciona como un supresor o promotor del tumor.

En epitelios benignos y en tumores de estadificación temprana, se ha visto que es un potente inductor del arresto del crecimiento. Sin embargo en tumores avanzados, las vías de señalización del TGF-  $\beta$  se ven severamente desregularizadas. En lugar de inhibir la carcinogénesis, TGF-  $\beta$  promueve el crecimiento del tumor y la progresión a estadios más avanzados, en parte por su habilidad por inducir TEM. (Principe et al., 2014)(Micalizzi et al., 2010)

TGF- $\beta$  regula la proliferación de diversas células normales, sin embargo, en las células tumorales ocurre la pérdida de respuesta de ésta citosina. Evidencias indican una correlación entre el aumento de la expresión de la proteína y del RNAm del TGF- $\beta$  con los estadios avanzados de la tumorigénesis, así como la disminución de la supervivencia en cánceres de origen epitelial, neuroectodérmicos y de origen mesenquimal, por lo que esto indica que el aumento en la expresión del TGF- $\beta$  lleva a la pérdida de la respuesta inhibitoria de la proliferación inducida por éste y puede representar un mecanismo de escape de la célula tumoral que favorece el proceso neoplásico. Los mecanismos que aumentan la expresión del TGF- $\beta$  pueden explicarse en parte por los procesos de la regulación de la expresión de este gen; pero una vez que la célula tumoral pierde su capacidad para inhibir su proliferación por esta molécula, produce cantidades excesivas de ésta misma. Esta condición proporciona una ventaja selectiva a la célula tumoral, ya que el TGF- $\beta$  induce *de novo* a la angiogénesis y el desarrollo

de un estado de inmunosupresión, incluyendo la inhibición de la respuesta antitumoral por parte de las células NK. (Peralta-Zaragoza, Lagunas-Martínez, & Madrid-Marina, 2001).

Se reconoce a TGF- $\beta$  como un clásico inductor de la TEM en una amplia gama de sistemas. En cáncer de mama se conoce que es supresor de tumor en etapas tempranas a través de sus efectos inhibitorios. En contraste TGF- $\beta$  promueve la metástasis en etapas avanzadas de la tumorigénesis en parte por su capacidad de inducir la TEM. En diversos modelos de invasión y metástasis de cáncer de mama, la vía de señalización de TGF- $\beta$  activada induce un incremento en la agresividad. Adicionalmente evidencia clínica sugiere una correlación entre la expresión de los ligandos de TGF- $\beta$  y una muy baja mejoría en el paciente. De igual forma, la vía de señalización activada se ha observado en metástasis de cáncer de mama y hueso, la cual contribuye a al establecimiento de estas lesiones. (Micalizzi et al., 2010)

Recientemente numerosos estudios han indicado que el TGF- $\beta$  induce la TEM en diversos tipos de células epiteliales. La TEM es un importante paso en la invasión y metástasis del cáncer, por lo tanto el TGF- $\beta$  induce la progresión del cáncer a través de la TEM. TGF- $\beta$  induce la expresión de diversos factores de transcripción y reguladores de la transcripción envueltos en la TEM, incluyendo  $\delta$ EF1, SIP1, y Snail esto en células epiteliales de mama de ratón NMuMG.

$\delta$ EF1 y SIP1 son dos factores transcripcionales con estructura de dedos de zinc envueltos en la TEM. Los niveles de expresión de  $\delta$ EF1 y SIP1 son gradualmente incrementados por TGF- $\beta$ , hasta después de 24 horas, con perfiles de expresión recíprocos a la E-caderina en células NMuMG. De igual forma se ha visto que estos factores reprimen la expresión de E-caderina, no afectan la expresión o reprimen a marcadores mesenquimatosos.

Se sabe que existe un sinergismo entre la señalización de TGF- $\beta$ , por ejemplo células EpH4 son transformadas por medio de Ras mutado, éstas se someten a la TEM por medio del TGF- $\beta$  y exhiben un fenotipo tipo fibroblasto, metastásico e invasivo.

La inducción de Snail por medio del TGF- $\beta$  únicamente ocurre en cooperación con Ras activo en ciertos tipos celulares como las MDCK y las células de carcinoma. (Miyazono, 2009)

En estadios avanzados de la enfermedad, TGF- $\beta$  induce la TEM en las células cancerosas. En éstas la represión de la E-caderina y la inducción de la vimentina,

metaloproteasas de matriz y otros factores que promueven la TEM pueden ser activados por el TGF- $\beta$ .

La pérdida de E-caderina se ha asociado a la señalización del TGF- $\beta$  en las células cancerosas a través de los mecanismos dependientes de SMAD e independientes.

En cáncer pancreático, TGF- $\beta$  es suficiente para inducir la fosforilación de la tirosina de una  $\alpha$ -catenina y la señalización río debajo de una catenina- $\beta$  Wnt de manera vía independiente de SMAD. Esta acción es dependiente de PI3K/Akt y desestabiliza la adhesión del complejo de E-caderina. Se sabe que E-caderina inhibe la vía de señalización PI3K/Akt, la pérdida inicial de E-caderina puede llevar a futuros eventos desestabilizadores, llevando a la pérdida de la adhesión célula-célula.

Alternativamente en células epiteliales, el TGF- $\beta$  puede inducir la expresión y la transcripción del factor Snail reclutando el complejo Sin3A/HDAC1/HDAC2, lo que lleva a una desacetilación del promotor de la E-caderina, por lo tanto reprimiendo la transcripción.

Las vías de señalización TGF- $\beta$  y WNT parece convergen en vimentina. Un estudio previo indicó que el aumento en la expresión de vimentina por TGF- $\beta$  en cáncer prostático es mediado por NF- $\kappa$ B y TAK1.

TGF- $\beta$  tiene una asociación positiva tanto con la adquisición de la TEM y de un fenotipo denominado células troncales cancerígenas. Este promueve la metástasis interrumpiendo la adhesión célula-célula, aumentando la expresión de la vimentina y las MMP's. (Principe et al., 2014)

## **xi. Vía de señalización de Hedgehog**

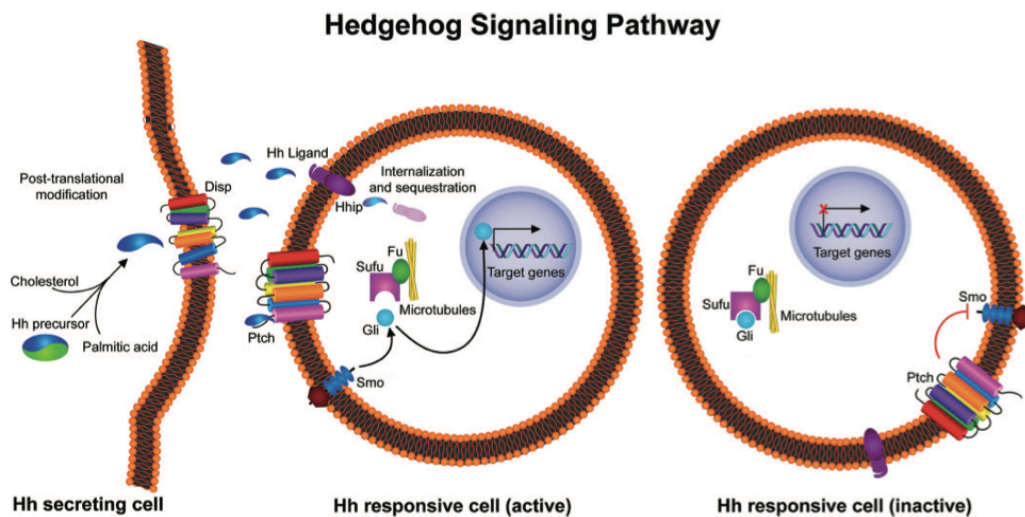
La familia de genes Hedgehog es una vía de señalización que es crucial en la embriogénesis, así como en la reparación y regeneración del tejido adulto. En mamíferos la vía de señalización de Hedgehog está compuesta de los ligandos Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) y Desert Hedgehog (Dhh) de los cuales Shh es el más estudiado. (Velcheti & Govindan, 2007) (Olsen, Hsu, Glienke, Rubanyi, & Brooks, 2004) (Nybakken & Perrimon, 2002).

La vía fue originalmente descubierta en el proceso de segmentación durante el desarrollo embrionario de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. De los tres miembros de la familia Dhh es el homólogo más cercano con Hh de *Drosophila*.

(Rodríguez-Blanco, Jezabel., Robbins, 2013)

También la componen las moléculas de superficie Patched (PTCH) y Smoothened (SMO). En ausencia de un ligando Hh, PTCH causa una supresión de SMO, sin embargo tras la unión del ligando con PTCH, la proteína SMO se transloca y activa al factor de transcripción GLI1, que después se transloca al núcleo e induce la expresión de los genes blanco Hh. Por su parte el factor de transcripción GLI2 tiene la función de activador y represor mientras GLI3 reprime la transcripción al no haber unión con el ligando. (Velcheti & Govindan, 2007)

Sonic Hedgehog participa en diferentes procesos como la diferenciación celular y la formación de órganos. Los tejidos requieren de niveles específicos de la vía de señalización de Hh para poder llevar a cabo una función adecuada; un incremento o decremento de la actividad de la vía resulta en severos defectos, por ejemplo estudios recientes indican que el aumento de la vía causa cáncer en diversos órganos incluyendo los pulmones, el tracto gastro-intestinal y el páncreas. (Pasca di Magliano & Hebrok, 2003).



