

Cinvestav

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Generación de tumores de cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y distribución de nanopartículas *core-shell* de Au-Fe₃O₄.

TESIS

Que presenta:

IBT. ROCÍO VILLALOBOS MANZO

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

En la especialidad de:

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de Tesis

DR. JOSÉ TAPIA RAMÍREZ

A Elizabeth, Joel y Omar...

Agradecimientos

Nunca está de más agradecer...

Elizabeth y Joel, a ustedes antes que nada debo decir gracias, gracias por permitirme conocerlos, por estar incondicionales a pesar de mi frenesí y mi desacato; por ustedes estoy donde estoy y les pido que consideren este trabajo como suyo, no es más significativo que lo que me han dado, pero es una muestra de reciprocidad; gracias por ser el amor hecho personas en mi vida; nadxiee' stale látu. A MAC, Suani y Sofía, porque están enviándome siempre su cariño, porque hacen que mis días tengan más sentido a pesar de la distancia. Es magnífico tenerlos como familia.

COCA, las palabras son insuficientes para expresar lo mucho que mi ser tiene que agradecerte, eres el partícipe primordial de mi evolución personal, profesional y emocional. Gracias por tu amor y apoyo incesante, por estar firme, por ser mi cómplice, por ser mi amuleto en las buenas, en las malas y en las peores. Eres el premio invaluable que la vida me ha dado. ¡Nadxieeli ne guenda stine'!

A Dios, a los amigos/compañeros que son parte de mi historia, que de alguna forma han sumado a mi vida y que no me es posible nombrar uno a uno, pero que saben que les quiero y aprecio.

Al Dr. José Tapia Ramírez, por aceptarme en su grupo de trabajo, por el apoyo a las ideas que surgieron y por su disponibilidad para que este proyecto marchase lo más posible y se materializase. A las personas que conforman el Laboratorio 2 del departamento de Genética y Biología Molecular y del LaNSE que de una u otra forma sumaron a la construcción de este proyecto. A mis asesores, el Dr. García Mena y el Dr. Gariglio Vidal por el tiempo y comentarios dados.

Y por último al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado con la beca número 632129 gracias a la cual se pudo llevar a cabo este proyecto y obtener el grado de Maestra en Ciencias en la especialidad de Genética y Biología Molecular.

Desde los afectos...

-Rocío.

Resumen

En esta investigación de maestría se realizaron los estudios preliminares para la aplicación de tratamientos basados en el uso de nanomedicina contra el cáncer de pulmón *in vivo*. Para esto, primero, se generaron tumores subcutáneos de cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, del inglés *Small Cell Lung Cancer*) en ratones inmunosuprimidos (Foxn1^{nu}:Nu/Nu) a partir de la una línea celular de SCLC proveniente de humano NCI-H69 [H69] (ATCC® HTB119™); así también se caracterizó la sobreexpresión del receptor de ácido fólico en los tumores por su posible afinidad a componentes activos de los nanosistemas utilizados, i.e., nanopartículas core-shell a base de oro funcionalizadas con moléculas de ácido fólico y fármacos quimioterapéuticos. Los modelos animales para estudios *in vivo* son significativos para la investigación clínica ya que dan pauta para entender el comportamiento biológico y bioquímico de distintas patologías y su respuesta ante los tratamientos. Se evaluaron diversas concentraciones celulares para la generación de los tumores y a partir de esto se determinó que los inóculos debían ser de 5×10^6 células con las cuales se obtuvieron tumores que llegaron a volúmenes aproximados de 2 cm^3 en la tercer semana después de la inoculación, comprobando la agresividad de este tipo de cáncer de pulmón humano. Al caracterizar el receptor de ácido fólico (FOLR1) en los tumores por medio de inmunohistoquímica se encontró que no presentaba una sobreexpresión como se reporta en la literatura, por lo tanto en estudios posteriores se deben evaluar otros receptores que permitan que el tratamiento sea selectivo. Así también se focalizó la evaluación de la distribución de nanopartículas core-shell (NPs core-shell) a base de oro en el modelo murino por medio de Resonancia Magnética de Imagen (RMI). Si bien las nanopartículas no estaban funcionalizadas los resultados mostraron que las NPs se localizaban principalmente en el riñón a las 8 horas y a las 24 horas ya habían sido excretadas por medio de la orina.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	c
Resumen	d
1 INTRODUCCIÓN	2
2 GENERALIDADES Y ANTECEDENTES	5
2.1 CÁNCER	5
2.1.1 FORMACIÓN DE TUMOR	7
2.1.2 CÁNCER DE PULMÓN	10
2.1.3 CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS (NSCLC)	12
2.1.4 CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS PEQUEÑAS (SCLC)	13
2.2 TERAPIAS CONTRA EL CÁNCER	15
2.2.1 QUIMIOTERAPIA	15
2.2.2 RADIOTERAPIA	17
2.3 EL USO DE MODELOS ANIMALES EN LA INVESTIGACIÓN DE TRATAMIENTOS CONTRA EL CÁNCER	19
2.4 RECEPTOR DE ÁCIDO FÓLICO (FOLR1)	21
2.5 NANOMEDICINA Y NANOPARTÍCULAS (NPs)	21
2.6 RESONANCIA MAGNÉTICA DE IMAGEN	23
3 OBJETIVOS	27
3.1 GENERAL	27
3.2 ESPECÍFICOS	27
4 HIPÓTESIS	29
5 JUSTIFICACIÓN	31
6 MATERIALES, MÉTODOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	33
6.1 MATERIALES	33
6.1.1 Línea celular de Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas (SCLC, del inglés Small Cell Lung Cancer) de la <i>American Type Culture Collection (ATCC)</i>	33
6.1.2 Ratones atímicos-Foxn1 ^{nu} (Nu/Nu),	34
6.1.3 Nanopartículas (NPs)	35
6.2 MÉTODOS	35
6.2.1 CULTIVO CELULAR	35
6.2.2 INOCULACIÓN SUBCUTÁNEA DE CÉLULAS NCI-H69	35
6.2.3 INMUNOHISTOQUÍMICA	36
6.2.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL	36
6.2.5 RT-PCR	37
6.2.6 PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	37
6.2.6.1 Preparación de solución semilla de óxido de hierro Fe ₃ O ₄	37
6.2.6.2 Preparación de la solución semilla de Oro	38
6.2.6.3 Síntesis de Nanopartículas core/shell Au-Fe ₃ O ₄	38
6.2.7 RESONANCIA MAGNÉTICA DE IMAGEN (RMI)	38
6.3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	38
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
7.1 GENERACIÓN DE TUMORES EN RATONES ATÍMICOS	43
7.2 DISTRIBUCIÓN DE NANOPARTÍCULAS POR RESONANCIA MAGNÉTICA DE IMAGEN	50
8 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	65
<i>Apéndice A</i> SOLUCIONES	65
<i>Apéndice B</i> DETALLE DE PROCEDIMIENTOS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferencia en la división celular de una célula normal y una cancerosa. .	6
Figura 2. Progresión tumoral: formación de un tumor en el epitelio pulmonar.	8
Figura 3. Proceso de Angiogénesis y metástasis. (Fidler and Ellis, 2000).	9
Figura 4. Incidencia de Cáncer mundialmente, WHO 2012.....	11
Figura 5. Tipos de muerte celular inducidas por la radiación.	18
Figura 6. Importancia de los modelos animales de cáncer durante el descubrimiento de drogas, detección y tratamiento de cáncer.	21
Figura 7. Morfología de crecimiento de las células NCI-H69, agregado multicelular.	33
Figura 8. Estrategia experimental de inoculación de ratones Nu/Nu.	40
Figura 9. Estrategia experimental de la Resonancia Magnética de Imagen de ratones Nu/Nu.	41
Figura 10. Procedimiento de inoculación de ratones Nu/Nu en el Bioterio de la UPEAL.	44
Figura 11. Evolución del crecimiento tumoral en los ratones Nu/Nu, de 4 días a 4 semanas.....	45
Figura 12. Comportamiento del crecimiento tumoral en los ratones Nu/Nu.	46
Figura 13. Morfología de los tumores de SCLC obtenidos a partir de la línea celular NCI-H69 en ratones Nu/Nu.	47
Figura 14. Gel de amplificación de RT-PCR de genes apoptóticos y las especificaciones de amplificación.	48
Figura 15. Fotografías de inmunohistoquímicas del receptor de ácido fólico (FOLR1).	49
Figura 16. Resonancia magnética de imagen, ratón control.	51
Figura 17. Resonancia magnética de imagen, ratón con tumor inducido.....	52

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

El organismo lleva a cabo procesos esenciales para que los órganos, tejidos, y otros sistemas puedan tener un funcionamiento correcto. La regeneración de células a través del ciclo celular es un proceso primordial para ello. Desafortunadamente dicho proceso llega a sufrir alteraciones como las que se presentan en el cáncer, en el cual se genera una desregulación, provocando que las células sufran daños irreversibles que no pueden ser controlados y por lo tanto adquieren la capacidad de crecer excesivamente y generar tumores malignos que pueden dispersarse por metástasis a otros órganos del cuerpo humano (Moreno-Bueno, Portillo, & Cano, 2008).

Actualmente diferentes tipos de cáncer se tratan con quimioterapias, radioterapias y cirugías que tienen efectos secundarios en el cuerpo, que provocan en los pacientes una calidad baja de vida. Esto debido a que dichas terapias son incapaces de aplicarse únicamente a las células tumorales, afectando y alterando el funcionamiento de los tejidos sanos (Berdasco & Esteller, 2010).

Los modelos animales de tumores humanos han jugado un papel importante para estudiar nuevos fármacos y drogas contra diferentes tipos de cáncer. Particularmente se han empleado ratones para estudiar ampliamente la eficacia y toxicidad de diferentes drogas anticáncer, antes de empezar los ensayos clínicos en humanos (Cekanova & Rathore, 2014); los modelos de cáncer preclínicos *in vivo* ampliamente utilizados incluyen ratones modificados genéticamente (OGM's)(J. M. Adams & Cory, 1991), modelos xenógrafos derivados de líneas celulares de tumores humanos (Sharpless & Depinho, 2006) y el uso de biopsias de tumores humanos trasplantados directamente en ratones inmunodeficientes (Cekanova & Rathore, 2014).

Además de los modelos animales se está en busca de opciones terapéuticas y de diagnóstico, como la nanomedicina, que puedan ser utilizadas para el tratamiento del cáncer Sin embargo, en este tipo de opciones terapéuticas se tienen preguntas sobre su comportamiento y efectividad (Moghimi & Farhangrazi, 2014). En esta investigación se propone la generación de un modelo animal para el cáncer de pulmón de células pequeñas y de la nanotecnología como una opción para dirigir el fármaco de manera específica hacia las células tumorales. Esencialmente se plantea el uso de materiales a nanoescala, nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) recubiertas con oro (core-shell NPs), y modificadas selectivamente en su superficie para tratar el cáncer de pulmón, ya que ésta es una de las enfermedades con mayor incidencia y mayor nivel de mortandad mundialmente. Estas partículas NPs son de nuestro interés ya que en un futuro se les anclará ácido fólico u otra molécula que pueda unirse selectivamente a las células cancerosas (que tienen mayor expresión de receptores de este tipo), además de contener Doxorubicina (fármaco quimioterapéutico, que se intercala y genera ruptura de las hebras de DNA) para implementar terapias en las cuales se puedan liberar los fármacos directamente en el tejido tumoral llevando a las células a apoptosis y generando así que los tumores se vean disminuidos.

El presente trabajo está compuesto por 8 capítulos; en el primero se presenta la introducción, seguido del capítulo referente a las generalidades y antecedentes; posterior a estos capítulos se presentarán los objetivos (capítulo 3), la hipótesis (capítulo 4) y la justificación del proyecto (capítulo 5); después se hace mención de los materiales, los métodos y las estrategias experimentales que fueron implementadas (capítulo 6). En el capítulo 7 se presentarán los resultados obtenidos y se continuará en el capítulo 8 que muestran las conclusiones y perspectivas del trabajo. Finalmente se presentan los anexos de este trabajo donde se detallan los procedimientos aplicados.

CAPÍTULO 2

GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

2 GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

2.1 CÁNCER

El cuerpo humano está constituido por trillones de células que contienen Ácido Desoxirribonucleico (ADN); estas células sufren un proceso de división, llamado ciclo celular, el cual es esencial para reemplazar las células desgastadas o dañadas en los distintos sistemas del organismo. Siempre que una célula sana se divide se generan dos células nuevas, cada una de éstas idéntica a la original. Este proceso de reproducción celular es absolutamente esencial para la correcta operación de todos los tejidos, órganos y los distintos sistemas del cuerpo humano (Walker, 2006).

Normalmente, el comportamiento celular, especialmente la replicación y división de células, están regulados de una manera específica y sincronizada. La replicación de células sólo se puede llevar a cabo bajo condiciones específicas, como cuando el cuerpo necesita del crecimiento de un tejido o de la muerte celular (Pelengaris & Khan, 2006). La división celular se controla por un equilibrio de dos tipos de genes: los que estimulan la proliferación celular (proto-oncogenes) y los que inhiben la división celular (genes supresores de tumores) (Merkle & Loescher, 2005). Además de los genes de regulación del crecimiento, la célula en división tiene la capacidad de identificar las mutaciones en la secuencia del ADN y luego reparar la secuencia dañada por la activación de genes de reparación del ADN. Si este daño no puede ser reparado, la célula se destruye llevándose a cabo un proceso de apoptosis (Merkle & Loescher, 2005). La figura 1 presenta la diferencia en la división celular de una célula normal y una cancerosa. Se debe tener claro que numerosos procesos reguladores deben llevarse a cabo para fomentar la proliferación celular. El primer mecanismo de señalización del crecimiento es la dependencia, en el cual la división celular se promueve por la presencia de

factores de supervivencia y crecimiento tejido específico (Martin & Mulrooney, 2004).

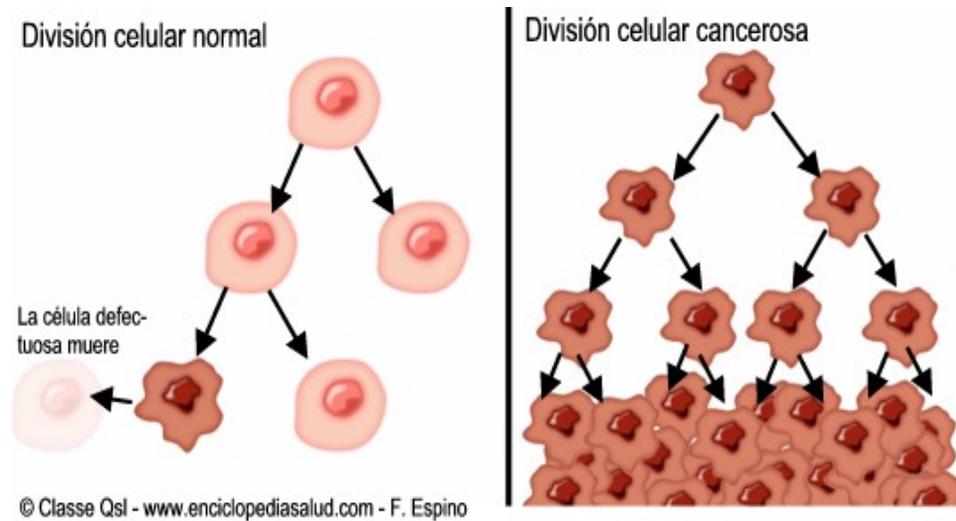


Figura 1. Diferencia en la división celular de una célula normal y una cancerosa.

