

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Expresión de IGF-1, IGF-2 y receptores IGF-1R en células  
de adenocarcinoma pulmonar con fenotipo  
neuroendócrino**

**TESIS**

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL  
GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

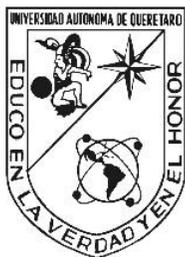
**PRESENTA**

**IBT. Jazmín Esmeralda Soto Hernández**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. Laura Cristina Berumen Segura**

**Querétaro, Qro. a Junio, 2022**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Expresión de IGF-1, IGF-2 y receptores IGF-1R en células de adenocarcinoma pulmonar con fenotipo neuroendócrino**

**TESIS**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**PRESENTA**

IBT. Jazmín Esmeralda Soto Hernández

**DIRIGIDA POR**

Dra. Laura Cristina Berumen Segura

COMITÉ TUTORAL

Dra. Laura Cristina Berumen Segura  
Presidente

\_\_\_\_\_

Dra. María Guadalupe García Alcocer  
Secretario

\_\_\_\_\_

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera  
Vocal

\_\_\_\_\_

Dra. Erika Patricia Rendón Huerta  
Suplente

\_\_\_\_\_

Dra. Alicia Irasema Mendieta Trejo  
Suplente

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Directora de la Facultad de Química

\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Junio de 2022  
México

“El mejor científico está abierto a la experiencia, y ésta empieza con un romance,  
es decir, la idea de que todo es posible. “

Ray Bradbury

“Al final, lo que importa no es quién eres, qué tan poderoso seas, cuántos  
premios has recibido o cuántos seguidores tengas, sino qué tan buena y  
reproducibile es tu ciencia.”

Indra K Vasil

*A todos los que fueron pacientes del cáncer.*

*Con cariño para mi familia.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Químico Biológicas de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro por el apoyo y formación académica que me brindaron durante mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca con número "1002747" otorgada como apoyo para realizar mis estudios de posgrado.

A CONACYT, ya que esta investigación fue realizada gracias al apoyo recibido a través de los proyectos CB2017-2018-A1-S-25275 y FOP02-2021-04/316849.

Agradezco a la Dra. Laura Cristina Berumen Segura, quien con su paciencia y dedicación ha logrado tener un equipo de trabajo muy colaborativo y amable del que me permitió formar parte. Por su vocación y su sabiduría al guiarme en este trabajo de tesis. Tiene mi admiración y cariño por todo lo que representa su persona.

A las doctoras, Dra. María Guadalupe García Alcocer, Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera, Dra. Erika Patricia Rendón Huerta y Dra. Alicia Irasema Mendieta Trejo, por estar atentas al trabajo. Agradezco cada una de sus observaciones que fueron parte fundamental del proyecto.

A mi familia, que siempre estuvieron apoyándome y son mi tesoro más grande. A Erick, que siempre será mi hermano menor pero que cada día me sorprende con su capacidad, inteligencia y nobleza. A Conchita y Manuel, que siempre me enseñaron a ser tan perseverante y a perseguir mis sueños, objetivos y metas. Todos ellos son ejemplos a seguir de cómo llegar a ser personas de gran corazón.

A la familia Ruiz Castillo, que me recibieron con los brazos abiertos y me permitieron formar parte de su hermoso hogar. Gracias por mostrarme el pedacito de cielo que es su bello Nayarit.

A Victoria, quien fue mi compañera, equipo, colega, copiloto, confidente y amiga. Representas tanto para estos años de maestría, que sólo me queda agradecerte por este equilibrio que se formó. Sin duda, llevaré conmigo todas las cosas que aprendí de tu persona, así como todos los libros recomendados. Tienes mi

admiración por la calidad de profesional que eres. Te deseo demasiadas cosas buenas y una de ellas es que llegues tan lejos como tú lo decidas.

A Bren, Prisci, Mayra y Fernando, que son grandes amigos y me apoyaron en todo momento. Aprendí demasiado de sus consejos y forma de trabajo. Además, todos tienen excelentes gustos musicales.

A Dani Piña y Marisa, que su amistad siempre me transmite reciprocidad, tranquilidad, felicidad y amor.

A mi prima, Lupis Lú, por siempre escucharme y debatir de ciencia. Eres una gran fuente de inspiración, te adoro de todo corazón.

A Dulce, Ale, Freddy, Jessi, Marian, Eli, Edgardo, Francisco, y todo el equipo de trabajo por su apoyo, compartir experiencias y conocimientos. Siempre hicieron ameno el tiempo en el laboratorio.

A Lau, Ricardo, Miriam, Odalis y Rebe que me permitieron acompañarlos, aprender y crecer con ellos. Su presencia hizo que reafirmara mi vocación al ayudarles y buscar explicación a sus inquietudes y preguntas. Muchas gracias por todos los buenos momentos compartidos, llenaron mis días de ternura, risas y sorpresas. Tienen una hermosa personalidad y estoy muy agradecida por el vínculo y amistad que se formó.

Y finalmente, pero no menos importante, a todas las personas que estaban pendiente de mí y que con mucho cariño atesoro su amistad: Sari, Naye, Francisco, Estefana, Bere, Daniel, Félix, Marisol, Jenny, Liz, Montse, Majo, Vivi, Jessi, Miguel, Blanquita y Diana.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Anatomía y fisiología del pulmón	3
2.1.1 Desarrollo del pulmón y linaje celular del epitelio pulmonar	3
2.2 Cáncer pulmonar	6
2.3 Cáncer neuroendócrino pulmonar	9
2.4 Factores de crecimiento: GH, IGF-1 e IGF-2	12
2.5 Receptores de factores de crecimiento: GHR, IGF-1R e IGF-2R	14
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	19

5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVOS	20
6.1 Objetivo general	20
6.2 Objetivos específicos	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1 Materiales y equipos	21
7.2 Reactivos	21
7.3 Métodos	22
7.3.1 Cultivo celular	22
7.3.2 Conteo celular y proliferación	22
7.3.3 Transdiferenciación neuroendócrina inducida por agentes que incrementan el AMPc intracelular	23
7.3.4 Extracción de ARN y síntesis de ADNc por RT-PCR	23
7.3.5 PCR para identificación de marcadores neuroendócrinos y factores de crecimiento similares a insulina	25
7.3.6 Electroforesis	28
7.3.7 Citometría de flujo para determinación de marcadores neuroendócrinos y receptores de membrana	28
7.4 Análisis estadístico	29
7.5 Manejo de residuos	30

8. RESULTADOS	31
8.1 Cambios en la morfología y proliferación de células A549 con fenotipo neuroendócrino	31
8.2 Evaluación de expresión de marcadores neuroendócrinos en células A549 <sub>NED</sub>	35
8.3 Comprobación de activación de la vía de señalización de CREB	39
8.4 Expresión de factores de crecimiento similares a insulina y sus receptores en células A549 <sub>NED</sub>	40
9. DISCUSIÓN	46
10. CONCLUSIONES	54
11. REFERENCIAS	55

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Clasificación de la OMS para cáncer neuroendócrino pulmonar.	10
2	Protocolo para preparación del tubo de reacción de retrotranscripción para síntesis de ADNc.	24
3	Protocolo para preparación del tubo de reacción de PCR para amplificación de genes de interés.	25
4	Oligonucleótidos que se emplearon para identificar marcadores neuroendócrinos, factores de crecimiento similares a insulina y controles de genes constitutivos.	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Zonas conductora y respiratoria del pulmón.	4
2	Esquematación de los tipos celulares presentes en el sistema respiratorio.	5
3	Carcinogénesis en células pulmonares.	8
4	Esquematación de cascada de señalización que se activa por receptores GHR e IGF-1R.	15
5	Condiciones de ciclo que se programó en el termociclador para realizar la síntesis de ADNc.	25
6	Condiciones de ciclo que se programó en el termociclador para realizar la amplificación de genes de interés.	26
7	Gráfico de proliferación de células A549 tratadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc para inducir transdiferenciación neuroendócrina.	32
8	Fotografías mediante microscopía que muestra cambios en la morfología de las células A549 tratadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc para inducir transdiferenciación neuroendócrina.	33
9	Microfotografías donde se muestran los cambios morfológicos de las células A549 con transdiferenciación neuroendócrina a las 24 y 120 h.	34

10	Nivel de expresión del ARNm del factor de transcripción Achaete-scute homolog 1 (ASCL1) en las células A549 transdiferenciadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc.	36
11	Nivel de expresión del ARNm del marcador neuroendócrino sinaptofisina en las células A549 transdiferenciadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc.	37
12	Nivel de expresión del ARNm del marcador neuroendócrino cromogranina A en las células A549 transdiferenciadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc.	38
13	Incremento del marcador neuroendócrino: cromogranina (CgA) en células A549 transdiferenciadas con agentes que elevan la concentración intracelular de AMPc.	39
14	Nivel de expresión del ARNm del factor de transcripción factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en las células A549 transdiferenciadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc.	40
15	Niveles de expresión del ARNm del factor de crecimiento similar a insulina 1 en las células A549 transdiferenciadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc.	41
16	Niveles de expresión del ARNm del factor de crecimiento similar a insulina 2 en las células A549 transdiferenciadas	42

con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc.

17	Niveles de expresión del ARNm del receptor del factor de crecimiento similar a insulina 1 en las células A549 transdiferenciadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc.	43
18	Detección por citometría de flujo de los niveles de IGF-1R en células A549 transdiferenciadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc.	44
19	Niveles de expresión del ARNm del receptor del factor de crecimiento similar a insulina 2 en las células A549 transdiferenciadas con que incrementan la concentración intracelular de AMPc.	44
20	Propuesta de vías de señalización que se activan al transdiferenciar las células A549 con agentes que incrementan el AMPc.	52

## ABREVIATURAS

<b>A549</b>	línea celular de adenocarcinoma pulmonar
<b>A549<sub>NED</sub></b>	células A549 con transdiferenciación neuroendócrina
<b>Ab-CgA-PE</b>	anticuerpo contra la proteína cromogranina A acoplado a ficoeritrina (PE)
<b>Ab-IGF-1R-PE</b>	anticuerpo contra el receptor IGF-1R acoplado a ficoeritrina (PE)
<b>AC</b>	adenilato ciclasa
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>AKT</b>	Akt quinasa también denominada proteína quinasa B (PKB)
<b>ALS</b>	subunidad ácido lábil
<b>AMP</b>	adenosín monofosfato
<b>AMPc</b>	adenosín monofosfato cíclico
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ASCL1</b>	factor de transcripción por sus siglas en inglés <i>Achaete-scute homolog 1</i>
<b>ATP</b>	adenosín trifosfato
<b>BDNF</b>	factor neurotrófico derivado del cerebro por sus siglas en inglés <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
<b>CgA</b>	cromogranina A
<b>CGRP</b>	péptido relacionado con el gen de calcitonina
<b>CRE</b>	elementos de respuesta de AMPc
<b>CREB</b>	proteína de unión a elementos de respuesta de AMPc
<b>CSC</b>	célula madre cancerosa
<b>DMEM</b>	medio Eagle modificado por Dulbecco por sus siglas en inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético

<b>EGFR</b>	receptor de factor de crecimiento epidérmico
<b>eIF-4E</b>	factor iniciador de la traducción eucariótico 4E
<b>EMT</b>	transición epitelio mesénquima
<b>EPOC</b>	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
<b>FAK</b>	quinasa de adhesión focal
<b>FSK</b>	forskolina
<b>Fwd</b>	oligonucleótido sentido ( <i>forward</i> )
<b>GAPDH</b>	gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa
<b>GH</b>	hormona de crecimiento
<b>GHIH</b>	hormona inhibidora de GH, somatostatina
<b>GHR</b>	receptor de hormona de crecimiento
<b>GHRH</b>	hormona liberadora de GH
<b>Grb2</b>	proteína adaptadora de unión del factor de crecimiento 2
<b>GSK3</b>	glucógeno sintasa quinasa 3
<b>IBMX</b>	isobutil-metilxantina
<b>IGF-1</b>	factor de crecimiento similar a la insulina 1
<b>IGF-1R</b>	receptor de factor de crecimiento similar a la insulina 1
<b>IGF-2</b>	factor de crecimiento similar a la insulina 2
<b>IGF-2R</b>	receptor de factor de crecimiento similar a la insulina 2
<b>IGFBP</b>	proteína de unión del factor de crecimiento similar a insulina
<b>IGFBP-3</b>	proteína de unión del factor de crecimiento similar a insulina 3
<b>IL-6</b>	interleucina 6
<b>INS</b>	insulina
<b>INS-R</b>	receptor de insulina
<b>IRS 1/2</b>	sustrato del receptor de insulina 1/2
<b>JAK</b>	Quinasa Janus
<b>LCC</b>	carcinoma de células grandes
<b>LUAD</b>	adenocarcinoma pulmonar
<b>KRAS</b>	proteína GTP-asa por sus siglas en inglés <i>Kirsten RAt Sarcoma virus</i>

<b>MAPK</b>	proteínas quinasas activadas por mitógenos por sus siglas en inglés <i>mitogen-activated protein kinases</i>
<b>mTOR</b>	diana de rapamicina en mamífero por sus siglas en inglés <i>mammalian Target of Rapamycin</i>
<b>NCAM1</b>	molécula de adhesión de célula neuronal
<b>NEB</b>	cuerpos de células neuroepiteliales
<b>NEC</b>	cáncer neuroendócrino
<b>NED</b>	transdiferenciación neuroendócrina
<b>NSE</b>	enolasa específica de neurona 1
<b>OMS</b>	organización mundial de salud
<b>PACAP</b>	polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria
<b>PBS</b>	amortiguador salino de fosfatos
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>p-CREB</b>	proteína CREB fosforilada
<b>PDE</b>	fosfodiesterasa
<b>PDK1</b>	proteína quinasa 1 dependiente de fosfatidilinositoles por sus siglas en inglés <i>phosphoinositide dependent protein kinase 1</i>
<b>PI3K</b>	fosfatidilinositol- 3-kinasa
<b>PIGF</b>	factor de crecimiento placentario
<b>PIP<sub>2</sub></b>	fosfatidilinositol 3,4 bifosfato
<b>PIP<sub>3</sub></b>	fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
<b>PKA</b>	proteína quinasa A
<b>PM</b>	peso molecular
<b>PNEC</b>	células neuroendócrinas pulmonares
<b>RAS</b>	GTPasa monomérica
<b>RAS-GEF</b>	factores de intercambio de nucleótidos de guanina de RAS
<b>REST</b>	factor de transcripción silenciador RE-1 (por sus siglas en inglés <i>Repressor Element-1 (RE-1) Silencing Transcription factor</i> )
<b>Rev</b>	oligonucleótido antisentido ( <i>reverse</i> )
<b>Rheb</b>	GTPasa monomérica

<b>Rheb-GAP</b>	proteínas activadoras de la actividad GTPasa de Rheb
<b>RhoA</b>	GTPasa
<b>ROCK</b>	Rho-quinasa
<b>RT-PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa
<b>S6K1</b>	proteína ribosomal S6 quinasa 1
<b>SCC</b>	carcinoma escamoso pulmonar
<b>SEM</b>	error estándar de la media
<b>SCLC</b>	cáncer de pulmón de células pequeñas
<b>SFB</b>	suero fetal bovino
<b>SK-N-AS</b>	línea celular de neuroblastoma
<b>SOS</b>	RAS – GEF por sus siglas en inglés <i>Son-of-sevenless</i>
<b>SRC</b>	proteína tirosina quinasa citoplasmática
<b>STAT</b>	transductores de señal y activadores de transcripción sus siglas en inglés <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
<b>STTR</b>	receptor de somatostatina
<b>Syp</b>	sinaptofisina
<b>TSC</b>	Rheb-GAP complejo de esclerosis tuberculosa por sus siglas en inglés <i>tuberous sclerosis complex</i>
<b>VIP</b>	péptido vasoactivo intestinal

**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.

## RESUMEN

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial en ambos géneros. Específicamente, el cáncer pulmonar con fenotipo neuroendócrino tiene una baja esperanza de vida. Para su estudio *in vitro* se induce la transdiferenciación neuroendócrina (NED) a través de la exposición a agentes que incrementan la concentración de AMPc. Las células NED sintetizan y secretan péptidos como la sinaptofisina (Syp) y cromogranina A (CgA), que son utilizados como marcadores neuroendócrinos; además, pueden secretar hormonas y factores de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1) que modulan la supervivencia y crecimiento celular. A pesar de las diversas investigaciones de IGF-1 y su receptor (IGF-1R), no se ha reportado la expresión de éstos en células de adenocarcinoma pulmonar con fenotipo neuroendócrino (A549<sub>NED</sub>). Es por ello se realizó el presente estudio con objetivo de inducir el fenotipo neuroendócrino en células A549 mediante la NED por isobutil-metilxantina (IBMX) y forskolina (FSK) para evaluar el papel del eje de IGF-1. Los resultados por RT-PCR muestran el cambio de expresión, donde las A549<sub>NED</sub> aumentaron un 180 % la expresión del factor de transcripción ASCL1 respecto al control y los marcadores neuroendócrinos CgA y Syp incrementaron su expresión 246 % y 48 % respectivamente. Para demostrar la activación de CREB por la NED se evaluó la expresión de BDNF, que tuvo un incremento significativo del 38 % respecto al control. Posteriormente, se analizó por RT-PCR la expresión de IGF-1 que no mostró diferencia significativa entre grupos, pero IGF-2 en A549<sub>NED</sub> disminuyó 60 % respecto al control. Mientras que IGF-1R e IGF-2R no mostraron cambio significativo de expresión. Además, por citometría de flujo se obtuvieron las poblaciones celulares positivas a CgA incrementando un 11 % significativamente. Por otra parte, IGF-1R no presentó cambio significativo. La NED inducida en A549 por incremento de AMPc genera la activación de factores de transcripción (p-CREB y ASCL1) que promueven la sobreexpresión de CgA, Syp y BDNF. En particular, la expresión de IGF-2 puede estar regulada por ASCL1.

