



# EFFECTO DEL PACLITAXEL EN LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE MMP-2 Y MMP-9 EN CÉLULAS DE CÁNCER PULMONAR EN CONDICIONES DE HIPOXIA.

---

Samantha González Galván

Matrícula: 2183069358

Asesor interno: Dra. Julia Pérez Ramos

Asesor externo: Dra. Georgina González-Ávila

*<sup>1</sup>Laboratorio Oncología Biomédica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", Calzada de Tlalpan 4502, Col. Sección XVI, Tlalpan, 14080 Ciudad de México, CP, México*

*<sup>2</sup>Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960 Ciudad de México, CDMX*

*Fecha: 31 de Marzo de 2023*

## ABSTRACT

There is a correlation between the overexpression and the enzymatic activity of matrix metalloproteinases (MMPs) with an increase in the metastatic capacity of cancer cells. The aim of this work was to determine the effect of paclitaxel on the expression of MMP-2 and MMP-9 in lung cancer cells under normoxia and hypoxia conditions.

**Methods.** A-549 cells were used in this study, which were cultured under normoxia and hypoxia conditions (1% O<sub>2</sub>) for 6 and 48 h. The protein expression of MMP-2 and MMP-9 was analyzed by Western Blot and the enzymatic activity by Zymogram in the culture medium. In order to have a semiquantitative measure of both, the expression and the activity of these MMPs, a densitometric analysis was carried out, expressing the results in densitometric units.

**Results.** MMP-2 expression decreased significantly at 48 hours under hypoxic conditions compared to normoxia ( $p = 0.001$ ). In contrast, the expression of MMP-9 increased significantly at 6 hours under hypoxic conditions compared to normoxia ( $p = 0.001$ ). Regarding the gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9, both increased significantly at 6 hours in hypoxia compared to normoxia ( $p = 0.01$  and  $p = 0.001$ , respectively).

**Conclusions.** MMP-2 had a higher expression under normoxic conditions, and MMP-9 under hypoxia conditions. The greatest gelatinolytic activity of both MMPs was under hypoxic conditions. Significant differences were found in the protein expression of MMP-2 and MMP-9 between the acute (6 h) and chronic (48 h) models in both normoxia and hypoxia. On the other hand, MMP-2 activity did not show significant differences between acute and chronic normoxia and hypoxia, while MMP-9 enzymatic activity did show significant differences between these two models under normoxia and hypoxia conditions.

## RESUMEN

Existe una correlación entre la sobreexpresión y la actividad enzimática de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) con un aumento de la capacidad metastásica

de las células de cáncer. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del paclitaxel en la expresión de MMP-2 y MMP-9 en células de cáncer de pulmón bajo condiciones de normoxia e hipoxia.

**Métodos.** Se utilizaron células A-549 las cuales se cultivaron en condiciones de normoxia e hipoxia (1% de O<sub>2</sub>) por 6 y 48 h. La expresión proteica de MMP-2 y MMP-9 se analizó por Western Blot y la actividad enzimática por Zimograma en el medio de cultivo. Para tener una medida semicuantitativa tanto de la expresión como de la actividad de estas MMPs se hizo un análisis densitométrico expresándose los resultados en unidades densitométricas.

**Resultados.** La expresión de MMP-2 disminuyó de forma significativa a las 48 horas en condiciones de hipoxia con respecto a normoxia ( $p = 0.001$ ). En contraparte, la expresión de MMP-9 aumentó a las 6 horas de manera significativa en condiciones de hipoxia en comparación con normoxia ( $p = 0.001$ ). En cuanto a la actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9, ambas aumentaron de manera significativa al tiempo de 6 horas en hipoxia con respecto a normoxia ( $p = 0.01$  y  $p = 0.001$ , respectivamente).

**Conclusiones.** MMP-2 tuvo una mayor expresión en condiciones de normoxia, y MMP-9 bajo condiciones de hipoxia. La mayor actividad gelatinolítica de ambas MMPs fue bajo condiciones de hipoxia. Se encontraron diferencias significativas en la expresión proteica de MMP-2 y MMP-9 entre el modelo agudo (6 h) y crónico (48 h) tanto en normoxia como hipoxia. Por otro lado, la actividad de MMP-2 no mostró diferencias significativas entre normoxia e hipoxia aguda y crónica mientras que, en la actividad enzimática de MMP-9 si se observaron diferencias significativas entre estos dos modelos bajo condiciones de normoxia e hipoxia.

## 1. Introducción

El cáncer de pulmón es el segundo más frecuente afectando a ambos sexos en el mundo; en los hombres, el cáncer de próstata es el más común, mientras que en las mujeres es el cáncer de mama (American Cancer Society, 2019).

En México, en un lapso de 30 años se identificó un incremento de la mortalidad por esta enfermedad (Rojas-Martínez *et al.*, 2020). De acuerdo con el GLOBOCAN en el año 2020, ocupaba la posición 7 de los tipos de cáncer con mayor presencia en México, en donde se reportaron 7588 casos nuevos, y una mortalidad del 7.9% dejándolo en la 4° posición por debajo del cáncer de hígado. Asimismo, la incidencia de esta enfermedad fue del 5% para hombres y en el caso de las mujeres no se reportó una incidencia significativa ya que hay una incidencia mayor en otros tipos de cáncer como el de mama en primer lugar, cervix, tiroides, etc (GLOBOCAN, 2020).

El cáncer de pulmón (CP) es un tipo de cáncer que comienza en los pulmones cuando las células del cuerpo se replican sin control. Se calcula que alrededor del 90% de los pacientes con cáncer mueren de metástasis (Dillekås *et al.*, 2019). Para desarrollar metástasis, las células neoplásicas deben desarrollar ciertas características para poder pasar por el proceso metastásico. Recientemente se ha visto una correlación entre la sobreexpresión y la actividad enzimática de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) con un aumento del CP, esto supone el uso de las MMPs como probables marcadores de esta enfermedad (González-Ávila *et al.*, 2019).

Debido a la incidencia y mortalidad del CP se considera un problema de salud grave. Esto se ve repercutido en los altos costos económicos, tanto para instituciones del sector salud, instituciones privadas y pacientes que requieren de la compra de los medicamentos para poder llevar a cabo un tratamiento oportuno (Pérez, Murillo, Pinzón, y Hernández, 2007). Sin embargo, estos medicamentos son de un alto costo variando desde los \$2,120 (paclitaxel) hasta los \$116,376.45 (ceritinib).

Es por esto que el objetivo de este artículo es determinar si el paclitaxel tiene efecto en la actividad y expresión de las MMP-2 y MMP-9 en células de cáncer pulmonar.

## **2. Marco teórico**

### **2.1. Cáncer de pulmón**

El cáncer de pulmón o carcinoma broncogénico es una enfermedad en la cual se desarrollan tumores que se originan en el parénquima pulmonar o dentro de los bronquios (Siddiqui, Vaqar y Siddiqui, 2022). La fisiopatología del cáncer de pulmón es muy compleja y no se conoce por completo, pero se ha reportado que alrededor del 85% de los casos de cáncer de pulmón están relacionados con tabaquismo, lo que conduce a una acumulación de alteraciones genéticas en oncogenes y genes supresores de tumores causando cáncer (Park *et al.*, 2017). Al mismo tiempo se han reportado otros factores en aquellas personas que son no fumadores y que nunca fumaron: vapor de aceite de cocina (Secretan *et al.*, 2009) quema de carbón en interiores, terapia de reemplazo hormonal (Shigematsu *et al.*, 2005), exposición a metales pesados (Couraud *et al.*, 2012), factores infecciosos y contaminación del aire, así como el humo de leña (Leng *et al.*, 2022) lo que causa displasia del epitelio

pulmonar. Si la exposición persiste conduce a mutaciones genéticas que afecta la síntesis de proteínas, a su vez, interrumpe el ciclo celular y promueve la carcinogénesis (Cagle, Allen, y Olsen, 2013).

Las mutaciones genéticas más comunes responsables del desarrollo del cáncer de pulmón son *MYC*, *BCL2* y *p53* para el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC). El SCLC normalmente inicia en los bronquios o en las vías respiratorias y luego se ramifican en estructuras progresivamente más pequeñas. Después de afectar los bronquios, el SCLC crece rápidamente y se disemina a otras partes del cuerpo, incluidos los ganglios linfáticos. Este tipo de cáncer de pulmón representa menos del 20 % de los cánceres de pulmón y generalmente es causado por el tabaquismo. SCLC en sí se divide en otras dos categorías: carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células pequeñas combinado. El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) se desarrolla lentamente y causa pocos o ningún síntoma hasta que avanza. Hay tres tipos principales de NSCLC: adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas y carcinoma indiferenciado de células grandes (Ciupka, 2020). El adenocarcinoma es la forma más común de cáncer de pulmón y representa el 30 % de todos los casos en general y alrededor del 40 % de todos los casos de cáncer de pulmón de células no pequeñas. En NSCLC, se encuentra en la región exterior del pulmón, en las glándulas que secretan moco, normalmente se desarrolla por mutaciones en los genes *EGFR*, *KRAS* y *p16* (Lindeman *et al.*, 2018).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2021 los tipos de cáncer de pulmón se clasifican como:

- Lesiones glandulares precursoras
- adenocarcinomas
- Carcinomas adenoescamosos
- Lesiones precursoras escamosas
- Carcinomas de células escamosas
- Carcinomas de células grandes
- Carcinomas sarcomatoides
- Neoplasias neuroendocrinas de pulmón
- Tumores del tipo de las glándulas salivales
- Tumores neuroendocrinos
- Carcinomas neuroendocrinos
- Y otros tumores epiteliales

Sin embargo, a partir de 1970, se ha visto un incremento en la frecuencia de muertes por cáncer pulmonar en las mujeres y en pacientes jóvenes y un cambio en el tipo histológico; actualmente el adenocarcinoma es más común que el carcinoma epidermoide (Barrionuevo y Dueñas, 2019).