Desde el punto de vista molecular, el cáncer se inicia debido a la acumulación de alteraciones en genes que son esenciales del control de la proliferación y la muerte celular. En el año 2001, Hanahan y Weinberg postularon que la gran mayoría de los tipos de cáncer en humanos compartían alteraciones moleculares, bioquímicas y celulares. De tal forma que estos autores sugirieron que el fenotipo de una célula cancerígena se manifestaba por seis alteraciones esenciales en la fisiología celular, que en conjunto podían dar lugar a un crecimiento maligno, que se caracteriza por presentar: capacidad de proliferar de una manera independiente mediante señales mitogénicas, insensibilidad a la señalización antiproliferativa, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, capacidad de generar nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), y por último, invasión de tejidos circundantes, y capacidad de diseminación y metástasis. Recientemente, estos autores (Hanahan & Weinberg, 2011) han propuesto dos nuevas alteraciones esenciales para el desarrollo de un tumor: la capacidad de modificar o

reprogramar el metabolismo celular con el fin de sustentar de una manera eficaz la proliferación neoplásica, y la capacidad de las células tumorales de evadir al sistema inmune. La naturaleza de estas alteraciones puede ser diversa, tratándose, entre otras, de mutaciones puntuales, cambios epigenéticos, amplificaciones, deleciones cromosómicas, translocaciones, pérdida de heterocigosidad y alteraciones en la regulación transcripcional, y cambios en los niveles de expresión génica (Díes López-Ayllón, 2013).

Los tumores están clasificados en benignos y malignos. Un tumor benigno no significa una amenaza para la vida y no se expande a otras partes del cuerpo. Las células de los tumores malignos son células cancerosas que crecen y tienen una tasa rápida de reproducción y son capaces de vivir más que las células normales. También son capaces de salir de su sitio de origen y viajar a otras partes del cuerpo, lo cual es llamado metástasis, así a menudo las células cancerosas toman una ruta rápida y directa hacia otros órganos por medio de su entrada al sistema sanguíneo (Roth, 2008).

2.1.1 FORMACIÓN DE TUMOR

La formación de un tumor es un proceso complejo que resulta de la acumulación de modificaciones genéticas y epigenéticas que alteran la homeostasis celular (Berdasco & Esteller, 2010; Hanahan & Weinberg, 2011). Como se observa en la Figura 2, las células alteradas modifican su patrón de división dando lugar a una hiperplasia localizada, que posteriormente conlleva a una desorganización del tejido (displasia). La membrana basal de los epitelios y la matriz extracelular subyacentes constituyen una barrera física, continua y prácticamente infranqueable, capaz de mantener los tumores benignos en un espacio bien definido. Por el contrario, las células tumorales más agresivas son capaces de degradar localmente esa barrera gracias a la síntesis de proteasas (metaloproteasas, MMP); además éstas pierden la adhesión celular y reorganizan su citoesqueleto para adquirir un fenotipo mesenquimal (transición epiteliomesenquima) (Moreno-Bueno et al., 2008).

Todos estos cambios permiten a las células invadir el tejido adyacente (formación de carcinoma o tumor maligno) y llegar a alcanzar incluso los sistemas linfático y circulatorio para dar lugar a una futura metástasis (figura 2).

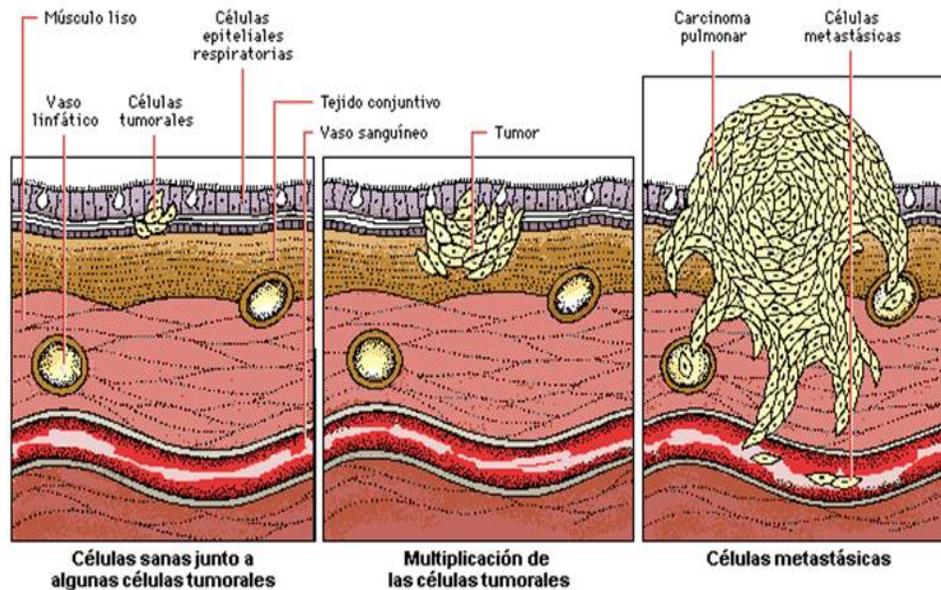


Figura 2. Progresión tumoral: formación de un tumor en el epitelio pulmonar.

La progresión tumoral y el desarrollo de metástasis son estrictamente dependientes de la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), que a su vez aportan los nutrientes necesarios para la supervivencia de las células tumorales, y participan como un medio de diseminación a otras regiones del organismo (figura 2). En ausencia de neovascularización, un tumor sólido no puede crecer más allá de unos pocos mm^3 (Zetter, 1998). La capacidad de algunas células tumorales para inducir angiogénesis es un requisito indispensable para su malignización. Esto implica la estimulación de la proliferación de las células endoteliales de los vasos sanguíneos cercanos, lo que lleva a la invasión del estroma circundante y su migración en dirección al tumor.

Durante el proceso de angiogénesis se establece un equilibrio entre factores proangiogénicos (FGF, PDGF, miembros de la familia VEGF, etc.) y factores anti-angiogénicos (trombospondina, endostatina, angiostatina, tumstatina, etc.) secretados por las propias células tumorales (Herbst, Onn, & Sandler, 2005; Kerbel, 2008). A medida que va creciendo el tumor, se va generando un ambiente de hipoxia en el interior del mismo que hace que se active la subunidad α del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF). Este factor activa la expresión de los factores pro-angiogénicos de la familia VEGF, que se unirán a sus respectivos receptores en la membrana de las células endoteliales. Así, estas células endoteliales serán atraídas por las células tumorales y formarán nuevos vasos sanguíneos cerca del tumor (Herbst, Heymach, & Lippman, 2008; Jimenez & Volpert, 2001). Una vez alcanzado el sistema circulatorio, las células tumorales pueden ser capaces de atravesar la membrana endotelial (intravasación), sobrevivir en el torrente sanguíneo y finalmente abandonarlo (extravasación) para anidarse en el órgano diana y formar metástasis a distancia, ver figura 3.

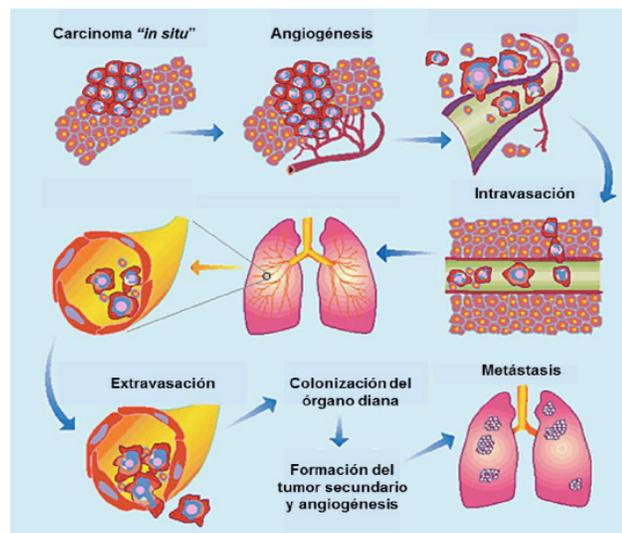


Figura 3. Proceso de Angiogénesis y metástasis. (Fidler and Ellis, 2000).

2.1.2 CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón es el crecimiento descontrolado de células anormales en uno o ambos pulmones. Estas células anormales no llevan a cabo las funciones de las células pulmonares normales y no se desarrollan en tejido pulmonar sano; a medida que crecen las células anormales pueden formar tumores e interferir con el funcionamiento del pulmón, que es el que proporciona oxígeno a través de la sangre (CancerCare, 2016) . En muchos de los casos el cáncer de pulmón comienza en el revestimiento celular de los bronquios, pero podría empezar en la tráquea, bronquiolos o alveolos. El tumor original que se forma en el pulmón por las células cancerosas es llamado tumor primario (Casado, 2008).

El cáncer de pulmón es un tumor maligno que se origina a partir de un crecimiento agresivo y desordenado de células procedentes de estructuras broncopulmonares. Inicialmente, el tumor suele ser asintomático y, a medida que aumenta de volumen, tiende a invadir otras estructuras del pulmón o de la vecindad como la pleura, los músculos, los ganglios y el corazón. Es, por lo tanto, un tumor localmente muy agresivo, que puede producir a menudo metástasis a distancia. Es frecuente, en este tipo de cáncer, que la metástasis se produzca en huesos, cerebro e hígado, y agresivamente en otros lóbulos de los propios pulmones (Chiang & Massague, 2008), aunque se debe tener claro que la metástasis puede aparecer en cualquier otro órgano.

El cáncer de pulmón es uno de los cánceres con mayor incidencia en el ser humano a nivel mundial. En 2012 se estimaron 1.8 millones de casos (12.9% del total)(figura 4). Dicha enfermedad está registrada mundialmente como el tipo de cáncer más común en los hombres (1.2 millones, 16.7% del total). También es la causa más común de mortandad a nivel mundial, registrándose en 2012 un total de 1.59 millones de muertes (19.4% del total) (UK, 2013). La mortalidad por cáncer de pulmón en mujeres, ha experimentado un incremento significativo en los últimos años, con un crecimiento anual del 4,1% (Cabanés

Domenech, Pérez-Gómez, Aragonés, Pollán, & López-Abente, 2009). De hecho, para la mujer ha pasado a ocupar el primer puesto en mortalidad por cáncer, por delante incluso del cáncer de mama (Jemal, Siegel, Xu, & Ward, 2010). En México se registró que el cáncer de pulmón es la principal causa de mortandad representando un 9.7% del total de muertes por cáncer anuales (aproximadamente 80 000) (World Health Organization & Who, 2012).

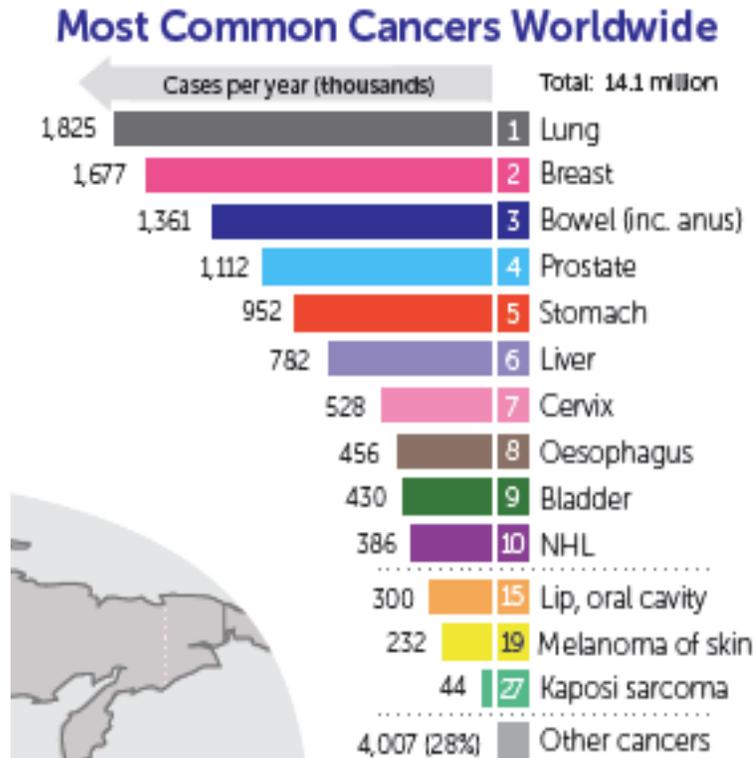


Figura 4. Incidencia de Cáncer mundialmente, WHO 2012.

El cáncer de pulmón no es un único tipo de enfermedad, existen varios tipos de cáncer que se pueden desarrollar en los pulmones y cada uno es reconocido por su apariencia cuando son vistos en el microscopio. Cada uno tiende a comportarse de diferente manera y ser generado por diferentes vías (Falk & Williams, 2009). La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de cáncer de pulmón incluye cuatro principales tipos histológicos: carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma de pulmón de células pequeñas y carcinoma de células grandes (Travis, Brambilla, Müller-

hermelink, & Harris, 2004). Estas clases se subdividen a su vez, y también existen otros tumores pulmonares menos comunes, como el carcinoma sarcomatoide y carcinoide. Para fines clínicos, histológicos las clases se agrupan en dos categorías principales de cáncer de pulmón: cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). SCLC incluye una categoría llamada carcinoma de células pequeñas combinadas. NSCLC incluye carcinoma de células escamosas (SCC), carcinoma de células grandes y el adenocarcinoma (Franklin, Noguchi, & Gonzalez, 2010).

2.1.3 CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS (NSCLC)

Dentro del NSCLC se encuentran tres tipos de tumores: Adenocarcinoma, Carcinoma de células escamosas (SCC) y carcinomas de células grandes. Aproximadamente el 75%-80% de todos los cánceres de pulmón son NSCLC (Franklin et al., 2010). Aunque los subtipos pueden diferir de la incidencia según el sexo, la raza y la edad, se agrupan debido a las similitudes en curso y respuesta al tratamiento. SCC surge con más frecuencia en los bronquios segmentarios proximales y se asocia con metaplasia escamosa; los tumores se componen de capas de células epiteliales, que pueden ser mal o bien diferenciados. SCC puede ser detectado por examen citológico de las células exfoliadas en su forma más temprana, carcinoma *in situ*, donde el epitelio escamoso estratificado se reemplaza con células escamosas malignas. Si no se controla, el tumor finalmente invade y obstruye el lumen bronquial. SCC tiende a ser de crecimiento lento y puede tardar años en desarrollarse a partir de un carcinoma *in situ* a un tumor clínicamente evidente (Franklin et al., 2010). El adenocarcinoma es la forma más común de cáncer de pulmón, lo que representa casi el 40% de todos los cánceres de pulmón (Franklin et al., 2010). Este tipo de cáncer se presenta como un tumor periférico, que surge de la superficie del epitelio alveolar o las glándulas mucosas bronquiales; también puede surgir de áreas de infecciones o cicatrices anteriores. Los tumores de

adenocarcinoma producen mucina y forman glándulas. El carcinoma broncoalveolar es una subclasificación del adenocarcinoma que parece tener propiedades clínicas y patológicas distintas (Franklin et al., 2010).

