

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad De Química

Identificación de enzimas productoras de aminas biogénicas y
de sulfuro de hidrógeno como biomarcadores de
diferenciación neuroendócrina en células A549 de cáncer de
pulmón

Tesis

Que como parte de los requisitos para
obtener el Grado de

Maestra en Ciencias Químico Biológicas

Presenta:

Q.I. Maricarmen Pérez Carrasco

Dirigido por:

Dra. Laura Cristina Berumen Segura

Querétaro, Qro. enero de 2025

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencias Químico Biológicas

Identificación de enzimas productoras de aminas biogénicas y de
sulfuro de hidrógeno como biomarcadores de diferenciación
neuroendócrina en células A549 de cáncer de pulmón

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestra en Ciencias Químico Biológicas

Presenta

Q.I. Maricarmen Pérez Carrasco

Dirigido por:

Dra. Laura Cristina Berumen Segura

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Presidente

Dra. Alicia Irasema Mendieta Trejo
Secretaria

Dr. Eloy Rodríguez De León
Vocal

Dra. María Guadalupe García Alcocer
Suplente

Dra. Jesica Escobar Cabrera
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
México 2025

Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación por la beca de maestría otorgada bajo el número de CVU 1245678.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por recibirme en sus instalaciones y al apoyo brindado del Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER) 2023 con número de proyecto FOPER-2023-FQU03340.

A la doctora Laura Cristina Berumen Segura por dirigir este proyecto, recibirme como estudiante, enseñarme una increíble rama de la ciencia que no conocía y apoyarme de todas maneras en cada segundo dentro de mi estancia; por ser un gran ejemplo a seguir en la vida y en la ciencia.

A la doctora Irasema Mendieta y a la maestra Dulce Caraveo, por la amistad y tener la paciencia y cuidado de enseñarme, guiarme y acompañarme durante mi formación en esta maestría; así mismo a las doctoras Jesica Escobar y Guadalupe García por apoyarme no solo de manera académica, si no que siempre me hicieron darme cuenta de todo lo que soy capaz y, finalmente, al doctor Eloy Rodríguez por su apoyo académico, técnico y sus consejos al supervisar este trabajo.

A Dariel Soria por el apoyo técnico durante este proyecto, espero haber logrado enseñarle algo durante su estancia como becario.

A mis amigas durante el posgrado Valeria y Karla que me mostraron el valor de la resiliencia y como juntas se hacía más amena la experiencia.

A todos mis compañeros de laboratorio, que vuelven el laboratorio de Biología Molecular una segunda casa dónde la ciencia y la felicidad convergen en un mismo espacio.

A mis padres Martha Carrasco y Paulo Pérez, que junto con mis hermanos Martha, Rafael y Paulo me escuchan a la distancia y siempre buscan la manera de impulsarme a dar lo mejor de mí.

A mi esposo Abiud, que me ha acompañado, motivado y creído en mí cuando ni si quiera yo misma lo hacía, junto a ti sé que puedo alcanzar todo en esta vida.

Dedicado a mi esposo Abiud Palma, que es mi equipo y pilar en mi vida, sé que puedes ver en mí más de lo que yo puedo apreciar, este logro fue gracias a ti,
te amo.

A mi bebé Alfonso Mateo, que me acompañó desde el vientre y me enseñó lo importante que es darle tiempo y disfrutar cada etapa en esta vida; quiero decirte que persigas y cumplas todas tus metas, siempre estaré para apoyarte.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS Y SIGLAS	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Cáncer	4
2.2 Cáncer de pulmón	6
2.2.1 Diagnóstico de cáncer de pulmón	7
2.2.1.1 Diagnóstico por Tomografía Computarizada de Baja Dosis	8
2.2.1.2 Diagnóstico mediante análisis molecular	8
2.2.1.2.1 Diagnóstico por muestras sanguíneas y muestras de Fluido de Lavado Bronco Alveolar (BALF) mediante análisis de metabolitos	9
2.2.1.2.2 Metabolismo de cisteína y serina	12
2.2.1.2.3 Metabolismo de sulfuro de hidrógeno	13
2.3 Cáncer de pulmón neuroendócrino	14
2.3.1 Clasificación de tumores neuroendócrinos	15
2.3.2 Marcadores para tumores neuroendócrino	16
2.3.3 Transdiferenciación a fenotipos neuroendócrinos	18
2.3.3.1 Neurotransmisores en A549 _{NED} , tirosina y triptófano	19
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	23
5. HIPÓTESIS	23

6.	OBJETIVOS	24
6.1	Objetivo General	24
6.2	Objetivos específicos	24
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
7.1	Diseño experimental	25
7.2	Desarrollo experimental	25
7.2.1	Cultivo celular	25
	Proliferación celular	26
7.2.2	Diferenciación neuroendócrina	26
7.2.3	Análisis de expresión de enzimas por RT-PCR	27
7.2.4	Cuantificación de sulfuro de hidrógeno	28
	Preparación de solución líquida de agar con acetato de zinc para trampas de H ₂ S.	28
	Incubación dentro de los frascos de cultivo para preparación de trampas de acetato de zinc	28
	Detección de H ₂ S	29
7.3	Análisis estadístico	30
8.	RESULTADOS	31
8.1	Transdiferenciación celular	31
8.2	Expresión de enzimas productoras de aminas biogénicas	32
8.3	Expresión de enzimas productoras de sulfuro de hidrógeno	35
8.4	Detección de sulfuro de hidrógeno (H ₂ S) en cultivo celular	37
9.	DISCUSIÓN	39
10.	CONCLUSIONES	44
11.	REFERENCIAS	45
12.	ANEXOS	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Hallazgos en el diagnóstico de tumores neuroendócrinos	17
2. Oligonucleótidos utilizados en RT-PCR	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Células del microambiente tumoral.....	6
2. Mapa de vías importantes en el diagnóstico de cáncer de pulmón	12
3. Diseño experimental	25
4. Trampas de acetato de zinc preparadas en frascos de cultivo para la detección de H ₂ S	29
5. Curva estándar representativa de concentración de H ₂ S.....	30
6. Proceso de transdiferenciación celular con el tratamiento combinatorio de IBMX + FSK en células A549	31
7. Análisis de expresión de marcadores neuroendócrinos por RT-PCR.....	32
8. Análisis de expresión de la isoforma 1 de Triptófano Hidroxilasa (TPH1) por RT-PCR.....	33
9. Análisis de expresión de la isoforma 2 de Triptófano Hidroxilasa (TPH2) por RT-PCR.....	34
10. Análisis de expresión de Tirosina Hidroxilasa (TH) por RT-PCR.....	35
11. Análisis de expresión de cistationina β-sintasa (CBS) por RT-PCR	36
12. Análisis de expresión de cistationina γ-liasa (CSE) por RT-PCR.....	37
13. Cantidad de sulfuro de hidrógeno (H ₂ S) detectado	38

ABREVIATURAS Y SIGLAS

5-HT	Serotonina
A549_{NED}	Fenotipo Neuroendócrino de las células de adenocarcinoma A549
AC	Carcinoide atípico
ACF	Anticuerpos conjugados a fármacos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNct	ADN circulante de tumor
ARN	Ácido Ribonucleico
BALF	Lavado de Fluido Bronco alveolar
CBS	Cistationina β -sintasa
CSE	Cistationina γ -liasa
CTC	Células circulantes de tumor
DA	Dopamina
DMEM	Medio de Eagle modificado de Dulbecco
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epitelial
EPI	Epinefrina
FSK	Forskolina
FT	Factor de transcripción
GC/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
IBMX	3-Isobutil-1-metilxantina
IL	Interleucina
LCNEC	Carcinoma neuroendócrino de células grandes
LDCT	Tomografía Computarizada de Baja Dosis
miARN	Micro ARN
NED	Neuroendócrino
NSCLC	Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas
NSE	Enolasa Neuronal Específica
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PNEC	Células Pulmonares Neuroendócrinas
SCLC	Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas
SCLC-C	Carcinoma de pulmón de células pequeñas
SFB	Suero Fetal Bovino
TC	Carcinoide típico
TEP	Plaquetas educadas de tumor

TH	Tirosina Hidroxilasa
TNE	Tumores neuroendócrinos
TPH1	Triptófano Hidroxilasa 1
TPH2	Triptófano Hidroxilasa 2

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Maricarmen Pérez Carrasco', enclosed within a circular scribble.

Q.I. Maricarmen Pérez Carrasco

RESUMEN

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer que causa más muertes en el mundo, debido a que los tratamientos no son suficientemente efectivos en etapas tardías y no existe aún un protocolo de diagnóstico que permita identificarlo tempranamente.

Un factor importante en la progresión de la enfermedad es la presencia del fenotipo neuroendócrino que en estudios *in vitro*, disminuye la supervivencia celular y dentro del microambiente tumoral favorece la metástasis a través de comunicación celular. En las células transdiferenciadas se han identificado cambios en la concentración de distintas moléculas asociadas a su metabolismo durante el proceso de cambio, mismas que al ser evaluadas contra un fenotipo no transdiferenciado podrían ser descritas como potenciales biomarcadores. En células tumorales de adenocarcinoma se han reportado concentraciones elevadas de aminoácidos como cisteína y serina, así como sulfuro de hidrógeno.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión de TH, TPH1, TPH2, CBS, CSE y la concentración de sulfuro de hidrógeno en células de adenocarcinoma de pulmón A549 y su fenotipo neuroendócrino para identificar este grupo de moléculas como biomarcadores de la diferenciación neuroendócrina en las células tumorales. El análisis de la expresión de enzimas tirosina hidroxilasa (TH), triptófano hidroxilasa (TPH1 y TPH2), cistationina γ -liasa (CSE) y cistationina- β -sintasa (CBS) se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa retrotranscriptasa y la cuantificación de sulfuro de hidrógeno mediante el método de azul de metileno. Los resultados mostraron un cambio significativo en la expresión de las enzimas CBS, TH y TPH1, indicando una sobreexpresión en el fenotipo neuroendócrino; no se identificó una sobreproducción de H₂S significativamente distinta.

Palabras clave:

Cáncer de pulmón de células no pequeñas, biomarcadores A549, A549_{NED}, sulfuro de hidrógeno, CBS, CSE, TH, TPH1, TPH2.

ABSTRACT

Lung cancer is the kind of cancer that causes the most deaths in the world, since treatments are not sufficiently effective in late stages and there is still no diagnostic protocol that allows early identification.

An important factor in the progression of the disease is the presence of the neuroendocrine phenotype, which in *in vitro* studies decreases cell survival and within the tumor microenvironment favors metastasis through cellular communication. In transdifferentiated cells, changes have been identified in the concentration of different molecules associated with their metabolism during the process of change, which when evaluated against a non-transdifferentiated phenotype could be described as potential biomarkers. Elevated concentrations of amino acids such as cysteine and tyrosine, as well as hydrogen sulfide, have been reported in adenocarcinoma tumor cells.

The aim of the present work is to evaluate the expression of TH, TPH1, TPH2, CBS, CSE and hydrogen sulfide in A549 lung adenocarcinoma cells and their neuroendocrine phenotype in order to identify this group of molecules as biomarkers of neuroendocrine differentiation in tumor cells. The analysis of tyrosine hydroxylase (TH), tryptophan hydroxylase (TPH1 and TPH2), cystathionine β -synthase (CBS) and cystathionine γ -lyase (CSE) enzyme expression was performed by polymerase chain reaction retrotranscriptase and hydrogen sulfide quantification was made by methylene blue method. The results showed a significant change in the expression of CBS, TH, and TPH1 enzymes, indicating an overexpression in the neuroendocrine phenotype; no significantly different H₂S overproduction was identified.

Keywords:

Non-small cell lung cancer, biomarkers, A549, A549_{NED}, hydrogen sulfide, CBS, CSE, TH, TPH2, TPH1.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es aún el cáncer más mortífero en el mundo, dado que los tratamientos utilizados no logran detener la enfermedad en etapas avanzadas; desafortunadamente, aún no existe un método de diagnóstico oportuno altamente fiable, que tenga la capacidad de diagnosticar la enfermedad en las primeras etapas de su desarrollo. Además de esta incertidumbre, las técnicas actuales suelen ser agresivas e invasivas para el paciente. Recientemente algunas investigaciones se han dirigido a identificar biomarcadores de cáncer de pulmón que sean detectables en etapas tempranas de dicho padecimiento.

Se ha demostrado que en el microambiente tumoral están presentes células con características neuroendócrinas, que se encargan de enviar señales y “coordinar” al tumor. El cambio de expresión de enzimas productoras de sulfuro de hidrógeno y productoras de aminas biogénicas en muestras de lavado bronco alveolar, biopsias o plasma sanguíneo de algunos cánceres de pulmón muestran cambios. Nuestra meta principal es comparar dichas moléculas en células de adenocarcinoma de pulmón A549 y su fenotipo neuroendócrino, para así proponerlas como biomarcadores de este fenotipo celular.

Este proyecto tiene como objetivo contribuir con las investigaciones sobre el diagnóstico de cáncer de pulmón por medios menos invasivos o agresivos mediante el análisis de los cambios de concentración y/o expresión de las biomoléculas mencionadas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer inicia cuando los procesos de crecimiento y muerte celular se vuelven disfuncionales. Se presenta un crecimiento descontrolado en células del tejido afectado, estas células pierden funciones normales (apoptosis, senescencia celular, entre otros) y adquieren capacidades que favorecen el desarrollo del cáncer; tales como ser autosuficientes en cuanto a la generación de señales de crecimiento e insensibles a señales inhibitorias de crecimiento, evadir la muerte celular programada, sostener la angiogénesis, invadir tejidos y tener la capacidad de replicarse ilimitadamente. Con estas características, al sistema inmune se le dificulta eliminar estas células y llega a provocar un acumulamiento que puede formar un tumor. Si bien, no todos los tumores son signo de cáncer, los cuales no invaden otros tejidos y sus complicaciones son sintomáticas; existen cánceres que no forman tumores como la leucemia (Hanahan y Weinberg, 2000; Wang, Lei y Han, 2018; Park *et al.*, 2021; Markman, 2022).

Actualmente, se pueden describir cinco principales categorías para el cáncer:

- Carcinomas que provienen de la piel o tejidos que están cerca a los órganos.
- Sarcomas que se desarrollan en el hueso, cartílago, grasa, músculo u otros tejidos conectivos.
- Leucemia que se desarrolla a partir de las células sanguíneas y huesos próximos.
- Linfomas, los cuales surgen en tejido linfático (aunque pueden afectar a otros tejidos, como la piel).
- Cáncer del sistema nervioso central que se desarrolla en el cerebro y la espina dorsal, principalmente (Goodlad, Cerroni y Swerdlow, 2022; Markman, 2022).

Se han descrito desde el año 2000 características esenciales del cáncer. Estas habilidades pueden heredarse o suceder debido a modificación genética. En 2011 se introdujo el concepto de microambiente tumoral (Figura 1) que identifica al ambiente como cúmulo de células reclutadas que poseen rasgos similares y que permiten el crecimiento y progresión del tumor, brindándole así características específicas a cada tipo de tumor (primario, invasivo o metastásico). Hasta 2022, Hanahan y Weinberg han descrito finalmente 14 características propias de los tumores (Hanahan y Weinberg, 2000, 2011; Hanahan, 2022):

1. Autosuficiencia en señales de crecimiento.
2. Insensibilidad a supresores de crecimiento.
3. Invasión de tejidos y metástasis.
4. Potencial de replicación ilimitada.
5. Aumento de la angiogénesis.
6. Evasión de la apoptosis.
7. Desregulación energética celular.
8. Evasión de la inmuno-vigilancia.
9. Inestabilidad y mutación del genoma.
10. Inflamación que promueve el tumor.
11. Reprogramación no-mutacional epigenética.
12. Microbiomas polimórficos.
13. Células senescentes.
14. Desbloqueo de la plasticidad fenotípica.