**Palabras clave:** *A549<sub>NED</sub>, eje de IGF-1, ASCL1, BDNF, transdiferenciación neuroendócrina.*

## ABSTRACT

Lung cancer is the type of cancer with the highest incidence and mortality worldwide in both sexes. Specifically, lung cancer with a neuroendocrine phenotype has a low life expectancy. For its *in vitro* study, neuroendocrine transdifferentiation (NED) is induced through exposure to agents that increase the concentration of cAMP. NED cells synthesize and secrete peptides such as synaptophysin (Syp) and chromogranin A (CgA), which are used as neuroendocrine markers; furthermore, they can secrete hormones and insulin-like growth factors 1 (IGF-1) that modulate cell survival and growth. Despite various investigations of IGF-1 and its receptor (IGF-1R), their expression in lung adenocarcinoma cells with neuroendocrine phenotype (A549<sub>NED</sub>) has not been reported. That is why the present study was carried out to induce the neuroendocrine phenotype in A549 cells through NED by isobutyl-methylxanthine (IBMX) and forskolin (FSK) to evaluate the role of the IGF-1 axis. The results by RT-PCR show the change in expression, where the A549<sub>NED</sub> cells increased the expression of the transcription factor ASCL1 by 180 % compared to the control and the neuroendocrine markers Syp and CgA increased their expression by 246 % and 48 %, respectively. To demonstrate the activation of CREB by NED, BDNF expression was evaluated, which had a significant increase of 38 % compared to the control. Subsequently, IGF-1 expression was analyzed by RT-PCR, which showed no significant difference between groups, but IGF-2 in A549<sub>NED</sub> decreased by 60 % compared to the control. While IGF-1R and IGF-2R did not show a significant change in expression. In addition, by flow cytometry, cell populations positive for CgA were obtained, increasing significantly by 11 %. On the other hand, IGF-1R did not present a significant change. The NED induced in A549 by an increase in cAMP generates the activation of transcription factors (p-CREB and ASCL1) that promote the overexpression of CgA, Syp and BDNF. In particular, IGF-2 expression may be regulated by ASCL1.

**Keywords:** *A549<sub>NED</sub>, IGF-1 axis, ASCL1, BDNF, neuroendocrine transdifferentiation.*

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es una de las principales enfermedades que afecta al sistema respiratorio; a nivel mundial este tipo de cáncer tiene la mayor incidencia y mortalidad en ambos géneros, dado que se detecta en etapas tardías (GLOBOCAN, 2020). En México, el cáncer se sitúa como la tercera causa de muerte, donde el cáncer pulmonar ocupa el sexto lugar de mortalidad a nivel nacional (Aldaco-Sarvide *et al.*, 2018; GLOBOCAN, 2018).

En el cáncer de pulmón puede presentarse el fenotipo neuroendócrino, el cual tiene una baja esperanza de vida, debido a que no se tiene un diagnóstico temprano. Adicionalmente, se ha descrito que las células tumorales con fenotipo neuroendócrino (NED) poseen la capacidad de disociarse del epitelio aumentando la posibilidad de generar metástasis (Kuo y Krasnow, 2015; Mollaoglu *et al.*, 2017; Ouadah *et al.*, 2019; Ireland *et al.*, 2020). El fenotipo neuroendócrino se caracteriza por la expresión de péptidos como: el péptido liberador de gastrina (GRP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), la sinaptofisina (Syp), la cromogranina A (CgA), la molécula de adhesión de célula neural 1 (NCAM1) y la enolasa específica de neuronas (NSE) (Nurwidya *et al.*, 2016; Melosky, 2017; Oronsky *et al.*, 2017; Garg *et al.*, 2019; Herrera-Martínez *et al.*, 2019; Minami *et al.*, 2019; Oleinikov *et al.*, 2019).

Otros péptidos y factores de crecimiento que se han reportado en ciertos cánceres de pulmón son la hormona de crecimiento (GH), el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1), y su receptor (IGF-1R), los cuales aumentan el metabolismo, proliferación, supervivencia e invasividad celular. Y en células no pequeñas de cáncer de pulmón se ha descrito que el IGF-1R puede formar un eje de retroalimentación con la interleucina 6 (IL-6) lo que promueve la transcripción tanto de IGF-1 e IGF-2, estos factores de crecimiento promueven la angiogénesis y la

capacidad de transición epitelio mesénquima (EMT) (Nurwidya *et al.*, 2016; Brittain *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2019).

Estudios recientes realizados en biopsias de neoplasias neuroendócrinas de cáncer gastrointestinal y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) demostraron la expresión de IGF-1. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce la expresión del eje de IGF-1 (IGF-1, IGF-2, IGF-1R e IGF-2R) en líneas celulares de cáncer de pulmón NED (Svejda *et al.*, 2013; Alexandraki *et al.*, 2017).

Con la finalidad de estudiar este fenotipo en cáncer de pulmón *in vitro* en líneas celulares cancerígenas epiteliales se ha estimulado la NED en presencia de la IL-6, radiación, silenciamiento o sobreexpresión de factores de transcripción proneurales (ASLC1, MYC, NEUROD1) o agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc, como son la isobutil-metilxantina (IBMX) y la forskolina (FSK) (Chang *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2015; Borromeo *et al.*, 2016; Mollaoglu *et al.*, 2017; Mendieta *et al.*, 2018; Thompson *et al.*, 2019; Kudoh *et al.*, 2020). En presencia de estos cambios en el microambiente celular o desregulación de factores proneurales se presentan cambios en la morfología y expresión de marcadores neuroendócrinos (Cieślak-Pobuda *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Ireland *et al.*, 2020).

El cáncer neuroendócrino representa un problema al no diagnosticarse a tiempo, es por ello en este trabajo se pretende determinar la expresión de los factores IGF-1, IGF-2, IGF-1R e IGF-2R en las células de adenocarcinoma pulmonar A549 neuroendócrinas (A549<sub>NED</sub>) y poder encontrar un posible marcador con la finalidad de que en un futuro se pueda dar un diagnóstico y tratamiento oportuno del cáncer de pulmón con fenotipo neuroendócrino.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Anatomía y fisiología del pulmón**

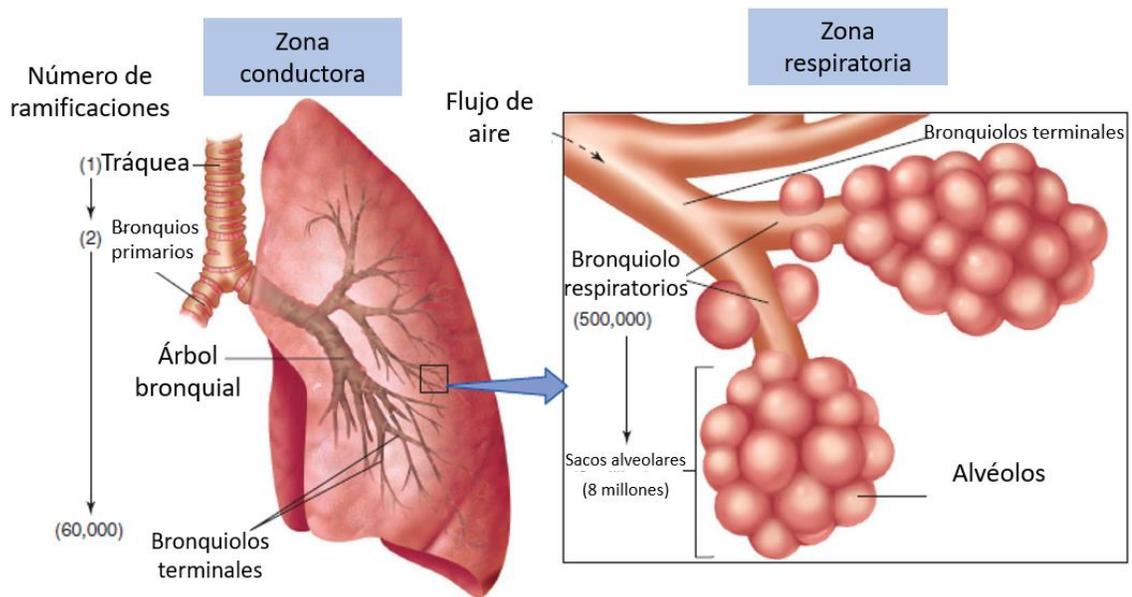
El pulmón es un órgano cuya función principal es el intercambio de gases en el cuerpo, es decir, oxigenar la sangre y recoger el bióxido de carbono proveniente de los tejidos; este órgano está expuesto a diferentes partículas contaminantes presentes en el aire, las cuales son detectadas en colaboración con el sistema nervioso y el sistema inmune (Garg *et al.*, 2019).

Los pulmones se subdividen en: a) la zona conductora, estructuras anatómicas que conforman las vías respiratorias que permiten la conducción del aire hasta llegar a b) la zona respiratoria o parénquima pulmonar, involucrada en el intercambio gaseoso (Fox, 2016).

La zona conductora se constituye por la tráquea y bronquios que conforman el árbol traqueobronquial pulmonar. La tráquea se bifurca en los bronquios, que son conductos encargados de distribuir el aire a través de los pulmones a la zona respiratoria, en la que se encuentran los bronquiolos respiratorios y los sacos alveolares. En los alvéolos se realiza el intercambio de dióxido de carbono y oxígeno a través de la membrana respiratoria, que funge como una barrera de aire-sangre entre los capilares pulmonares y alvéolos como se observa en la Figura 1 (Fox, 2016; Amador y Varacallo, 2020).

#### **2.1.1 Desarrollo del pulmón y linaje celular del epitelio pulmonar**

La formación de los pulmones inicia durante la cuarta semana de gestación, en la cual el embrión, a partir de la capa germinal del endodermo, desarrolla el tubo intestinal que se divide en intestino anterior, intestino medio e intestino posterior (Amador y Varacallo, 2019).



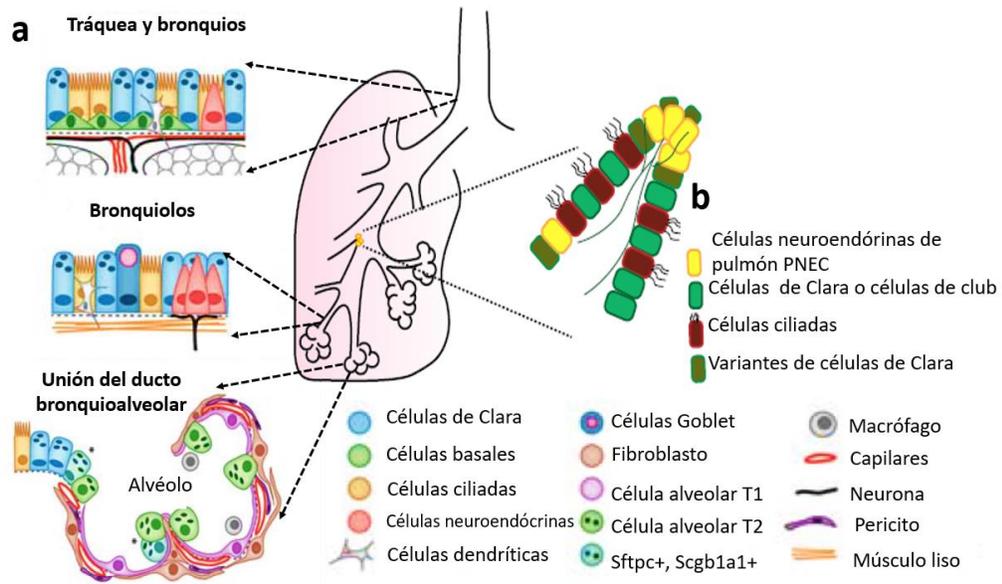
Fuente: Fox, 2016.

Figura 1. Zona conductora y respiratoria del pulmón. La zona conductora es la vía respiratoria por donde fluye el aire para llegar a la zona respiratoria en donde se realiza el intercambio gaseoso (Fox, 2016).

En las semanas siguientes se desarrolla el árbol bronquial a partir de la ramificación del intestino anterior, formando un árbol de tubos estrechos con gruesas paredes epiteliales compuestas de células columnares (Cheung y Nguyen, 2015; Rozance y Rosenberg, 2017; Amador y Varacallo, 2020). De manera paralela, el epitelio comienza a diferenciarse en células secretoras o células de clara, ciliadas y células neuroendócrinas pulmonares (PNEC). Para que se lleve a cabo la diferenciación celular, es necesaria la expresión de factores y vías de señalización como son FGF, TGFB, Wnt, Sox, Hedgehog, Notch y ácido retinoico (Cheung y Nguyen, 2015; Semenova *et al.*, 2015; Garg *et al.*, 2019).

Las PNEC son de las primeras células especializadas que aparecen a partir de la semana 8 en el epitelio respiratorio, derivadas del endodermo en el desarrollo embrionario (Garg *et al.*, 2019; Kuo y Krasnow, 2015; Ouadah *et al.*, 2019). Las PNEC son un tipo de célula epitelial de las vías respiratorias, que representa <1 % de la población de epitelio pulmonar (Garg *et al.*, 2019). Se ubican como células

solitarias dentro del epitelio nasal, la tráquea y los bronquios principales, pueden agruparse en cuerpos de células neuroepiteliales (NEB) o en las bifurcaciones de las vías respiratorias como se observa en la Figura 2 (Kuo y Krasnow, 2015; Wolterink *et al.*, 2018; Garg *et al.*, 2019).



Fuente: adaptado de Semenova *et al.*, 2015 y Garg *et al.*, 2019.

Figura 2. Esquematación de los tipos celulares presentes en el sistema respiratorio. a) Tipos celulares presentes en la zona conductora (tráquea, bronquios y bronquiolos) y zona respiratoria (unión bronquioalveolar) del sistema respiratorio. b) Las PNEC se encuentran aisladas o de manera conjunta entre las bifurcaciones de las vías respiratorias (Semenova *et al.*, 2015; Garg *et al.*, 2019).

Los NEB se encuentran asociados con células nerviosas intraepiteliales, de esta manera, es posible la comunicación con el sistema nervioso central (Semenova *et al.*, 2015; Garg *et al.*, 2019). Esta intercomunicación permite que las PNEC tengan funciones moduladoras de los niveles de oxígeno, detecten cambios químicos y mecánicos, además se ha observado que en respuesta al daño en epitelio pulmonar tienen la capacidad de pluripotencia, ya que los NEB, son nichos progenitores que tienen la capacidad de diferenciarse en células de clara que secretan surfactante, cuya función principal es lubricar y proteger los bronquios (Kuo y Krasnow, 2015; Wolterink *et al.*, 2018, Garg *et al.*, 2019; Ouadah *et al.*, 2019; Hor *et al.*, 2020).

Por otro lado, la tráquea y bronquios están revestidos por el epitelio columnar pseudoestratificado que contiene células ciliadas secretoras, PNEC solitarias y células basales como se muestra en la Figura 2 (Kuo y Krasnow, 2015; Semenova *et al.*, 2015).

Los alvéolos se caracterizan por tener dos tipos de células alveolares: 1) las células alveolares tipo 1, que representan la mayor parte del área pulmonar; en este tipo de células se produce el intercambio gaseoso, por lo que sus membranas están interconectadas con las células endoteliales capilares y 2) las células alveolares tipo 2, son las células que se encargan de secretar surfactante que ayuda a reducir la tensión superficial, y reabsorben sodio y agua para incrementar el intercambio de gases en el alvéolo (Fox, 2016; Rozance y Rosenberg, 2017).

Las diferentes células descritas son fundamentales para el buen funcionamiento del sistema respiratorio, no obstante, la disfunción de algún tipo de células puede conducir al desarrollo de enfermedades respiratorias. De acuerdo a la OMS, las cinco principales enfermedades respiratorias son el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la infección por tuberculosis, la infección aguda del tracto respiratorio inferior y el cáncer pulmonar (OMS, 2017).

## **2.2 Cáncer pulmonar**

El cáncer es un término que engloba un amplio grupo de enfermedades que se caracteriza por una rápida proliferación celular que puede extenderse e invadir partes adyacentes del tumor o propagarse a otros órganos (OMS, 2022). A nivel mundial, el cáncer de pulmón provocó 1.76 millones de muertes en 2020, ocupando el primer lugar de mortalidad por cáncer combinando ambos sexos (GLOBOCAN, 2020). En México, el cáncer prevalece como la tercera causa de muerte después de la diabetes mellitus y las enfermedades isquémicas del corazón (Aldaco-Sarvide *et al.*, 2018; Reynoso-Noverón y Torres-Domínguez, 2018).

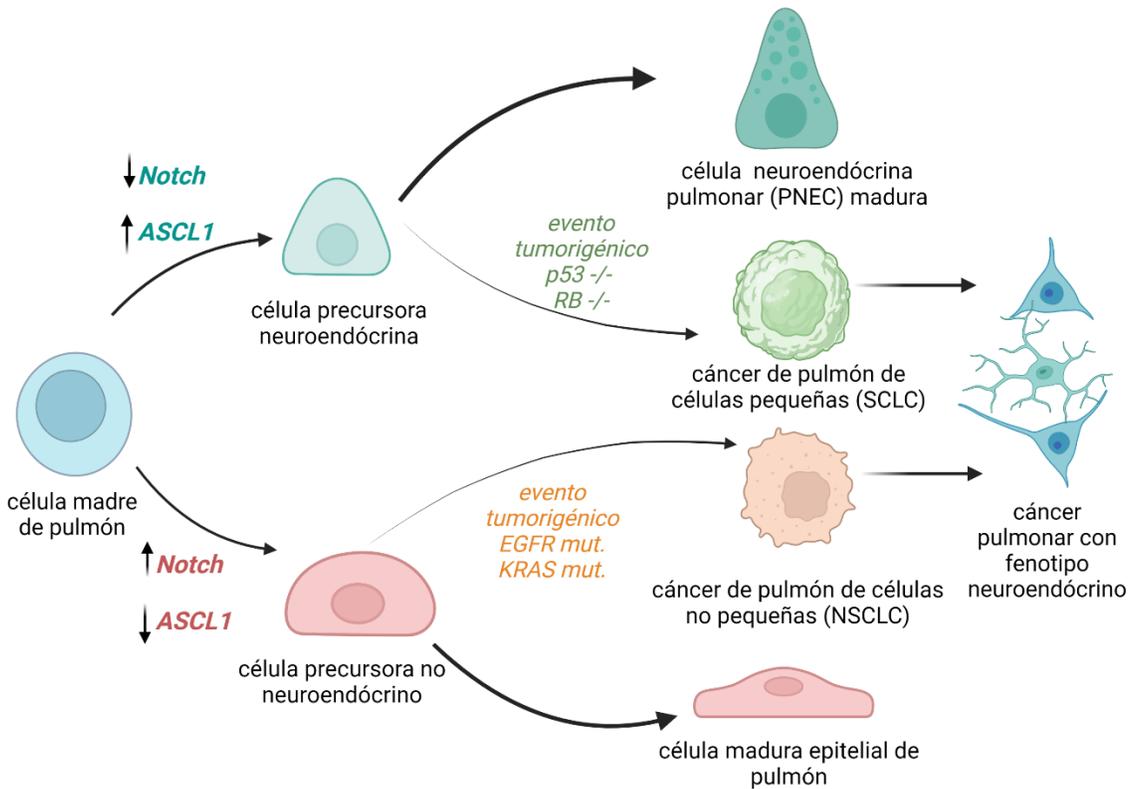
El cáncer de pulmón es el segundo cáncer con mayor incidencia a nivel mundial, con 2.2 millones de nuevos diagnósticos de cáncer pulmonar en 2020 de un total de 19.29 millones, es decir, representa el 11.4 % de todos los nuevos casos de cáncer. Además, el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer con 18 % del total, seguido del cáncer de colon con 9.4 % y cáncer de hígado con 8.3 % (Bray *et al.*, 2018; OMS, 2022).

