



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE COMPUESTOS CON
NÚCLEO XANTINA EN LA DIFERENCIACIÓN
NEUROENDÓCRINA DE LAS CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA PULMONAR (A549)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

BRANDON ALEXANDER NAVA MAYA

DIRIGIDA POR

Dra. ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2026.

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.

AGRADECIMIENTOS

En memoria a mi tío César Páez por ser el motivo de esta investigación. Por siempre creer en su gallo. Un abrazo hasta el cielo.

A mi amada madre, por enseñarme que el querer es poder y que así llueve, truene o se caiga el mundo a pedazos, siempre debo de dar lo mejor de mí. Por darme su mano cuando sentía que no podía más. Este logro también es tuyo.

A mis queridos tíos Janeth Yuridia Maya Páez y Daniel Sánchez Ramírez por ser dos pilares en mi vida. Por el apoyo incondicional y por aconsejarme sobre como enfrentar los retos. Los amo.

Mi abuela Silvia Páez porque de ti aprendí a ser fuerte, a no dejarme caer sobre cualquier adversidad y sobre todo por amarme y velarme en todo momento.

A mi tío Antonio Páez y mi abuelo Salomón Ortiz por sus consejos y apoyo. Los quiero mucho.

A mis tíos abuelos Araceli Páez y Juan Páez por su apoyo y siempre creer en mí.

A la mujer de mi vida Ángela Peña por brindarme su inmensurable amor y fortaleza para la realización de este trabajo. Por acercarme a Dios y enseñarme a vivir. Te amo.

A mis mejor amigo y hermano Jorge Tierrablanca porque pasamos dificultades, risas, llantos y siempre estuviste para mí aún cuando yo no podía estarlo para ti. Este trabajo es tuyo, te quiero hermano.

A mis mejores amigas de la carrera Jaqueline Hernández Medrano, Karla Patricia Ochoa, Karla Valenzuela, Lizeth Valencia porque con ustedes, este viaje se hizo divertido, aprendí mucho de ustedes, gracias por todo el apoyo y las risas.

A mi directora de tesis Dra. Alicia Mendieta por ser mi mentora, mi profesora, mi amiga. De usted aprendí a que lo mejor siempre llega cuando menos lo esperamos, gracias por todos los conocimientos que compartió conmigo.

A la Dra. Dulce Caraveo Gutiérrez, M.C. Karla Salinas, M.C. Karla Denisse, QFB. Ana Mayra y QFB. Judith Santos por enseñarme todo lo que sé dentro del laboratorio, por siempre llenar los pasillos con sus risas, por todo el cariño y apoyo.

A mis hermanos en Cristo: Ahiram, Abi, Perla, Santi médico, Santi arquitecto, Eli y Raquel por arroparme en mi momento de necesidad, porque desde el día uno me hicieron sentir en casa, en familia. Gracias, por tanto.

Principalmente este trabajo es dedicado a Dios, por enseñarme a ser valiente, a nunca rendirme y sobre todo por ponerme a personas maravillosas en mi camino, amigos, familia, pareja. Todo lo que soy te pertenece.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE CUADROS	ii
INDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
1.1. Cáncer.....	2
1.2. Cáncer de pulmón	2
1.3. Cáncer neuroendócrino	3
1.4. Diferenciación neuroendócrina	3
1.5. El papel de los compuestos con metilxantina en las células neuroendócrinas	5
1.6. Forskolina.....	7
HIPÓTESIS.....	8
OBJETIVOS.....	9
1.7. Objetivo general.	9
1.8. Objetivos específicos.....	9
METODOLOGÍA	10
1.9. Materiales.....	10
1.10. Métodos.....	10
1.10.1. Diseño experimental	10
1.10.2. Transdiferenciación neuroendócrina	11
1.10.3. Viabilidad celular (Ensayos MTT).....	11
1.10.4. Marcadores neuroendócrinos (RT-PCR).....	11
1.10.5. Análisis estadístico	12
1.10.6. Disposición de residuos	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
CONCLUSIONES	25
REFERENCIAS	26

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Cebadores para amplificar los marcadores neuroendócrinos.....	11

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1: Estructura química de la xantina y las combinaciones de las cadenas laterales de sus derivados.....	6
Figura 2. Efecto de compuestos con núcleo xantina (IBMX/FSK, cafeína, teobromina) en la morfología de células A549.....	14
Figura 3. Efecto de compuestos con núcleo xantina (IBMX/FSK, cafeína, teobromina) en el número de células A549 con proyecciones de tipo neurita.....	16
Figura 4. Efecto de compuestos con núcleo xantina (IBMX/FSK, cafeína, teobromina) en el número de proyecciones por célula A549..	17
Figura 5. Efecto de compuestos con núcleo xantina (IBMX/FSK, cafeína, teobromina) en el tamaño proyecciones de tipo neurita en células A549.....	19
Figura 6. Efecto de compuestos con núcleo xantina (IBMX/FSK, cafeína, teobromina) sobre la viabilidad celular.....	20
Figura 7. Efecto de compuestos con núcleo xantina (IBMX/FSK, cafeína, teobromina) sobre la expresión de los marcadores neuroendócrinos (CgA y SYP) por RT-PCR.	21
Figura 8. Efecto de compuestos con núcleo xantina (IBMX/FSK, cafeína, teobromina) sobre la expresión de los marcadores neuroendócrinos (CgA y SYP) por RT-PCR.	22
Figura 9. Efecto de compuestos con núcleo xantina (IBMX/FSK, cafeína, teobromina) sobre la expresión del factor de transcripción (ASCL1) por RT-PCR..	24

RESUMEN

El cáncer de pulmón se encuentra entre las principales causas de mortalidad por cáncer a nivel mundial. Esta enfermedad se caracteriza por ciertos aspectos como la proliferación sostenida, evasión de los mecanismos inmunológicos que propician la apoptosis, así como su capacidad invasiva y metastásica. El fenotipo neuroendócrino, representa un estadio tumoral más agresivo. Para este estudio, el fenotipo neuroendócrino se evaluó a través de la transdiferenciación de células tumorales hacia un fenotipo que se caracteriza por cambios morfológicos, la secreción de hormonas y la expresión de los marcadores cromogranina (CgA) y sinaptofisina (SYP). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los compuestos con núcleo xantina presentes en la dieta (cafeína y teobromina) sobre la transdiferenciación neuroendócrina de una línea celular de adenocarcinoma pulmonar (A549) en ausencia y presencia de suero fetal bovino (SFB) (10 % en DMEM). La línea de adenocarcinoma de pulmón fue tratada con compuestos con núcleo xantina, cafeína (1,3,7-trimetilxantina, 100 μ M) y teobromina (3,7-dimetilxantina, 100 μ M) por 120 horas. Como control positivo de transdiferenciación se trató con agentes que incrementan la concentración intracelular de cAMP 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, 0.5 mM) y forskolina (FSK, 0.5 mM) por 120 horas. Como control de estrés celular se trató con un antibiótico glucopéptido que generó roturas en el ADN y estrés celular por 120 horas (zeocina, 100 μ M). Se observaron cambios morfológicos en las células relacionados con el fenotipo neuroendócrino, como la formación y el número y el tamaño de proyecciones de tipo neurita. Además de la viabilidad celular por el ensayo (MTT) y la expresión de los marcadores neuroendócrinos (CgA), (SYP), y el factor de transcripción ASCL1, por (RT-PCR). Nuestros resultados sugieren que cafeína y teobromina no inducen un fenotipo neuroendócrino a una concentración de 100 μ M en condiciones de ausencia y presencia de SFB al 10 %. Se requiere el estudio de otras condiciones de suplementación para confirmar este resultado.

Palabras clave: Cáncer de Pulmón, neuroendócrino, metilxantinas, cafeína, teobromina.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón se encuentra entre las primeras causas de muerte, no solo en México, también a nivel mundial. Su clasificación se basa en su capacidad de adaptación, así como su heterogeneidad. Su diagnóstico suele ser tardío, lo que da como consecuencia una baja tasa de supervivencia; además, los métodos para identificarlo suelen ser agresivos e invasivos. Dentro del estudio acerca del cáncer de pulmón, las neoplasias neuroendócrinas cobran relevancia debido al cambio en su fenotipo, lo que resulta en un cáncer más agresivo. Por su parte, las metilxantinas, como la cafeína y teobromina, son metabolitos naturales que son consumidos en la dieta. Algunos de sus mecanismos se ven relacionados con la proliferación, diferenciación y viabilidad celular por lo que se han vuelto de gran interés para su estudio. En este proyecto se busca identificar la transdiferenciación hacia el fenotipo neuroendócrino en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar A549, empleando a las metilxantinas (cafeína y teobromina) como alternativa a los modelos previamente estudiados en nuestro laboratorio (IBMX + FSK).

Este proyecto tiene como objetivo conocer más acerca del mecanismo de transdiferenciación de las células de cáncer de pulmón y la participación de las metilxantinas en la generación de tipos de cáncer de pulmón más agresivos y/o resistentes a quimioterapias como el fenotipo neuroendócrino.