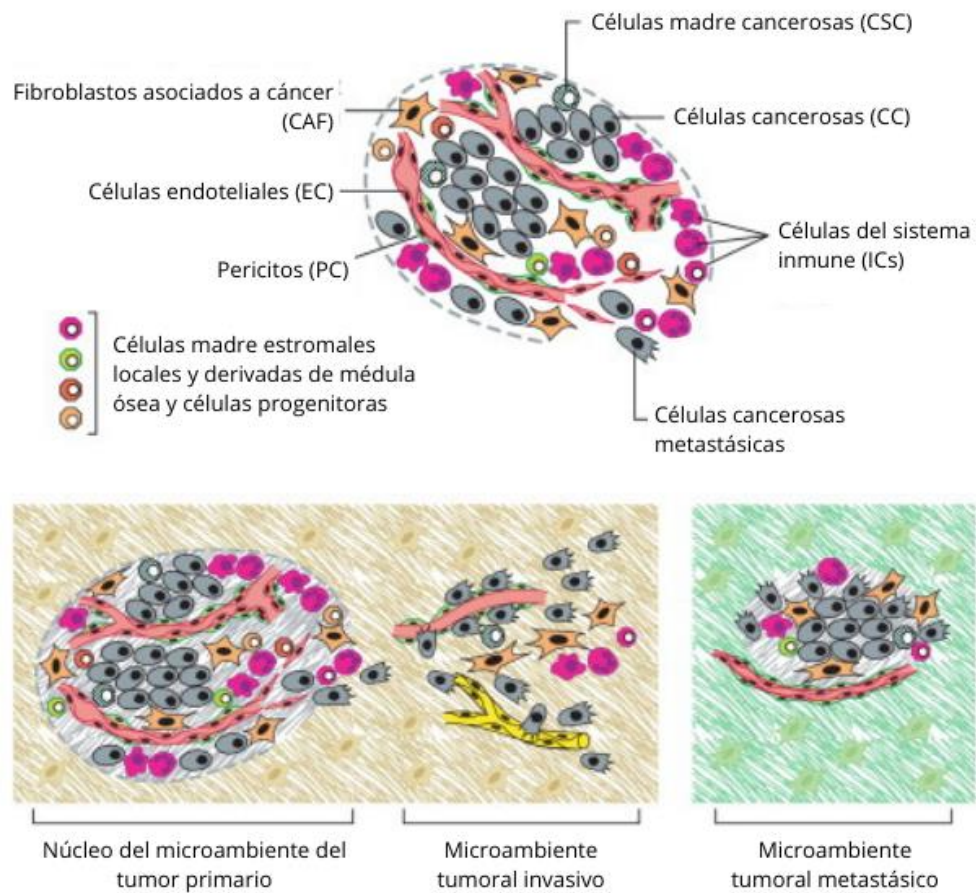


Figura 1. Células del microambiente tumoral (Hanahan y Weinberg, 2011)

2.2 Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es aquel que inicia en los pulmones. Comúnmente, se divide en dos categorías de acuerdo a su histología: cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), que suele presentar tasas de supervivencia muy pequeñas y representa del 15% al 20% de los casos y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), con tasas de supervivencia heterogéneas; este subtipo se presenta en un 80% a 85% de los casos y se divide histológicamente en adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes (Casagrande *et al.*, 2023; Kuśnierczyk, 2023).

Esta clasificación del cáncer de pulmón está basada en relacionar la morfología de las células tumorales con las características biológicas del tumor al que pertenece, esto ha favorecido la toma de decisiones en cuanto al tipo de terapia que se utiliza (Zheng, 2016). El cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) inicia comúnmente en las células

productoras de hormonas de pulmón, histológicamente son tumores malignos con células monomorfas y compactas, que presentan una alta relación núcleo-citoplasma y suelen presentar necrosis confluyente (Kahnert, Kauffmann-Guerrero y Huber, 2016). Por otro lado, las células de pulmón más grandes desarrollan otra clasificación de cáncer de pulmón, que comprende principalmente a los carcinomas pulmonares de células no pequeñas incluyendo así al carcinoma de células escamosas, el adenocarcinoma no mucinoso, el adenocarcinoma mucinoso y el carcinoma de células grandes (Geraldine, Bell y Wright, 2019).

El síntoma más común pero no más específico es la tos, los síntomas asociados incluyen hemoptisis, o dificultad para respirar, o síntomas sistémicos, incluyendo la anorexia o bajo peso que están relacionados con mayor probabilidad de padecer cáncer de pulmón (Kim, Lee y Huang, 2022). Por su parte, el tabaquismo es la principal causa de cáncer de pulmón, aunque el asbesto y contaminación por el tráfico también forman parte de factores de riesgo (Harðardóttir et al., 2022).

El cáncer de pulmón, sigue siendo la principal causa de muerte por cánceres en el mundo, con más de 1,761,000 muertes en 2018 (Oliver, 2022). En 2020, se registraron 7 mil 811 casos nuevos y 6 mil 733 muertes por cáncer de pulmón en México (INEGI, 2021). No obstante, la tasa de nuevos casos de cáncer de pulmón ha disminuido alrededor de 2% por año desde el año 2000, llegando a un aproximado de 53.1 casos por cada 100,00 personas en 2018. La tasa de muerte por cáncer de pulmón del 2014 al 2018 disminuyó aún más en un promedio de 4% por año llegando hasta 37 casos por cada 100,000 personas. En 2022, se estimaron más de 500,000 personas viviendo con cáncer de pulmón, la mayoría (55%) fueron mujeres. A pesar de que la mayor parte las mujeres son diagnosticadas con cáncer de mama, más mujeres mueren por cáncer de pulmón en Europa y el este de Asia (Oliver, 2022).

2.2.1 Diagnóstico de cáncer de pulmón

El diagnóstico oportuno puede llegar a salvar vidas; se considera como pacientes propensos a padecer esta enfermedad, aquellos que normalmente fuman más de 30 cajetillas al año y el riesgo aumenta después de los 25 años de mantener este hábito (Goebel *et al.*, 2019). Los nuevos procesos para la detección y seguimiento del cáncer de pulmón son inciertos y tienen tasas bajas (5% – 18% a nivel mundial); estos nuevos

procesos de detección funcionan bajo enfoques que no tienen prácticas claramente establecidas que logren guiar a un resultado concreto (Bernstein *et al.*, 2022).

Los pacientes sospechosos de cáncer de pulmón suelen presentar tos de tres semanas o más, disnea, dolor torácico, pérdida de peso, hemoptisis o fatiga. Su diagnóstico inicia en las pruebas de laboratorio, incluyendo un conteo completo de células, química sanguínea, niveles de calcio, pruebas de función renal y radiografía de tórax. Los pacientes que presentan marcadores específicos como aumento de EFGR reciben una tomografía computarizada con contraste intravenoso, idealmente se incluye el riñón y las glándulas adrenales (Arroyo-Hernández *et al.*, 2022; Kim, Lee y Huang, 2022).

Los métodos de diagnóstico actuales son los rayos-X, la broncoscopia, el análisis de esputo seguido por análisis citológico y la tomografía computarizada de baja dosis. Estos medios de diagnóstico pueden llegar a ser invasivos, tediosos o riesgosos para el paciente (debido a la exposición a la radiación); además de no tener la precisión deseada, que va del 34% al 88% (Haince *et al.*, 2022).

2.2.1.1 Diagnóstico por Tomografía Computarizada de Baja Dosis

La tomografía computarizada es la investigación principal tanto para el diagnóstico como la estadificación del cáncer de pulmón; sin embargo, algunos pacientes han sido diagnosticados con radiografías convencionales. Las neumonías de difícil tratamiento o los infiltrados que no desaparecen con el tratamiento son causa de sospecha del cáncer de pulmón. Las detecciones “por casualidad” representan un 5%-10% de los casos sintomáticos (Harðardóttir *et al.*, 2022).

Se ha demostrado de acuerdo con dos estudios aleatorios que la detección de cáncer de pulmón con tomografía computarizada de baja dosis (LDCT) reduce la mortalidad del cáncer de pulmón en pacientes con alto riesgo de malignidad pulmonar por la identificación de etapas tempranas del cáncer, cuando la cura local y el control es alcanzable. Sin embargo, en Estados Unidos, se han encontrado muchos retos para lograr un diagnóstico eficiente y seguimiento a la enfermedad en la población en general (Bernstein *et al.*, 2022).

2.2.1.2 Diagnóstico mediante análisis molecular

En los últimos años se busca diagnosticar tempranamente el cáncer de pulmón con metodologías no tan riesgosas o invasivas (como el lavado broncoalveolar o la LDCT);

utilizando como muestra de análisis aire exhalado, orina, esputo, aire exhalado condensado y sangre; el objetivo es identificar biomarcadores como proteínas, anticuerpos asociados a tumores, ADN circulante, células tumorales circulantes, miARN y ADN metilado, entre otros metabolitos (Haince *et al.*, 2022).

Dado que los metabolitos son los productos río abajo de las interacciones de componentes intracelulares, existe una gran relación entre los genes, las proteínas y los metabolitos. Por lo tanto, la huella de la metabolómica y sus cambios de características en procesos cancerígenos aporta pistas, acerca de qué metabolitos se estarán alterando y de qué forma lo harán. Es posible que de esta manera, en cáncer de pulmón, se pueda determinar la etapa y localización del adenocarcinoma sin utilizar métodos invasivos y riesgosos para el paciente (Haince *et al.*, 2022).

2.2.1.2.1 Diagnóstico por muestras sanguíneas y muestras de Fluido de Lavado Bronco Alveolar (BALF) mediante análisis de metabolitos

Las células circulantes de tumor (CTC), el ADN circulante de tumor (ADNct), los exosomas derivados de tumor, las plaquetas educadas de tumor (TEP) y los microARN se han identificado como biomarcadores sanguíneos. Las CTC se han asociado ligeramente con la metástasis de cáncer de pulmón, es decir, la enfermedad en etapas avanzadas. El ADN circulante de tumor es una cadena sencilla o doble que deriva de las células tumorales que comienzan a morir en sangre y los exosomas pueden brindar información relevante de la porción intracelular. Finalmente las TEP y los miARN muestran información relevante acorde a la señalización y comunicación celular, especialmente del tipo sináptica (Mamdani *et al.*, 2017).

Se han identificado hasta 25 biomarcadores moleculares que diferencian a los pacientes con NSCLC de pacientes no fumadores sanos, fumadores y asmáticos, dentro de estas moléculas se lograron identificar a IL-7, IL-10, SAA, MMP-9, IL-8, Gro, MIG, Rantes, TNFRI, resistina, sCD40L, ya que su concentración en suero se elevó más del 50% en pacientes con cáncer que en pacientes sanos; sin embargo, se concluyó que la concentración de estas moléculas también podría estar afectada en otros tipos de cáncer y no solo en cáncer de pulmón (Goebel *et al.*, 2019).

Utilizando plasma como muestra experimental, se identificaron al ácido palmítico, el ácido heptadecanoico, la ornitina, el ácido tridecanoico y el ácido esteárico como los metabolitos más adecuados para el diagnóstico diferencial de fases del NSCLC; la mayoría de los ácidos grasos disminuyeron debido al exceso de energía que demandan las células cancerígenas, sin embargo, no se han reportado cambios de concentración con diferencias significativas. También se identificaron varios aminoácidos involucrados; resultando en que la asparagina, histidina, fenilalanina, serina, metionina, lisina, leucina, treonina, triptófano y prolina se incrementaron en plasma de pacientes enfermos; mientras que, la arginina y glutamina disminuyeron (Qi *et al.*, 2021).

En un estudio de asociación del metaboloma, realizado por Pamungkas y colaboradores, se identificaron cambios en las concentraciones plasmáticas de ácido linoleico, 5-metiltetrahidrofolato y N-succinil glutamato-5-semialdehído, las cuales se encontraban elevadas en pacientes con mutaciones en el EGFR; mientras que la concentración de tetradecanoil carnitina se vio reducida. Esto sugiere que dichos compuestos pueden identificarse como biomarcadores asociados a una mutación de EGFR y de esta manera este grupo de moléculas podrían servir como herramienta de diagnóstico de cáncer de pulmón en un futuro (Pamungkas *et al.*, 2017).

Gracias a los avances en secuenciación como las técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) o la secuenciación de Nueva Generación (NGS), se han encontrado múltiples mutaciones en células transformadas por el cáncer de pulmón. Dentro de estas mutaciones se incluyen alteraciones en los genes EGFR, ALK, ROS1, KRAS, HER2, MET, RET y FGFR (Mamdani *et al.*, 2017). Las mutaciones más comunes que se han identificado y seleccionado para el tratamiento de los pacientes de cáncer de pulmón están presentes en los genes EGFR, ALK y PD-L1 (Deshpand, Chandra y Rauthan, 2022).

Los micro ARN (miARN) maduros en conjunto con un complejo de silenciamiento de ARN contribuyen a la regulación de la expresión génica. Se ha demostrado que ciertos miARN circulantes son biomarcadores eficaces para el diagnóstico y seguimiento de la tumorigénesis. Se han analizado cinco miARN circulantes (miR-92a, miR-140-5p, miR-331-3p, miR-223, miR-374a) que participan en la patogénesis del cáncer de pulmón, esto demuestra un alto potencial como molécula de diagnóstico de cáncer de pulmón (Zhang *et al.*, 2020).

A partir del análisis de fluido de lavado bronco alveolar se encontró, mediante espectrometría de masas de cuadrupolo de infusión directa por ionización de electrospray y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), que los aminoácidos, las carnitinas, los lisofosfolípidos, los fosfolípidos, fosfoetanolaminas y fosfoetanolaminas plasmalógenas se ven alteradas en pacientes con cáncer de pulmón. Dentro de estos compuestos se identificaron la serina, valina, colina, creatina, urea, glutamato arginina, ácido láctico, ácido acético, glicerol, ácido fosfórico, ácido palmítico, colesterol, entre otros. Las rutas metabólicas de parte de estos compuestos se vieron alteradas en cáncer de pulmón, dentro de estos metabolismos se encuentran: el aumento de glutamina y glutamato; el metabolismo de glicina, serina y treonina; de piruvato; alanina, aspartato y glutamato; galactosa y, finalmente, de arginina y prolina; así como la disminución del metabolismo glicerofosfolípidos (Callejón-Leblic *et al.*, 2016).

En el año 2019, el grupo de investigación de Tang y colaboradores describió y comparó los principales parámetros para el descubrimiento de biomarcadores de cáncer de pulmón, mencionaron también que los análisis para la identificación de biomarcadores deben contar con una población bien definida y con baja variación entre individuos, además, las moléculas deberán ser estables, presentar un cambio significativo entre pacientes enfermos y no enfermos y poseer propiedades cuantificables. Los autores describen que, la resonancia magnética nuclear, la espectrometría de masas, la cromatografía de gases acoplada a masas y la cromatografía líquida acoplada a masas forman el complejo principal de análisis instrumentales utilizados para la identificación de biomarcadores. En la revisión Tang y colaboradores señalan que desde 2009 y hasta 2019 fueron identificados 213 metabolitos significativos, pero concretamente, las rutas metabólicas alteradas convergen en el metabolismo de la glicina, serina y treonina; así como el metabolismo de la alanina, aspartato y glutamato; y la biosíntesis de valina, leucina e isoleucina (Ray *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2019).

Los pacientes de cáncer de pulmón presentan estos cambios en rutas metabólicas normalmente incrementando su actividad, involucrando el metabolismo de azúcares como la sacarosa, la galactosa, fructosa, degradación de la manosa, el metabolismo de las purinas y triptófano. Existen aminoácidos como la valina, leucina e isoleucina (relacionados a la producción de energía y regulación de rutas de señalización celular de síntesis de

proteínas y lípidos, crecimiento celular y autofagia) que se encuentran en concentraciones elevadas en pacientes de cáncer de pulmón, mientras que otros aminoácidos como la cisteína y la serina se encuentran en concentraciones menores en pacientes con esta enfermedad (Zhang *et al.*, 2022; Casagrande *et al.*, 2023).

2.2.1.2.2 Metabolismo de cisteína y serina

La cisteína y la homocisteína son aminoácidos semi-esenciales, producidos a partir de la metionina y cuyo radical tiol (-SH) permite formar múltiples tipos de enlaces. Se condensa con la serina por medio de la enzima cistationina β -sintasa (CBS). En el cuerpo, la mayor parte de cisteína y homocisteína se oxida rápidamente al reaccionar con otras moléculas con un grupo tiol libre y el resto se presenta en forma reducida. Sus concentraciones en plasma normales suelen ser de 240-360 μ M y 12-15 μ M respectivamente (Rehman *et al.*, 2020).

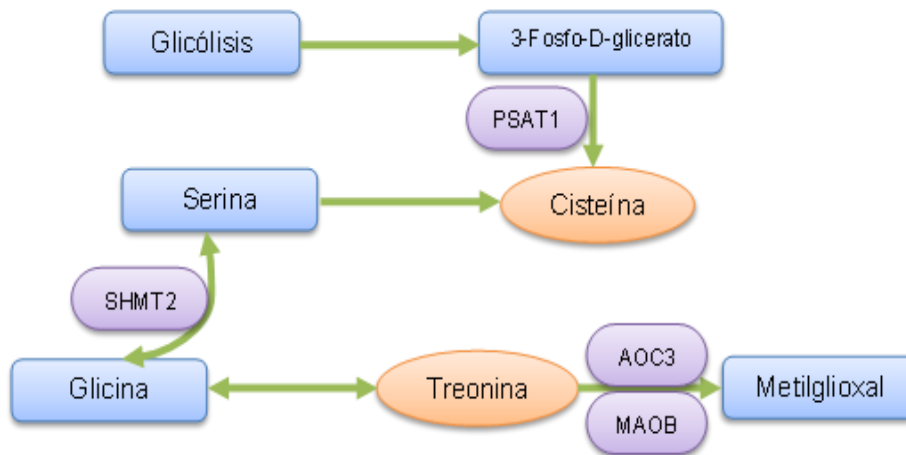


Figura 2. Mapa de vías importantes en el diagnóstico de cáncer de pulmón (Traducido de Zhang *et al.*, 2022).

