

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

Modulación de la expresión de los genes blanco NEUROD1 y NEUROG1 del factor de transcripción AutoInmune Regulator (AIRE) en el modelo de células A549 neuroendócrinas de cáncer de pulmón

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestría en Ciencias Químico Biológicas

Presenta
Karla Andrea Salinas Torres

Dirigida por
Dra. Laura Cristina Berumen Segura

Querétaro, Qro Agosto 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 licenciatario 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 licenciatario.

 **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

Modulación de la expresión de los genes blanco NEUROD1 y NEUROG1 del factor de transcripción Autolmune Regulator (AIRE) en el modelo de células A549 neuroendócrinas de cáncer de pulmón

Tesis

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

PRESENTA
KARLA ANDREA SALINAS TORRES

DIRIGIDA POR
DRA. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Presidente

Dra. María Guadalupe García Alcocer
Secretaria

Dra. Alicia Irasema Mendieta Trejo
Vocal

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera
Suplente

MCQB. Dulce María Caraveo Gutiérrez
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Agosto 2025
México

Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación de México (SECIHTI) por la beca de maestría otorgada bajo el número de CVU 1312056.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por recibirme en sus instalaciones y al apoyo brindado del Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER) 2025 con número de proyecto FOPER- 2025-FQU03933.

A mi directora la doctora Laura Cristina Berumen Segura por guiarme y por dirigir es el proyecto y en la nueva etapa que empecé que no fue solo mi maestría sino también en mi vida, porque no solo es un ejemplo, en el área académica sino también en lo personal, me enseño lo bonito que representa y es la investigación. Su apoyó es imprescindible no solo en su vocación también en lo particular me apoyo de todas maneras que usted puede, por eso la considero como una “madre en área de la investigación”. Sobre todo, le agradezco su paciencia y su tiempo para escucharme y seguirme dándome ánimos, en todas las adversidades. Por eso y más gracias Doctora.

A la doctora Alicia Irasema Mendieta Trejo por sus consejos, por su apoyo en mi proyecto, por su tiempo y por ser una amiga que pasando la puerta podíamos hablar y desestresarnos con unas carcajadas.

A la doctora María Guadalupe García Alcocer por siempre impulsarme a hacer más y ser más, porque los investigadores “hacemos fotosíntesis” y un investigador es objetivo, crítico, constante, organizado, veraz, estudioso, valiente, creativo y muy resiliente.

A la doctora Dulce María Caraveo Gutiérrez, a la maestra Maricarmen Pérez Carrasco y IBT Brandon Alexander Nava Maya por ser parte también de esto, por recibirme en un ambiente tan bonito en el laboratorio lleno de paciencia y cariño me enseñaron y acompañaron durante mi formación en esta maestría; así mismo a la doctora Jesica Escobar Cabrera por apoyarme en lo académico, técnico y sus consejos al supervisar este trabajo. A todos los que integrábamos el laboratorio Judith, Karla, Ana y Jorge.

A la maestra Karla Portilla Domínguez alias “mi ashlicita” y a la maestra Dora Isabel González Santos por ser mi apoyo y amigas en este periodo, aunque fue poco el tiempo que estuvimos juntas representaron mucho para mí; llegando en el momento justo y demostrando su apoyo, lealtad, sinceridad y cariño.

A mi hermana Sara Salinas por siempre ser mi pilar, mi confidente, mi defensora, mi apoyo y ser una excelente hermana que siempre me apoya e impulsa a seguir con mis metas y sueños, llenándome de amor y cariño, junto con su esposo Víctor Martínez estuvieron conmigo impulsándome y acompañándome a todos lados, por eso muchas gracias, lo amo. A mis hermanos Juan Salinas, Andrés Salinas y junto con Jocelin Martínez me escuchan a la distancia, siempre buscaban apoyarme y darme ánimos de seguir.

A mi prometido Agustín Naranjo López por ser un amor incondicional, apoyarme en todo, ser un equipo conmigo, acompañarme al laboratorio, sostenerme en la adversidad y siempre amándome. Te amo.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	II
INDICE DE CUADROS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ACRÓNIMOS	V
RESUMEN	6
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Cáncer	5
2.2 Cáncer de pulmón	6
2.3 Cáncer de pulmón neuroendócrino	7
2.4 Marcadores neuroendócrinos	8
2.5 Inmunovigilancia en el cáncer	9
2.6 Gen regulador autoinmune (AIRE)	10
2.7 AIRE presente en neoplasias	14
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo General	17
5.2 Objetivos específicos	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1 Materiales y células	18
6.2.1 Mantenimiento y cultivo celular	18
6.2.2 Viabilidad celular	18

6.2.3 Transdiferenciación neuroendocrina de las células A549	19
6.2.4 Preparación de ARN total y PCR con transcripción inversa (RT-PCR)	19
6.2.5 Condiciones de cultivo y manejo de residuos	20
6.2.6 Análisis estadístico	21
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
7.1 Transdiferenciación neuroendocrina de células A549 y expresión de marcadores neuroendocrinos.	22
7.2 Expresión del gen AIRE y sus genes blancos (NEUROD1 y NEUROG1)	24

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Secuencias específicas de cada gen	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Sitios comunes de metástasis en SCLC	7
2. Representación del gen AIRE humano	11
3. Mecanismos moleculares de acción del gen AIRE	12
4. Transdiferenciación de células de cáncer de pulmón A549	22
5. Expresión de SYN A549 y A549 neuroendocrino (NED)	23
6. Expresión de CHGA A549 y A549 neuroendocrino (NED)	24
7. Expresión de AIRE A549 y A549 neuroendocrino (NED)	24
8. Expresión de los genes diana de AIRE (NEUROG1 y NEUROD1)	25
9. Interacción entre las vías de señalización	27

ACRÓNIMOS

Ac:	Acetilación
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADP:	Adenosina difosfato
ADN-PK:	Proteína quinasa activada por ADN
ADN-TOP:	ADN-topoisomerasa
AIRE:	Gen regulador autoinmune
Aire:	Proteína reguladora autoinmune
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
CBP:	Proteína de unión a CREB
CD:	Grupos de diferenciación
CG:	Genes de cáncer/línea germinal
CHGA	Cromogranina
CREB:	Proteína de unión a CRE
DC:	Células dendríticas
HIPK2:	Proteína quinasa 2 que interactúa con el homeodominio
IL:	Interleucina
MDSC:	Células mieloides supresoras
MHC I:	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
MHC II:	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
mTEC:	Células epiteliales del timo medular
NB:	Cuerpos nucleares
NEUROD1:	Diferenciación neural 1
NEUROG1:	Neurogenina 1
NSCLC:	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
PARP1:	Poli-(ADP-ribosa) polimerasa 1
P-TEFb:	Factor b de alargamiento de la transcripción positiva
SCLC:	Cáncer de pulmón de células pequeñas
scRNA-seq:	Secuenciación de ARN unicelular
SYP	Sinaptofisina
TRA:	Antígenos restringidos a tejido
TIL:	Linfocitos infiltrantes de tumores
TME:	Microambiente tumoral
Treg:	Linfocitos T reguladores
Ts-gs:	Autoantígenos específicos de tejido

RESUMEN

Una de las principales causas de muerte por cáncer tanto en hombres como en mujeres a nivel mundial es el cáncer de pulmón. Se ha determinado que el fenotipo neuroendocrino está presente en el 20 % de los pacientes de cáncer de pulmón, siendo este un factor determinante del aumento de la agresividad, causando pronósticos desfavorables, pobre respuesta a tratamientos convencionales, y debido a la identificación inadecuada, tratamientos erróneos.

En años recientes, el interés en los avances en el campo de la inmunoterapia contra el cáncer ha ido en aumento. Uno de los inmunomoduladores ampliamente estudiado por su participación en enfermedades autoinmunes, pero poco estudiado en cáncer es el gen AIRE, que codifica su proteína Aire encargada de la regulación del sistema inmune al expresar antígenos específicos de tejido. El gen AIRE se ha caracterizado como un regulador multifacético, dependiendo el contexto, por lo que el objetivo de este trabajo fue caracterizar la expresión del ARNm de AIRE en las células adenocarcinoma de cáncer de pulmón (A549) y A549 más agresivas con diferenciación al fenotipo neuroendocrino (A549 NED). Con nuestros hallazgos tras realizar RT-PCR evidenciamos que en nuestro modelo de estudio de células de adenocarcinoma pulmonar no se observa la expresión de AIRE en las condiciones evaluadas. Aunque AIRE no se expresa naturalmente en células A549, los hallazgos (expresión de sus genes blanco NEUROD1 y NEUROG1) sugieren que su red transcripcional sí puede activarse en estados celulares específicos, como la conversión epitelial a neuroendocrina. Se requieren experimentos más detallados para confirmar dicha aseveración.

Palabras clave: Regulador autoinmune, AIRE, A549, neuroendocrino

ABSTRACT

Lung cancer is one of the leading causes of cancer death in both men and women worldwide. The neuroendocrine phenotype has been determined to be present in 20% of lung cancer patients, and this is a determining factor in increased aggressiveness, leading to poor prognoses and poor response to conventional treatments due to inadequate identification and mistreatment.

In recent years, interest in advances in the field of cancer immunotherapy has increased. One of the immunomodulators widely studied for its role in autoimmune diseases, but little studied in cancer, is the AIRE gene, which encodes the Aire protein, which is responsible for regulating the immune system by expressing tissue-specific antigens. The AIRE gene has been characterized as a multifaceted regulator, depending on the context. Therefore, the objective of this study was to characterize Aire mRNA and protein expression in lung cancer adenocarcinoma cells (A549) and more aggressive A549 cells with differentiation toward the neuroendocrine phenotype (A549 NED). Our findings after performing RT-PCR analysis show that in our lung adenocarcinoma cell model, AIRE expression is not observed under the conditions evaluated. Although AIRE is not naturally expressed in A549 cells, the findings (expression of its target genes NEUROD1 and NEUROG1) suggest that its transcriptional network can be activated in specific cellular states, such as epithelial-to-neuroendocrine conversion. More detailed experiments are needed to confirm this assertion.

Keywords: Autoimmune regulator, AIRE, A549, neuroendocrine

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 black ink, appearing to read "Karla Andrea Salinas".

Salinas Torres Karla Andrea

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cáncer de pulmón es la neoplasia maligna con mayor tasa de letalidad en ambos sexos.

Algunas células de cáncer de pulmón pueden transdiferenciarse hacia un fenotipo neuroendocrino, adquiriendo la capacidad de adaptarse a cambios en su microambiente tumoral, favoreciendo la tumorigénesis y disminuyendo la esperanza de vida de los pacientes. En el cáncer de pulmón la presencia de un ambiente inflamatorio crónico puede alterar o desviar la diferenciación de las células inmunitarias, lo que resulta además en un desequilibrio de la actividad antitumoral, favoreciendo así la evasión del tumor y, posteriormente, la resistencia al sistema inmune.

Diversos factores de transcripción participan en la regulación del sistema inmune. El gen regulador autoinmune (AIRE) es un factor de transcripción que se expresa principalmente en las células epiteliales del timo medular (mTEC) y que es responsable de regular la expresión génica en el timo y cuyo producto proteico, Aire, es esencial para la tolerancia inmunológica.