A nivel nacional la tasa de incidencia estandarizada de cáncer de pulmón se estima en 5.8 nuevos casos por cada 100 000 habitantes, y que en 2020 representó el 3.9 % del total de 195 499 nuevos casos de cáncer registrados por la OMS (GLOBOCAN, 2020). En 2015, los estados con la mayor tasa de mortalidad específica por cáncer de pulmón por cada 100 000 habitantes fueron Sinaloa con  $11.3/10^5$ ; Sonora con  $10.8/10^5$ ; Nayarit con  $9.2/10^5$ ; Chihuahua con  $8.9/10^5$  y Nuevo León con  $8.1/10^5$  (Aldaco-Sarvide *et al.*, 2018).

Los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de pulmón incluyen una serie de mutaciones sucesivas; los genes que principalmente están afectados son: EGFR, KRAS, BRAF, ALK, PIK3CA, PTEN, Rb1 y Tp53, generando que cambien las funciones celulares, afectando la regulación del ciclo celular y dando origen al cáncer (Chan y Hughes, 2015; Oser *et al.*, 2016; Hassanpour y Dehghani, 2017; Skoulidis y Heymach, 2019). Los principales factores de riesgo son el tabaquismo, que ocasiona aproximadamente el 22 % de las muertes por cáncer, la exposición al humo o contaminantes del aire, y factores genéticos (Guerrero-López *et al.*, 2019; OMS, 2022).

De acuerdo a la OMS, el cáncer de pulmón se clasifica en dos subtipos histológicos: a) el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), subtipo que incluye el carcinoma escamoso pulmonar (SCC), adenocarcinoma pulmonar (LUAD) y carcinoma de células grandes (LCC). El NSCLC se presenta en el 85 % de los casos, y b) el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) representa el 15 % restante (Travis *et al.*, 2015a; Korrodi-Gregório *et al.*, 2016). Como se observa en la

Figura 3, en ocasiones también se puede desarrollar tanto en el NSCLC y el SCLC, una subclasificación denominada cáncer neuroendócrino (NEC).



Fuente: elaboración propia utilizando BioRender.com, con base en datos referenciados en la descripción de la Figura.

Figura 3. Carcinogénesis en células pulmonares. Una célula madre de pulmón puede diferenciarse en varios tipos celulares de acuerdo a las cascadas de señalización que se encuentren activas (Notch, ASCL1). Si existe un evento tumorigénico como mutación en oncogenes (EGFR, KRAS) o genes supresores de tumores (p53, RB) se dará origen a células de cáncer de pulmón no pequeñas y pequeñas respectivamente. En ambos tipos histológicos se presenta el fenotipo neuroendócrino. Siglas: Cascada de señalización de la proteína Notch (Notch), cascada de señalización de factor de transcripción ASCL1 (ASCL1), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), retinoblastoma (RB), gen que codifica la proteína que detiene ciclo celular en caso de daño al ADN (p53), gen que codifica la proteína GTPasa que forma parte de la vía de señalización de RAS-MAPK (KRAS), vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Imagen creada con BioRender.com, derechos y licencia de publicación número CP246N3I4A (Oser *et al.*, 2016; Borromeo *et al.*, 2016; Leonetti *et al.*, 2019; Ireland *et al.*, 2020).

### 2.3 Cáncer neuroendócrino pulmonar

El cáncer neuroendócrino (NEC) es un cáncer heterogéneo que se puede presentar en el tracto gastrointestinal, el páncreas, la próstata y en el pulmón; este último, es el segundo lugar más frecuente donde se presenta cáncer con fenotipo neuroendócrino (Melosky, 2017; Herrera-Martínez *et al.*, 2019).

Las células cancerígenas neuroendócrinas pueden producir, almacenar y secretar hormonas, péptidos y factores de crecimiento. Las moléculas que se han identificado que se sobreexpresan en NEC son: la somatostatina, la colecistoquinina, la adrenomedulina, el neuropéptido-YY, la calcitonina, el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), la cromogranina A (CgA), la enolasa específica de neuronas (NSE), la sinaptofisina (Syn), la molécula de adhesión de célula neural 1 (NCAM1) o CD56, el factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1), el factor de crecimiento placentario (PIGF), el receptor de factor de crecimiento vascular (VEGFR), el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el receptor de somatostatina (SSTR) (Alexandraki *et al.*, 2017; Öberg, 2018; Mendieta *et al.*, 2018; Bellur *et al.*, 2019; Herrera-Martínez *et al.*, 2019; Oleinikov *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2019). Sin embargo, el NEC pulmonar tiene características específicas que lo diferencian de los neoplasmas neuroendócrinos.

El NEC pulmonar se puede clasificar de acuerdo a la OMS con base en su histología, su capacidad de proliferación y diferenciación celular. Además, se puede dividir en grados que van del G1 al G3, los cuales se obtienen mediante recuento mitótico y el índice Ki-67, que es un marcador de proliferación (Travis *et al.*, 2015b; Öberg, 2018). En esta clasificación se incluyen carcinoides típicos, carcinoides atípicos, carcinomas de células pequeñas y carcinomas de células grandes como se muestra en el Cuadro 1 (Melosky, 2017; Metovic *et al.*, 2021).

Cuadro 1. Clasificación de la OMS para cáncer neuroendócrino pulmonar.

Tipo de NEC	Grado de la OMS	Histología	Mitosis por 2 mm cuadrados	Expresión de CD56 Syp, CgA	Presencia de necrosis
Grado bajo (bien diferenciado)	G1	Carcinoide típico	< 0 -1	positivo	No hay necrosis
Grado intermedio (bien diferenciado)	G2	Carcinoide atípico	2-10	positivo	Sí hay necrosis
Grado alto (poco diferenciado)	G3	Células grandes	>10	positivo 80 -90 %	Necrosis extensiva
		Células pequeñas			Alta necrosis

Fuente: Travis *et al.*, 2015a; Scoazec, 2019; Metovic *et al.*, 2021.

Los carcinoides atípicos con una diferenciación intermedia pueden ser más agresivos que los carcinoides típicos, mientras que los carcinomas neuroendócrinos de células grandes y carcinoma de células pequeñas tienden a tener una progresión más rápida y una menor esperanza de vida (Oronsky *et al.*, 2017; Metovic *et al.*, 2021). De esta manera, las personas que presentan un cáncer neuroendócrino pulmonar tienen un alto potencial metastásico que reduce su probabilidad de eliminar las células cancerígenas del cuerpo (Kuo y Krasnow, 2015; Oronsky *et al.*, 2017; Ouadah *et al.*, 2019; Ireland *et al.*, 2020).

Específicamente en NEC pulmonar se ha reportado la expresión del péptido liberador de gastrina (GRP), su precursor proGRP, el péptido relacionado con la el gen de calcitonina (CGRP), la neurotensina, el péptido vasoactivo intestinal (VIP), el polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP) estos péptidos se

han descrito que promueven el crecimiento de los NEC pulmonares (Garg *et al.*, 2019; Herrera-Martínez *et al.*, 2019; Moody *et al.*, 2015; Moody *et al.*, 2016).

Debido a la importancia de entender el comportamiento del fenotipo neuroendócrino por ser el segundo órgano de mayor incidencia del NEC, se ha investigado el proceso de transdiferenciación neuroendócrina (NED) que se define como el proceso en donde una célula parcialmente diferenciada se transforma y sufre cambios morfológicos a un tipo celular diferente, sin tener que reprogramarse (Ciešlar-Pobuda *et al.*, 2017). Los principales cambios son la formación de neuritas y gránulos que pueden sintetizar y secretar los péptidos que son conocidos como marcadores neuroendócrinos: CgA, NSE, Syp y NCAM1 (Oronsky *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Herrera-Martínez *et al.*, 2019; Minami *et al.*, 2019; Ireland *et al.*, 2020).

Se pueden generar células cancerígenas con fenotipo neuroendócrino, mediante el proceso de transdiferenciación neuroendócrina (NED), el cual se induce mediante la adición de agentes análogos o que incrementan la concentración del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) intracelular; un ejemplo de ellos es la isobutilmetilxantina (IBMX) que inhibe a las fosfodiesterasas (PDE) que degradan al AMPc, además se puede adicionar la forskolina (FSK), que activa a la adenilato ciclasa (AC), que permite la conversión del ATP a AMPc. Así mismo, es posible inducir NED mediante la exposición a radiación, o cambios en la expresión de genes como son interleucina 6, el factor de transcripción ASCL1, Myc y ERK/MAP (Deeble *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015; Mendieta *et al.*, 2018; Tenjin *et al.*, 2019).

Cuando se eleva el AMPc intracelular se activa a la proteína quinasa A (PKA) y ésta su vez activa a la proteína de unión al elemento de respuesta AMPc (CREB) localizada principalmente en el núcleo y funge como un factor de transcripción, que se une a los elementos de respuesta de AMPc (CRE) en los sitios promotores de genes que inducen proliferación, diferenciación, angiogénesis y resistencia a la

apoptosis (Alberts *et al.*, 2015; Moody, 2019). Para poder unirse al ADN, CREB debe ser fosforilado por PKA en el residuo de serina 133 (Ser 133). Una vez que está activado CREB (p-CREB) se une con la proteína de unión a CREB (CBP) y de esta forma puede unirse al ADN en la región promotora que tengan CRE, como son los genes para cromogranina (CgA), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y factores de crecimiento (Mahapatra *et al.*, 2003; Dyson y Wright, 2016; Steven y Seliger, 2016; Wang *et al.*, 2018a; Yan *et al.*, 2016; Moody, 2019;).

#### **2.4 Factores de crecimiento: GH, IGF-1 e IGF-2**

Dentro de los factores de crecimiento se encuentra la hormona de crecimiento (GH) y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1). La GH es una proteína de 191 residuos de aminoácidos que pertenece a la familia de la somatotropinas junto con la prolactina y el lactógeno placentario (Guevara-Aguirre *et al.*, 2018). La GH es sintetizada y secretada por las células somatotropas, localizadas en la hipófisis anterior o adenohipófisis sin embargo, también puede ser producida por otros tejidos extrapituitarios en donde actúa de forma autócrina y parácrina (Boguszewski y Boguszewski, 2019). Su secreción es regulada por dos factores liberadores secretados por el hipotálamo, los cuales son hormona liberadora de GH (GHRH) que estimula la síntesis y secreción de GH, mientras que la hormona inhibidora de GH (GHIH, somatostatina) no permite su liberación. El IGF-1 regula por retroalimentación negativa la liberación de GH (Hage *et al.*, 2019).

La GH se une a la proteína de unión a la hormona de crecimiento (GHBP); una vez que se encuentra en la circulación, la GH se une y activa el receptor de hormona de crecimiento (GHR) de la superficie celular, teniendo diferentes efectos de crecimiento y metabólicos los cuales involucran el metabolismo de lípidos y glucosa en los tejidos hepático, muscular, óseo y adiposo (Esposito *et al.*, 2019; Hage *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2019). Cuando estimula a ciertos tejidos se produce IGF-1 que actúa en conjunto con la GH (Bonfig y Holl, 2019).

El IGF-1 es una proteína compuesta por 70 residuos de aminoácidos cuyo peso es de 7.5 kDa y está conformada por cuatro dominios alfa hélice. Junto con el factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF-2), el IGF-1 puede interactuar con dos tipos de receptores de membrana celular (IGF-1R e IGF-2R) y 6 proteínas de unión a IGF (IGFBP 1-6) (Majchrzak-Baczmańska y Malinowski, 2016; Wang *et al.*, 2018b). El IGF-1 es secretado principalmente por hepatocitos en el hígado y es sintetizado en otros tejidos como ovario, endometrio y pulmón donde tiene efectos anabólicos y de crecimiento celular (Majchrzak-Baczmańska y Malinowski, 2016). Más del 99 % del IGF-1 se une a la proteína de unión del factor de crecimiento similar a insulina 3 (IGFBP-3) y a su vez forman un complejo con la subunidad ácido lábil (ALS) aumentando la vida media del IGF-1 en el torrente sanguíneo (Majchrzak-Baczmańska y Malinowski, 2016; Boguszewski y Boguszewski, 2019; Bonfig y Holl, 2019).

El tejido hepático también es la principal fuente de IGF-2, proteína de 67 residuos de aminoácidos que se secreta de manera independiente de la GH en respuesta a factores nutricionales y hormonales. Aunque IGF-1 e IGF-2 provocan respuestas biológicas similares, la etapa en que se expresan es diferente, IGF-2 es expresado durante el desarrollo fetal e IGF-1 en etapas posteriores del nacimiento (Majchrzak-Baczmańska y Malinowski, 2016; Boguszewski y Boguszewski, 2019).

Diversos estudios demuestran la implicación de la GH e IGF-1 en diferentes tipos de cáncer como mama, colon, próstata y pulmón donde tienen efectos autócrinos y parácrinos sobre el comportamiento de las células cancerosas y cercanas dentro del microambiente tumoral (Lu *et al.*, 2019; Boguszewski y Boguszewski, 2019). A medida que el tumor progresa, las células pueden tener diversos efectos por presencia de GH e IGF-1 como aumento de la supervivencia, proliferación, migración e invasión celular, que es factible debido a que estos factores de crecimiento inducen la transición epitelio-mesénquima (EMT) que promueve el proceso metastásico de un tumor (Brittain *et al.*, 2017; Boguszewski y Boguszewski, 2019; Lu *et al.*, 2019). Así mismo se ha reportado que GH promueve angiogénesis

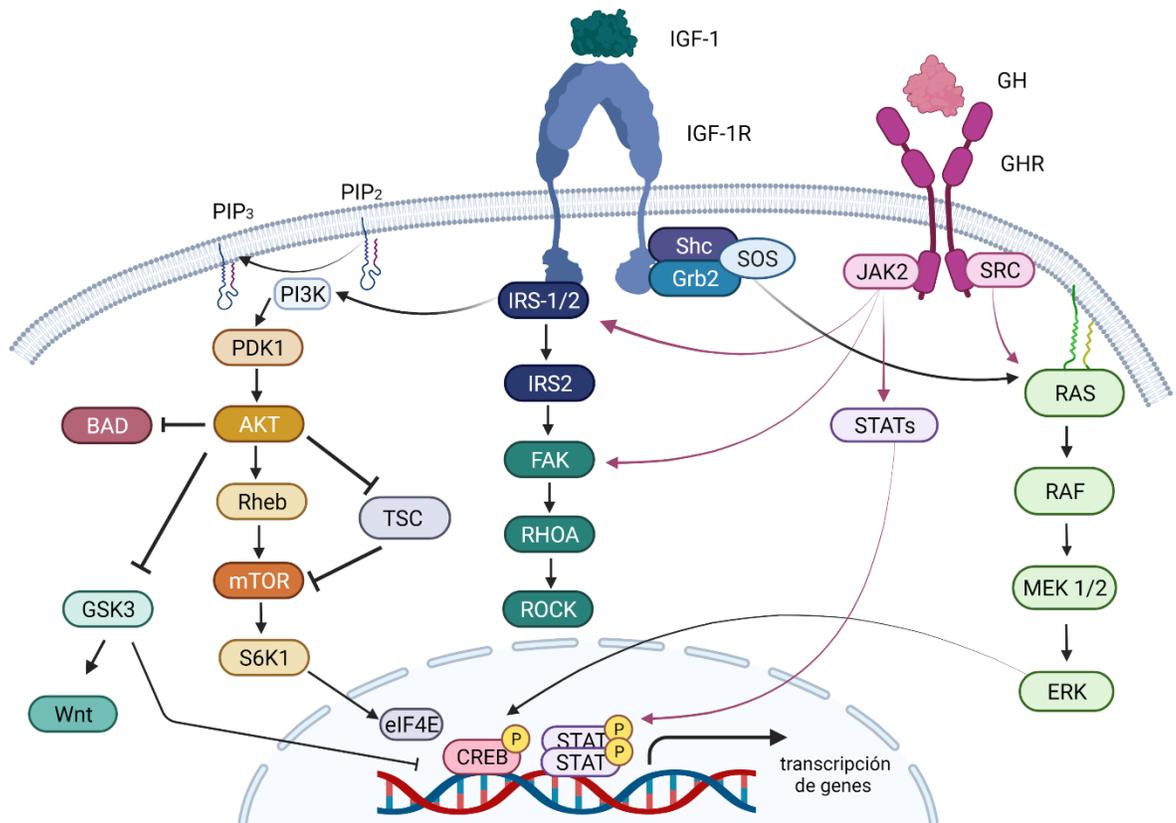
tumoral, inhibición de los procesos de apoptosis y reparación de ADN además de potenciar un fenotipo similar a las células madre cancerosas (CSC) (Lu *et al.*, 2019; Boguszewski y Boguszewski, 2019).