**Figura 4.-** Vía de señalización de Hedgehog (Velcheti & Govindan, 2007)

### *Sonic Hedgehog y cáncer*

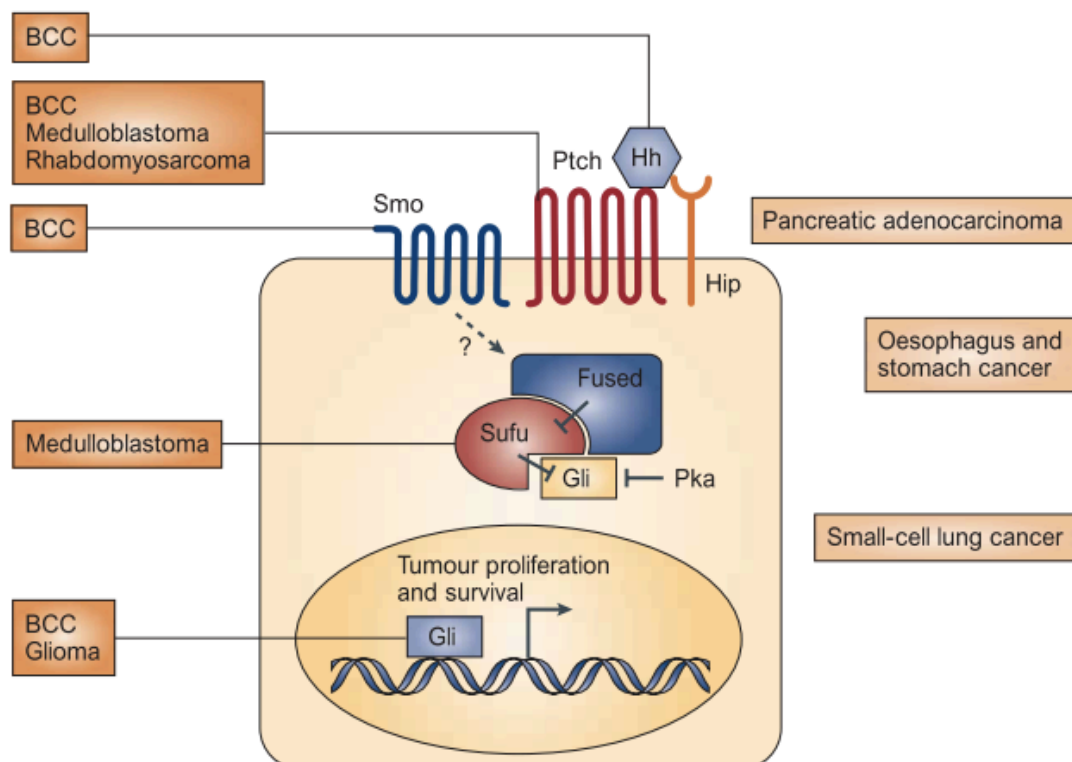
Una activación patológica de la vía de Hedgehog se asocia con meduloblastoma, un tumor maligno del cerebro que se cree que proviene de células del granulo del cerebelo. (Velcheti & Govindan, 2007)

Diversos estudios indican que un aumento en la vía causa cáncer en otros órganos que incluyen a los pulmones, el tracto gastro-intestinal y el páncreas. Sin embargo, el tejido adulto conserva la capacidad para responder a las señales de la vía de Hh,

cuando se ven elevadas la expresión de Shh y PTCH en tejido en regeneración causado por un daño.

Diferentes componentes de la vía tienen mutaciones activadas y se han identificado diferentes mutaciones en Shh en un pequeño porcentaje de carcinoma de células basales, meduloblastoma e incluso en cáncer de mama. El papel de Shh como oncogén se ha demostrado en estudios de ratones y humanos, donde la expresión ectópica de Shh resulta en carcinoma de células basales. También mutaciones activas de SMO se han encontrado en un 10-20% en cáncer de células basales, y el factor de transcripción GLI1 fue originalmente identificado como un gen que amplificaba en glioma.

Mutaciones en PTCH se asocian con carcinoma de células basales así como meduloblastoma y rhabdomyosarcoma, de igual manera una forma oncogénica de Shh se ha asociado con carcinoma de células basales. La desregulación de la señalización de la vía de Hedgehog también se ha asociado con adenocarcinoma pancreático, cáncer de esófago, estómago y cáncer de células pequeñas; sin embargo, se conoce muy poco acerca de los mecanismos moleculares por los cuales la vía de Hh se ve sobre-expresada en estos tumores. (Pasca di Magliano & Hebrok, 2003)



**Figura 5.-** Vía de señalización de Hedgehog y cáncer. La desregulación de la vía de Hh causa cáncer en diversos tejidos. (Pasca di Magliano & Hebrok, 2003)

En condiciones normales, la vía de Hedgehog está inactiva en el epitelio pulmonar del adulto a excepción de las células progenitoras o madre (epitelio progenitor). La presencia de la vía en el este epitelio progenitor ayuda al mantenimiento de estas células que desempeñan un papel crítico en respuesta a un daño al epitelio de las vías aéreas. Estudios en modelos de daño y regeneración en animales sugieren que un daño persistente a las vías aéreas es un estímulo potente para la activación de la vía de Hedgehog, lo cual ayuda a la expansión de las células epiteliales progenitoras. (Velcheti & Govindan, 2007) Diversos estudios en líneas de cáncer de células pequeñas (SCLC) y de cáncer de células no pequeñas NSCLC mostraron la expresión de la proteína Shh. (Watkins et al., 2003)

La vía de señalización de Hedgehog es un mediador crucial para el desarrollo normal de órganos durante la embriogénesis y la reparación del tejido durante la existencia de daños a éste específicamente en el tejido pulmonar. La vía de Hh regula estos procesos a través de la inducción de la TEM. Reactivación de la vía de señalización de Hh con la inducción de la TEM se ha visto altamente implicada en la carcinogénesis de diversos cánceres. Estudios pre-clínicos indican que la inhibición de la vía de Hh puede revertir la TEM, que a su vez se asocia con una mayor sensibilidad del tumor a agentes citotóxicos. Se sugiere que ésta vía está activada en diversos NSCLCs. Se demostró que una exposición crónica a TGF- $\beta$  induce la TEM en NSCLC en la línea celular A549, llevando a éstas células a expresar características mesenquimales las cuales denominaron A549M. La inducción de la TEM en estas células se asoció con la activación de la vía de Hh. (Ahmad et al., 2013)

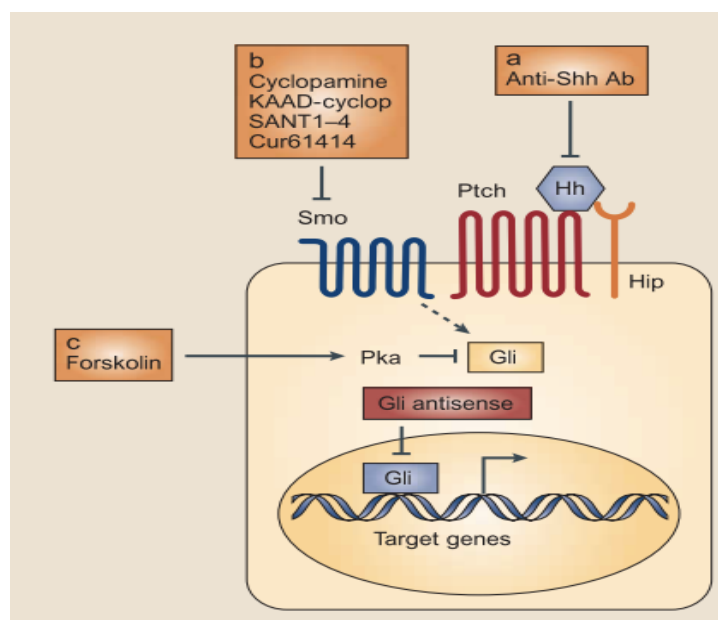
En un estudio de células de cáncer pancreático los datos sugieren que la red molecular de la TEM mediada por la señalización de Shh puede contener al menos dos circuitos de retroalimentación. El primero es la retroalimentación positiva en la señalización entre Shh y TGF- $\beta$ . Evidencia *in vitro* e *in vivo* sugiere que la comunicación entre TGF- $\beta$  y Shh resulta en una inducción recíproca. TGF- $\beta$  aumenta la expresión de Shh y activa GLI1 durante la inducción de la TEM, sin embargo, la vía de señalización de Hh aumentó la expresión de TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. La segunda retroalimentación positiva es entre la señalización de Ras y Shh. (Xu et al., 2012)



### Inhibidores de la vía de Hedgehog

La vía de Hedgehog Hh puede ser bloqueada a diferentes niveles, los inhibidores de la vía Hh pueden funcionar como agentes anticancerígenos gracias a sus efectos específicos en un pequeño número de células en tejido adulto.

Diversos antagonistas de la vía se han identificado y probado. La inhibición de la actividad de ligando se ha reportado con anticuerpos dirigidos contra Sonic Hedgehog Shh. La ciclopamina, un alcaloide natural derivado y aislado de una planta de la familia de las liliis *Veratum californicum* representa el primer miembro de una pequeña clase de compuestos químicos que inhiben específicamente la vía de Hh. Es un teratógeno de alta especificidad que inhibe la actividad de SMO. La proteína Kinasa A (Pka) mantiene a los factores de transcripción en un estado inactivo, por lo que la activación de la Pka por medio de agonistas como la forskolina puede prevenir la activación de GLI por medio de genes de transcripción blanco. GLI también se puede inhibir a nivel de RNA tomando en cuenta como blancos sus transcritos por medio de oligonucleótidos anti sentido. (Pasca di Magliano & Hebrok, 2003)



**Figura 6.-** La vía de señalización de Hh puede ser bloqueada a diversos niveles, por diversos inhibidores específicos de ésta. (Pasca di Magliano & Hebrok, 2003)

## **xii. HHIP- molécula inhibidora de la vía de Hedgehog**

“Human Hedgehog Interacting Protein” (HHIP) codifica para una proteína de membrana que se une a las tres proteínas de la vía de Hedgehog (Sonic, Desert e Indian Hedgehog) con una afinidad nanomolar, similar a la de PTCH. Se adhiere a la superficie celular por medio de una hélice-terminal C. (Chuang & McMahon, 1999)(Bishop et al., 2010)

La proteína HHIP de humano es una proteína GPI con una N terminal HFN-CRD, un dominio Beta- propeller y dos dominios C terminales EGF. (Pei & Grishin, 2012).

La disponibilidad del ligando Hh para la señalización es regulada por la expresión de HHIP en la superficie de membrana. La proteína HHIP atenúa la señalización de la vía de Hh a través de un mecanismo de retro-alimentación negativa por medio de la interacción con las proteínas, es uno de los genes blanco por lo que actúa como un gen supresor de tumores, asimismo aumenta su expresión en respuesta a la señal de Shh. (Shahi et al., 2014)(Torroja, Gorfinkiel, & Guerrero, 2005)

El papel de HHIP en el control del gradiente de Shh ha sido muy bien documentado durante el desarrollo del tubo neural, donde se sabe que Shh actúa como un morfógeno. Es interesante que el mecanismo de restricción de Shh por parte de PTCH es mediado por la internalización y degradación de Shh, mientras que HHIP se acumula en la superficie celular donde es capaz de interactuar con Shh previniendo así su movimiento e interacción con el mecanismo de traducción de señal. No se sabe si HHIP tiene otro papel además de restringir la difusión de Shh y competir con PTCH por el ligando Shh. Se ha sugerido que tal vez existe de forma soluble y que tanto ésta como la asociada a membrana están implicadas en la regulación de la vía. (Torroja et al., 2005)

Esta posible versión soluble de la proteína HHIP también es capaz de secuestrar a Shh, por lo tanto interfiriendo con la señalización de Hh. HHIP tienen función en el desarrollo del cartílago, desarrollo normal de los nervios y la orientación del axón y se sabe que su expresión se encuentra alterada en diversos tipos de cánceres. (Bishop et al., 2010)



**Figura 7.-** Esquema de la organización del receptor de HHIP. SP- Peptido señal; L1-L2 regiones de uniones de interdominios; EGF1, EGF2 Dominios repetidos tipo factor de crecimiento epidermal; Hx Hélice de anclaje a la membrana; Residuos de sitios de rompimiento proteolítico Arg189 y Arg210 identificado por una secuencia N-terminal; (Bishop et al., 2010)

#### *Papel inhibidor de HHIP en cáncer*

La expresión del gen de HHIP se ha visto reducida o ausente en diferentes líneas celulares tumorales, por ejemplo células de cáncer hepático, gástrico y meduloblastoma.