La patología del adenocarcinoma consiste en la formación de glándulas neoplásicas, la expresión de marcadores de neumocitos (factor de transcripción tiroideo 1 [TTF-1] con o sin expresión de napsina, o mucina intracitoplasmática. Se clasifica además según la extensión y la arquitectura de la formación de glándulas neoplásicas como mucinosas o no mucinoso. Los subtipos acinar, papilar, micropapilar, lepidico y sólido son no mucinosos. La identificación anatomopatológica de estos subtipos es importante para el pronóstico. Los patrones

sólidos, micropapilar y cribiforme (un subtipo de adenocarcinoma acinar no mucinoso) tienen una importancia pronóstica adversa (Kadota *et al.*, 2014)

El adenocarcinoma mínimamente invasivo (MIA) es un pequeño adenocarcinoma solitario menor o igual a 3 cm con invasión mínima (menos de 5 mm) y un patrón de crecimiento predominantemente lepidico. Si la invasión es mayor de 5 mm, se define como adenocarcinoma de predominio lepidico. El adenocarcinoma mucinoso invasivo, comprende lesiones mucinosas que no pueden clasificarse como MIA. Si hay más del 10% de patrones de crecimiento mucinoso y no mucinoso, la lesión debe clasificarse como adenocarcinoma mixto (Siddiqui, Vaqar y Siddiqui, 2022).

## **2.2. Metástasis generalidades**

El proceso por el cual las células cancerosas se diseminan a otras partes del cuerpo se llama metástasis (National Cancer Institute, 2020). El incremento en la mortalidad debido al cáncer de pulmón se ha atribuido a la falta de un diagnóstico temprano, ya que normalmente el paciente recurre al servicio médico cuando existe una invasión local o metástasis (González-Ávila *et al.*, 2009). En un estudio llevado a cabo por Dillekås, Rogers y Oddbjørn (2019), encontraron que el 66.7% de las muertes por cáncer en tumores sólidos fueron causadas por metástasis, y en la última década se ha incrementado dramáticamente.

La forma en la que las células cancerosas se diseminan por el cuerpo consiste en una serie de pasos (National Cancer Institute, 2020; González-Ávila *et al.*, 2009):

1. Células neoplásicas se disocian del tumor primario e invaden el tejido adyacente, mediante la modificación de la matriz extracelular (ME) hasta



entrar en la circulación a través de un lecho vascular o linfático, o induciendo la neovascularización del tumor creciente.

- 1.1. Se ha identificado a las MMPs como las enzimas que modifican la ME. Estas enzimas son secretadas por las células neoplásicas y por las células del estroma en la zona de invasión del tumor.
2. Una vez en la circulación, estas células tienen que sobrevivir hasta extravasarse en un nuevo órgano.
3. Movimiento a través de las paredes de los ganglios linfáticos o vasos sanguíneos cercanos.
4. Unión o adhesión a pequeños vasos sanguíneos en un lugar distante, invadir las paredes de los vasos sanguíneos y moverse hacia el tejido circundante.
5. Crecimiento en este tejido hasta que se forme un pequeño tumor.
6. Desarrollar nuevos vasos sanguíneos, lo que crea un suministro de sangre que permite que el tumor metastásico continúe creciendo.

### **2.3. Microambiente tumoral**

Se cree que el microambiente tumoral no es solo un ambiente espectador, sino más bien un sitio activo promotor de la progresión del cáncer (Truffi *et al.*, 2020). En etapas tempranas del crecimiento tumoral, se desarrolla una relación entre las células cancerígenas y componentes del microambiente tumoral que permite la supervivencia de las células cancerosas, invasión local y diseminación metastásica (Anderson y Simon, 2020).

Las células tumorales cuando entran en el sitio metastásico se enfrentan a un nuevo microambiente tisular en el que deben desarrollar diversas estrategias para

subsistir. Por lo que, al crear una interacción entre las células neoplásicas y el microambiente transforman este nicho en su propio microambiente tumoral (TME) (Kim y Tanner, 2015). Moléculas, como factores de crecimiento, quimiocinas, citocinas, proteínas de la matriz extracelular (ECM) estructural y no estructural y componentes de la membrana basal (MB), así como diferentes tipos de células forman parte del TME (Wang, Zhao, Zhang *et al.*, 2017) (*fig.1*).

Al igual que, los cambios en las circunstancias metabólicas de TME, como la disminución de nutrientes y las condiciones hipóxicas y ácidas, impulsan el desarrollo de las células tumorales (Maley, Aktipis y Graham, 2017). Al mismo tiempo, la transición epitelial mesenquimatoso (EMT), la resistencia a la apoptosis, la angiogénesis y la linfangiogénesis son procesos que tienen lugar en el TME durante la progresión del cáncer; también la TME del tumor primario participa en la preparación del nicho premetastásico (Chen *et al.*, 2015).

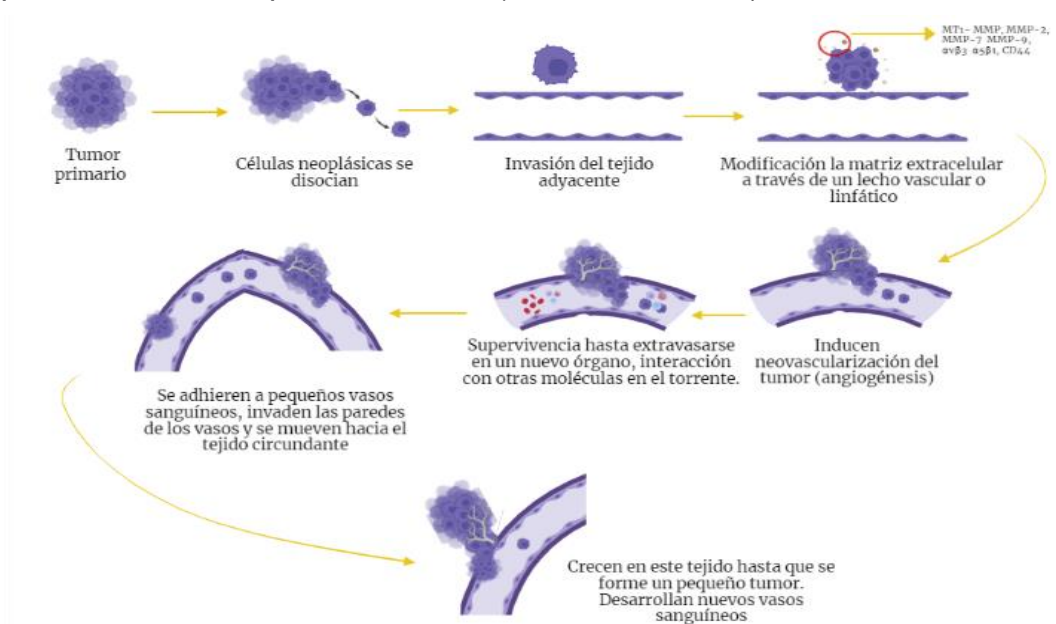


Fig 1. Proceso metastásico. Modificado de González-Ávila *et al.* (2009)

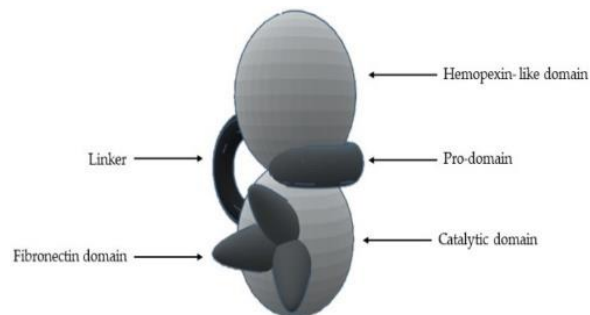
## 2.4. Metaloproteinasas de matriz humana (MMPs).

En 1949 se describieron por primera vez las MMP (Gersh y Catchpole, 1949), como: *“enzimas despolimerizantes que facilitan el crecimiento tumoral al producir estroma de tejido conectivo, incluidos los vasos sanguíneos pequeños que son más fluidos”*. Sin embargo, fue hasta 1985 cuando el área se desarrolló de manera más significativa (Verma y Hansch, 2007).

Las MMPs son un grupo de endopeptidasas que requieren iones calcio-zinc para su actividad enzimática; son capaces de romper todas las moléculas de la membrana basal (BM) y la matriz extracelular (ECM) (Murphy y Nagase, 2008). Tienen diferentes sustratos, pero comparten características estructurales similares. El sitio activo depende del zinc y está altamente conservado, con tres residuos de histidina unidos al zinc catalítico. La principal función biológica de las MMP es la degradación de proteínas y glicoproteínas de la MEC, receptores de membrana, citocinas y factores de crecimiento. Las MMPs participan en muchos procesos biológicos, como la reparación y remodelación de tejidos, la diferenciación celular, la embriogénesis, morfogénesis, movilidad celular, angiogénesis, proliferación celular y migración, cicatrización de heridas, apoptosis, y los principales eventos reproductivos como la ovulación y la proliferación endometrial (Laronha y Caldeira, 2020). Hasta la fecha, se han identificado 28 MMP en vertebrados y 24 en humanos, incluidas dos formas equivalentes de MMP-23 (MMP-23A y MMP-23B) codificadas por 2 genes distintos en el cromosoma 1 (Jackson *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2017; Mittal *et al.*, 2016). Se han denominado en orden secuencial de MMP-1 a MMP-28.