Los estadios de este tipo de cáncer de pulmón son: I, donde el cáncer es localizado solamente en los pulmones sin haberse propagado a los nódulos linfáticos; II, el cáncer está en el pulmón y cercano a los nódulos linfáticos; III, el cáncer es encontrado en el pulmón y en los ganglios linfáticos a mitad del pecho, se encuentran dos subtipos IIIA, que es cuando el cáncer se ha propagado solamente a los ganglios linfáticos en el mismo sitio del pecho donde se ha iniciado el cáncer y el subtipo IIIB, que es cuando se ha propagado a los ganglios linfáticos en el lado opuesto del pecho o por encima de la clavícula; y el estadio IV es el estado más avanzado del cáncer de pulmón, es cuando el cáncer se ha propagado a ambos pulmones, al área fluida alrededor de los ellos y a otra parte del cuerpo, es decir, a otros órganos (NCCN, 2013).

2.1.4 CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS PEQUEÑAS (SCLC)

SCLC es un tumor maligno epitelial que consiste en células pequeñas y ovaladas, con escaso citoplasma, bordes celulares mal definidos, cromatina finamente granular y nucléolos ausentes o poco visibles. Se clasifica como un tumor de carcinoma neuroendocrino de alto grado que se produce habitualmente en las vías respiratorias centrales. (Houlihan & Paolilli, 2004)

El SCLC está caracterizado por un tiempo de duplicación rápido, tasa alta de crecimiento y el desarrollo precoz de metástasis, aunque la mayoría de los SCLC se generan en el pulmón pueden expandirse a sitios extra pulmonares, presentando un comportamiento biológico y clínico similar (NCCN, 2013).

SCLC es menos común que el NSCLC. La clasificación de la OMS de SCLC incluye una variante conocida como carcinoma de células pequeñas

combinado, que se define como un carcinoma de células pequeñas con un componente de cualquier subtipo histológico de NSCLC. Entre los subtipos de cáncer de pulmón, la más alta asociación entre el grado de exposición al tabaco y el riesgo se produce en el SCLC y SCC (Franklin et al., 2010).

SCLC típicamente se presenta como una larga masa hilar y mediastinal voluminosa que causa tos y disnea, los pacientes presentan con frecuencia síntomas de la enfermedad metastásica generalizada como pérdida de peso, debilidad, dolor de huesos y sistema neurológico comprometido (NCCN, 2013).

El SCLC representa el 15% de los cánceres de pulmón y existen dos estadios en esta clasificación: estadio limitado, que es cuando el cáncer está sólo en un sitio del pecho, envolviendo una parte del pulmón y cercano a los ganglios linfáticos; el estadio extensivo, se refiere a que el cáncer se ha propagado a otras regiones del pecho y a otros órganos del cuerpo (CancerCare, 2016).

SCLC es altamente sensible a la quimio y radioterapia, no obstante la mayoría de los pacientes mueren por enfermedades recurrentes. En los pacientes en estadio limitado, el objetivo del tratamiento es curar mediante quimioterapia más radioterapia torácica; en los pacientes con SCLC de estadio extensivo la quimioterapia sólo puede aliviar los síntomas y prolongar la supervivencia que resulta muy baja.

SCLC es una enfermedad agresiva, en estadio limitado es más curable que la enfermedad en estadio extenso. Antes del uso de la quimioterapia, los pacientes diagnosticados con la enfermedad en estadio limitado sobrevivieron unos tres meses. La media de supervivencia con la quimioterapia es de 10-14 meses, con una supervivencia a los cinco años del 10% (Huang, Shepherd, & Kelly, 2010). SCLC exhibe un alto grado de diferenciación neuroendocrina con la expresión de una amplia variedad de neuropéptidos y receptores de neuropéptidos, varios de éstos tienen potencial mitogénico y se han

demostrado ser mediadores de la proliferación de SCLC (L. A. Adams, Tyson, & Ginex, 2004).

2.2 TERAPIAS CONTRA EL CÁNCER

2.2.1 QUIMIOTERAPIA

La quimioterapia hace uso de fármacos (agentes quimioterapéuticos) con el propósito de tratar el cáncer teniendo como fin prevenir que las células cancerosas se multipliquen, hagan metástasis y lleven al paciente a la muerte. La mayoría de los fármacos que actualmente se usan tienen efectos primarios ya sea en la síntesis de macromoléculas o en su función. Esto significa que ellos interfieren en la síntesis de DNA, RNA o proteínas o con el funcionamiento apropiado de las moléculas preformadas (Skeel & Khleif, 2011). Es decir, afectan directamente el crecimiento celular del tumor dejándolas incapaces de duplicarse o iniciando artificialmente el proceso normal de muerte celular llamado "apoptosis" (A. Ross, 2014).

Los fármacos quimioterapéuticos se pueden clasificar generalmente como aquellos que evitan la división celular o el crecimiento del tumor (fármacos citostáticos) o aquellos que llevan a la muerte celular (fármacos citotóxicos). Dentro de estas dos amplias categorías, los fármacos quimioterapéuticos se pueden luego agrupar de acuerdo al trabajo que realizan, el efecto que tienen sobre las células tumorales, y el momento en la vida de las células en el que se considera que son más eficaces (A. Ross, 2014). La quimioterapia se considera una terapia "sistémica", lo que significa que viaja por todo el cuerpo, a diferencia de la cirugía o la radiación, las cuales son terapias "locales" (Oncolink, n.d.).

La quimioterapia puede ser administrada en la secuencia de tratamientos como:

- Terapia adyuvante: la terapia administrada después de la cirugía para reducir la probabilidad de reaparición del cáncer.
- Terapia neoadyuvante: La terapia administrada antes de la cirugía para reducir el tumor, lo que permite que la cirugía sea más exitosa.
- Terapia concurrente: cuando 2 o más terapias se administran juntas, como la quimioterapia y la radiación.

La quimioterapia puede administrarse de las siguientes maneras:

- Vía oral (por la boca, en forma de píldora).
- Vía intravenosa (IV, a través de una vena, ya sea como una infusión corta o continua durante uno o más días).
- Directamente en una cavidad corporal (es decir: la vejiga, la cavidad abdominal).
- Intraarterial (en casos especiales, como el tratamiento de perfusión de extremidad para el melanoma).

La quimioterapia es típicamente parte del tratamiento para el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC). Esto se debe, por lo general, a que el SCLC ya se ha propagado a otros órganos cuando se le diagnostica, por lo que otros tratamientos como la cirugía o la radioterapia no llegaría a todas las áreas del cáncer. Para las personas con SCLC en estadio limitado, la quimioterapia a menudo se administra junto con radioterapia. Esto se conoce como la quimiorradiación. Para las personas con SCLC en etapa extensiva, la quimioterapia sola suele ser el tratamiento principal. (American Cancer Society, 2014).

La quimioterapia convencional tiene buenos efectos en las células cancerosas, no obstante pueden causar efectos severos relacionados con la inhabilidad para atacar únicamente células cancerosas. Desafortunadamente el sistema de liberación de quimioterapéuticos pueden ser altamente tóxico para ciertas

subpoblaciones celulares normales como las células del estómago, folículos del cabello y de la sangre que generan efectos como náuseas, diarrea, pérdida de peso, pérdida de cabello y comprometen al sistema inmune (Farokhzad & Langer, 2009; Sagnella, McCarroll, & Kavallaris, 2014).

2.2.2 RADIOTERAPIA

La radioterapia es un agente físico, que se utiliza para destruir células cancerosas. La radiación utilizada se denomina radiación ionizante debido a que forma iones (partículas cargadas eléctricamente) y la energía se deposita en las células de los tejidos que atraviesa. Esta energía depositada puede matar las células cancerosas o causar cambios genéticos que provocan la muerte celular en éstas.

Los daños se generan por la radiación de alta energía en el ADN de las células, bloqueando así su capacidad de dividirse y proliferar (Freitas, 2005). Aunque la radiación daña tanto a las células cancerosas como células normales, el objetivo de la radioterapia es maximizar el daño que se genera en las células cancerosas o anormales y reducir al mínimo la exposición a las células normales que están adyacentes a los tumores o en la trayectoria para llegar a este. Este mayor daño a las células tumorales se debe a que estas últimas generalmente no son tan eficientes como las células normales en la reparación de los daños causados por el tratamiento de radiación (T Lammers, Hennink, & Storm, 2008).

Las indicaciones de la terapia de radiación incluyen estrategias de combinación con otras modalidades de tratamiento tales como la cirugía, la quimioterapia o inmunoterapia. Si se usa antes de la cirugía (terapia neoadyuvante), la radiación tendrá como objetivo reducir el tumor. Si se usa después de la cirugía (terapia adyuvante), la radiación destruye las células tumorales microscópicas que puedan haber sido dejados atrás (Baskar, Ann-Lee, Yeo, & Yeoh, 2012).

Hay dos formas de administrar la radiación a la ubicación del cáncer: La radiación externa se administra desde fuera del cuerpo, apuntando rayos de alta energía (fotones, protones o radiación de partículas) a la ubicación del tumor. La radiación interna o braquiterapia se administra al interior del cuerpo por medio de fuentes radiactivas sellados en catéteres o semillas ubicadas directamente en el sitio del tumor (Baskar et al., 2012).

La radioterapia, como la mayoría de los tratamientos contra el cáncer, logra su efecto terapéutico mediante la inducción de diferentes tipos de muerte celular (figura 5)(Verheij, 2008). La terapia de radiación no mata las células cancerosas de forma inmediata. Toma horas, días o semanas de tratamiento antes de que las células cancerosas comienzan a morir después de lo cual las células cancerosas siguen muriendo durante semanas o meses después de que termine la terapia de radiación.

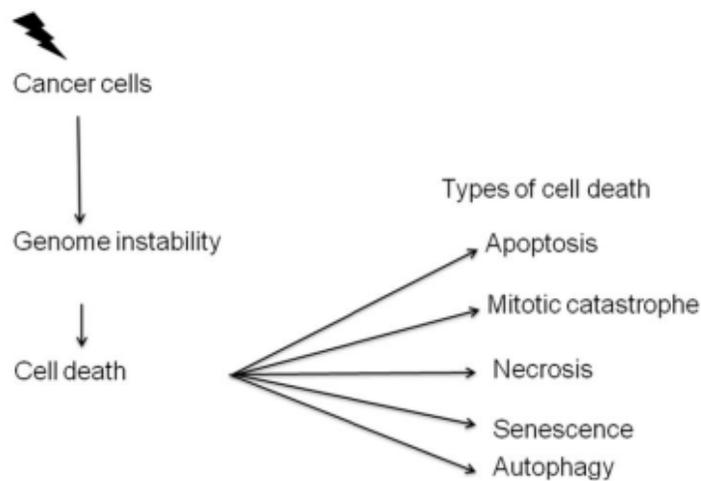


Figura 5. Tipos de muerte celular inducidas por la radiación.

2.3 EL USO DE MODELOS ANIMALES EN LA INVESTIGACIÓN DE TRATAMIENTOS CONTRA EL CÁNCER

El cáncer presenta varias características distintivas durante su desarrollo tales como: mantenimiento de la señalización proliferativa, evadiendo supresores del crecimiento, lo que permite la inmortalidad replicativa, resistiendo la muerte celular; la inducción de la angiogénesis, la activación de la invasión y la metástasis; la inestabilidad del genoma y las mutaciones; la resistencia a los mecanismos de defensa del sistema inmune; y la desregulación de la energía celular (Hanahan & Weinberg, 2011). El cáncer generalmente se detecta cuando se han producido cambios estructurales en un tejido u órgano; por lo tanto la detección temprana de los tumores y la vigilancia precisa de la respuesta del tumor al tratamiento son la clave para la supervivencia del paciente. Se requiere el descubrimiento de blancos moleculares específicos del tumor para mejorar la detección y el tratamiento eficaz del cáncer en etapas tempranas.

El uso y desarrollo apropiado de modelos *in vitro* y modelos *in vivo* es de vital importancia para el diagnóstico y tratamiento terapéutico del cáncer. La investigación *in vitro* sobre el cáncer utiliza líneas celulares de cáncer humano o de animales para estudiar las rutas bioquímicas en las células cancerosas (Masters, 2002). Casi todas las líneas celulares de cáncer continuas se derivan de cánceres de etapa avanzada y de alto grado. En el proceso de aplicación de protocolos de tratamientos personalizados basados en el perfil genético de un individuo, el uso de líneas celulares de cáncer primarios derivados del paciente en lugar de líneas celulares genéricas se ha convertido en un valioso sistema *in vitro* para el desarrollo de los tratamientos.

Las ventajas de los estudios de cáncer *in vitro* son que las condiciones como la homogeneidad, el descubrimiento de los mecanismos moleculares y reproducibilidad son altamente controlados; no obstante las principales

limitaciones del cultivo de células cancerosas *in vitro* son la selección de células con determinado fenotipo y genotipo durante la adaptación de las condiciones, la posible acumulación de mutaciones en las células durante el cultivo, la población celular homogénea y el aislamiento que tienen estas del microambiente tumoral (Cekanova et al., 2006; Wang et al., 2014). A pesar de lo anterior este tipo de estudios seguirán siendo de importancia para el entendimiento de este tipo de enfermedades.

El desarrollo de modelos animales para el estudio *in vivo* del cáncer es un requisito importante para el avance de las diversas investigaciones realizadas sobre terapias anticáncer, siendo una de las primeras fases para ayudar a detectar y elucidar la respuesta a los tratamientos y pasar a la fase de investigación clínica (figura 6). La importancia de los modelos animales es que tienen un porcentaje de reproducibilidad alto para todos los tipos de cáncer, incluyendo el comportamiento biológico, y la respuesta al tratamiento con los agentes citotóxicos similar a los que ocurren en los seres humanos. Adicionalmente tienen una vida útil total más corta y progresa la enfermedad de una manera más rápida, estos factores entre otros contribuyen a las ventajas del uso de modelos animales (Knapp & Waters, 1997; MacEwen, 1990; Spugnini, Porrello, Citro, & Baldi, 2005).

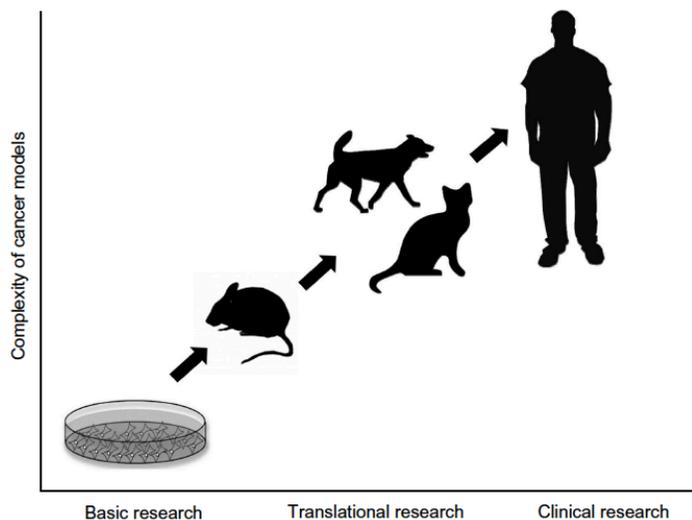


Figura 6. Importancia de los modelos animales de cáncer durante el descubrimiento de drogas, detección y tratamiento de cáncer.