Las mTEC utilizan factores de transcripción para definir el linaje de los tipos de células extratímicas en varias subpoblaciones, en función de su parecido con tejidos extratímicos particulares, llamándolas “células miméticas”, demostrando que la mayoría de ellas se encuentran en la etapa “post-Aire”. En particular, el ARNm de AIRE se ha detectado en diversos tejidos linfoides y no linfoides periféricos; sin embargo, no se ha demostrado firmemente la expresión de la proteína Aire fuera del timo. Los genes inducidos por AIRE constan de dos contextos en los que AIRE promueve los genes a través de distintos mecanismos reguladores; genes inducidos por la actividad transcripcional genuina de AIRE y genes expresados preferentemente en células miméticas.

El gen AIRE en un grupo de células miméticas, además de sus genes característicos del grupo correspondiente se detectarán como genes inducidos por AIRE, como lo son las células neuroendócrinas con sus genes NEUROD1, NEUROG1, CHGA. El objetivo de este trabajo fue determinar la expresión del gen AIRE en la línea celular de cáncer de pulmón A549 y A549 con fenotipo neuroendocrino verificando además la expresión de sus genes diana.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad multifactorial que presenta una proliferación descontrolada de células causada por una serie de mutaciones genéticas y epigenéticas, permitiendo a las células autorrenovarse y formar tumores (excepto leucemias). Los comportamientos de las células cancerígenas no sólo dependen del genotipo del huésped, sino que también se ven afectados por factores ambientales, factores del huésped, por ejemplo, su estilo de vida que incluye su alimentación, sedentarismo y los vicios, que aumentan la probabilidad de tumorigénesis y promoción del cáncer [Yin *et al.*, 2021].

Las características esenciales o “*hallmarks*” del cáncer se han conceptualizado como un conjunto de funciones que las células adquieren al cambiar de un estado normal a etapas de crecimiento neoplásico, específicamente aquellas cruciales para la formación de tumores malignos. En la actualidad, estas habilidades incluyen conservar el control de señales sobre la proliferación, evadir los inhibidores de crecimiento, evasión inmune, facilitar la replicación celular, promover la inflamación tumoral, estimular la invasión y angiogénesis, acceder a la vasculatura, promover la inestabilidad y mutación genómica, oponerse a la apoptosis, alteraciones del metabolismo celular y la plasticidad fenotípica. Estudios recientes han señalado que las células cancerígenas también pueden reprogramarse epigenéticamente, cada individuo puede presentar un microbioma polimórfico y tener células en senescencia, no obstante, éstas aún no pueden ser reconocidas como características esenciales, porque no existen suficientes estudios que lo respalden [Hanahan, 2022].

A pesar de ésto, las características esenciales, de manera aislada, no abordan completamente las complejidades de la patogénesis del cáncer, es decir, los mecanismos moleculares y celulares específicos que posibilitan que las células neoplásicas evolucionen y adquieran estas capacidades fenotípicas anómalas durante el desarrollo tumoral y la progresión maligna. Como resultado, se han introducido las “características habilitantes”, las cuales son resultado de la anormalidad de la neoplasia y ofrecen vías a través de las cuales las células cancerosas y los tumores pueden adoptar estas características funcionales. Las características habilitantes se reflejan en los mecanismos moleculares y celulares mediante los cuales se adquieren las características habilitantes en lugar de las características esenciales. Entre las características habilitantes se encuentran la inestabilidad del genoma y la inflamación que promueven los tumores [Hanahan, 2022].

Adicionalmente, el microambiente tumoral (TME), definido como una composición de poblaciones heterogéneas que interactúan con las células cancerosas y células madre cancerosas, junto con una variedad de tipos de células estromales reclutadas (el parénquima transformado y el estroma asociado), desempeña un papel fundamental en el desarrollo de tumores y la progresión maligna [Hanahan, 2022].

El cáncer representa una de las principales causas de mortalidad a nivel global. En el año 2022, de acuerdo con estadísticas de Globocan se estimaron 2.48 millones de casos nuevos de cáncer de pulmón y para el 2045 se prevé que habrá un aumento del número de casos, con aproximadamente 4.25 millones. Por tanto, el cáncer de pulmón se encuentra entre los cánceres más comunes y, con el mayor número de fallecimientos en 2020 fue el primer lugar (1.8 millones de defunciones) [Globocan, 2024].

2.2 Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón representa un reto importante para la salud pública, al ser reconocido como una de las principales causas de muerte por cáncer en México y en el mundo [ISSSTE, 2023; Cabrera-Miranda *et al.*, 2023]. Debe ser considerado una prioridad en la toma de decisiones en cuanto a diagnóstico, manejo y control [Cabrera-Miranda *et al.*, 2023]. En 2022 se reportaron cerca de ocho mil casos nuevos de cáncer de pulmón en México; y aproximadamente siete mil fallecieron. Posterior al diagnóstico de este padecimiento se registra mortalidad de 90 por ciento indicando una alta letalidad [ISSSTE, 2023].

El cáncer pulmonar se clasifica principalmente en dos tipos histológicos: el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). NSCLC es el más común; comprende subtipos como el adenocarcinoma, el carcinoma escamoso y el carcinoma de células grandes [Ruiz-Cordero *et al.*, 2020]. El SCLC es un carcinoma que presenta mayor agresividad y un rápido crecimiento, que se muestra en fumadores activos o exfumadores y tiene un pronóstico excepcionalmente malo [Rudin *et al.*, 2021]. Además de la clasificación principal se ha detectado que ambas histologías presentan un subtipo de cáncer neuroendocrino [Shyu *et al.*, 2018].

En la metástasis del cáncer del pulmón los principales órganos afectados son los ganglios linfáticos, el cerebro y los huesos [Figura 1] [Rudin *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2021]. En la metástasis existe la compleja interacción en el microambiente tumoral (TME) con las células inmune infiltradas, que a su vez interactúan con las células

madre cancerosas donde mecanismos como la linfangiogénesis y la angiogénesis subyacen el crecimiento tumoral y la resistencia terapéutica [Bayik y Lathia, 2021].

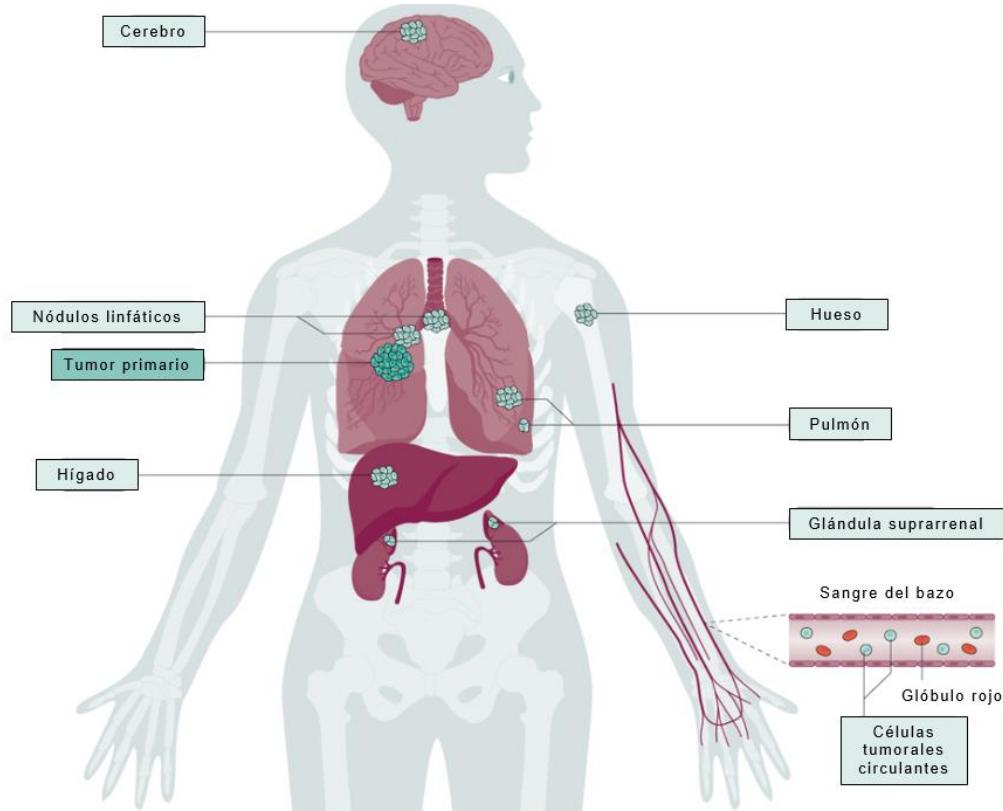


Figura 1. Sitios comunes de metástasis en SCLC [Rudin *et al.*, 2021].

2.3 Cáncer de pulmón neuroendocrino

Las neoplasias neuroendocrinas de pulmón se definen como una familia de neoplasias pulmonares heterogéneas que muestran morfología neuroendocrina e inmunofenotipo. A pesar de la diferenciación neuroendocrina común y la expresión de marcadores neuroendocrinos, los miembros de esta familia difieren significativamente en términos de morfología, inmunofenotipo, perfiles moleculares, comportamiento biológico y comportamiento clínico. Cuatro entidades tumorales pertenecen a esta variada familia: carcinoide típico, carcinoide atípico, SCLC y carcinoma neuroendocrino de células grandes. Los SCLC representan el 15 % de todas las neoplasias malignas pulmonares primarias, seguidos por los cánceres neuroendocrinos de células grandes (3 %) y los carcinoides pulmonares (2 %), con

una relación carcinoide típico con carcinoide atípico de 10:1 [WHO, 2021; Vocino *et al.*, 2024].

La capacidad de las células tumorales para transdiferenciarse en células neuroendocrinas posibilita la variedad celular dentro del tumor, facilitando su supervivencia en entornos con escasez de oxígeno o nutrientes. Además, esta habilidad les permite adaptarse a las alteraciones en el microambiente durante el proceso metastásico y enfrentar el estrés ocasionado por la exposición a tratamientos farmacológicos como la quimioterapia [Thankamony *et al.*, 2021].

La hiperplasia de células neuroendocrinas determina un mayor número de células neuroendocrinas en el epitelio respiratorio y se asocia con muchos factores causales. En la población adulta, las alteraciones del comportamiento de las células neuroendocrinas se asocian generalmente con enfermedades obstructivas crónicas, enfermedades bronquio-alveolares relacionadas con el tabaquismo y neumonía, o más en general con cualquier condición que conduzca a lesión y reparación pulmonar, así como a inflamación intersticial y fibrosis [Shyu *et al.*, 2018].

Los patrones histopatológicos de la hiperplasia de células neuroendocrinas se recapitulan en hiperplasia lineal y nodular. Dichos patrones se definen como un crecimiento excesivo irregular de células neuroendocrinas triangulares o en forma de matraz, ubicadas en estrecho contacto con la membrana basal de las vías respiratorias pequeñas o grandes, mientras que la segunda está formada por pequeños grupos de 10 a 20 células neuroendocrinas en contacto con la membrana basal [Vocino *et al.*, 2024].

2.4 Marcadores neuroendocrinos

Los marcadores inmunohistoquímicos neuroendocrinos tradicionales que se utilizan ampliamente en la práctica de patología por su sensibilidad y especificidad incluyen a la sinaptofisina (SYP), la cromogranina A (CHGA) y la proteína 1 asociada a insulinoma. La enolasa neuronal específica es otro marcador, aunque menos recomendable debido a su baja especificidad [Rekhtman, 2022; Vocino *et al.*, 2024].

En estudios recientes se ha identificado que, a pesar de la homogeneidad genómica, el SCLC comprende distintos subtipos basados en las diferencias globales en la expresión genética y los perfiles de metilación. Estos subtipos se definen principalmente por expresar reguladores transcripcionales maestros como: ASCL1, NEUROD1 y POU2F3, siendo el ASCL1 el más común [Rekhtman, 2022].