El análisis del metaboloma y transcriptoma en suero de pacientes con cáncer de pulmón ha revelado alteraciones en el metabolismo de la glicina, la metionina, cisteína y treonina (Figura 2). La treonina se ha asociado a distintas funciones fisiológicas: tiene un impacto significativo en la regulación del sistema inmune, se relaciona con la expresión de citocinas inflamatorias y puede que el consumo de treonina en la dieta establezca una zona de confort del sistema inmune. En cambio, la cisteína funciona como sustrato para la producción de

sulfuro de hidrógeno (H₂S), el cual provee energía para la cadena de transporte mitocondrial para estimular así la vía bioenergética de las células cancerígenas (Zhang *et al.*, 2022).

La cisteína participa en múltiples procesos biológicos como la biosíntesis de lípidos, formación de músculo esquelético, organelos celulares, queratina, entre otros. Su concentración se encuentra aumentada en distintos padecimientos tales como la hiperhomocisteinemia, choque isquémico, desórdenes neuronales, diabetes, disfunción renal, vitíligo, carcinoma de células renales, cáncer colorrectal, del tracto digestivo y de pulmón (Rehman *et al.*, 2020). Como se mencionó anteriormente, el grupo tiol de la cisteína resulta muy importante al facilitar las reacciones redox del cuerpo y por consecuencia la transferencia de energía, se sugiere que muchos tumores mantienen una alta reserva de cisteína principalmente mediante dos mecanismos: la captación de cistina y la síntesis *de novo* de cisteína (Yoon *et al.*, 2023).

La síntesis *de novo* de cisteína sucede por un proceso llamado transulfuración. A partir de la homocisteína (proveniente de la dieta) y la serina por medio de la cistationina β-sintasa (CBS) se obtiene la cistationina y en una reacción (pobrementemente caracterizada) con la cistationina γ-liasa (CSE) se convierte en cisteína. Sin embargo, se ha demostrado que en una serie de tumores la reserva de cisteína no proviene de la transulfuración, si no a partir de la cistina por medio del transportador xCT. También fue demostrado que las enzimas CBS y CSE (dependientes del piridoxal 5-fosfato (PLP)) y la enzima 3 - mercaptopiruvato sulfotransferasa (3-MST) (independiente de PLP), juegan un papel muy importante en la generación de H₂S que puede resultar tóxico en altas concentraciones en tejidos epiteliales (Yin *et al.*, 2016; Yoon *et al.*, 2023).

2.2.1.2.3 Metabolismo de sulfuro de hidrógeno

El sulfuro de hidrógeno de manera endógena participa en procesos antiinflamatorios, antioxidantes y como agente neuroprotector (Yin *et al.*, 2016). El metabolismo del sulfuro de hidrógeno involucra a la cisteína como sustrato y también a la homocisteína o α-cetoglutarato como cosustratos. Los procesos en los que se encuentra involucrado son el metabolismo energético de la mitocondria, modificación postraduccional de proteínas por la S-sulfohidratación en el sistema cardiovascular y el metabolismo de los lípidos. Una deficiencia de CBS se relaciona con la expresión aumentada de citocinas proinflamatorias (Blachier, Andriamihaja y Blais, 2020). Anteriormente se concluyó mediante un análisis *in*

vitro que la inhibición de CSE mediante DL-propargilglicina o β -ciano-L-alanina en presencia de cisteína como sustrato inhibía la producción de H₂S en dos líneas celulares tipo endotelial, dentro del mismo estudio se encontró que la actividad enzimática depende del tipo de célula utilizada (Kantha *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que los tumores de adenocarcinoma de pulmón y células cultivadas *in vitro* expresan un alto nivel de enzimas productoras de H₂S (CBS, la CSE y 3-MST); también se ha relacionado que la reparación del ADN mitocondrial está de cierta manera regulada por el H₂S y a su vez este compuesto potencia la formación de un complejo de reparación del ADN mitocondrial. El H₂S mantiene una demanda energética constante en células de adenocarcinoma de pulmón. Finalmente, la inhibición de las enzimas productoras de H₂S sensibiliza a los tumores y células de adenocarcinoma al tratamiento con quimioterapia (Szczesny *et al.*, 2016).

2.3 Cáncer de pulmón neuroendócrino

Dentro de la clasificación de cáncer de pulmón se han identificado tumores que muestran características neuroendócrinas. Los tumores neuroendócrinos (TNE), aquellos que poseen más de 30% de células neuroendócrinas, llegan a presentarse en un 20% a 25% del total de cánceres de pulmón. Se caracterizan por tener un patrón de crecimiento organoide (células neoplásicas que se encuentran organizadas en lóbulos con una alta cohesión), un patrón de cromatina de gránulos finos estilo “sal y pimienta” y expresan marcadores neuroendócrinos (NE) distintivos, como son la cromogranina A, la sinaptofisina y la proteína CD56 (Diaz-Perez *et al.*, 2012; Zheng, 2016).

La morfología es el principal criterio de diferenciación para TNE: sus células poseen morfología blanda, membranas nucleares delgadas, cromatina granulada tipo sal y pimienta, ausencia de nucleolo y otras formas de organización; estas características son observadas en biopsias. Pueden presentar patrones de células fusiformes, neoplasias de células fusiformes de bajo grado y arquitectura papilar (Rekhtman, 2022).

Las células pulmonares transdiferenciadas a un fenotipo neuroendócrino (NED) en estudios *in vitro*, tienen la característica de que poseen bajas tasas de proliferación, se observa morfología poligonal, tienen una alta capacidad regenerativa y su tejido adquiere plasticidad. Estas células son más grandes en comparación a las células tumorales de

pulmón y presentan estructuras morfológicas que se relacionan con las estructuras neuronales, tales como, las neuritas (Mendieta *et al.*, 2021).

Se ha encontrado que las células pulmonares neuroendócrinas (PNEC) son el primer tipo de célula especializada en aparecer en el pulmón y participan en múltiples funciones, tales como la modulación de las respuestas inmunitarias, la detección de oxígeno en vías respiratorias, la redistribución de la sangre en los pulmones o el mantenimiento de un cúmulo de células madre; aunque también se han asociado a problemas pulmonares (Iyoda, Azuma y Sano, 2020). Generalmente los marcadores de este tipo de células se encuentran en cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), aunque se ha logrado transdiferenciar y caracterizar este fenotipo generadas a partir de células A549 de adenocarcinoma de cáncer de pulmón (Mendieta *et al.*, 2021). La investigación guiada hacia el campo de las neoplasias de pulmón neuroendócrinas ha sido limitado en los últimos años, estas neoplasias representan el 20% de los tumores primarios de pulmón, cerca de 2% los carcinoides (tumores neuroendócrinos) y el 3% los carcinomas neuroendócrinos de células grandes (Rekhtman, 2022).

2.3.1 Clasificación de tumores neuroendócrinos

Actualmente los tumores neuroendócrinos se clasifican en cuatro grandes categorías, las cuales son el carcinoide típico (TC), el carcinoide atípico (AC), el carcinoma neuroendócrino de células grandes (LCNEC) y el carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC-C). Los tumores carcinoides tienen morfología neuroendócrina y patrones de crecimiento característicos (roseta, trabeculares, organoides, entre otros). Los tumores neuroendócrinos de pulmón son diferentes a los tumores neuroendócrinos gastrointestinales, aunque la clasificación TC y AC provenga de este tipo de tumores. Su diagnóstico se lleva a cabo por medio de técnicas de inmunquímica en muestras de biopsias (Zheng, 2016; Iyoda, Azuma y Sano, 2020). Debido a que la tasa de proliferación de estos tumores brinda información relevante para el pronóstico de la enfermedad, se ha utilizado este parámetro y la presencia (o ausencia) de necrosis para dividir a los TNE en tres grados de importancia pronóstica; los TNE de bajo grado son el TC, los de grado medio el AC y los de grado alto los SCLC-C y LCNEC; este último es un tumor altamente agresivo, solo el 30% de pacientes con este tipo de tumor alcanzan una tasa de supervivencia de cinco años (Zheng, 2016).

Mientras que la disminución de la incidencia de carcinomas neuroendócrinos se asocia con la disminución del consumo de cigarrillos; la incidencia de los carcinoides ha aumentado y esto puede deberse al incremento en el uso de la imagen de tomografía computarizada (TC). Sin embargo, la principal causa de que la incidencia de los LCNEC haya aumentado es porque se ha empezado a reconocer esta entidad (Rekhtman, 2022).

2.3.2 Marcadores para tumores neuroendócrino

Para diferenciar estos tumores de otros, uno de los principales criterios de diferenciación para los carcinoides de pulmón son el conteo mitótico por 2mm² y la presencia de necrosis. A pesar de esto, la característica que mejor los distingue es mayormente la morfología y en parte las tasas de replicación, así mismo, Ki67 es un marcador estándar para el grado de los TNE digestivos. La metástasis de los tumores de pulmón comúnmente se dirige hacia huesos y cerebro, cosa que no sucede en los del tracto digestivo. Se han descrito algunos marcadores inmunohistoquímicos, los más significativos en la actualidad son la sinaptofisina (Syn), la cromogranina A (CgA) y el NCAM1 (CD56), este último se utiliza más en pulmón que en próstata; en los últimos años también se ha identificado a POU2F3 como un nuevo marcador para el diagnóstico e identificación de TNE que expresan poco o no expresan los otros biomarcadores (Rekhtman, 2022). POU2F3 es un importante factor de transcripción implicado en la diferenciación de las células de penacho y se ha identificado que se expresa fuertemente en líneas celulares de SCLC-C (Koh *et al.*, 2023). Por último, se ha utilizado el ASCL1 como muy buen marcador en inmunohistoquímica y aunque es específico para la diferenciación neuroendócrina, no se expresa en los distintos tipos de carcinoides (Rekhtman, 2022).

Se ha complementado la metodología de diagnóstico de TNE mediante inmunohistoquímica con el marcador de proliferación celular Ki67, que brinda información útil al analizar muestras pequeñas. Este marcador es un inmunomarcador celular utilizado para evaluar la proliferación, es comúnmente utilizado para realizar diagnóstico en neoplasias y como herramienta de pronóstico; es una proteína nuclear con función de regulación celular que se encuentra a lo largo de todo el ciclo celular, excepto en la fase G0, y se ve aumentada su expresión cuando se estimulan células con factores de crecimiento (Castro-Ortega *et al.*, 2019). La Tabla 1 muestra hallazgos importantes para la diferenciación de TNE (Zheng, 2016).

Tabla 1. Hallazgos en el diagnóstico de tumores neuroendócrinos (Zheng, 2016).

	Carcinoide típico (CT)	Carcinoide atípico (CA)	SCLC-C	LCNEC
Morfología neuroendócrina	Células monótonas arregladas en nidos organoides, palizada, rosetas y trabecular	Células monótonas arregladas en nidos organoides, palizada, rosetas y trabecular	Tamaño celular pequeño, finos gránulos de cromatina, nucleolo discreto y citoplasma escaso	Tamaño celular grande, presencia frecuente de nucleolo, citoplasma abundante
Mitosis por 2mm ²	<2	2 – 10	>10, usualmente >60	>10, usualmente >30
Índice de proliferación Ki67	≤4-5%	≤20-25%	>50%	Usualmente >40%
Necrosis	No	Focal o puntual	A menudo ampliamente presente	A menudo ampliamente presente
Expresión de marcadores neuroendócrinos	Si	Si	Si, raramente negativo	Si
Grado	Bajo grado	Grado intermedio	Alto grado	Alto grado

A pesar de que el marcador índice de proliferación Ki67 se ha propuesto como criterio de diagnóstico para los carcinoides neuroendócrinos de cáncer de pulmón, se ha encontrado su expresión elevada en cáncer de mama y cáncer de próstata (Castro-Ortega *et al.*, 2019). De manera similar, el factor de transcripción POU2F3 también se encuentra sobreexpresado en carcinomas neuroendócrinos extrapulmonares, principalmente en el tracto genitourinario, cabeza y cuello, tracto ginecológico y tracto hepatopancreatobiliario;

por lo que no se podría considerar cómo único criterio de diferenciación de tumores pulmonares neuroendócrinos ya que se ha observado que no se expresa en todos los TNE (Koh *et al.*, 2023). También se han identificado este tipo de tumores con el marcador enolasa neuronal específica (NSE), una proteína secretada por las células que han pasado por una diferenciación neuroendócrina; este biomarcador fue uno de los primeros en ser utilizados para identificar la diferenciación neuroendócrina (Addis, 1995; Arman y Nelson, 2022).

La NSE se considera el marcador tumoral más fiable para diagnóstico, pronóstico y seguimiento del SCLC, ya que su incremento puede cuantificarse en líquidos corporales como el suero; sin embargo, también se ha reportado un incremento en casos de NSCLC, neuroblastoma en todas las etapas, melanoma, seminoma y carcinoma de células renales; sin embargo, se considera un marcador altamente específico de neuronas y tejido neuroendócrino periférico, razón por la que se usa para identificar TNE (Isgrò, Bottoni y Scatena, 2015).

2.3.3 Transdiferenciación a fenotipos neuroendócrinos

Se han reportado casos clínicos de transdiferenciación de adenocarcinomas de SCLC y NSCLC, y a pesar de ser un evento poco frecuente, este puede suceder luego de algunas terapias dirigidas a receptores de la señalización celular como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR). Se ha sugerido que este tratamiento vuelve más agresivo al cáncer en el paciente, con menor sensibilidad a los fármacos y un peor pronóstico (Ishioka *et al.*, 2021). La formación de TNE se ha observado frecuentemente en áreas fibrosas del pulmón y desde hace más de 20 años se confirma con la producción de hormonas (hormona antidiurética u hormona adrenocorticotrófica) (Addis, 1995). Este proceso ha sido reportado escasamente en el cáncer de pulmón; sin embargo, alcanza un máximo de 20% de los casos de NSCLC. En tumores basaloideos de pulmón, se ha encontrado que la desregularización de la ruta de señalización NOTCH contribuye a la diferenciación NED, ya que promueve la expresión del gen ASCL1, un marcador NED ya antes mencionado (Keyhanian *et al.*, 2022).

Mediante ensayos *in vitro*, nuestro grupo de investigación y otros han demostrado que al elevar la concentración intracelular de AMP cíclico (AMPC) por más de 72 horas con el agonista de la adenilato ciclasa: forskolina (FSK) y el inhibidor de la fosfodiesterasa: 3-

isobutil-1-metilxantina (IBMX) en células de adenocarcinoma de pulmón A549, las células desarrollan proyecciones tipo neurita y aumentan su tamaño. Además, se reportó que luego de 120 horas se genera un fenotipo terminal (A549_{NED}), observado al retirar el tratamiento; dicho fenotipo sobreexpresa marcadores los neuroendócrinos CgA y Syn, y con un cambio de producción de aminas biógenas; sugiriendo la transdiferenciación al fenotipo neuroendócrino.(Mendieta *et al.*, 2018, 2021).

2.3.3.1 Neurotransmisores en A549_{NED}, tirosina y triptófano

La generación del fenotipo neuroendócrino en células A549, cambia la expresión de aminas biogénicas, el grupo control, es decir, las células que no han sido transdiferenciadas producen epinefrina (EP) y dopamina (DA), sin producir serotonina (5-HT) y NSE, mientras que el fenotipo A549_{NED} disminuye la producción de EP, suprime la producción de DA y aumenta la producción de 5-HT, además de ahora expresar NSE (Mendieta *et al.*, 2018).

La biosíntesis de aminas biogénicas inicia con la captación de L-tirosina por las células, misma que puede obtenerse con la ingesta en la dieta o debido a la conversión de fenilalanina mediante la enzima fenilalanina hidroxilasa (Berends *et al.*, 2019). La tirosina hidroxilasa (TH) forma parte de las enzimas biosintetizadoras de catecolaminas, participando en la conversión de tirosina a 3,4-dihidroxi-fenilalanina (DOPA) en las neuronas catecolaminérgicas periféricas y centrales, ésta es una enzima limitante en la síntesis de catecolaminas (Iwase *et al.*, 1994; Berends *et al.*, 2019; Maneu *et al.*, 2023).