2.4 RECEPTOR DE ÁCIDO FÓLICO (FOLR1)

Un biomarcador de interés reciente en el campo del cáncer es receptor de folato α (FOLR1), una proteína de membrana con alta afinidad para la unión y transporte de folato en las células (Necela et al., 2015). El folato es un componente necesario del metabolismo celular. La sobreexpresión de FOLR1 puede conferir una ventaja de crecimiento a los tumores mediante el aumento de la absorción de folato y/o puede afectar a la proliferación celular a través de la activación alternativa de vías de señalización celulares (Kelemen, 2006; Siu et al., 2012). Se han encontrado niveles elevados de FOLR1 en los tumores de origen epitelial en comparación con el tejido normal, incluyendo ovario, mama, cerebro, pulmón y colorrectal (Evans et al., 2003; Parker et al., 2005; J. F. Ross, Chaudhuri, & Ratnam, 1994; Toffoli et al., 1997; Weitman et al., 1992). La especificidad de FOLR1 en los tumores hace que sea un objetivo prometedor para el diagnóstico y estrategias de tratamiento. Existen varios tipos de terapias dirigidas de receptor de folato, tales como anticuerpos y conjugados de ácido fólico y los fármacos se han desarrollado y se encuentran en distintas fases de los ensayos clínicos para el tratamiento de cáncer de ovario y cáncer de pulmón (Clinical Trials, 2015).

2.5 NANOMEDICINA Y NANOPARTÍCULAS (NPs)

Se han explorado en las últimas décadas estrategias específicas que prometen ser efectivas para las terapias anticancerígenas que tienen la habilidad de superar las limitaciones comunes de los tratamientos tradicionales (quimioterapia, radioterapia y cirugía), la nanomedicina es la principal (Farrell, Ptak, Panaro, & Grodzinski, 2011; T Lammers et al., 2008; Twan Lammers,

Kiessling, Hennink, & Storm, 2012). Ésta es la aplicación de la nanotecnología a la medicina; en el proceso de diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades usando herramientas y conocimiento molecular sobre el cuerpo humano (Freitas, 2005). Este tipo de tratamiento hace uso de nanoestructuras aplicando nanoingeniería para tener efectos médicos únicos. De esta forma, la nanomedicina toma ventajas de dos fenómenos que ocurren a nanoescala: la transición en propiedades físico-químicas y la transición de las interacciones fisiológicas (Etheridge et al., 2013).

Las nanopartículas (NPs), de acuerdo a la American Society for Testing and Materials (ASTM) son partículas con medidas que van desde 1 a 100 nm en dos o tres dimensiones (ASTM, 2006). Existen diversos tipos de nanopartículas entre las cuales se encuentran nanotubos de carbón, NPs de oro y cadmio, etc. Las NPs de metales nobles y más específicamente las nanopartículas de Oro (GNPs) han sido de interés para la comunidad científica debido a que exhiben propiedades físico-químicas únicas como la de unirse a grupos aminos y tioles, permitiendo modificaciones en su superficie para su aplicación biomédica (Shukla et al., 2005; Valenzuela, 2013).

La funcionalización de las NPs es un tema de investigaciones intensas actualmente, teniéndose grandes progresos para la generación de partículas multifuncionales para su uso en la diagnosis y terapia del cáncer (Nel, Xia, Mädler, & Li, 2006). Las GNPs al ser funcionalizadas uniendo fármacos covalentemente a su superficie tienen el potencial de mejorar la distribución de las drogas quimioterapéuticas evitando su rápida degradación y liberándolas directamente en el sitio de tumores y/o previniendo que éstas afecten tejidos sanos (Sagnella et al., 2014).

De igual forma las GNPs se consideran una excelente opción para inducir muerte celular o apoptosis por su capacidad de generar hipertermia en los tejidos, esto se lleva a cabo aprovechando sus cualidades metálicas. Cuando se aplica a GNPs una fuente de energía como un laser que produce radiación

electromagnética no ionizante, se tiende a una generación de calor debido a la excitación y relajación de los electrones (Cherukuri & Curley, 2010), esto a su vez lleva a una mayor elevación de la temperatura y por lo tanto se logra un daño irreversible en los tejidos tumorales, es decir, se tiene disminución del tumor (Stern et al., 2007). No obstante, aun existe varios aspectos por elucidar en el campo de la nano medicina, esencialmente aquéllos relacionados con los impactos clínicos que pueda tener el uso de las NPs en la terapia contra el cáncer.

2.6 RESONANCIA MAGNÉTICA DE IMAGEN

La Resonancia Magnética de Imagen (RMI) es una tecnología de imágenes no invasiva que produce imágenes anatómicas tridimensionales detalladas, sin el uso de la radiación dañina. Se usa frecuentemente para la detección de enfermedades, el diagnóstico y el monitoreo de tratamientos. Se basa en una tecnología sofisticada que estimula y detecta el cambio en la dirección del eje de rotación de protones que se encuentran en el agua que compone los tejidos vivos. La RMI es conocida por su utilidad como herramienta de diagnóstico médico y por la variedad de imágenes claras que se obtienen en el interior del cuerpo, las cuales se adquieren de una manera inocua y no invasiva. La RMI tiene sus bases sentadas hace más que hace 60 años en experimentos de física diseñados para medir las propiedades de la espines nucleares de los átomos de hidrógeno (Nacher, 2009).

Las imágenes que se obtienen de RMI se forman por las señales de los protones en el agua y de los lípidos que componen el organismo. Los protones son partículas cargadas que giran alrededor de un eje interno de rotación con un valor dado de momento angular P y un momento magnético μ , y por lo tanto puede ser considerado como un imán muy pequeño con polos norte y sur. El campo magnético que se genera por la rotación de la partícula es colineal con la dirección de los ejes de giro y, normalmente, se denomina momento

magnético. La fuerza del momento magnético determina la sensibilidad de detección en la resonancia magnética y es dependiente del tipo de núcleo. Con mayor frecuencia, el núcleo de hidrógeno con un protón es el más utilizado en RMI porque posee el momento magnético más fuerte, además que éste tiene una abundancia significativa en los tejidos del organismo. Las variaciones en el momento angular del spin resulta de la interacción con un campo magnético estático aplicado y de la radiación electromagnética. Estas partículas tienen masa y por lo tanto generan un momento angular a medida que giran. Partículas positiva y negativamente cargadas pueden ser considerados como esferas de cargas positivas o negativas, mientras que las partículas eléctricas neutras (neutrones) se pueden considerar como una combinación de cargas positivas y negativas homogéneamente distribuidas (Brown & Semelka, 2003). Relacionado con la RMI, la magnitud del momento angular del protón se cuantifica, y tiene un valor único y fijo. La magnitud de momento magnético los de protones es proporcional a la magnitud del momento angular:

$$|\vec{\mu}| = \gamma |\vec{P}|$$

Dónde γ es una constante llamada radio giro-magnético, y tiene un valor de 267,54 MHz/Tesla para los protones. Como resultado, la magnitud del momento magnético tiene una valor único. En ausencia de un campo magnético externo la magnitud del momento magnético de cada protón en nuestros cuerpos es fijo, pero la orientación es completamente al azar. Por lo tanto, la magnetización neta, es decir, la suma de todos los momentos magnéticos individuales en nuestro cuerpo es cero (Tyler & Butt, 2012).

La situación cambia con la aplicación de un campo magnético externo, B_0 . De la mecánica cuántica, el componente del momento magnético en la dirección de B_0 puede tener sólo dos posibles valores discretos, lo cual se traduce en los momentos magnéticos que son alineados en un ángulo de $54,7^\circ$ con respecto

a la dirección de B_0 . La primera configuración se denomina como la paralela, y la segunda se le denomina como la configuración antiparalela; nótese que los términos paralela y antiparalela se refieren sólo a el componente z de μ y que μ está en realidad alineada en un ángulo con respecto a B_0 . El número relativo de protones en las configuraciones paralela y antiparalela depende del valor de B_0 . Los protones en la configuración paralela son los preferidos, ya que en ésta se garantiza el estado de energía más bajo (Brown & Semelka, 2003).

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 GENERAL

- Generar tumores de SCLC en ratones atímicos (Nu/Nu) y evaluar la distribución de NPs core-shell de Au-Fe₃O₄ por RMI.

3.2 ESPECÍFICOS

- Inducir y caracterizar de tumores con la línea celular NCI-H69 (SCLC) en ratones inmunosuprimidos.
- Evaluar la distribución de las NPs en ratones por Resonancia Magnética de Imagen (MRI).

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

4 HIPÓTESIS

- Las NPs core-shell de Au-Fe₃O₄ se pueden distribuir selectivamente en tumores de SCLC inducidos con la línea celular NCI-H69 en ratones inmunosuprimidos. Esto será esencial para trabajos futuros sobre el tratamiento de tumores de cáncer de pulmón ya que se podrá generar una terapia efectiva para disminuir el tamaño del tumor debido a la capacidad de liberación específica de fármacos anticancerígenos.

CAPÍTULO 5

JUSTIFICACIÓN

5 JUSTIFICACIÓN

La evolución de los tratamientos contra el cáncer se está enfocando en el uso de sistemas funcionales para el tratamiento y diagnóstico, promoviendo que se disminuyan los efectos secundarios que los tratamientos tradicionales generan en las células sanas, en este aspecto la nanotecnología está siendo un área potencial de estudio.

Un paso importante para el avance en las aplicaciones médicas es el uso de modelos animales para que los estudios puedan ser potencialmente utilizados con fines terapéuticos.

CAPÍTULO 6

MATERIALES, MÉTODOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

6 MATERIALES, MÉTODOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

6.1 MATERIALES

6.1.1 Línea celular de Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas (SCLC, del inglés Small Cell Lung Cancer) de la *American Type Culture Collection* (ATCC)

La línea celular NCI-H69 [H69] (ATCC® HTB119™) proviene del pulmón de un humano (*Homo sapiens*), un individuo masculino caucásico de 55 años de edad con un carcinoma de células pequeñas de pulmón. Dichas células cuentan con una morfología de tipo de agregados flotantes que crecen en suspensión como agregados multicelulares. En la figura 7 se puede observar la morfología de las células NCI-H69.

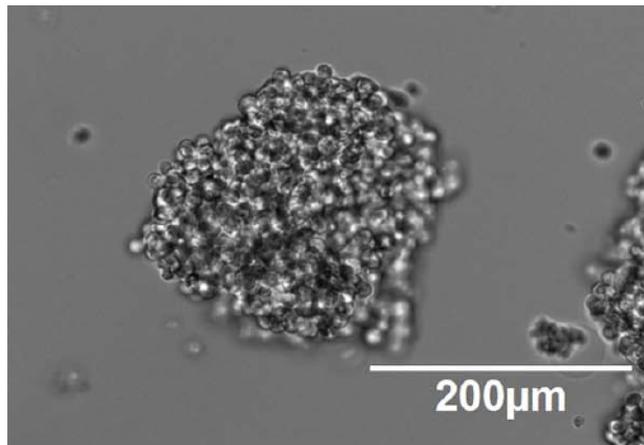


Figura 7. Morfología de crecimiento de las células NCI-H69, agregado multicelular.

6.1.2 Ratones atímicos-Foxn1^{nu} (Nu/Nu),

Los ratones desnudos, carecen de pelo desde el nacimiento y durante toda la vida; carecen completamente de timo (De Sousa, Parrott, & Pantelouris, 1969), por lo tanto tienen una deficiencia de células T. Debido a su falta de la función inmune dependiente del timo, los ratones desnudos se han utilizado como receptores de tumores humanos.

La falta del timo en los homocigotos conduce a muchos defectos en el sistema inmune, incluyendo el agotamiento de los linfocitos de las áreas dependientes del timo, de los ganglios linfáticos y el bazo, cuentan con una población de linfocitos reducida compuesta casi por completo de células B, tienen una respuesta relativamente normal de IgM a antígenos, muy mala respuesta a los antígenos timo-dependientes, y tienen una gran susceptibilidad a la infección (De Sousa et al., 1969; ENVIGO, 2010).

Para llevar a cabo los experimentos de este trabajo se utilizaron ratones atímicos-Foxn1^{nu} (Nu/Nu), hembra, de cuatro a seis semanas de vida y procedentes de la UPEAL (Unidad de Producción y Experimentación de animales de Laboratorio) del CINVESTAV (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN). Los ratones fueron mantenidos y cuidados de acuerdo con las regulaciones del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación del Cinvestav. Los ratones se mantuvieron en un ambiente estéril con agua y comida. Cuando se detectó cualquier signo importante de enfermedad o que el volumen efectivo del tumor llegaba a 2 cm³ los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Todos los procedimientos con los animales se llevaron a cabo según la normativa en el Bioterio de la UPEAL.

6.1.3 Nanopartículas (NPs)

Todos los reactivos usados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich: Hidróxido de Sodio (NaOH), Cloruro férrico hexahidratado, ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Cloruro de hierro tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Bromuro hexadeciltrimetilamonio (CTAB), Cloruro de oro (III) trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), Ácido Ascórbico (AA), Dimetilsulfóxido (CH_3SOCH_3) y Agua bidestilada (H_2O). Agua desionizada (DI) de conductividad $18.2\text{M}\Omega$ fue usada para todos los experimentos.

6.2 MÉTODOS

6.2.1 CULTIVO CELULAR

La línea celular de SCLC (NCI H69) fue rutinariamente mantenida en medio RPMI 1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino, bajo una concentración de CO_2 del 5%, a 37°C . Con recambios tres veces a la semana, conservando las mismas condiciones. Debido a su morfología de crecimiento en agregados las células fueron centrifugadas en cada pasaje.

6.2.2 INOCULACIÓN SUBCUTÁNEA DE CÉLULAS NCI-H69

Las células tumorales de la línea celular NCI-H69 se prepararon en PBS (5×10^6 células en $100\ \mu\text{l}$), y se inocularon subcutáneamente en los flancos de los ratones ($100\ \mu\text{l}$ por flanco) utilizando jeringas de insulina de $0.5\ \text{mm}^3$ con una aguja de 31G y 8 mm de longitud. Cada cantidad de células se inoculó en dos ratones. El volumen tumoral fue medido 3 veces por semana desde su aparición visible, calculándose según la ecuación $\text{Volumen} = (\text{L} \cdot \text{A}^2) / 2$ (Faustino-Rocha et al., 2013), donde L es el diámetro mayor del tumor y A el diámetro menor. Los ratones fueron sacrificados cuando el volumen del tumor en el flanco alcanzó los $2\ \text{cm}^3$.

6.2.3 INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cortes pulmón y tumor de SCLC fueron desparafinizados y rehidratados de acuerdo a protocolos descritos en trabajos similares (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989). La detección de proteínas fue llevada a cabo utilizando el kit “Mouse/Rabbit PolyDetector HRP/DAB Detection System” (Bio SB, USA). Inicialmente, los tejidos fueron rehidratados en PBS y se realizó un procedimiento de recuperación de antígenos utilizando una solución de citratos (ImmunoRetriever Citrate Solution, Bio SB, USA) en una olla de presión digital (121 °C, 20 lb de presión, 15 minutos tiempo total). Las laminillas con los cortes fueron enfriadas a temperatura ambiente durante 30 minutos y los tejidos fueron tratados con una solución de bloqueo para inhibir las peroxidasas endógenas (PolyDetector Peroxidase Block quenching buffer; Bio SB, USA). Después de tres lavados en PBS, los cortes fueron incubados de 12 a 16 horas a 4 °C con uno de los siguientes anticuerpos monoclonales primarios diluidos 1:50 en buffer de dilución: Tris-HCl, pH 8.0 100 mM (concentración final) y NaCl 150 mM (concentración final) en agua ultrapura. Se dejó incubar con el anticuerpo primario anti-FOLR1 (LSBio). Se realizaron cuatro lavados en PBS y los cortes fueron incubados durante 30 minutos con un anticuerpo secundario (PolyDetector HRP label; Bio SB, USA). Después de tres lavados en PBS, los cortes fueron incubados con el substrato (PolyDetector DAB chromogen; Bio SB, USA), se contratiñeron con hematoxilina y se montaron en Permount (Fisher Scientific, USA).