NEUROD1 es un factor de transcripción neurogénico básico de hélice-bucle-hélice y desempeña un papel fundamental en la diferenciación neuronal. Todavía no está

claro cómo NEUROD1 activa su transcripción genética y qué genes, y en qué grado, dependen de él en el SCLC [Chen *et al.*, 2023].

2.5 Inmunovigilancia en el cáncer

Existe una asociación ya conocida entre las células cancerosas y células inmunitarias; es uno de los temas críticos en el cáncer, dado que el sistema inmune ayuda y combate la enfermedad, así como su desarrollo. Por otro lado, también se sabe que las células inmunitarias pueden actuar en paralelo para regular y promover la formación de tumores [Rezaie *et al.*, 2024].

Las principales células que actúan en la supresión de tumores del sistema inmunológico incluyen células T efectoras CD4 +, células T citotóxicas CD8 +, macrófagos M1, neutrófilos N1, células dendríticas (DC) y células asesinas naturales (NK) [Lei *et al.*, 2020; Rezaie *et al.*, 2024]. No obstante, algunas células del sistema inmunológico pueden provocar respuestas inmunosupresoras, incluidas las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) o los macrófagos asociados a tumores (TAM); por su parte el microambiente tumoral también está conformado por el factor de necrosis tumoral α (TNF α), la IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-23, y células T reguladoras (Treg) [Lei *et al.*, 2020; Romero, 2020; Rezaie *et al.*, 2024]. Mientras tanto, algunas células como las células Th17, las Treg CD4 + CD25 + Foxp3 + y las citocinas que regulan el sistema inmunológico (p. ej., TGF- β) tienen un doble papel a la hora de provocar o prevenir el cáncer, dependiendo del microambiente tumoral y de los factores asociados con la tumorigénesis [Romero, 2020; Rezaie *et al.*, 2024]. Además, las células tumorales pueden cambiar sus rasgos fisiológicos, como el metabolismo y las propiedades de tumor primario, a través de interacciones con células inmunes y estromales, para evitar la detección por parte del sistema inmunológico [Bayik y Lathia, 2021].

Los tumores pueden crear un microambiente que tiene una acción supresora del sistema inmunológico al secretar citocinas que provocan la apoptosis de los linfocitos T activados [Rezaie *et al.*, 2024]. El microambiente tumoral (TME) forma una barrera metabólica debido a las desregulaciones metabólicas en las células neoplásicas para desarmar la inmunidad antitumoral del huésped y las estrategias inmunoterapéuticas actuales [Chuang *et al.*, 2024].

También es importante señalar que existen mecanismos epigenéticos los cuales son importantes no sólo en el inicio y avance del cáncer, sino también en la inmunidad tumoral. Estudios recientes en epigenética del cáncer han revelado varios moduladores epigenómicos involucrados en la remodelación de la cromatina, la modificación de histonas, la metilación del ADN y la modificación del ARN, que

tienen un impacto significativo en la inmunogenicidad del tumor, las funciones de las células inmunes y la respuesta a la inmunoterapia [Yang *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2024].

Los hallazgos anteriores contribuyen a evaluar si AIRE participa en la inmunomodulación del cáncer de pulmón, dado que opera como un factor de transcripción para promover una amplia gama de objetivos transcripcionales, no reconociendo secuencias particulares de ADN sino involucrando mecanismos epigenéticos [Matsumoto *et al.*, 2023].

2.6 Gen regulador autoinmune (AIRE)

El gen regulador autoinmune (AIRE) está ubicado en la región 22q.3 del cromosoma 22. Las variantes patógenas de AIRE causan el síndrome poliglandular autoinmune tipo 1 (APS1), caracterizado por candidiasis superficial crónica y diversas enfermedades autoinmunes que afectan principalmente a las glándulas endocrinas [Perniola, 2018].

AIRE pertenece al grupo de proteínas capaces de unirse a la cromatina y regular el proceso de transcripción genética. A partir del extremo N, AIRE comprende un dominio de reclutamiento y activación de caspasa (CARD), una señal de localización nuclear (NLS), un dominio SAND y dos dedos homeodominio (PHD) [Figura 2]. A nivel subcelular, AIRE se localiza en pequeñas partículas distribuidas uniformemente en el nucleoplasma, con una organización subcelular asociada con la matriz nuclear como se observa en cultivos de mTEC humanos y líneas celulares transfectadas con AIRE [Perniola, 2018].

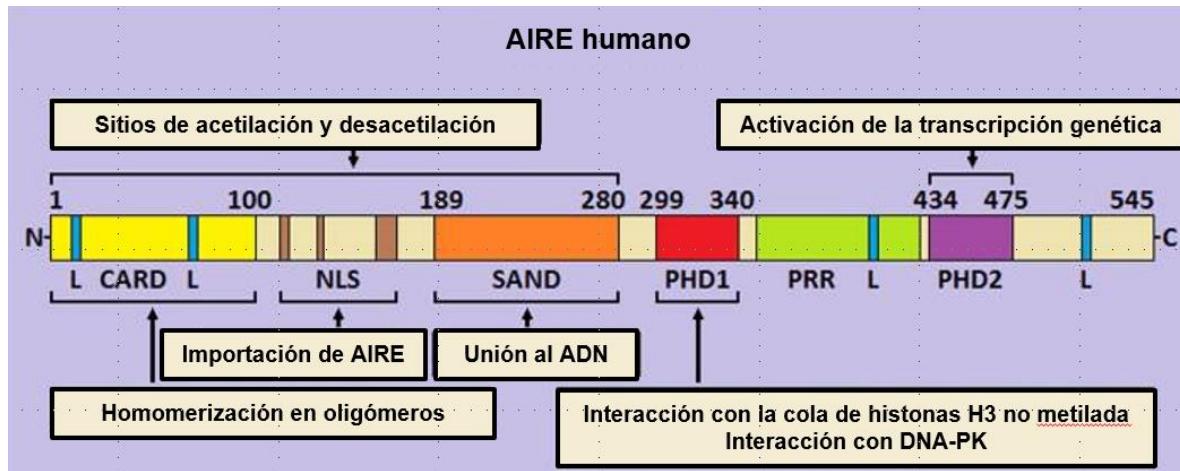


Figura 2. Representación del gen AIRE humano [Perniola, 2018].

El gen AIRE se expresa en el timo y su producto proteico, Aire, es esencial para la tolerancia inmunológica [Besnard *et al.*, 2021; Duarte *et al.*, 2021]. Las mTEC expresan marcadores de superficie como citoqueratinas, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II) y los grupos de diferenciación CD80, CD86 y CD40. Una minoría de células tímicas AIRE+ expresaron CD11c y CD83, que identifican DC maduras de linaje mieloide [Heino *et al.*, 1999; Perniola, 2012]. También se detectó ARNm de AIRE en linfocitos B tímicos y timocitos CD4+ CD8+ doble positivo, mientras que en la sangre periférica se limitó únicamente a los linfocitos B [Suzuki *et al.*, 2008]. Las mTEC presentan una gran variedad de antígenos, dada por la expresión de AIRE, que les permite a las mTEC expresar y presentar estos autoantígenos llamados ectópicos. La selección negativa ocurre debido a la exposición de múltiples autoantígenos en el timo, los cuales tienen la capacidad de unirse al MHC. Aquellas células que no se unen al MHC y muestran un alto grado de autorreactividad son eliminadas, con el objetivo de reducir la probabilidad de desencadenar respuestas autoinmunes. Aunque una pequeña fracción de estas células logra evadir la eliminación, estas células se diferencian en una subpoblación con características fenotípicas y funcionales específicas, conocidas como células Treg, que desempeñan un papel supresor en el sistema inmunológico [Chávez *et al.*, 2017].

El mecanismo molecular del gen AIRE se acciona desde la proteína de unión a CREB (CBP), que se localiza en los cuerpos nucleares (NB) y es un coactivador de varios factores de transcripción. La acetilación (Ac) por CBP estabiliza la distribución subcelular de AIRE (proteína). El factor b de alargamiento de la transcripción positiva (P-TEFb) y la proteína quinasa activada por ADN (DNA-PK) son otros coactivadores de AIRE. DNA-PK fosforila AIRE, junto con otras moléculas que coimmunoprecipitan con AIRE, como la ADN-topoisomerasa (DNA-TOP) IIa. La DNA-

TOPII α realiza cortes de ADN de doble cadena y atrae DNA-PK y poli-(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1), DNA-Topl es un compañero de AIRE preeminente aguas arriba de DNA-TopII α y DNA-TopII β [Figura 3]. AIRE ejercería una función similar a la camptotecina que regula negativamente la topoisomerasa I en muchas células tumorales incluyendo cáncer de pulmón, con actividad antitumoral en el proceso de tumorigénesis [Liu *et al.*, 2000; Wen *et al.*, 2021], y al etopósido capaz de inhibir la actividad de religación de DNA-TOP de tipo I y II [Jang *et al.*, 2025]. A ésto le siguen cambios en la cromatina atribuibles a DNA-PK y PARP1, y activa la transcripción de genes de baja expresión. La proteína quinasa 2 que interactúa con el homeodominio (HIPK2), otra proteína quinasa serina-treonina localizada en los NB, fosforila AIRE (y CBP) y ejerce una influencia represiva sobre las propiedades relacionadas [Perniola, 2018]. Además, para la regulación de la proteína Aire, Yoshida *et al.* encontraron que la proteína 4 que contiene bromodominio (Brd4) forma un puente entre Aire y P-Tefb, y que la fosforilación equilibrada y Ac de Aire son necesarios para la movilizar los mecanismos de transcripción y empalme e inducir la transcripción [Yoshida *et al.*, 2015]. En este contexto, se ha destacado que la histona desacetilasa del grupo III Sirtuin 1 preserva la expresión de genes codificantes de TRA dependientes de Aire por desacetilación de dichos residuos [Chuprin *et al.*, 2015].

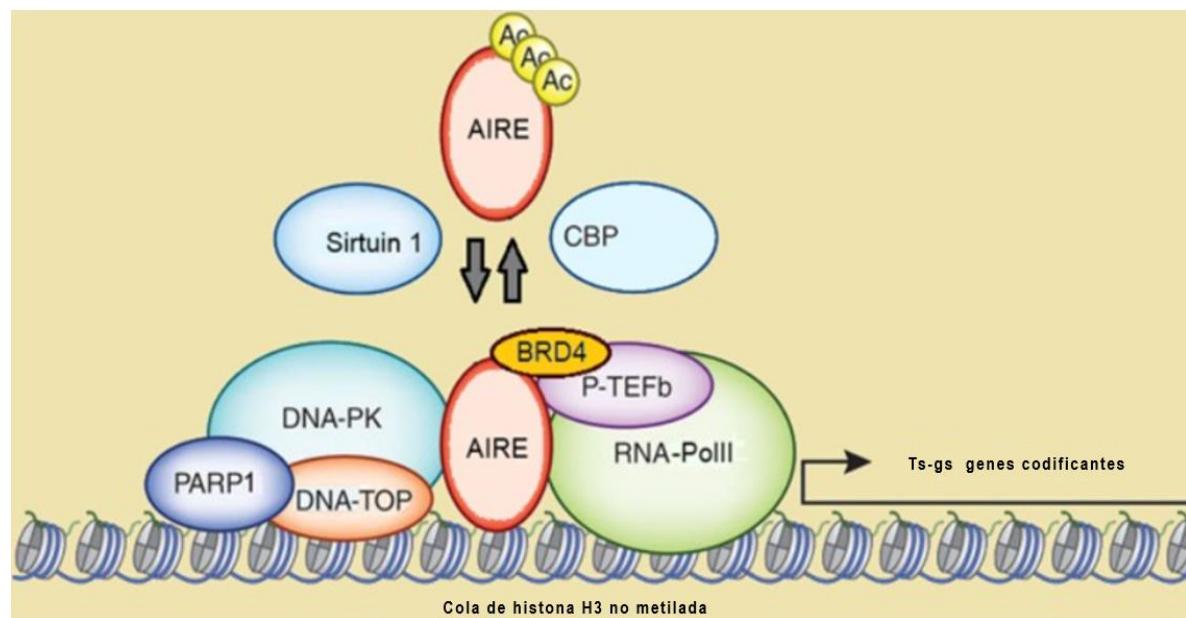


Figura 3. Mecanismos moleculares de acción del gen AIRE [Perniola, 2018].