También se conoce de la restauración de la expresión de HHIP en líneas de cáncer pancreático, gastrointestinal y hepático después de un tratamiento con un agente desmetilizante, esto indica la metilación del promotor de HHIP en estos tipos de cánceres. De igual forma otros reportes indican que la des-acetilación y remodelación de la cromatina contribuyen al silenciamiento de HHIP en cáncer pancreático y gastrointestinal. (Kobune M., 2012)(Shahi et al., 2014)

## II JUSTIFICACIÓN

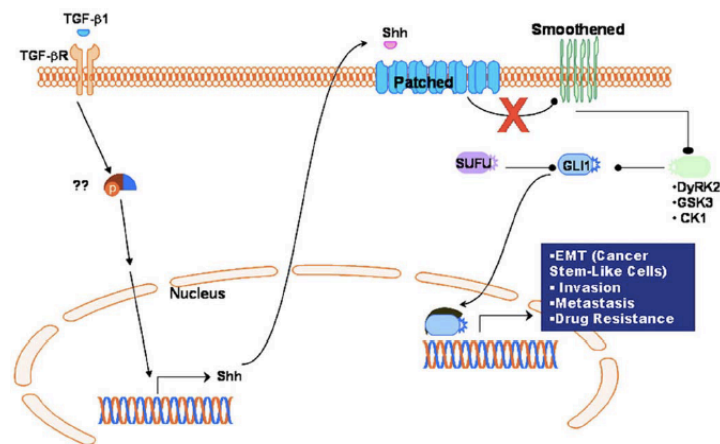
Las vías de señalización embrionarias como la de Hedgehog, el proceso denominado transición epitelio-mesénquima o la regulación y diferenciación celular por medio de TGF- $\beta$  (Peralta-Zaragoza et al., 2001) son de suma importancia para que el embrión logre desarrollarse con éxito. Lo que se ha observado en cáncer particularmente, es que las células tumorales reactivan fácilmente propiedades del desarrollo embrionario fuera de contexto en el adulto (Micalizzi, 2010) lo que contribuye al desarrollo de tumorigénesis por medio de la inducción de una acelerada proliferación, resistencia a apoptosis y evasión de la senescencia.

HHIP la proteína de membrana que se une a las tres proteínas de la vía de Hedgehog, fue descubierta en un modelo murino por Chuang y McMahon en el año 1999 y lo que observaron fue que la expresión ectópica de HHIP en ratones transgénicos resultaron en severos defectos similares a los observados en mutaciones de Indian Hedgehog *Ihh*, demostrando que HHIP está envuelta en la atenuación de la vía de señalización. (Bak, Hansen, Henriksen, & Tommerup, 2001) Por tal HHIP es una molécula "recientemente" descubierta la cuál ha sido más estudiada en modelos de desarrollo embrionario y no así en cáncer, de la cual hay poca información particularmente de pulmón. Así como se ha observado la expresión anómala de diversos componentes de la vía de señalización de Hedgehog en cáncer, HHIP no es una excepción, es por esto que se le ha dado importancia a esta molécula ya que cumple con la función de inhibir a Shh y que la vía se active, lo cual evita que los genes blanco se expresen y con esto no haya un proceso de proliferación celular en el caso de cáncer. Se ha comprobado que HHIP se ve disminuida en los procesos oncológicos, por lo que no hay una inhibición de Shh para evitar la proliferación celular. Por tal motivo es que esta molécula es de suma importancia en la regulación de la vía de señalización para mantener una estabilidad en la célula /sistema y en patologías como cáncer su disminución o casi nula expresión permite, conjunto con otros procesos el desarrollo de la enfermedad.

Es por esto que el estudio de la vía de Hedgehog en particular del inhibidor HHIP, durante la transición epitelio-mesénquima estimulada por TGF- $\beta$  en una línea celular de cáncer de pulmón podría proveer información importante que ayude a comprender por qué estas vías embrionarias se reactivan de forma anómala en el adulto, favoreciendo procesos patológicos como el cáncer.

### III ANTECEDENTES

Maitah *et al.* demostraron que una exposición crónica de las células A549 a TGF- $\beta$  conlleva a la adquisición de un fenotipo TEM con un concomitante aumento en la expresión de Sonic Hedgehog tanto a nivel mRNA como proteico. Este aumento en la regulación de Shh fue consistente con un incremento en la movilidad, invasión y agresividad del tumor. También este proceso puede ser atenuado por un Shh siRNA, así como inhibidores de la vía como son la ciclopamina. Por lo tanto, todo lo que llevaron a cabo sugiere que la adquisición de un fenotipo TEM por TGF- $\beta$  en células de NSCLC está mecanísticamente mediado por la activación de la vía de señalización de Shh, ya que al silenciar a Shh por medio de un siRNA Shh específico atenuó el fenotipo TEM inducido por TGF- $\beta$ . De igual forma ellos proponen un modelo (Figura 8) por el cual las células epiteliales tumorales pueden ser crónicamente expuestas a TGF- $\beta$  secretado por células del estroma, células del sistema inmune o células del micro ambiente tumoral, resultando en el aumento de la expresión de Shh a nivel mRNA como proteico lo que consecuentemente estaría causando la activación de la vía de Hh y la adquisición de un fenotipo TEM.



**Figura 8.-** Propuesta en la que el receptor de TGF- $\beta$  se activa por medio de la unión de su ligando lo que lleva al aumento en la regulación de la expresión de Shh. La proteína secretada activa a la vía de Hh (canónica) lo que da como resultado la activación de los factores de transcripción GLI1 y su posterior translocación al núcleo. Después de esto los genes blanco se activan lo que conlleva a la adquisición de un fenotipo TEM, contribuyendo a la invasión, metástasis y resistencia a tratamientos.(Maitah, Ali, Ahmad, Gadgeel, & Sarkar, 2011)

#### **IV HIPÓTESIS**

Durante la transición epitelio-mesénquima inducida por TGF- $\beta$ 1 en células epiteliales A549, HHIP se encuentra disminuida.

## **V OBJETIVOS**

### **i. Objetivo general**

Evaluar la expresión HHIP y Shh durante la transición epitelio-mesénquima en la línea celular A549 inducida por TGF- $\beta$ 1.

### **ii. Objetivos específicos**

- Desarrollar un modelo in vitro de transición epitelio-mesénquima en células A549 inducida por TGF-  $\beta$ 1.
- Confirmar la TEM mediante la evaluación de la expresión de E-caderina y vimentina en las células diferenciadas.
- Analizar la presencia de HHIP y Shh por Western blot.

## VI MÉTODOS

### i. Cultivo celular

La línea celular de adenocarcinoma A549 se obtuvo de la ATCC. Las células se mantuvieron en medio F12 suplementado con suero fetal bovino al 10%, en la incubadora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> con aire. Las células se crecieron en cajas de cultivo de 75cm<sup>2</sup> y se subcultivaron hasta lograr tener células entre los pasajes 15-20 para hacer todos los experimentos.

Para inducir la transición epitelio mesénquima se plaquearon 1.5x 10<sup>6</sup> células. Una vez que las células se adhirieron, el medio se reemplazó por medio sin suero y se dejaron por 24 horas para sincronizar el cultivo. Después de este tiempo, las células se estimularon con TGF-β1 (R&D) (5ng/ml) durante 24, 48 y 72 horas. Como controles se utilizaron cultivos en medio sin suero. Al finalizar los tiempos de exposición, las células fueron fotografiadas con ayuda de un microscopio Fluid Cell Imaging Station- Life Technologies con un aumento 20X.

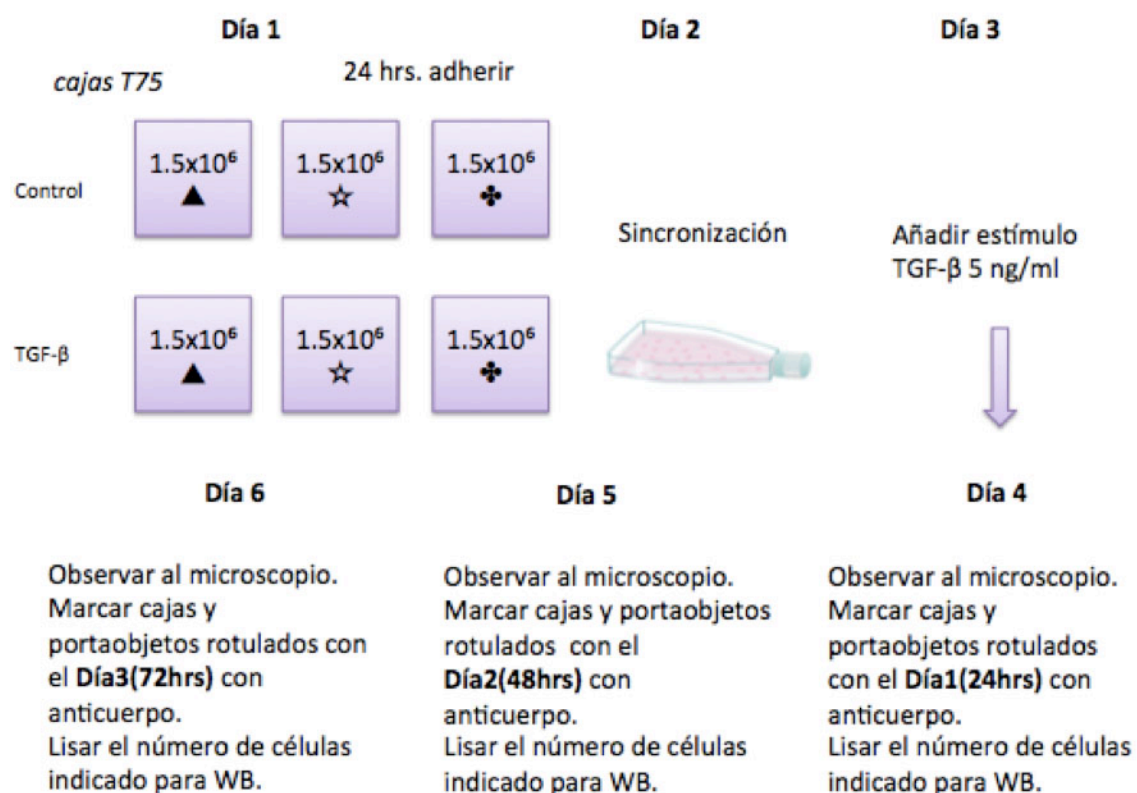


Figura 9.- Modelo experimental.



## **ii. Extracción de proteínas**

Una vez que se cumplió con los tiempos de estímulo, las células se cosecharon con Tripsina/EDTA, se centrifugaron a 200 g durante 10 minutos y se lavaron 2 veces con PBS. Las células se resuspendieron en 1 ml de PBS y se contaron en un hemocitometro. A una fracción de las células ( $1 \times 10^6$ ) se le adicionaron 50ul de buffer RIPA (Thermo Scientific) con un coctel de inhibidores proteasas 100x (Thermo Scientific) más PMSF Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Sigma) 1mM y se dejaron en hielo durante 10 min. Para obtener los extractos celulares las células se sonicaron 2 veces durante 6 segundos a una amplitud de 60 watts, con un sonicador Ultrasonic Processor y después se centrifugaron 10 min a 12000g a 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos de 0.5ml y se mantuvieron a -80 °C para su uso posterior.