6.2.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL.

El RNA total fue aislado y purificado a partir de células de tejido tumoral utilizando el reactivo TRIzol de acuerdo a las instrucciones del fabricante (*Invitrogen, USA*). La calidad de los mRNAs fue determinada mediante electroforesis en geles de agarosa (1%) desnaturalizantes, teñidos con GelRed, lo cual permitió la visualización de las bandas correspondientes a las fracciones 18S y 28S del RNA a través de un transiluminador de luz UV. Las

concentraciones del RNA total fueron obtenidas mediante espectrofotometría. Estas muestras se utilizaron para los ensayos de RT-PCR de punto final.

6.2.5 RT-PCR

Se utilizó RNA total del tejido tumoral para la transcripción reversa, la reacción de PCR se realizó con una concentración de RNA total entre los 100-200ng. Se emplearon de 35 a 40 ciclos a diferentes temperaturas de amplificación.

6.2.6 PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Se utilizó un método de co-precipitación simple para la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro. 50ml de NaOH 1.5M fue usado como agente reductor. Un volumen de 10 mL de agua desionizada fue desgasificado con nitrógeno gaseoso y después se añadió 1mM de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.85ml de HCl. Entonces la solución fue mezclada y posteriormente se añadió la solución de NaOH bajo agitación constante con una atmósfera de nitrógeno a 80°C por 1.5h. Se formaron polvos sólidos negros que se separaron usando un imán y se lavaron con agua destilada y etanol 3 veces cada uno. El precipitado negro se separó y se lavó para ser utilizado para la síntesis de NPs core-shell.

6.2.6.1 Preparación de solución semilla de óxido de hierro Fe_3O_4 .

Solución de semilla de óxido de hierro se preparó utilizando 5 ml de solución de Fe_3O_4 de Au y luego se diluyó con 25 ml de agua destilada. 5 ml de dimetil sulfóxido (DMSO, 0,2% w / v) añadido para la eliminación de la aglomeración en las partículas, y se agitó bajo atmósfera de N_2 . La temperatura se mantuvo a 80 ° C durante todo el experimento por 3 h.

6.2.6.2 Preparación de la solución semilla de Oro.

La solución de semilla de oro se preparó inicialmente mezclando 1 ml de CTAB (0,1 M) y 2 ml de AA (1 mM) juntos y después se añadió a 50 ml de solución de HAuCl₄ (0,3 M).

6.2.6.3 Síntesis de Nanopartículas core/shell Au-Fe₃O₄.

La solución semilla de óxido de hierro y la solución semilla de oro se mezclaron, sintetizándose así nanopartículas core-shell de Au-Fe₃O₄. Inicialmente, la solución semilla de oro de color violeta se añadió gota a gota a la solución de óxido de hierro de color marrón. Esta mezcla se mantuvo bajo agitación constante durante 6 horas hasta que la solución de color marrón se volvió a púrpura oscuro.

6.2.7 RESONANCIA MAGNÉTICA DE IMAGEN (RMI)

La distribución de las NPs administradas en el modelo knockout de ratón fue monitoreada en el Centro Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica (CI³M) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I).

Los ratones fueron anestesiados con 100 uL de una mezcla de Xilacina (1:5) Ketamina (2:5) y solución salina (2:5) intraperitonealmente para posteriormente ser introducidos al equipo y realizar el escaneo con el equipo de marca Varian.

6.3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En las figuras 8 y 9 se presenta la estrategia experimental para cumplir con los objetivos de esta investigación. En la Figura 8 se presenta el diagrama de flujo que resume la etapa experimental para cumplir con el objetivo de inducir y caracterizar el tumor en el modelo de ratón que se estudia. En esta estrategia se considera desde el cultivo de células hasta su inyección para generar los

tumores, que a su vez son caracterizados por inmunohistoquímica y RT-PCR. En la figura 9 se presenta el diagrama de flujo que resume la etapa experimental que permite monitorear la distribución de las NP score-shell en los tumores que fueron inducidos en los ratones desnudos, dicha distribución se evaluó por medio de RMI, las nanopartículas fueron inyectadas por la vena de la cola del ratón haciendo uso de jeringas de insulina.

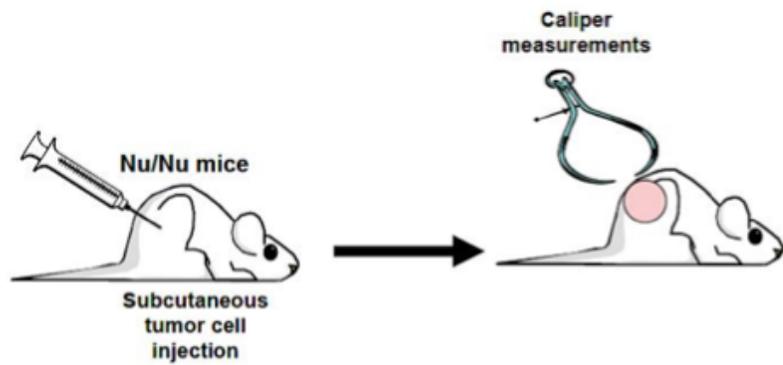
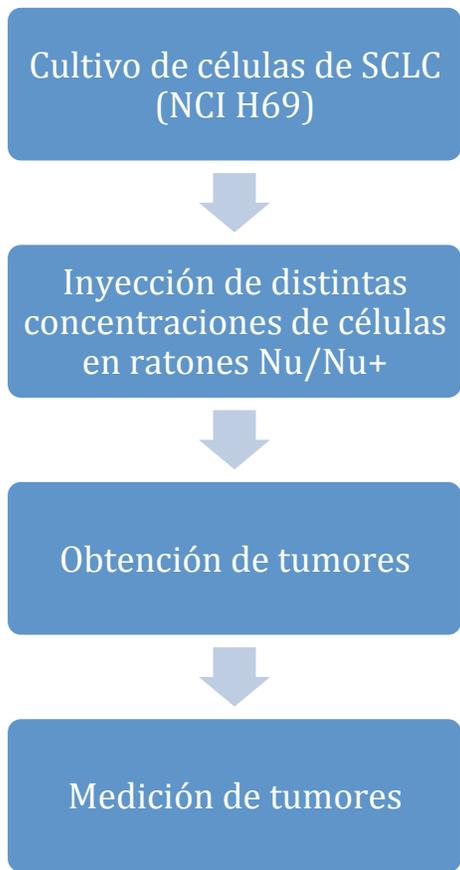


Figura 8. Estrategia experimental de inoculación de ratones Nu/Nu.

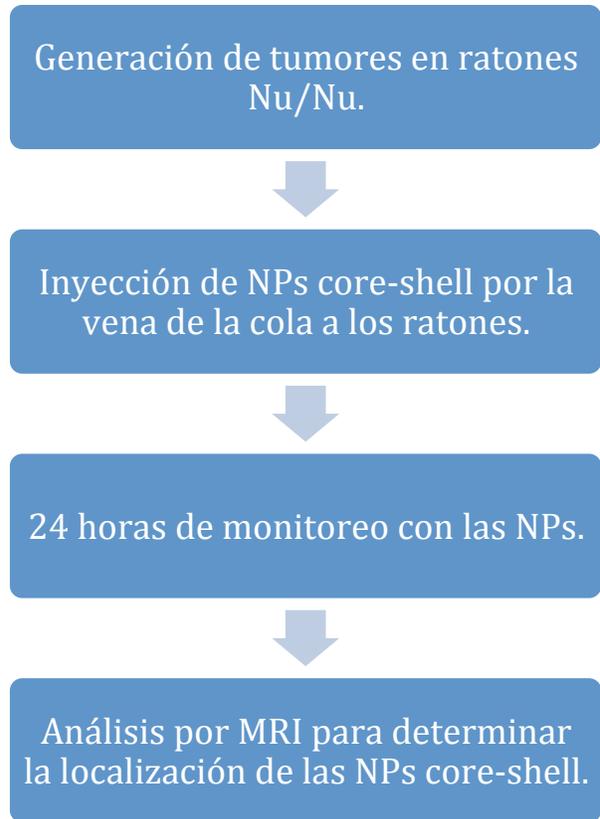


Figura 9. Estrategia experimental de la Resonancia Magnética de Imagen de ratones Nu/Nu.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan los resultados del proyecto de investigación. Se muestra lo obtenido para cumplir con el primer objetivo sobre la generación de tumores *in vivo* utilizando ratones atímicos-Foxn1^{nu} (Nu/Nu), y la caracterización de los tumores obtenidos por RT-PCR e Inmunohistoquímica. Posteriormente se presentan los resultados que permiten cumplir con el segundo objetivo de esta investigación y se relaciona con la obtención de imágenes para evaluar la distribución de las nanopartículas en los ratones atímicos-Foxn1^{nu} (Nu/Nu) por Resonancia Magnética de Imagen.

7.1 GENERACIÓN DE TUMORES EN RATONES ATÍMICOS

Para cumplir con el primer objetivo se realizó el cultivo de la línea celular NCI-H69 (ATCC® HTB119™). Las células poseían 6 pasajes al momento de ser utilizadas con una confluencia del 95%; en cada preparación de la inoculación se contaban las células con Azul de Tripano para determinar la concentración existente de células en cada caja p100; de esta forma se determinó en cada uno de los conteos que el promedio existente por caja era de 9×10^6 células de SCLC. Ya que no se tenían referencias de cuántas células eran necesarias para generar los tumores con dicha línea celular en los ratones atímicos-Foxn1^{nu} (Nu/Nu), se tomaron los volúmenes correspondientes de solución celular para tener: 1×10^6 , 3×10^6 y 5×10^6 células. A partir de esto se colocaron las concentraciones correspondientes en tubos Eppendorf que posteriormente se depositaron en las jeringas de insulina, todo esto manteniéndose un ambiente estéril en campanas de flujo laminar para posteriormente ser llevados al la Bioterio de la UPEAL.

Los ratones hembra de 4-6 semanas fueron sujetados con la mano izquierda, se realizaba una limpieza de la zona de inoculación con torundas de alcohol y

con la mano derecha se sujetaba la jeringa, se introducían de 3-4mm de la aguja en uno de los flancos del ratón para depositar el inoculo correspondiente (Kahn & Shin, 1979; Universidad Nacional de Quilmes, 2013) como se muestra en la figura 10.



Figura 10. Procedimiento de inoculación de ratones Nu/Nu en el Bioterio de la UPEAL.

Posterior a la inoculación, los ratones fueron monitoreados la primer semana diariamente y posteriormente fueron monitoreados 3 veces por semana. A los cuatro días se logró apreciar el primer indicio de que el tumor se estaba generando, esto se relacionó con una pequeña inflamación en color blanca que se observó sobre el área inoculada, después se logró percibir que el crecimiento del tumor era rápido coincidiendo con lo reportado acerca de la agresividad de este tipo de cáncer (NCCN, 2013). A las cuatro semanas se alcanzó un volumen aproximado de 2 cm^3 como se aprecia en la figura 11.

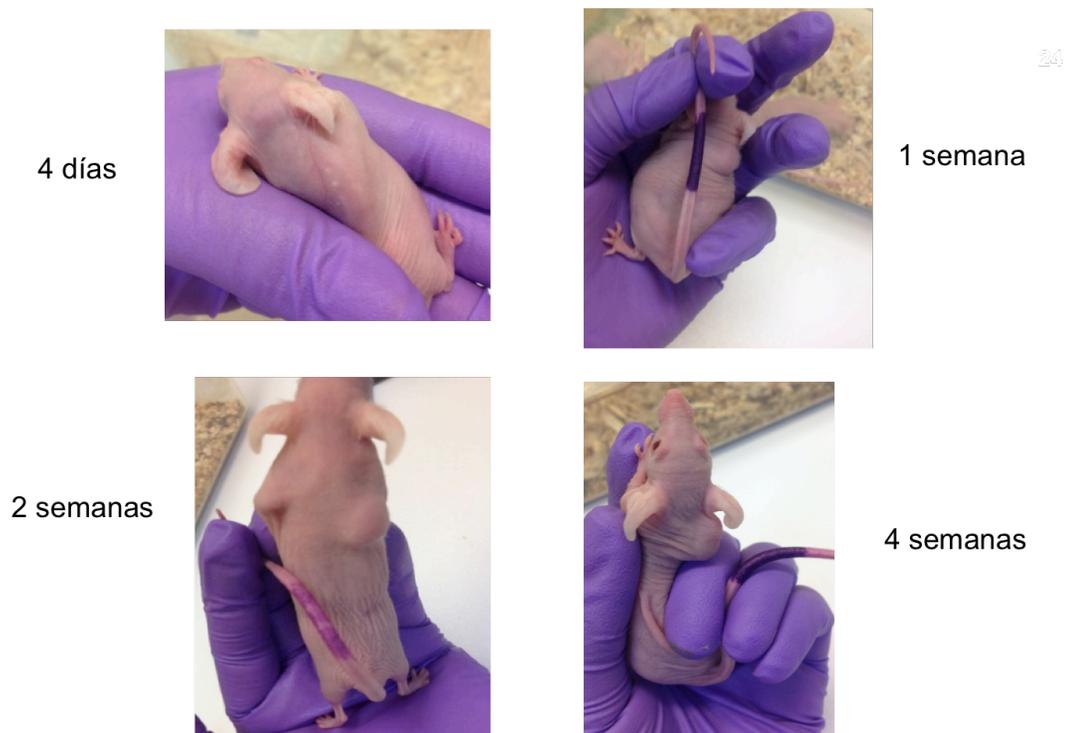


Figura 11. Evolución del crecimiento tumoral en los ratones Nu/Nu, de 4 días a 4 semanas.

En la figura 12 se presenta una gráfica que muestra el comportamiento del crecimiento tumoral que se obtuvo con dos de las concentraciones utilizadas para generar tumores de SCLC. Como se comentó anteriormente la inducción del tumor se realizó mediante una inoculación subcutánea de la línea celular NCI-H69 en tres distintas concentraciones: 1×10^6 , 3×10^6 y 5×10^6 células. Con la primer concentración no se obtuvo resultado alguno, no obstante con la segunda y tercera concentración sí, tal como se puede observar en la figura, donde se percibe un aumento significativo en el tamaño de los tumores. Este incremento en el tamaño del tumor se comenzó a apreciar a partir de la segunda semana. La mayor concentración de la línea celular NCI-H69 se reflejó en la obtención de un tumor de mayor tamaño, de tal forma que a las 4.5 semanas se alcanzó un volumen de aproximadamente 2.5 cm^3 para la concentración de 5×10^6 células.