Las características estructurales más comunes son (Laronha y Caldeira, 2020) (fig.2):

1. Un péptido N -terminal de señal con longitud variable.
2. Un prodominio (con alrededor de 80 aa), que mantiene inactiva la MMP y se elimina cuando la enzima se activa proteolíticamente.
3. Un dominio catalítico (con alrededor de 160 aa), con un ion zinc, que consta de cinco láminas  $\beta$ , tres hélices  $\alpha$  y tres iones de calcio.
4. Un enlazador de longitud variable (14–69 aa), que une el dominio catalítico con el dominio similar a la hemopexina: “región bisagra”.
5. Un dominio similar a la hemopexina (con alrededor de 210 aa) que se caracteriza por cuatro hélices  $\beta$ .
6. Un dominio transmembrana adicional con el pequeño dominio C -terminal citoplasmático, solo presente en las MMP-14, -15, -16 y -24.



*Fig.2.* Estructura general de las MMP. Recuperado de Laronha y Caldeira (2020)

A su vez estas moléculas se pueden clasificar en seis subfamilias: colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13 y MMP-18), gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), estromelinas (MMP-3, MMP-10 y MMP-11), matrilisinas (MMP7 y MMP-26), MMP de tipo membrana (MMP-14, MMP-15, MMP16, MMP-17, MMP-24 y MMP- 25) y otras MMP (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-27 y

MMP-28) (Murphy y Nagase, 2008). En el caso de MMP-2 y MMP-9 se conocen como gelatinasas; la MMP-2 se conoce como gelatinasa-A y la MMP-9 es denominada gelatinasa-B. Las gelatinasas son estructuralmente similares a otras proteinasas en la familia de las MMPs pero tienen un dominio de unión a colágena distinto, compuesto por tres repeticiones en tándem de fibronectina tipo II en el extremo N del dominio catalítico que son necesarios para la unión a gelatina (Cui, Hu, y Khalil, 2017). La MMP-2 es secretada predominantemente por las células endoteliales, leucocitos, plaquetas, monocitos, condrocitos, osteoblastos, fibroblastos y queratinocitos, mientras que la MMP-9 es liberada por células epiteliales, fibroblastos, leucocitos polimorfonucleares, granulocitos, neutrófilos, macrófagos, células T, osteoblastos, células dendríticas y queratinocitos (Laronha, y Caldeira, 2020).

Las gelatinasas también son responsables de la activación de otras proteínas que no son de matriz como fibroblastos, receptor 1 del factor de crecimiento (FGFR1), proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina-3 y -5 (IGF-BP-3 y -5), interleucina-1b (IL1 $\beta$ ), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y crecimiento transformante factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Asimismo, se han vinculado con invasión tumoral, metástasis y angiogénesis (Cui, Hu, y Khalil, 2017).

Se ha visto que la actividad gelatinolítica promueve la invasión tumoral y la metástasis; esto reportado en casos de neoplasias malignas de tumores sólidos como células escamosas esofágicas carcinomas (Koyoma *et al.*, 2000); melanoma, cáncer de pulmón (Jung *et al.*, 2016), cáncer colorrectal (Heslin *et al.*, 2001), carcinoma gástrico, cáncer de mama, hepático, tiroides, próstata, ovario (Yao *et al.*, 2017).

## 2.5. Tratamiento en pacientes con cáncer pulmonar

Actualmente existen una serie de tratamientos establecidos para controlar el desarrollo de la enfermedad entre los que destacan (National Cancer Institute, s.f.):

- a) Quimioterapia: es un tipo de tratamiento contra el cáncer que usa medicamentos para matar a las células cancerosas
- b) Terapia hormonal: es un tratamiento que retarda o detiene el crecimiento de los cánceres de mama y de próstata que utilizan hormonas para crecer.
- c) Hipertermia: es un tipo de tratamiento en el que el tejido corporal se calienta hasta 113 °F para ayudar a dañar y eliminar las células cancerosas con poco o ningún daño al tejido normal
- d) Inmunoterapia: es un tipo de tratamiento contra el cáncer que ayuda a su sistema inmunitario a combatir el cáncer.
- e) Terapia fotodinámica: usa un fármaco activado por la luz para matar el cáncer y otras células anormales.
- f) Radioterapia: es un tipo de tratamiento contra el cáncer que usa altas dosis de radiación para destruir las células cancerosas y reducir los tumores.
- g) Trasplante de células madre: son procedimientos que restauran las células madre que se convierten en células sanguíneas en personas a las que se les han destruido las suyas por altas dosis de quimioterapia o radioterapia.

Debido a la existencia de dos tipos de cáncer de pulmón, los cuales son cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas, se clasifican juntas porque, cuando se encuentran localizadas, tienen el potencial de curación con resección quirúrgica. Sin un tratamiento, el carcinoma de pulmón de

células pequeñas tiene una progresión más agresiva que cualquier tipo de tumor pulmonar, con una mediana de supervivencia de solo 2 a 4 meses después del diagnóstico. El carcinoma de células pequeñas tiene una mayor tendencia a diseminarse ampliamente, por lo que es más complicado extirparse quirúrgicamente debido a su tamaño y distribución (Pakunlu *et al.*, 2004).

Aunado a esto, el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), la presenta casi la mitad de los pacientes con enfermedad metastásica, incluso si se diagnostica en etapas tempranas eventualmente desarrollaran enfermedad metastásica. En consecuencia, el tratamiento más adecuado es mediante dosis alta de quimioterapia, a veces en combinación con radioterapia (Earle *et al.*, 2001).

La quimioterapia sistémica a menudo se administra con la esperanza de un control temporal de la enfermedad, una mejor calidad de vida, y un modesto aumento en la supervivencia. Existen diversos fármacos utilizados como quimioterapia, en un estudio encontraron que los pacientes con NSCLC avanzado, los cuales fueron tratados con regímenes de quimioterapia que contenían cisplatino tuvieron un aumento en la mediana supervivencia de alrededor de 6 semanas y una mejora del 10% en 1 año supervivencia en comparación con aquellos manejados con atención de apoyo solamente (Zippin, Lum, y Hankey, 1995). Al igual que el cisplatino, el paclitaxel, es un agente fijador de tubulina, que se usa ampliamente para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). La combinación de paclitaxel y un compuesto de platino es un régimen aprobado para el tratamiento del NSCLC avanzado (Ramalingam y Belani, 2004).

### 3. Hipótesis y Objetivos

El paclitaxel a ciertas concentraciones tiene un efecto citotóxico en las células A-549 por lo que inhibirá la actividad de las MMP-2 y MMP-9.

Es por esto que, el principal objetivo de este trabajo fue determinar si el paclitaxel tiene efecto en la actividad y expresión de las MMP-2 y MMP-9 en células de cáncer pulmonar

#### Objetivos

- Determinar los efectos citotóxicos del paclitaxel en diferentes concentraciones en células A-549.
- Selección de 2 concentraciones que no maten a las células
- Cultivo de células en presencia de paclitaxel en 2 concentraciones utilizando como control células cultivadas sin fármaco en condiciones de normoxia e hipoxia a 6 y 48 horas.
- Determinación de MMP-2 y MMP-9 en medio de cultivo para ver efecto del paclitaxel
- Determinación de la actividad de gelatinolítica de las MMPs
- Análisis de la expresión proteica de MMP-2 y MMP-9 por Western Blot.

### 4. Materiales y métodos

*4.1. Cultivo Celular.* Se utilizaron células de adenocarcinoma pulmonar, las cuales eran células A-549 de la American Type Culture Collection (ATCC), las cuales crecieron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), el cual contiene L-glutamina y bicarbonato de sodio, con 10% de suero fetal bovino (SFB), suplementado con aminoácidos no esenciales y antibióticos, en una atmósfera de



5% de CO<sub>2</sub>. Este medio le provee los nutrientes necesarios a las células para que puedan crecer y llevar a cabo el ciclo celular.

*4.2. Exposición de células en condiciones de hipoxia.* Se utilizaron las células A-549 que previamente se habían cultivado hasta que llegaron al 80% de confluencia. Se les cambió el medio de cultivo por medio sin SFB. Se dejaron en una cámara de hipoxia con O<sub>2</sub> al 1% por 6 h (agudo) o 48 h (crónico), o en condiciones de normoxia (O<sub>2</sub> al 21%). Con estos cultivos se obtuvo el medio para realizar los zimogramas y Western blots.

*4.3. Cuantificación de proteínas.* Se realizó mediante el método de proteína del ácido bicinonínico utilizando el medio de cultivo con el kit comercial Pierce BCA (Pierce Chemical Co, Rockford, Ill, USA). Al finalizar se determinó la concentración de proteínas en un lector de placas a una absorbancia de 540 nm.

*4.4. Electroforesis.* Se prepararon geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 8% y se cargaron 30 µg de muestra, la cual estaba integrada por la muestra de proteína y solución desnaturizante (buffer muestra, que contiene: 2 mL buffer superior, 2mL Glicerol, 0.5 mL SDS al 10%, 0.5 mL Agua dd, mas 5% de 2-mercaptoetanol), en condiciones reductoras (se calentó a 95°C por 10 min). Se corrió a 80 V por alrededor de 3 hrs.