## **iii. Cuantificación de proteínas**

Se hizo la cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford utilizando el reactivo comercial Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad). Se extrapolaron las absorbancias de las muestras en una curva estandarizada de albúmina sérica. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Bio-Rad iMark Microplate Reader.

## **iv. Western Blot**

Muestras de proteínas totales de los lisados (40ug) se mezclaron con buffer Laemmli 4X (Tris-HCl 0.5M pH 6.8- SDS- glicerol azul de bromofenol 0.05%,  $\beta$  Mercaptoetanol) y fueron sujetas a electroforesis SDS-PAGE en geles al 10%. La electroforesis se realizó en condiciones reductoras en una cámara BIO-RAD que se corrió a 150 V durante 70 min a 4°C. Para establecer el peso aproximado de las bandas, se incluyó un marcador de pesos molecular preteñido. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semi-seca (Bio-Rad Trans-Blot Turbo Transfer System) durante 20 min. Después de este tiempo la membrana se bloqueó con leche semidescremada al 5% en Buffer PBS-T con el fin de bloquear los posibles sitios de pegado inespecífico durante 1 hora. Para preparar 1 litro de PBS-T se requirieron de 800ml de PBS 1X en un vaso de precipitados y se agregaron 500ul de Tween 20. Se mantuvieron en agitación y se ajustó el pH de la solución a 7.4. Para finalizar se transfirió a una probeta y se aforó con PBS 1X estéril a 1L. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios mouse anti-Hhip (Abcam 1:500) y rabbit anti-Sonic Hedgehog (Abcam 1:100) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente las membranas se lavaron 4 veces con PBS-T durante 10 minutos y se incubaron con los

anticuerpos secundarios correspondientes anti-Mouse (1:10000) o anti-Rabbit (1:5000) conjugados a peroxidasa de rábano (Amersham), durante una hora a temperatura ambiente. Después de esto las membranas se lavaron 4 veces con PBS-T durante 10 minutos.

La marca se visualizó con el sistema de detección de quimioluminiscencia (West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) en un fotodocumentador (Bio-Rad Molecular Imager, ChemiDoc XRS+BIO-RAD). Como control de carga se utilizó un anticuerpo mouse anti-GAPDH 1:10000 (Invitrogen).

Las imágenes obtenidas se analizaron en el software Image J (V1.7) para obtener datos semicuantitativos de la intensidad del área de cada banda obtenida comparada contra el control de carga. Como controles positivos para HHIP y Shh se utilizaron 2 líneas comerciales Hela de ATCC, fibroblastos normales de pulmón (NHLF, de Lonza) y la línea celular de mama MDA-231 también de ATCC.

#### **v. Caracterización fenotípica de los marcadores epiteliales y mesenquimatosos por citometría de flujo**

Las células fueron tomadas de los cultivos de cajas T75, se llevó a cabo la inmunofenotipificación en  $4 \times 10^5$  células de la línea celular A549 y se incubaron con el anticuerpo monoclonal dirigidos contra antígenos de superficie CD324 E-Cadherin 2ul para  $4 \times 10^5$  células (PerCP/Cy5.5) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al pasar este tiempo se hicieron los lavados correspondientes con PBS y se fijaron las células con paraformaldehído para después incubarlas con el anticuerpo monoclonal dirigido contra antígenos intracelulares Vimentin 2ul para  $4 \times 10^5$  células (Alexa Fluor 488). La células fueron adquiridas en un citómetro de flujo (BD Biosciences, San José, Cal. USA) y se analizaron con el Software FlowJo V. X (Treestar, Inc, Ashland, Or, USA) Se adquirieron en todos los casos 50,000 eventos.

## VII RESULTADOS

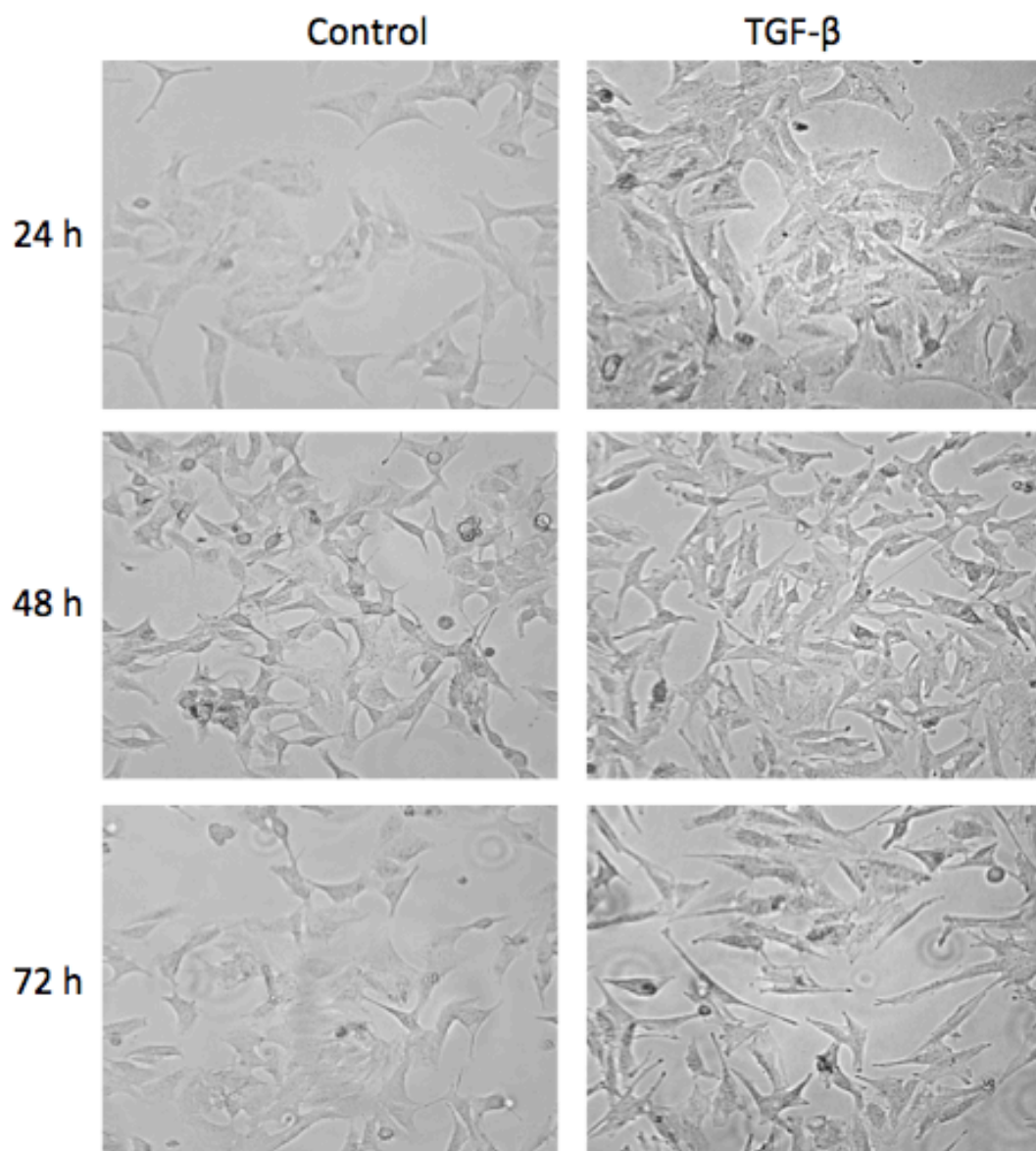
### *I. Morfología*

Las células se mantuvieron en medio con suero o se trataron con TGF- $\beta$  y se fotografiaron en los tiempos correspondientes (Figura 10). Como se puede observar, a las 24 horas de cultivo las células control mantienen una morfología característica de células epiteliales, cuboidales o redondas formando una monocapa. Las células estimuladas con TGF- $\beta$  a las 24 horas se observan aún unidas, pero con un ligero alargamiento con respecto a su morfología. A las 48 y 72 horas las células control mantienen la misma morfología y unión, mientras que en las estimuladas con TGF- $\beta$  se comienza a observar una notoria separación entre estas y finalmente a las 72 horas de haber sido estimuladas, las células se observan alargadas y con un fenotipo más parecido a células tipo fibroblasto.