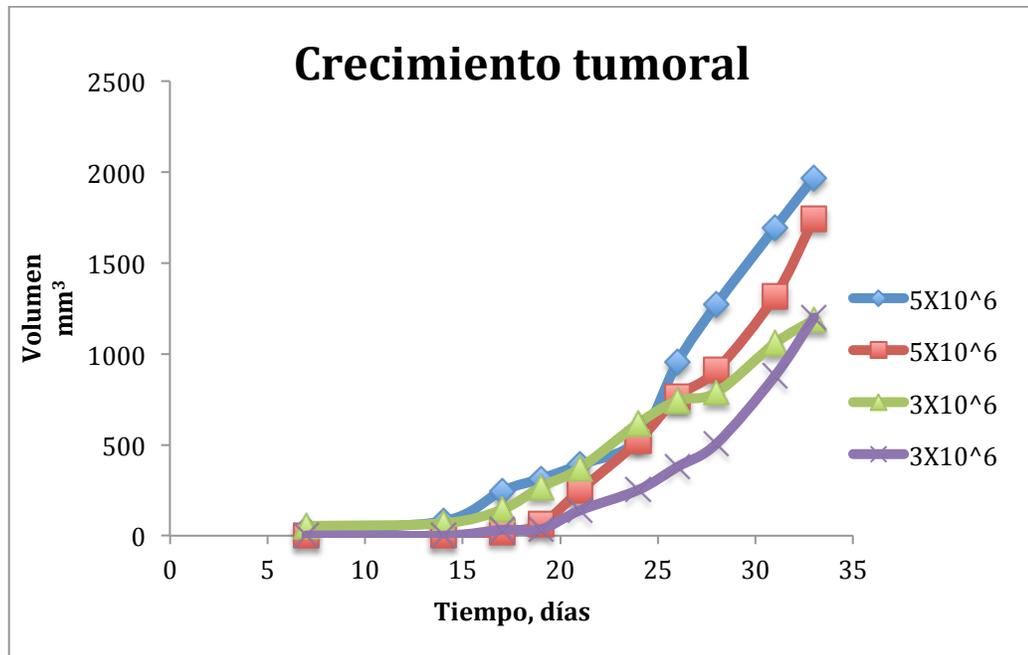


Figura 12. Comportamiento del crecimiento tumoral en los ratones Nu/Nu.

De este estudio se determinó, después de realizarlo por triplicado, que la concentración óptima para la generación de los tumores de SCLC en ratones atímicos era de 5×10^6 células NCI-H69 por inculo por ratón. Al alcanzar un volumen aproximado de $1.5-2.0 \text{ cm}^3$ los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical para extraer la masa tumoral y realizar la caracterización correspondiente. La figura 13 muestra los tumores que se extrajeron de los ratones, los cuales son blancuzcos y sólidos, en mayor medida al centro de la masa tumoral; cuentan con vasos sanguíneos, es decir, son tumores vascularizados ya que esto es una de las características para su malignización (Herbst et al., 2008; Jimenez & Volpert, 2001).

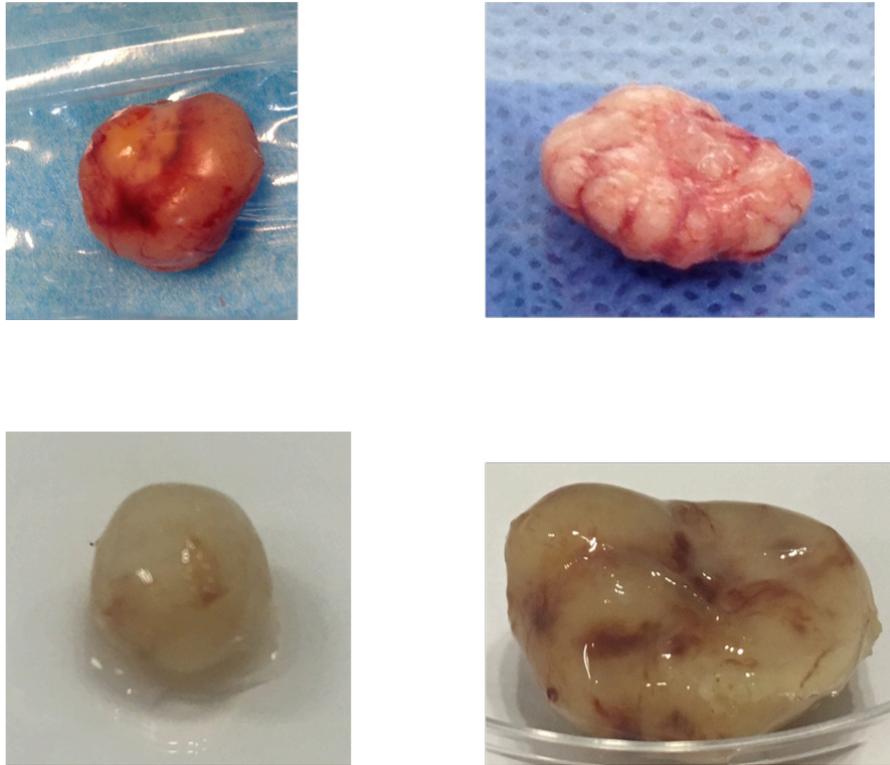
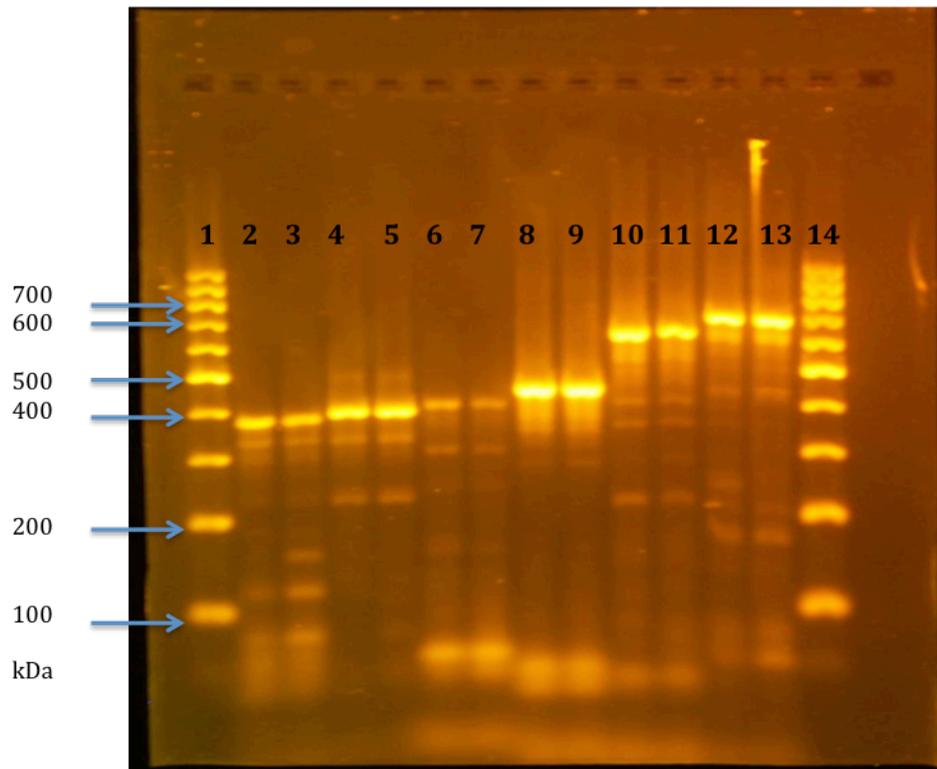


Figura 13. Morfología de los tumores de SCLC obtenidos a partir de la línea celular NCI-H69 en ratones Nu/Nu.

Una vez obtenido el tejido tumoral se realizó la extracción de RNA con TRizol de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Life Technologies, 2014) para posteriormente realizar una reacción de RT-PCR (Anexo B). En la figura 14 se muestra un gel de agarosa donde se han corrido muestras de dicha reacción de RT-PCR. Lo que se observa es la amplificación de diferentes genes a partir de muestras de RNA total, obtenidos de los tumores inducidos en ratones atímicos con la línea celular NCI-H69, y que son de alto interés ya que participan en apoptosis y el ciclo celular (p53, Rb1, Bcl2, Mdm2 y E2F3). Se sabe que las células tumorales tienen una desregulación en estos genes y por lo tanto tienden a proliferar de manera excesiva, porque la función de las proteínas participantes en dicha regulación se ve afectada (Hanahan & Weinberg, 2011). En una etapa posterior se pretende estudiar el nivel de expresión a nivel de RNA mensajero y proteína, mediante ensayos de RTqPCR y microarreglos de proteína.



Carril	Gen	Peso Molecular (kDa)	Temp. De amplificación (°C)
1 y 14	Marcador de PM	-	-
2 y 3	Rb1	374	52.8
4 y 5	Mdm2	386	53.1
6 y 7	P53	399	57.1
8 y 9	PCNA	442	55.5
10 y 11	E2F3	629	54.5
12 y 13	Bcl2	686	55

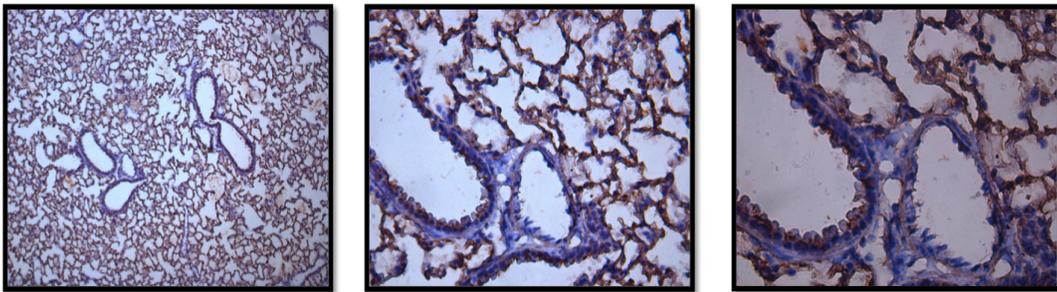
Figura 14. Gel de amplificación de RT-PCR de genes apoptóticos y las especificaciones de amplificación.

En la figura 15 se muestran las fotografías de los ensayos de inmunohistoquímica realizada utilizando el anticuerpo del Receptor de Ácido Fólico (FOLR1) en tejido de pulmón de ratón y en tejido de tumor que fue generado en los ratones desnudos. De izquierda a derecha se aprecia un aumento en el objetivo utilizado (10X, 40X y 63X). La señal positiva es la observada en color café, en el primer grupo de fotografías que corresponden al

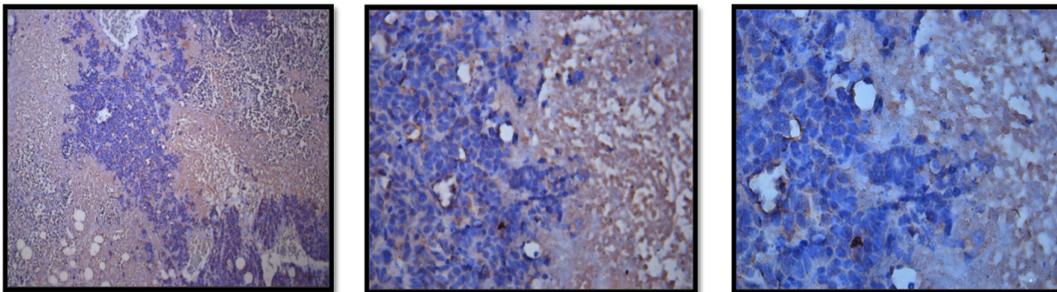
tejido del pulmón del ratón desnudo se pueden observar los alveolos, y la señal del receptor en el borde de dichas secciones debido a que dicho receptor se encuentra localizado en la membrana celular. En la literatura se menciona que el receptor de ácido fólico se encuentra sobre expresado en células tumorales (John F. Ross, et al, 1998) debido a la necesidad de dichas células para replicar el DNA y sintetizar proteínas de forma más rápida. (Kamen B., 1997).

RECEPTOR DE ÁCIDO FÓLICO (FOLR1)

Pulmón



SCLC Tumor



10X

40X

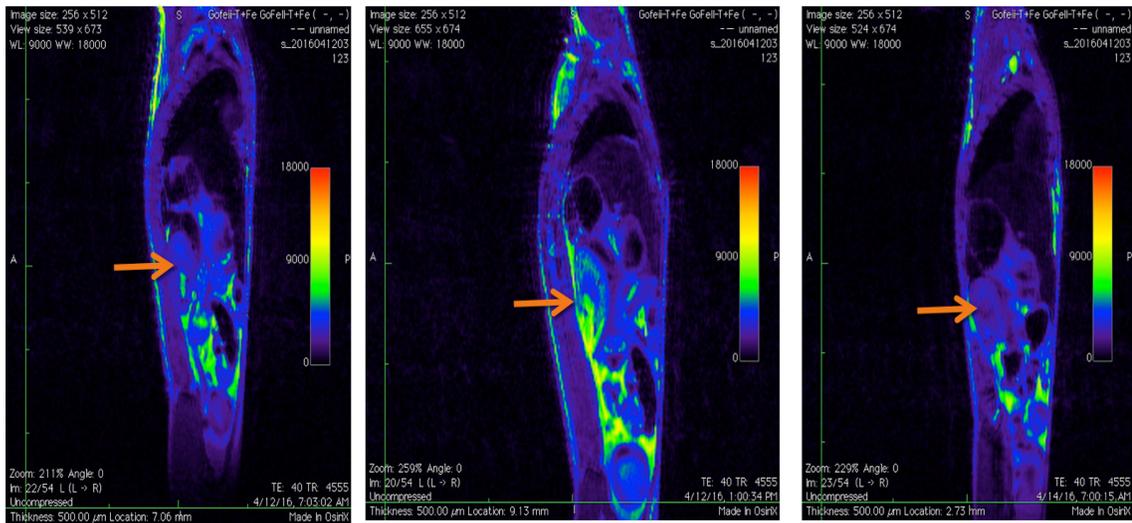
63X

Figura 15. Fotografías de inmunohistoquímicas del receptor de ácido fólico (FOLR1).

7.2 DISTRIBUCIÓN DE NANOPARTÍCULAS POR RESONANCIA MAGNÉTICA DE IMAGEN

En las figura 16 y 17 se muestran los resultados de las imágenes obtenidas de la distribución de las nanoparticulas de hierro-oro por Resonancia Magnética de Imagen. El análisis se basa en el cambio de energía que presentan los átomos de hidrógeno que abunda en el organismo al someterse a un campo magnético, lo cual genera un contraste específico respecto a la proporción de la presencia de dichos átomos. Las nanopartículas utilizadas en el estudio, que son de oro y magnetita ($\text{Au-Fe}_3\text{O}_4$), generan un contraste distinto. Se obtienen imágenes con tonos de grises que para ser percibidos mejor fueron cambiados por tonos de color verde y fondo azul, como los que se muestran en las figuras. En la figura 16 se muestra lo obtenido en ratones control, donde no se presentan tumores y en la figura 17 se analizó un ratón con tumor de SCLC, de izquierda a derecha se hace referencia a los tiempos en los cuales fueron analizados (0.5, 8 y 24 horas). Lo que elucidó con esta caracterización a diferentes tiempos fue la distribución de las nanopartículas después de haber sido suministradas por medio de una inyección en la vena de la cola para que las nanopartículas se transportasen por el sistema sanguíneo y así determinar cuál era el tiempo de residencia en el organismo y hacia dónde se dirigían. Las flechas en las imágenes que se presentan hacen referencia al riñón de los ratones. Como se ha encontrado en la literatura las NPs al ser pequeñas tienden a permanecer en el organismo y posteriormente se dirigen al riñón para ser excretadas; por medio de este análisis de imágenes se confirmó esto, ya que observando la zona del riñón se puede identificar el cambio de contraste en color verde presentado a las 8 horas con respecto a la imagen de 0.5 horas, lo que indica que las NPs se encuentran almacenadas ahí para ser excretadas por medio de la orina, y por lo tanto a las 24 horas estas partículas han sido eliminadas del organismo. En todos los ratones analizados se presentó el mismo comportamiento confirmando así que las NPs no

permanecen más de un día después de haber sido suministradas a los ratones, característica que se ha identificado para diferentes sistemas reportados en la literatura que hacen uso de una línea celular diferente.