ANTECEDENTES

1.1. Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte que aquejan a ambos sexos. Tan solo en el año 2022 en México se registraron 847, 716 defunciones por cáncer (INEGI, 2024). Las células cancerosas son derivadas de alteraciones del material genético; dichas alteraciones le confieren a la célula la capacidad de escapar de los mecanismos de control para dividirse aceleradamente y sin restricciones (apoptosis, senescencia) (Ruddon, 2003). El proceso por el cual las células normales se convierten en células cancerosas se le conoce como carcinogénesis (Valent y col., 2012,). Las cualidades que van adquiriendo las células cancerosas durante un periodo de desarrollo se le conoce como “hallmarks del cáncer” o rasgos del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011). En el caso concreto del cáncer de pulmón, se ha investigado que dichas mutaciones y el tipo celular donde ocurren, establecen un fenotipo neuroendócrino más agresivo (Sutherland & Berns, 2010).

1.2. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es el segundo tipo de cáncer más común a nivel mundial, con una incidencia reportada de 2,480,675 casos en 2022 (GCO, 2022). Su clasificación histológica da lugar a dos tipos: el cáncer de pulmón de células no pequeñas y el cáncer de pulmón de células pequeñas (por sus siglas en inglés NSCLC Y SCLC respectivamente) (Roviello, 2015). NSCLC abarca todos los tipos de cáncer epitelial siendo el más común el carcinoma de células escamosas, el carcinoma de células grandes y el adenocarcinoma, lo que comprende el 85 % de los tipos de cánceres, mientras que SCLC representa el 15 %, este último resulta ser más agresivo, con una alta tasa de proliferación y un mayor porcentaje de metástasis, lo que conlleva en una baja tasa de supervivencia para quien es diagnosticado con esta enfermedad (Rekhtman, 2022).

1.3. Cáncer neuroendócrino

Los tumores neuroendócrinos ocurren en casi todo el cuerpo y se originan a partir de células dentro del sistema endócrino (Klöppel, 2017). Algunas características presentes son la morfología similar a un grano de pimienta y una mayor expresión de marcadores neuroendócrinos (Sultana y col., 2023a). El sitio con un mayor porcentaje de aparición es el tracto gastrointestinal (60 %), mientras que en el pulmón ocupan el segundo sitio de origen más común (20 %), perteneciendo al grupo de SCLC (Silveira y col., 2017). Sin embargo, también están presentes en diversos órganos como cabeza, tiroides, timo, mama, piel entre otros (Rosa & Uccella, 2020). Estos tumores secretan hormonas peptídicas, así como algunas aminas biogénicas que originan diferentes patologías (Gaudenzi y col., 2020). De acuerdo con la clasificación histológica los tumores neuroendócrinos se pueden agrupar en dos tipos: tumores neuroendócrinos bien diferenciados (NET) y carcinomas neuroendócrinos poco diferenciados (NEC). Dentro del grupo NET se encuentran los carcinoides típicos y carcinoides atípicos ambos son tumores de tipo G1 y G2 respectivamente, mientras que por lado de los NEC encontramos al carcinoma de pulmón de células pequeñas y al carcinoma de pulmón en SCLC y NSCLC, respectivamente. Ambos son tumores de tipo G3 representando neoplasias de alto grado. La clasificación G1, G2 y G3 para las neoplasias neuroendócrinas son en base a la expresión de Ki-67, una proteína que se encuentra en células en proceso de proliferación, a mayor índice de proliferación Ki-67 mayor probabilidad de que el cáncer disemine a diferentes órganos (Rekhtman, 2022).

1.4. Diferenciación neuroendócrina

En el tejido pulmonar existen células neuroendócrinas, estas, representan el 0.41 % de todas las células epiteliales que conforman la vía respiratoria, su función se centra en la secreción de diversos componentes como lo son el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la serotonina, que son factores que participan como transductores sensoriales en respuesta a estímulos fisiológicos del pulmón (Noguchi

y col., 2020). En los tumores neuroendócrinos de pulmón se cree que las células neuroendócrinas provienen de carcinogénesis/proliferación de células NE normales o de la transdiferenciación celular de las células tumorales (Yellin & Benfield, 1985). El proceso por el cual una célula bien diferenciada de un linaje característico cambia para pertenecer a otro bien diferenciado, se llama transdiferenciación. Esto tiene que ver con la progresión del cáncer puesto que altera el estado celular para sobreponerse a algunas limitaciones como la falta de oxígeno y nutrientes generando un microambiente pro tumoral (Thankamony y col., 2021). En el cáncer de pulmón se encuentra ampliamente reportado que esta transdiferenciación se puede lograr *in vitro* gracias a la exposición a diferentes estímulos como pueden ser la inhibición por contacto, el aumento de la concentración intracelular de cAMP de manera continua, interleucinas, radiación fraccionada ionizante, etc. (Mendieta y col., 2018; Adame-García y col., 2019; Deng y col., 2008). Sin embargo, existen otros factores que pueden propiciar la transdiferenciación, como las alteraciones genéticas o epigenéticas, así como el estrés producido por ciertos fármacos e inclusive algunas señales generadas por el propio microambiente. La cromogranina (CgA), la sinaptofisina (SYP) son algunos marcadores para identificar la presencia de células NED, presentes en diversos órganos como los que conforman el sistema gastrointestinal, cabeza, tiroides, mama, colon, hueso, entre otros (Sultana y col., 2023b). Otras formas de detección son por medio de ensayos como inmunohistoquímica, imágenes moleculares con indio 111-octreótido que detecta los niveles de somatostatina y resonancia magnética nuclear (Sundin y col., 2017). CgA es una proteína monomérica soluble presente en los gránulos secretorios, que interviene en diferentes procesos como la regulación de las vesículas secretoras del sistema simpático, y del adrenomedular. También juega un papel importante en la biología vascular y tumoral ya que se ha demostrado que tiene una función bifásica, es decir, puede inhibir la angiogénesis lo que da como consecuencia que se activen las células endoteliales manteniendo íntegra la barrera endotelial. Por otro lado, en la mayoría de cánceres neuroendócrinos las concentraciones de CgA son mayores por lo que el efecto antiangiogénico disminuye (Crippa y col., 2013). La sinaptofisina (SYP) es una glucoproteína de membrana integral que se encuentra en las vesículas

presinápticas de las células neuroendócrinas, el reciclaje de estas vesículas es esencial para la liberación de neurotransmisores y neuropéptidos. Su presencia indica que la célula tiene maquinaria secretora especializada, característico de un fenotipo neuroendócrino (Blobel y col., 1985).

1.5. El papel de los compuestos con metilxantina en las células neuroendócrinas

Las xantinas metiladas (metilxantinas) son metabolitos secundarios de nucleótidos de purina, por lo que se consideran como los compuestos con mayor consumo en el mundo (Monteiro y col., 2016). Se pueden encontrar en diversos productos de origen natural como el té, café, chocolate, así como en productos derivados como bebidas energéticas, refrescos y algunos medicamentos (Basnet y col., 2017). A nivel celular, las metilxantinas actúan como inhibidores de las fosfodiesterasas, en específico la fosfodiesterasa-4 (PDE4), esta inhibición complica la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster en diferentes moléculas como el monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), impidiendo su degradación y, por ende, incrementa su concentración (Sugimoto y col., 2014). Este incremento participa en la activación de la proteína de respuesta (CREB), con ayuda de la proteína quinasa A (PKA) (Yoneda y col., 2017). CREB se considera una proteína multifacética ya que participa en una amplia serie de procesos biológicos (Bleckmann y col., 2002). Su sobreexpresión promueve un aumento en la proliferación celular, la disminución en la apoptosis y una mayor migración celular, es por eso que CREB está relacionada con la iniciación y la progresión tumoral (Steven & Seliger, 2016). El IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) es un inhibidor no selectivo de las fosfodiesterasas, lo que aumenta el (cAMP) intracelular (Savai y col., 2010). IBMX modula funciones celulares dependientes de cAMP como la inhibición del factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), así como la activación de la proteína quinasa A (PKA) (Tio y col., 2010). En conjunto con Forskolina induce la expresión de un marcador neuronal tirosina hidroxilasa presente en células embrionarias carcinomatosas (NT2) (Deng y col., 2001). Cuando se utiliza en combinación con dibutilil adenosina dbcAMP las células madre mesenquimales se diferenciaron en células neuronales (Fajardo y col., 2020).

La cafeína (1,3,7 trimetilxantina) es un compuesto psicoestimulante que se encuentra de manera natural en algunas plantas, así como los granos de cacao, café y hojas de té (Moratalla, 2008). Su estructura se compone principalmente en grupos metilo adicionales en el nitrógeno de la estructura de la xantina (figura 1). Por su parte, la teobromina (3,7- dimetilxantina) posee dos grupos metilo R2 y R3 respectivamente. Es un compuesto proveniente de la cafeína que podemos encontrar en el cacao, sin embargo, también está presente en muchos alimentos de origen vegetal (Lee y col., 2022).