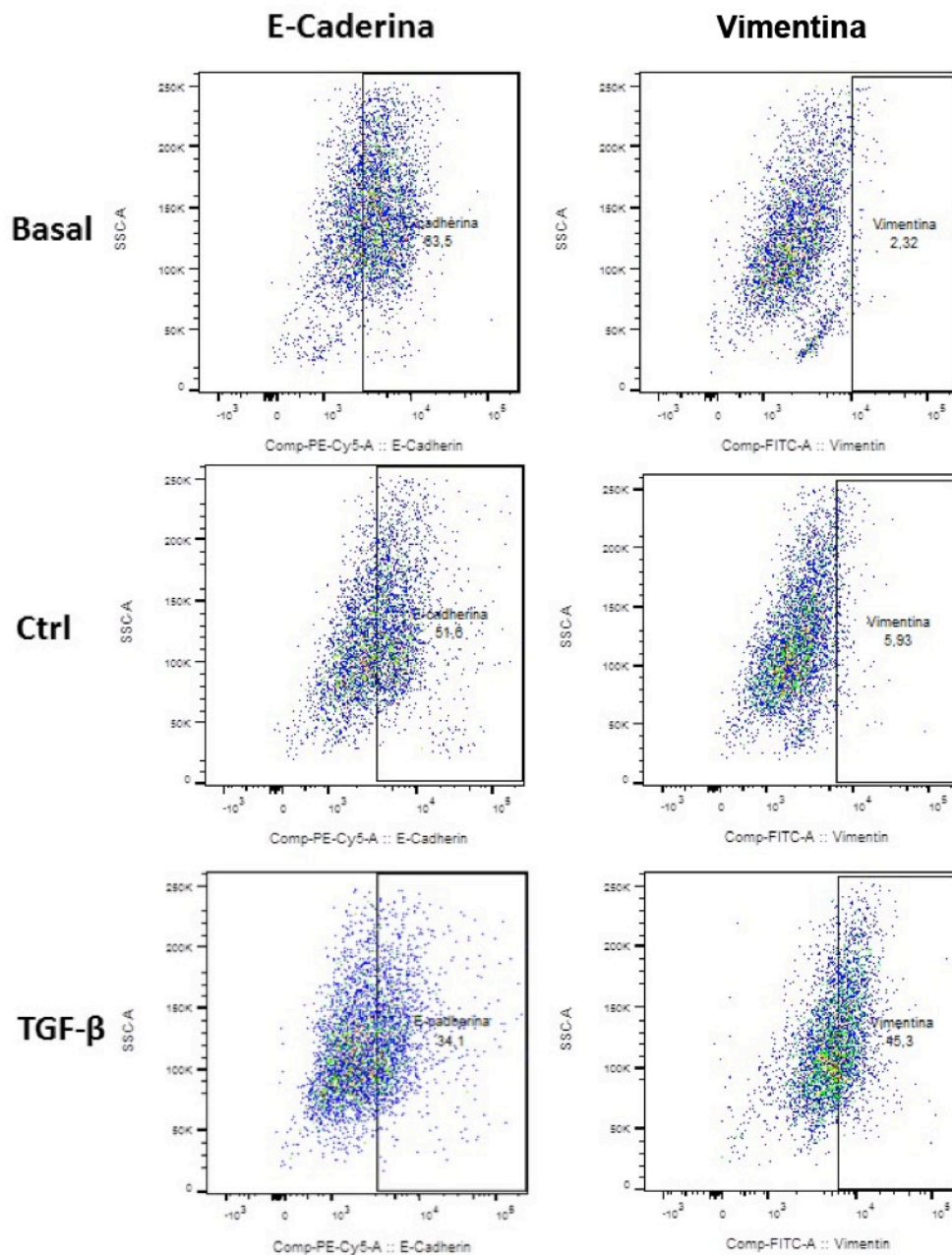
### *II. Citometría de flujo*

Adicional a la observación morfológica y para corroborar la transición epitelio-mesénquima, en los cultivos de células estimuladas con TGF- $\beta$  también fueron analizadas la presencia o ausencia de un marcador de células epiteliales (E-caderina) y un marcador de células tipo fibroblasto (vimentina). La figura 11 representa un ejemplo de los blots obtenidos por citometría de flujo de uno de los 3 experimentos que se hicieron mientras que las figuras 12 y 13 muestran el análisis de los resultados. En primer lugar, se determinó el porcentaje de células positivas para E-caderina y el porcentaje de células positivas para vimentina en la línea A549 en condiciones basales. Los niveles basales de E-caderina fueron de  $62.3 \pm 10.6$  % (figura 12) mientras que para vimentina fueron de  $13.7 \pm 11.3$  % (figura 13).

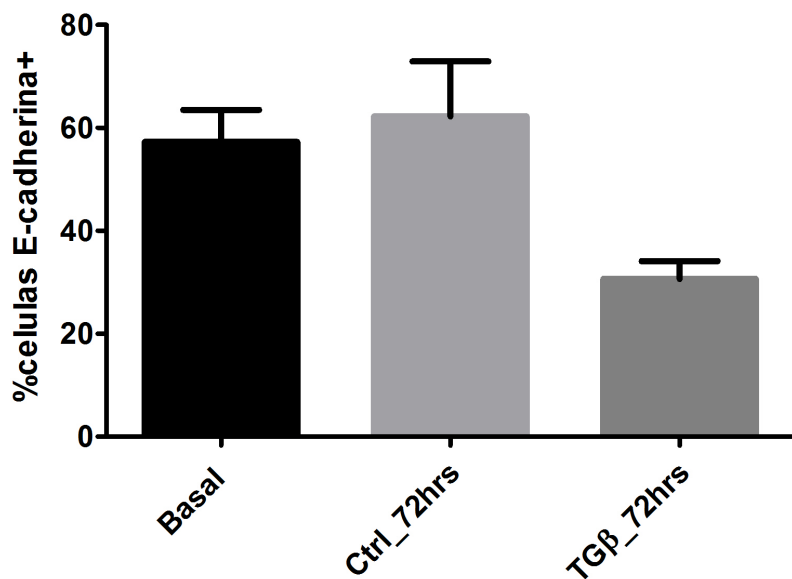
Posteriormente, a las células se les adicionó TGF- $\beta$  y después de permanecer 72 en cultivo se encontró que el porcentaje de células positivas para E-caderina disminuye considerablemente en las células tratadas con TGF- $\beta$  respecto al control ( $62.25 \pm 10.65$ % en TGF- $\beta$  vs  $30.65 \pm 3.4$ % en control) mientras que, por el contrario el porcentaje de células positivas para vimentina aumento considerablemente, pasando de  $9.2 \pm 3.2$  % en el control contra  $37.85 \pm 7.4$  % en los cultivos tratados con TGF- $\beta$ . En ambos casos, ninguno de los resultados arrojó una diferencia significativa (figura 12 y 13).



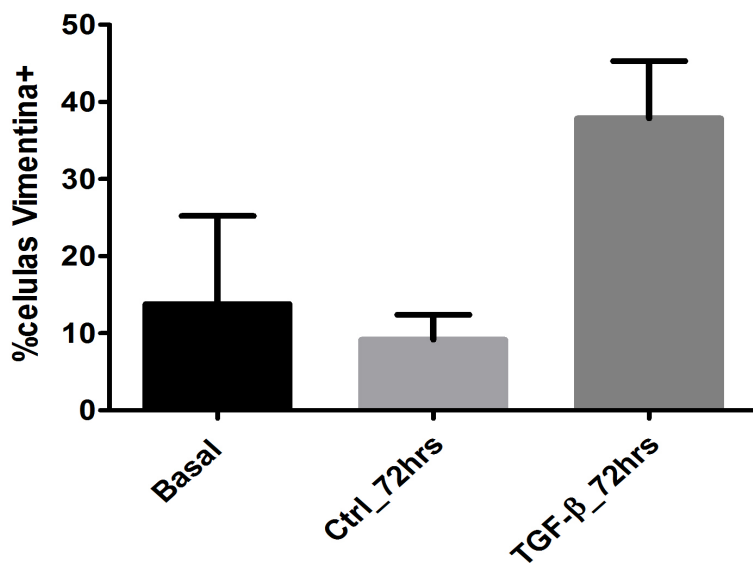
**Figura 10.-** Imágenes representativas de cultivos de células A549 en medio sin suero (Control) y tratadas con TGF-  $\beta$  (5ng/ml) a diferentes tiempos. Las imágenes se tomaron a un aumento 20X.



**Figura 11.-** Dot blots representativos del análisis de vimentina y E-caderina en células A549 tratadas con TGF-β a 72 horas. Se puede observar que en los Controles de E-caderina lo expresan un 51.6% de las células mientras que con TGF-β la expresan un 34.1% lo que concuerda con un fenotipo epitelial. Para vimentina un 45.3% de células expresó esta proteína en experimentales demostrando un fenotipo mesenquimatoso, mientras que por su parte en controles se observa que un 5.93% de células la expresaron.



**Figura 12.-** Gráfica del porcentaje de células que expresan E-cadherina. N=3  
 Se puede observar que el porcentaje de células control que expresan E-cadherina es mayor al número de células experimentales, en este experimento no hay significancia.

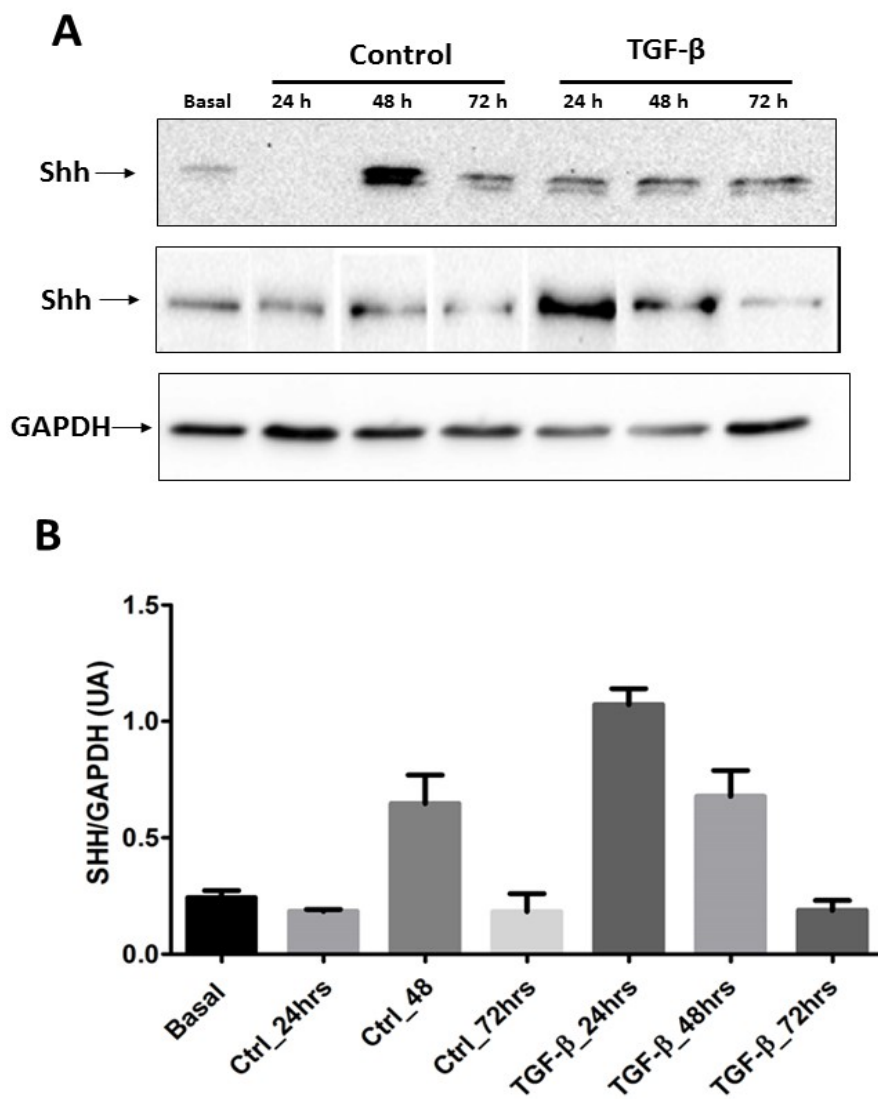


**Figura 13.-** Gráfica del porcentaje de células que expresan vimentina. N=3  
 El porcentaje de células estimuladas con TGF-β tuvieron un mayor porcentaje de expresión de la proteína vimentina y este no fue significativo.