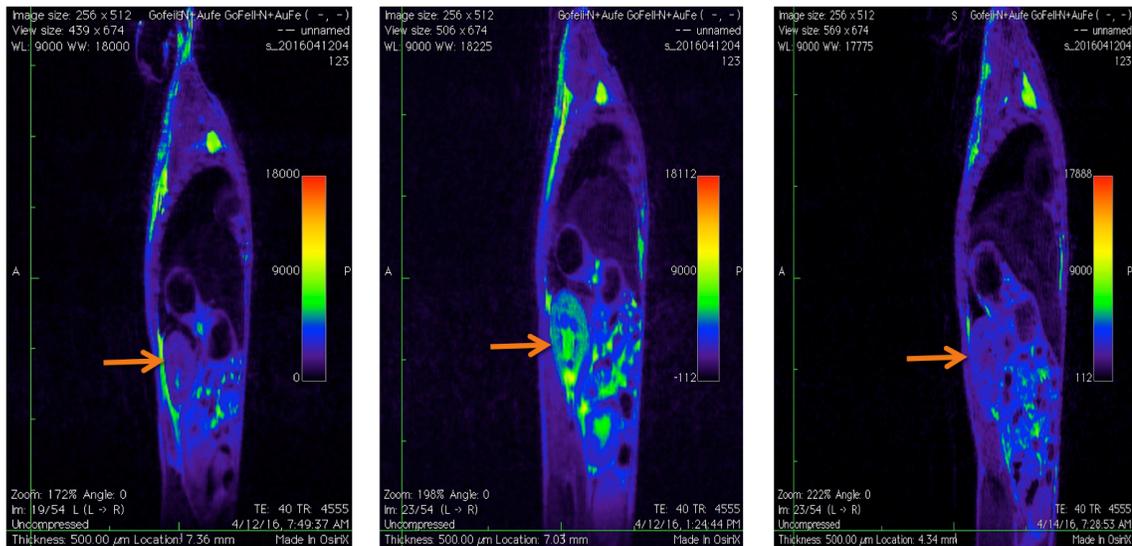


0.5 horas

8 horas

24 horas

Figura 16. Resonancia magnética de imagen, ratón control.



0.5 horas

8 horas

24 horas

Figura 17. Resonancia magnética de imagen, ratón con tumor inducido.

La importancia de este tipo de estudios es porque actualmente es sustancial implementar métodos de diagnóstico tempranos para los pacientes que tienen algún tipo de cáncer y las NPs están siendo herramientas que pueden ayudar en este ámbito para así poder proveer oportunidades de detección temprana para los pacientes con cáncer.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

8 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las principales conclusiones de esta investigación se resumen a continuación:

- Se generaron tumores de SCLC con la línea celular NCI-H69, inoculando 5×10^6 células por ratón.
- Se determinó que el Receptor de ácido fólico no es el receptor que presenta una mayor sobreexpresión en tumores de SCLC.
- Se determinó por medio de Resonancia Magnética de Imagen (MRI) que el tiempo de residencia de las Au-Fe₃O₄ es de 8 horas en el modelo murino y que a las 24 horas ya han sido excretadas.

De acuerdo a estas conclusiones las perspectivas que se proponen para futuros trabajos son las siguientes:

- Las perspectiva primordial que se propone para futuros trabajos es la implementación del tratamiento con NPs acopladas con Doxorubicina y a partir de esto evaluar los niveles de los diversos genes participantes en la apoptosis y los niveles de las proteínas que también juegan un papel primordial en el evento de muerte celular.
- Realizar estudios de proteómica serían de gran ayuda para elucidar específicamente cuáles son los receptores que se sobreexpresan en el cáncer de pulmón de células pequeñas, para poder implementar un método por medio del cual la terapia sea específicamente dirigida, es decir, selectiva.
- Evaluar la distribución de las NPs que tengan acoplada el fármaco quimioterapéutico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J. M., & Cory, S. (1991). Transgenic models of tumor development. *Science*, 254(5035), 1161–1167. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1957168
- Adams, L. A., Tyson, L. B., & Ginex, P. K. (2004). Small Cell Lung Cancer. In N. G. Houlihan & L. B. Tyson (Eds.), *Site-specific cancer series: Lung Cancer* (pp. 87–130).
- American Cancer Society. (2014). What is small cell lung cancer? Retrieved from <http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-smallcell/detailedguide/small-cell-lung-cancer-what-is-small-cell-lung-cancer>
- ASTM. (2006). Standard Terminology Relating to Nanotechnology. *American Society for Testing and Materials, E2456*, 4. <http://doi.org/10.1520/C0071-12.2>
- Baskar, R., Ann-Lee, K., Yeo, R., & Yeoh, K.-W. (2012). Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Science*, 9(3), 193–199. <http://doi.org/10.7150/ijms.3635>
- Berdasco, M., & Esteller, M. (2010). Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Developmental Cell*. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.005>
- Brown, M. A., & Semelka, R. C. (2003). *MRI Basic Principle and Applications*. John Wiley & Sons, Inc.
- Cabanes Domenech, A., Pérez-Gómez, B., Aragonés, N., Pollán, M., & López-Abente, G. (2009). La situación del cáncer en España, 1975-2006. *Centro Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III, 1975–2006*. Retrieved from http://www.isciii.es/htdocs/publicaciones/documentos/SituacionCancerenEspana1975_2006_2010.pdf
- CancerCare. (2016). Lung Cancer 101.

- Casado, D. I. (2008). *Cáncer de pulmón microcítico*. Arán Ediciones, S.L. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=5bfXgg9izv0C>
- Cekanova, M., Masi, T., Plummer, H. K., Majidi, M., Fedorocko, P., & Schuller, H. M. (2006). Pulmonary fibroblasts stimulate the proliferation of cell lines from human lung adenocarcinomas. *Anti-Cancer Drugs*, *17*(7), 771–781. <http://doi.org/10.1097/01.cad.0000217434.48870.f9>
- Cekanova, M., & Rathore, K. (2014). Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: Utility and limitations. *Drug Design, Development and Therapy*. <http://doi.org/10.2147/DDDT.S49584>
- Cherukuri, P., & Curley, S. A. (2010). Use of nanoparticles for targeted, noninvasive thermal destruction of malignant cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *624*, 359–373. http://doi.org/10.1007/978-1-60761-609-2_24
- Chiang, A., & Massague, J. (2008). Molecular Basis of Metastasis — NEJM. <http://doi.org/10.1056/NEJMra0805239>
- Clinical Trials. (2015). Clinical Trials. Retrieved from <http://www.clinicaltrials.gov>
- De Sousa, M. A., Parrott, D. M., & Pantelouris, E. M. (1969). The lymphoid tissues in mice with congenital aplasia of the thymus. *Clinical and Experimental Immunology*, *4*(6), 637–44. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1579038&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Días López-Ayllón, B. (2013). Estudio de la resistencia a quimioterapia en células con características de cancer stem cells (CSC) derivadas de cáncer no microcítico de pulmón (CNMP). Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/282119>
- ENVIGO. (2010). Athymic Nude Mice **, 490, 7287.
- Etheridge, M. L., Campbell, S. A., Erdman, A. G., Haynes, C. L., Wolf, S. M., & McCullough, J. (2013). The big picture on nanomedicine: The state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *9*(1), 1–14.

<http://doi.org/10.1016/j.nano.2012.05.013>

- Evans, C. O., Reddy, P., Brat, D. J., O'Neill, E. B., Craige, B., Stevens, V. L., & Oyesiku, N. M. (2003). Differential expression of folate receptor in pituitary adenomas. *Cancer Res*, 63(14), 4218–4224. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12874029
- Falk, S., & Williams, C. (2009). *Lung Cancer*. OUP Oxford. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=R4EFRj-MV3YC>
- Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2009). Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*, 3(1), 16–20. <http://doi.org/10.1021/nn900002m>
- Farrell, D., Ptak, K., Panaro, N. J., & Grodzinski, P. (2011). Nanotechnology-based cancer therapeutics - Promise and challenge - Lessons learned through the NCI alliance for nanotechnology in cancer. *Pharmaceutical Research*. <http://doi.org/10.1007/s11095-010-0214-7>
- Faustino-Rocha, A., Oliveira, P. A., Pinho-Oliveira, J., Teixeira-Guedes, C., Soares-Maia, R., da Costa, R. G., ... Ginja, M. (2013). Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements. *Laboratory Animals*, 42(6), 217–224. <http://doi.org/10.1038/labnan.254>
- Franklin, W. A., Noguchi, M., & Gonzalez, A. (2010). Molecular and cellular pathology of lung cancer. In D. P. Pass, D. H. Carbone, J. D. Johnson, J. D. Minna, G. V. Scagliotti, & A. T. Turrisi (Eds.), *Principles and practice of lung cancer* (4th ed., pp. 287–324). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Freitas, R. A. (2005). What is nanomedicine? *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2004.11.003>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Herbst, R. S., Heymach, J. V., & Lippman, S. M. (2008). Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 359(13), 1367–1380. <http://doi.org/10.1056/NEJMra0802714>

- Herbst, R. S., Onn, A., & Sandler, A. (2005). Angiogenesis and lung cancer: prognostic and therapeutic implications. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(14), 3243–3256. <http://doi.org/10.1200/JCO.2005.18.853>
- Houlihan, N. G., & Paolilli, D. E. (2004). Overview of Lung Cancer. In N. G. Houlihan & L. B. Tyson (Eds.), *Site-specific cancer series: Lung Cancer*. (2nd ed., pp. 1–4).
- Huang, C. H., Shepherd, F. A., & Kelly, K. (2010). Chemotherapy for small cell lung cancer. In H. I. Pass, D. P. Carbone, D. H. Johnson, J. D. Minna, G. V. Scagliotti, & A. T. Turrisi (Eds.), *Principles and practice of lung cancer* (4th ed., pp. 847–866). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., & Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 60(5), 277–300. <http://doi.org/10.3322/caac.20073>
- Jimenez, B., & Volpert, O. V. (2001). Mechanistic insights on the inhibition of tumor angiogenesis. *J.Mol.Med.*, 78, 663–672. <http://doi.org/10.1007/s001090000178>
- Kahn, P., & Shin, S. I. (1979). Cellular tumorigenicity in nude mice. Test of associations among loss of cell-surface fibronectin, anchorage independence, and tumor-forming ability. *Journal of Cell Biology*, 82(1), 1–16.
- Kelemen, L. E. (2006). The role of folate receptor?? in cancer development, progression and treatment: Cause, consequence or innocent bystander? *International Journal of Cancer*. <http://doi.org/10.1002/ijc.21712>
- Kerbel, R. S. (2008). Tumor angiogenesis. *The New England Journal of Medicine*, 358(19), 2039–49. <http://doi.org/10.1056/NEJMra0706596>
- Knapp, D. W., & Waters, D. J. (1997). Naturally occurring cancer in pet dogs: Important models for developing improved cancer therapy for humans. *Molecular Medicine Today*. [http://doi.org/10.1016/S1357-4310\(96\)20031-0](http://doi.org/10.1016/S1357-4310(96)20031-0)
- Lammers, T., Hennink, W. E., & Storm, G. (2008). Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. *British Journal of Cancer*, 99(3), 392–397. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604483>

- Lammers, T., Kiessling, F., Hennink, W. E., & Storm, G. (2012). Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *Journal of Controlled Release*. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.063>
- Life Technologies. (2014). TRIZOL[®] Reagent. *Product Data Sheet*, (15596026), 18–21. <http://doi.org/10.1101/pdb.caut2701>
- MacEwen, E. G. (1990). Spontaneous tumors in dogs and cats: Models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer and Metastasis Reviews*. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0025164639&partnerID=tZOtx3y1>
- Martin, S., & Mulrooney, T. (2004). Biology of Lung Cancer. In N. G. Houlihan & L. B. Tyson (Eds.), *Site-specific cancer series: Lung Cancer*. (2nd ed., pp. 5–20).
- Masters, J. R. (2002). HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer*, 2(4), 315–319. <http://doi.org/10.1038/nrc775>
- Merkle, C. J., & Loescher, L. J. (2005). Biology of cancer. In C. Yarbro & M. Goodman (Eds.), *Cancer nursing: Principles and practice*. (6th ed., pp. 3–25). Sudbury, MA: Jones & Bartlett.
- Moghimi, S. M., & Farhangrazi, Z. S. (2014). Just so stories: The random acts of anti-cancer nanomedicine performance. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10(8), 1661–1666. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2014.04.011>
- Moreno-Bueno, G., Portillo, F., & Cano, a. (2008). Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene*, 27, 6958–6969. <http://doi.org/10.1038/onc.2008.346>
- Nacher, P. J. (2009). Magnetic resonance imaging: From spin physics to medical diagnosis. *The Spin: Poincare Seminar 2007*, 55, 159–193. <http://doi.org/10.1007/978-3-7643-8799-0-6>
- NCCN. (2013). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines[®]) Breast Cancer.
- Necela, B. M., Crozier, J. A., Andorfer, C. A., Lewis-Tuffin, L., Kachergus, J. M., Geiger, X. J., ... Perez, E. A. (2015). Folate receptor- α (FOLR1)

- expression and function in triple negative tumors. *PLoS ONE*, 10(3).
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0122209>
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science (New York, N.Y.)*, 311(February 2006), 622–627.
<http://doi.org/10.1126/science.1114397>
- Oncolink. (n.d.). Chemotherapy: the basics.
- Parker, N., Turk, M. J., Westrick, E., Lewis, J. D., Low, P. S., & Leamon, C. P. (2005). Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Analytical Biochemistry*, 338(2), 284–293. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.026>
- Pelengaris, S., & Khan, M. (2006). DNA replication and the cell cycle. In S. Pelengaris & M. Khan (Eds.), *The molecular biology of cancer* (pp. 88–119). Malden, MA.: Blackwell Publishing Ltd.
- Ross, A. (2014). American Brain Tumor Association. *American Brain Tumor Association*, 3–4. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(00\)00269-2](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(00)00269-2)
- Ross, J. F., Chaudhuri, P. K., & Ratnam, M. (1994). Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications. *Cancer*, 73(9), 2432–2443. [http://doi.org/10.1002/1097-0142\(19940501\)73:9<2432::AID-CNCR2820730929>3.0.CO;2-S](http://doi.org/10.1002/1097-0142(19940501)73:9<2432::AID-CNCR2820730929>3.0.CO;2-S)
- Roth, J. A. (2008). Targeted Genetic Therapy for Lung Cancer. In *Lung Cancer* (pp. 411–420). Blackwell Publishing Ltd.
<http://doi.org/10.1002/9780470696330.ch26>
- Sagnella, S. M., McCarroll, J. A., & Kavallaris, M. (2014). Drug delivery: Beyond active tumour targeting. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10(6), 1131–1137.
<http://doi.org/10.1016/j.nano.2014.04.012>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory press. New York.
<http://doi.org/574.873224> 1/1989
- Sharpless, N. E., & Depinho, R. A. (2006). The mighty mouse: genetically