*4.5. Western Blot.* Se llevó a cabo utilizando 30 µg de muestra de proteína por carril en geles de SDS-PAGE al 8% bajo condiciones reductoras. Seguido de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de polifloruro de vinilideno (PVDF) y se bloqueó con leche descremada al 2.5% en 100 Mm de buffer Tris-HCl, 150 mM de NaCl, y Tween 20 al 0.1% (buffer TTBS) a un pH de 7.5. Las membranas

se incubaron por 90 min a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos a una concentración 1:100: anticuerpo monoclonal de ratón anti-MMP-2 (Abcam, Cambridge, MA, USA), anticuerpo monoclonal anti-ratón (Biolegend, San Diego, CA, USA) anti-MMP-9, y anti-beta-tubulina (1:200) (Abcam) como control. Los anticuerpos primarios se detectaron con el kit VECTASTAIN ELITE ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). La intensidad de las bandas se analizó por densitometría usando el sistema digital de documentación para electroforesis de Kodak (Analysis System 120, Kodak, Rochester, NY). Los resultados se expresan como unidades densitométricas (U.D.), las cuáles darán una evaluación semicuantitativa de las proteínas identificadas por Western blot.

*4.6. Zimograma.* Se hizo una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no reductoras al 8% en presencia de SDS, que contenía gelatina de piel de cerdo al 0.1% (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA). Se corrieron 30 µg de proteína a 80 V por 7 h. Se utilizó como control de la actividad enzimática medio de células de sarcoma HT-1080, 5µl. Después de la electroforesis, se lavó con Tritón X-100 al 2.5% e incubó a 37°C por 48 h en buffer TNC, el cual contiene 50 mmol/L, de Tris-HCl, 20 mmol/L de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y 5 mmol/L ZnCl<sub>2</sub> a un pH de 7.4. Luego, se tiñeron los geles con azul de Coomassie G-250 (BioRad, Richmond, California, EE. UU.) al 0,05%. Se evaluó la actividad gelatinolítica mediante bandas de lisis sobre el fondo oscuro del gel, asimismo la intensidad de las bandas se analizó por densitometría.

*4.7. Experimento de toxicidad con paclitaxel.* Se cultivaron células A-549 hasta que alcanzaron un 80% de confluencia, se les retiró el medio y se cambió por medio sin

suero con Paclitaxel (Nimaril, Laboratorio Hetero, CDMX, México) a una concentración de 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M, los ensayos se hicieron en condiciones de normoxia e hipoxia a 6 y 48 horas. Como controles se mantendrán células en presencia de medio sin suero. Posteriormente se les determinaría la concentración de proteína al medio de cultivo.

*4.8. Análisis estadístico.* Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para analizar los datos, y los valores se expresaron como la media del  $\pm$  error estándar (SE) de al menos tres ensayos.

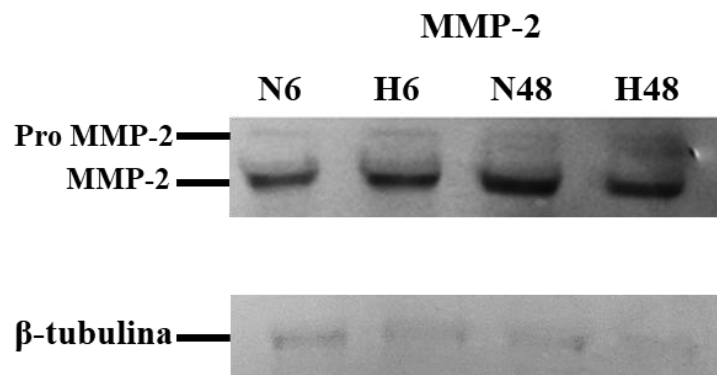
Las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando el Análisis ANOVA de Kruskal-Wallis. El software estadístico SPSS versión 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY) se utilizó para realizar el análisis estadístico. Se consideró una significancia estadística de  $p < 0.05$  para todos los resultados.

## **5. Resultados**

### **5.1. Expresión de MMP-2 en células A-549 en condiciones de normoxia e hipoxia.**

El análisis realizado por Western Blot se llevó a cabo para identificar la presencia de MMP-2 y MMP-9.

La inmunotransferencia de MMP-2 mostró bandas en todas las condiciones estudiadas de aproximadamente 65 kDa que equivalen a la forma activa de la enzima, las bandas más tenues corresponden a la pro-enzima (*Fig.3*).

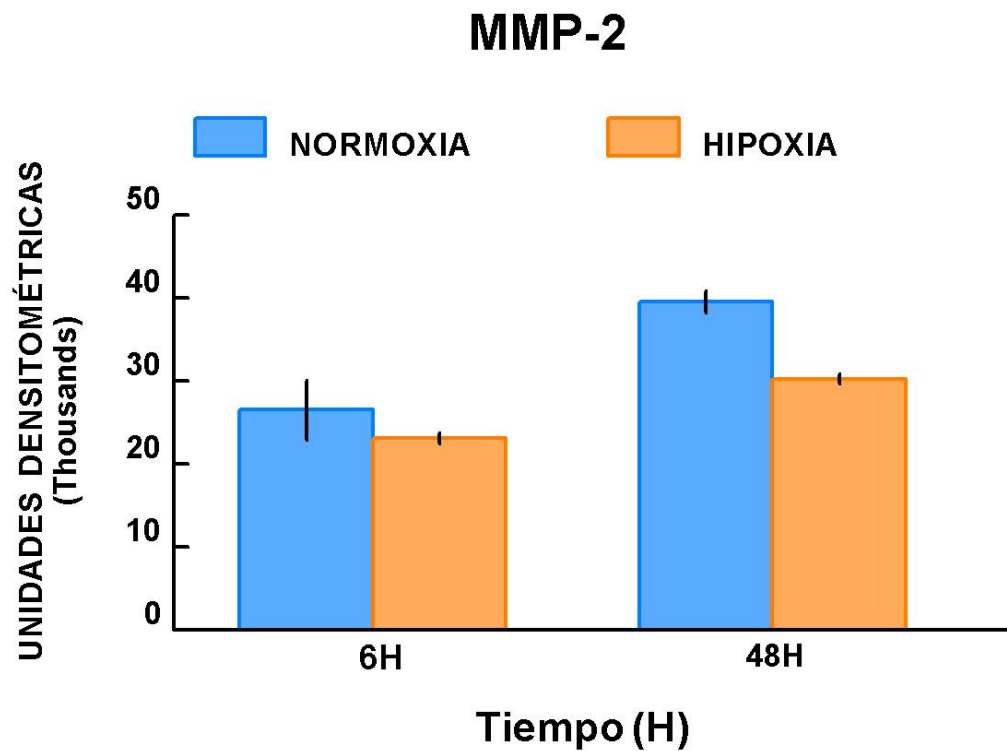


*Figura.3.* Western Blot de la expresión de MMP-2 en células de adenocarcinoma humano A-549.  $\beta$ -tubulina se utilizó como control del Western blot. N6 (normoxia a las 6 horas), H6 (hipoxia a las 6 horas), N48 (normoxia a las 48 horas) y H48 (hipoxia a las 48 horas).

El análisis densitométrico mostró que la expresión más alta de MMP-2 se encontró a las 48 horas en condiciones de normoxia (*Fig.4*).

No existieron diferencias significativas en la expresión a 6 h entre las condiciones de normoxia e hipoxia ( $26,551.8 \pm 3600.7$  y  $23132.9 \pm 667.8$  U.D., respectivamente). Sin embargo, a las 48 horas si hubo diferencias significativas entre normoxia e hipoxia ( $39557.1 \pm 1311.4$  y  $30294.9 \pm 630.6$  U.D., respectivamente;  $p = 0.001$ ) existiendo una reducción en la expresión de esta MMP en hipoxia.

Por otro lado, hubo un aumento estadísticamente significativo en la expresión de MMP-2 a través del tiempo tanto en condiciones de normoxia (6N =  $26551.8 \pm 3600.7$ , 48N =  $39557.4 \pm 1,311.4$  U.D.;  $p = 0.004$ ) como de hipoxia (6H =  $23132.9 \pm 667.8$ , 48H =  $30294.9 \pm 630.6$ , U.D.;  $p=0.001$ ).

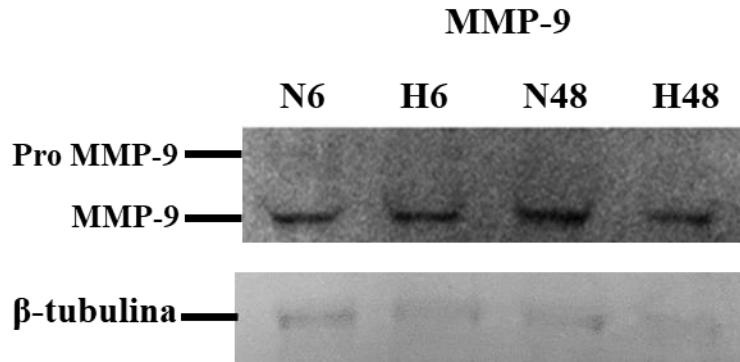


*Figura.4.* Gráfico del análisis densitométrico de la expresión de MMP-2. La gráfica muestra que la mayor expresión de esta metaloproteinasas fue bajo condiciones de normoxia a las 6 y 48 horas.

Mientras que en hipoxia hubo un incremento de las 6 a las 48 h bajo esta condición.