Se ha encontrado que la TH existe en células que sintetizan catecolaminas (neuroblastoma, células paraganglioma y feocromocitoma) y tejidos normales de glándulas adrenales, el grado de TH está correlacionado a su actividad con el tumor, en todas las muestras dónde se encontró TH se encontró también NSE (Iwase *et al.*, 1994). Estudios han demostrado que estimular prolongadamente la biosíntesis de catecolaminas provoca la transcripción del gen TH por medio de vías dependientes de AMPc favoreciendo la síntesis de la enzima (Berends *et al.*, 2019).

Además, se encontró que después de inducir la diferenciación de células madre mesenquimales a neuronas dopaminérgicas *in vitro* mediante el factor hedgehog, el factor de crecimiento de fibroblastos 8 y el factor de crecimiento de fibroblastos básicos, se encontró que las células tratadas expresaron proteínas neuronales como la NSE, la proteína 2 asociada a microtúbulos, la TH y el transportador vesicular de monoaminas-2 en

distintos grados. En este caso, la expresión de TH fue mucho más alta que otros marcadores, favoreciendo también la síntesis de catecolaminas como la epinefrina, norepinefrina y dopamina (Fu *et al.*, 2013).

La síntesis de 5-hidroxitriptamina (5-HT; serotonina: uno de los neurotransmisores más importantes), es mediada por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH) a partir del aminoácido triptófano (Trp), este aminoácido produce una serie de metabolitos involucrados en procesos patológicos como excitotoxicidad, neuroinflamación, estrés oxidativo, daño mitocondrial, enfermedades psicológicas y se relaciona altamente con trastornos neurodegenerativos como el Alzheimer. El metabolismo del triptófano enlaza distintos sistemas (como la respuesta inmune y el sistema nervioso) (Li *et al.*, 2022; Mühlethaler-Mottet *et al.*, 2022).

Dos subtipos de TPH se han identificado: TPH1, la cual se encuentra en células enterocromafines, bazo, timo y glándula pineal y TPH2, que se localiza en células neuronales centrales. La producción de 5-HT se lleva a cabo en su mayoría en células enterocromafines (EC) (Li *et al.*, 2022).

Debido a que las concentraciones de sulfuro de hidrógeno y la expresión de enzimas son diferentes según el estado fisiológico (células sanas contra células de cáncer o contra células de cáncer transdiferenciadas). Se propuso identificar la relación que existe entre este metabolito y las enzimas involucradas en su síntesis (CBS, CSE), así como estudiar la expresión de las enzimas productoras de aminas biogénicas TH, TPH1 y TPH2 tras el proceso de transdiferenciación de células de adenocarcinoma de pulmón A549. El estudio comparativo de estos metabolitos nos permite proponerlos como biomarcadores. Dado que estas moléculas no requieren una identificación vía inmunohistoquímica, un biomarcador con estas condiciones permitiría realizar una prueba menos invasiva, esto disminuiría las molestias de diagnóstico para el paciente, así como los costos de hospitalización.

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte entre los cánceres a nivel mundial. El diagnóstico de esta enfermedad es poco oportuno y en el caso de tumores neuroendócrinos es inespecífico, esta situación complica el pronóstico del paciente, disminuyendo la oportunidad de aplicar tratamientos efectivos en etapas tempranas del cáncer. Actualmente, los métodos de diagnóstico utilizados son bastante invasivos, dolorosos e incluso pueden poner en riesgo a los pacientes sanos (como aquellas tecnologías que utilizan radiación).

La presencia de tumores neuroendócrinos empeora el pronóstico del paciente y en la actualidad, los pocos casos identificados son diagnosticados utilizando muestras de tejido y técnicas de inmunohistoquímica, elevando los costos de diagnóstico e incomodando al paciente.

El estudio de un fenotipo neuroendócrino de cáncer de pulmón resulta una herramienta importante y novedosa para la comprensión del comportamiento de los TNE, realizarlo mediante el estudio de transcritos y aminoácidos apoya al objetivo de cada día generar métodos de diagnóstico menos invasivos o agresivos. Sumado a esto, evaluar el papel que juegan las enzimas participantes en la síntesis de aminas biogénicas o aquellas que se involucran en la síntesis de sulfuro de hidrógeno ayudará a entender qué tipo de cambios en la producción de estas moléculas sufren las células al ser transdiferenciadas.

El sulfuro de hidrógeno, que es producto de la actividad de las enzimas cistationina β -sintasa y cistationina γ -liasa con la cisteína como principal sustrato, está involucrado en múltiples procesos, principalmente en proteger a la célula del estrés oxidativo, que favorecería la tumorigénesis. La síntesis de norepinefrina y dopamina, dos aminas biogénicas que muestran cambios de concentración después de la transdiferenciación en células de cáncer de pulmón, está altamente mediada por la enzima tirosina hidroxilasa y, finalmente, la serotonina que tiene como primer sustrato al triptófano depende de la enzima triptófano hidroxilasa para llevar a cabo su síntesis en células neuronales y células enterocromafines.

Estudiar los cambios en la expresión de enzimas productoras de aminas biogénicas y de sulfuro de hidrógeno, así como la concentración de este gas, en la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549 y en su fenotipo neuroendócrino permitirá reconocer que

existen procesos que modifican el metabolismo de estas moléculas en las células tras la transdiferenciación celular; de esta manera será posible identificar a este grupo de moléculas como potenciales biomarcadores de células neuroendócrinas de adenocarcinoma de pulmón.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las enzimas tirosina hidroxilasa, triptófano hidroxilasa, cistationina β -sintasa, cistationina γ -liasa y el sulfuro de hidrógeno serán biomarcadores del fenotipo neuroendócrino de las células de adenocarcinoma A549 del cáncer de pulmón?

5. HIPÓTESIS

Las enzimas tirosina hidroxilasa, triptófano hidroxilasa, cistationina β -sintasa, cistationina γ -liasa y el sulfuro de hidrógeno son biomarcadores efectivos del fenotipo neuroendócrino de cáncer de pulmón.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Determinar la expresión de TH, TPH1, TPH2, CBS, CSE y concentración de H₂S presentes en células de adenocarcinoma A549_{CTRL} y A549_{NED} para conocer su papel como biomarcadores del fenotipo neuroendócrino de adenocarcinoma A549 de cáncer de pulmón.

6.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración de tirosina hidroxilasa, triptófano hidroxilasa, cistationina γ -liasa y cistationina β -sintasa mediante RT-PCR en células A549 y A549_{NED}.
- Determinar la concentración de sulfuro de hidrógeno en células A549 y A549_{NED} por medio del método de azul de metileno, un ensayo espectrométrico.
- Evaluar el papel del cambio de expresión de las enzimas y concentración de sulfuro de hidrógeno entre ambos fenotipos celulares y describir si pueden proponerse como nuevos biomarcadores del fenotipo neuroendócrino.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diseño experimental

Se utilizaron células de adenocarcinoma de pulmón A549, en un 80% de confluencia. A partir de dicha confluencia, se clasificaron en dos grupos (Figura 3. Diseño experimental. Creado en Biorender.com. El grupo 1: células A549_{CTRL} con medio DMEM sin SFB, el grupo 2: A549_{NED} con medio DMEM sin SFB. El grupo 2, el grupo experimental, se obtuvo luego de someter un cultivo celular a una confluencia de 80% al tratamiento de transdiferenciación; el cual consta de 3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX, Sigma-Aldrich) 0.5 mM y forskolina (FSK, Sigma Aldrich) 0.5 mM en DMEM sin SFB por 72 horas. A partir de estos grupos se realizaron los análisis de cuantificación de sulfuro de hidrógeno por el método de azul de metileno y el análisis de expresión de las enzimas CBS, CSE, TH, TPH1 y TPH2 por RT-PCR.

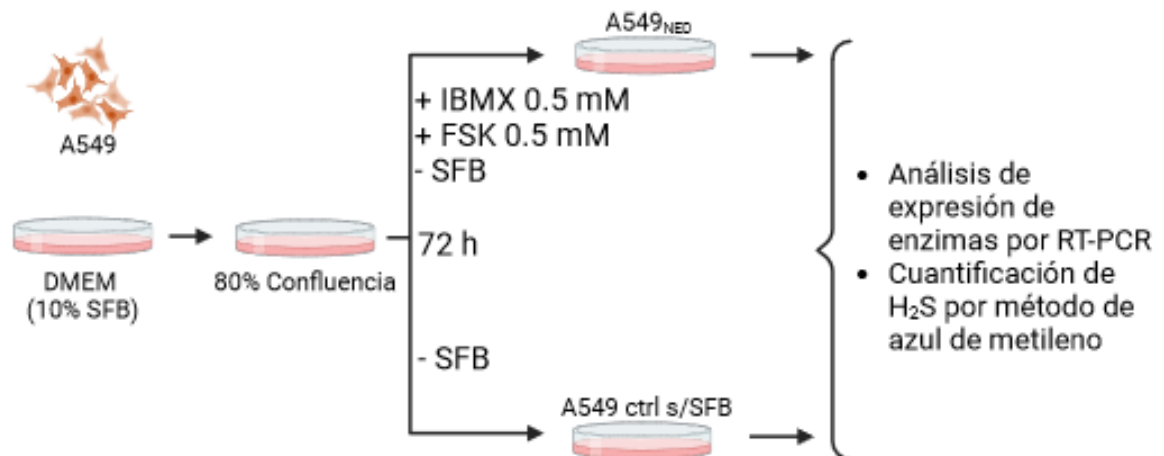


Figura 3. Diseño experimental. Creado en Biorender.com

7.2 Desarrollo experimental

7.2.1 Cultivo celular

Se utilizaron células A549 (ATCC CCL-185) a partir del pase 5. El cultivo celular fue llevado a cabo utilizando medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM-High glucose) (Gibco 11995-065), suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) (Gibco 26140-079), con 1% de penicilina-estreptomina (Gibco 15140) a 37°C en una atmósfera de 5% dióxido de

carbón. La población celular sembrada en placas de cultivo (NEST 703001,712001) se dividió cada tres o cuatro días para mantener una confluencia celular óptima (80%) (Mendieta *et al.*, 2021).

Proliferación celular

En placas de 24 pocillos, se sembró una densidad de 7×10^4 células por pozo, por triplicado, para cinco días de ensayo (18 pozos en total). Se incubó a 37°C con atmósfera de 5% CO_2 y llevó a cabo el conteo celular cada 24 horas, se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X) y añadieron 250 μL de tripsina-EDTA 0.25% (Gibco 25200072) y luego de incubar por 5 minutos, se agregaron 250 μL de medio DMEM (10% SFB); se disgregaron las células utilizando una pipeta y extrajeron 50 μL para mezclarlos con 200 μL de PBS, el conteo fue realizado en cámara de Neubauer según las instrucciones del fabricante, utilizando como colorante de contraste azul tripano (0.4%) (Sigma-Aldrich T8154). Los datos obtenidos se graficaron y se realizó una curva de crecimiento celular y obtuvo el tiempo de duplicación de acuerdo con la Ecuación 1.

Ecuación 1 Tiempo de duplicación celular

$$T_d = \frac{\ln(2) * t}{\ln\left(\frac{X_f}{X_0}\right)}$$

Dónde:

Td: Tiempo de duplicación

t: Tiempo (en horas)

Xf: Número de células final

X0: Número de células inicial

7.2.2 Diferenciación neuroendócrina

Se cultivó la línea celular estable A549 de adenocarcinoma de pulmón en DMEM completo (10% SFB, estreptomina/penicilina) a 37°C y 5% atmósfera de CO_2 . Se sembró en una placa p100 (Corning 353001) una densidad de 5×10^6 células/placa. Luego de 24 horas de cultivo, se lavó con PBS 1X y añadió el tratamiento de IBMX (Sigma 28822-58-4) 0.5 mM y FSK (MedChem HY-15371) 0.5 mM en medio fresco sin SFB. Transcurridas 48 horas, se aspiró el medio de cultivo para eliminar células muertas y repitió el tratamiento anterior en medio fresco sin SFB. El tratamiento se mantuvo hasta alcanzar las 72 horas; el seguimiento fue llevado a cabo mediante la evaluación de los cambios en la morfología

(generación de proyecciones tipo neuritas y redondeamiento del cuerpo celular) con microscopía óptica (Mendieta *et al.*, 2021).

7.2.3 Análisis de expresión de enzimas por RT-PCR

Se analizó la expresión de enzimas por RT-PCR mediante el siguiente protocolo.

La extracción de ARN total se llevó a cabo utilizando el kit Direct-zol RNA Miniprep kit de Zymo Research (R2072); para la generación del ADN complementario (ADNc) se utilizó el kit Revert Aid First Strand cDNA (Thermo Scientific K1621). Para la reacción en cadena de la polimerasa se usó GoTaq Green Master Mix (Thermofisher K0252); el control negativo fue realizado con agua libre de nucleasas y el oligo correspondiente a la proteína β -Actina. Todos los kits se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los oligonucleótidos para la reacción se muestran en la tabla 2, los títulos marcados con un * fueron diseñados con el servidor Primer3Plus y Ensembl, fueron evaluados utilizando el servidor USCS In-Silico PCR utilizando el genoma humano completo actualizado en 2022 (The Regents of the University of California). La síntesis de los oligonucleótidos fue llevada a cabo por la empresa OligoT4.

La reacción de PCR fue llevada a cabo en un termociclador (Bio-Rad T100 Thermal Cycler) bajo las siguientes condiciones: El ciclo se programó inicialmente a 95°C por 5 minutos para la primera extensión, *95°C por 30 segundos, 10 segundos por cada 100 pb del producto de la reacción y la T_m seleccionada para la etapa de hibridación y 72°C por 60 segundos para la fase de extensión* (de * a * indica un ciclo), finalmente 72°C por 5 minutos para culminar la reacción; se programaron 35 ciclos para cada gen seleccionado.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en RT-PCR

Enzima	Sentido	Antisentido	Tamaño	Tm(°C)
CBS*	5'-GGCTCCCTTCTCCAACAGTT-3'	5'-TCGTTCTGGGCATGTGTGAG-3'	523 pb	58.5
CSE*	5'-GGGGTTTCACTAGTTGGCCA-3'	5'-TTCGAATCCTCCAAGCTCT-3'	219 pb	60.8
TPH2*	5'-AGCACGCCCTTCTGACAAG-3'	5'-CCAAGCCATGACACAGAAGGT-3'	539 pb	58.3
TPH1*	5'-ACCCTGCTGTCTTTGTTGCT-3'	5'-TTCCTCCCCTTTCTGCAGC-3'	557 pb	62.0
TH*	5'-TTGCTGAGATCGCCTTCCAG-3'	5'-TCTCCTGTTGTGCCAAGGTC-3'	562 pb	58.3
CgA ¹	5'-AACCGCAGACCAGAGGACCA-3'	5'-GTCTCAGCCCCGCCGTAGT-3'	102 pb	60.4
Syn ²	5'-CTGCTGCAATGGGTGTTTCG-3'	5'-CCGTGGCCAGAAAGTCCAG-3'	349 PB	60.2
β-Actina ²	5'-CCATCATGAAGTGTGACGTTG-3'	5'-ACAGAGTACTTGCCTCAGGA-3'	197 pb	58-64

¹(Fosado *et al.*, 2023), ²(Soto-Hernández, 2022)

La evaluación de los productos de la reacción se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en TAE 1X (Invitrogen 24710-030), este proceso permitió separar las bandas y asegurar el tamaño del amplicón utilizando una escalera de peso molecular de 500 pb (BioRad 500pb RuleLadder L000768B). Las condiciones en las que se llevó a cabo la electroforesis fueron 60 Volts por 1 hora; los geles se revelaron utilizando una solución de bromuro de etidio 2 ug/mL por 45 minutos y la visualización se efectuó en un transiluminador con luz UV (VWR Scientific LM-20E). Se obtuvieron fotos de cada gel para proceder con el análisis densitométrico de la expresión relativa con respecto a β-Actina utilizando el software ImageJ (Schneider, Rasband y Eliceiri, 2012).

7.2.4 Cuantificación de sulfuro de hidrógeno

Preparación de solución líquida de agar con acetato de zinc para trampas de H₂S.

Se preparó 20 mL agar-agar (Sigma Alldrich, 05040) (1.5% p/v) y esterilizó por 20 min a 120°C y mantuvo a 60°C hasta su uso, se le añadió la siguiente solución esterilizada y filtrada a través de un filtro estéril (Millipore MPPG002A1) de 0.22 μm: 4 mL de acetato de zinc 45 mM y 0.9 mL de hidróxido de sodio 3 M. Se agitó suavemente la solución y mantuvo líquida hasta la adición a los frascos de cultivo después del tratamiento de neurodiferenciación (Kartha *et al.*, 2012).

Incubación dentro de los frascos de cultivo para preparación de trampas de acetato de zinc

Se sembraron 5x10⁵ y 1.5x10⁶ células A549 en la superficie adherente de frascos de cultivo de 25 cm² (NEST NST-707001) para los grupos A549_{CTRL} y A549_{NED}, respectivamente, con

3.5 mL de DMEM completo (10% SFB); se cultivaron por 24 horas para permitir la adhesión. Se procedió a realizar el tratamiento de transdiferenciación bajo las condiciones descritas en el apartado 7.2.2 con 4 mL de DMEM s/SFB.