El gen AIRE es expresado principalmente en órganos linfoides como médula ósea y bazo [Nagamine *et al.*, 1997; Poliani *et al.*, 2010]. Sin embargo, Aaltonen y sus

colaboradores detectaron ARNm de AIRE en tejidos humanos como glándulas endócrinas y otros órganos no linfoides, aunque los linajes celulares que tienen dicha propiedad no estaban definidos [Aaltonen *et al.*, 1997].

Se ha reportado expresión AIRE negativa o insignificante positiva en hígado, músculo esquelético, cartílago, hueso, corazón, vasos sanguíneos, sistema respiratorio, sistema gastrointestinal, sistema genitourinario, sistema nervioso central, glándulas endocrinas, piel y ojos [Nagamine *et al.*, 1997; Heino *et al.*, 1999; Klamp *et al.*, 2006; Poliani *et al.*, 2010].

Michelson y sus colaboradores demostraron que las mTEC utilizan factores de transcripción que definen el linaje para reflejar los tipos de células extratímidicas. Realizando experimentos unicelulares (scRNA-seq), para investigar los mecanismos de las expresiones de antígenos restringidos de tejido (TRA) en mTEC, clasificaron las mTEC en varias subpoblaciones en función de su parecido con tejidos extratímidicos particulares, como queratinocitos, células de penacho, células de micropliegues, células neuroendocrinas/secretoras, células ciliadas y miocitos. Llamaron a estas poblaciones “células miméticas” y demostraron que la mayoría de ellas se encuentran en la etapa “post-Aire”. Es decir, la etapa del desarrollo de ciertas células del timo, en particular las mTEC, ocurre después de la expresión del gen AIRE. La etapa “post-Aire” corresponde a células que ya expresaron AIRE en el pasado, aunque la expresión sea baja [Michelson *et al.*, 2022].

Bautista y sus colaboradores al investigar la heterogeneidad del compartimento medular y comprender mejor la relación entre las mTEC y otros subconjuntos epiteliales, identificaron las células neuroendocrinas con genes inducidos (diana) por AIRE (NEUROD1, NEUROG1, CHGA), además de los ionocitos con genes promovidos por AIRE (CFTR, FOXI1, ASCL3, CLCNKB) [Bautista *et al.*, 2021]. Curiosamente, los ionocitos pulmonares surgen de células basales (dan lugar a células neuroendocrinas) y de células tímicas [Montoro *et al.*, 2018].

Cabe mencionar que los genes expresados por las células neuroendocrinas como NEUROD1 se sobreexpresan en cánceres neuroendocrinos agresivos como SCLC promoviendo la supervivencia de las células tumorales y la metástasis [Osborne *et al.*, 2013; Ikematsu *et al.*, 2020]; NEUROG1 y CHGA continúan en investigaciones para comprender mejor el mecanismo del cáncer de pulmón y lograr el objetivo final de una mejor identificación de las células cancerosas; hasta el momento se usan como marcador potencial para el diagnóstico temprano del cáncer de pulmón neuroendocrino [Pradhan *et al.*, 2013; Shi, 2021].

Si bien aún falta por comprender la información sobre los genes dependientes de AIRE en humanos, los datos unicelulares recabados hasta ahora de las células epiteliales tímicas humanas pueden ayudar a identificar los objetivos de AIRE

[Matsumoto *et al.*, 2023]. Dado que las células miméticas están presentes principalmente en los tejidos linfoides secundarios, es probable que cumplan un papel accesorio en la regulación inmunitaria. Esta hipótesis se ve apoyada por los hallazgos de que las células miméticas expresan moléculas inmunomoduladoras, como IDO, IL-10 y PD-L1 [Tas *et al.*, 2007]. Las células miméticas también expresan altos niveles de MHCII, lo que podría sugerir que tienen la capacidad para presentar antígenos a las células T CD4 + [Fergusson *et al.*, 2019].

2.7 AIRE presente en neoplasias

Se sabe que los tumores malignos pueden escapar a la eliminación inmunomodulación por mecanismos que implican la inhibición de la activación de las células T. En el linfoma cutáneo de células T, las células malignas muestran un aumento dramático en la expresión de AIRE en comparación con las células T no malignas, lo que puede contribuir a los mecanismos de evasión inmunológica [Borcherding *et al.*, 2023]. En el melanoma causa la infiltración de células T CD8 + en los tumores, esto estuvo acompañado por una alta expresión de factores inmunorreguladores (es decir, IDO, PD-L1 y Tregs FOXP3+), lo que apunta a mecanismos inmunosupresores en su lugar dentro del microambiente tumoral [Zhu *et al.*, 2016]. Otro vínculo entre el cáncer y la transcripción de AIRE proviene de estudios *in vitro* en células tumorales escamosas orales que recientemente han demostrado expresar AIRE. La expresión de AIRE se correlacionó con la sobreexpresión de ETS1 que está asociada con cambios prooncogénicos en la expresión génica (es decir, quimiocinas, moléculas de adhesión y metaloproteinasas de matriz), que disminuyen en células knock-out de AIRE y aumentan aún más en células que sobreexpresan AIRE [Nguyen *et al.*, 2020]. En un estudio en carcinoma de próstata, donde una alta expresión de AIRE coincidió con niveles más altos de IL-6, tanto AIRE como IL-6 se asociaron con cánceres más agresivos y linfadenopatía, lo que sugiere una regulación asociada a AIRE de la inmunidad en el carcinoma de próstata [Kalra *et al.*, 2018]. En el cáncer de mama, se ha encontrado que la expresión de AIRE afecta la progresión del ciclo celular y la apoptosis [Bianchi *et al.*, 2016].

AIRE representa un caso fascinante de estudio dado que, de acuerdo al tipo celular, y/o microambiente tumoral, puede promover el crecimiento tumoral, la invasión, inmunosupresión o facilitar la muerte celular. Además, se ha observado que una variante genómica (SNP rs2075876 G>A) se asocia con protección contra cáncer de mama evaluando en una población de Oriente Medio, y niveles elevados de AIRE se vinculan con mejor pronóstico en subtipos triples negativos [Abdel *et al.*, 2023].

En este proyecto se busca comprobar la expresión de gen AIRE en células A549 y A549 con fenotipo neuroendocrino de cáncer de pulmón, evaluando si AIRE se relaciona con transdiferenciación. Dado que de la misma manera que ocurre una regulación del gen AIRE en las mTEC se podría ver en las células A549 neuroendocrina.

3. JUSTIFICACIÓN

En México actualmente las defunciones ocasionadas por el cáncer de pulmón han llegado a ser un problema de orden público, como se menciona en la página oficial del gobierno de México en 2022 de los 8 mil pacientes que fueron diagnosticados, el 90 % de los pacientes fallecieron.

Tal cifra es alarmante porque no solo en México el cáncer de pulmón ha jugado un papel importante en defunciones por cáncer, sino que se encuentra como la principal causa de mortalidad relacionada con el cáncer en todo el mundo, representando hasta el 25% de todas las muertes por cáncer. A pesar de los recientes avances en el diagnóstico y el tratamiento, la tasa de supervivencia a cinco años sigue siendo baja con un 22%. Las razones de esta supervivencia o recaída es su gran adaptación a sus tratamientos y microambiente tumoral, dado que alrededor del 15 % y 20 % de todos los tipos de cáncer de pulmón son de fenotipo neuroendócrino, presentando un aumento de la agresividad y fácil crecimiento, teniendo como consecuencia diagnósticos y tratamientos erróneos, así como pronósticos desfavorables.

Conforme a la situación actual, este trabajo es de importancia fundamental en el estudio de factores que participan en la inmunomodulación, evaluando sus posibles mecanismos de adaptación. Una de estas adaptaciones podría estar relacionada con la presencia del fenotipo neuroendócrino, cuyo comportamiento aún no ha sido completamente comprendido. Hasta el momento, no se ha explorado adecuadamente la expresión del gen regulador autoinmune (AIRE) en este tipo de cáncer.

Aunque varios estudios han examinado el gen AIRE en tejidos no linfoides, el efecto inmunomodulador asociado con las respuestas inmunitarias antitumorales siguen sin estar claros. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la expresión de AIRE en la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549 con fenotipo neuroendócrino, para analizar si mecanismos similares de regulación transcripcional que realiza AIRE en las mTEC, operan de manera semejante en las células neuroendócrinas del cáncer de pulmón.

4. HIPÓTESIS

El gen AIRE y sus genes blancos (NEUROD1 y NEUROG1) se encuentran expresados en la línea celular A549 neuroendocrina.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar la expresión del gen AIRE y sus genes blancos (NEUROD1 y NEUROG1) en células A549 neuroendocrinas del cáncer de pulmón.

5.2 Objetivos específicos

Analizar la expresión del gen AIRE y realizar la comparación con la expresión en células de cáncer de pulmón A549 y con las células de cáncer de pulmón con fenotipo neuroendocrino empleando RT-PCR.

Analizar la expresión de genes NEUROD1, NEUROG1, CHGA, SYP de células neuroendocrinas y realizar la comparación con la expresión en células de cáncer de pulmón A549 y con las células de cáncer de pulmón con fenotipo neuroendocrino empleando RT-PCR.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales y células

Se empleó la línea celular A549 de adenocarcinoma de pulmón humano de ATCC (CCL-185). Se utilizaron los siguientes reactivos: suero fetal bovino (FBS) (Gibco 26140-079) al 10 % 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco 15140), DMEM-High glucose (GIBCO 11995-065 500 mL), tripsina-EDTA (Gibco 25200072), 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (Sigma, cat: 15879-100MG), forskolina (MedChemExpress, cat: HY-15371), Direct-zol RNA MiniPrep Plus (Zymo research, cat. R2070), TRIzolReagent (Zymo Research, cat: R2050-1-50), RevertAid first strand cDNA (Thermo Fisher Scientific, ref: K1622), GoTaq Green Master Mix (Promega, cat: M7122), agarosa (Sigma, ref: A9539-100G), tampón TAE 50X (Invitrogen, cat: 24710-030), BioRad 500pb Molecular Mass RulerLadder (L000768B), azul de tripano (Sigma-Aldrich T8).

6.2 Métodos

6.2.1 Mantenimiento y cultivo celular

Se utilizó la línea celular A549, las células se mantuvieron en el medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina a 37 °C con CO₂ al 5 % en una incubadora (Thermo Scientific Model:3110) de células con una atmósfera humidificada (Mendieta *et al.*, 2018).