## 5.2. Expresión de MMP-9 en células A-549 en condiciones de normoxia e hipoxia.

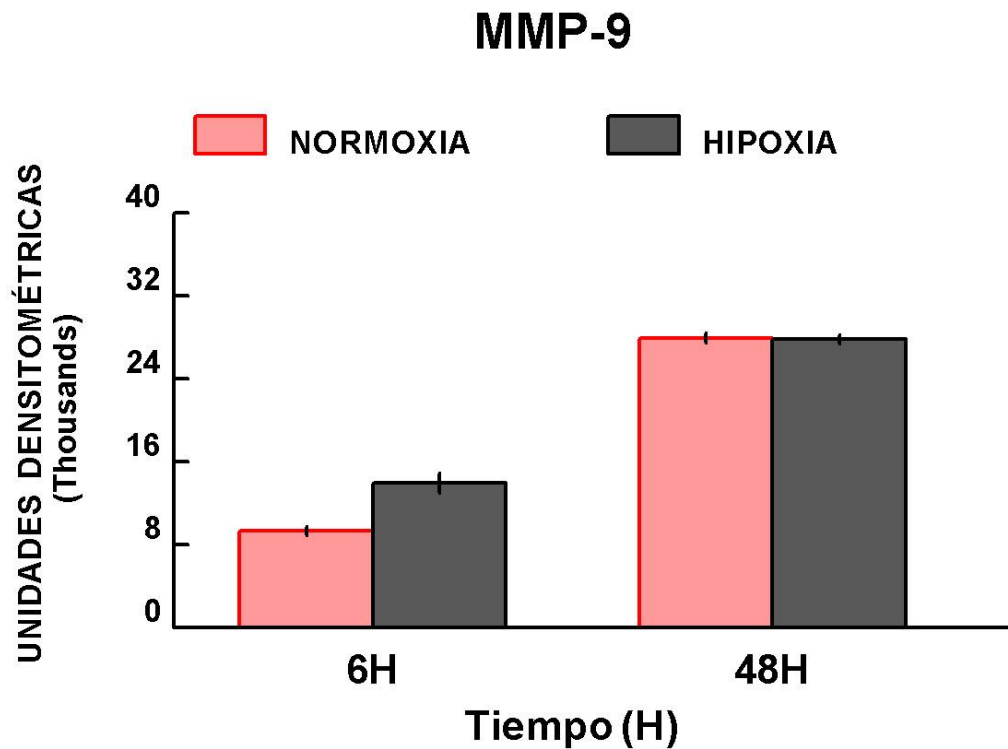
La inmunotransferencia de MMP-9 mostró bandas menos intensas en todas las condiciones estudiadas de aproximadamente 85 kDa que equivalen a la forma activa de la enzima, las bandas más tenues corresponden a la pro-enzima (*Fig.5*).



*Figura.5.* Western Blot de la expresión de MMP-9 en células de adenocarcinoma humano A-549.  $\beta$ -tubulina utilizada como control del Western blot. N6 (normoxia a las 6 horas), H6 (hipoxia a las 6 horas), N48 (normoxia a las 48 horas) y H48 (hipoxia a las 48 horas).

En el análisis densitométrico realizado para MMP-9 mostró que la expresión más alta se obtuvo a las 48 horas en condiciones de normoxia ( $27968.36 \pm 491.1$  U.D.) y hipoxia ( $27,837.26 \pm 413.5$  U.D.), sin diferencias significativas entre ellas y la expresión más baja al tiempo de 6 horas en condiciones de normoxia ( $9340.8 \pm 427.92$  U.D.) (*Fig. 6*).

Por otra parte, al tiempo de 6 horas si hubo diferencias significativas entre normoxia e hipoxia ( $9340.8 \pm 427.92$  y  $13951.21 \pm 955.2$  U.D., respectivamente,  $p=0.001$ ), en donde se observa un aumento en la expresión de MMP-9. Al mismo tiempo, hubo un incremento estadísticamente significativo en la expresión de esta MMP entre los dos tiempos tanto en condiciones de normoxia ( $6N = 9,340.8 \pm 427.92$ ,  $48N = 27968.36 \pm 491.1$  U.D.;  $p= 0.001$ ) como de hipoxia ( $6H = 13,951.21 \pm 955.2$ ,  $48H = 27,837.26 \pm 413.5$  U.D.;  $p=0.001$ ).



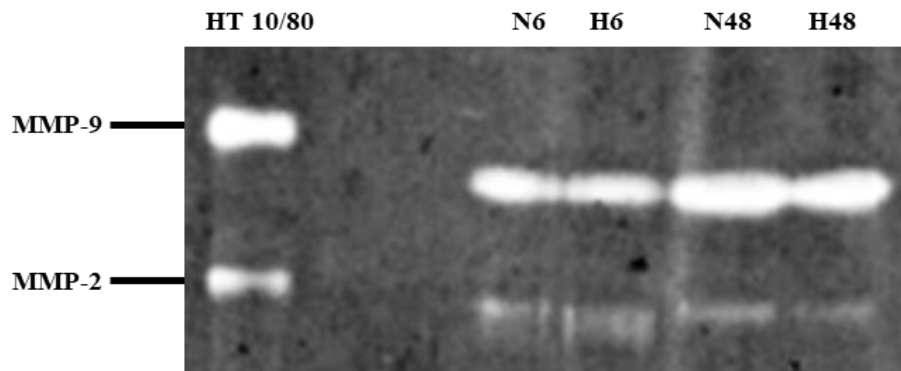
*Figura.6.* Gráfico del análisis densitométrico de la expresión de MMP-9. La gráfica muestra que la mayor expresión de esta metaloproteinasa fue a las 48 h en condiciones de normoxia e hipoxia.

Asimismo, se observa que en ambas condiciones hubo un incremento en su expresión con respecto al tiempo.

### **5.3. Actividad gelatinolítica de células A-549 en condiciones de normoxia e hipoxia**

El ensayo de zimograma llevado a cabo reveló la presencia de las formas activas de MMP-2 y MMP-9, los cuales mostraron la capacidad para degradar la gelatina. En la figura 7 se pueden observar las bandas en la parte superior correspondientes a MMP-9 ya que tienen un peso molecular de alrededor de 82 kDa, mientras que

MMP-2 es de alrededor de 63 kDa. Se mostraron bandas de actividad enzimática para ambas metaloproteinasas en todas las condiciones estudiadas.

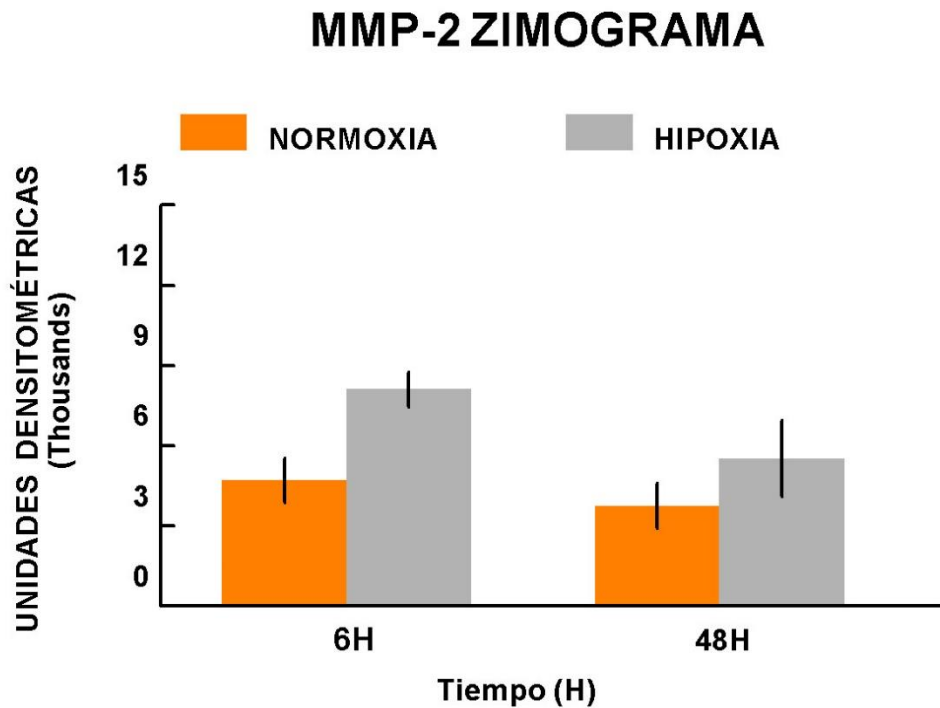


*Figura.7.* Zimograma de la actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9 en células de adenocarcinoma humano A-549. HT-1080 utilizado como control del zimograma. N6 (normoxia a las 6 horas), N48 (normoxia a las 48 horas), H6 (hipoxia a las 6 horas), H48 (hipoxia a las 48 horas).

El análisis densitométrico obtenido para MMP-2, demostró que la mayor actividad de esta metaloproteinasa fue a las 6 horas en condiciones de hipoxia ( $8,109.08 \pm 646.14$  U.D.), mientras que a las 48 horas en condiciones de normoxia ( $3,764.4 \pm 858.35$  U.D.) fue cuando presentó una menor actividad (*Fig.8*).

Asimismo, se encontraron diferencias significativas al tiempo de 6 horas entre las condiciones de normoxia e hipoxia ( $4,723.71 \pm 831.6$  y  $8,109.08 \pm 646.14$  U.D., respectivamente;  $p=0.01$ ). En contra parte, no hubo diferencias significativas al tiempo de 48 horas entre las condiciones de normoxia e hipoxia ( $3,764.4 \pm 858.35$  y  $5,525,87 \pm 1,432,69$  U.D., respectivamente). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de 6 y 48 horas en condiciones de normoxia ( $4,713.71 \pm 831.16$  y  $3,764.4 \pm 858.35$  U.D., respectivamente) e hipoxia ( $8,109.08 \pm 646.14$  y  $5,525,87 \pm 1,432.69$  U.D., respectivamente) ya que hubo un decremento no estadísticamente significativo pasado el tiempo.