Transcurrido el periodo, se aspiró el medio de cultivo y lavó con 2 mL de PBS 1X, se giraron los frascos de cultivo y se añadieron 5 mL de solución líquida de agar con acetato de zinc a una temperatura no mayor a 30°C. Los frascos se taparon e introdujeron por 3-5 minutos a un congelador (-4°C); transcurrido el tiempo y solidificado el agar, se añadieron 3.5 mL de DMEM s/SFB enriquecido con L-cisteína 3000 uM (como agente liberador de H₂S) y se procedió a incubar por 24 horas para capturar el H₂S liberado en las trampas de acetato de zinc, en la Figura 4 se observa el diagrama de las trampas de acetato de zinc para la detección de H₂S liberado por las células cultivadas. Las tapas de los frascos de cultivo fueron cubiertas con Parafilm para evitar fugas de gases (Kartha *et al.*, 2012).

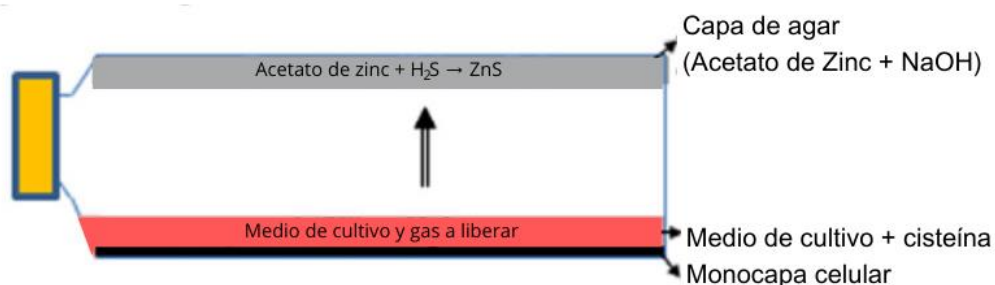


Figura 4. Trampas de acetato de zinc preparadas en frascos de cultivo para la detección de H₂S (Kartha *et al.*, 2012).

Detección de H₂S

El medio de cultivo se aspiró sin dañar la capa de agar y las cajas se giraron para trabajar en la superficie de agar (que atrapó al H₂S). Se añadió sobre la capa de agar, suavemente 2 mL de cloruro de N,N-dimetil-*p*-fenilendiamina (N,N-dpd) (Thermo scientific 11478526) 40 mM en HCl 7.2 M, hasta crear una capa uniforme sobre la superficie del agar e incubó a temperatura ambiente (20 - 25 °C) por 20 minutos. Se añadieron 400 µL de reactivo de cloruro de hierro III (Merk 6K-803945-5) (30 mM en HCl 1.2 M) y mezcló por completo, nuevamente, se incubó por 30 minutos (20 - 25 °C) y mezcló muy bien el contenido del matraz. Se tomaron alícuotas de 200 µL y transfirieron a una placa de microtitulación de 96 pocillos. La absorbancia se midió a 670 nm con un espectrofotómetro UV-Visible. La concentración de H₂S fue calculada utilizando la ecuación de regresión lineal (Ecuación 2)

presente en la curva de calibración generada por el grupo de Kartha (Figura 5) (Kartha *et al.*, 2012).

Ecuación 2. Ecuación de regresión lineal despejada para cálculo de H₂S detectado

$$x = \frac{y - 0.0347}{0.0014}$$

Dónde:

x = Concentración de H₂S detectado (μ M)

y = Lectura de absorbancia a 670 nm.

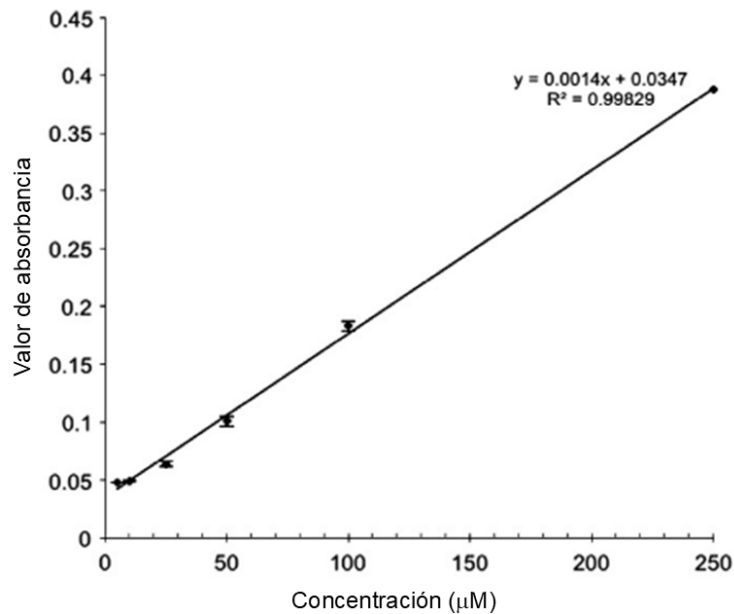


Figura 5. Curva estándar representativa de concentración de H₂S. Utilizando el método de captura de H₂S tras la incubación con sulfuro ácido de sodio (NaHS) en un intervalo de concentración de 5 a 250 μ M. Se proporciona la ecuación de regresión lineal y los valores R² (Kartha *et al.*, 2012).

7.3 Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico mediante el método de la prueba de *t-Student* para estudiar las diferencias de concentraciones entre los grupos A549_{CTRL} y A549_{NED}. Se compararon las medias y la desviación estándar entre los grupos de estudio A549 control s/SFB (A549_{CTRL}) y A549_{NED}. Se realizaron tres experimentos (n) por cada grupo de estudio, por triplicado y se evaluó la diferencia entre concentraciones con un intervalo de confianza de 95%. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete estadístico GraphPad Prism 8 para Windows 10

8. RESULTADOS

8.1 Transdiferenciación celular

Se observó el cambio de morfología y proliferación celular de las células A549 luego de ser sometidas por 72 horas al tratamiento combinatorio de IBMX (0.5 mM) y FSK (0.5 mM), propuesto por Mendieta (Mendieta *et al.*, 2021). Se evaluaron los cambios morfológicos por medio de microscopía óptica y el proceso de transdiferenciación se observa en la Figura 6. Se identifica un aumento general del tamaño celular, además de la extensión de proyecciones tipo neurita y el redondeamiento del cuerpo celular.

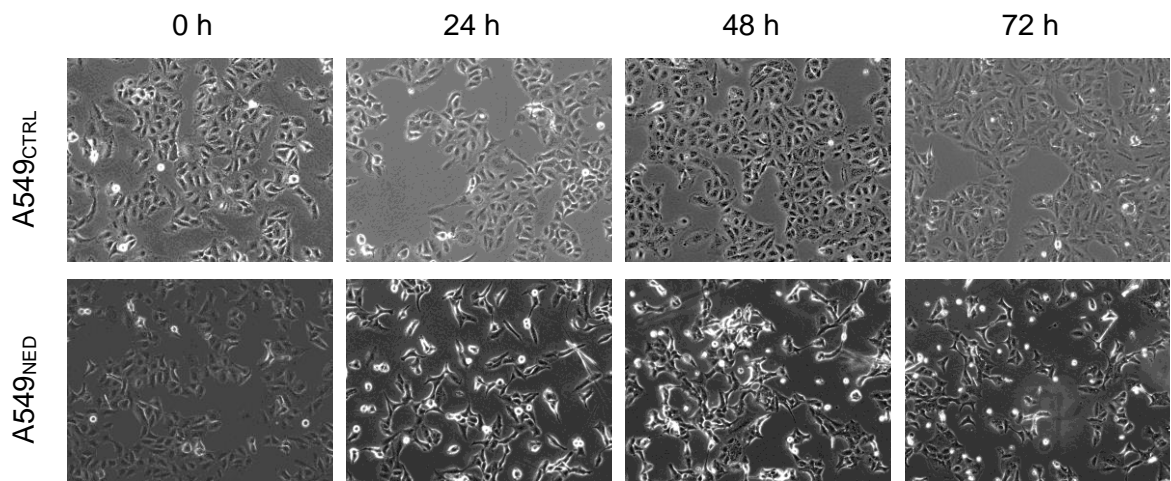


Figura 6. Proceso de transdiferenciación celular con el tratamiento combinatorio de IBMX + FSK en células A549

La confirmación de la generación del fenotipo neuroendócrino se realizó por medio de RT-PCR para validar la expresión de marcadores neuroendócrinos típicos (CgA y Syn). La reacción fue llevada a cabo utilizando ADNc sintetizado a partir de ARN extraído de cada grupo de estudio (A549_{CTRL} y A549_{NED}). La Figura 7 muestra una expresión mayor de CgA y Syn con las células A549_{NED} que en el grupo de A549_{CTRL}. El control positivo de la reacción se realizó con β -Actina (197 pb).

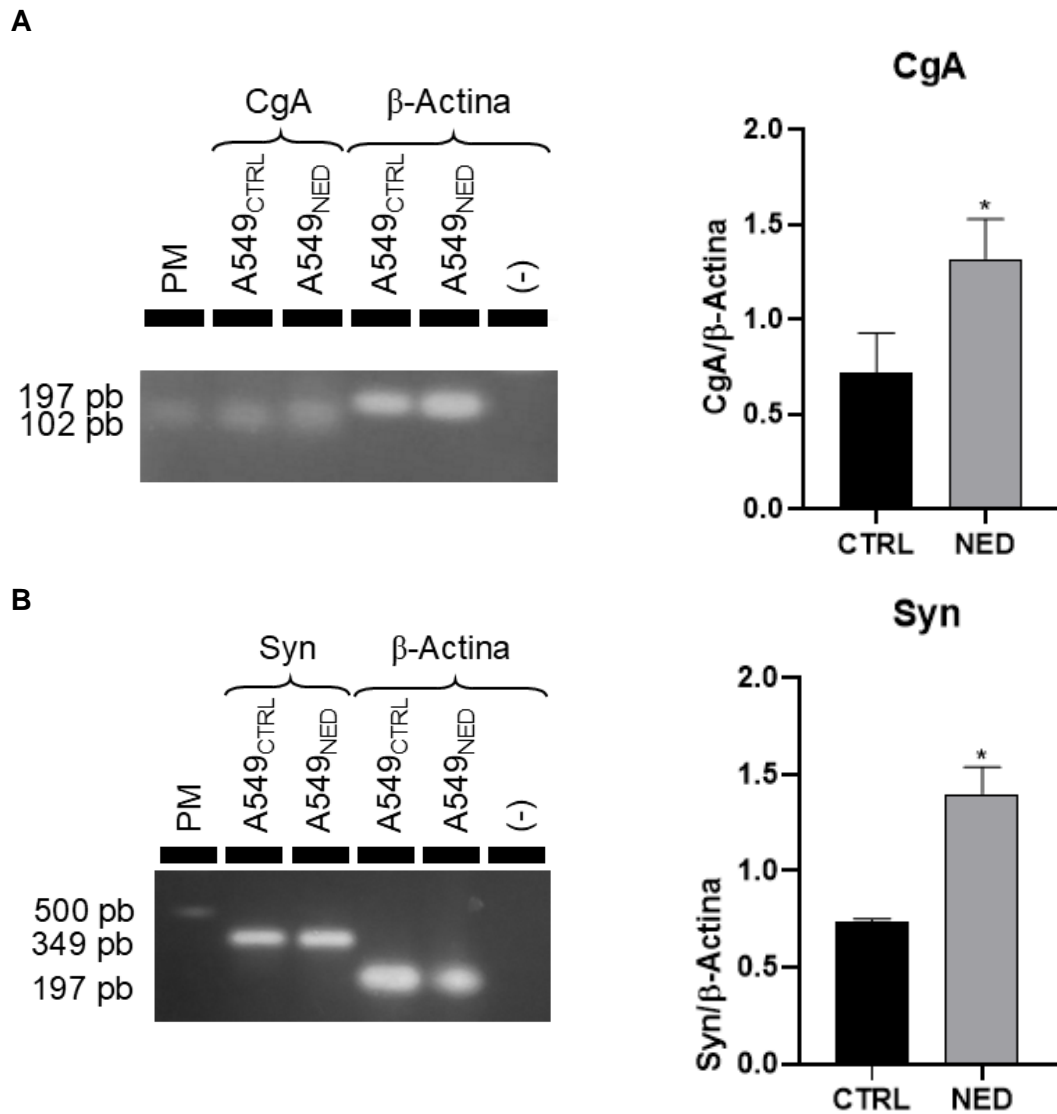


Figura 7. Análisis de expresión de marcadores neuroendócrinos por RT-PCR. 7A corresponde a cromogranina A (CgA) y 7B a sinaptofisina. El análisis estadístico de la expresión relativa con respecto a β -Actina se realizó con la prueba de t-Student considerando $*p < 0.05$.

8.2 Expresión de enzimas productoras de aminas biogénicas

La expresión de las isoformas de triptófano hidroxilasa (TPH1 y TPH2) y tirosina hidroxilasa (TH) se analizó por medio de RT-PCR utilizando los oligonucleótidos de la Tabla 2. En la Figura 8 se observa la expresión de la enzima TPH1, donde es evidente que la banda correspondiente a A549_{NED} es más intensa que el grupo A549_{CTRL}, resultado que se confirma con el análisis densitométrico de la imagen, presentando un cambio de expresión significativamente diferente en el grupo NED en comparación al CTRL. En la Figura 9 se

muestra la expresión de la enzima TPH2 dónde no es visible un cambio en la expresión de la enzima entre grupos, en el análisis estadístico, esta diferencia no es significativa. Finalmente, la Figura 10 presenta la expresión de la enzima TH, dónde en el gel de agarosa se aprecia la sobreexpresión de la enzima en el grupo A549_{NED} en comparación al grupo A549_{CTRL}, el análisis densitométrico de la imagen confirma este resultado mostrando diferencia estadísticamente significativa. De igual manera, en el análisis de todas las enzimas, el control positivo con β -Actina fue realizado en todos los grupos para asegurar la misma carga de ADNc en cada reacción.

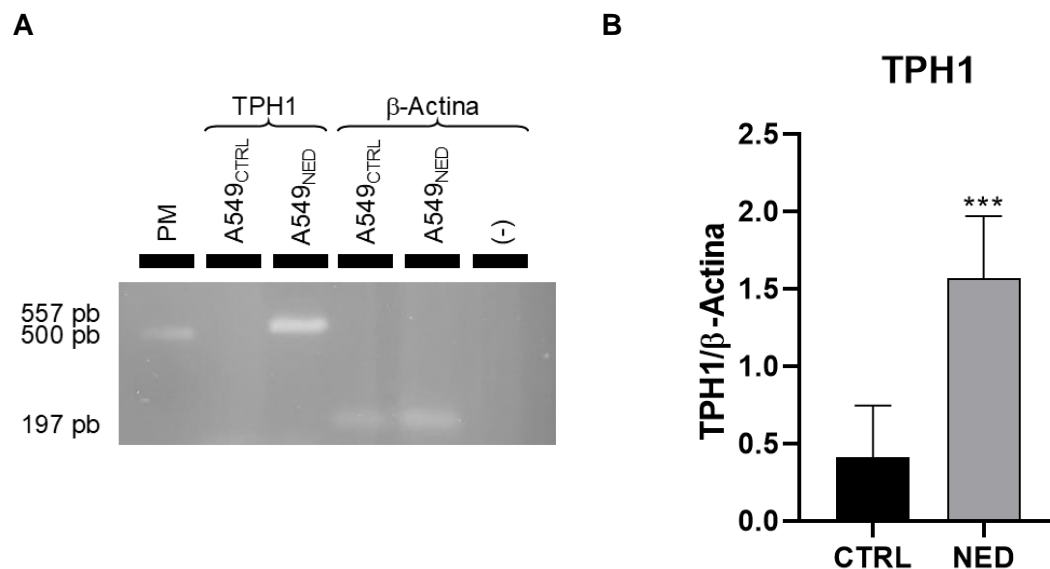


Figura 8. Análisis de expresión de la isoforma 1 de Triptófano Hidroxilasa (TPH1) por RT-PCR. A) Gel de agarosa al 2% que muestra en el primer carril la escalera de peso molecular, en los dos siguientes la amplificación del gen TPH1 a 557 pb para las células A549 sin SFB (A549_{CTRL}) y las células A549 con el tratamiento combinatorio de FSK + IBMX (A549_{NED}), junto con su control positivo β -Actina (197pb) en el cuarto y quinto carril para ambos grupos de estudio, finalizando con el control negativo en el último lugar (-). B) Gráfica de barras con los resultados del análisis densitométrico de la expresión relativa con respecto a β -Actina de la imagen para la detección del gen TPH1, se presenta una diferencia significativa con respecto al control. El análisis estadístico se realizó con la prueba de t-Student considerando *** $p < 0.001$.