6.2.2 Viabilidad celular

Se preparó una suspensión celular tripsinizada (2 mL de tripsina) y neutralizada 1:1 con medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Se tomaron 100 µL de la suspensión celular y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 2 mL, se tomó un volumen 1:1 de solución azul de tripano al 0.4 % (p/v) y se añadió al tubo, se homogenizó y reposó de 5 - 15 minutos. Se transfirieron 20 µL de mezcla de suspensión de células - azul de tripano a ambas cámaras de Neubauer. Se observó al microscopio y se contaron a la cámara 1 y 2, se contaron todas las células en el cuadrado central de 1 mm y cuatro cuadrados de esquina de 1 mm, se realizará el conteo por triplicado (ATCC, 2023).

6.2.3 Transdiferenciación neuroendocrina de las células A549

Pasadas 24 h después de la siembra (obteniendo una confluencia del 40%), se lavaron las células con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1X. Posteriormente, se separaron las células en un grupo control, se trataron con medio DMEM suplementado 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina y otro grupo de células con medio DMEM suplementado 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y forskolina (FSK) cada uno a una concentración de 0.5 mM. Ambos tratamientos se incubaron con una duración de 96 h, agregando los inductores de AMPc (FSK y IBMX) cada 24 horas y se realizaron cambios de medio a las 48 h. Este modelo fue probado utilizando DMEM con SFB al 10% en presencia (tratamientos) o ausencia (control) de los inductores de AMPc. Para confirmar la transdiferenciación neuroendocrina exitosa de las células A549, se observaron los cambios en su morfología empleando un microscopio invertido y se documentaron tomando fotos a 48, 72 y 96 h (Mendieta *et al.*, 2018).

6.2.4 Preparación de ARN total y PCR con transcripción inversa (RT-PCR)

Se extrajó el ARN total de las células A549 y A549 neuroendocrinas; se emplearon TRIzol Reagent y kit Direct-zol RNA MiniPrep Plus siguiendo el procedimiento del manual del fabricante (Zymo Research, 2023). Se determinó la concentración y calidad del ARN obtenido en un espectrofotómetro NanoDrop y su integridad por electroforesis en gel de agarosa al 3 %. Posteriormente, se sintetizó el ADNc a partir del ARN total utilizando Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit que incluye cebadores hexaméricos aleatorios y Oligo(dT)18 (Thermo Fisher Scientific, 2024). Se analizó el ADNc obtenido en un espectrofotómetro NanoDrop (Spectrophotometer ND-100) para determinar su calidad y concentración.

Las secuencias de los genes AIRE, NEUROD1 y actina se recuperaron de la base de datos NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), diseñando los siguientes oligonucleótidos para cada gen [Cuadro 1]. La síntesis de las secuencias fue llevada a cabo por la empresa OligoT4. La secuencia de NEUROG1 fue tomada de Shu *et al.*, 2011.

Cuadro 1. Secuencias específicas de cada gen utilizadas para RT-PCR

	Secuencias	Tm (°C)	Productos (nt)
AIRE	Fw: ATGACACTGCCAGTCACGAG Rv: GTGCTGAGAAGGACACCTCC	62.7	190
NEUROD1	Fw: GAGACGCATGAAGGCTAACG Rv: CTGAACGAAGGAGACCAGGT	60	208
NEUROG1 ³	Fw: GCCTTCTATCTGTCCGTCG Rv: GTCTGGCACAGTCTTCCTC	60	141
CHGA ¹	Fw: AACCGCAGACCAGAGGACCA Rv: GTCTCAGCCCCGCCGTAGT	60.4	102
SYP ²	Fw: CTGCTGCAATGGGTGTTCG Rv: CCGTGGCCAGAAAGTCCAG	60.2	349
Actina ²	Fw: CCATCATGAAGTGTGACGTTG Rv: ACAGAGTACTTGCCTCAGGA	62	197

¹ [Fosado *et al.*, 2023], ² [Soto-Hernández, 2022], ³ [Shu *et al.*, 2011].

La PCR se llevó a cabo en el termociclador (Bio-Rad T100 Thermal Cycler); se usó GoTaq Green Master Mix, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Promega, 2021) en 30 ciclos: primera extensión por 5 min a 95 °C, desnaturación por 30 s a 95 °C y el alineamiento (Tm, seleccionada de acuerdo a cada secuencia para la etapa de hibridación), para la fase de extensión por 1 min a 72 °C y elongación final por 5 min a 72 °C.

Se corrieron los productos de las reacciones por electroforesis en gel de agarosa al 2 % a 80 V por 45 min, se colocó 30 min de tinción con bromuro de etidio y se reveló en un transiluminador de luz UV (VWR Scientific Model LM-20E) para su análisis.

6.2.5 Condiciones de cultivo y manejo de residuos

La producción del cultivo se llevó a cabo en áreas estériles. Cada componente utilizado se sometió a un proceso de esterilización, con reactivos debidamente etiquetados, indicando claramente las fechas de apertura y de caducidad. Todo material en contacto con las células se sometió a un proceso de inactivación con cloro y posteriormente fue desechado para prevenir cualquier forma de contaminación. Los desechos biológicos se depositaron en bolsas rojas. La

eliminación y tratamiento de los residuos generados es responsabilidad de empresas especializadas, debidamente autorizadas por la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Esta institución sigue los procedimientos necesarios para cumplir con los estándares establecidos por la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

6.2.6 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado en tres ensayos independientes. Los datos obtenidos se analizaron para media \pm error estándar. Las diferencias entre los grupos experimentales fueron evidenciadas en las imágenes, con falta de expresión en los grupos control (prueba t de student, $p<0.05$).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Transdiferenciación neuroendocrina de células A549 y expresión de marcadores neuroendócrinos.

Las células A549 fueron tratadas con 0.5 mM FSK y 0.5 mM IBMX durante 96 horas, presentando proyecciones similares a neuritas, a diferencia de las células A549 de grupo control [Figura 4].

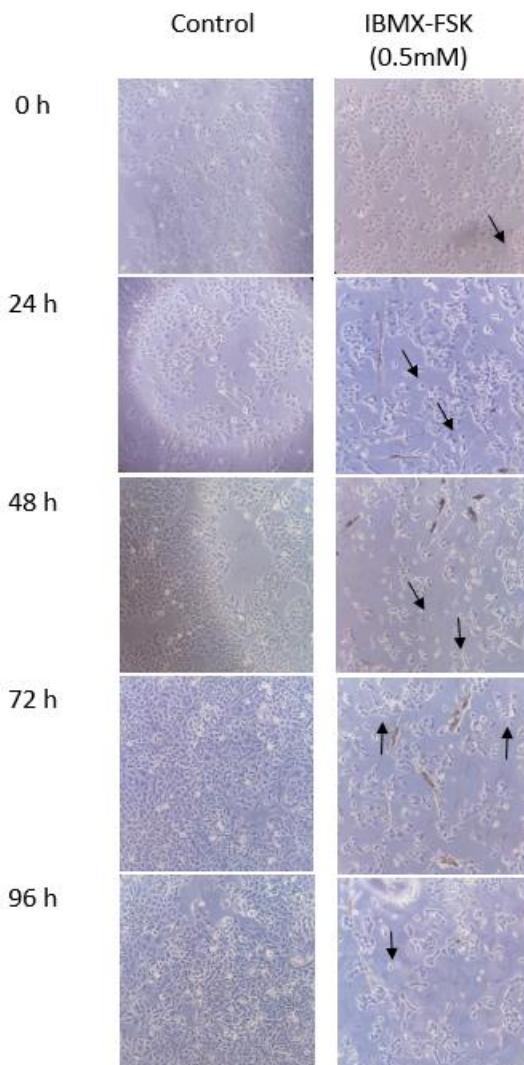


Figura 4. Transdiferenciación de células de cáncer de pulmón A549. Cambios morfológicos en células A549 tratadas con IBMX-FSK. Células control sin tratar con morfología epitelial normal, y células IBMX-FSK tras 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con IBMX-FSK, que muestran proyecciones similares a proyecciones tipo neuritas (10X).

Los resultados obtenidos confirman la efectividad del modelo de transdiferenciación utilizado, demostrando que la elevación de los niveles intracelulares de AMPc pueden inducir la diferenciación neuroendocrina, de la línea celular de cáncer de pulmón analizada. Para lograr este efecto, se emplearon dos compuestos: la forskolina (FSK), que actúa como estimulante de la enzima adenilato ciclase responsable de sintetizar AMPc, y la 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), un inhibidor de las fosfodiesterasas, encargadas de degradar dicho nucleótido. Ambos agentes fueron administrados a una concentración de 0.5 mM, conforme a los parámetros previamente estandarizados y optimizados por Mendieta y colaboradores en 2018, permitiendo inducir exitosamente la diferenciación neuroendocrina en células A549.

Para corroborar que la transdiferenciación fue correcta se evaluaron marcadores neuroendócrinos como la sinaptofisina (SYN) [Figura 5] y la cromogranina A (CHGA) [Figura 6], comparando la expresión de células A549 y células A549 con un fenotipo neuroendocrino. Conforme a la literatura dichos marcadores neuroendócrinos son empleados por su alta sensibilidad para la identificación diferencial neuroendocrina. Además, son útiles en la estadificación de la enfermedad, lo cual es fundamental para la formulación de estrategias de tratamiento. Su detección contribuye a la prevención y el control de la enfermedad [Lu *et al.*, 2022].

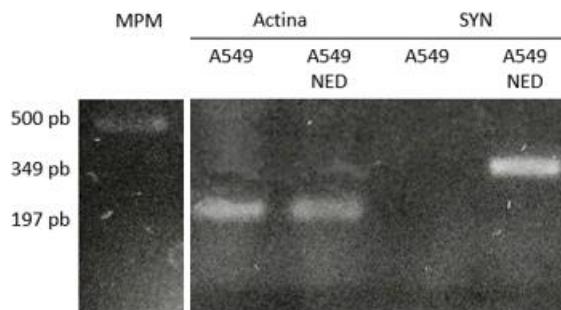


Figura 5. Expresión de SYN en células A549 y A549 neuroendócrinas (NED), mediante RT-PCR a partir de ADNc de células A549 no tratadas y de células A549 tratadas con IBMX-FSK, sin SFB (NED). En el carril de extrema izquierda se muestra el marcador de peso molecular (MPM); se aprecian las bandas correspondientes de SYP con un peso de 349 pb (sólo en A549 NED) y de actina (197 pb) como gen de referencia.

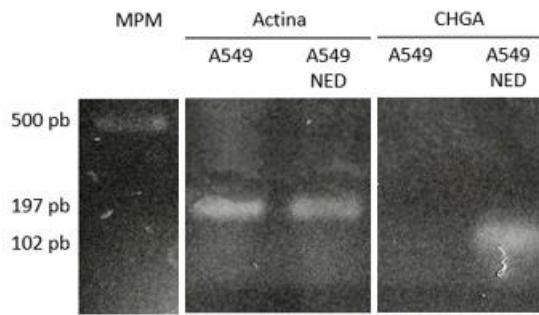


Figura 6. Expresión de CHGA en células A549 y A549 neuroendócrinas (NED), mediante RT-PCR a partir de ADNc de células A549 no tratadas y de células A549 tratadas con IBMX-FSK, sin SFB (NED). En el carril de extrema izquierda se muestra el marcador de peso molecular (MPM); se aprecian las bandas correspondientes de CHGA con un peso de 102 pb (sólo en A549 NED) y de actina (197 pb) como gen de referencia.