## **2.5 Receptores de factores de crecimiento: GHR, IGF-1R e IGF-2R**

El GHR, pertenece a la familia de receptores de citoquinas 1 y se encuentra como un homodímero de forma constitutiva en la membrana plasmática (Guevara-Aguirre *et al.*, 2018). Cuando se une la GH a su receptor GHR activa tres vías principales que son: GHR/JAK2/STATs, GHR/JAK2/SHC/MAPK y GHR/IRS/PI3K/Akt; estas dos últimas vías tienen importancia en la activación de receptor IGF-1R como se observa en la Figura 4 (Qiu *et al.*, 2017). Cuando el receptor activa con sus dominios tirosina a la cascada de señalización de JAK2, éstas a su vez reclutan varias proteínas STAT, que son fosforiladas por JAK2 en una tirosina. Las proteínas STAT fosforiladas se liberan luego del complejo receptor GHR/JAK2, y se forman dímeros para posteriormente translocarse al núcleo y acoplarse a sitios de unión en genes regulados por GH (Alberts *et al.*, 2015; Carter-Su y Schwartz 2016; Lu *et al.*, 2019).

La vía de señalización de IGF involucra a IGF-1, IGF-2, receptores de membrana IGF-1R, IGF-2R, receptores de insulina (INS-R), receptores híbridos con IGF-INS y seis proteínas de unión a IGF (IGFBP 1-6) (Majchrzak-Baczmańska y Malinowski, 2016; Wang *et al.*, 2018b).

Los receptores IGF-1R son proteínas transmembranales heterotetraméricas, que pertenecen a los receptores tirosina quinasa y están conformados por dos subunidades alfa y dos subunidades beta: la subunidad alfa se encuentra en la parte extracelular, la cual contiene la unión al ligando, mientras que la subunidad beta tiene el dominio tirosina quinasa. Por otro lado el IGF-2R no tiene este dominio quinasa y se ha reportado que se une a su ligando IGF-2 y lo internaliza para su degradación (Bowers *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018b).



Fuente: elaboración propia utilizando BioRender.com, con base en datos referenciados en la descripción de la Figura.

Figura 4. Esquematización de cascada de señalización que se activa por receptores GHR e IGF-1R. Siglas: factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), receptor de factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1R), sustrato del receptor de insulina 1/2 (IRS 1/2), fosfatidilinositol 3,4 bifosfato (PIP<sub>2</sub>), fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP<sub>3</sub>), fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), proteína quinasa 1 dependiente de fosfatidilinositolo (PDK1), Akt quinasa también denominada proteína quinasa B (AKT/PKB), GTPasa monomérica (Rheb), diana de rapamicina en mamífero por siglas en inglés *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR), proteínas activadoras de la actividad GTPasa de Rheb (Rheb-GAP), Rheb-GAP complejo de esclerosis tuberculosa por sus siglas en inglés *tuberous sclerosis complex* (TSC), inhibición de la vía de señalización de apoptosis (BAD), glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), activación de la vía de Wnt (Wnt), proteína ribosomal S6 quinasa 1 (S6K1), factor iniciador de la traducción eucariótico 4E (eIF-4E), quinasa de adhesión focal (FAK), GTPasa (RhoA), Rho quinasa (ROCK), receptor de hormona de crecimiento (GHR), hormona de crecimiento (GH), proteína tirosina quinasa citoplasmática (SRC), quinasa Janus (JAK), transductores de señal y activadores de transcripción (STAT), proteína adaptadora de unión del factor de crecimiento 2 (Grb2), factores de intercambio de nucleótidos de guanina de RAS (RAS-GEF), RAS – GEF (SOS por sus siglas en inglés *Son-of-sevenless*), GTPasa monomérica (RAS) y vía de

señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK que abarca RAF, MEK 1/2 y ERK). Imagen creada con BioRender.com, derechos y licencia de publicación número LY2436IQP4 (Alberts *et al.*, 2015; Kasprzak *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2018b; Blyth *et al.*, 2020).

Cuando los ligandos se unen al receptor IGF-1R se activa la actividad tirosina quinasa, reclutando los ligandos del receptor de insulina 1 ó 2 (IRS1 /2) y este activa a la vía PI3K-Akt-mTOR que desencadena y conecta con vías como Wnt, NFK $\beta$ , inhibición de apoptosis, y regulación de fase S del ciclo celular mediante GSK3, IKK $\alpha$ , TSC, BAD, ciclina D1 (Qiu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018b). Además, IRS también puede regular la movilidad celular mediante la modulación de expresión de integrinas a través de Rho A o la quinasa de adhesión focal (FAK) y Rho-quinasa (ROCK). El IGF-1R también recluta a Shc y esta quinasa interactúa con la proteína adaptadora de unión del factor de crecimiento 2 (Grb2) y con SOS que es una Ras-GEF, por lo que activa a RAS y la vía de señalización de MAP quinasas ERK/MAPK que median la proliferación y el crecimiento celular (Figura 4). Debido a su similitud IGF-1R puede ser activado por INS especialmente si está en altas concentraciones (Alberts *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018b).

De igual manera la sobreexpresión del IGF-1R promueve la angiogénesis y un fenotipo de célula madre cancerosa (CSC). Además, la activación del IGF-1R contribuye a la inhibición de la apoptosis, el crecimiento independiente del anclaje y la inflamación asociada al tumor, además que ya se ha descrito que esta vía ha sido implicada en metástasis (Nurwidya *et al.*, 2016).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La incidencia de cáncer va en aumento; éste es un problema de salud que afecta a 18 millones de personas en el mundo, donde el cáncer de pulmón considerando ambos sexos tiene el mayor número de diagnósticos y a nivel mundial es la principal causa de muerte debido a esta enfermedad. En México el cáncer de pulmón se encuentra en el sexto lugar de incidencia y en 2018 tuvo una tasa de mortalidad de 5.8 por cada 100 000 habitantes (GLOBOCAN, 2020).

El cáncer pulmonar, al igual que el de próstata e intestinal, puede presentar un fenotipo neuroendócrino, en el que las células tienen la capacidad de secretar péptidos, entre los que se pueden encontrar sinaptofisina, cromogranina A, enolasa específica de neurona, y la expresión de IGF-1; éste último se ha reportado en cáncer gastrointestinal neuroendócrino y cáncer de próstata (Armakolas *et al.*, 2015; Alexandraki *et al.*, 2017; Minami *et al.*, 2019). Por otra parte, en cáncer pulmonar se ha descrito que GH e IGF-1 modulan la supervivencia, crecimiento y metabolismo celular, características necesarias para el inicio de la enfermedad, además se ha reportado que estos factores de crecimiento, promueven la transición epitelio-mesénquima y un fenotipo de célula madre cancerosa, que son resistentes a tratamiento (Nurwidya *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2018; Boguszewski y Boguszewski, 2019).

El cáncer de pulmón neuroendócrino tiene pronóstico con poca esperanza de vida, debido a que se desarrolla de forma más agresiva. En 2015 Kuo y Krasnow reportaron la capacidad que presentan las células neuroendócrinas pulmonares de migrar, lo cual explica porque el cáncer derivado de estas células es altamente metastásico, por lo que resalta la importancia de determinar la presencia de este fenotipo. Sin embargo, no se ha evaluado la expresión de IGF-1, IGF-2, IGF-1R e IGF-2R en células cancerígenas de pulmón con fenotipo neuroendócrino (células de adenocarcinoma transdiferenciadas por agentes que elevan el AMPc).

El objetivo de este proyecto es determinar la expresión de IGF-1, IGF-2, IGF-1R e IGF-2R en células A549 neuroendócrinas (A549<sub>NED</sub>) transdiferenciadas por FSK e IBMX. De esta forma proponer como un potencial marcador diagnóstico del cáncer pulmonar con fenotipo neuroendócrino.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La transdiferenciación de células de adenocarcinoma pulmonar humano A549 por activación de CREB a un fenotipo neuroendócrino promoverá la expresión de IGF-1, IGF-2 e IGF-1R?

#### **5. HIPÓTESIS**

Las células de adenocarcinoma pulmonar humano neuroendócrinas A549<sub>NED</sub> expresan mayor cantidad de IGF-1 e IGF-2 y mantienen la expresión de IGF-1R tras la activación de CREB en la transdiferenciación.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

Determinar la expresión de los factores de crecimiento similar a insulina tipo 1 y 2 (IGF-1 e IGF-2) y el receptor de IGF-1 (IGF-1R) en las células A549 neuroendócrinas (A549<sub>NED</sub>) inducidas por la activación de CREB.

### **6.2 Objetivos específicos**

- Inducir el fenotipo neuroendócrino (A549<sub>NED</sub>) a partir de la línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano A549 mediante IBMX y FSK.
- Evaluar la presencia de marcadores neuroendócrinos (ASCL1, Syp, y CgA) en A549<sub>NED</sub> por medio de RT-PCR y comparar la expresión con células no transdiferenciadas A549.
- Determinar la activación de CREB en células A549<sub>NED</sub> por expresión de BDNF como uno de sus blancos moleculares.
- Evaluar la expresión de IGF-1, IGF-2 y el IGF-1R en células A549<sub>NED</sub> y comparar con células no transdiferenciadas A549 por medio de RT-PCR.
- Determinar la expresión de CgA e IGF-1R en células A549<sub>NED</sub> y comparar con células no transdiferenciadas A549 mediante citometría de flujo.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Materiales y equipos**

Para la manipulación del cultivo celular se empleó la campana de flujo laminar clase II (LABCONCO), incubadora (Thermofisher, Series II Water Jacket CO<sub>2</sub>), cajas p100 (NEST), cajas p6 (NEST), p12 (NEST), p24 (NEST). La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó con el Nanodrop-1000 (Thermo Fisher). Termociclador (Bio-Rad), citómetro de flujo Attune NxT (Life Technologies), fuente de carga (Bio-Rad), cámara de electroforesis (Bio-Rad) y micropipetas (GIBSON).

### **7.2 Reactivos**

Se emplearon los siguientes reactivos DMEM (Gibco), suero fetal bovino (Biowest), solución de tripsina- EDTA 0.25 % (Sigma), versene (Gibco), 3-Isobutil-1-metilxantina (Sigma), forskolina (Med Chem Express), azul tripano (Sigma), Kit Direct-zol RNA miniprep (Zymo Research), First strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher), GoTaq Green master Mix (Promega), agarosa gel (Sigma), TAE 50X (Invitrogen), BenchTop 100 bp DNA Ladder (Promega). Para citometría de flujo se ocuparon: Cytotfix/Cytoperm (BD biosciences), Perm/ Wash (BD biosciences), Ab-CgA-PE (BD biosciences, Ab-CgA-PE-Ratón Clona S21-537) y Ab-IGF-1R-PE (BD biosciences, Ab-CD222-PE Ratón Clona 1H7).

## 7.3 Métodos

### 7.3.1 Cultivo celular

Las células de adenocarcinoma pulmonar A549 se cultivaron en cajas p6 y p24 con medio DMEM (GIBCO), suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina. Los cultivos de A549 se mantuvieron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> en ambiente húmedo dentro de la incubadora. Se realizó el cambio de medio de acuerdo a los requerimientos del crecimiento celular. Cuando los cultivos alcanzaron 80 % de confluencia, se realizó el pase celular haciendo lavados de amortiguador salino de fosfatos (PBS) y se incubó con tripsina-EDTA 0.25 % durante 5 minutos a 37 °C en ambiente húmedo con 5 % CO<sub>2</sub> para despegar las células, posteriormente se disgregaron por pipeteo para su posterior propagación o conteo celular.

### 7.3.2 Conteo celular y proliferación

Las células se despegaron de una placa p100 con 2 mL de tripsina-EDTA 0.25 % y se agregó un volumen igual de DMEM completo, se recolectó la suspensión en un tubo con fondo cónico para centrífuga de 15 mL (Nest) y se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos a 37 °C. Para el conteo celular se tomaron 100 µL de suspensión de células, se agregaron 400 µL de azul de tripano al 0.4 % (Strober, 2015). Se contaron células totales en la cámara de Neubauer y se calculó la concentración celular con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{células totales}}{\text{mL}} = (\text{Promedio células por cuadrante}) (\text{factor de dilución})(10,000).$$

La proliferación se realizó en cajas de p24 donde se inocularon 5x10<sup>4</sup> células en cada pozo y se realizó el conteo cada 24 h. La tasa de proliferación se normalizó con respecto al control.

### **7.3.3 Transdiferenciación neuroendócrina inducida por agentes que incrementan el AMPc intracelular**

Las células A549 de adenocarcinoma de pulmón humano se sembraron ( $5 \times 10^5$  células) en placas de 24 pozos y se mantuvieron en condiciones de cultivo durante 24 h. Los pozos se lavaron con PBS y posteriormente se trataron con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, 0.25 mM) y forskolina (FSK, 0.25 mM) en medio DMEM sin SFB. Las tasas de proliferación y cambios morfológicos de las células se evaluaron mediante microscopía óptica a las 24, 48, 72, 96, 120 h. Las células control y tratadas se recolectaron para analizar la expresión de los marcadores neuroendócrinos y los factores de crecimiento contemplados en este estudio (Cuadro 4) (Mendieta *et al.*, 2018).

### **7.3.4 Extracción de ARN y síntesis de ADNc por RT-PCR**

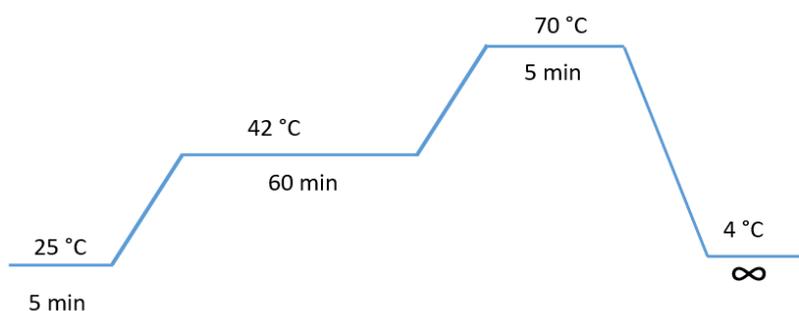
Se tomó un volumen de medio con células suspendidas donde la concentración celular fuese  $1 \times 10^6$  cel/mL para extraer ARN con el Kit Direct-zol RNA miniprep (Zymo Research) y se siguieron las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Una vez que se obtuvo el ARN total se cuantificaron los ng/ $\mu$ L con el Nanodrop (Thermo Fisher) y se evaluó la pureza de las muestras acuerdo a la relación de absorbancia, 260/280 nm donde 260 nm corresponde a la absorbancia máxima de los ácidos nucleicos y 280 nm de las proteínas. Únicamente se continuó con muestras que presentaran un cociente de 1.8 a 2. Posteriormente, se realizó reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) para sintetizar el ADNc por medio del kit First Strand DNAc Synthesis (Thermo Fisher). Para la reacción se utilizaron los siguientes reactivos que se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Protocolo para preparación del tubo de reacción de retrotranscripción para síntesis de ADNc.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
Muestra de ARN	Agregar volumen necesario para 1 µg
Primer oligo (dT) <sub>18</sub> 100 µM	1 µL
Primer de hexámeros aleatorios 100 µM	1 µL
Amortiguador de reacción 5 X Tris- HCl (pH 8.3) 250 mM KCl 250 mM, MgCl <sub>2</sub> 20 mM DTT 50 mM	4 µL
Inhibidor de ARNasa (20 U/µL)	1 µL
dNTP's 10 mM	2 µL
Transcriptasa Reversa M-MLV (200 U/µL)	1 µL
H <sub>2</sub> O	Ajustar volumen para completar el volumen final
	Volumen final: 20 µL

Fuente: Thermo Fisher Scientific, 2013.

Se realizó la reacción de síntesis de ADNc incubando durante 5 minutos a 25 °C, posteriormente 60 minutos a 42 °C, al terminar la reacción de retrotranscripción se elevó la temperatura a 70 °C durante 5 minutos. Al finalizar, se almacenó a -70 °C para su posterior uso (Figura 5).



Fuente: elaboración propia.

Figura 5. Condiciones de ciclo que se programó en el termociclador para realizar la síntesis de ADNc.

### 7.3.5 PCR para identificación de marcadores neuroendócrinos y factores de crecimiento similares a insulina

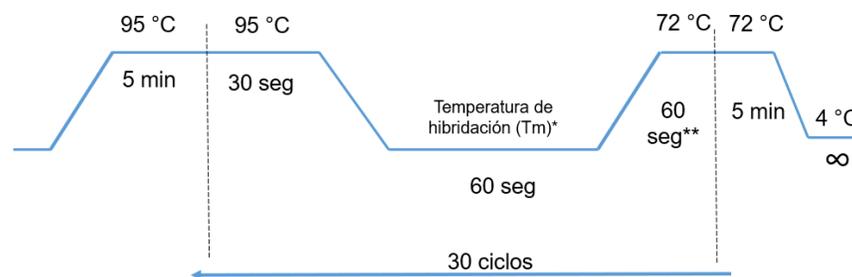
Del ADNc se realizó la técnica de una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con las condiciones que se muestran en la Figura 6, de acuerdo a protocolo (Cuadro 3) del Kit GoTaq Green Master Mix (Promega). Se utilizaron los oligonucleótidos del Cuadro 4 con la finalidad de detectar la expresión de marcadores neuroendócrinos (CgA y Syp), factores de transcripción y factores proneuronales (ASCL1 y BDNF) y factores de crecimiento con sus receptores (IGF-1, IGF-2, IGF-1R e IGF-2R).

Cuadro 3. Protocolo para preparación del tubo de reacción de PCR para amplificación de genes de interés.