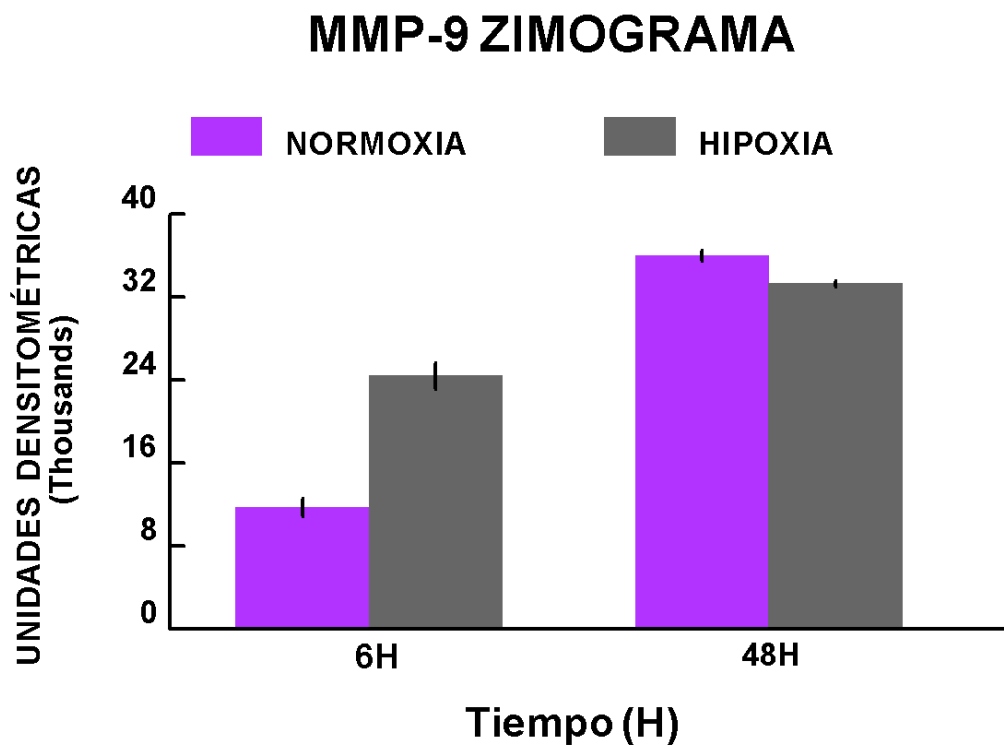
*Figura.8.* Gráfico del análisis densitométrico obtenido de la actividad de MMP-2. La gráfica muestra que la mayor actividad de esta metaloproteinasa fue a las 6 h en condiciones de hipoxia. Sin embargo, se puede apreciar que hubo un decremento en la actividad de MMP-2on respecto al tiempo.

El análisis densitométrico, muestra que al tiempo de 48 horas en condiciones de normoxia ( $36,007.97 \pm 535.51$  U.D.) hubo la mayor actividad gelatinolítica, en tanto al tiempo de 6 horas en condiciones de normoxia ( $11,740.25 \pm 900.93$  U.D.) tuvo la menor actividad (*Fig. 9*).

No se encontraron diferencias significativas en el tiempo de 48 horas en condiciones de normoxia e hipoxia ( $36,007.97 \pm 535.51$  y  $33,324.26$  U.D., respectivamente).

En contraparte, si se encontraron diferencias significativas entre el tiempo de 6 horas en normoxia e hipoxia ( $11,740.25 \pm 900.93$  y  $24,450.86 \pm 1,296.57$  U.D.,

respectivamente;  $p= 0.001$ ) ya que la actividad de esta metaloproteinasa se incrementó cuando cambio la condición. Al igual que, entre los tiempos de 6 horas y 48 horas en condiciones de normoxia ( $11,740.25 \pm 900.93$  y  $36,007.97 \pm 535.51$  U.D., respectivamente;  $p= 0.02$ ) e hipoxia ( $24,450.86 \pm 1,296.57$  y  $33,324.26 \pm 345.33$  U.D., respectivamente;  $p=0.02$ ) hubo una diferencia significativa, ya que en ambas condiciones hubo un aumento conforme pasó el tiempo.



*Figura.9.* Gráfico obtenido del análisis densitométrico de la actividad de MMP-9. El gráfico muestra que la mayor actividad de esta metaloproteinasa fue a las 48 h en condiciones de normoxia y la menor a las 6 h en esta misma condición. Al mismo tiempo, se puede apreciar que hubo un incremento en la actividad de esta MMP con respecto al tiempo en ambas condiciones.

Nota: Los ensayos para determinar la citotoxicidad del paclitaxel así como su efecto sobre las células A-549 en la expresión de MMP-2 y MMP-9 ya no se llevaron a cabo debido a diversas circunstancias externas que se presentaron durante el desarrollo de los experimentos en el laboratorio. Tanto problemas técnicos, como del laboratorio en el cual se estaba trabajando ya que es un área nueva y aún se está trabajando en las instalaciones como la eléctrica. También aún no se ha regularizado del todo la entrega de reactivos debido a la pandemia de COVID-19.

## 6. Discusión

Con los ensayos realizados se determinó que tanto MMP-2 como MMP-9 se encuentran expresadas en el medio de cultivo, en condiciones de hipoxia simulando el microambiente tumoral, ya que, las MMPs se han asociado con la degradación de la MEC, el avance de la progresión tumoral y la metástasis (Neha *et al.*, 2018). Los tiempos seleccionados para el análisis de la actividad y expresión de las dos metaloproteinasas bajo condiciones de normoxia e hipoxia fue de 6 y 48 h, ya que en otros estudios realizan ensayos a las 6 horas simulando la hipoxia aguda y de 24 a 48 horas como representativas de hipoxia prolongada (Yosef *et al.*, 2002).

Al contrario de los resultados encontrados en el presente trabajo, en donde MMP-2 se encuentran mayormente expresada en condiciones de normoxia a las 6 y 48 horas en células de adenocarcinoma humano (A-549), Choi, Jang, Min y Song (2011), no encontraron presencia de MMP-2 ni de MMP-9 en condiciones de normoxia al utilizar células de cáncer de mama MDA-MB-231 y células de cáncer de pulmón NCI-H-1299, pero si encontraron expresión de estas metaloproteinasas

en condiciones de hipoxia crónica (tiempo de ensayo a 24 horas). Esto a su vez coincide con lo reportado por Lee, Cheng, Chen, y Shih (2014), al utilizar células A-549, en donde bajo condiciones de hipoxia se indujo una mayor expresión de MMP-2, MMP-9 y HIF-1 alfa, no obstante, no mencionan el tiempo utilizado para el ensayo bajo esta condición. Interesantemente, en otros estudios se ha mencionado que en experimentos *in vitro* con células epiteliales renales bajo condiciones hipóxicas crónicas (24 horas), demostraron una secreción reducida de MMP-2 (Orphanides, Fine y Norman, 1997). También en otro ensayo se observó que, en líneas celulares de tumor de ovario, bajo condiciones de hipoxia crónica (24 horas) no se encontraron cambios en la expresión de MMP-2 (Krtolica y Ludlow, 1996). Es por esto por lo que, Yosef *et al.* (2002), relacionan que la actividad y el papel de las MMPs parecen no ser uniformes y pueden depender del tipo de tejido tumoral o de célula. Al igual que, las condiciones o el entorno en el cual se desenvuelve una célula son fundamental para su supervivencia, mientras que las células normales no pueden resistir la hipoxia prolongada, ya que sufren apoptosis o necrosis, las células cancerosas pueden adaptarse a la hipoxia alterando la expresión de genes involucrados en varios procesos celulares como la reprogramación metabólica, la proliferación y angiogénesis (Harris, 2002). Esto lo demuestran Dong *et al.* (2019), observaron que al someter células de cáncer de hígado HepG2 y Huh7 a hipoxia intermitente (1 % de O<sub>2</sub>, 24 h de hipoxia, 24 h de reoxigenación, 3 ciclos) y a hipoxia continua (1 % de O<sub>2</sub>, 48 horas) se observaron menores efectos proangiogénicos de las células cancerosas tratadas con hipoxia intermitente en comparación con las tratadas con hipoxia continua.

En el caso de MMP-9 se encontró mayormente expresado en condiciones de hipoxia a las 6 y 48 horas, esto mismo lo reportan Liu *et al.* (2018), los cuales llevaron a cabo su ensayo en estas mismas células y encontraron que la hipoxia aumenta la expresión de MMP-2 y MMP-9. Asimismo, Zhang *et al.* (2018), al utilizar células endoteliales arteriales pulmonares encontraron que la expresión de MMP-2 y MMP-9 aumentó en condiciones de hipoxia a las 24 horas, considerada como hipoxia crónica, esto coincide con los resultados hallados en el presente estudio en el cual también se ve aumentada la actividad o expresión de MMP-9 en condiciones de hipoxia a las 48 h (hipoxia crónica).