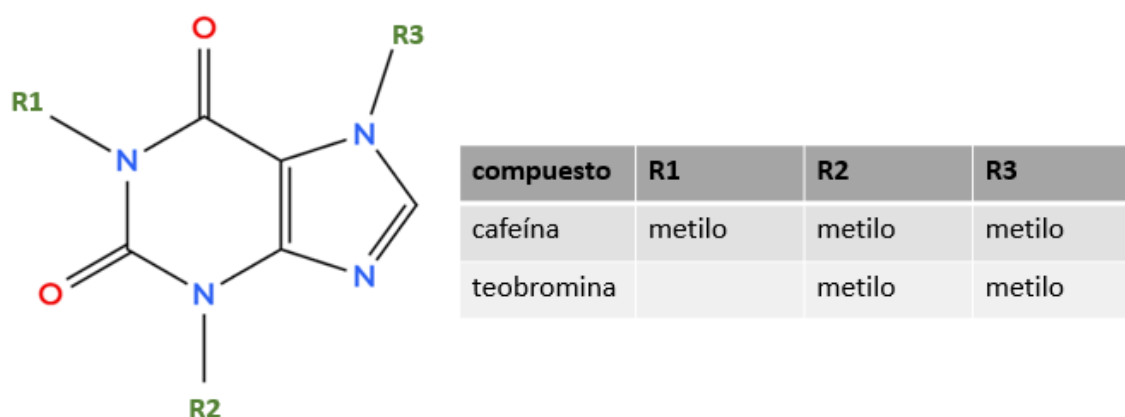


Figura 1: Estructura química de la xantina y las combinaciones de las cadenas laterales de sus derivados; Modificado de (Janitschke y col., 2020)

El mecanismo de acción de las metilxantinas se basa en 4 diferentes tipos: Regulación de los niveles de calcio intracelular, inhibición de la fosfodiesterasa, modulación del receptor GABAA y antagonismo de los receptores de Adenosina (Franco y col., 2013). Las fosfodiesterasas por medio de su inhibición aumentan la concentración de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) lo que provoca una activación de la proteína de respuesta (CREB); sin embargo, para que se lleve a cabo se requieren concentraciones elevadas de metilxantinas por lo que su principal mecanismo de acción se centra en participar como antagonista de los receptores de adenosina (Choi y col., 2004).

1.6. Forskolina

La forskolina es un diterpeno derivado de las raíces de *Coleus forskholii* (Kanne y col., 2015). A lo largo del tiempo, se ha utilizado como tratamiento a diferentes patologías como asma, psoriasis y la hipertensión (Pateraki y col., 2017). Actúa como activador del adenilato ciclasa, esta enzima interviene en la síntesis de (cAMP), lo que permite su acumulación masiva, esto puede implicar funciones supresoras o promotoras en el desarrollo del cáncer (Salzillo y col., 2023). Otro mecanismo por el cual interviene la forskolina es como potenciador de la noradrenalina a través de la vía ERK en las neuronas dopaminérgicas (Troadek y col., 2002).

En este estudio se busca evaluar un modelo de transdiferenciación hacia el fenotipo neuroendócrino en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar A549, utilizando metilxantinas (cafeína y teobromina) como alternativa al modelo previamente probado con éxito en nuestro laboratorio (IBMX + FSK).

Esto con la finalidad de conocer más acerca del mecanismo de transdiferenciación de las células de cáncer de pulmón y sobre la participación de las metil xantinas en la generación de tipos de cáncer de pulmón más agresivos y/o resistentes a quimioterapias.

HIPÓTESIS

Los compuestos con núcleo xantina (cafeína y teobromina) causarán la diferenciación neuroendócrina en las células de adenocarcinoma pulmonar humano A549.

OBJETIVOS

1.7. Objetivo general.

Determinar el efecto de los compuestos con núcleo xantina (cafeína y teobromina) en la diferenciación neuroendócrina de la línea celular de adenocarcinoma pulmonar A549.

1.8. Objetivos específicos.

- Analizar los cambios morfológicos asociados a la diferenciación neuroendócrina en la línea celular A549 tratada con compuestos con núcleo xantina (cafeína y teobromina), por microscopía.
- Evaluar el efecto de los compuestos con núcleo xantina (cafeína y teobromina) sobre la proliferación de las células de adenocarcinoma pulmonar A549, por MTT.
- Determinar la expresión de marcadores neuroendócrinos (CgA, SYP y ASCL1) de la línea celular de adenocarcinoma pulmonar A549, tratada con compuestos con núcleo xantina, por RT-PCR.

METODOLOGÍA

1.9. Materiales

Para el cultivo celular se utilizó la línea celular de adenocarcinoma pulmonar A549 (ATCC, CCL-185), placas de cultivo de 24 pozos, medio DMEM (Biowest, BIO-L0103-500) suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (Biowest, S1400-500) y 100 μ L al 2 % de una solución de Penicilina-Estreptomicina (GIBCO, 15070-063), tampón fosfato salino 1X (PBS) (Gibco 10010023) y una solución de tripsina (0.25 %) (Gibco 25200072). La transdiferenciación neuroendócrina se llevó a cabo utilizando forskolina (MedChemExpress 66575-29-9) y 3-isobutil-1-metilxantina (Sigma 28822-58-4). Los tratamientos incluyeron cafeína (Sigma 1001887349), teobromina (Sigma 101339630) y zeocina (Gibco 2165842).

La extracción de ARN total se realizó con el kit (QIAGEN 74004). La síntesis de ADN complementario (cDNA) se llevó a cabo utilizando el kit (Roche 11483188001). Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizó MasterMix (Promega M7122) y agarosa (Promega 0000551526).

1.10. Métodos

1.10.1. Diseño experimental

Las células de adenocarcinoma pulmonar al alcanzar un 80 % de confluencia, se sembraron a una densidad de (5×10^4 células en 500 μ L) en cada pozo de una placa p24, utilizando medio DMEM completo (suplementado con 10 % de suero fetal bovino con 2 % de antibióticos). Las células se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 37 °C con CO₂ al 5 %. Tras el periodo de incubación, cada pozo fue lavado con 500 μ L de (PBS). Posteriormente las células se dividieron en 6 grupos con 4 réplicas para cada uno con un volumen final del 500 μ L. Al grupo control se le administró únicamente medio DMEM completo (con 10 % de suero fetal bovino con antibióticos). Al segundo grupo, se le añadieron a cada pozo los fármacos forskolina

(FSK) y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) a una concentración de 0.5 mM de cada una. El tercer grupo fue suplementado con cafeína en el medio DMEM a una concentración de 100 μ M. El siguiente grupo se le añadió medio DMEM con una concentración de teobromina de 100 μ M. Al quinto grupo igualmente a cada pozo se le administró DMEM con una concentración 100 μ M de zeocina.

1.10.2. Transdiferenciación neuroendócrina

Para evaluar la presencia del fenotipo neuroendócrino, las células A549 se analizaron con un microscopio invertido (AXIOVERTM, Zeiss). Se tomaron micrográficas de las células a las 0, 72 y 120 horas, una vez iniciados los tratamientos. Las proyecciones de tipo neurita se cuantificaron con el software Fiji de (ImageJ versión 1.54), utilizando el plugin NeuronJ, rastreando y trazando todas las neuritas presentes.

1.10.3. Viabilidad celular (Ensayos MTT)

La viabilidad celular se evaluó a las 72 y 120 horas. Cada grupo fue lavado con 500 μ L de PBS y posteriormente se añadió medio basal DMEM suplementado con 10 μ L bromuro de 3,4,5- dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Las placas se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Luego, el medio de cultivo (DMEM + MTT) fue retirado y se agregó una solución solubilizadora, incubando durante 5 minutos. Finalmente, la absorbancia se leyó a 570 nm en un lector de placas.

1.10.4. Marcadores neuroendócrinos (RT-PCR).

La expresión de los marcadores neuroendócrinos CgA y SYP, ASCL1, fue analizada mediante RT-PCR en punto final. Para ello, las células A549 se sembraron a una densidad de 3×10^5 por pozo en una placa P6. Tras 120 horas de tratamiento, se extrajo ARN total de A549 y A549_{NED} utilizando trizol. La

síntesis de ADNc se realizó con el kit RevertAid First Stand cDNA Synthesis (Roche 11483188001), combinando hexámeros aleatorios y oligo(dT)₁₈ como cebadores. Tras determinar la concentración y la calidad del ácido nucleico, los genes CgA, SYP y ASCL1 se amplificaron mediante PCR en punto final utilizando cebadores específicos para cada gen, ver cuadro 1. La PCR se llevó a cabo con el reactivo GoTaq Green Master Mix (Promega M7122), siguiendo el protocolo del fabricante. Esta consistió en una etapa inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C, seguida de 35 repeticiones del siguiente ciclo: desnaturalización a 95°C durante 30s, hibridación a 55°C durante 30s y extensión a 72°C durante 60s. Los productos de reacción fueron separados en un gel de agarosa al 2 %, el cual se semicuantificó en el programa GraphPad Prism versión 8.0.1.

1.10.5. Análisis estadístico

Se realizaron 3 experimentos independientes por triplicado, graficando las medias de los experimentos $\pm$ error estándar (SE). Para analizar los datos grupales se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnett como prueba *post hoc*. Un valor $p < 0.05$ indica una diferencia estadísticamente significativa. Todo esto se llevó a cabo mediante el programa GraphPad Prism versión 8.0.1.