Reactivo	Volumen
Muestra de ADNc	Volumen necesario para 3 µg
Primer Forward 10 µM	1 µL
Primer Reverse 10 µM	1 µL

GoTaq Green master Mix 2 X (GoTaq polimerasa, amortiguador de reacción pH 8.5, dNTPs 400 µM y MgCl <sub>2</sub> 3 mM)	12.5 µL
H <sub>2</sub> O	Ajustar volumen para completar el volumen final
	Volumen final: 25 µL

Fuente: Promega, 2021.



Fuente: elaboración propia.

Figura 6. Condiciones de ciclo que se programó en el termociclador para realizar la amplificación de genes de interés. \* La temperatura de hibridación (T<sub>m</sub>) para cada oligonucleótido (*primers*) fue de 55 °C. \*\*El tiempo de elongación se programó de acuerdo al tamaño del amplicón, se requiere 30 segundos por cada 500 pb de ADN (Kuslich *et al.*, 2018).

Cuadro 4. Oligonucleótidos que se emplearon para identificar marcadores neuroendócrinos, factores de crecimiento similares a insulina y controles de genes constitutivos.

Gen	Secuencia de primer	T <sub>m</sub> °C teórica	T <sub>m</sub> °C experimental	Tamaño de amplicón
Syp (Fwd)	GTGCTGCAATGGGTCTTCG	59.50	55	349
Syp (Rev)	CCGTGGCCAGAAAGTCCAG	60.67		
CgA (Fwd)	AACCGCAGACCAGAGGACCA	63.30	55	102

CgA (Rev)	GTCTCAGCCCCGCCGTAGT	63.95		
ASCL1 (Fwd)	CAGCGCCCAAGCAAGTCAAGC	62.34	55	374
ASCL1 (Rev)	GGCCATGGAGTTCAAGTCGTT	61.38		
BDNF (Fwd)	GCTGCAGAACAGAAGGAGTACA	60.29	55	412
BDNF (Rev)	GTCCTCATCCAACAGCTCTTCTA TC	60.74		
IGF-1 (Fwd)	GCTCTTCAGTTCGTGTGTGGA	60.54	55	71
IGF-1 (Rev)	CGACTGCTGGAGCCATACC	60.23		
IGF-1R (Fwd)	TCCACATCCTGCTCATCTCC	58.87	55	669
IGF-1R (Rev)	AGAAGTCACGGTCCACACAG	58.49		
IGF-2 (Fwd)	ACACCCTCCAGTTCGTCTGT	60.76	55	212
IGF-2 (Rev)	GGGGTATCTGGGGAAGTTGT	58.70		
IGF-2R (Fwd)	TCAACATCTGTGGAAGTGTGGA	59.56	55	428
IGF-2R (Rev)	GAATAGAGAAGTGTCGGATCG GAGTC	64.16		
GAPDH (Fwd)	CCACTCCTCCACCTTTGACG	59.96	55	178
GAPDH (Rev)	TCCTCTTGTGCTCTTGCTGG	59.96		

Siglas: sinaptofisina (Syp), cromogranina (CgA), factor de transcripción achaete-scute homolog 1 (ASCL1), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1), receptor de factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1R), factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGF-2), receptor de factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGF-2R), gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH), Fwd – sentido (*forward*) y Rev – antisentido (*reverse*).

### **7.3.6 Electroforesis**

Una vez que se obtuvieron los productos de PCR de los oligonucleótidos que se muestran en la Cuadro 4, se procedió a la separación de los amplicones por electroforesis con gel de agarosa al 2 % en TAE, el cual permitió separar las bandas por tamaño y fue confirmado por la escalera de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Promega). Las condiciones en las que se realizó la electroforesis fueron: 80 Volts durante 45 minutos. Después, se tiñó el gel de agarosa con bromuro de etidio 2 µg/mL durante 30 minutos y se visualizaron en un transiluminador con luz UV. Se digitalizó el gel y se analizó por densitometría la intensidad de cada banda con GAPDH como gen de referencia con el software Image Lab (Bio-Rad).

### **7.3.7 Citometría de flujo para determinación de marcadores neuroendócrinos y receptores de membrana**

Por citometría de flujo se detectaron el marcador neuroendócrino intracelular cromogranina A y el receptor de membrana IGF-1R.

Para la detección de moléculas membranales en células A549<sub>NED</sub> y no transdiferenciadas se despegaron removiendo el medio de la caja p12, después se lavaron 2 veces las células con PBS, y posteriormente se agregaron 500 µL versene - EDTA 1:5000 (Gibco). Se dejaron incubando por 15 minutos, a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> en ambiente húmedo y al finalizar se adicionaron 500 µL de PBS. La suspensión de células se homogenizó por pipeteo para disgregar completamente. Todo el volumen del pozo se colocó en un tubo para microcentrífuga y se centrifugó por 5 minutos a 2000 rpm, se descartó el sobrenadante y la pastilla celular se lavó con 500 µL de buffer de citometría, después de centrifugar, el sobrenadante se descartó. La pastilla celular se resuspendió en 100 µL buffer de citometría específico para el citómetro. Posteriormente, se agregaron 20 µL del anticuerpo monoclonal contra IGF-1R acoplado a ficoeritrina (BD biosciences, Ab-CD222-PE de ratón, clona 1H7) y se dejaron incubando por 30 minutos en oscuridad a 4 °C. Se lavaron

con buffer de citometría, después del lavado se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Se resuspendieron en 500 µL de buffer de citometría.

Para moléculas intracelulares después de despegar la monocapa de células de la placa p12, se lavó la suspensión de células con buffer de citometría, consecutivamente, se centrifugaron a 2000 rpm por 5 minutos y se resuspendió la pastilla celular en 100 µL del buffer de citometría. Posteriormente se fijaron y permeabilizaron las células, para ello se agregaron 100 µL de la solución Cytifix/Cytoperm (BD Biosciences) y se dejaron a 4 °C por 20 minutos. Una vez que se incubaron, se centrifugó la suspensión celular a 2000 rpm por 5 minutos a 4 °C y se lavaron con 250 µL Perm Wash (BD biosciences). Se resuspendió la pastilla celular en 45 µL Perm Wash y se agregaron 5 µL el marcaje con el anticuerpo monoclonal contra cromogranina A acoplado a ficoeritrina (BD Biosciences, Ab-CgA-PE de ratón clona S21-537) y se incubó por 30 minutos en oscuridad a 4 °C.

Después del marcaje la suspensión celular se lavó con 250 µL de Perm Wash, después del lavado se centrifugaron las células a 2000 rpm por 5 minutos a 4 °C y se resuspendieron en 500 µL de buffer de citometría. Cada ensayo se realizó por triplicado y las muestras se leyeron en el citómetro de flujo Attune NxT (Life Technologies).

#### **7.4 Análisis estadístico**

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media) de mediciones por triplicado. Se analizaron los valores por *t-Student*, donde todas las diferencias con una  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativas. Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico GraphPad Prism 8.

## **7.5 Manejo de residuos**

Los residuos generados de cultivo celular se desecharon en bolsas de polietileno de color rojo de RPBI (Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos), que fueron almacenados para su recolección y transporte por la empresa ECOLSERVI Industrial; lo anterior se llevó a cabo de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Cambios en la morfología y proliferación de células A549 con fenotipo neuroendócrino

En esta investigación se realizó la transdiferenciación al fenotipo neuroendócrino de células de adenocarcinoma pulmonar A549 mediante el tratamiento con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc. Posteriormente, se evaluó su proliferación cada 24 h por medio de conteo en un hematocitómetro y azul de tripano, donde las células viables se encuentran sin teñir debido a la integridad de la membrana. En la Figura 7, se observa la tasa proliferación de las células a lo largo del tiempo, donde las A549 con tratamiento (A549<sub>NED</sub>) dejaron de proliferar a las 24 h que se les agregó la FSK e IBMX. El último día que se evaluó su proliferación se redujo un 50 %, por su parte las células A549 con medio privado de suero fetal bovino (SFB) siguieron proliferando hasta las 48 h.

Adicionalmente, las células fueron analizadas mediante microfotografías cada 24 h para comparar los cambios morfológicos que presentaban las A549<sub>NED</sub> respecto a las A549 control (Figura 8). Lo que se encontró fue que desde las 24 h de tratamiento se presentaron cambios morfológicos que asemejan a las proyecciones alargadas tipo neurita y cuerpos poligonales similares al soma de una neurona como se aprecia en la Figura 9. Estos cambios se mantuvieron a lo largo del tiempo en el grupo A549<sub>NED</sub> y la confluencia en las células con tratamiento fue disminuyendo como se registró en la curva de proliferación, mientras que el grupo control mantuvo una morfología poligonal como se observa en la Figura 8.

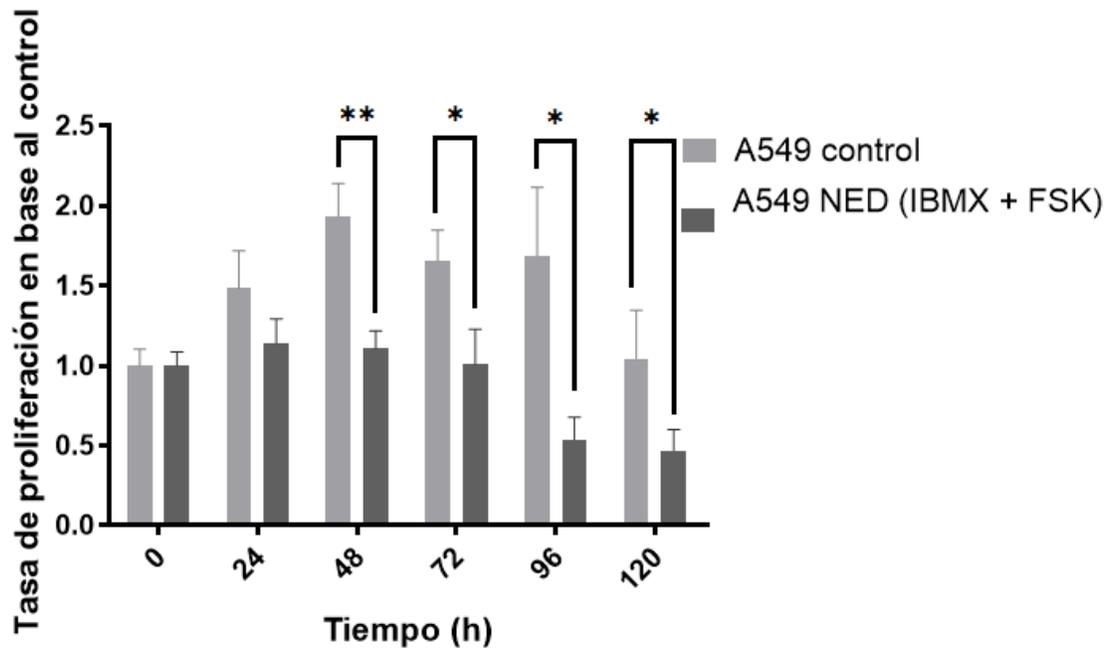


Figura 7. Gráfico de proliferación de células A549 tratadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc para inducir transdiferenciación neuroendócrina. Las células se trataron durante 120 h con IBMX + FSK. Se analizó con *t*-Student, y se consideró una diferencia significativa con \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  comparado con el control. IBMX: isobutilmetilxantina, y FSK: forskolina.

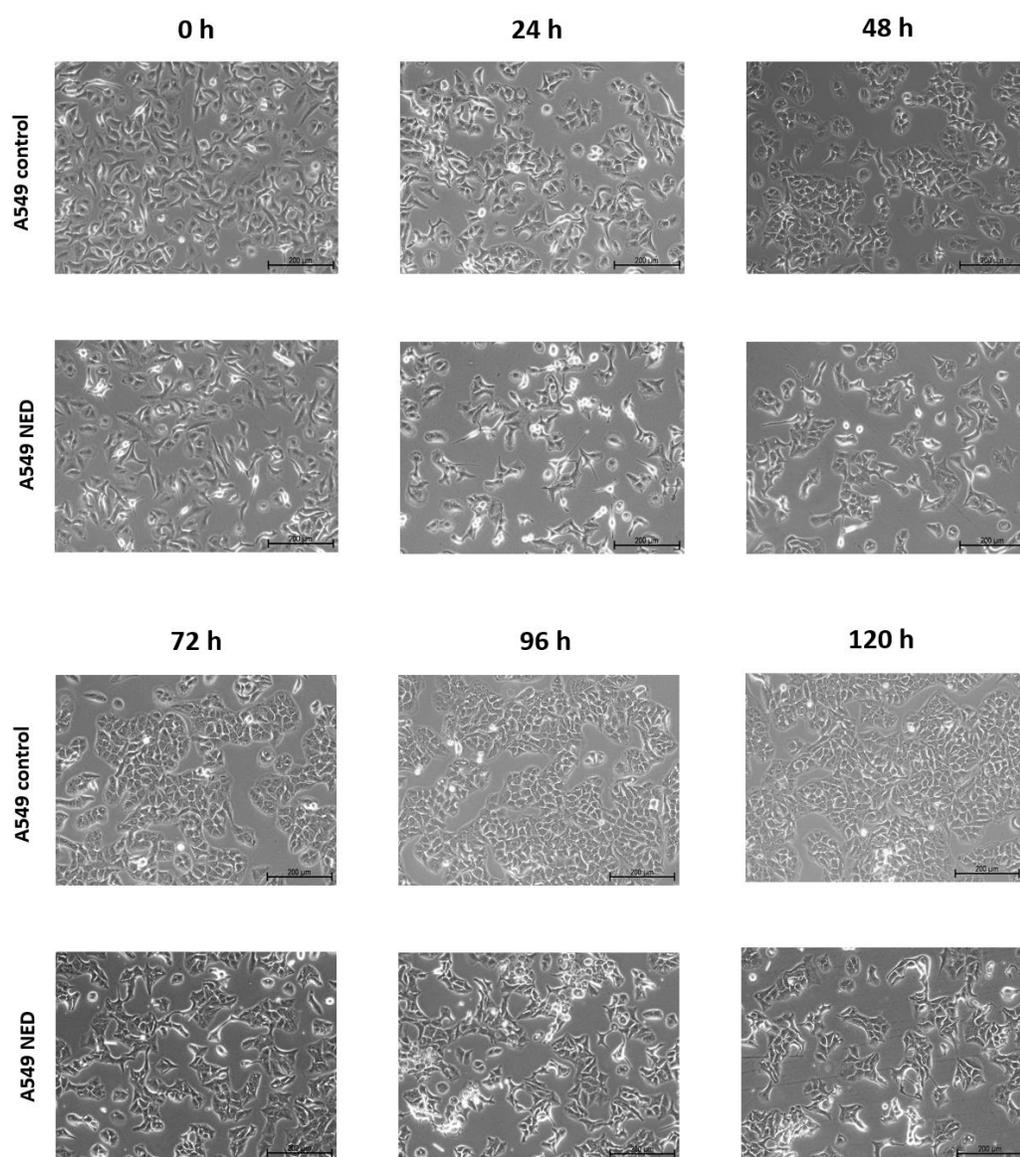


Figura 8. Fotografías mediante microscopía que muestra cambios en la morfología de las células A549 tratadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc para inducir transdiferenciación neuroendócrina. Las células se observaron durante 120 h después del tratamiento (IBMX + FSK) y se compararon contra el control. Barras 200  $\mu\text{m}$  con objetivo 10 X. IBMX: isobutilmetilxantina, y FSK: forskolina.

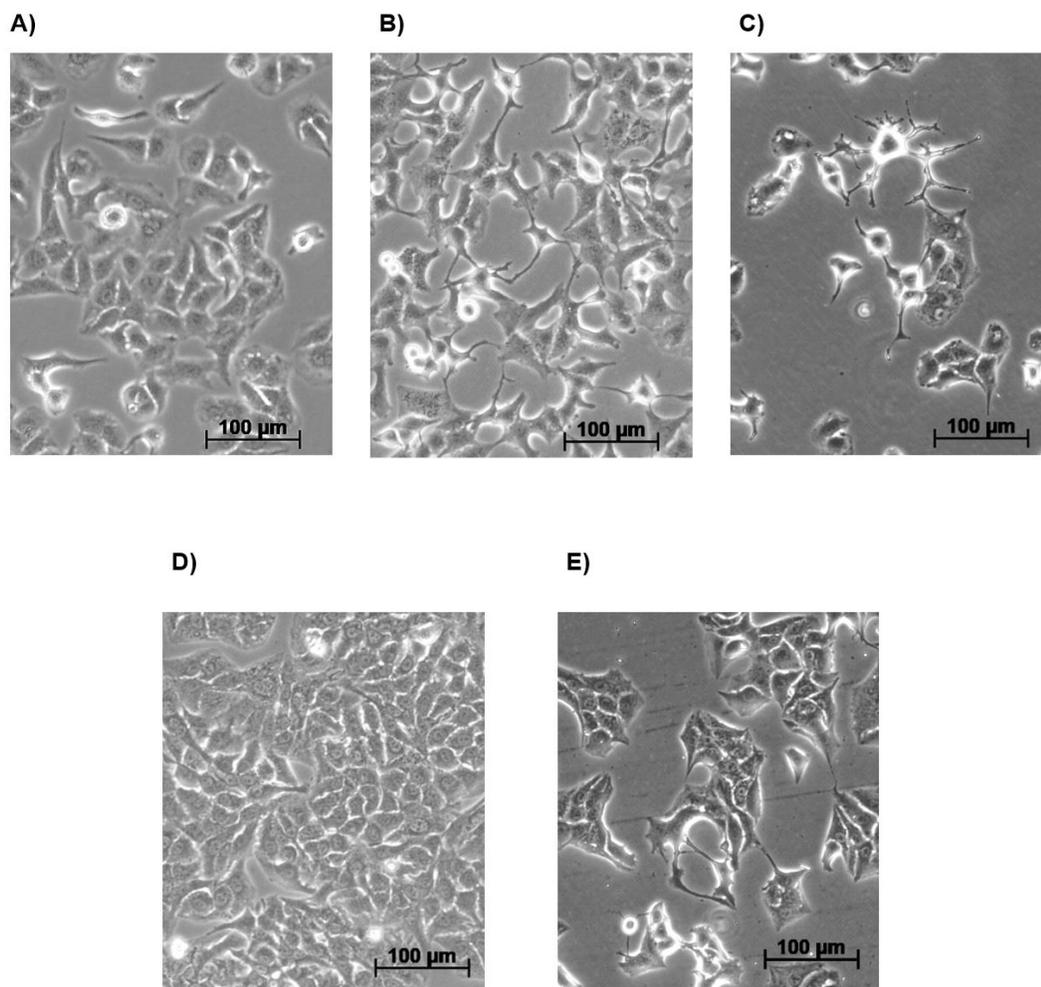


Figura 9. Microfotografías donde se muestran los cambios morfológicos de las células A549 con transdiferenciación neuroendócrina a las 24 y 120 h. A) A549 control a las 24 h de tratamiento. B y C) A549<sub>NED</sub> a las 24 h de tratamiento. D) A549 control a las 120 h de tratamiento. E) A549<sub>NED</sub> a las 120 h de tratamiento con IBMX + FSK, las células presentan morfología similar al soma de neurona, dendritas y proyecciones tipo neuritas. Barras 100 μm con objetivo 10 X.