### **III. WB**

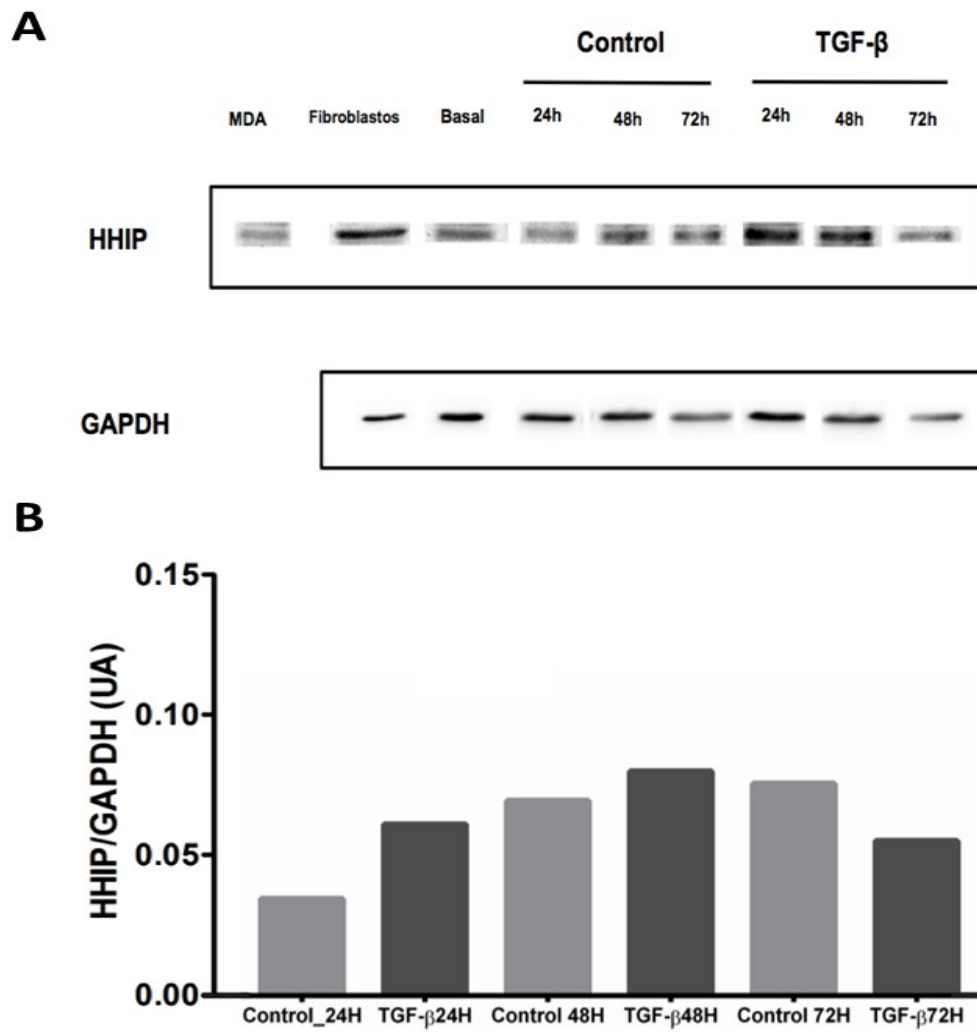
Células A549 se cultivaron con o sin TGF- $\beta$  y en ellas se analizó la presencia o ausencia de Shh y HHIP por inmunoelectrotransferencia en dos experimentos independientes. Como se puede observar en la figura 14A, en ambos experimentos se encontró que las células expresan la proteína Shh en condiciones basales. Sin embargo, cuando las células se dejaron 24, 48 y 72 horas en presencia o ausencia de TGF- $\beta$  los resultados obtenidos fueron heterogéneos. A pesar de ello, el análisis densitométrico (figura 14B) comparando los resultados de las dos membranas indica que el tratamiento con TGF- $\beta$  induce un aumento de Shh a las 24 horas vs el grupo control. En este análisis, no se pudieron observar diferencias en la expresión de Shh a las 48 y 72 horas entre las células control y las tratadas con TGF- $\beta$ .

En la figura 15 se muestran los resultados del análisis por western blot de HHIP. En las células que permanecieron en cultivo sin TGF- $\beta$  se puede observar que HHIP se incrementa a 48 y 72 horas. Por otro lado, en las células que fueron estimuladas con TGF- $\beta$  se encontró que HHIP aumenta considerablemente a las 24 y 48 horas. Sin embargo, a las 72 horas de estímulo con TGF- $\beta$  si se observó una disminución de la proteína.



**Figura 14.-** Análisis de Shh por Western Blot. A) Fotos representativas de blots en dos experimentos independientes. B) grafica del análisis densitométrico de los blots comparando la intensidad media de Shh vs la intensidad media de GAPDH como control de carga.





**Figura 15.-** Análisis de HHIP por Western Blot. A) Foto representativa del western blot contra HHIP y GAPDH como control de carga. B) Gráfica del análisis densitométrico.

## VII DISCUSIÓN

La caracterización de la biología molecular del desarrollo in útero y del cáncer han revelado similitudes muy remarcables en sus orígenes moleculares. Los requerimientos para la proliferación celular y la diferenciación tienen paralelismos considerables en las vías de señalización que rigen estos procesos.

Investigación reciente demuestra que la TEM tiene un papel importante en el desarrollo temprano de metástasis de células cancerígenas, de igual forma se sabe que la vía de señalización de Hedgehog y TGF- $\beta$  se ven implicados en el desarrollo y avance de esta enfermedad.

Está demostrado que TGF- $\beta$  es un precursor de la TEM como se puede observar en las imágenes (Fig.10) en las cuales las células sufrieron un cambio fenotípico. Morfológicamente está bien estudiado que las células epiteliales pierden su forma cuboidal característica y obtienen una forma tipo estrellada y alargada, en nuestras células estimuladas con TGF- $\beta$  se pudo observar este cambio mucho más notable a las 72 horas. Hoy en día existen numerosos estudios que demuestran este proceso, el cual se descubrió a nivel embrionario ya que es esencial para la gastrulación, el desarrollo de corazón y otros tejidos. (Xiao & He, 2010)

Se sabe que en adulto es esencial para el proceso de reparación celular, la re-epitelización y sanación de herida, así como la generación del tejido de fibroblastos durante el proceso de fibrosis en los órganos (Shih & Yang, 2011) y en últimos años se ha observado su expresión en diversas patologías como el cáncer.

Otra característica de la TEM es que las células pierden marcadores epiteliales como la E-caderina y ganan marcadores de células tipo fibroblasto, como vimentina. En nuestras condiciones, los porcentajes de células que expresan E-caderina muestran que ésta proteína tiene una alta expresión en la línea celular A549, lo que concuerda con estudios previos ya que estas células son epiteliales. Se observó que en condiciones basales y en las células de los grupos control, esta tendencia de una alta expresión se sigue manteniendo. Sin embargo, en las células que fueron estimuladas con TGF- $\beta$  el porcentaje de células que expresa esta proteína es menor, lo cual concuerda con la literatura ya que está comprobado esta proteína se va perdiendo al ser transformadas a un fenotipo TEM. Se sabe que en cáncer lo que caracteriza a la TEM es la disminución de la expresión de E-caderina, también se cree que es un represor de la invasión y la metástasis. Esta proteína es una molécula de adhesión que participa en interacciones dependientes de calcio, para formar las uniones adherentes y secuestrar a  $\beta$ -catenina. Se conocen diversos factores de transcripción

que reprimen la transcripción de E-caderina como son Snail, Slug, Zeb 1 etc. Estos factores suprimen el conjunto de genes que codifican a las caderinas, claudinas, MUC1 y citoqueratinas para inducir la TEM. (Shih & Yang, 2011) Se sabe que los mecanismos por los cuales E-caderina es inactiva en los tumores humanos se pueden resumir a dos categorías, una en la cual resulta en la producción de una proteína no funcional y la segunda que haya una completa ausencia de esta proteína. Se sugiere que esta pérdida de E-caderina puede resultar en la activación de una transducción de vías de señalización, que le confieren a las células cancerígenas la facilidad de completar los pasos en la metástasis. (Onder et al., 2008)

Por otra parte, para el caso de la proteína vimentina el porcentaje de células que expresaron la molécula en condiciones basales fue bajo lo que concuerda con lo reportado para un fenotipo epitelial, mientras que con TGF- $\beta$  se observó un aumento del porcentaje de células que expresan vimentina, en particular a las 72 horas que es cuando se observó la transición epitelio-mesénquima. El aumento en la expresión de vimentina se ha asociado directamente con la capacidad invasiva de diferentes tipos de cáncer.

Vimentina es una proteína de tipo filamento intermediario tipo III y se expresa predominantemente en el desarrollo embrionario, pero se ve estrictamente restringida a células mesenquimatosas en el adulto, incluyendo fibroblastos, linajes celulares derivados de la médula ósea y células endoteliales. Es requerida para la adherencia de linfocitos y para su migración a través del endotelio, la movilidad de fibroblastos o de células de cáncer de mama. Por ejemplo, en diversos tipos de cánceres epiteliales se ha reportado una alta expresión de vimentina, en particular por los fenotipos invasores de cáncer de próstata, células de sarcoma y células de cáncer de mama.

Los mecanismos que conducen al incremento de esta molécula no han sido completamente dilucidados y siguen en constante estudio. En este sentido, el bloqueo de la expresión de vimentina en un modelo de carcinoma escamoso no solo disminuyó la movilidad, si no promovió un fenotipo epitelial y a sí mismo, se ha reportado que en células epiteliales de cáncer de mama, la sobre- expresión del oncogén H-Ras-V12G o del factor de transcripción Slug, que están implicados en la migración celular y la TEM, inducen la expresión de vimentina.(Chung, 2014)

En la progresión del cáncer en particular, hay una afinidad para adquirir un patrón de comportamiento más agresivo. Las células más agresivas obtienen una forma ovalada, estrellada, pérdida de desmosomas y uniones adherentes, comenzando a expresar vimentina y un incremento de proteínas proteolíticas como metaloproteasas de matriz para degradar la matriz extracelular e incrementar la movilidad de éstas. (Shih & Yang, 2011)

A pesar de los cientos de trabajos enfocados a establecer la TEM como un fenómeno con utilidades para el diagnóstico clínico, los resultados obtenidos han sido controversiales. Diversos estudios indican una asociación entre la pérdida de la expresión de la E-caderina y de un mal pronóstico en cáncer de pulmón. (Xiao & He, 2010) Sin embargo, también se ha reportado que, aunque diversos marcadores asociados con la TEM como E-caderina o N-caderina con alto índice de expresión en cáncer de pulmón de células escamosas, no se asocian con una mala evolución de los pacientes. (Prudkin et al., 2009) Ciertamente esto indica que aún falta por hacer más investigación relacionada con la Transición Epitelio Mesénquima y particularmente en cáncer de pulmón, por lo que se requieren de más estudios para poder entender cómo funciona este proceso en la evolución de la enfermedad.

Además, el fenotipo TEM se sabe que está envuelto en la resistencia a agentes terapéuticos. Por lo que llevar a cabo una transición reversa TME, puede proveer de una herramienta efectiva en la cual las células puedan responder a los agentes terapéuticos convencionales.