1.10.6. Disposición de residuos

El modelo de estudio es una línea celular previamente adquirida de un banco de células ATCC, y la disposición de residuos de este experimento se llevó a cabo según los lineamientos de la facultad y de nuestra H. Universidad Autónoma de Querétaro. Todo el material que estuvo en contacto con las células fue sometido a un proceso de inactivación por al menos 15 minutos con una solución de cloro al 10 % antes de ser desechado, con el fin de prevenir cualquier riesgo de contaminación. Los residuos biológicos y el material de desecho, se colocaron en

una bolsa roja destinado para Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI). Posteriormente estas bolsas fueron almacenadas temporalmente para su recolección y transporte por la empresa ECOLSERVI Industrial, quienes se encargarán del tratamiento para su correcta disposición final. En base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo

Cuadro 1. Cebadores que se utilizaron para amplificar los marcadores neuroendócrinos

Genes	Secuencia	Tm (°C)	Productos (bp)	Referencias
CgA	Fwd:5'-AACCGCAGACCAGAGGACCA-3'	63.30	102	(Fosado y col., 2023)
	Rev: 5'-GTTCCAGCCCCGCCGTAGT-3	63.95		
SYP	Fwd: 5'-AGACAGGGAACACATGCAAG-3'	58.10	123	
	Rev: 5'-TCTCCTTAAACACGAACACAG-3'	58.28		
ASCL1	Fwd: 5'-CAAGCAAGTCAAGCGACAGC-3'	60.39	156	(Herramienta de diseño de primers, s/f)
	Rev: 5'-TTGACCAACTTGACGCGGTT-3'	60.75		
β Actina	Fwd: 5'-CCATCATGAAGTGTGACGTTG-3'	58-64	197	(Fosado y col., 2023)
	Rev: 5'-ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA-3'			

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.11. Transdiferenciación neuroendócrina (cambios morfológicos)

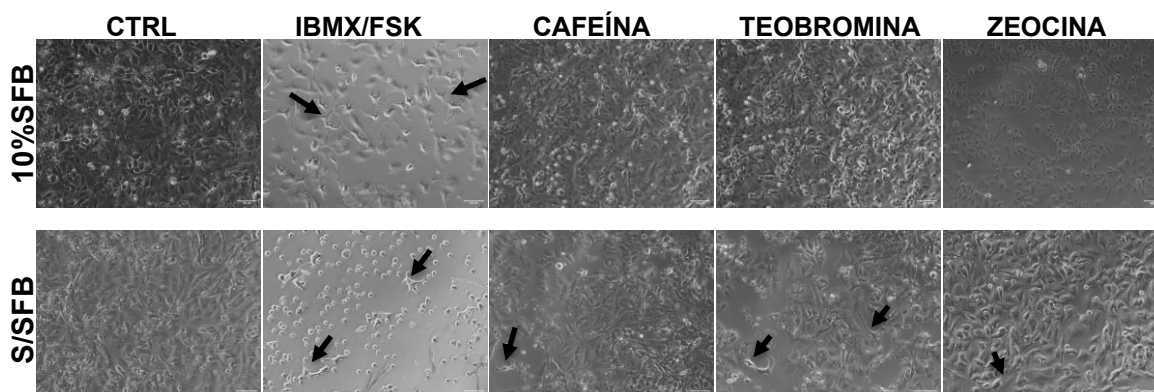


Figura 2. Efecto de compuestos con núcleo xantina (IBMX/FSK, cafeína, teobromina) en la morfología de células A549. Las células A549 con 10 % de suero fetal bovino o deprivadas (S/SFB), fueron tratadas durante 120 h con diferentes compuestos: IBMX + FSK [0.5 mM, control positivo], cafeína [100 μ M], teobromina [100 μ M] y zeocina [100 μ M, control de estrés celular], posteriormente se tomaron las micrografías con el microscopio 200M Carl Zeiss, a 10X.

En la figura 2 se observa el efecto de compuestos con núcleo xantina (IBMX/FSK, cafeína, teobromina) en la morfología de células A549 a las 120 h de tratamiento. El grupo de control positivo de transdiferenciación tratado con 0.5 mM de IBMX y FSK con 10 % de suero fetal bovino y deprivados de SFB, presentan la disminución de la densidad celular y un cambio en su morfología epitelial, puesto que, presentan redondeamiento del cuerpo celular y proyecciones de tipo neurita después del tratamiento, comparados con el grupo control. Mientras que, nuestros tratamientos experimentales con cafeína [100 μ M] y teobromina [100 μ M] presentan cambios morfológicos en el grupo deprivado (sin SFB), de manera localizada, es decir, solo un grupo de células en comparación con el grupo control.

El grupo control de estrés celular, tratado con zeocina [100 μ M], no presentó cambios en la morfología; sin embargo, si disminuyó la densidad celular principalmente en el

grupo con 10 % de SFB. Esto debido a que la zeocina es un antibiótico glucopéptido que genera roturas en el ADN y estrés celular y no está relacionado con las vías que inducen transdiferenciación neuroendócrina, ya que se ha propuesto que su principal mecanismo de acción es mediante la activación de las caspasas mitocondriales que conlleva a la apoptosis (Hwang y col., 2005; Trastoy y col., 2005).

A lo largo del tiempo, se han estudiado diversos mecanismos para inducir un fenotipo neuroendócrino en células epiteliales. En 2017 Yadav S, propone que, la vía PI3K está involucrada en diferenciación neuroendócrina en células de próstata (Yadav y col., 2017). En 2018 Zhang y col. Demuestran que la proteína de unión al elemento de respuesta cAMP (CREB), promueve los fenotipos neuroendócrinos (Zhang y col., 2018). Adame García en 2019 estudia el incremento de cAMP a través de diversos agentes para inducir el fenotipo neuroendócrino (Adame-García y col., 2019). Basados en esta información se propuso el aumento de cAMP como el modelo para inducir la transdiferenciación neuroendócrina en células A549, como nuestro control positivo, usando 10 % de suero fetal bovino y privado de este; en combinación con IBMX+FSK (0.5mM). Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis concuerdan con lo reportado por Mendieta y colaboradores en 2021 donde al utilizar IBMX, que actúa como un inhibidor de las fosfodiesterasa y forskolina que incrementa la activación de adenilato ciclasa, promueven en conjunto la síntesis de cAMP y se inducen los cambios morfológicos que caracterizan al fenotipo neuroendócrino a las 120h de tratamiento, ya que se observa la formación de proyecciones de tipo neurita y la disminución de células con morfología epitelial/poligonal en las células A549 (Mendieta y col., 2021).

El tratamiento con los grupos experimentales cafeína [100 μ M] y teobromina [100 μ M] no promovió cambios morfológicos en la población celular cuando el medio contenía 10 % de SFB. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Eguchi y col., quienes demostraron que tanto la cafeína como la teobromina, a una concentración de 100 μ M, no inducen cambios morfológicos ni alteraciones en la expresión de claudinas. No obstante, dichos autores observaron modificaciones en la expresión de claudinas a una concentración de 200 μ M, destacando que estas proteínas actúan como biomarcadores y moduladores en la diferenciación de células

tumorales epiteliales hacia un fenotipo más agresivo. En este contexto, se sugiere que los resultados obtenidos podrían estar asociados con la promoción de la transición epitelial-mesenquimal, un proceso mediado por los receptores de adenosina A2B, los cuales se encuentran sobreexpresados en las células A549. Adicionalmente, la cafeína actúa como antagonista de la adenosina al unirse a receptores como A2B con mayor afinidad que la teobromina ($K_i \approx 10 \mu\text{M}$ vs. $K_i > 100 \mu\text{M}$, respectivamente), lo que sugiere que la señalización inducida por la cafeína podría involucrar rutas alternativas (Eguchi y col., 2022a)

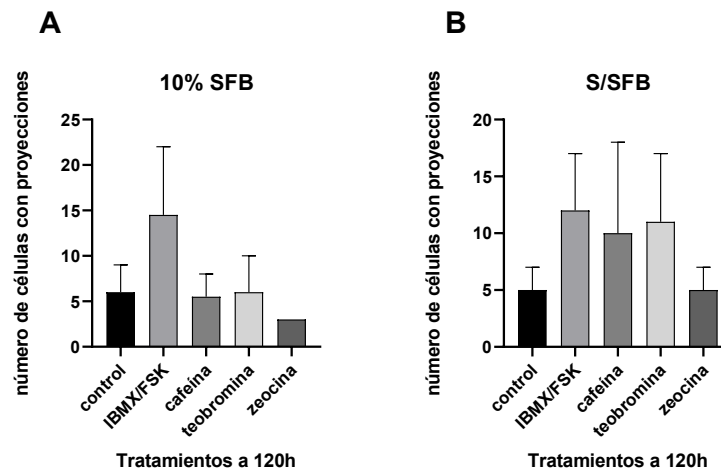


Figura 3. Efecto de compuestos con núcleo xantina (IBMX/FSK, cafeína, teobromina) en el número de células A549 con proyecciones de tipo neurita. A) Las células A549 con 10 % de suero fetal bovino o B) deprivadas (S/SFB), fueron tratadas durante 120 h con diferentes compuestos: IBMX + FSK [0.5 mM, control positivo], cafeína [100 μM], teobromina [100 μM] y zeocina [100 μM , control de estrés celular], posteriormente se tomaron las micrográficas con el microscopio 200M Carl Zeiss, a 10X, seguido de la cuantificación de células con proyecciones de tipo neurita. análisis estadístico utilizado.