7.2 Expresión del gen AIRE y sus genes blancos (NEUROD1 y NEUROG1)

El gen AIRE se expresa predominantemente en el timo, no obstante, la expresión extratímica de AIRE tanto en el linaje mieloide como en el epitelial ha sido reconocida desde los primeros estudios sobre este gen [Nagamine *et al.*, 1997; Heino *et al.*, 1999; Klamp *et al.*, 2006; Poliani *et al.*, 2010]. En nuestro modelo experimental de fenotipo neuroendócrino de cáncer de pulmón observamos que el gen AIRE, evaluado por RT-PCR, no se expresa en las células A549 ni en su estado epitelial, ni en el inducido a fenotipo neuroendócrino, en condiciones de ausencia de suero fetal bovino [Figura 7]. Dado que AIRE es un factor de transcripción de expresión transitoria, podría estudiarse en las células A549 en distintas condiciones de suplementación con SFB y tiempos cortos de exposición a forskolina e IBMX.

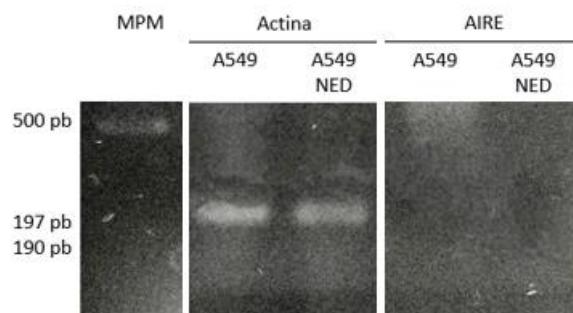


Figura 7. Expresión de AIRE en células A549 y A549 neuroendócrinas (NED), mediante RT-PCR a partir de ADNc de células A549 no tratadas y de células A549 tratadas con IBMX-FSK, sin SFB (NED). En el carril de extrema izquierda se muestra el marcador de peso molecular (MPM), se aprecian las bandas

correspondientes de actina (197 pb) como gen de referencia. Las bandas para AIRE se esperaban con 190 pb, aunque no se presentan en ninguno de los tipos celulares evaluados.

Se han realizado estudios en diferentes cánceres sobreexpresando el gen AIRE; que han evaluado el impacto que genera este factor de transcripción en el ciclo celular; en células de cáncer de mama (línea celular MCF-7) observaron un aumento significativo de células en fase G1, induciendo el arresto celular, activación de caspasas, promoviendo apoptosis. Los resultados sugieren que esto fue debido al estrés por sobre-traducción de proteínas de la familia Bcl-2 y una reducción en células en fase S [Bianchi *et al.*, 2016]. De acuerdo con dichos resultados se explicaría la ausencia de la expresión del gen AIRE en nuestro estudio, al usar un modelo sin enriquecimiento de suero fetal bovino. Por otro lado, en los modelos utilizados en este trabajo, no hubo sobreexpresión del gen. Así mismo, a nivel transcriptómico, AIRE se expresa en aproximadamente un tercio de los tumores de mama según datos del TCGA.

Asimismo, se evaluaron genes diana asociados al factor de transcripción AIRE, que podrían estar involucrados en el fenómeno de transdiferenciación. Al realizarse la evaluación de los genes asociados NEUROD1 y NEUROG1 se observó una expresión en las células de cáncer de pulmón solo con fenotipo neuroendocrino (A549 NED) [Figura 8].

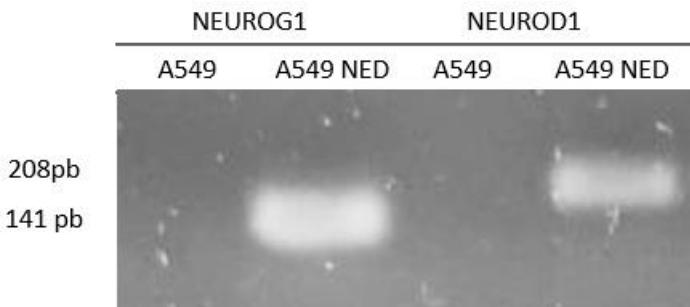


Figura 8. Expresión de los genes diana de AIRE (NEUROG1 y NEUROD1). Productos obtenidos por RT-PCR a partir de ADNc de células A549 no tratadas, células A549 tratadas con IBMX-FSK (A549 NED). En los carriles se muestran las bandas correspondientes de NEUROD1 y NEUROG1 con un peso de 208 pb y 141 pb, respectivamente.

Este resultado podría sugerir que los factores de transcripción, como CREB (por el incremento de AMPc) o AIRE (por su relación con NEUROD1 y NEUROG1), juegan un papel importante en la transdiferenciación de las células A549 de células epiteliales a células con fenotipo neuroendocrino. El no identificar en un tiempo determinado la presencia de AIRE, nos llevó a pensar que podría haber una participación transitoria de AIRE en este proceso. Es importante destacar que,

aunque el papel de NEUROG1 en el cáncer aún no está completamente esclarecido, su función más conocida está relacionada con la diferenciación neuronal, por lo que es posible que, en el contexto de nuestra investigación, cumpla una función similar. Cabe mencionar que los genes expresados por células neuroendocrinas como NEUROD1 se sobreexpresan en cánceres neuroendocrinos agresivos como el SCLC, promoviendo la supervivencia y metástasis de células tumorales [Osborne *et al.*, 2013; Ikematsu *et al.*, 2020].

Aunque AIRE no se expresa naturalmente en A549, nuestros hallazgos sugieren que su red transcripcional sí podría activarse en estados celulares específicos, como la conversión epitelial a neuroendocrina. Esto posicionaría a AIRE como un posible regulador oculto de plasticidad tumoral, con implicancias clínicas en cáncer de pulmón neuroendocrino. Previamente, ha sido probado que AIRE actúa de forma transitoria en el desarrollo del timo, activando genes periféricos solo por un tiempo, luego se silencia para evitar respuestas autoinmunes crónicas [Aaltonen *et al.*, 1997; Perniola, 2018]. Siguiendo ese contexto y el de muchos otros factores de transcripción como Oct4 y Nanog, o incluso Myc también actúan de manera transitoria para iniciar su función y luego ya no son necesarios. Bin y colaboradores descubrieron la expresión de AIRE en células madre y células embrionarias tempranas y su función en la autorenovación de células embrionarias donde observaron que la expresión de AIRE se eliminó 6 días después de la diferenciación celular [Bin *et al.*, 2012]. AIRE podría seguir un patrón transitorio en células pulmonares con plasticidad fenotípica.

Sin embargo, hay más vías por las que NEUROG1 y NEUROD1 se activan, por ejemplo por la vía Notch [Figura 7]. En el desarrollo neural el inhibidor de la alfa-secretasa permite la expresión de estos factores, por la vía Wnt/beta-catenina que favorece la expresión de genes neuroendocrinos en células progenitoras, la acumulación de beta-catenina activa la transcripción de genes diana que proliferan y diferencian células de linaje neuronales [Kuwabara *et al.*, 2009] y por la vía hedgehog, la cascada de señalización puede regular células progenitoras neuronales, así como la familia de las bHLH (básica hélice-bucle-hélice) que regulan genes neuroendocrinos, facilitando así la transición hacia un fenotipo neuroendocrino [Bertrand *et al.*, 2002; Palma *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2021].

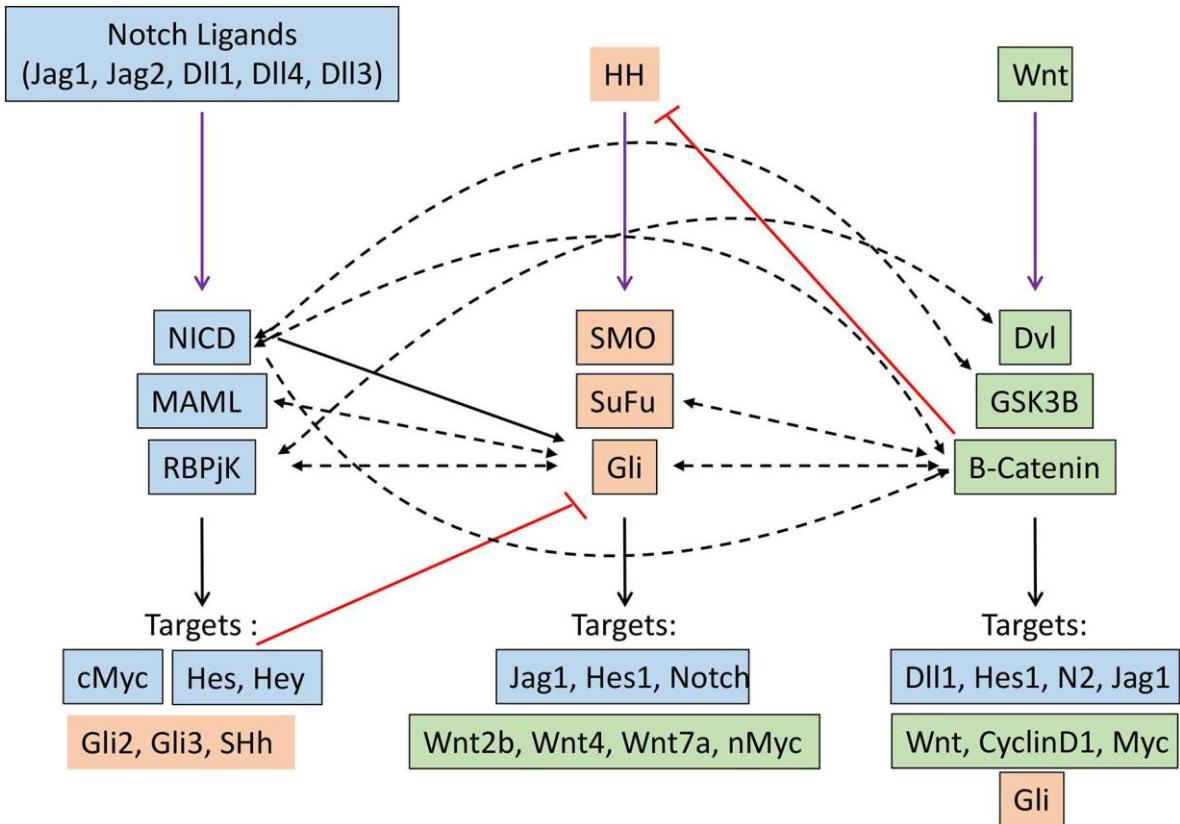


Figura 9. Interacción entre las vías de señalización Notch (azul), Hedgehog (naranja) y Wnt (verde) en el cáncer. La flecha negra indica la regulación transcripcional. Las flechas negras discontinuas indican interacciones directas. Las líneas rojas indican la regulación inhibitoria. Imagen tomada de Kumar *et al.*, 2021.

Adicionalmente, moduladores intracelulares como el AMPc son capaces de inducir la expresión de NEUROD1 y NEUROG1 a través de la vía clásica o por mecanismos independientes. Uno de estos mecanismos independientes puede ser el uso de FSK, un activador del adenilato ciclase e IBMX, un inhibidor de las fosfodiesterasas, provocando el aumento de los niveles intracelulares de AMPc, activando la vía de señalización PKA/CREB (proteína quinasa A / proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc), la cual puede inducir la expresión de genes proneuronales [Lepski *et al.*, 2013; Thompson *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2024].

Esta interacción entre vías de señalización (como Notch, Wnt y Hedgehog) y mecanismos internos mediados por segundos mensajeros como el AMPc refuerza la noción de que la especificación celular es un proceso dinámico y regulado por múltiples niveles, y que la activación de NEUROG1 y NEUROD1 representa múltiples señales de diferenciación y función de las células neuroendocrinas.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que en las condiciones evaluadas AIRE no se expresa en las células A549 ni A549 neuroendócrinas sin SFB en los tiempos evaluados.