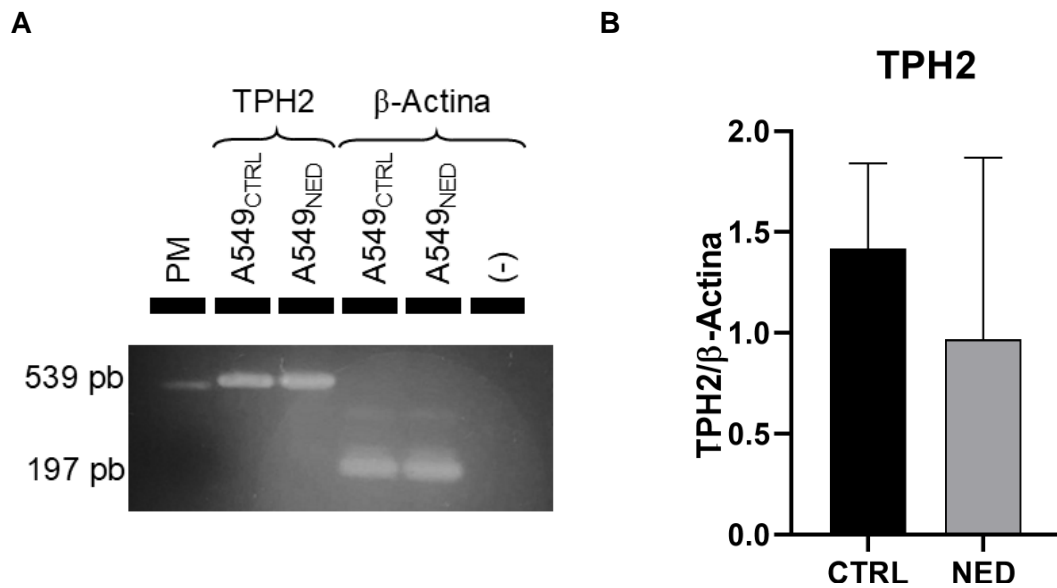


Figura 9. Análisis de expresión de la isoforma 2 de Triptófano Hidroxilasa (TPH2) por RT-PCR. A) Gel de agarosa al 2% que muestra en el primer carril la escalera de peso molecular, en los dos siguientes la amplificación del gen TPH2 en 539 pb para las células A549 sin SFB (A549_{CTRL}) y las células A549 con el tratamiento combinatorio de FSK + IBMX (A549_{NED}), junto con su control positivo β -Actina (197pb) en el cuarto y quinto carril para ambos grupos de estudio, finalizando con el control negativo en el último lugar (-). B) Gráfica de barras con los resultados del análisis densitométrico de la expresión relativa con respecto a β -Actina de la imagen para la detección del gen TPH2, no se observa diferencia significativa con respecto al control. El análisis estadístico se realizó con la prueba de t-Student considerando $*p < 0.05$.

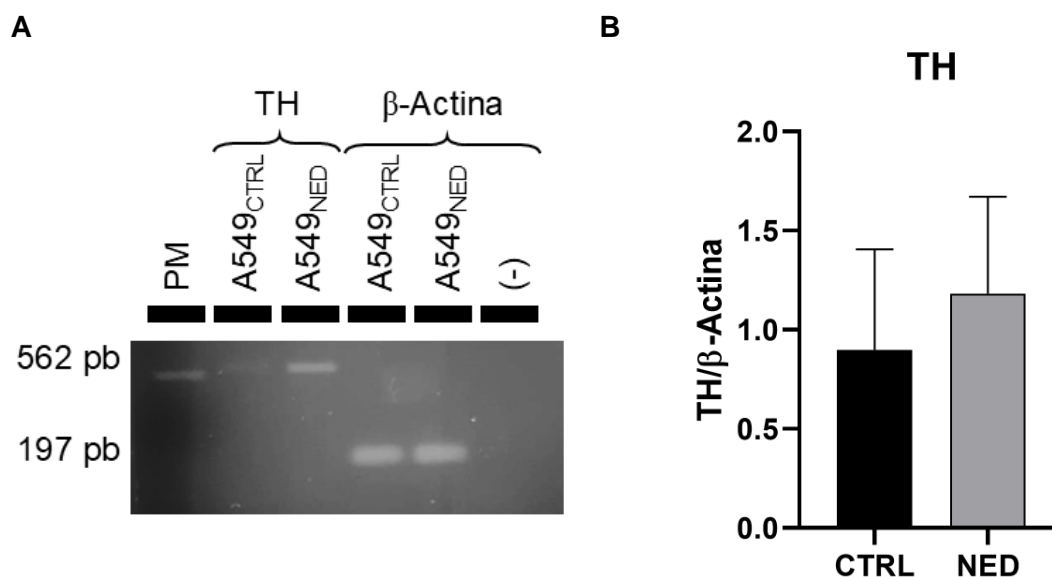


Figura 10. Análisis de expresión de Tirosina Hidroxilasa (TH) por RT-PCR. A) Gel de agarosa al 2% que muestra en el primer carril la escalera de peso molecular, en los dos siguientes la amplificación del gen TH en 562 pb para las células A549 sin SFB (A549_{CTRL}) y las células A549 con el tratamiento combinatorio de FSK + IBMX (A549_{NED}), junto con su control positivo β -Actina (197pb) en el cuarto y quinto carril para ambos grupos de estudio, finalizando con el control negativo en el último lugar (-). B) Gráfica de barras con los resultados del análisis densitométrico de la expresión relativa con respecto a β -Actina de la imagen para la detección del gen TH, se presenta una diferencia significativa en el grupo NED con respecto al control. El análisis estadístico se realizó con la prueba de t-Student considerando $**p < 0.01$.

8.3 Expresión de enzimas productoras de sulfuro de hidrógeno

Se evaluó la expresión de enzimas productoras de sulfuro de hidrógeno (H₂S), CBS y CSE, por medio de RT-PCR utilizando los oligonucleótidos de la Tabla 2 en los grupos de estudio A549_{CTRL} y A549_{NED}. En la Figura 11 se observa el cambio de expresión de la enzima CBS entre el grupo control y el grupo NED. El control positivo con β -Actina para cada grupo fue llevado a cabo para asegurar que se utilizó la misma cantidad de ADNc en todas las reacciones. En cambio, en la Figura 12 se observa la amplificación del gen correspondiente a la enzima CSE, en este caso no se presenta diferencia significativa en la expresión de la enzima entre ambos grupos; adicionalmente, esta enzima casi no es expresada en los grupos de estudio.

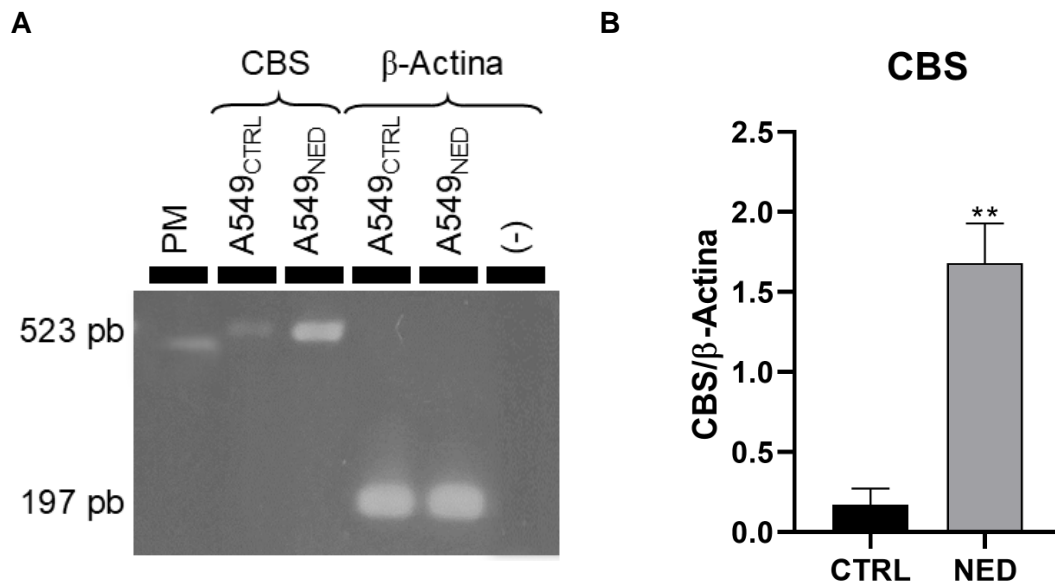


Figura 11. Análisis de expresión de cistationina β-sintasa (CBS) por RT-PCR. A) Gel de agarosa al 2% que muestra en el primer carril la escalera de peso molecular, en los dos siguientes la amplificación del gen CBS en 523 pb para las células A549 sin SFB (A549_{CTRL}) y las células A549 con el tratamiento combinatorio de FSK + IBMX (A549_{NED}), junto con el control positivo β-Actina (197pb) en el cuarto y quinto carril para ambos grupos de estudio, finalizando con el control negativo en el último lugar (-). B) Gráfica de barras con los resultados del análisis densitométrico de la expresión relativa con respecto a β-Actina de la imagen para la detección de CBS, se observa una diferencia significativa entre el grupo CTRL y NED. El análisis estadístico se realizó con la prueba de t-Student considerando ** $p < 0.01$.

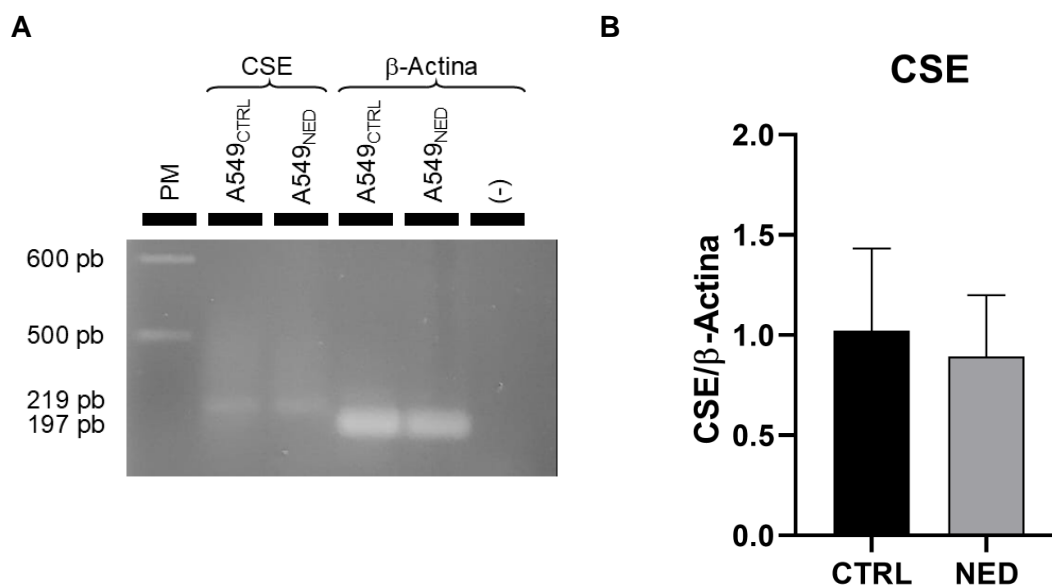


Figura 12. Análisis de expresión de cistationina γ -lialasa (CSE) por RT-PCR. A) Gel de agarosa al 2% que muestra en el primer carril la escalera de peso molecular, en los dos siguientes la amplificación del gen CSE en 219 pb para las células A549 sin SFB (A549_{CTRL}) y las células A549 con el tratamiento combinatorio de FSK + IBMX (A549_{NED}), junto con el control positivo β -Actina (197pb) en el cuarto y quinto carril para ambos grupos de estudio, finalizando con el control negativo en el último lugar (-). B) Gráfica de barras con los resultados del análisis densitométrico de la expresión relativa con respecto a β -Actina de la imagen para la detección de CSE, no se observa una diferencia significativa. El análisis estadístico se realizó con la prueba de t-Student considerando $*p < 0.05$.

8.4 Detección de sulfuro de hidrógeno (H₂S) en cultivo celular

Para corroborar la influencia de las enzimas CBS y CSE en la síntesis de sulfuro de hidrógeno (H₂S) se realizó la detección de H₂S utilizando el método de azul de metileno descrito por Kartha, se utilizó la curva estandarizada de los autores del valor de absorbancia, observado contra la concentración de gas detectado para finalmente obtener este valor (Kartha *et al.*, 2012). En la Figura 13 se muestra un ligero incremento en la concentración de gas detectado en el grupo A549_{NED} contra el grupo A549_{CTRL}, no obstante, luego del análisis estadístico no presentó diferencia significativa entre grupos ($*p < 0.05$).

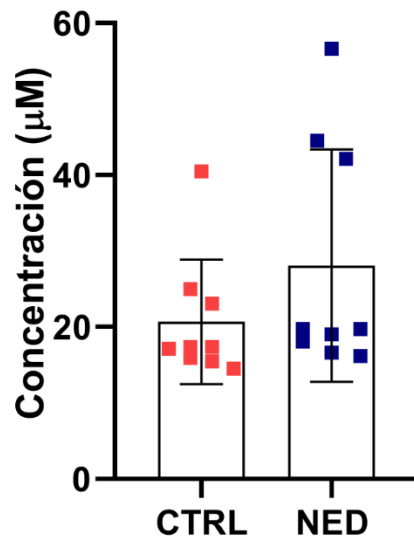


Figura 13. Cantidad de sulfuro de hidrógeno (H_2S) detectado. La cantidad de gas detectado se obtuvo a partir de la lectura de absorbancia del azul de metileno formado en la trampa de acetato de zinc, luego de 24 horas de incubación de las células A549 sin SFB ($A549_{CTRL}$) y las células A549 con el tratamiento combinatorio de FSK + IBMX ($A549_{NED}$) con DMEM s/SFB enriquecido con L-cys ($3000\mu M$). Los valores de concentración se obtuvieron a partir de la Ecuación 2. No se muestra una diferencia significativa considerando $*p < 0.05$.

9. DISCUSIÓN

El diagnóstico tardío es una de las principales razones por la cual, el cáncer de pulmón se considera el más mortífero en el mundo. Sumado a las dificultades actuales del diagnóstico de esta enfermedad, el desconocimiento de un fenotipo neuroendócrino (que agrava la enfermedad) vuelve aún más complicada esta tarea. Dentro del objetivo principal de este estudio, está identificar marcadores específicos de la enfermedad; basándonos en dos grupos de moléculas que pueden alterarse entre cada grupo de estudio: la síntesis de H₂S y el metabolismo de dopamina y serotonina.

Para realizar el análisis de estos metabolitos, dentro de esta investigación se utilizó la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549 y se indujo su transdiferenciación a un fenotipo neuroendócrino (NED) utilizando un tratamiento combinatorio de FSK y IBMX, dicho tratamiento eleva los niveles intracelulares de AMPc (Mendieta *et al.*, 2021). Los cambios en la morfología tales como la generación de proyecciones tipo neurita y la expresión de los marcadores neuroendócrinos CgA y Syn indicaron que la transdiferenciación fue exitosa, como en casos anteriormente reportados (Soto-Hernández, 2022; Fosado *et al.*, 2023). Se han reportado otros métodos para lograr una transdiferenciación *in vitro* exitosa en otro tipo de líneas celulares, entre esos métodos se encuentra agregar directamente AMPc (dibutiril-AMPc) al medio de cultivo o transfectar las células diana para inducir la expresión de genes propios del fenotipo NED (Farach *et al.*, 2016).

A diferencia de estudios anteriores, los resultados mostrados en el apartado 8.1 demostraron que después de 72 horas de tratamiento, el fenotipo NED poseía las características esperadas y se utilizaron las células tratadas sin continuar con un tratamiento de 120 horas. Dicha decisión permitió tener una población celular más numerosa que expresara los marcadores neuroendócrinos a comparación de estudios anteriores (Mendieta *et al.*, 2021; Fosado *et al.*, 2023).

Luego del análisis de las enzimas productoras de aminas biogénicas, presentado en el apartado 8.2, se esperaba ver una disminución de la expresión de TH y un aumento representativo en la expresión de TPH1 y TPH2. Sin embargo, los datos presentados en la Figura 9 no señalan cambios significativos en la expresión de TPH2 en el grupo A549_{NED} con respecto al grupo A549_{CTRL}, cabe señalar que este resultado sólo se presenta en la isoforma TPH2, la cual se expresa mayormente en células neuronales centrales; sin

embargo, esta enzima está directamente involucrada en el desarrollo de los tejidos derivados de la cresta neural como un factor morfogénico. La expresión de esta enzima disminuye en otros tejidos del cuerpo (SNC) conforme la edad de la persona avanza, lo que sugiere que la 5-HT sintetizada por el individuo se produce por la acción de otra enzima, sugiriendo la participación de TPH1 (Li *et al.*, 2022; Sinenko *et al.*, 2023).