Para observar claramente los cambios inducidos por los tratamientos, se cuantificó el número de células con proyecciones de tipo neurita por campo. Los resultados registrados en la figura 3, muestran la presencia de células con proyecciones de tipo neurita, en ambas condiciones (10 % SFB y deprivado) del grupo control positivo (IBMX+FSK) comparado con el control sin tratamiento. Por su parte, el control de estrés celular tratado con zeocina, no muestra el aumento de células con

proyecciones en comparación con las A549 sin tratamiento. Por otro lado, en los tratamientos experimentales con cafeína [100 μ M] y teobromina [100 μ M] observamos que existe presencia de células con proyecciones de tipo neurita cuando se deprivan de SFB sin embargo, el análisis estadístico no aportó evidencia suficiente para detectar diferencias respecto al control. Se ha reportado en la literatura que, para comprender el comportamiento de una célula neuroendócrina cancerosa se deben considerar términos como axonogénesis y neurogénesis que son estudiados en conjunto dentro de la neurobiología del cáncer. Estos consisten en el desarrollo de células neuronales, que presentan proyecciones de tipo neurita que sirven para establecer una red de comunicación dentro del microambiente tumoral (Kaarijärvi y col., 2021). Por tanto, identificar el efecto de estos compuestos usados en la dieta resulta relevante para identificar en qué condiciones se promueve la axonogénesis y neurogénesis en las células de cáncer de pulmón.

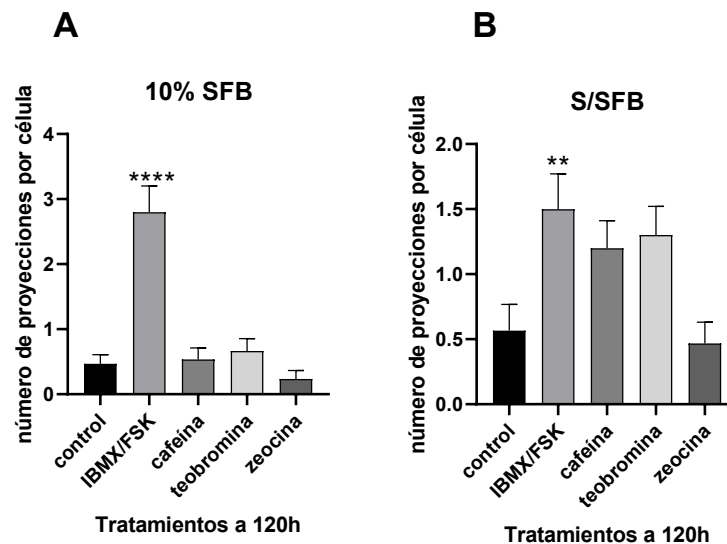


Figura 4. Efecto de compuestos con núcleo xantina (IBMX/FSK, cafeína, teobromina) en el número de proyecciones por célula A549. Las células A549 con A) 10 % de suero fetal bovino o B) deprivadas, fueron tratadas durante 120 h con diferentes compuestos: IBMX + FSK [0.5 mM, control positivo], cafeína [100 μ M], teobromina [100 μ M] y zeocina [100 μ M, control de estrés celular], posteriormente se tomaron las micrografías con el microscopio 200M Carl Zeiss, a 10X, seguido de la cuantificación el número de proyecciones de tipo neurita por célula A549.

Adicionalmente, se cuantificó el número de proyecciones por célula para distinguir el los cambios morfológicos inducidos por los tratamientos. Como se observa en la figura 4, en ambas condiciones de SFB (10 % y deprivado) del grupo control positivo (IBMX+FSK) hay un aumento significativo del número de proyecciones de tipo neurita por célula con respecto al grupo control (A549 sin tratamiento). Para el grupo de control de estrés celular tratado con Zeocina, no se muestra un aumento del número de proyecciones por célula en comparación con las A549 sin tratamiento. Además, podemos apreciar que, con 10 % de suero fetal bovino, nuestros grupos experimentales con cafeína [100 μ M] y teobromina [100 μ M] no muestran el aumento de estas proyecciones por célula. Por otra parte, en el grupo deprivado de suero, se observa el aumento de proyecciones por célula con respecto al control. Esta tendencia no tiene significancia estadística, sin embargo, esto responde a que dichos cambios solo se encuentran de manera localizada, es decir, solo en un grupo de células en comparación con el grupo control de manera similar a lo que se reportó en los cambios morfológicos (figura 2). El aumento en el número de neuritas por célula se relaciona con un cambio en la morfología de las células de adenocarcinoma pulmonar, sugiriendo su desarrollo hacia un tumor característico de un fenotipo neuroendócrino con el suplemento de cafeína y teobromina, sólo en condiciones de deprivación de SFB. Los antecedentes reportados previamente en estudios preclínicos, demostraron que la presencia de dichas proyecciones, promueve la angiogénesis dando como resultado la modulación procesos inmunitarios que favorecen la proliferación y metástasis en el cáncer de pulmón (Nguyen y col., 2023).

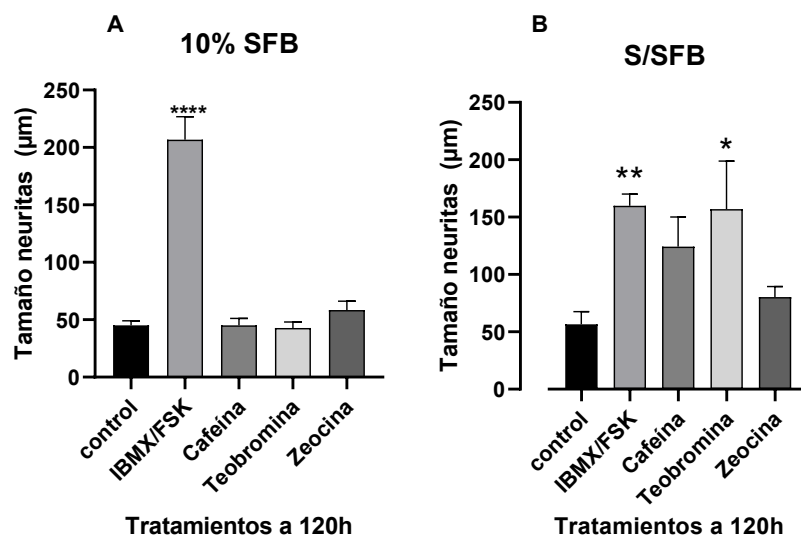


Figura 5. Efecto de compuestos con núcleo xantina (IBMX/FSK, cafeína, teobromina) en el tamaño proyecciones de tipo neurita en células A549. Las células A549 con A) 10 % de suero fetal bovino o B) deprivadas, fueron tratadas durante 120 h con diferentes compuestos: IBMX + FSK [0.5 mM, control positivo], cafeína [100 µM], teobromina [100 µM] y zeocina [100 µM, control de estrés celular], posteriormente se tomaron las micrografías con el microscopio 200M Carl Zeiss, a 10X, seguido de la cuantificación del tamaño de las proyecciones de tipo neurita en células A549. estadístico

Continuando con el análisis morfológico de la línea celular A549, se cuantificó el tamaño de proyecciones de tipo neurita. Como se observa en la figura 5, encontramos que, existieron diferencias significativas en ambas condiciones de SFB (10 % y deprivado) del grupo control positivo (IBMX+FSK), que mostró un aumento de tamaño con respecto al grupo control (A549 sin tratamiento). En el control de estrés celular tratado con Zeocina, se muestra un tamaño de las proyecciones de tipo neurita, similar al grupo control de células A549 sin tratamiento. Similar a lo que ocurre en los grupos experimentales con cafeína [100 µM] y teobromina [100 µM] con 10 % de suero fetal bovino. Sin embargo, en el grupo deprivado de suero, se observa el aumento del tamaño de las proyecciones de tipo neurita en las células tratadas con cafeína y teobromina; siendo significativo únicamente para teobromina. Esto sugiere que el suero fetal bovino a una gran concentración reduce el efecto de las metil xantinas en el ensayo.

1.12. Transdiferenciación neuroendócrina (viabilidad)

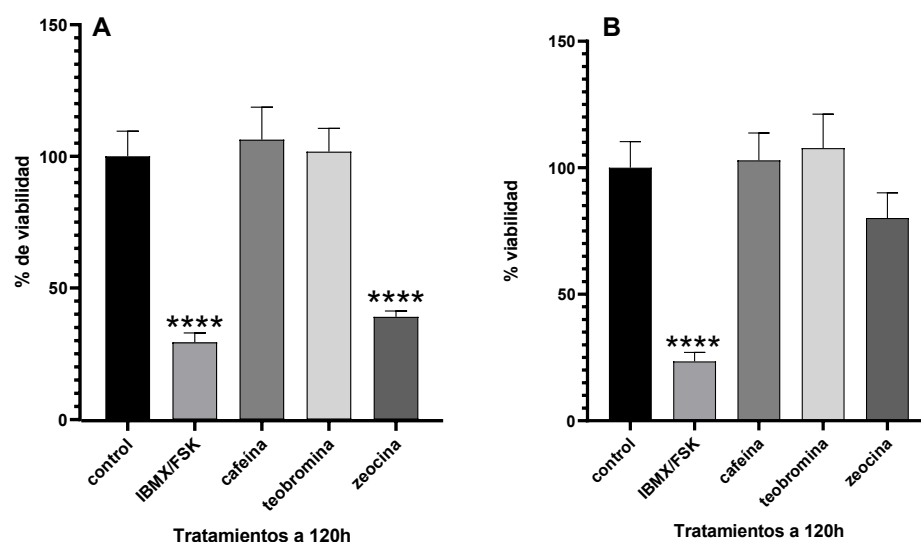


Figura 6. Efecto de compuestos con núcleo xantina (IBMX/FSK, cafeína, teobromina) sobre la viabilidad celular. Las células A549 con A) 10 % de suero fetal bovino o B) deprivadas, fueron tratadas durante 120 h con diferentes compuestos: IBMX + FSK [0.5 mM, control positivo], cafeína [100 μ M], teobromina [100 μ M] y zeocina [100 μ M, control de estrés celular], posteriormente se evaluó la viabilidad con MTT.