Los genes asociados a AIRE CHGA, NEUROD1 y NEUROG1 se sobreexpresan en las células A549 neuroendócrinas.

Estos resultados sugieren que en este modelo el gen AIRE es posible que sea de manera transitoria un regulador plasticidad tumoral, considerando la expresión de NEUROD1 y NEUROG1 evidenciada por RT-PCR.

Proponemos que AIRE puede tener una función reguladora puntual y transitoria, que puede ser especialmente relevante en cánceres como el de pulmón, donde la transición a fenotipos neuroendócrinos se asocia con agresividad y resistencia. Se requieren experimentos más detallados para confirmar dicha aseveración.

9. REFERENCIAS

Aaltonen J, Björses P, Perheentupa J, et al. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene that features two PHD-type zinc finger domains. *Nature Genetics*. 1997; 17 (4): 399–403

Abdel Ghafar MT, Elshora OA, Allam AA, Mashaal RG, Hamous SAA, Abd El-Khalik SR, Abd-Ellatif RN, Mariah RA, Eissa R, Mwafy M, Shalaby RE, Nasif E, Elkholy RA. Autoimmune Regulator Gene Polymorphisms and the Risk of Primary Immune Thrombocytopenic Purpura: A Case-Control Study. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 5;24(5):5007. doi: 10.3390/ijms24055007. PMID: 36902438; PMCID: PMC10003684.

ATCC. Animal Cell Culture Guide. [monografía en internet]. Virginia: ATCC, 2023 [Consultado 2023 Febrero 29]. <https://www.atcc.org/resources/culture-guides/animal-cell-culture-guide>

Bautista JL, Cramer NT, Miller CN, Chavez J, Berrios DI, Byrnes LE, Germino J, Ntranos V, Sneddon JB, Burt TD, Gardner JM, Ye CJ, Anderson MS, Parent AV. Single-cell transcriptional profiling of human thymic stroma uncovers novel cellular heterogeneity in the thymic medulla. *Nat Commun*. 2021 Feb 17;12(1):1096. doi: 10.1038/s41467-021-21346-6. PMID: 33597545; PMCID: PMC7889611.

Bayik D, Lathia JD. Cancer stem cell-immune cell crosstalk in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2021 Aug;21(8):526-536. doi: 10.1038/s41568-021-00366-w. Epub 2021 Jun 8. PMID: 34103704; PMCID: PMC8740903.

Bertrand N, Castro DS, Guillemot F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Jul;3(7):517-30. doi: 10.1038/nrn874. PMID: 12094208.

Besnard M, Padonou F, Provin N, Giraud M, Guillonneau C. AIRE deficiency, from preclinical models to human APECED disease. *Dis Model Mech*. 2021 Feb 5;14(2):dmm046359. doi: 10.1242/dmm.046359. PMID: 33729987; PMCID: PMC7875492.

Bianchi F, Sommariva M, De Cecco L, Triulzi T, Romero-Cordoba S, Tagliabue E, Sfondrini L, Balsari A. Expression and prognostic significance of the autoimmune regulator gene in breast cancer cells. *Cell Cycle*. 2016 Dec;15(23):3220-3229. doi:

10.1080/15384101.2016.1241918. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27753538; PMCID: PMC5176139.

Bin G, Jiarong Z, Shihao W, Xiuli S, Cheng X, Liangbiao C, Ming Z. Aire promotes the self-renewal of embryonic stem cells through Lin28. *Stem Cells Dev.* 2012 Oct 10;21(15):2878-90. doi: 10.1089/scd.2012.0097. Epub 2012 Jun 11. PMID: 22540148; PMCID: PMC3464070.

Borcherding N, Severson KJ, Henderson N, Ortolan LS, Rosenthal AC, Bellizzi AM, Liu V, Link BK, Mangold AR, Jabbari A. Single-cell analysis of Sézary syndrome reveals novel markers and shifting gene profiles associated with treatment. *Blood Adv.* 2023 Feb 14;7(3):321-335. doi: 10.1182/bloodadvances.2021005991. PMID: 35390145; PMCID: PMC9881051.

Cabrera-Miranda, L. A., Lozano-Ruiz, F. J., Blake-Cerda, M., Corona-Cruz, J. F., Sánchez-Reyes, R., Pérez-Álvarez, S. I., ... & Arrieta, Ó. (2023). Guía de práctica clínica para el manejo del cáncer de pulmón de células pequeñas: enfermedad limitada. *Gaceta mexicana de oncología*, 22(1), 3-23.

Chávez Sánchez, F. R., Rojas-Lemus, M., Fortoul van der Goes, T. I., & Tenorio Zumárraga, E. P. (2017). Células T reguladoras tímicas: su origen, función e importancia en la salud y la enfermedad. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 60(5), 36-44.

Chen H, Gesumaria L, Park YK, Oliver TG, Singer DS, Ge K, Schrump DS. BET Inhibitors Target the SCLC-N Subtype of Small-Cell Lung Cancer by Blocking NEUROD1 Transactivation. *Mol Cancer Res.* 2023 Feb 1;21(2):91-101. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-22-0594. PMID: 36378541; PMCID: PMC9898120.

Chuang YM, Tzeng SF, Ho PC, Tsai CH. Immunosurveillance encounters cancer metabolism. *EMBO Rep.* 2024 Feb;25(2):471-488. doi: 10.1038/s44319-023-00038-w. Epub 2024 Jan 12. PMID: 38216787; PMCID: PMC10897436.

Chuprin A, Avin A, Goldfarb Y, Herzig Y, Levi B, Jacob A, Sela A, Katz S, Grossman M, Guyon C, Rathaus M, Cohen HY, Sagi I, Giraud M, McBurney MW, Husebye ES, Abramson J. The deacetylase Sirt1 is an essential regulator of Aire-mediated induction of central immunological tolerance. *Nat Immunol.* 2015 Jul;16(7):737-45. doi: 10.1038/ni.3194. Epub 2015 May 25. PMID: 26006015.

Duarte MJ, Mascarenhas RS, Assis AF, Tanaka PP, Speck-Hernandez CA, Passos GA. Autoimmune regulator act in synergism with thymocyte adhesion in the control

of lncRNAs in medullary thymic epithelial cells. *Mol Immunol.* 2021 Dec; 140:127-135. doi: 10.1016/j.molimm.2021.10.005. Epub 2021 Oct 23. PMID: 34700158.

Fosado R, Soto-Hernández JE, Núñez-Anita RE, Aceves C, Berumen LC, Mendieta I. Neuroendocrine Differentiation of Lung Cancer Cells Impairs the Activation of Antitumor Cytotoxic Responses in Mice. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 4;24(2):990. doi: 10.3390/ijms24020990. PMID: 36674504; PMCID: PMC9865473.

Fergusson JR, Morgan MD, Bruchard M, Huitema L, Heesters BA, van Unen V, van Hamburg JP, van der Wel NN, Picavet D, Koning F, Tas SW, Anderson MS, Marioni JC, Holländer GA, Spits H. Maturing Human CD127⁺ CCR7⁺ PDL1⁺ Dendritic Cells Express AIRE in the Absence of Tissue Restricted Antigens. *Front Immunol.* 2019 Jan 14;9:2902. doi: 10.3389/fimmu.2018.02902. PMID: 30692988; PMCID: PMC6340304.

Globocan (2024). Cancer Tomorrow | IARC - <https://gco.iarc.who.int>.

Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. PMID: 35022204.

Heino M, Peterson P, Kudoh J, Nagamine K, Lagerstedt A, Ovod V, Ranki A, Rantala I, Nieminen M, Tuukkanen J, Scott HS, Antonarakis SE, Shimizu N, Krohn K. Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Apr 21;257(3):821-5. doi: 10.1006/bbrc.1999.0308. PMID: 10208866.

Ikematsu Y, Tanaka K, Toyokawa G, Ijichi K, Ando N, Yoneshima Y, Iwama E, Inoue H, Tagawa T, Nakanishi Y, Okamoto I. NEUROD1 is highly expressed in extensive-disease small cell lung cancer and promotes tumor cell migration. *Lung Cancer.* 2020 Aug;146:97-104. doi: 10.1016/j.lungcan.2020.05.012. Epub 2020 May 24. PMID: 32526603.

ISSSTE. (2023). Primary lung cancer, highly lethal and preventable: Government of Mexico. Accessed at. <https://www.gob.mx/issste/prensa/cancer-de-pulmon-primario-altamente-letal-y-prevenible-issste?idiom=es>

Jang JY, Kim D, Im E, Kim ND. Etoposide as a Key Therapeutic Agent in Lung Cancer: Mechanisms, Efficacy, and Emerging Strategies. *Int J Mol Sci.* 2025 Jan 18;26(2):796. doi: 10.3390/ijms26020796. PMID: 39859509; PMCID: PMC11765581.

Kalra R, Bhagyaraj E, Tiwari D, Nanduri R, Chacko AP, Jain M, Mahajan S, Khatri N, Gupta P. AIRE promotes androgen-independent prostate cancer by directly regulating IL-6 and modulating tumor microenvironment. *Oncogenesis*. 2018 May 25;7(5):43. doi: 10.1038/s41389-018-0053-7. PMID: 29795364; PMCID: PMC5968032.

Klamp, T., Sahin, U., Kyewski, B., Schwendemann, J., Dhaene, K., & Türeci, Ö. (2006). Expression profiling of autoimmune regulator AIRE mRNA in a comprehensive set of human normal and neoplastic tissues. *Immunology letters*, 106(2), 172-179.

Kumar V, Vashishta M, Kong L, Wu X, Lu JJ, Guha C, Dwarakanath BS. The Role of Notch, Hedgehog, and Wnt Signaling Pathways in the Resistance of Tumors to Anticancer Therapies. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Apr 22;9:650772. doi: 10.3389/fcell.2021.650772. PMID: 33968932; PMCID: PMC8100510.

Kuwabara T, Hsieh J, Nakashima K, Taira K, Gage FH. A small modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells. *Cell*. 2004 Mar 19;116(6):779-93. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00248-x. PMID: 15035981.

Lei X, Lei Y, Li JK, Du WX, Li RG, Yang J, Li J, Li F, Tan HB. Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy. *Cancer Lett*. 2020 Feb 1;470:126-133. doi: 10.1016/j.canlet.2019.11.009. Epub 2019 Nov 12. PMID: 31730903.

Lepski G, Jannes CE, Nikkhah G, Bischofberger J. cAMP promotes the differentiation of neural progenitor cells in vitro via modulation of voltage-gated calcium channels. *Front Cell Neurosci*. 2013 Sep 19;7:155. doi: 10.3389/fncel.2013.00155. PMID: 24065885; PMCID: PMC3777016.

Liu LF, Desai SD, Li TK, Mao Y, Sun M, Sim SP. Mechanism of action of camptothecin. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;922:1-10. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb07020.x. PMID: 11193884.

Lu QQ, Li J, Li YH, Liu H, Xie XB. [On detection of chromogranin A, synaptophysin, neuronspecific enolase and progastrin-releasing peptide in small cell lung cancer]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2022 Jul 6;56(7):1017-1022. Chinese. doi: 10.3760/cma.j.cn112150-20220106-00022. PMID: 35899358.

Matsumoto M, Yoshida H, Tsuneyama K, Oya T, Matsumoto M. Revisiting Aire and tissue-restricted antigens at single-cell resolution. *Front Immunol*. 2023 May

3;14:1176450. doi: 10.3389/fimmu.2023.1176450. PMID: 37207224; PMCID: PMC10191227.