La vía de señalización de Hh está posiblemente inactiva en el epitelio pulmonar adulto del ser humano a excepción de las células epiteliales progenitoras. Esta persistencia de la vía de señalización de Hh en las células progenitoras pueden mantener a estas células y conllevan un papel importante en la respuesta al daño epitelial, particularmente en las vías aéreas. (Velcheti & Govindan, 2007)

Como un primer acercamiento al estudio de esta vía, analizamos la expresión de Shh por western blot en dos experimentos independientes (figura 14). A diferencia de lo reportado por Maitah *et al.* donde ellos sugieren que las células parentales no transformadas no expresan Shh en condiciones basales, nosotros si pudimos observar que las células A549 expresan Shh. Sin embargo, existen trabajos en donde la expresión basal de Shh también ha sido reportada en diferentes líneas primarias de SCLC y NSCLC. (Watkins et al., 2003). Estas diferencias son debidas a diversos factores, entre ellos el tiempo de estimulación para conseguir el fenómeno de TEM y las condiciones de cultivo. En nuestro caso, nosotros utilizamos medio sin suero para estos experimentos y mantuvimos un estímulo con TGF- $\beta$  durante 72 horas que fue el tiempo en donde pudimos observar el cambio de fenotipo. A pesar de ello, nuestros resultados en dos experimentos independientes fueron diferentes, se sugiere que Shh se expresa considerablemente en las células A549 que crecen en medio sin suero y que el estímulo con TGF- $\beta$  incrementa la expresión de Shh a las 24 horas. Es probable que nuestro hallazgo de expresión de Shh en la condición basal y en los controles sea debida a la falta de nutrientes y a la generación de un ambiente hipóxico. Recientemente (Zhou et al., 2014) encontró que, en carcinoma de células

renales la condición de hipoxia incrementa la expresión de Shh a través del factor HIF-2a. No obstante, falta comprobar esta hipótesis en nuestro experimento.

Se ha estimado que al menos un 25% de los tumores requieren de esta vía de señalización para mantener la viabilidad de las células tumorales. Yuan *et al.* reportan que la vía de Hh se encuentra constitutivamente activa en cierto número de NSCLCs y sugieren la clasificación de estos tumores en aquellos que no requieren de la vía de Hh, aquellos que requieren de la vía de Hh y son sensibles a los inhibidores conocidos de la vía y finalmente aquellos que requieren de la actividad de la vía de Hh pero no responden a los inhibidores conocidos, ya que estos expresan niveles altos del factor de transcripción GLI1. Identificaron que en particular la línea celular A549 expresa altos niveles de GLI1, es decir, que correlaciona con un incremento en el potencial del crecimiento de la línea celular tumoral o del estado de metástasis del tumor *in vivo* (Yuan et al., 2007)

Se sabe de la existencia de diversos inhibidores de la vía y estos se han utilizado para demostrar que diversos tipos de cáncer requieren de la vía de Hh, al demostrar que estos antagonistas inhiben la proliferación de estas células tumorales de forma dosis-dependiente. (Yuan et al., 2007)

Como previamente se ha mencionado HHIP es un inhibidor de la vía de Hedgehog el cual secuestra a Sonic y no permite que este se una a PTCH por lo que la vía de señalización no se activa y por ende los genes blanco no se transcriben, lo cual indica una retroalimentación negativa, ya que HHIP es parte de los genes blanco de la vía.

Al ser parte de la vía de Hedgehog y basándonos en lo previamente aportado por Maitah *et al.* se esperaba que HHIP se encontrara disminuida en la línea celular A549, pero aún más disminuida en células en TEM estimuladas con TGF- $\beta$ . Se observó que el estímulo con TGF- $\beta$  a las 24 y 48 horas aumenta la expresión de HHIP, pero a las 72 horas que es cuando observamos el fenotipo de transición disminuye. Hay reportes de que la expresión de HHIP se reduce en un xenotransplante de células A549 en ratones desnudos; así mismo se sabe que el silenciamiento de la proteína HHIP induce un aumento en la señalización de la vía de Hh. Finalmente, se sabe que hay una baja expresión de HHIP en células endoteliales cuando ocurre la angiogénesis que puede potencialmente aumentar la vía de señalización de Hh y facilitar este proceso. (Velcheti & Govindan, 2007)

En este contexto, las células A549 que aumentan la expresión Shh en TEM no permitiría una retroalimentación y una regulación en el medio de Shh por medio de HHIP y esto podría explicar un aumento de la malignidad en las células, ya que nos estaría hablando de una casi nula retroalimentación negativa de la vía por parte de

ésta molécula y por lo tanto permitiría que más moléculas de Shh se unieran a PTCH en células blanco y permitieran de nueva cuenta la activación de la vía.

En nuestro experimento, las células control (sin TGF- $\beta$ ) tienen aumentada HHIP y también se ve un aumento de esta proteína con el estímulo de TGF- $\beta$  a las 24 y 48 horas. Este aumento puede ser debido en parte a la activación de vías alternas que a su vez podrían incrementar los niveles de HHIP, así como una falta de réplicas experimentales. Se sabe que TGF- $\beta$  es capaz de inducir la expresión de los factores de transcripción GLI, de los cuales existen tres proteínas en mamíferos GLI1 GLI2 y GLI3 cada uno codificado por diferentes genes. Se sabe que GLI3 exhibe una baja actividad transcripcional, por lo que es considerado un inhibidor de la actividad de Hh, mientras que GLI2 funciona como el principal transductor de las respuestas de los genes Hh. GLI1 carece de un dominio de represión y es también un activador transcripcional muy potente (Javelaud, Pierrat, & Mauviel, 2012) vía distintos mecanismos y estos no incluyen el eje Ptch/Smo (vía canónica). Existe la probabilidad de que esto pudiera estar pasando en nuestras condiciones, que exista la activación de la vía alterna que activa los genes blancos y permite la expresión de estos incluyendo un aumento de HHIP.

Adicionalmente se sabe de la existencia de vías alternas a la vía canónica que no requiere el complejo Shh-Ptch-SMO-Gli. Por ejemplo, en adenocarcinoma pancreático el factor de transcripción GLI es regulado por TGF- $\beta$  y K-ras. (Bermudez, Hennen, Koch, Lindner, & Eickelberg, 2013) En cáncer de ovario se desarrolló un estudio en líneas celulares en el cual se observó que la activación de las señales Shh-GLI1 pueden inducir a una TEM. De igual forma observaron que para la activación de las señales Shh-GLI1 se requería del aumento en la expresión de la vía PI3K-Akt. Por lo que demostraron que hay una intercomunicación entre las señales Shh-GLI1 y la vía de señalización PI3K-Akt para que la TEM pueda ocurrir en cáncer ovárico. (Ke, Caiping, Qing, & Xiaojing, 2015)

Se sabe que la activación de la vía es necesaria para la invasión y que cuando TGF- $\beta$  está presente, la activación de la vía canónica estimula la expresión de factores que promueven la TEM por medio de la disminución de la expresión de la molécula E-caderina. Se conoce que también induce la TEM por medio de otra vía (no canónica) activando directamente los factores GLI. Por ejemplo en adenocarcinoma de células pancreáticas se ha reportado que TGF- $\beta$  induce la activación de GLI1 por medio de Smad 3 y estos resultados podrían estar indicando una retroalimentación asociando a TGF- $\beta$  con la activación de Shh. (Maitah et al., 2011)

Hay que tener en cuenta como previamente se mencionó TGF- $\beta$  actúa a través de la vía de señalización canónica de Smads la cual activa los factores de transcripción envueltos en el desarrollo de la TEM como son los factores Snail, Slug. También se sabe que TGF- $\beta$  puede activar la TEM por vías alternas o hacer sinergismo con diversas vías de señalización como Notch, por lo tanto el adquirir un fenotipo mesenquimatoso no solo es dependiente de la vía de Hh sino de otras vías que actúan en conjunto en el ambiente tumoral.

Todo esto indica que vías alternas participan en la activación de los factores de transcripción GLI los cuales son los principales en permitir la expresión de los genes blanco y a los cuales HHIP pertenece. Esto podría ser una posible explicación del porque nosotros encontramos un aumento de HHIP en las células sin estímulo. Así mismo, se puede inferir que HHIP estaría regulando los niveles de Shh en esta línea celular.

Es importante hacer estudios más a fondo en los que se observe que vías de señalización están actuando en conjunto con la de Hh y activan los factores GLI para permitir este aumento en la expresión de HHIP y éste no permita que la vía canónica se exprese, así mismo el saber del porque HHIP deja de expresarse en estos padecimientos ya que se sabe que la disminución de esta molécula en cáncer permite el avance de esta patología, así como su malignidad. Nuestro estudio no es concluyente, pero abre nuevas ventanas para el estudio del fenómeno TEM en las células A549 por lo cual se debe hacer un estudio más a fondo de la Transición epitelio Mesénquima y la transición reversa con marcadores tanto epiteliales como mesenquimatosos, así mismo utilizar otras líneas celulares para poder establecer si alguno de estos marcadores puede ser utilizado en el ámbito clínico.

Human Hedgehog Interacting Protein es una molécula "recientemente" descubierta y por la previa y escasa información que se tiene, se sabe que es un supresor de tumor, lo que indica que esta molécula podría funcionar como un blanco terapéutico.

La diseminación de un tumor es un proceso complejo. La patogénesis de la metástasis del cáncer consiste en una serie de pasos ligados, unidos y selectivos que envuelven procesos como la migración, invasión, adhesión, proliferación y angiogénesis (Shih & Yang, 2011), por esta razón es importante unificar diversos elementos como los son las vías de TGF- $\beta$ , la TEM y la vía de señalización de Hedgehog que en conjunto se ha comprobado favorecen el avance de los factores previamente mencionados, no así dejando de lado otras vías que puedan estar influyendo en el ambiente tumoral.

## **IX CONCLUSIÓN**

Se ha especulado por diversos investigadores que alteraciones genéticas en el gen HHIP conllevan a una proteína no funcional, lo que permite un aumento en la expresión de la vía de señalización de Hedgehog y posiblemente con esto el desarrollo y crecimiento de tumores. Actualmente la identificación de biomarcadores de dependencia de la vía de Hh y el desarrollo de potentes inhibidores de la misma han aumentado relevantemente para el tratamiento de diversos tumores humanos.(Yuan et al., 2007)

Las vías embrionarias están estrechamente ligadas a factores que se desencadenan posteriormente en el adulto, ya sea en la simple reparación de una herida o en el desencadenamiento de una enfermedad como el cáncer al reactivarse de manera anómala. Es por que el estudio de estas vías es de suma importancia ya que estas pueden ayudar a revertir los procesos patológicos que implica el cáncer, en particular de pulmón. Es de suma relevancia hacer notar que estas vías y en particular la proteína HHIP no han sido muy estudiadas en este tipo de cáncer por lo que implican posibles blancos terapéuticos que en un futuro puedan extrapolarse a protocolos con pacientes, por lo que hay que tener en cuenta que debido a la heterogeneidad de cada subtipo de cáncer de pulmón, adicionalmente a su caracterización histológica y molecular se requiere de la selección de tratamientos más específicos.