Otra característica de la diferenciación neuroendócrina es la disminución de la tasa de proliferación, para ello se cuantificó la viabilidad celular de las células A549. La viabilidad celular se llevó a cabo mediante la técnica MTT, la cual consiste en una reacción de reducción por enzimas mitocondriales provenientes de células metabólicamente activas. En ambas condiciones de SFB (10 % y deprivado) del grupo control positivo (IBMX+FSK), se promueve la disminución significativa de la viabilidad celular en relación al grupo control (sin tratamiento). Estos resultados coinciden con lo señalado por Mendieta y colaboradores en 2018 que afirman que la mezcla de IBMX y FSK disminuyen la viabilidad celular. No obstante, nuestros grupos experimentales con cafeína y teobromina no presentan dicha disminución, esto nos indica que bajo una concentración de 100 μ M, cafeína y teobromina no presentan citotoxicidad, ni disminución de la proliferación a las 120 horas de tratamiento. Retomando lo reportado por Eguchi y colaboradores, cafeína y teobromina no

influyen en la viabilidad celular; así mismo, en 2014 Tiwari reporta que a concentraciones menores o iguales a 100 μ M, compuestos como la cafeína no demostraron una disminución significativa de la viabilidad celular (Mendieta y col., 2018; Eguchi y col., 2022b). El control de estrés celular (zeocina) mostró una disminución significativa en nuestro modelo 10 % mientras que no presenta cambios cuando se elimina el suero por completo a las células A549, esto sugiere que, en condiciones de privación de nutrientes, la citotoxicidad puede estar modulada por otra vía diferente que no se traduzca a muerte celular (Tiwari y col., 2014).

1.13. Transdiferenciación neuroendócrina (expresión de marcadores neuroendócrinos)

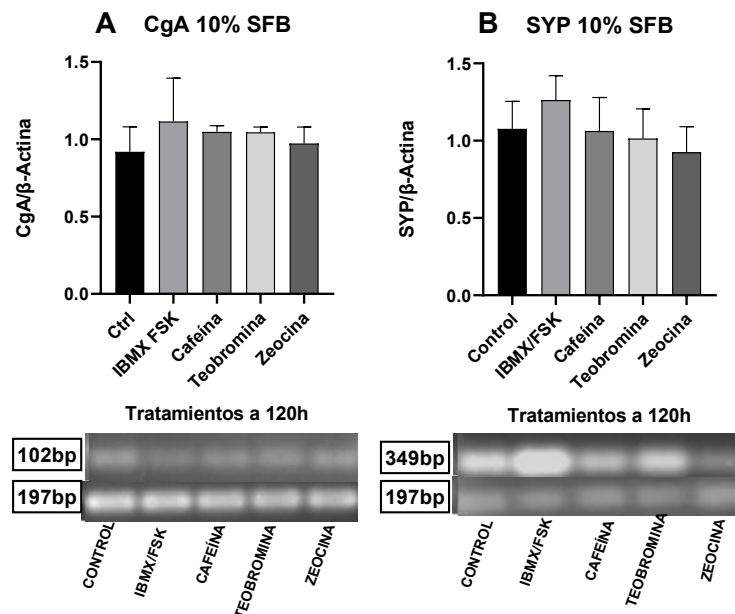


Figura 7. Efecto de compuestos con núcleo xantina (IBMX/FSK, cafeína, teobromina) sobre la expresión de los marcadores neuroendócrinos A) CgA o B) SYP por RT-PCR en punto final. Las células A549 con 10 % de suero fetal bovino, fueron tratadas durante 120 h con diferentes compuestos: IBMX + FSK [0.5 mM, control positivo], cafeína [100 μ M], teobromina [100 μ M] y zeocina [100 μ M, control de estrés celular], posteriormente se extrajo el mRNA, se sintetizó cDNA y se realizó una PCR en punto final, seguida de electroforesis para semicuantificar la expresión de CgA, SYP y B Actina.

Una de las formas para corroborar la presencia de un fenotipo neuroendócrino es mediante la presencia de marcadores neuroendocrinos como lo son CgA y SYP. Estos marcadores son fundamentales para determinar un estadio más agresivo de la enfermedad (Savu y col., 2021). Los resultados obtenidos cuando se suplementa con 10 % de suero fetal bovino reflejan la expresión de los marcadores CgA y SYP en todos los grupos (control, IBMX/FSK, cafeína, teobromina y zeocina. Sin embargo, se observa de manera descriptiva un incremento de ambos únicamente en nuestro control positivo (IBMX+FSK), sin significancia estadística. Esto no concuerda con Mendieta y colaboradores ya que al evaluar el efecto de los fármacos en combinación (IBMX+ FSK), los resultados arrojan una expresión con significancia, del marcador neuroendócrino CgA a las 120 horas de tratamiento, esta diferencia podría estar relacionada con la suplementación de 10 % de SFB, que podría impedir la susceptibilidad hacia la transdiferenciación neuroendócrina (Mendieta y col., 2021).

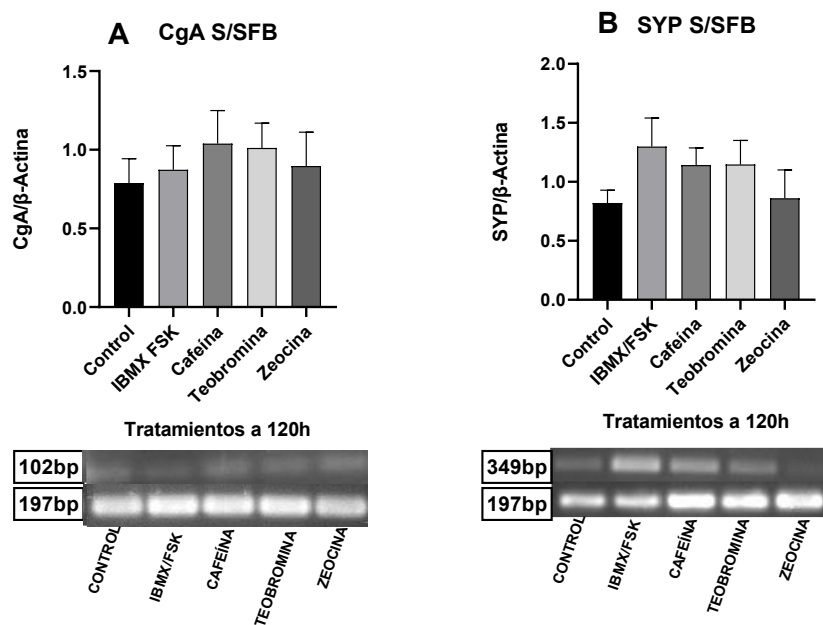


Figura 8. Efecto de compuestos con núcleo xantina (IBMX/FSK, cafeína, teobromina) sobre la expresión de los marcadores neuroendócrinos A) CgA o B) SYP por RT-PCR en punto final. Las células A549 privadas de suero fetal bovino, fueron tratadas durante 120 h con diferentes compuestos: IBMX + FSK [0.5 mM, control positivo], cafeína [100 µM], teobromina [100 µM] y zeocina [100 µM, control de estrés celular], posteriormente se extrajo el mRNA, se sintetizó cDNA y se realizó una PCR en punto final, seguida de electroforesis para semicuantificar la expresión de CgA, SYP y B Actina.

Las células A549 privadas de suero fetal bovino, mostró de igual forma, la presencia de ambos marcadores neuroendócrinos en todos los grupos. Se observa un aumento descriptivo de SYP únicamente en nuestro control positivo (IBMX+FSK) sin significancia estadística. Los resultados no empatan con lo reportado en la literatura Fosado y col., 2021, ya que con los fármacos IBMX+FSK a 0.5 mM, no expresan de manera significativa en comparación con el grupo control, los marcadores asociados al fenotipo neuroendócrino ya que se propone que diversos factores como el tiempo de tratamiento, la cantidad de mRNA obtenido, así como alguna ruta de señalización alternativa, por ejemplo en 2019, Mendieta y col. señalan que el cAMP puede activar proteínas llamadas EPAC1/EPAC2 que son independientes de PKA, por lo que si la señal se distribuye entre estas dos vías, la señal no activa eficientemente a CREB y por tanto no se transcribe SYP/CgA de manera significativa, sino que se canaliza hacia otras rutas como MAPK sin una traducción consistente en marcadores neuroendócrinos. Adicionalmente, se sugieren más experimentos para sustentar la activación de CREB, ya que otras referencias mencionan que la transdiferenciación neuroendócrina podría estar relacionada con otras rutas como JAK/STAT. Por otro lado, el mecanismo principalmente propuesto señala que, al someter a las células A549 bajo tratamientos con fármacos que aumentan el cAMP intracelular, se produce la fosforilación de CREB, estimulando factores de transcripción como ASCL1 que regula la expresión positiva de SYP y CgA, respectivamente. Otras metilxantinas como la cafeína y teobromina pueden inhibir a las fosfodiesterasas lo que provoca un aumento de cAMP, sin embargo, Kalhan en 2012 demuestra que los tumores neuroendócrinos secretan adenosina, lo que también puede provocar un aumento de cAMP estimulando la producción de CgA y nos sugieren que el aumento de CgA en otros modelos podría estar favorecido por vías indirectas (Mendieta y col., 2018b; Kalhan y col., 2012).