## **8.2 Evaluación de expresión de marcadores neuroendócrinos en células A549<sub>NED</sub>**

Con la finalidad de evaluar si se realizó la transdiferenciación neuroendócrina de las células A549 por medio del tratamiento con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc, se analizó la expresión de ARNm por RT-PCR de los siguientes marcadores neuroendócrinos: el factor de transcripción Achaete-scute homolog 1 (ASCL1), la sinaptofisina (Syp) y la cromogranina A (CgA). El ASCL1 se expresó un 180 % más en células A549<sub>NED</sub> respecto al control, siendo un cambio significativo ( $p < 0.05$ ), como se muestra en la Figura 10, este factor de transcripción proneural es relevante ya que promueve la transcripción de genes que dirigen la neurogénesis y marcadores característicos de la diferenciación neuroendócrina en pulmón.

Entre los marcadores neuroendócrinos que se analizaron fue la glicoproteína Syp que se encuentra en la membrana de vesículas y gránulos secretores, este marcador se expresó 48 % más en el grupo de células A549<sub>NED</sub> respecto a su control lo que representó un cambio significativo, como se puede apreciar en la Figura 12.

Además, la CgA que es la granina más abundante en los tumores neuroendócrinos, en las células expuestas a tratamiento con FSK + IBMX presentaron un 246 % mayor expresión significativa respecto al control, como se observa en la Figura 12. Y se corroboró con la presencia de la proteína CgA por citometría de flujo, esta técnica permitió analizar la población de células positivas para este último marcador neuroendócrino donde se obtuvo un incremento del 11 % respecto a A549 control siendo una diferencia significativa (Figura 13).

De esta forma, los resultados sugieren que los agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc inducen la producción de ARNm de factores de transcripción (ASCL1) y marcadores neuroendócrinos (Syp y CgA). Una vez que se analizó el cambio de morfología celular y expresión de los marcadores NED se

consideró como indicadores que corroboran que se realizó la transdiferenciación neuroendócrina.

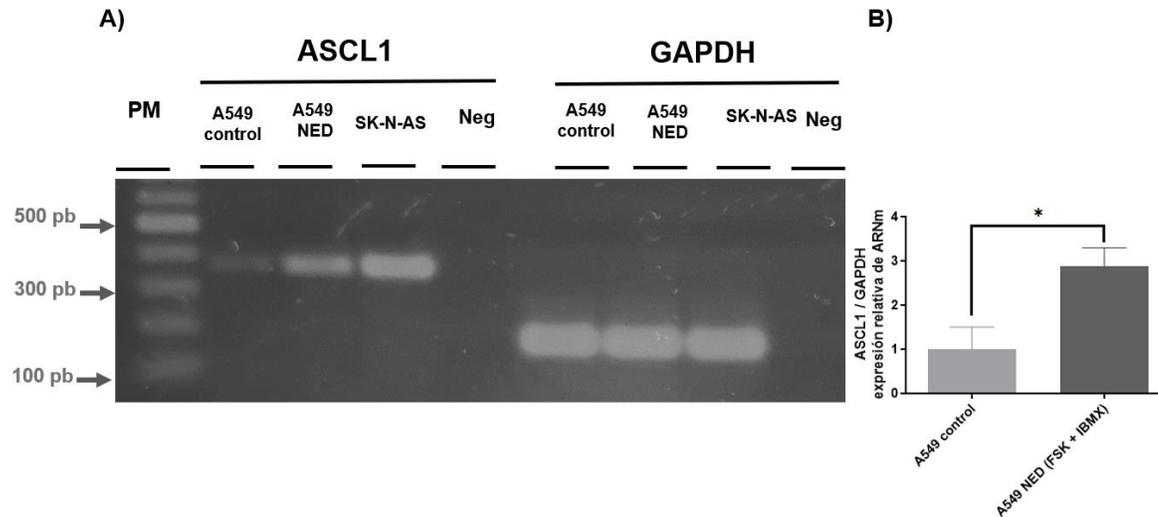


Figura 10. Nivel de expresión del ARNm del factor de transcripción Achaete-scute homolog 1 (ASCL1) en las células A549 transdiferenciadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc. A) Gel de agarosa al 2 % que muestra las bandas correspondientes al amplicón del factor de transcripción Achaete-scute homolog 1 (ASCL1) con una longitud de 374 pb y las bandas del amplicón de gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con un tamaño de 178 pb. En los carriles se muestra: escalera de peso molecular (PM), células A549 sin SFB (A549 control), células A549 tratadas con IBMX + FSK para realizar la transdiferenciación neuroendócrina (A549<sub>NED</sub>), control positivo con células de neuroblastoma (SK-N-AS) y control negativo (Neg). B) Gráfica que representa la cuantificación por densitometría de la RT-PCR para detectar la expresión de ASCL1, donde se obtuvo una diferencia significativa respecto al control. Los resultados fueron normalizados con los valores del ARNm de GAPDH y se muestran como la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media) de mediciones por triplicado. Se consideró una diferencia significativa con  $*p < 0.05$ .

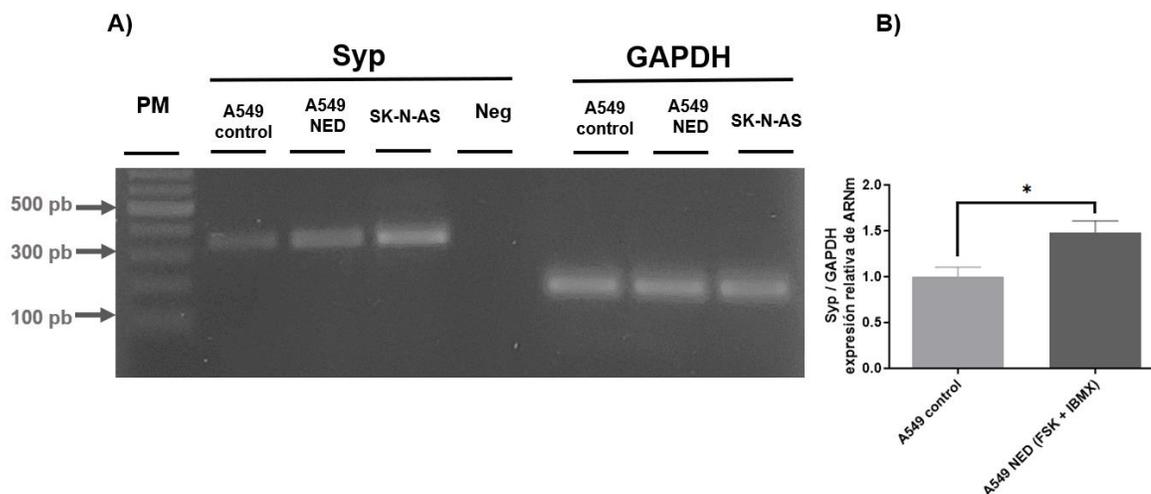


Figura 11. Nivel de expresión del ARNm del marcador neuroendócrino sinaptofisina en las células A549 transdiferenciadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc. A) Gel de agarosa al 2 % que muestra las bandas correspondientes al amplicón de sinaptofisina (Syp) con una longitud de 349 pb y las bandas del amplicón de gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con un tamaño de 178 pb. En los carriles se muestra: escalera de peso molecular (PM), células A549 sin SFB (A549 control), células A549 tratadas con IBMX + FSK para realizar la transdiferenciación neuroendócrina (A549<sub>NED</sub>), control positivo con células de neuroblastoma (SK-N-AS) y control negativo (Neg). B) Gráfica que representa la cuantificación por densitometría de la RT-PCR para detectar la expresión de Syp, donde se obtuvo una diferencia significativa respecto al control. Los resultados fueron normalizados con los valores del ARNm de GAPDH y se muestran como la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media) de mediciones por triplicado. Se consideró una diferencia significativa con  $*p < 0.05$ .

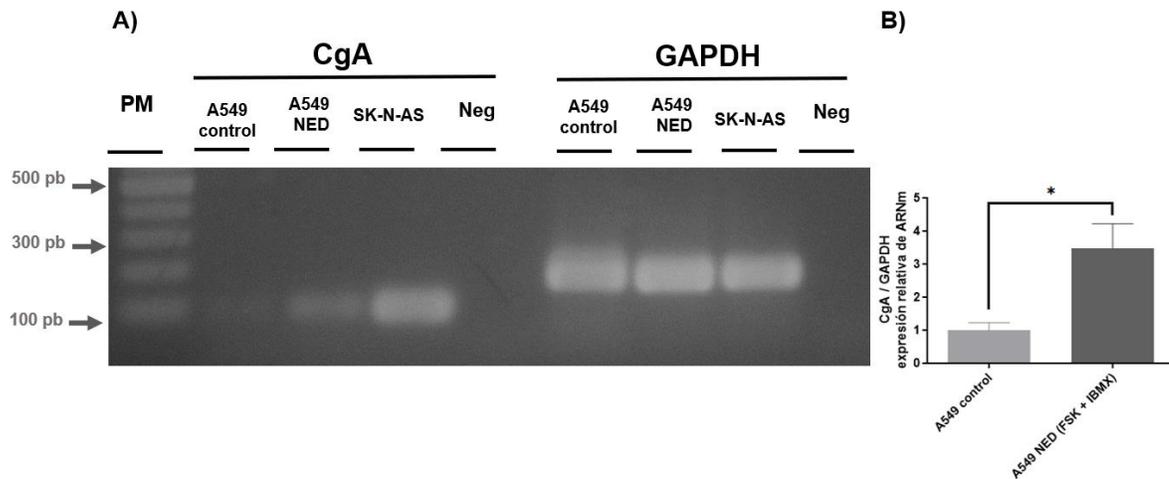


Figura 12. Nivel de expresión del ARNm del marcador neuroendócrino cromogranina A en las células A549 transdiferenciadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc. A) Gel de agarosa al 2 % que muestra las bandas correspondientes al amplicón de cromogranina A (CgA) con una longitud de 102 pb y las bandas del amplicón de gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con un tamaño de 178 pb. En los carriles se muestra: escalera de peso molecular (PM), células A549 sin SFB (A549 control), células A549 tratadas con IBMX + FSK para realizar la transdiferenciación neuroendócrina (A549<sub>NED</sub>), control positivo con células de neuroblastoma (SK-N-AS) y control negativo (Neg). B) Gráfica que representa la cuantificación por densitometría de la RT-PCR para detectar la expresión de CgA, donde se obtuvo una diferencia significativa respecto al control. Los resultados fueron normalizados con los valores del ARNm de GAPDH y se muestran como la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media) de mediciones por triplicado. Se consideró una diferencia significativa con  $*p < 0.05$ .

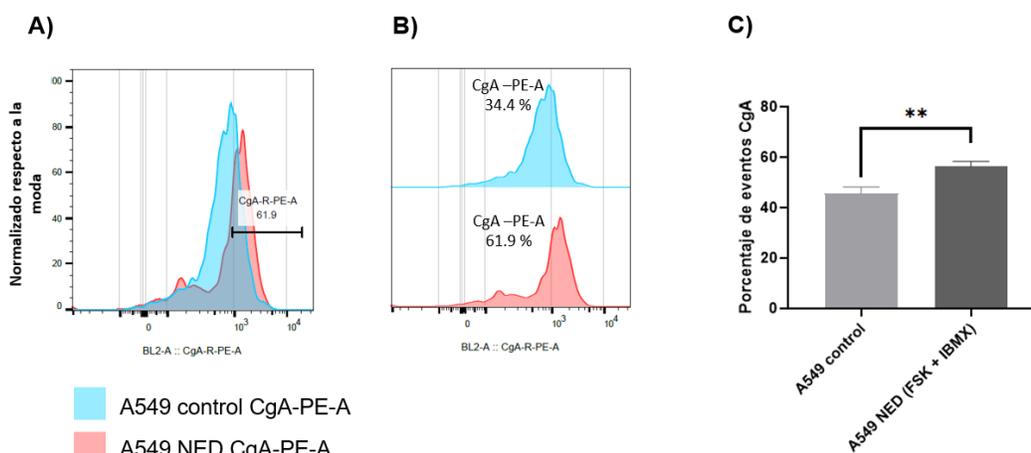


Figura 13. Incremento del marcador neuroendócrino: cromogranina (CgA) en células A549 transdiferenciadas con agentes que elevan la concentración intracelular de AMPc. A) Empalme de histogramas de población positiva a CgA en células A549 sin SFB (A549 control) y A549 tratadas con IBMX + FSK para realizar la transdiferenciación neuroendócrina (A549<sub>NED</sub>). B) Comparación individual de histogramas de población positiva para CgA en células A549 control y A549<sub>NED</sub>. C) Gráfica que representa la población positiva para la proteína CgA detectado por citometría de flujo en el grupo de células A549 control y A549<sub>NED</sub>. Se analizó con *t*-Student, y se consideró una diferencia significativa con \**p* < 0.05 y \*\**p* < 0.01 comparado con el control.

### 8.3 Comprobación de activación de la vía de señalización de CREB

Debido a que se empleó el tratamiento con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc para transdiferenciar las células, se decidió comprobar que la vía de AMPc-PKA-CREB se encontraba activa. Para ello, se evaluó la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF por sus siglas en *inglés brain-derived neurotrophic factor*), el cual es transcrito cuando se activa el factor de transcripción CREB. El BDNF tuvo un incremento significativo (38 %) en su expresión, por lo que se consideró que a las 120 h de tratamiento FSK e IBMX seguían produciendo efecto en las células.

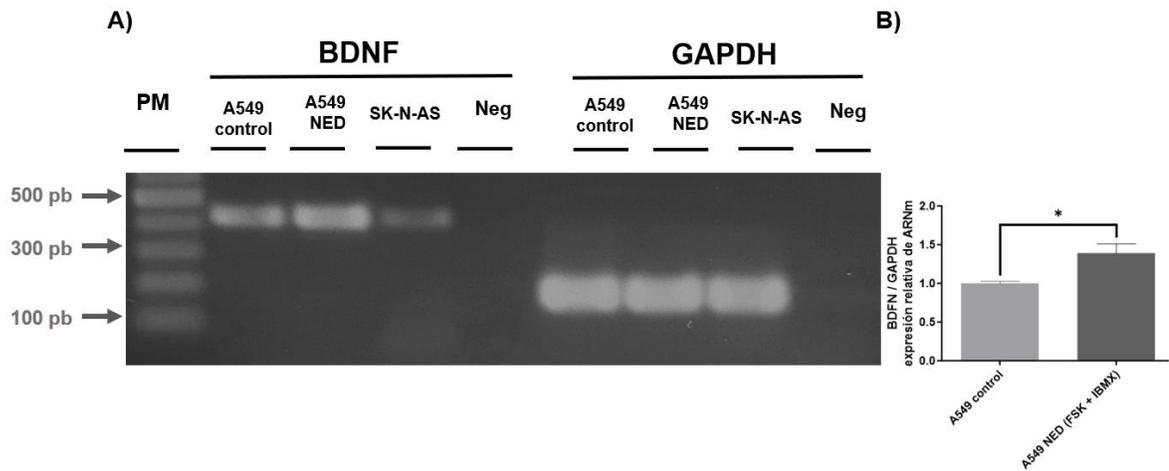


Figura 14. Nivel de expresión del ARNm del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en las células A549 transdiferenciadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc. A) Gel de agarosa al 2 % que muestra las bandas correspondientes al amplicón del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF por sus siglas en *inglés brain-derived neurotrophic factor*) con una longitud de 412 pb y las bandas del amplicón de gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con un tamaño de 178 pb. En los carriles se muestra: escalera de peso molecular (PM), células A549 sin SFB (A549 control), células A549 tratadas con IBMX + FSK para realizar la transdiferenciación neuroendócrina (A549<sub>NED</sub>), control positivo con células de neuroblastoma (SK-N-AS) y control negativo (Neg). B) Gráfica que representa la cuantificación por densitometría de la RT-PCR para detectar la expresión de BDNF, donde se obtuvo una diferencia significativa respecto al control. Los resultados fueron normalizados con los valores del ARNm de GAPDH y se muestran como la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media) de mediciones por triplicado. Se consideró una diferencia significativa con  $*p < 0.05$ .

#### 8.4 Expresión de factores de crecimiento similares a insulina y sus receptores en células A549<sub>NED</sub>

Puesto que el cáncer de pulmón con fenotipo neuroendócrino suele producir péptidos y sobreexpresar marcadores NED se decidió evaluar la expresión de factores de crecimiento similar a insulina (IGF-1 e IGF-2) y sus receptores (IGF-1R e IGF-2R). El IGF-1 mantuvo una expresión sin diferencia significativa en células control y con tratamiento (Figura 15), mientras que el IGF-2 disminuyó de forma significativa un 60 % su expresión en células A549<sub>NED</sub> con respecto al control como

se observa en la Figura 16. En cambio, el receptor del factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGF-2R) no mostró diferencia significativa en el nivel de expresión de mRNA relativa (Figura 19). Por su parte, el ARNm del receptor IGF-1R tampoco presentó un cambio significativo de expresión comparado con el control (Figura 17), de igual forma, al analizar la población de células positiva para la presencia del IGF-1R en membrana por citometría de flujo se corroboró que las células A549<sub>NED</sub> no presentó un cambio significativo respecto al control como se observa en la Figura 18.