En cuanto a la actividad gelatinolítica, ambas metaloproteinasas mostraron tener dicha actividad observada en los zimogramas, donde las bandas de lisis más intensas corresponden a MMP-9, mientras que las menos intensas a MMP-2. Estos resultados son coincidentes con lo obtenido por Kodate *et al.* (1997), en los cuales al analizar 3 líneas celulares (11OST, A549 y PC9) encontraron actividad gelatinolítica en ambas metaloproteinasas, siendo MMP-9 la que mostró mayor actividad en qué condiciones de hipoxia. Adicionalmente, Schütz *et al.* (2002), también reportan estos resultados en donde la principal banda gelatinolítica la observaron a aproximadamente 92 kDa correspondiente a MMP-9 y a 62 kDa para MMP-2 en condiciones de normoxia

En los resultados obtenidos se muestra que a los tiempos tanto de 6 h como de 48 h hubo una mayor actividad gelatinolítica de MMP-2 en condiciones de hipoxia, esto es coincidente con los datos demostrados en el estudio de Yosef *et al.* (2002), en donde sugieren que la hipoxia prolongada (48h) aumenta la actividad de MMP-2 en células endoteliales humanas, al mismo tiempo, esta condición tiene el potencial de

promover la degradación de la ECM. MMP-9 también mostró tener una mayor actividad a tiempos de 6 h en condiciones de hipoxia, ya que MMP-9 actúa como responsable de la invasión celular y metástasis inducidas por hipoxia. Choi, Jang, Min, Yoon y Song (2011), mencionan que la sobreexpresión de MMP-9 se correlaciona positivamente con una mayor incidencia de metástasis en cánceres de mama y pulmón, en su estudio encontraron que la expresión de MMP-9 estaba aumentada por HIF-1 $\alpha$  en las líneas celulares utilizadas (MDA-MB-231 y NCI-H-1299) al tiempo estudiado de hipoxia a las 24 horas, y que por lo tanto, MMP-9 es un componente esencial de la invasión inducida por hipoxia en las células de cáncer mama, y reportan que los tumores de mama grandes pueden tener microambientes hipóxicos más severos que inducen propiedades invasivas celulares a través de mecanismos de activación de MMP-9.

Esto lo menciona Gong *et al.*, (2016), donde bandas más intensas correspondientes a MMP-9, pueden deberse a que inicialmente esta es secretada por varias células en forma inactiva como un propéptido, que puede ser activado por otras MMPs o por el sistema activador del plasminógeno tisular (tPA)-plasmina, debido a su función biológica de escindir la gelatina, lo que promueve la motilidad de las células malignas. Al igual han revelado que una alta expresión de MMP-9 se asocia positivamente con la agresividad de las células malignas en tumores sólidos.

## **7. Conclusión**

Tanto MMP-2 como MMP-9 se encontraron expresadas en el medio de cultivo simulando la condición de hipoxia en el microambiente tumoral. MMP-2 tuvo una mayor expresión en condiciones de normoxia (a las 6 y 48 horas), mientras que

MMP-9 tuvo una mayor expresión bajo condiciones de hipoxia (6 y 48 horas), como lo han reportado otros estudios la expresión de MMP-2 no siempre aumenta bajo condiciones de hipoxia, al mismo tiempo, se ha mencionado que también estas diferencias pueden deberse al tipo de célula y tejido con la que se esté trabajando, así como su papel en la progresión del cáncer. En cuanto la actividad gelatinolítica, ambas metaloproteinasas tuvieron una mayor actividad en condiciones de hipoxia, ya que como se ha reportado en estudios previos, esta condición favorece la remodelación del MEC, y estas MMPs tienen un papel fundamental en la degradación del colágeno de manera más eficiente para a su vez contribuir en la motilidad de las células cancerígenas.

Aún queda por realizar más estudios para comprender el papel que juegan estas dos metaloproteinasas en la progresión del cáncer. Así como también poder demostrar la hipótesis planteada en el presente trabajo respecto al efecto que tiene el paclitaxel sobre la expresión de estas dos metaloproteinasas y las concentraciones a las cuales se ve un efecto inhibitorio en éstas, ya que no se pudo determinar debido a las circunstancias mencionadas previamente.

## **Agradecimientos**

Agradezco a mis papás por darme la oportunidad de estudiar una carrera que me apasiona y por apoyarme incondicionalmente en este viaje de 4 años. También a mis asesoras, que sin ellas no hubiera podido aprender tanto en estos últimos meses y mostrarme lo apasionante que es el mundo de la investigación, y el impacto que nuestros resultados puedan tener sobre la generación de nuevos conocimientos.

## 8. Bibliografía

1. Acker H. (2005). The oxygen sensing signal cascade under the influence of reactive oxygen species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360:2201-2210
2. American Cancer Society. (2019). What is lung Cancer? American Cancer Society. Atlanta, Ga. Consultado el 13 de Septiembre, de <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/about/what-is.html>
3. American Cancer Society. (2022). Estadísticas importantes sobre el cáncer de pulmón. American Cancer Society. Atlanta, Ga. Consultado el 13 de Septiembre, de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-pulmon/acerca/estadisticas-clave>
4. Anderson, N. M., y Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current Biology*, 30(16), R921–R925. doi:10.1016/j.cub.2020.06.081
5. Barrionuevo, C., y Dueñas, D. (2019). Clasificación actual del carcinoma de pulmón. Consideraciones histológicas, inmunofenotípicas, moleculares y clínicas. *Horizonte Médico (Lima)*, 19(4), 74-83.
6. Ben-Yosef, Y., Lahat, N., Shapiro, S., Bitterman, H., & Miller, A. (2002). Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circulation research*, 90(7), 784-791.
7. Cagle, P., Allen, T., y Olsen, R. (2013). Lung cancer biomarkers: present status and future developments. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 137 (9):1191-8.



8. Chen, F., Zhuang, X., Lin, L., Yu, P., Wang, Y., Shi, Y., Hu, G., Sun, Y. (2015). New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BioMed Central Medicine* 13:45. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0278-7>
9. Choi, J. Y., Jang, Y. S., Min, S. Y., & Song, J. Y. (2011). Overexpression of MMP-9 and HIF-1 $\alpha$  in breast cancer cells under hypoxic conditions. *Journal of breast cancer*, 14(2), 88-95.
10. Chopra, A., Willmore, W.G. y Biggar, K.K. (2019). Protein quantification and visualization via ultraviolet-dependent labeling with 2,2,2-trichloroethanol. *Scientific Reports*, 9, 13923. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50385-9>
11. Ciupka, B. (2023, February 9). *SCLC vs. NSCLC: What's the difference?: NFCR Lung Cancer*. NFCR. Consultado el 8 de Abril de 2023, de, <https://www.nfcr.org/blog/small-cell-lung-cancer-vs-non-small-cell-lung-cancer-whats-the-difference/>
12. Couraud, S., Zalcman, G., Milleron, B., Morin, F., Souquet, P.J. (2012). Lung cancer in never smokers—a review. *European Journal of Cancer*, 48, 1299–1311
13. Cui, N., Hu, M., y Khalil, R. A. (2017). Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Progress in molecular biology and translational science*, 147, 1-73.
14. Cui, N., Hu, M., y Khalil, R. A. (2017). Chapter One-Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol and Transl Sci* 147: 1–73.

15. Das, S., Amin, S. A., y Jha, T. (2021). Inhibitors of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) for the management of hematological malignancies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 223. doi:10.1016/j.ejmech.2021.113623
16. Dillekås, H., Rogers, M. S., y Straume, O. (2019). Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer medicine*, 8(12), 5574-5576
17. Earle, C. C., Tsai, J. S., Gelber, R. D., Weinstein, M. C., Neumann, P. J., Weeks, J. C. (2001). Effectiveness of Chemotherapy for Advanced Lung Cancer in the Elderly: Instrumental Variable and Propensity Analysis. *Journal of Clinical Oncology*, 19(4), 1064–1070. doi:10.1200/jco.2001.19.4.1064
18. Gersh, I., & Catchpole, H. R. (1949). The organization of ground substance and basement membrane and its significance in tissue injury, disease, and growth. *American Journal of Anatomy*, 85(3), 457-521.
19. GLOBOCAN. (2020). Estimated number of new cases in 2020, Mexico, both sexes, all ages. Consultado el 13 de Septiembre, de <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis>.
20. Gong, L., Wu, D., Zou, J., Chen, J., Chen, L., Chen, Y., Ni, C., & Yuan, H. (2016). Prognostic impact of serum and tissue MMP-9 in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 7(14), 18458–18468. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7607>
21. González-Ávila, G., González, A., Delgado, J. y Gutiérrez-González, L. H. (2009). Participación de las metaloproteasas de matriz en la progresión del cáncer. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 22, 328-336.

22. González-Ávila, G., Sommer, B., Mendoza-Posada, D. A., Ramos, C., García-Hernández, A. A., y Falfan-Valencia, R. (2019). Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 137, 57–83.
23. Heslin, M. J., Yan, J., Johnson, M. R., Weiss, H., Diasio, R. B., y Urist, M. M. (2001). Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis. *Annals of Surgery*, 233(6), 786.
24. Jackson, B. C., Nebert, D. W., y Vasiliou, V. (2010). Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. *Human genomics*, 4(3), 1-8.
25. Jordan, M.A., Toso, R.J., Thrower, D., Wilson, L. (1993). Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90:9552–9556.
26. Jung, O., Lee, J., Lee, Y. J., Yun, J. M., Son, Y. J., Cho, J. Y., Ryou, C., Lee, S. Y. (2016). Timosaponin AIII inhibits migration and invasion of A549 human non-small-cell lung cancer cells via attenuations of MMP-2 and MMP-9 by inhibitions of ERK1/2, Src/FAK and  $\beta$ -catenin signaling pathways. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 26(16), 3963-3967
27. Kadota, K., Yeh, Y. C., Sima, C. S., Rusch, V. W., Moreira, A. L., Adusumilli, P. S., Travis, W. D. (2014). The cribriform pattern identifies a subset of acinar predominant tumors with poor prognosis in patients with stage I lung adenocarcinoma: a conceptual proposal to classify cribriform predominant tumors as a distinct histologic subtype. *Modern Pathology*, 27(5), 690-700.