- engineered mouse models in cancer drug development. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5(9), 741–754. <http://doi.org/10.1038/nrd2110>
- Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R. R., & Sastry, M. (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir*. <http://doi.org/10.1021/la0513712>
- Siu, M. K., Kong, D. S., Chan, H. Y., Wong, E. S., Ip, P. P., Jiang, L., ... Cheung, A. N. (2012). Paradoxical impact of two folate receptors, FRalpha and RFC, in ovarian cancer: effect on cell proliferation, invasion and clinical outcome. *PLoS One*, 7(11), e47201. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0047201>
- Skeel, R. T., & Khleif, S. N. (2011). *Handbook of Cancer Chemotherapy*. Lippincott Williams & Wilkins. Retrieved from https://books.google.com.mx/books?id=6Nz_87OLrtcC
- Spugnini, E. P., Porrello, A., Citro, G., & Baldi, A. (2005). COX-2 overexpression in canine tumors: Potential therapeutic targets in oncology. *Histology and Histopathology*.
- Stern, J. M., Stanfield, J., Lotan, Y., Park, S., Hsieh, J.-T., & Cadeddu, J. a. (2007). Efficacy of Laser-Activated Gold Nanoshells in Ablating Prostate Cancer Cells in Vitro. *Journal of Endourology*, 21(8), 939–943. <http://doi.org/10.1089/end.2007.0437>
- Toffoli, G., Cernigoi, C., Russo, A., Gallo, A., Bagnoli, M., & Boiocchi, M. (1997). Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers. *International Journal of Cancer*, 74(2), 193–198. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970422\)74:2<193::AID-IJC10>3.0.CO;2-F](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970422)74:2<193::AID-IJC10>3.0.CO;2-F)
- Travis, W. D., Brambilla, E., Müller-hermelink, H. K., & Harris, C. C. (2004). World Health Organization Classification of Tumours WHO Classification. Pathology & Genetics Tumours of the Lung , Pleura , Thymus and Heart. *IARC/Press*, 9–122.
- Tyler, P., & Butt, S. (2012). Basic principles of MRI. *Radionuclide and Hybrid*

- Bone Imaging*, 9783642024, 149–171. http://doi.org/10.1007/978-3-642-02400-9_7
- UK, C. R. (2013). Cancer Incidence for Common Cancers. <http://doi.org/10.1017/S0020860400079146>
- Universidad Nacional de Quilmes. (2013). Biología Celular y Molecular . Guía de TP Nro . 2 Mantenimiento de líneas celulares ., 2, 10. Retrieved from <http://plmenna.blog.unq.edu.ar/wp-content/uploads/sites/8/2013/03/TP-2-Mantenimiento-de-líneas-celulares.pdf>
- Valenzuela, C. S. A.-R. N. G. (2013). Nanomedicina y Nanoterapias para Deteccion, cura y tratamiento del cancer. *Nanotecnologia*, 3–4–5. Retrieved from <http://www.nanoporundia.org/web/wp-content/uploads/2014/04/nanomedicina-y-nanoterapias-para-deteccion-cura-y-tratamiento-del-cancer.pdf>
- Verheij, M. (2008). Clinical biomarkers and imaging for radiotherapy-induced cell death. *Cancer and Metastasis Reviews*. <http://doi.org/10.1007/s10555-008-9131-1>
- Walker, J. (2006). *Lung Cancer: Current and Emerging Trends in Detection and Treatment*. Rosen Publishing Group. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=0VfKAKwDIW4C>
- Wang, C., Tang, Z., Zhao, Y., Yao, R., Li, L., & Sun, W. (2014). Three-dimensional in vitro cancer models: a short review. *Biofabrication*, 6(2), 022001. <http://doi.org/10.1088/1758-5082/6/2/022001>
- Weitman, S. D., Lark, R. H., Coney, L. R., Fort, D. W., Frasca, V., Zurawski, V. R., & Kamen, B. A. (1992). Distribution of the Folate Receptor GP38 in Normal and Malignant Cell Lines and MA104, 3396–3401.
- World Health Organization, & Who, W. H. O. (2012). *World Health Statistics 2012*. *World Health Statistics 2012* (Vol. 27). <http://doi.org/10.2307/3348165>
- Zetter, B. R. (1998). Angiogenesis and tumor metastasis. *Annual Review of Medicine*, 49(1), 407–424. <http://doi.org/10.1146/annurev.med.49.1.407>

ANEXOS

Apéndice A SOLUCIONES

Medio de cultivo RPMI 1640

para células NCI-H69 (Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas)

Para 1 L de medio

Medio RPMI en polvo	10.4	g
HEPES	2.383	g
NaHCO ₃	2.0	g

Añadir:

Glucosa	4.5	g/L
Piruvato	1	mM
Glutamina	2	mM

PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X

Se pesan 8.06 g de NaCl, 0.22 g KCl, 1.15 g de Na₂HPO₄, el pH se ajusta a 7.4, se afora a un volumen de 1 L con agua Elix esterilizada y se almacena a temperatura ambiente.

TBE 10X

Se pesan:

Ácido Bórico	55 g	
Tris-base	108g	
Na ₂ EDTA	7.44 g o	40 mL (Solución Na ₂ EDTA 0.5M)

Solución Na₂EDTA 0.5M

Se pesan 18.61 g Na₂EDTA y se lleva a un volumen final de 100 mL con agua Elix esterilizada.

PARAFORMALDEHÍDO (PFA) FIJATIVO AL 4%

1. Poner 450 mL de H₂O en un vaso de precipitado de vidrio, calentar a 60°C utilizando una plancha con agitación.

NOTA: No calentar arriba de 70°C.

2. Añadir 20 g de paraformaldehído en polvo al agua caliente.
3. Añadir 5 gotas de NaOH 2N (1 gota/100mL). Con esto la solución se aclarará.
4. Remover del calor y añadir 50 mL de PBS 10X.
5. Ajustar el pH a 7.2 (añadiendo HCl)
6. Llevar a un volumen final de 500 mL.
7. Filtrar y poner en hielo, hacer alícuotas de 25 mL y cubrirlos de la luz.
8. Congelar a -20 °C.

Apéndice B DETALLE DE PROCEDIMIENTOS

CAMBIO DE MEDIO DEL CULTIVO CELULAR NCI-H69

En el caso de las células H69 el crecimiento es en suspensión, el procedimiento utilizado es el siguiente:

1. Se pasan las células de la caja P-100 a un tubo cónico de 15ml y se centrifuga a 600 rpm por 10 min.
2. Una vez que las células estén empastilladas se decanta el sobrenadante.
3. Resuspender en 2ml de medio RPMI 1640 con antibióticos a 1X y SBF10% (aforado en 100ml).
4. Pipetear las veces necesarias para resuspender y disgregar los cúmulos de células.
5. Se agregan los 8ml restantes de medio RMPI 1640 y se resuspende nuevamente.
6. Se vacía a una caja P-100

PREPARACIÓN CELULAR PARA LA INOCULACIÓN SUBCUTÁNEA DE RATONES

1. Depositar las células NCI-H69 con el medio en tubos Falcón de 50 mL
2. Centrifugar las células a 600 rpm por 10 minutos
3. Retirar el sobrenadante con una pipeta Pasteur
4. Añadir PBS (volumen igual al retirado en el paso anterior) y lavar
5. Centrifugar a 600 rpm/10 minutos
6. Retirar el sobrenadante
7. En caso de ser necesario resuspender los grumos de células NCI-H69:
 - a. Añadir 3 mL de tripsina
 - b. Resuspender la pastilla
 - c. Dejar por 3 minutos
 - d. Añadir medio completo con suero (al 10%) para inactivar la tripsina

- e. Centrifugar 600 rpm/10 mins
 - f. Retirar el sobrenadante
 - g. Enjuagar con PBS
 - h. Centrifugar 600/5mins
8. Agregar 5 mL de PBS y resuspender pipeteando suavemente.
 9. Tomar 10 uL de la suspensión celular anterior y añadir 90 uL de PBS (Dilución 1:10)
 10. Mezclar 20 uL de lo anterior con 20 uL de azul de tripano
 11. Realizar conteo en la cámara de Neubauer y calcular la concentración celular.
 12. Agregar PBS dependiendo del número de inoculos a realizar (100 uL/inoculo) y depositar el volumen para conseguir la concentración celular deseada para cada inoculo.

INOCULACIÓN SUBCUTÁNEA DE RATONES

1. Pasar el inoculo depositado en los Eppendorf anteriormente mencionados a las jeringas de insulina con agujas 31G y 8mm de longitud.
2. Sujetar al ratón.
3. Limpiar la zona donde se realizará la inyección con torundas de alcohol.
4. Con la otra mano sujetar la jeringa con el bisel hacia arriba.
5. Introducir 4mm de la aguja en el dorso del ratón en un ángulo de 45° e ir introduciendo poco a poco el inoculo.
6. Limpiar nuevamente el área inyectada con torunda de alcohol.

DISECCIÓN DEL TEJIDO TUMORAL Y PULMÓN DE RATÓN.

1. Realizar una dislocación cervical para dejar sin vida al ratón.
2. Realizar una perfusión pulmonar. Haciendo uso de una jeringa de 5 mL con paraformaldehído, realizar un piquete en la traquea y depositar la solución para inflar los pulmones. Abrir al ratón y extraer los pulmones.

3. Posteriormente extraer el tejido tumoral.
4. Depositar los tejidos en tubos con paraformaldehído para ser utilizados para inmunohistoquímica o en su defecto depositarlos en tubos Eppendorf con trizol para extracción de RNA (de ser así no debe realizarse la perfusión pulmonar).

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE RNA

1. Añadir 1 mL de trizol
2. Depositar enl volumen en un Eppendorf de 1.5 mL
3. Añadir cloroformo (200 uL/mL trizol) y agitar vigorosamente
4. Dejar a 4 °C/10 mins. Agitar cada 5 mins.
5. Centrifugar a 13000 rpm /10 mins/4°C
6. Trsanferir fase acuosa a un nuevo tubo
7. Añadir 80% mL de isopropanol del volumen anterior obtenido.
8. Incubar 10 mins/Temp. Ambiente.
9. Centrifugar a 13000 rpm/10 mins/4°C
10. Remover sobrenadante y lavar la pastilla suavemente (sin disolverla) con 0.5-1 mL de EtOH al 70%
11. Agitar suavemente
12. Centrifugar a 900rpm/10 mins/4°C
13. Decantar el EtOH
14. Dejar secar a temperatura ambiente/20-30 mins
15. Disolver en 20 uL de agua inyectable
16. Incubar 10 mins/60°C
17. Transferir al hielo
18. Dar un spin
19. Almacenar a -20°C

**Reaccion de RT-PCR con SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq
(Invitrogen)**

1. Programar el termociclador de tal forma que la síntesis de cDNA se realice inmediatamente mediante la amplificación de PCR. Nota: una síntesis eficiente de cDNA puede adquirirse con una incubación de 15-30 minutos a 45-55 °C. Se recomienda usar una incubación inicial de 30 minutos a 55 °C. la temperatura optima para la transcripción inversa dependerá de los oligonucleótidos y la secuencia blanco utilizada.

2. Programa de temperatura:

- Síntesis de cDNA y pre-desnaturalización : 1 ciclo de 45-55 °C por 15-30 minutos; después a 94 °C por 2 minutos.
- Amplificación por PCR: 35-40 ciclos de
 - i. Desnaturalización, 94 °C por 15 s
 - ii. Hibridación, 55-60 °C por 30 s
 - iii. Extensión, 68-72 °C por 1min/kb
- Extensión final: 1 ciclo de 72 °C por 5-10 minutos.

3. Añadir lo siguiente a los tubos de microcentrífuga en hielo:

Reactivo	Volumen	Concentración final
Mezcla de reacción 2X	12.5 µL	1X
Molde RNA	2 µL	10pg-1µg
Mezcla de oligos	2 µL	0.2µM c/u
RT/Platinum Taq	0.5 µL	----
dH ₂ O	hasta 25 µl	----

4. Mezclar cuidadosamente y asegurarse de que todos los componentes se encuentren en el fondo del tubo.

5. Analizar el producto de amplificación.

ELECTROFORESIS

1. Para preparar un gel de 100 mL al 0.9%
2. Se pesan 0.9 g de agarosa
3. Se añaden a 60 mL de TBE 1X
4. Calienta la solución para disolver completamente la agarosa
5. Añadir 3 uL de RedGel a la solución y posteriormente depositarlo en el molde de la cámara a utilizar.
6. Preparar las muestras obtenidas en la RT-PCR (2uL) y añadiendo 2uL de buffer de carga.
7. Llenar la cámara con TBE 1X
8. Depositar las muestras en los pocillos del gel.
9. Correr el gel a 85V por una hora.

INCLUSIÓN DE TEJIDOS EN PARAFINA

1. Realizar cortes de los tejidos para ser depositados en los Histosette® I para ser deshidratados e incluidos con las siguientes soluciones:
2. Solución de alcohol al 50%/1 hora
60%/1 hora
70%/1 hora
80%/1 hora
90%/1 hora
100%/1 hora
100%/1 hora
3. Solución de xilol-alcohol 50%-50%/1 hora
4. Xilol 100%/1 hora
5. Para la inclusión en parafina:
Parafina 1/1 hora
Parafina 2/1 hora
Parafina 3/1 hora

6. NOTA: Poner previamente (1 día antes) tres contenedores de parafina a calentar en el horno a (65°C) para mantenerla en estado líquido, mantener siempre la temperatura del horno.
7. Al retirar los histosettes de la parafina 3 poner el tejido en las charolas de metal para dejarlos solidificar sobre hielo.

CORTES DE TEJIDO EN MICROTOMO Leyca Biosystems®

Los tejidos incluidos en parafina deben ser colocados en el equipo y realizar cortes de aproximadamente 4-5 micras para ser colocados en laminillas electrocargadas para su posterior uso en la realización de inmunohistoquímica.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Teniendo las muestras de tejido en las laminillas electrocargadas se procede a lo siguiente:

1. Colocar las laminillas en:
 - 65-70°C para ser desparafinadas.
 - Xilol al 100%/15 minutos
 - Etanol Absoluto/5 minutos
 - Etanol Absoluto nuevo/5 minutos
 - Dejar secar.
 - PBS 1X/5 minutos
2. Se realiza un tratamiento con citratos poniendo las laminillas en el Electric Cooker por 10 minutos.
3. Dejar reposar las laminillas con RT por 30 minutos en agitación.
4. Poner las laminillas con peroxidasa po 1 hora.
5. Mantener las laminillas con PBS 1X/5 mins en agitación.
6. Posteriormente dejar 1 hora con la solución de bloqueo.

7. Dejar toda la noche con el anticuerpo primario a 4°C.
8. Enjuagar las laminillas con PBS 1X/5 minutos.
9. Añadir el anticuerpo secundario/1 hora
10. Enjuagar con PBS 1X/5 minutos
11. Preparar el substrato cromogeno (DAB)
12. 10uL en 500 uL Buffer
13. Aplicar DAB de 3 a 50 minutos.
14. Enjuagar con PBS 1X/5 minutos.
15. Añadir hematoxilina/15 segundos.
16. Enjuagar con agua.
17. Enjuagar con PBS 1X/30 segundos.
18. Realizar dos lavados con agua destilada.
19. Dejar secar.
20. Premontar las laminillas con Permount y dejar secar.
21. Proceder a la toma de fotografías.