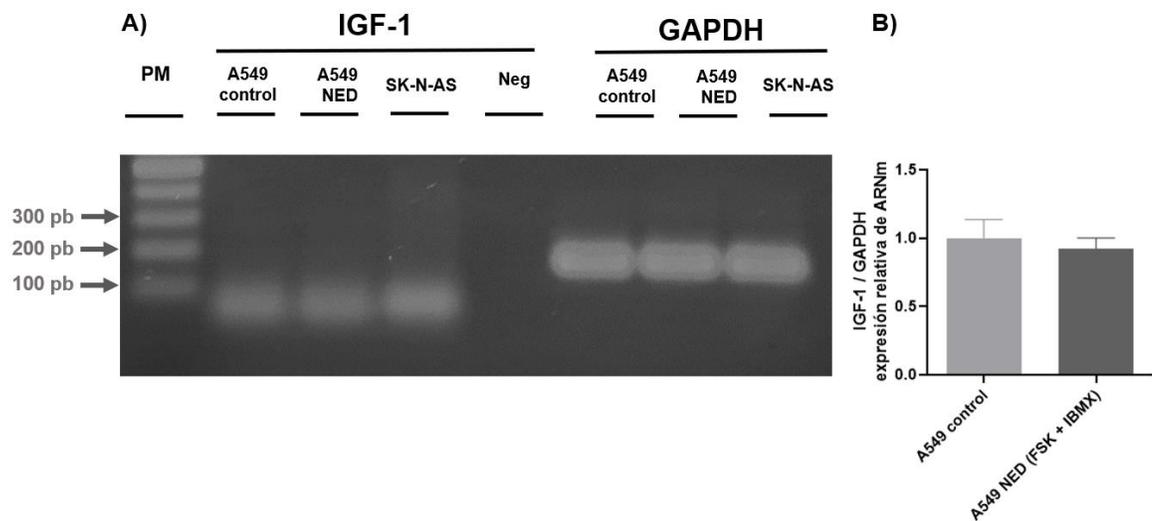


Figura 15. Niveles de expresión del ARNm del factor de crecimiento similar a insulina 1 en las células A549 transdiferenciadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc. A) El gel de agarosa que muestra la banda correspondiente al amplicón del factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1) con una longitud de 71 pb y la banda del amplicón de gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con tamaño de 178 pb. En los carriles se muestra: escalera de peso molecular (PM), células A549 sin SFB (A549 control), células A549 tratadas con IBMX + FSK para realizar la transdiferenciación neuroendócrina (A549<sub>NED</sub>), control positivo con células de neuroblastoma (SK-N-AS), y control negativo (Neg). B) Gráfica que representa la cuantificación densitométrica de la RT-PCR para detectar el ARNm de IGF-1. Los resultados fueron normalizados con los valores del ARNm de GAPDH y se muestran como la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media) de mediciones por triplicado. Se consideró una diferencia significativa con  $*p < 0.05$ .

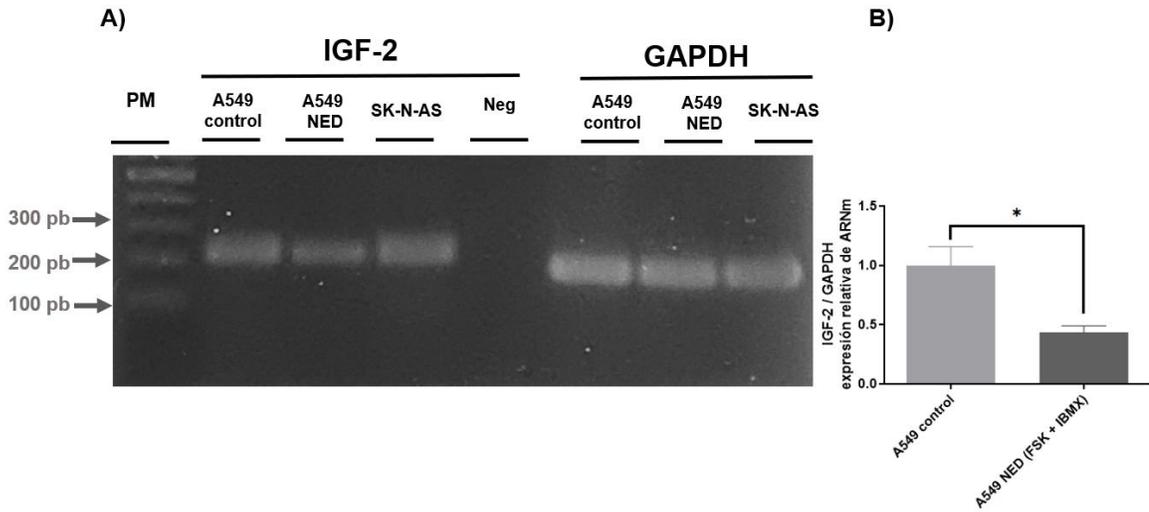


Figura 16. Niveles de expresión del ARNm del factor de crecimiento similar a insulina 2 en las células A549 transdiferenciadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc. A) El gel de agarosa que muestra la banda correspondiente al amplicón del factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGF-2) con una longitud de 212 pb y la banda del amplicón de gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con tamaño de 178 pb. En los carriles se muestra: escalera de peso molecular (PM), células A549 sin SFB (A549 control), células A549 tratadas con IBMX + FSK para realizar la transdiferenciación neuroendócrina (A549<sub>NED</sub>), control positivo con células de neuroblastoma (SK-N-AS), y control negativo (Neg). B) Gráfica que representa la cuantificación densitométrica de la RT-PCR para detectar el ARNm de IGF-2. Los resultados fueron normalizados con los valores del ARNm de GAPDH y se muestran como la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media) de mediciones por triplicado. Se consideró una diferencia significativa con  $*p < 0.05$ .

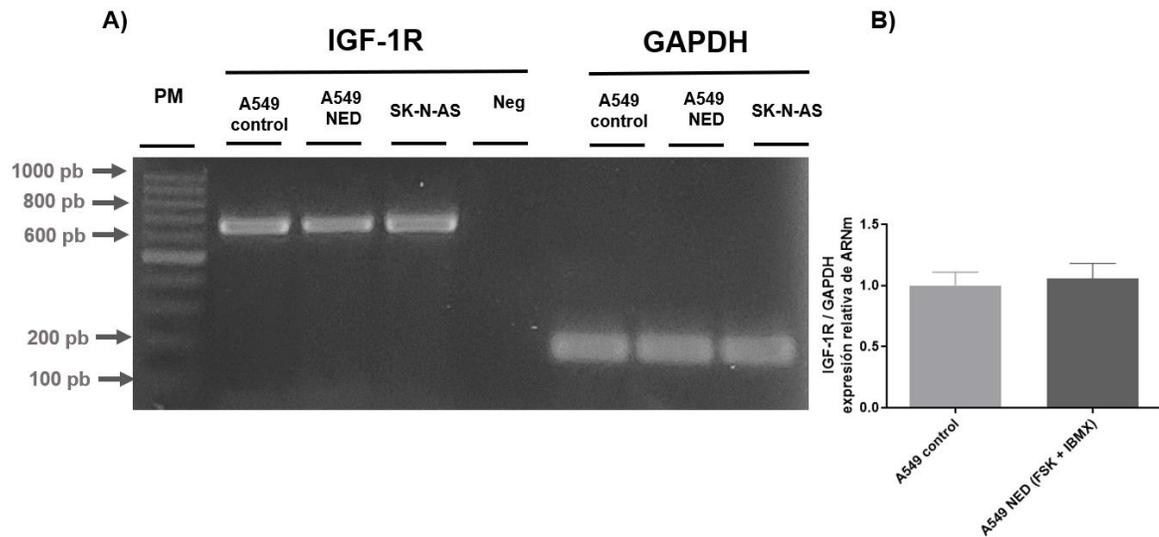


Figura 17. Niveles de expresión del ARNm del receptor del factor de crecimiento similar a insulina 1 en las células A549 transdiferenciadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc. A) Gel de agarosa que muestra la banda correspondiente al amplicón del receptor del factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1R) con una longitud de 669 pb y la banda del amplicón de gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con un tamaño de 178 pb. Células A549 sin SFB (A549 control), células A549 tratadas con IBMX + FSK para realizar la transdiferenciación neuroendócrina (A549<sub>NED</sub>), control positivo con células de neuroblastoma (SK-N-AS), negativo (Neg). B) Gráfica que representa la cuantificación por densitometría de la RT-PCR para detectar el ARNm de IGF-1R. Los resultados fueron normalizados con los valores del ARNm de GAPDH y se muestran como la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media) de mediciones por triplicado.

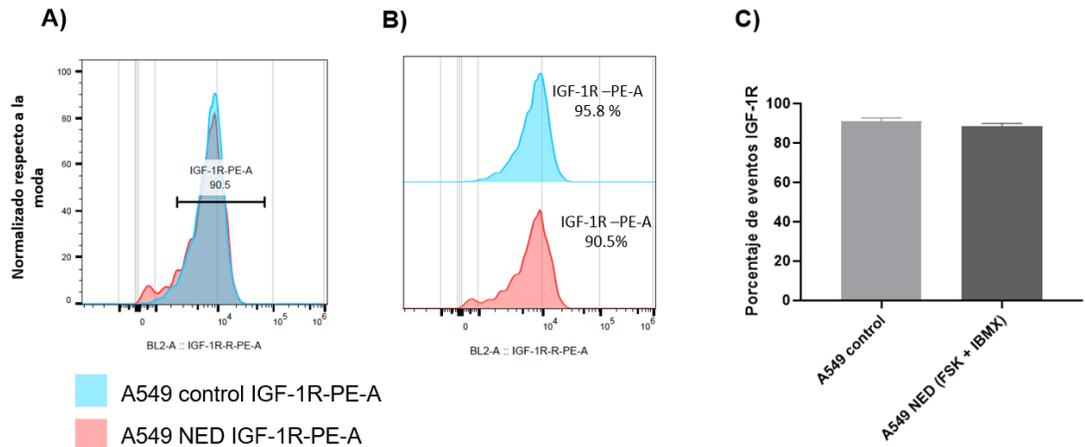


Figura 18. Detección por citometría de flujo de los niveles de IGF-1R en células A549 transdiferenciadas con agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc. A) Empalme (*match*) de histogramas de población positiva a IGF-1R en células A549 sin SFB (A549 control) y A549 tratadas con IBMX + FSK para realizar la transdiferenciación neuroendócrina (A549<sub>NED</sub>). B) Comparación individual de histogramas de población positiva para IGF-1R en células A549 control y A549<sub>NED</sub>. C) Gráfica que representa la población positiva para el receptor de membrana IGF-1R detectado por citometría de flujo en el grupo de células A549 control y A549<sub>NED</sub>. Se analizó con *t*-Student, y se consideró una diferencia significativa con \**p* < 0.05 y \*\**p* < 0.01 comparado con el control.

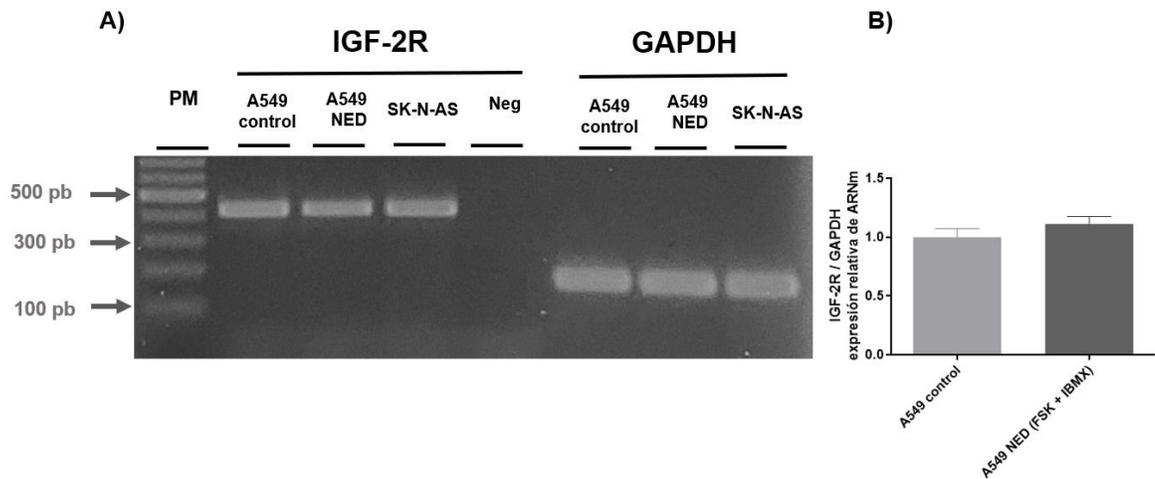


Figura 19. Niveles de expresión del ARNm del receptor del factor de crecimiento similar a insulina 2 en las células A549 transdiferenciadas con que incrementan la concentración intracelular de AMPc. A) El gel de agarosa que muestra la banda

correspondiente al amplicón del receptor del factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGF-2R) con una longitud de 428 pb y la banda del amplicón de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con tamaño de 178 pb. En los carriles se muestra: escalera de peso molecular (PM), células A549 sin SFB (A549 control), células A549 tratadas con IBMX + FSK para realizar la transdiferenciación neuroendócrina (A549<sub>NED</sub>), control positivo con células de neuroblastoma (SK-N-AS), y control negativo (Neg). B) Gráfica que representa la cuantificación densitométrica de la RT-PCR para detectar el ARNm de IGF-2R. Los resultados fueron normalizados con los valores del ARNm de GAPDH y se muestran como la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media) de mediciones por triplicado.

## 9. DISCUSIÓN

Debido a que en el pulmón es el segundo órgano con más frecuencia en donde se presenta cáncer con un fenotipo neuroendócrino, se ha buscado desarrollar modelos *in vitro* para su estudio; en esta investigación se utilizó la línea celular de adenocarcinoma pulmonar A549, a la cual se le indujo la transdiferenciación neuroendócrina (NED) por agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc como son la forskolina (FSK) y la isobutil-metilxantina (IBMX).

La NED también puede ser inducida por cambios en el microambiente celular como aumento de la interleucina 6 (IL-6) (Deeble *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2014), desregulación de factores de transcripción y activación de vías proneurales (ASLC1, MYC, NEUROD1 y MEN1) (Borromeo *et al.*, 2016; Mollaoglu *et al.*, 2017; Tenjin *et al.*, 2019; Qiu *et al.*, 2020; Kudoh *et al.*, 2020), además de los agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc (Chang *et al.*, 2013; Mendieta *et al.*, 2018; Thompson *et al.*, 2019).

Los resultados que se obtuvieron al transdiferenciar las células A549 a un fenotipo neuroendócrino concuerdan con la investigación de Mendieta y colaboradores (2018), en la cual se evaluó la proliferación con diferentes tratamientos. Se encontró que con los tratamientos de FSK e IBMX + FSK disminuyó significativamente la proliferación a partir de las 48 h de tratamiento, mientras que en los cultivos de células A549 tratados solo con IBMX se inhibió la proliferación hasta las 72 h.

Igualmente, se ha reportado en células de cáncer de próstata que una disminución en la proliferación celular se debe a una detención del ciclo celular en la fase G<sub>0</sub> al inducir el proceso de transdiferenciación neuroendócrina (Pernicová *et al.*, 2014).

Además de tener una baja proliferación; las células A549<sub>NED</sub> mostraron cambios en la morfología celular a partir de las 24 h de tratamiento con IBMX + FSK, presentando prolongaciones tipo neurita que se conservaron hasta las 120 h. Como resultado del proceso de transdiferenciación neuroendócrina, la célula tiene

cambios morfológicos que permiten transformarse sin reprogramarse a un tipo celular diferente (Cieślak-Pobuda *et al.*, 2017; Mendieta *et al.*, 2018).

En este estudio se observó la formación de cuerpos celulares redondeados y proyecciones tipo neurita desde las 24 h (Figura 8 y 9); estos cambios morfológicos permanecieron durante todo el tiempo del tratamiento respecto al control. Estos resultados concuerdan con trabajos anteriores, en los que Mendieta y colaboradores detallaron los cambios morfológicos que se generan en A549<sub>NED</sub>, con un incremento en el tamaño celular, y aumento de las prolongaciones de tipo neurita que dependiendo de la longitud se consideran filopodios (cortos) y neuritas (largos) (Chang *et al.*, 2013; Mendieta *et al.*, 2021).

Mendieta y colaboradores (2021) proponen que la formación de prolongaciones tipo neurita se produce por cambios entre las interacciones entre la actina y microtúbulos del citoesqueleto, y esto es generado por el aumento de AMPc / GMPc o sus análogos en el microambiente celular. Al activarse la vía del AMPc, el CREB fosforilado (p-CREB) por PKA en la Ser 133 promueve además la transcripción del factor de crecimiento BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) (Sainath y Gallo, 2014; Yan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018a; Mendieta *et al.*, 2021). En este sentido, para este trabajo de tesis, el BDNF se evaluó para comprobar la vía de activación por AMPc, además, de que su presencia puede correlacionar los efectos en el cambio de fenotipo de las células en cultivo.

El BDNF induce la formación de neuritas a través de la activación de su receptor TrkB y de la vía IP<sub>3</sub>/PI3K que genera incremento de Cdc42, Rac1, siendo las principales encargadas de la iniciación de neuritas. Igualmente, BDNF inhibe a RhoA, la cual es una proteína GTPasa que impide la formación de neuritas y promueve que se retracten (Nakamura *et al.*, 2008; Namekata *et al.*, 2012; Sainath y Gallo, 2014; Sasi *et al.*, 2017; Tejeda y Díaz-Guerra, 2017).

Además, se ha asociado la expresión de BDNF con una peor prognosis debido a que tiene un papel importante en la tumorigénesis y progresión el cáncer de pulmón

de células no pequeñas (NSCLC), específicamente en la línea celular A549 se observó que al silenciar la expresión de BDNF, las células tenían menor capacidad de invasión y proliferación (Zhang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2016).