En la Figura 8, se observa que la expresión de TPH1 sí presenta un aumento representativo en el grupo A549_{NED} comparado con el grupo control. Este resultado soporta que la síntesis de 5-HT previamente reportada está asociada a la actividad de esta isoforma de TPH. Se ha demostrado que la utilización de inhibidores de TPH sobre cultivos celulares neuroendócrinos del páncreas, disminuye significativamente la secreción de 5-HT; por lo que fármacos como Telotristat se han convertido en parte de los tratamientos contra el síndrome carcinoide (Herrera-Martínez *et al.*, 2020). También, en microarreglos de tejidos de adenocarcinoma ductal pancreático se identificó la sobreproducción de esta enzima, particularmente en islotes que forman arreglos de tipo neuroendócrino (células anidadas y en roseta) (Jiang *et al.*, 2017).

Particularmente, los tumores neuroendócrinos del intestino delgado expresan altos niveles de TPH1, aunque también se ha encontrado que es altamente expresada en otros tipos de cáncer como leucemia mieloide aguda, glioma cerebral de grado bajo, carcinoma invasivo de mama, carcinoma faríngeo, glioblastoma multiforme, adenocarcinoma de próstata, de estómago y carcinoma endometroide del cuerpo intrauterino y en células de SCLC (H69AR, DMS273) también se identificó la sobreexpresión de TPH1, especialmente, la línea celular DMS273 proviene de un cáncer resistente a quimioterapias, lo que podría sugerir que en esta línea celular, la expresión de TPH1 o la segregación de 5-HT participa en la resistencia del tumor a fármacos (Tow *et al.*, 2023). Se relaciona la sobreexpresión de TPH1 con metabolismo de tipo neuroendócrino en cánceres del tracto digestivo, principalmente el intestino (Mattiolo *et al.*, 2023)

Por otro lado, en la Figura 10 se exhibe que la expresión de TH está incrementada en el grupo A549_{NED}, este resultado no corresponde con lo esperado, de acuerdo con la producción de aminas biogénicas reportadas por Mendieta y colaboradores en 2018; sin embargo, actualmente la tirosina hidroxilasa se considera una enzima útil en el diagnóstico de neoplasias neuroendócrinas no epiteliales. Existe la probabilidad de que el aumento en

la producción de esta enzima esté relacionado a la necesidad de producir catecolaminas como moléculas de comunicación neuroendócrina dada la naturaleza del fenotipo transdiferenciado (Mendieta *et al.*, 2018; Mete *et al.*, 2022).

Se ha reportado que en el paraganglioma (un tipo de tumor neuroendócrino), se expresa altamente la enzima TH, junto con la enzima dopamina β -hidroxilasa (precursora de la norepinefrina) y la feniletanolamina N-metiltransferasa (precursora de la epinefrina a partir de la norepinefrina), todas estas proteínas son parte de la síntesis de catecolaminas y no dependen del almacenamiento de gránulos secretores (Mete *et al.*, 2022; Asa *et al.*, 2023).

Continuando con el análisis de la sobreexpresión de TH en el grupo A549_{NED}, en estudios realizados en pacientes con tumores neuroendócrinos colorrectales se ha encontrado un aumento en la concentración sérica de DA, neurotransmisor producto de la actividad de la TH, en comparación con aquellos pacientes que no presentaron marcadores neuroendócrinos típicos; la concentración de DA se asocia estrechamente al estado de inflamación del tumor. Este neurotransmisor puede influenciar la carcinogénesis de manera positiva y negativa por medio de distintos mecanismos, existe evidencia de que esta catecolamina se produce por las células cancerosas para favorecer el crecimiento del tumor. Sin embargo, puede inhibirse bloqueando la producción de DA (Cîmpeanu *et al.*, 2024). Es posible que la sobreexpresión de TH en el grupo NED tenga el objetivo de aumentar la concentración celular de DA para favorecer la proliferación celular; sin embargo, al disminuir la tasa de proliferación *in vitro* debido a los efectos citotóxicos del tratamiento de transdiferenciación, no se identificó un aumento en la concentración de DA en células A549_{NED}.

Por otro lado, en la diferenciación de células cromafines, la estimulación de TH induce la conversión de norepinefrina a epinefrina y una deficiencia de glucocorticoides resulta en bajos niveles de catecolaminas en plasma. Dentro de un estudio publicado en 2024, se encontró que en células adrenales, la TH se encontraba activa en la síntesis de DA, sin embargo, la concentración de norepinefrina y EP disminuyen en conjunto, sugiriendo que no se está utilizando la dopamina como sustrato para la síntesis de estas moléculas, como consecuencia, la DA se acumula dentro de la célula (Martinelli *et al.*, 2024). Este comportamiento podría verse en los resultados de Mendieta, dónde la EP está presente en el grupo NED y la DA no, relacionando la sobreexpresión de TH a la síntesis de DA

(neurotransmisor que no se observa presente en el grupo NED) que será, o mejor dicho, fue utilizada para continuar la síntesis de norepinefrina y EP (presente en el grupo NED) (Mendieta *et al.*, 2018).

Los resultados mostrados en el apartado 8.3 indicaron que las células neuroendócrinas cambian la expresión de la enzima productora de H₂S, cistationina β-sintasa, tal como se esperaba y concuerda con el metabolismo de las enzimas involucradas cuando se utilizan como referencia en tejido sano y tumores de pulmón, sin embargo, este proceso no ha sido estudiado a profundidad en el fenotipo neuroendócrino (Yoon *et al.*, 2023).

La necesidad de producir H₂S para combatir el estrés celular por los agentes elevadores de AMPc conduce a la sobreexpresión de CBS en el grupo A549_{NED}, además, se ha reportado que en cáncer de tiroides (la neoplasia neuroendócrina más frecuente) y sus variantes, CBS también se encuentra sobreexpresado en comparación con tejidos sanos. Su sobreexpresión se ha asociado en otros carcinomas (de células colorrectales, de mama, uroteliales, de células escamosas orales, de vejiga y renales) al estado del tumor, anaplasia, metástasis y resistencia a la quimioterapia (Turbat-Herrera *et al.*, 2018; Stipanuk, 2020).

Sin embargo, el que no se haya sobreexpresado representativamente CSE no indica que no esté involucrado en la síntesis de este gas. Previamente se ha reportado que algunas líneas de cáncer (mama, próstata y pulmón) suprimen la síntesis *de novo* de cisteína, en dicha reacción de síntesis, la enzima que participa principalmente es CSE, esta información puede asociarse a que a pesar de que el proceso de síntesis *de novo* fue suprimido después de la transdiferenciación, la enzima siguió expresándose para participar en la producción de H₂S, aunque no de manera significativa (Stipanuk, 2020; Yang *et al.*, 2022).

El H₂S es un gasotransmisor generado a partir de la cisteína por sus tres principales enzimas productoras (CBS, CSE y 3-MST), se ha observado que este gas propicia la función del canal de calcio dependiente de voltaje tipo T afectando diversas funciones como la neurodiferenciación y la secreción de neurotransmisores, como las aminas biogénicas ya antes mencionadas. Diversos estudios han relacionado la sobreproducción del canal de calcio Ca_v3.2 tipo T con el aumento endógeno de H₂S a consecuencia de la sobreexpresión y actividad de las enzimas CSE y CBS. Este canal de Ca²⁺ se encuentra altamente

expresando en células LNCaP con diferenciación neuroendócrina por agentes elevadores de AMPc. Dentro de estos estudios, el inhibir las enzimas productoras de H₂S atenúa los efectos de la neurodiferenciación (Fukami *et al.*, 2015; Fukami, Sekiguchi y Kawabata, 2017).

También se observó sobreexpresión de CBS en adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP) y se propone que participa activamente como un oncogén en la regulación del proceso de transición epitelio mesénquima (EMT), al menos en células de ACDP. Se ha encontrado en otros estudios que cánceres dónde la CBS se encuentra incrementada, también lo hace con ello la síntesis de H₂S mediante el proceso de transulfuración (Czikora *et al.*, 2022).

Las dos enzimas estudiadas participan en la síntesis de este gas dentro de distintos procesos fisiológicos; sin embargo, en el apartado 8.4 no se identifica un aumento significativo en la detección del gas en el grupo A549_{NED} contra el grupo A549_{CTRL}, a pesar de percibirse una mayor producción en el grupo A549_{NED}. Una de las principales razones por las que pudo no haberse evidenciado un cambio significativo pudo llegar a ser el alcance del método. Kartha y colaboradores mencionan que la variación de las mediciones disminuye conforme incrementa la cantidad de H₂S liberado (Kartha *et al.*, 2012). Es posible que las cantidades de H₂S liberadas por los grupos de estudio no fueran lo suficientemente grandes como para ser detectadas en el periodo de incubación definido. Sin embargo, al utilizar la curva estándar para cuantificar la concentración de H₂S liberado de los autores, no se modificó el tiempo de incubación de las reacciones utilizadas para la síntesis de azul de metileno en las trampas de agar; de esta manera, se evitó aumentar las posibles variables en el estudio.

No se descarta la idea de que este gas pueda ser propuesto en un futuro como biomarcador de la enfermedad; sin embargo, será necesario identificar un mejor método para su detección. Uno de los métodos propuestos sería utilizar un sensor electroquímico específico para H₂S. Estos sensores tienen la capacidad de medir hasta 1ppm en el ambiente (*Detector de Sulfuro de Hidrógeno | Detector de H2S | Monitor H2S*, 2024). Sin embargo, utilizando métodos de cultivo celular, sería problemático alcanzar las poblaciones celulares necesarias para alcanzar la concentración mínima. Pero podría considerarse la evaluación de este gas utilizando algún otro modelo biológico.

10. CONCLUSIONES

El fenotipo neuroendócrino generado a partir del tratamiento combinatorio con los agentes elevadores de AMPc intracelular (IBMX + FSK) permitió realizar una serie de estudios que nos ayudarían a definir a distintos grupos de moléculas como biomarcadores de este fenotipo.

La cuantificación por medio del método de azul de metileno de H₂S liberado en cultivo celular no demostró diferencia significativa entre los grupos de estudio; sin embargo, no se descarta la idea de encontrar un mejor método de detección en cultivo celular, mucho más sensible y estable, para así corroborar si su producción es o no es significativamente diferente entre fenotipos celulares.

En cambio, el análisis de la expresión de enzimas en ARNm de los grupos celulares A549_{CTRL} y A549_{NED} por medio RT-PCR reveló que el grupo A549_{NED} sobreexpresa significativamente las enzimas CBS, TH y TPH1 en comparación al grupo A549_{CTRL}. Por lo tanto, se propone utilizar a las enzimas CBS, TH y TPH1 como nuevas moléculas de interés para diferenciar el fenotipo neuroendócrino en cáncer de pulmón, es decir, como biomarcadores.

11. REFERENCIAS

- Addis, B. J. (1995) "Neuroendocrine differentiation in lung carcinoma.", *Thorax*. BMJ Publishing Group Ltd, 50(2), pp. 113–115. doi: 10.1136/THX.50.2.113.
- Arman, T. y Nelson, P. S. (2022) "Endocrine and paracrine characteristics of neuroendocrine prostate cancer", *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A., 13, p. 2845. doi: 10.3389/FENDO.2022.1012005/BIBTEX.
- Arroyo-Hernández, M. *et al.* (2022) "Guía de Práctica Clínica para el diagnóstico temprano y la referencia oportuna del cáncer de pulmón", *Salud Pública de México*. Instituto Nacional de Salud Publica, 64(5, sept-oct), pp. 530–538. doi: 10.21149/13919.
- Asa, S. L. *et al.* (2023) "Cauda Equina Neuroendocrine Tumors: Distinct Epithelial Neuroendocrine Neoplasms of Spinal Origin", *The American journal of surgical pathology*. Am J Surg Pathol, 47(4), pp. 469–475. doi: 10.1097/PAS.0000000000002009.
- Berends *et al.* (2019) "Intricacies of the Molecular Machinery of Catecholamine Biosynthesis and Secretion by Chromaffin Cells of the Normal Adrenal Medulla and in Pheochromocytoma and Paraganglioma", *Cancers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 11(8), p. 1121. doi: 10.3390/cancers11081121.
- Bernstein, E. *et al.* (2022) "Barriers and facilitators to lung cancer screening and follow-up", *Seminars in Oncology*. W.B. Saunders. doi: 10.1053/j.seminoncol.2022.07.004.
- Blachier, F., Andriamihaja, M. y Blais, A. (2020) "Sulfur-containing amino acids and lipid metabolism", *Journal of Nutrition*. Oxford Academic, 150(Supplement_1), pp. 2524–2531. doi: 10.1093/jn/nxaa243.
- Callejón-Leblic, B. *et al.* (2016) "Metabolic profiling of potential lung cancer biomarkers using bronchoalveolar lavage fluid and the integrated direct infusion/ gas chromatography mass spectrometry platform", *Journal of Proteomics*. J Proteomics, 145, pp. 197–206. doi: 10.1016/j.jprot.2016.05.030.
- Casagrande, G. M. S. *et al.* (2023) "Liquid Biopsy for Lung Cancer: Up-to-Date and Perspectives for Screening Programs", *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 24(3). doi: 10.3390/IJMS24032505.
- Castro-Ortega, A. *et al.* (2019) "Expresión Inmunohistoquímica de Ki-67 en Lesión Central

de Células Gigantes”, *International journal of odontostomatology*. Universidad de La Frontera, 13(2), pp. 150–156. doi: 10.4067/S0718-381X2019000200150.

Cîmpeanu, R. C. *et al.* (2024) “Correlation between Neurotransmitters (Dopamine, Epinephrine, Norepinephrine, Serotonin), Prognostic Nutritional Index, Glasgow Prognostic Score, Systemic Inflammatory Response Markers, and TNM Staging in a Cohort of Colorectal Neuroendocrine Tumor Patien”, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 25(13). doi: 10.3390/ijms25136977.

Czikora, Á. *et al.* (2022) “Cystathionine β -synthase overexpression drives metastatic dissemination in pancreatic ductal adenocarcinoma via inducing epithelial-to-mesenchymal transformation of cancer cells”, *Redox Biology*. Elsevier, 57. doi: 10.1016/J.REDOX.2022.102505.

Desai, A. *et al.* (2022) “Antibody-drug conjugates: A promising novel therapeutic approach in lung cancer”, *Lung Cancer*. Elsevier Ireland Ltd, 163, pp. 96–106. doi: 10.1016/j.lungcan.2021.12.002.

Deshpand, R., Chandra, M. y Rauthan, A. (2022) “Evolving trends in lung cancer: Epidemiology, diagnosis, and management”, *Indian Journal of Cancer*. Wolters Kluwer Medknow Publications, 59(5), pp. 90–105. doi: 10.4103/ijc.IJC_52_21.

Detector de Sulfuro de Hidrógeno | Detector de H2S | Monitor H2S (2024). Disponible en: <https://proconsamexico.com/productos/detectores-de-gas/h2s-sulfuro-de-hidrogeno/detector-sulfuro-hidrogeno-h2s/> (Consultado: el 18 de octubre de 2024).

Diaz-Perez, J. A. *et al.* (2012) *Patrones histopatológicos tumorales*. 1a ed, *Primera edición*. 1a ed. Editado por P. UDES. Santander: Facultad de medicina, Universidad de Santander UDES. Disponible en: <https://medium.com/@arifwicaksanaa/pengertian-use-case-a7e576e1b6bf>.

Farach, A. *et al.* (2016) “Neuronal Trans-Differentiation in Prostate Cancer Cells”, *The Prostate*. John Wiley & Sons, Ltd, 76(14), pp. 1312–1325. doi: 10.1002/PROS.23221.

Fosado, R. *et al.* (2023) “Neuroendocrine Differentiation of Lung Cancer Cells Impairs the Activation of Antitumor Cytotoxic Responses in Mice”, *International journal of molecular sciences*. Int J Mol Sci, 24(2), p. 990. doi: 10.3390/IJMS24020990.

Fu, W. Y. *et al.* (2013) “An effective inducer of dopaminergic neuron-like differentiation”,

Neural Regeneration Research. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 8(5), p. 427. doi: 10.3969/J.ISSN.1673-5374.2013.05.006.

Fukami, K. *et al.* (2015) “Functional upregulation of the H₂S/Cav3.2 channel pathway accelerates secretory function in neuroendocrine-differentiated human prostate cancer cells”, *Biochemical Pharmacology*, 97(3), pp. 300–309. doi: 10.1016/j.bcp.2015.08.005.