Mendieta I, Nuñez-Anita RE, Pérez-Sánchez G, Pavón L, Rodríguez-Cruz A, García-Alcocer G, Berumen LC. Effect of A549 neuroendocrine differentiation on cytotoxic immune response. *Endocr Connect.* 2018 May;7(5):791-802. doi: 10.1530/EC-18-0145. Epub 2018 Apr 26. PMID: 29700099; PMCID: PMC5987362.

Michelson DA, Hase K, Kaisho T, Benoist C, Mathis D. Thymic epithelial cells co-opt lineage-defining transcription factors to eliminate autoreactive T cells. *Cell.* 2022 Jul 7;185(14):2542-2558.e18. doi: 10.1016/j.cell.2022.05.018. Epub 2022 Jun 16. PMID: 35714609; PMCID: PMC9469465.

Montoro DT, Haber AL, Biton M, Vinarsky V, Lin B, Birket SE, Yuan F, Chen S, Leung HM, Villoria J, Rogel N, Burgin G, Tsankov AM, Waghray A, Slyper M, Waldman J, Nguyen L, Dionne D, Rozenblatt-Rosen O, Tata PR, Mou H, Shivaraju M, Bihler H, Mense M, Tearney GJ, Rowe SM, Engelhardt JF, Regev A, Rajagopal J. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature.* 2018 Aug;560(7718):319-324. doi: 10.1038/s41586-018-0393-7. Epub 2018 Aug 1. PMID: 30069044; PMCID: PMC6295155.

Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, Krohn KJ, Lalioti MD, Mullis PE, Antonarakis SE, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet.* 1997 Dec;17(4):393-8. doi: 10.1038/ng1297-393. PMID: 9398839.

Nguyen CTK, Sawangarun W, Mandasari M, Morita KI, Harada H, Kayamori K, Yamaguchi A, Sakamoto K. AIRE is induced in oral squamous cell carcinoma and promotes cancer gene expression. *PLoS One.* 2020 Feb 3;15(2):e0222689. doi: 10.1371/journal.pone.0222689. PMID: 32012175; PMCID: PMC6996854.

Osborne JK, Larsen JE, Shields MD, Gonzales JX, Shames DS, Sato M, Kulkarni A, Wistuba II, Girard L, Minna JD, Cobb MH. NeuroD1 regulates survival and migration of neuroendocrine lung carcinomas via signaling molecules TrkB and NCAM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Apr 16;110(16):6524-9. doi: 10.1073/pnas.1303932110. Epub 2013 Apr 3. PMID: 23553831; PMCID: PMC3631659.

Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sánchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development.* 2005 Jan;132(2):335-44.

doi: 10.1242/dev.01567. Epub 2004 Dec 16. PMID: 15604099; PMCID: PMC1431583.

Perniola R. Expression of the autoimmune regulator gene and its relevance to the mechanisms of central and peripheral tolerance. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:207403. doi: 10.1155/2012/207403. Epub 2012 Oct 22. PMID: 23125865; PMCID: PMC3485510.

Perniola R. Twenty Years of AIRE. *Front Immunol.* 2018 Feb 12;9:98. doi: 10.3389/fimmu.2018.00098. PMID: 29483906; PMCID: PMC5816566

Poliani PL, Kisand K, Marrella V, Ravanini M, Notarangelo LD, Villa A, Peterson P, Facchetti F. Human peripheral lymphoid tissues contain autoimmune regulator-expressing dendritic cells. *Am J Pathol.* 2010 Mar;176(3):1104-12. doi: 10.2353/ajpath.2010.090956. Epub 2010 Jan 21. Erratum in: *Am J Pathol.* 2010 May;176(5):2581. PMID: 20093495; PMCID: PMC2832133.

Pradhan MP, Desai A, Palakal MJ. Systems biology approach to stage-wise characterization of epigenetic genes in lung adenocarcinoma. *BMC Syst Biol.* 2013 Dec 26;7:141. doi: 10.1186/1752-0509-7-141. PMID: 24369052; PMCID: PMC3882327.

Rekhtman N. Lung neuroendocrine neoplasms: recent progress and persistent challenges. *Mod Pathol.* 2022 Jan;35(Suppl 1):36-50. doi: 10.1038/s41379-021-00943-2. Epub 2021 Oct 18. PMID: 34663914; PMCID: PMC8695375.

Rezaie J, Chodari L, Mohammadpour-Asl S, Jafari A, Niknam Z. Cell-mediated barriers in cancer immunosurveillance. *Life Sci.* 2024 Apr 1;342:122528. doi: 10.1016/j.lfs.2024.122528. Epub 2024 Feb 24. PMID: 38408406.

Romero, P. MT. (2020). LA INMUNOLOGÍA CONTRA EL CÁNCER. NPunto. <https://www.npunto.es/revista/22/la-inmunologia-contra-el-cancer>

Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, Sage J. Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2021 Jan 14;7(1):3. doi: 10.1038/s41572-020-00235-0. PMID: 33446664; PMCID: PMC8177722.

Ruiz-Cordero R, Devine W P. Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy in Lung Cancer. *Surgical pathology clinics.* 2020; 13: 17–33.

Shi YX. Identification of the molecular function of tripartite motif containing 58 in human lung cancer. *Oncol Lett.* 2021 Sep;22(3):685. doi: 10.3892/ol.2021.12946. Epub 2021 Jul 28. PMID: 34434284; PMCID: PMC8335731.

Shu L, Khor TO, Lee JH, Boyanapalli SS, Huang Y, Wu TY, Saw CL, Cheung KL, Kong AN. Epigenetic CpG demethylation of the promoter and reactivation of the expression of Neurog1 by curcumin in prostate LNCaP cells. *AAPS J.* 2011 Dec;13(4):606-14. doi: 10.1208/s12248-011-9300-y. Epub 2011 Sep 22. PMID: 21938566; PMCID: PMC3231852.

Shyu S, Heath JE, Burke AP. Neuroendocrine cell proliferations in lungs explanted for fibrotic interstitial lung disease and emphysema. *Pathology.* 2018 Dec;50(7):699-702. doi: 10.1016/j.pathol.2018.08.003. Epub 2018 Oct 22. PMID: 30360902.

Soto Hernández, J. E. (2023). Expression of IGF-1, IGF-2, and IGF-1R receptors in pulmonary adenocarcinoma cells with neuroendocrine phenotype [Undergraduate thesis, Universidad Autónoma de Querétaro]. Institutional Repository UAQ. <https://ri-ng.uaq.mx/jspui/bitstream/123456789/3801/1/RI006824.pdf>

Sun M, Han X, Li J, Zheng J, Li J, Wang H, Li X. Targeting KDM4 family epigenetically triggers antitumour immunity via enhancing tumour-intrinsic innate sensing and immunogenicity. *Clin Transl Med.* 2024 Feb;14(2):e1598. doi: 10.1002/ctm2.1598. PMID: 38390756; PMCID: PMC10884983.

Suzuki E, Kobayashi Y, Kawano O, Endo K, Haneda H, Yukiue H, Sasaki H, Yano M, Maeda M, Fujii Y. Expression of AIRE in thymocytes and peripheral lymphocytes. *Autoimmunity.* 2008 Mar;41(2):133-9. doi: 10.1080/08916930701773941. PMID: 18324482.

Tas SW, Vervoordeldonk MJ, Hajji N, Schuitemaker JH, van der Sluijs KF, May MJ, Ghosh S, Kapsenberg ML, Tak PP, de Jong EC. Noncanonical NF-κappaB signaling in dendritic cells is required for indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induction and immune regulation. *Blood.* 2007 Sep 1;110(5):1540-9. doi: 10.1182/blood-2006-11-056010. Epub 2007 May 4. PMID: 17483297.

Thankamony AP, Subbalakshmi AR, Jolly MK, Nair R. Lineage Plasticity in Cancer: The Tale of a Skin-Walker. *Cancers (Basel).* 2021 Jul 18;13(14):3602. doi: 10.3390/cancers13143602. PMID: 34298815; PMCID: PMC8306016.

Thermo Scientific. First Strand cDNA Synthesis System [Manual de instrucciones]. Massachusetts: Thermo Fisher Scientific Inc, 2013 [Consultado 2024, febrero]. chrome-

extension://efaidnbmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/18267.pdf

Thompson R, Casali C, Chan C. Forskolin and IBMX Induce Neural Transdifferentiation of MSCs Through Downregulation of the NRSF. *Sci Rep.* 2019 Feb 27;9(1):2969. doi: 10.1038/s41598-019-39544-0. PMID: 30814572; PMCID: PMC6393535.

Vocino Trucco G, Righi L, Volante M, Papotti M. Updates on lung neuroendocrine neoplasm classification. *Histopathology.* 2024 Jan;84(1):67-85. doi: 10.1111/his.15058. Epub 2023 Oct 4. PMID: 37794655.

Wang G, Zhang D, Qin L, Liu Q, Tang W, Liu M, Xu F, Tang F, Cheng L, Mo H, Yuan X, Wang Z, Huang B. Forskolin-driven conversion of human somatic cells into induced neurons through regulation of the cAMP-CREB1-JNK signaling. *Theranostics.* 2024 Feb 11;14(4):1701-1719. doi: 10.7150/thno.92700. PMID: 38389831; PMCID: PMC10879881.

WHO, EB. "WHO classification Thoracic tumours." (2021).

Wen T, Song L, Hua S. Perspectives and controversies regarding the use of natural products for the treatment of lung cancer. *Cancer Med.* 2021 Apr;10(7):2396-2422. doi: 10.1002/cam4.3660. Epub 2021 Mar 2. PMID: 33650320; PMCID: PMC7982634.

Xie S, Wu Z, Qi Y, Wu B, Zhu X. The metastasizing mechanisms of lung cancer: Recent advances and therapeutic challenges. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2021; 138: 111450

Yang J, Xu J, Wang W, Zhang B, Yu X, Shi S. Epigenetic regulation in the tumor microenvironment: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2023 May 22;8(1):210. doi: 10.1038/s41392-023-01480-x. PMID: 37217462; PMCID: PMC10203321.

Yoshida H, Bansal K, Schaefer U, Chapman T, Rioja I, Proekt I, Anderson MS, Prinjha RK, Tarakhovsky A, Benoist C, Mathis D. Brd4 bridges the transcriptional regulators, Aire and P-TEFb, to promote elongation of peripheral-tissue antigen transcripts in thymic stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Aug 11;112(32):E4448-57. doi: 10.1073/pnas.1512081112. Epub 2015 Jul 27. PMID: 26216992; PMCID: PMC4538633.

Yin W, Wang J, Jiang L, James Kang Y. Cancer and stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2021 Aug;246(16):1791-1801. doi: 10.1177/15353702211005390. Epub 2021 Apr 5. PMID: 33820469; PMCID: PMC8381702.

Zhu H, Jia Z, Trush MA, Li YR. Nrf2 Deficiency Promotes Melanoma Growth and Lung Metastasis. *React Oxyg Species (Apex)*. 2016;2(4):308-314. doi: 10.20455/ros.2016.853. Epub 2016 May 30. PMID: 29721548; PMCID: PMC5926243.

Zymoresearch. Direct-zol™ RNA Miniprep Plus [monografía en internet]. California: Zymo Research Corporation, 2021 [Consultado 2023 Octubre 18]. https://files.zymoresearch.com/protocols/_r2070t_r2070_r2071_r2072_r2073_direct-zol_rna_miniprep_plus_kit.pdf