28. Kim, J., y Tanner, K. (2015). Recapitulating the tumor ecosystem along the metastatic cascade using 3D culture models. *Frontiers in Oncology*, 5(170). <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00170>
29. Kodate, M., Kasai, T., Hashirnoto, H., Yasumoto, K., Iwata, Y., & Manabe, H. (1997). Expression of matrix metalloproteinase (gelatinase) in T1 adenocarcinoma of the lung. *Pathology International*, 47(7), 461–469. doi:10.1111/j.1440-1827.1997.tb04525.x
30. Koyama, H., Iwata, H., Kuwabara, Y., Iwase, H., Kobayashi, S., Fujii, Y. (2000). Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and-9 in oesophageal carcinoma; a study using in situ zymography. *European Journal of Cancer*, 36(16), 2164-2170.
31. Krtolica A, Ludlow JW. (1996). Hypoxia arrests ovarian carcinoma cell cycle progression, but invasion is unaffected. *Cancer Research* 56: 1168–1173.
32. Laronha, H., y Caldeira, J. (2020). Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells*, 9(5), 1076. <https://doi.org/10.3390/cells9051076>
33. Laronha, H., y Caldeira, J. (2020). Structure and function of human matrix metalloproteinases. *Cells*, 9(5), 1076.
34. Leng, S., Picchi, M. A., Meek, P. M., Jiang, M., Bayliss, S. H., Zhai, T., Belinsky, S. A. (2022). Wood smoke exposure affects lung aging, quality of life, and all-cause mortality in New Mexican smokers. *Respiratory research*, 23(1), 1-15.
35. Lindeman, N., Cagle, P., Aisner, D., Arcila, M., Beasley, M., Bernicker, E., Colasacco, C., Dacic, S., Hirsch, F., Kerr, K., Kwiatkowski, D., Ladanyi, M., Nowak, J., Sholl, L., Temple-Smolkin, R., Solomon, B., Souter, L., Thunnissen, E., Tsao, M., Ventura, C., Wynes, M., Yatabe, Y. (2018). Updated Molecular

Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment with Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 20(2):129-159.

36. Maley, C., Aktipis, A., Graham, T., Sottoriva, A. (2017). Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms. *Nature Reviews Cancer*, 17(10):605–619. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.69>
37. Mittal, R., Patel, A.P., Debs, L.H., Nguyen, D., Patel, K., Grati. M., Mittal, J., Yan, D., Chapagain, P., Liu, X.Z. (2016). Intricate functions of matrix metalloproteinases in physiological and pathological conditions. *Journal of cellular physiology*, 231(12), 2599-2621.
38. Murphy G., Stanton H., Cowell S., Butler G., Knäuper V., Atkinson S., Gavrilovic, J. (1999). Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, 107:38-44.
39. Murphy, G., y Nagase, H. (2008). Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular aspects of medicine*, 29(5), 290-308.
40. National Cancer Institute. (s. f.). Types of Cancer Treatment. Recuperado el 18 de Septiembre de 2022, de <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>
41. National Human Genome Research Institute. (2022). *Electrophoresis*. Genome.gov. Consultado el 23 de Septiembre de <https://www.genome.gov/genetics->

glossary/Electrophoresis#:~:text=Electrophoresis%20is%20a%20laboratory%20technique,a%20gel%20or%20other%20matrix.

42. National Human Genome Research Institute. (2022). *Western Blot | NHGRI*. Genome.gov. Consultado el 23 de Septiembre de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Western-Blot>.
43. Organización mundial de la Salud. (2021). Classification of Tumours. *Thoracic tumours*. Iarc.
44. Orphanides C, Fine LG, Norman JT.(1997). Hypoxia stimulates proximal tubular cell matrix production via TGF- $\beta$  independent mechanism. *Kidney International*, 52: 637–647.
45. Pakunlu, R. I., Wang, Y., Tsao, W., Pozharov, V., Cook, T. J., Minko, T. (2004). Enhancement of the efficacy of chemotherapy for lung cancer by simultaneous suppression of multidrug resistance and antiapoptotic cellular defense: novel multicomponent delivery system. *Cancer research*, 64(17), 6214-6224.
46. Park, Y.R., Bae, S.H., Ji, W., Seo, E.J., Lee, J.C., Kim, H.R., Jang, S.J., Chang-Min, C. (2017). GAB2 Amplification in Squamous Cell Lung Cancer of Non-Smokers. *Journal of Korean Medical Science*, 32, 1784–1791.
47. Pérez, M., Murillo R., Pinzón, C., y Hernández, G. (2007) Costos de la atención médica del cáncer de pulmón, la EPOC y el IAM atribuibles al consumo de tabaco en Colombia (proyecto multicéntrico de la OPS). *Revista Colombiana de Cancerología*, 11(4):241-249.
48. Pérez, N., Murillo, R., Pinzón, C., y Hernández, G. (2007). Costos de la atención médica del cáncer de pulmón, la EPOC y el IAM atribuibles al consumo de

- tabaco en Colombia (proyecto multicéntrico de la OPS). *Revista Colombiana de Cancerología*, 11(4), 241-249.
49. Ramalingam, S., y Belani, C. P. (2004). Paclitaxel for non-small cell lung cancer. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 5(8), 1771-1780.
50. Rodríguez- Rojas, Y. (2021). Repository.urosario.edu.co. Consultado el 23 de Septiembre de <https://repository.urosario.edu.co/bitstream/handle/10336/31625/TRABAJODIRIGIDOFINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
51. Rojas-Martínez, R., Escamilla-Núñez, C., Meza, R., Vázquez-Salas, R. A., Zárate-Rojas, E., Lazcano-Ponce, E. (2020). Mortalidad por cáncer de pulmón en México de 1990 a 2016: efecto edad-periodo-cohorte. *Salud Pública de México*, 61, 230-239.
52. Scadden, A. D., y Naaby-Hansen, S. (2001). Analysis of ribonucleases following gel electrophoresis. *Methods in enzymology*, 341, 126-141.
53. Schütz, A., Schneidenbach, D., Aust, G., Tannapfel, A., Steinert, M., & Wittekind, C. (2002). Differential Expression and Activity Status of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 in Tumor and Stromal Cells of Squamous Cell Carcinomas of the Lung. *Tumor Biology*, 23(3), 179–184. doi:10.1159/000064034
54. Secretan, B., Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L. (2009). A review of human carcinogens—Part E: Tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncology*, 10, 1033–1034.
55. Shigematsu, H., Lin, L., Takahashi, T., Nomura, M., Suzuki, M., Wistuba, I.I., Fong, K.M., Lee, H., Toyooka, S., Shimizu, N., (2005). Clinical and biological

- features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 97, 339–346.
56. Siddiqui F, Vaqar S, Siddiqui, A.H. (2022) Lung Cancer. StatPearls. Consultado el 23 de Septiembre, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482357/>
57. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem*, 150, 76-85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7
58. Stepanchenko, N., Novikova, G. Y Moshkov, I. (2011). Protein Quantification. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58. 737-742. 10.1134/S1021443711040182.
59. Truffi, M., Sorrentino, L., y Corsi, F. (2020). Fibroblasts in the tumor microenvironment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1234, 15–29.
60. Vaupel, P., Mayer, A. (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer metastasis*, 26:225-239.
61. Veiga, A. (2022). *Western Blot Introducción y Optimización*. Docs.abcam.com. Consultado el 23 de Septiembre de, <https://docs.abcam.com/pdf/events/spanish-wb-webinar.pdf>.
62. Verma R.P., y Hansch C. (2007). Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 2223–2268. doi: 10.1016/j.bmc.2007.01.011



63. Verma, A., Verma, M., y Singh, A. (2020). Animal tissue culture principles and applications. *Animal Biotechnology*, 269–293. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4>
64. Verma, R.P., y Hansch C. (2007). Metaloproteinasas de matriz (MMP): funciones químico-biológicas y (Q) SAR. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15:2223–2268. doi: 10.1016/j.bmc.2007.01.011.
65. Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., Gong, Z., Zhang, S., Zhou, J., Cao, K., Li, X., Xiong, W., Li, G., Zeng, Z., Guo, C. (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8(5):761–773. <https://doi.org/10.7150/jca.17648>
66. Weigelt, B., Peterse, J.L., y van 't Veer, L.J. (2005) Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature Reviews Cancer*, 5: 591-602.
67. Whittaker, M., Floyd, C.D., Brown, P., Gearing, A.J. (1999). Diseño y aplicación terapéutica de inhibidores de metaloproteinasas de matriz. *Revista de química*, 99:2735–2776. doi: 10.1021/cr9804543
68. Yao, Z., Yuan, T., Wang, H., Yao, S., Zhao, Y., Liu, Y., Jin, S., Chu, J., Xu, Y., Zhou, W., Yang, S., Liu, Y. (2017). MMP-2 together with MMP-9 overexpression correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in early gastric carcinoma. *Tumor Biology*, 39(6), 1010428317700411.
69. Zhang, H., Liu, Y., Yan, L., Du, W., Zhang, M., Chen, H., ... Zhu, D. (2018). MMP-2 and MMP-9 contribute to the angiogenic effect produced by hypoxia/15-HETE in pulmonary endothelial cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 121, 36–50. doi:10.1016/j.yjmcc.2018.06.006

70. Zippin, C., Lum, D., y Hankey, B. F. (1995). Completeness of hospital cancer case reporting from the SEER Program of the National Cancer Institute. *Cancer*, 76(11), 2343-2350.
71. Harris, A. L. (2002). Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews cancer*, 2(1), 38-47.
72. Dong, G., Lin, X. H., Liu, H. H., Gao, D. M., Cui, J. F., Ren, Z. G., & Chen, R. X. (2019). Intermittent hypoxia alleviates increased VEGF and pro-angiogenic potential in liver cancer cells. *Oncology letters*, 18(2), 1831-1839.