Fukami, K., Sekiguchi, F. y Kawabata, A. (2017) “Hydrogen Sulfide and T-Type Ca²⁺ Channels in Pain Processing, Neuronal Differentiation and Neuroendocrine Secretion”, *Pharmacology*, pp. 196–203. doi: 10.1159/000449449.

Geraldine, O., Bell, S. y Wright, S. (2019) *Wheater's Pathology*, Elsevier.

Goebel, C. *et al.* (2019) “Diagnosis of Non-small Cell Lung Cancer for Early Stage Asymptomatic Patients”, *Cancer Genomics & Proteomics*. International Institute of Anticancer Research, 16(4), pp. 229–244. doi: 10.21873/CGP.20128.

Goodlad, J., Cerroni, L. y Swerdlow, S. (2022) “Recent advances in cutaneous lymphoma—implications for current and future classifications”, *Virchows Archiv 2022 482:1*. Springer, 482(1), pp. 281–298. doi: 10.1007/S00428-022-03421-5.

Haince, J. F. *et al.* (2022) “Metabolomic Fingerprinting for the Detection of Early-Stage Lung Cancer: From the Genome to the Metabolome”, *International journal of molecular sciences*, 23(3). doi: 10.3390/ijms23031215.

Hanahan, D. (2022) “Hallmarks of Cancer: New Dimensions”, *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research, pp. 31–46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2000) “The hallmarks of cancer”, *Cell*. Elsevier, pp. 57–70. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2011) “Hallmarks of cancer: The next generation”, *Cell*. Cell Press, pp. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Harðardóttir, H. *et al.* (2022) “Advances in lung cancer diagnosis and treatment - a review”, *Læknablaðið*. Laeknafelag Islands, 108(01), pp. 17–29. doi: 10.17992/ibl.2022.01.671.

Herrera-Martínez, A. D. *et al.* (2020) “Effect of the Tryptophan Hydroxylase Inhibitor Telotristat on Growth and Serotonin Secretion in 2D and 3D Cultured Pancreatic Neuroendocrine Tumor Cells”, *Neuroendocrinology*. S. Karger AG, 110(5), pp. 351–363.

doi: 10.1159/000502200.

INEGI (2021) *México frente al cáncer de pulmón, México Frente al cáncer de pulmón*. Disponible en: <https://www.insp.mx/avisos/mexico-frente-al-cancer-de-pulmon> (Consultado: el 25 de octubre de 2022).

Isgrò, M. A., Bottoni, P. y Scatena, R. (2015) “Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects”, *Advances in experimental medicine and biology*. Adv Exp Med Biol, 867, pp. 125–143. doi: 10.1007/978-94-017-7215-0_9.

Ishioka, K. *et al.* (2021) “Upregulation of FGF9 in lung adenocarcinoma transdifferentiation to small cell lung cancer”, *Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., 81(14), pp. 3916–3929. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-4048.

Iwase, K. *et al.* (1994) “Tyrosine hydroxylase indicates cell differentiation of catecholamine biosynthesis in neuroendocrine tumors”, *Journal of endocrinological investigation*. J Endocrinol Invest, 17(4), pp. 235–239. doi: 10.1007/BF03348964.

Iyoda, A., Azuma, Y. y Sano, A. (2020) “Neuroendocrine tumors of the lung: clinicopathological and molecular features”, *Surgery today*. Surg Today, 50(12), pp. 1578–1584. doi: 10.1007/S00595-020-01988-7.

Jiang, S. H. *et al.* (2017) “Increased Serotonin Signaling Contributes to the Warburg Effect in Pancreatic Tumor Cells Under Metabolic Stress and Promotes Growth of Pancreatic Tumors in Mice”, *Gastroenterology*. Gastroenterology, 153(1), pp. 277-291.e19. doi: 10.1053/J.GASTRO.2017.03.008.

Kahnert, K., Kauffmann-Guerrero, D. y Huber, R. M. (2016) “SCLC—State of the Art and What Does the Future Have in Store?”, *Clinical Lung Cancer*. Elsevier, 17(5), pp. 325–333. doi: 10.1016/j.clc.2016.05.014.

Kartha, R. V. *et al.* (2012) “Enhanced detection of hydrogen sulfide generated in cell culture using an agar trap method”, *Analytical Biochemistry*. Elsevier Inc., 423(1), pp. 102–108. doi: 10.1016/j.ab.2012.01.001.

Keyhanian, K. *et al.* (2022) “Neuroendocrine differentiation distinguishes basaloid variant of lung squamous cell carcinoma”, *Diagnostic Pathology*. BioMed Central, 17(1). doi: 10.1186/S13000-022-01223-6.

- Kim, J., Lee, H. y Huang, B. W. (2022) “Lung Cancer: Diagnosis, Treatment Principles, and Screening”, *American family physician*. NLM (Medline), 105(5), pp. 487–494.
- Koh, J. *et al.* (2023) “Molecular Classification of Extrapulmonary Neuroendocrine Carcinomas With Emphasis on POU2F3-positive Tuft Cell Carcinoma”, *American Journal of Surgical Pathology*. Wolters Kluwer Health, 47(2), pp. 183–193. doi: 10.1097/PAS.0000000000001977.
- Kuśnierczyk, P. (2023) “Genetic differences between smokers and never-smokers with lung cancer”, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media SA, 14. doi: 10.3389/FIMMU.2023.1063716.
- Li, D. *et al.* (2022) “Tryptophan metabolism: Mechanism-oriented therapy for neurological and psychiatric disorders”, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 13. doi: 10.3389/FIMMU.2022.985378/FULL.
- Mamdani, H. *et al.* (2017) “Blood-based tumor biomarkers in lung cancer for detection and treatment”, *Translational Lung Cancer Research*, 6(6), pp. 648–660. doi: 10.21037/tlcr.2017.09.03.
- Maneu, V. *et al.* (2023) “Forty years of the adrenal chromaffin cell through ISCCB meetings around the world”, *Pflugers Archiv*. Springer, 475(6), p. 667. doi: 10.1007/S00424-023-02793-0.
- Markman, M. (2022) *What is Cancer?, What is cancer?* Disponible en: <https://www.cancercenter.com/what-is-cancer> (Consultado: el 20 de septiembre de 2022).
- Martinelli, S. *et al.* (2024) “The 3D in vitro Adrenoid cell model recapitulates the complexity of the adrenal gland”, *Scientific Reports 2024 14:1*. Nature Publishing Group, 14(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-024-58664-w.
- Mattiolo, P. *et al.* (2023) “Transcriptome analysis of primary sporadic neuroendocrine tumours of the intestine identified three different molecular subgroups”, *Pathology - Research and Practice*. Urban & Fischer, 248, p. 154674. doi: 10.1016/J.PRP.2023.154674.
- Mendieta, I. *et al.* (2018) “Effect of A549 neuroendocrine differentiation on cytotoxic immune response”, *Endocrine Connections*. Bioscientifica Ltd., 7(5), pp. 791–802. doi: 10.1530/EC-18-0145.

- Mendieta, I. *et al.* (2021) “Ultrastructural changes associated to the neuroendocrine transdifferentiation of the lung adenocarcinoma cell line A549”, *Acta histochemica. Acta Histochem*, 123(8). doi: 10.1016/J.ACTHIS.2021.151797.
- Mete, O. *et al.* (2022) “Overview of the 2022 WHO Classification of Paragangliomas and Pheochromocytomas”, *Endocrine Pathology*. Springer, 33(1), pp. 90–114. doi: 10.1007/s12022-022-09704-6.
- Mühlethaler-Mottet, A. *et al.* (2022) “Low number of neurosecretory vesicles in neuroblastoma impairs massive catecholamine release and prevents hypertension”, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A., 13. doi: 10.3389/FENDO.2022.1027856/FULL.
- Oliver, A. L. (2022) “Lung Cancer: Epidemiology and Screening”, *Surgical Clinics of North America*. Elsevier Inc., 102(3), pp. 335–344. doi: 10.1016/j.suc.2021.12.001.
- Pamungkas, A. D. *et al.* (2017) “A pilot study identifying a potential plasma biomarker for determining EGFR mutations in exons 19 or 21 in lung cancer patients”, *Molecular Medicine Reports*. Mol Med Rep, 15(6), pp. 4155–4161. doi: 10.3892/mmr.2017.6530.
- Park, H. J. *et al.* (2021) “Definition, Incidence, and Challenges for Assessment of Hyperprogressive Disease during Cancer Treatment with Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-analysis”, *JAMA Network Open*, 4(3), pp. 1–16. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.1136.
- Qi, S. ang *et al.* (2021) “High-resolution metabolomic biomarkers for lung cancer diagnosis and prognosis”, *Scientific Reports*. Sci Rep, 11(1). doi: 10.1038/s41598-021-91276-2.
- Ray, P. *et al.* (2010) “Statistical Evaluation of a Biomarker”, *Anesthesiology*. American Society of Anesthesiologists, 112(4), pp. 1023–1040. doi: 10.1097/ALN.0B013E3181D47604.
- Rehman, T. *et al.* (2020) “Cysteine and homocysteine as biomarker of various diseases”, *Food Science and Nutrition*. Wiley-Blackwell, pp. 4696–4707. doi: 10.1002/fsn3.1818.
- Rekhtman, N. (2022) “Lung neuroendocrine neoplasms: recent progress and persistent challenges”, *Modern Pathology*. Nature Publishing Group, 35(Suppl 1), pp. 36–50. doi: 10.1038/s41379-021-00943-2.

- Schneider, C. A., Rasband, W. S. y Eliceiri, K. W. (2012) “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis”, *Nature Methods*, 9(7), pp. 671–675. doi: 10.1038/NMETH.2089.
- Sinenko, S. A. *et al.* (2023) “Tryptophan Hydroxylase-2-Mediated Serotonin Biosynthesis Suppresses Cell Reprogramming into Pluripotent State”, *International journal of molecular sciences*. *Int J Mol Sci*, 24(5). doi: 10.3390/IJMS24054862.
- Soto-Hernández, J. E. (2022) *Expresión de IGF-1, IGF-2 y receptores IGF-1R en células de adenocarcinoma pulmonar con fenotipo neuroendócrino*. Universidad Autónoma de Querétaro. Disponible en: <https://ri-ng.uaq.mx/bitstream/123456789/3801/1/R1006824.pdf>.
- Stipanuk, M. H. (2020) “Metabolism of sulfur-containing amino acids: How the body copes with excess methionine, cysteine, and sulfide”, *Journal of Nutrition*. Oxford Academic, 150(Supplement_1), pp. 2494S-2505S. doi: 10.1093/jn/nxaa094.
- Szczesny, B. *et al.* (2016) “Inhibition of hydrogen sulfide biosynthesis sensitizes lung adenocarcinoma to chemotherapeutic drugs by inhibiting mitochondrial DNA repair and suppressing cellular bioenergetics”, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/srep36125.
- Tang, Y. *et al.* (2019) “Metabolomics workflow for lung cancer: Discovery of biomarkers”, *Clinica Chimica Acta*. *Clin Chim Acta*, pp. 436–445. doi: 10.1016/j.cca.2019.05.012.
- Tow, D. H. *et al.* (2023) “Inhibition of serotonin biosynthesis in neuroendocrine neoplasm suppresses tumor growth in vivo”, *bioRxiv: the preprint server for biology*. bioRxiv. doi: 10.1101/2023.04.07.536013.
- Turbat-Herrera, E. A. *et al.* (2018) “Cystathione β -Synthase is increased in thyroid malignancies”, *Anticancer Research*, 38(11), pp. 6085–6090. doi: 10.21873/anticancer.12958.
- Wang, J. J., Lei, K. F. y Han, F. (2018) “Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments”, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(12), pp. 3855–3864. doi: 10.26355/eurrev-201806-15270.
- Yang, Y. L. *et al.* (2022) “The Role of Hydrogen Sulfide in the Development and Progression of Lung Cancer”, *Molecules (Basel, Switzerland)*. *Molecules*, 27(24). doi: 10.3390/MOLECULES27249005.

Yin, J. *et al.* (2016) "l-Cysteine metabolism and its nutritional implications", *Molecular Nutrition & Food Research*. John Wiley & Sons, Ltd, 60(1), pp. 134–146. doi: 10.1002/MNFR.201500031.

Yoon, S. J. *et al.* (2023) "Comprehensive Metabolic Tracing Reveals the Origin and Catabolism of Cysteine in Mammalian Tissues and Tumors", *Cancer Research*. American Association for Cancer Research (AACR), 83(9), pp. 1426–1442. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-22-3000/718464/AM/COMPREHENSIVE-METABOLIC-TRACING-REVEALS-THE-ORIGIN.

Zhang, C. *et al.* (2022) "Study on plasma amino acids and piperonamide as potential diagnostic biomarkers of non-small cell lung cancer", *Translational cancer research*. Transl Cancer Res, 11(5), pp. 1269–1284. doi: 10.21037/TCR-22-865.

Zhang, L., Meng, F. y Zhong, D. (2022) "DNA Damage Repair System and Antineoplastic Agents in Lung Cancer", *Chinese Journal of Lung Cancer*, 25(6), pp. 434–442. doi: 10.3779/10.3779/j.issn.1009-3419.2022.101.24.

Zhang, Y. H. *et al.* (2020) "Identifying circulating miRNA biomarkers for early diagnosis and monitoring of lung cancer", *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 1866(10). doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165847.

Zheng, M. (2016) "Classification and Pathology of Lung Cancer", *Surgical Oncology Clinics of North America*. Surg Oncol Clin N Am, pp. 447–468. doi: 10.1016/j.soc.2016.02.003.

12. ANEXOS

12.1 Tratamiento de cáncer de pulmón

Los principales tratamientos para cáncer de pulmón se pueden dividir en cirugía, radiación y quimioterapia. La cirugía, más comúnmente utilizada es la lobectomía, se utiliza en casi el 80 % de los casos quirúrgicos y es recomendable cuando se encuentra en la etapa I o II (difícilmente en la IIIA). La resección en cuña y la segmentectomía se realizan en pacientes que se considera que no toleran la lobectomía debido a una función pulmonar reducida. Los cánceres con una mutación conocida son casi siempre del tipo adenomatosos y si hay mutación, el primer tratamiento suele consistir en fármacos específicos contra la mutación, y aunque tienen buena respuesta, suelen causar efectos secundarios como erupciones, cambios en las heces o inflamación en los órganos (hígado o pulmones). La quimioterapia no específica se basa en medicamentos inmunoestimulantes para ayudar al sistema inmunitario a reconocer las células cancerosas como extrañas, estos medicamentos tienen efectos secundarios más leves que los medicamentos convencionales contra el cáncer. Los medicamentos cisplatino y vinorelbina generalmente se administran a pacientes con esta enfermedad en etapa II. Cuando el paciente se encuentra en etapa III la radioterapia combinada con medicamentos como carboplatino y paclitaxel muestran resultados muy favorables. Si el cáncer se encuentra en etapa metastásica (IV) el tratamiento se aplica de acuerdo al tipo de tumor (Harðardóttir *et al.*, 2022).

La quimioterapia sistémica, la cirugía, la radioterapia y las terapias moleculares personalizadas han mejorado los resultados clínicos en los últimos años, aunque no han llegado a un control de la enfermedad. La inmunoterapia se posiciona como un tratamiento benéfico para mantener el control de los pacientes con cáncer de pulmón, asegurando minimizar los efectos adversos (Deshpand, Chandra y Rauthan, 2022).

La quimioterapia con platino siempre ha sido el principal tratamiento de cáncer de pulmón; en este tratamiento, el platino interactúa con las bases de las cadenas de ADN para formar enlaces cruzados de platino – ADN no específicos, de esta manera se cambia la función de la cadena de replicación y causa daños en la misma (afectando la replicación, división y muerte celular). Los inhibidores de la topoisomerasa también afectan la replicación del ADN y causan daño directo en las cadenas. Los nuevos medicamentos están relacionados con anticuerpos monoclonales recombinantes (cómo el nivolumab, atezolizumab,

pembrolizumab y druvalumab) que se dirigen principalmente a superficie de las células tumorales para neutralizarlas (Zhang, Meng y Zhong, 2022).

Los anticuerpos conjugados a fármacos (ACF) han demostrado ser tratamientos prometedores en pacientes con cáncer de pulmón (de células pequeñas o no pequeñas); muestran una velocidad de respuesta muy alta y mejoran el pronóstico de pacientes con tratamientos previos. Este tipo de tratamientos constan principalmente de tres componentes: un anticuerpo marcado contra un tumor asociado a un antígeno, un ligando y una carga citotóxica útil. Sin embargo, para mejorar los resultados es necesario mejorar las estructuras de los ACF, utilizando cargas citotóxicas más efectivas o anticuerpos más específicos, también mejorar la administración y englobar más problemas cómo los inhibidores de receptores tirosina-quinasa (Desai *et al.*, 2022).