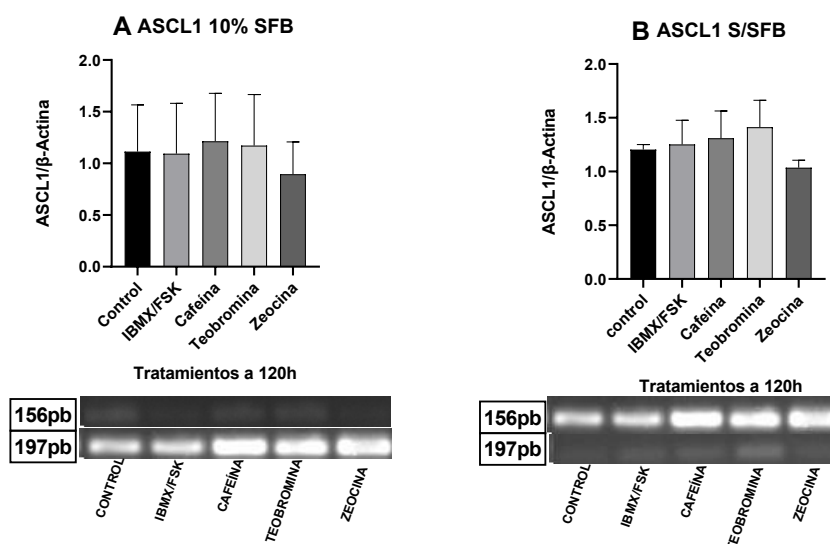


Figura 9. Efecto de compuestos con núcleo xantina (IBMX/FSK, cafeína, teobromina) sobre la expresión del factor de transcripción (ASCL1) por RT-PCR en punto final. Las células A549 con 10 % de suero fetal bovino y deprivadas (S/SFB), fueron tratadas durante 120 h con diferentes compuestos: IBMX + FSK [0.5 mM, control positivo], cafeína [100 μ M], teobromina [100 μ M] y zeocina [100 μ M, control de estrés celular], posteriormente se extrajo el mRNA, se sintetizó cDNA y se realizó una PCR en punto final, seguida de electroforesis para semicuantificar la expresión de ASCL1 y B Actina.

Se ha estudiado en otros modelos de cáncer de pulmón neuroendócrino que, la expresión de ASCL1 está relacionada con la vía PKA/CREB inducida por el aumento de cAMP (Tabrizian y col., 2023). Este factor de transcripción regula la expresión de CgA y SYP y participa en el desarrollo de un fenotipo neuroendócrino. Los resultados obtenidos en condiciones de ausencia y presencia de SFB al 10 % muestran la expresión del factor de transcripción ASCL1 en todos los grupos (control, IBMX/FSK, cafeína, teobromina y zeocina). De manera descriptiva, se identificó un cambio en el patrón de expresión de ASCL1 en el grupo tratado con teobromina sin SFB; sin embargo, el análisis estadístico no evidenció diferencias significativas. Aunque este hallazgo coincide con el aumento significativo en el tamaño de neuritas observado únicamente en esta condición, no es posible establecer una relación directa bajo el diseño experimental empleado. En presencia o ausencia de SFB, la expresión de ASCL1 se mantuvo sin cambios estadísticamente significativos entre los grupos

experimentales. Esto sugiere que probablemente los cambios morfológicos observados en el control positivo estén relacionados con otros genes maestros o factores de transcripción. O podría sugerirse que los demás grupos experimentales presentan un desarrollo parcial; ya que, aunque los marcadores neuroendócrinos están presentes sin sobreexpresión, morfológicamente no desarrollan las características típicas del modelo neuroendócrino.

CONCLUSIONES

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan evidencia que sugiere que los efectos de la cafeína y la teobromina dependen de la concentración y de las condiciones experimentales evaluadas. Bajo las condiciones analizadas, ninguno de estos compuestos indujo un fenotipo neuroendócrino a una concentración de 100 μ M, tanto en ausencia como en presencia de SFB al 10 %. En este sentido, se propone la evaluación de concentraciones adicionales y su combinación con otros fármacos elevadores de cAMP, con el fin de profundizar en la caracterización de sus posibles efectos biológicos.

En condiciones de privación de SFB, se observó la presencia de marcadores asociados al fenotipo neuroendócrino; sin embargo, el análisis estadístico no evidenció diferencias significativas entre los grupos experimentales, por lo que estos hallazgos se interpretan como observaciones descriptivas que requieren validación adicional.

Por otro lado, se confirmó la inducción del fenotipo neuroendócrino en las células tratadas con IBMX/FSK, tanto en presencia como en ausencia de SFB al 10 %, a las 120 h de tratamiento, consistente con su papel como control positivo en la activación de vías dependientes de cAMP.

REFERENCIAS

- Adame-García, S. R., Cervantes-Villagrana, R. D., Orduña-Castillo, L. B., del Río, J. C., Gutkind, J. S., Reyes-Cruz, G., Taylor, S. S., & Vázquez-Prado, J. (2019). cAMP-dependent activation of the Rac guanine exchange factor P-REX1 by type I protein kinase A (PKA) regulatory subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 294(7), 2232–2246.
- Basnet, R. M., Zizioli, D., Guarienti, M., Finazzi, D., & Memo, M. (2017). Methylxanthines induce structural and functional alterations of the cardiac system in zebrafish embryos. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 18(1).
- Bleckmann, S. C., Blendy, J. A., Rudolph, D., Monaghan, A. P., Schmid, W., & Schütz, G. (2002). Activating Transcription Factor 1 and CREB Are Important for Cell Survival during Early Mouse Development. *Molecular and Cellular Biology*, 22(6), 1919–1925.
- Blobel, G. A., Gould, V. E., Moll, R., Lee, I., Huszar, M., Geiger, B., & Franke, W. W. (1985). Coexpression of neuroendocrine markers and epithelial cytoskeletal proteins in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. *Laboratory Investigation*, 52(1), 39–51.
- Choi, E. Y., Stockert, A. L., Leimkühler, S., & Hille, R. (2004). Studies on the mechanism of action of xanthine oxidase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(5), 841–848.
- Crippa, L., Bianco, M., Colombo, B., Gasparri, A. M., Ferrero, E., Loh, Y. P., Curnis, F., & Corti, A. (2013). A new chromogranin A-dependent angiogenic switch activated by thrombin. *Blood*, 121(2), 392–402.
- Deng, W., Prockop, D. J., Obrocka, M., & Fischer, I. (2001). In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(1), 148–152.
- Deng, X., Liu, H., Huang, J., Cheng, L., Keller, E. T., Parsons, S. J., & Hu, C. D. (2008). Ionizing radiation induces prostate cancer neuroendocrine differentiation through interplay of CREB and ATF2: Implications for disease progression. *Cancer Research*, 68(23), 9663–9670.
- Fajardo, J., Milthorpe, B. K., & Santos, J. (2020). Molecular mechanisms involved in neural substructure development during phosphodiesterase inhibitor treatment of mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 1–26.
- Fosado, R., Soto-Hernández, J. E., Núñez-Anita, R. E., Aceves, C., Berumen, L. C., & Mendieta, I. (2023). Neuroendocrine Differentiation of Lung Cancer Cells Impairs the Activation of Antitumor Cytotoxic Responses in Mice. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 990, 24(2), 990.
- Franco, R., Oñatibia-Astibia, A., & Martínez-Pinilla, E. (2013). Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. En *Nutrients* (Vol. 5, Número 10, pp. 4159–4173).
- Gaudenzi, G., Carra, S., Dicitore, A., Cantone, M. C., Persani, L., & Vitale, G. (2020). Fishing for neuroendocrine tumors. *Endocrine-Related Cancer*, 27(6), R163–R176.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Herramienta de diseño de primers* (2025).