## X BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, A., Maitah, M. Y., Ginnebaugh, K. R., Li, Y., Bao, B., Gadgeel, S. M., & Sarkar, F. H. (2013). Inhibition of Hedgehog signaling sensitizes NSCLC cells to standard therapies through modulation of EMT-regulating miRNAs. *Journal of Hematology & Oncology*, 6(1), 77. <http://doi.org/10.1186/1756-8722-6-77>
- Bak, M., Hansen, C., Henriksen, K. F., & Tommerup, N. (2001). The human hedgehog-interacting protein gene : 4q31 . 21 → q31 . 3, 303, 300–303.
- Bermudez, O., Hennen, E., Koch, I., Lindner, M., & Eickelberg, O. (2013). Gli1 mediates lung cancer cell proliferation and Sonic Hedgehog-dependent mesenchymal cell activation. *PloS One*, 8(5), e63226. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0063226>
- Bhowmick, N. a, Ghiassi, M., Bakin, a, Aakre, M., Lundquist, C. a, Engel, M. E., ... Moses, H. L. (2001). Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Molecular Biology of the Cell*, 12(1), 27–36. <http://doi.org/10.1091/mbc.12.1.27>
- Bishop, B., Aricescu, A. R., Harlos, K., Callaghan, C. A. O., Yvonne, E., Drive, R., ... Kingdom, U. (2010). Europe PMC Funders Group Structural insights into hedgehog ligand sequestration by the human hedgehog-interacting protein HIP, 16(7), 698–703. <http://doi.org/10.1038/nsmb.1607.Structural>
- Chuang, P. T., & McMahon, a P. (1999). Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature*, 397(6720), 617–621.
- Chung, B.-M. et al. (2014). Networking galore : Intermediate filaments and cell migration. *Cell Biology*, 25(5), 600–612. <http://doi.org/10.1016/j.cebm.2013.06.008.Networking>
- de Groot, P., & Munden, R. F. (2012). Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention. *Radiologic Clinics of North America*, 50(5), 863–76. <http://doi.org/10.1016/j.rcl.2012.06.006>
- Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T., & Matthay, R. a. (2011). Lung Cancer: epidemiology, etiology and prevention. *Clin Chest Med*, 32(4), 1–61. <http://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.09.001.Lung>
- Dna, A. (2013). Lung Cancer ( Non-Small Cell ) What is cancer ? *American Cancer Society*.
- Fehrenbach, H. (2001). Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respiratory Research*, 2(1), 33–46. <http://doi.org/10.1186/rr36>
- Ferlay, J. et al. (2010). Estimates of Worldwide burden of cancer in 2008:GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer*, 2893–917.
- Ganti, A. K., & Gerber, D. E. (2013). Lung Cancer (pp. 1–11). New York: Oxford University Press.
- Huber, M. a., Kraut, N., & Beug, H. (2005). Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(5 SPEC. ISS.), 548–558. <http://doi.org/10.1016/j.cebm.2005.08.001>
- Javelaud, D., Pierrat, M.-J., & Mauviel, A. (2012). Crosstalk between TGF-β and

- hedgehog signaling in cancer. *FEBS Letters*, 586(14), 2016–2025.  
<http://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.011>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. a. (2009). Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428.  
<http://doi.org/10.1172/JCI39104.1420>
- Kang, Y., & Massagué, J. (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: Twist in development and metastasis. *Cell*, 118(3), 277–279.  
<http://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.011>
- Ke, Z., Caiping, S., Qing, Z., & Xiaojing, W. (2015). Sonic hedgehog–Gli1 signals promote epithelial–mesenchymal transition in ovarian cancer by mediating PI3K/AKT pathway. *Medical Oncology*, 32(1), 368.  
<http://doi.org/10.1007/s12032-014-0368-y>
- Kernstine, K. H., & Reckamp, K. L. (2010). *Lung Cancer : a multidisciplinary approach to diagnosis and management*. New York: Demos Medical.
- Klymkowsky, M. W., & Savagner, P. (2009). Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher’s conceptual friend and foe. *The American Journal of Pathology*, 174(5), 1588–1593. <http://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080545>
- Kobune, M., Iyama, S., Kikuchi, S., Horiguchi, H., Sato, T., Murase, K., ... Kato, J. (2012). Stromal cells expressing hedgehog-interacting protein regulate the proliferation of myeloid neoplasms. *Blood Cancer Journal*, 2(9), e87.  
<http://doi.org/10.1038/bcj.2012.36>
- Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., & Thompson, E. W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: New insights in signaling, development, and disease. *Journal of Cell Biology*, 172(7), 973–981.  
<http://doi.org/10.1083/jcb.200601018>
- Lee, P. N. (2001). Relation between exposure to asbestos and smoking jointly and the risk of lung cancer. *Occupational and Environmental Medicine*, 58, 145–153. <http://doi.org/10.1136/oem.58.3.145>
- Levine, A. (1989). *Cancer Growth and Progression Etiology of Cancer in Man*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Maitah, M. Y., Ali, S., Ahmad, A., Gadgeel, S., & Sarkar, F. H. (2011). Up-regulation of sonic hedgehog contributes to TGF-β1-induced epithelial to mesenchymal transition in NSCLC cells. *PloS One*, 6(1), e16068.  
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0016068>
- Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M., & Ford, H. L. (2010). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer : Parallels Between Normal Development and Tumor Progression, 117–134. <http://doi.org/10.1007/s10911-010-9178-9>
- Miettinen, P. J., Ebner, R., Lopez, a R., & Derynck, R. (1994). TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *The Journal of Cell Biology*, 127(6 Pt 2), 2021–2036. <http://doi.org/10.1083/jcb.127.6.2021>
- Miller, Y. E. (2005). Pathogenesis of lung cancer: 100 year report. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 33(3), 216–23.  
<http://doi.org/10.1165/rcmb.2005-01580E>

- Miyazono, K. (2009). Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 85(8), 314–323. <http://doi.org/10.2183/pjab.85.314>
- Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., & Adjei, A. a. (2008). Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clinic Proceedings*, 83(5), 584–594. <http://doi.org/10.4065/83.5.584>
- Nybakken, K., & Perrimon, N. (2002). Hedgehog signal transduction: recent findings. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12(5), 503–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200154>
- Olsen, C. L., Hsu, P.-P., Glienke, J., Rubanyi, G. M., & Brooks, A. R. (2004). Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors. *BMC Cancer*, 4, 43. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-4-43>
- Onder, T. T., Gupta, P. B., Mani, S. A., Yang, J., Lander, E. S., & Weinberg, R. A. (2008). Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways, (10), 3645–3655. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2938>
- Pasca di Magliano, M., & Hebrok, M. (2003). Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nature Reviews. Cancer*, 3(12), 903–911. <http://doi.org/10.1038/nrc1229>
- Pei, J., & Grishin, N. V. (2012). Cysteine-rich domains related to Frizzled receptors and Hedgehog-interacting proteins. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 21(8), 1172–84. <http://doi.org/10.1002/pro.2105>
- Peralta-Zaragoza, O., Lagunas-Martínez, a., & Madrid-Marina, V. (2001). Factor de crecimiento transformante beta-1: Estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *Salud Publica de Mexico*, 43(4), 340–351. <http://doi.org/10.1590/S0036-36342001000400011>
- Principe, D. R., Doll, J. a., Bauer, J., Jung, B., Munshi, H. G., Bartholin, L., ... Grippo, P. J. (2014). TGF- $\beta$ : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(2), 1–16. <http://doi.org/10.1093/jnci/djt369>
- Prudkin, L., Liu, D. D., Ozburn, N. C., Sun, M., Behrens, C., Tang, X., ... Wistuba, I. I. (2009). Epithelial-to-mesenchymal transition in the development and progression of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung, 22(5), 668–678. <http://doi.org/10.1038/modpathol.2009.19>
- Rodriguez-Blanco, Jezabel., Robbins, D. (2013). The Hedgehog processing pathway is required for NSCLC growth and survival, 76(6), 1358–1375. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07165.x.Characterization>
- Ruddon, R. W. (2007). *Cancer Biology*. New York: Oxford University Press.
- Shahi, M. H., Zazpe, I., Afzal, M., Sinha, S., Rebhun, R. B., Meléndez, B., ... Castresana, J. S. (2014). Epigenetic regulation of human hedgehog interacting protein in glioma cell lines and primary tumor samples. *Tumor Biology*, 36(4), 2383–2391. <http://doi.org/10.1007/s13277-014-2846-4>
- Shih, J. Y., & Yang, P. C. (2011). The EMT regulator slug and lung carcinogenesis.

- Carcinogenesis*, 32(9), 1299–1304. <http://doi.org/10.1093/carcin/bgr110>
- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2013). Cancer Statistics, 2013, 63(1), 11–30. <http://doi.org/10.3322/caac.21166>.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442–454. <http://doi.org/10.1038/nrc822>
- Thiery, J. P. (2003). Epithelial–mesenchymal transitions in development and pathologies. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(6), 740–746. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.006>
- Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(2), 131–142. <http://doi.org/10.1038/nrm1835>
- Torroja, C., Gorfinkiel, N., & Guerrero, I. (2005). Mechanisms of Hedgehog gradient formation and interpretation. *Journal of Neurobiology*, 64(4), 334–56. <http://doi.org/10.1002/neu.20168>
- Velcheti, V., & Govindan, R. (2007). Hedgehog signaling pathway and lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 2(1), 7–10. <http://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31802c0276>
- Wang, H. Z. H., & Su, H. Z. J. (2011). Transforming growth factor- $\beta$  1 promotes lung adenocarcinoma invasion and metastasis by epithelial-to-mesenchymal transition, 309–314. <http://doi.org/10.1007/s11010-011-0869-3>
- Watkins, D. N., Berman, D. M., Burkholder, S. G., Wang, B., Beachy, P. A., & Baylin, S. B. (2003). Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer, 313–317.
- Wise, C. (2002). *Epithelial Cell Culture Protocols*. New Jersey: Humana Press.
- Xiao, D., & He, J. (2010). Review Article Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 2, 6. <http://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2010.02.03.7>
- Xu, X., Zhou, Y., Xie, C., Wei, S., Gan, H., He, S., ... Guo, C. (2012). Genome-Wide Screening Reveals an EMT Molecular Network Mediated by Sonic Hedgehog-Gli1 Signaling in Pancreatic Cancer Cells. *PLoS ONE*, 7(8), e43119. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0043119>
- Yu, Y., & He, J. (2013). Molecular classification of non-small-cell lung cancer: diagnosis, individualized treatment, and prognosis. *Frontiers of Medicine*, 7(2), 157–71. <http://doi.org/10.1007/s11684-013-0272-4>
- Yuan, Z., Goetz, J. a, Singh, S., Ogden, S. K., Petty, W. J., Black, C. C., ... Robbins, D. J. (2007). Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene*, 26(7), 1046–55. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1209860>
- Zavadil, J., Bitzer, M., Liang, D., Yang, Y. C., Massimi, a, Kneitz, S., ... Bottinger, E. P. (2001). Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor- $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), 6686–6691. <http://doi.org/10.1073/pnas.111614398>

- Zavadil, J., & Böttinger, E. P. (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*, *24*(37), 5764–5774. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1208927>
- Zhou, J., Wu, K., Gao, D., Zhu, G., Wu, D., Wang, X., ... Saha, D. (2014). Reciprocal Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 2 a and GLI1 Expression Associated With the Radioresistance of Renal Cell Carcinoma. *Radiation Oncology Biology*, *90*(4), 942–951. <http://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2014.06.065>