- Hwang, J., Kim, Y. Y., Huh, S., Shim, J., Park, C., Kimm, K., Choi, D. K., Park, T. K., & Kim, S. (2005). The time-dependent serial gene response to Zeocin treatment involves caspase-dependent apoptosis in HeLa cells. *Microbiology and Immunology*, 49(4), 331–342.
- Janitschke, D., Lauer, A. A., Bachmann, C. M., Seyfried, M., GrimM, H. S., Hartmann, T., & GrimM, M. O. W. (2020). Unique role of caffeine compared to other methylxanthines (Theobromine, theophylline, pentoxifylline, propentofylline) in regulation of ad relevant genes in neuroblastoma sh-sy5y wild type cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–19.
- Kaarijärvi, R., Kaljunen, H., & Ketola, K. (2021). Molecular and Functional Links between Neurodevelopmental Processes and Treatment-Induced Neuroendocrine Plasticity in ProstateCancerProgression. *Cancers*, 13(4), 692.
- Kanne, H., Burte, N., Prasanna, V., & Gujjula, R. (2015). Extraction and elemental analysis of Coleus forskohlii extract. *Pharmacognosy Research*, 7(3), 237–241.
- Klöppel, G. (2017). Neuroendocrine Neoplasms: Dichotomy, Origin and Classifications. *Visceral Medicine*, 33(5), 324.
- Lee, H. W., Choi, I. W., & Ha, S. K. (2022). ImMunostimulatory Activities of Theobromine on Macrophages via the Activation of MAPK and NF-κB Signaling Pathways. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(9), 4216–4228.
- Mendieta, I., Rodríguez-Nieto, M., Nuñez-Anita, R. E., Menchaca-Arredondo, J. L., García-Alcocer, G., & Berumen, L. C. (2021). Ultrastructural changes associated to the neuroendocrine transdifferentiation of the lung adenocarcinoma cell line A549. *Acta Histochemica*, 123(8).
- Mendieta, I., Nuñez-Anita, R. E., Pérez-Sánchez, G., Pavón, L., Rodríguez-Cruz, A., García-Alcocer, G., & Berumen, L. C. (2018). Effect of A549 neuroendocrine differentiation on cytotoxic imMune response. *Endocrine connections*, 7(5), 791–802.
- Monteiro, J. P., Alves, M. G., Oliveira, P. F., & Silva, B. M. (2016). Structure-bioactivity relationships of methylxanthines: Trying to make sense of all the promises and the drawbacks. En *Molecules* (Vol. 21, Número 8). MDPI AG.
- Moratalla, R. (2008). Neurobiología de las metilxantinas. *Trastornos Adictivos*, 10(3), 201–207.
- Noguchi, M., Furukawa, K. T., & Morimoto, M. (2020). Pulmonary neuroendocrine cells: physiology, tissue homeostasis and disease. *Disease Models & Mechanisms*, 13(12), dmM046920.
- Nguyen, T. M., Ngoc, D. T. M., Choi, J. H., & Lee, C. H. (2023). Unveiling the Neural Environment in Cancer: Exploring the Role of Neural Circuit Players and Potential Therapeutic Strategies. *Cells*, 12(15), 1996.
- Pateraki, I., Andersen-Ranberg, J., Jensen, N. B., Wubshet, S. G., Heskes, A. M., Forman, V., Hallström, B., Hamberger, B., Motawia, M. S., Olsen, C. E., Staerk, D., Hansen, J., Møller, B. L., & Hamberger, B. (2017). Total biosynthesis of the cyclic AMP booster forskolin from Coleus forskohlii. *eLife*, 6, e23001.B
- Rekhtman, N. (2022). Lung neuroendocrine neoplasms: recent progress and persistent challenges. *Modern Pathology*, 35(Suppl 1), 36.
- Rosa, S. La, & Uccella, S. (2020). Classification of neuroendocrine neoplasms: lights and shadows.
- Roviello, G. (2015). The distinctive nature of adenocarcinoma of the lung. *OncoTargets*

- and therapy, 8, 2399.
- Ruddon, R. W. (2003). *What Makes a Cancer Cell a Cancer Cell?*
- Savu, C., Melinte, A., Diaconu, C., Stiru, O., Gherghiceanu, F., Tudorica, Ștefan D. O., Dumitrașcu, O. C., Bratu, A., Balescu, I., & Bacalbasa, N. (2021). Lung neuroendocrine tumors: A systematic literature review (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 23(2), 176.
- Salzillo, A., Ragone, A., Spina, A., Naviglio, S., & Sapio, L. (2023). Forskolin affects proliferation, migration and Paclitaxel-mediated cytotoxicity in non-small-cell lung cancer cell lines via adenylyl cyclase/cAMP axis. *European Journal of Cell Biology*, 102(2), 151292.
- Savai, R., Pullamsetti, S. S., Banat, G. A., Weissmann, N., Ghofrani, H. A., GrimMinger, F., & Schermuly, R. T. (2010). Targeting cancer with phosphodiesterase inhibitors. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 19(1), 117–131.
- Silveira, F., Basile, M. L., Kuga, F. S., Próspero, J. D., Pinto Paes, R. A., & Fabíola Del Carlo, B. (2017). Tumores neuroendócrinos: Estudo epidemiológico de 250 casos em um hospital terciário. *Revista da Associacao Medica Brasileira*, 63(10), 856–861.
- Steven, A., & Seliger, B. (2016). Control of CREB expression in tumors: from molecular mechanisms and signal transduction pathways to therapeutic target. *Oncotarget*, 7(23), 35454.
- Sugimoto, N., Miwa, S., Hitomi, Y., Nakamura, H., Tsuchiya, H., & Yachie, A. (2014). Theobromine, the primary methylxanthine found in theobroma cacao, prevents malignant glioblastoma proliferation by negatively regulating phosphodiesterase-4, extracellular signal-regulated kinase, Akt/mammalian target of rapamycin kinase, and nuclear factor-kappa B. *Nutrition and Cancer*, 66(3), 419–423.
- Sultana, Q., Kar, J., Verma, A., Sanghvi, S., Kaka, N., Patel, N., Sethi, Y., Chopra, H., Kamal, M. A., & Greig, N. H. (2023b). A Comprehensive Review on Neuroendocrine Neoplasms: Presentation, Pathophysiology and Management. *Journal of Clinical Medicine*, 12(15), 5138.
- Sundin, A., Arnold, R., Baudin, E., Cwikla, J. B., Eriksson, B., Fanti, S., Fazio, N., Giammarile, F., Hicks, R. J., Kjaer, A., Krenning, E., Kwekkeboom, D., Lombard-Bohas, C., O'Connor, J. M., O'Toole, D., Rockall, A., Wiedenmann, B., Valle, J. W., & Vullierme, M. P. (2017). ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Radiological, Nuclear Medicine and Hybrid Imaging. *Neuroendocrinology*, 105(3), 212–244.
- Sutherland, K. D., & Berns, A. (2010). Cell of origin of lung cancer. *Molecular Oncology*, 4(5), 397.
- Tabrizian, N., Nouruzi, S., Cui, C. J., Kobelev, M., Namekawa, T., Lodhia, I., Talal, A., Sivak, O., Ganguli, D., & Zoubeydi, A. (2023). ASCL1 is activated downstream of the ROR2/CREB signaling pathway to support lineage plasticity in prostate cancer. *Cell Reports*, 42(8).
- Tiwari, K. K., Chu, C., Couroucli, X., Moorthy, B., & Lingappan, K. (2014). Differential concentration-specific effects of caffeine on cell viability, oxidative stress, and cell cycle in pulmonary oxygen toxicity in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(4), 1345.
- Trastoy, M. O., Defais, M., & Larminat, F. (2005). Resistance to the antibiotic Zeocin by stable expression of the Sh ble gene does not fully suppress Zeocin-induced DNA

- cleavage in human cells. *Mutagenesis*, 20(2), 111–114.
- Thankamony, A. P., Subbalakshmi, A. R., Jolly, M. K., & Nair, R. (2021). Lineage Plasticity in Cancer: The Tale of a Skin-Walker. *Cancers* 2021, Vol. 13, Page 3602, 13(14), 3602.
- Tio, M., Tan, K. H., Lee, W., Wang, T. T., & Udolph, G. (2010). Roles of db-cAMP, IBMX and RA in aspects of neural differentiation of cord blood derived mesenchymal-like stem cells. *PLoS ONE*, 5(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0009398>,
- Troadec, J. D., Marien, M., Mourlevat, S., Debeir, T., Ruberg, M., Colpaert, F., & Michel, P. P. (2002). Activation of the mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) signaling pathway by cyclic AMP potentiates the neuroprotective effect of the neurotransmitter noradrenaline on dopaminergic neurons. *Molecular Pharmacology*, 62(5), 1043–1052.
- Uribe, C. (2021). Evaluación del efecto de la inhibición de la vía Notch en la morfología y proliferación de células A549 neuroendócrinas (Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Querétaro).
- Valent, P., Bonnet, D., De Maria, R., Lapidot, T., Copland, M., Melo, J. V., Chomienne, C., Ishikawa, F., Schuringa, J. J., Stassi, G., Huntly, B., Herrmann, H., Soulier, J., Roesch, A., Schuurhuis, G. J., Wöhrer, S., Arock, M., Zuber, J., Cerny-Reiterer, S., ... Eaves, C. (2012). Cancer stem cell definitions and terminology: The devil is in the details. *Nature Reviews Cancer*, 12(11), 767–775.
- Yadav, S. S., Li, J., Stockert, J. A., Herzog, B., O'Connor, J., Garzon-Manco, L., Parsons, R., Tewari, A. K., & Yadav, K. K. (2017). Induction of Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer Cells by Dovitinib (TKI-258) and its Therapeutic Implications. *Translational Oncology*, 10(3), 357–366.
- Yellin, A., & Benfield, J. R. (1985). The pulmonary Kulchitsky cell (neuroendocrine) cancers: From carcinoid to small cell carcinomas. *Current Problems in Cancer*, 9(7), 1–38.
- Yoneda, M., Sugimoto, N., Katakura, M., Matsuzaki, K., Tanigami, H., Yachie, A., Ohno-Shosaku, T., & Shido, O. (2017). Theobromine up-regulates cerebral brain-derived neurotrophic factor and facilitates motor learning in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 39, 110–116.
- Zhang, Y., Zheng, D., Zhou, T., Song, H., Hulsurkar, M., Su, N., Liu, Y., Wang, Z., Shao, L., Ittmann, M., Gleave, M., Han, H., Xu, F., Liao, W., Wang, H., & Li, W. (2018). Androgen deprivation promotes neuroendocrine differentiation and angiogenesis through CREB-EZH2-TSP1 pathway in prostate cancers. *Nature Communications*, 9(1).