En la misma investigación de Zhang y colaboradores (2016) evaluaron la variante 5 (NM\_170733.4) de BDNF en A549, sin embargo, no obtuvieron diferencia significativa respecto a las otras líneas de cáncer de pulmón analizadas. Cabe destacar que en este estudio se analizó la misma variante, la cual aumentó significativamente en las A549 con fenotipo neuroendócrino respecto al control (Figura 14). Este resultado puede correlacionarse con la activación de la vía AMPc / p-CREB / BDNF y promover la formación de proyecciones tipo neurita.

Otro cambio morfológico que se observó en este estudio debido a la transdiferenciación neuroendócrina fue el redondeamiento del cuerpo de la célula (Figura 8 y 9). Este cambio morfológico se ha reportado en el trabajo de Kudoh y colaboradores (2020), en donde se indujo la transdiferenciación neuroendócrina de A549 por transfección del factor de transcripción ASCL1 (A549 ASCL1+).

El factor de transcripción ASCL1 es miembro de la familia de bHLH (por sus siglas en inglés *basic-helix-loop-helix*) que se une a regiones cerradas y abiertas de cromatina, lo que activa la transcripción de genes de proliferación y diferenciación en la neurogénesis (Raposo *et al.*, 2015).

En cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) se observó que ASCL1 activa oncogenes como MYCL1, RET, SOX2 y NFIB, además, el ASCL1 coordinado con el factor de transcripción NEUROD1 y las quinasas MAPK se encargan de la heterogeneidad en los cánceres neuroendócrinos de pulmón (Borromeo *et al.*, 2016; Caeser *et al.*, 2021). Lo anterior, indica que ASCL1 es primordial para la NED, ya que al ser sobreexpresado en A549 presenta los cambios morfológicos característicos de la transdiferenciación neuroendócrina (Kudoh *et al.*, 2020), y concuerda con lo que se observa en la Figura 10, donde las A549<sub>NED</sub> sobreexpresan ASCL1 significativamente respecto al control.

Igualmente, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis la expresión de marcadores neuroendócrinos es similar a los presentados en las células transfectadas con el factor de transcripción proneural ASCL1, donde Syp y CgA tiene una expresión significativa (Tenjin *et al.*, 2019; Kudoh *et al.*, 2020; Caeser *et al.*, 2021).

La sobreexpresión de Syp puede deberse a que el factor de transcripción ASCL1 tiene la capacidad de unirse a la región del promotor del gen de sinaptofisina. Adicionalmente, el promotor de Syp es regulado negativamente por factor de transcripción silenciador RE-1 (REST), también conocido como factor silenciador restrictivo de neuronas (NRSF) (Kashiwagi *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha demostrado que la expresión de REST en cáncer de pulmón es silenciada por metilación de su promotor y desregulación de miARNs, por lo que se activa la expresión de los marcadores neuroendócrinos (Kreisler *et al.*, 2010; Laneve *et al.*, 2010).

Además, la zona promotora del gen para CgA y Syp tienen secuencias de elementos de respuesta al AMPc (CRE) donde se puede unir p-CREB (Kashiwagi *et al.*, 2012; Mahapatra *et al.*, 2003), por tanto, la transdiferenciación neuroendócrina inducida por el incremento de AMPc intracelular promueve la transcripción de ambos marcadores neuroendócrinos (Figura 11,12 y 13).

Los cambios morfológicos en A549<sub>NED</sub> pueden correlacionarse con la expresión de factores de crecimiento que promueven la neurogénesis (BDNF) y la presencia de los factores de transcripción p-CREB y ASCL1 inducen la expresión de marcadores neuroendócrinos (CgA y Syp) (Figura 20). También se han descrito cambios en la estructura de la membrana, debido a la producción de vesículas secretoras con los péptidos y factores de crecimiento (Mendieta *et al.*, 2021).

Brevemente, en este trabajo de investigación para evaluar si había cambio de expresión en los factores de crecimiento debido a la transdiferenciación

neuroendocrina se analizó la expresión de los factores de crecimiento similares a insulina (IGF-1 e IGF-2) y sus receptores (IGF-1R e IGF-2R).

El gen IGF-1 está conformado por seis exones y cinco intrones largos, cuya transcripción está controlada por dos promotores (P1 y P2) ubicados en el exón 1 y 2 respectivamente. En la mayoría de tejidos humanos la transcripción está regulada por el promotor 1 (P1) donde aproximadamente se debe el 90 % de transcripciones, por lo que tiene más actividad que el P2 (Kasprzak y Szaflarski, 2020).

La transcripción alternativa de P1 y P2, así como del procesamiento postranscripcional debido al empalme alternativo de IGF-1, da como resultado la expresión de seis diversas variantes (isoformas) de ARNm, donde de acuerdo a el promotor P1 o P2 se denominan la clase I o clase II respectivamente, es decir, IA, IB, IC, IIA, IIB y IIC. Una proteína IGF-1 de 70 kDa madura está codificada solo por los exones 3 y 4, mientras que los exones 5 y 6 codifican alternativamente los tres péptidos C-terminales E: Ea (exón 6), Eb (exón 5) y Ec (fragmentos de los exones 5 y 6). El más abundante de estos transcritos es IGF-1Ea, seguido de IGF-1Eb e IGF-1Ec (Christopoulos *et al.*, 2015; Kasprzak y Szaflarski, 2020).

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo para evidenciar la expresión de IGF-1, corresponden a una región del exón 1 del gen (Locación genómica: cromosoma 12 Fwd:102,475,662 a 102,475,682 y Rev: 102,419,659 a 102,419,677). La secuencia de cebadores empleada permitió amplificar un transcrito de 71 pb que no mostró diferencia significativa entre las células del grupo control y transdiferenciadas.

En la literatura se ha reportado que las células A549 tienen expresión del exón 1, correspondiente al inicio de la secuencia del gen de IGF-1, que podría correlacionarse con una eficiencia más alta de transcripción (Christopoulos *et al.*, 2015; Blyth *et al.*, 2020; Kasprzak y Szaflarski, 2020; Zheng *et al.*, 2021).

Sin embargo, se ha reportado que existe diferencia de expresión en las distintas variantes generadas a partir de los exones 5 y 6 (Christopoulos *et al.*, 2015; Alexandraki *et al.*, 2017). Es por ello, que se probaron oligonucleótidos dirigidos para los exones finales (resultados no mostrados), no obstante, se necesitan más estudios para obtener resultados concluyentes.

La expresión citoplasmática positiva del péptido IGF-1Ec se describió en la mitad de las biopsias (n=2) de los cánceres neuroendocrinos de pulmón (Alexandraki *et al.*, 2017). En el caso de la línea A549 se reportó mayor expresión de las isoformas IGF-1Ea e IGF-1Ec, seguidas por la isoforma IGF-1Eb (Christopoulos *et al.*, 2015).

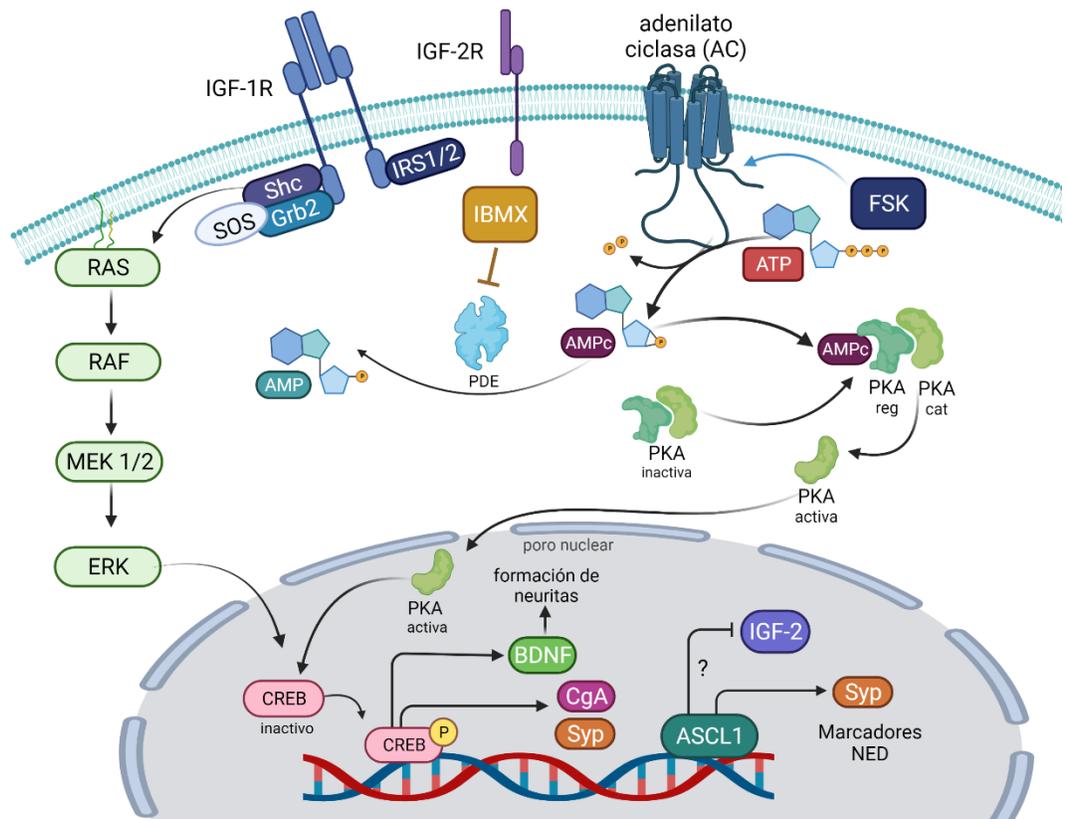
Si bien, Christopoulos y colaboradores (2015) refieren la posición de los primers en los exones 5 y 6 para detección diferenciada de las variantes, pero al analizar las secuencias se encontró que los oligos para el IGF-1Ec coinciden con la región del exón 1 en la variante 4 (NM\_000618.5). Por lo que sus resultados podrían reflejar mayor expresión debido a una alta eficiencia de transcripción.

Igualmente, se ha propuesto que la activación del eje de IGF-1 en neoplasias neuroendócrinas gastrointestinales promueve la supervivencia, angiogénesis y progresión del cáncer (Alexandraki *et al.*, 2017), y su participación en cáncer de pulmón también parece ser relevante en un fenotipo como el que se trabajó en esta tesis.

También se ha reportado que IGF-1 o la presencia de BDNF pueden activar la vía de las MAPK que fosforilan a CREB y promoviendo la NED, lo cual representaría un sistema de control complejo en el microambiente tumoral (Zheng y Quirion, 2006; Zuloaga *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2016; Tejeda y Díaz-Guerra, 2017).

Adicionalmente, Zheng y colaboradores (2019) demostraron en NSCLC una regulación autócrina positiva por parte de la interleucina 6 (IL-6) con el receptor del factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1R), al silenciar la expresión de IGF-1R, JAK/STAT3 no presentó actividad y del mismo modo, inhibir STAT3 evitó la

activación de IGF-1R/Akt. Además, STAT3 promueve la transcripción de IGF-1R, por lo que los autores sugieren la relación entre IL-6/IGF-1R/STAT3 (Zheng *et al.*, 2019). Esto es importante ya que se ha reportado que IL-6 puede inducir transdiferenciación neuroendócrina (Deeble *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2019).



Fuente: elaboración propia utilizando BioRender.com, con base en datos referenciados en la descripción de la Figura.

Figura 20. Propuesta de vías de señalización que se activan al transdiferenciar las células A549 con agentes que incrementan el AMPc. Siglas: Forskolina (FSK), isobutil-metilxantina (IBMX), adenilato ciclasa (AC), adenosín trifosfato (ATP), adenosín monofosfato cíclico (AMPc), adenosín monofosfato (AMP), fosfodiesterasa (PDE), proteína quinasa A (PKA), subunidad reguladora de PKA (PKA reg), subunidad catalítica de PKA (PKA cat), proteína de unión a elementos de respuesta de AMPc (CREB), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de transcripción Achaete-scute homolog 1 (ASCL1), cromogranina A (CgA), sinaptofisina (Syp) factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1), receptor del

factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1R), factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGF-2) y receptor del factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGF-2R). Imagen creada con BioRender.com, derechos y licencia de publicación número PC245T9JOD (Li *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Kashiwagi *et al.*, 2012; Alberts *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018b; Blyth *et al.*, 2020, Kudoh *et al.*, 2020 Mendieta *et al.*, 2021).

Por su parte, la disminución en la expresión del factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGF-2) se pudiera correlacionar con la sobreexpresión de ASCL1 en A549<sub>NED</sub>, ya que en cáncer de neuroblastoma cuando se silenció el factor de transcripción proneural, hubo un incremento significativo de IGF-2, por lo que los autores plantean que juega un papel importante en la diferenciación neuroendocrina (Li *et al.*, 2011). También se describió en cardiomioblastos que CREB activado se une al promotor del receptor del factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGF-2R), disminuyendo su expresión, es decir, p-CREB tiene una regulación negativa de este receptor (Chen *et al.*, 2015).

## 10. CONCLUSIONES

Se logró realizar la transdiferenciación neuroendócrina de las células A549 con agentes que incrementan la concentración intracelular del AMPc (FSK + IBMX) y se comprobó mediante cambios en la morfología celular y expresión biomolecular significativa de marcadores neuroendócrinos (ASCL1, CgA y Syp).

La proliferación de las células A549<sub>NED</sub> disminuyó significativamente a través del tiempo en comparación con las células sin tratamiento.

Adicionalmente, en células A549<sub>NED</sub> se determinó la activación de la vía de señalización de AMPc-PKA-CREB por el incremento significativo en la expresión de BDNF uno de los blancos moleculares de p-CREB.

Se encontró la expresión de los receptores de factores de crecimiento similar a insulina (IGF-1R e IGF-2R) en células A549<sub>NED</sub>, al igual que en células sin tratamiento, no obstante, no hubo diferencia estadísticamente significativa con la transdiferenciación.

El papel que puede desempeñar el eje de IGF-1 en el microambiente tumoral es promover la supervivencia y progresión del cáncer, en este modelo celular se logró evidenciar la presencia de este factor de crecimiento sin diferencia significativa respecto al control.

Finalmente, el factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGF-2) presentó una disminución significativa en su expresión en A549<sub>NED</sub> respecto al control, lo cual correlaciona con la sobreexpresión de ASCL1.

## 11. REFERENCIAS

- Alberts**, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2015). Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 16, Issue 12).
- Aldaco-Sarvide**, F., Pérez-Pérez, P., Cervantes-Sánchez, G., Torrecillas-Torres, L., Erazo-Valle-Solís, A. A., Cabrera-Galeana, P., Motola-Kuba, D., Anaya, P., Rivera-Rivera, S., y Cárdenas-Cárdenas, E. (2018). Mortality from cancer in Mexico: 2015 update. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 17(1), 28–34. <https://doi.org/10.24875/j.gamo.M18000105>.
- Alexandraki**, K. I., Philippou, A., Boutzios, G., Theohari, I., Koutsilieris, M., Delladetsima, I. K., y Kaltsas, G. A. (2017). IGF-IEc expression is increased in secondary compared to primary foci in neuroendocrine neoplasms. *Oncotarget*, 8(45), 79003–79011. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20743>.
- Amador**, C., y Varacallo, M. (2021). *Anatomy, Thorax, Bronchial*. Stat Pearls. [Consultado 2022 marzo 12]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537353/>.
- Armakolas**, A., Kaparelou, M., Dimakakos, A., Papageorgiou, E., Armakolas, N., Antonopoulos, A., Petraki, C., Lekarakou, M., Lelovas, P., Stathaki, M., Psarros, C., Donta, I., Galanos, P. S., Msaouel, P., Gorgoulis, V. G., y Koutsilieris, M. (2015). Oncogenic role of the Ec peptide of the IGF-1Ec isoform in prostate cancer. *Molecular Medicine*, 21, 167–179. <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00222>.
- Bellur**, S., Van der Kwast, T., y Mete, O. (2019). Evolving concepts in prostatic neuroendocrine manifestations: from focal divergent differentiation to amphicrine carcinoma. *Human Pathology*, 85(2019), 313–327. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.11.016>.

- Blyth, A. J., Kirk, N. S., y Forbes, B. E. (2020).** Understanding IGF-II Action through Insights into Receptor Binding and Activation. *Cells*, 9(10), 2276. <https://doi.org/10.3390/cells9102276>.
- Boguszewski, C. L., y Boguszewski, M. C. D. S. (2019).** Growth hormone's links to cancer. *Endocrine Reviews*, 40(2), 558–574. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00166>.
- Bonfig, W., y Holl, R. W. (2019).** Mini review/commentary: Growth hormone treatment in children with type 1 diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 3–5. <https://doi.org/10.3390/ijms20030772>.
- Borromeo, M. D., Savage, T. K., Kollipara, R. K., He, M., Augustyn, A., Osborne, J. K., Girard, L., Minna, J. D., Gazdar, A. F., Cobb, M. H., y Johnson, J. E. (2016).** ASCL1 and NEUROD1 Reveal Heterogeneity in Pulmonary Neuroendocrine Tumors and Regulate Distinct Genetic Programs. *Cell Reports*, 16(5), 1259–1272. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.081>.
- Bowers, L. W., Rossi, E. L., O'Flanagan, C. H., De Graffenried, L. A., y Hursting, S. D. (2015).** The role of the insulin/IGF system in cancer: Lessons learned from clinical trials and the energy balance-cancer link. *Frontiers in Endocrinology*, 6(MAY), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00077>.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., y Jemal, A. (2018).** Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Brittain, A. L., Basu, R., Qian, Y., y Kopchick, J. J. (2017).** Growth hormone and the epithelial-To-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 102(10), 362–3673. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-01000>.
- Caeser, R., Hulton, C., Costa, E., Durani, V., Little, M., Chen, X., Tischfield, S. E.,**

Asher, M., Kombak, F. E., Chavan, S. S., Shah, N. S., Ciampricotti, M., de Stanchina, E., Poirier, J. T., Rudin, C. M., y Sen, T. (2021). MAPK pathway activation selectively inhibits ASCL1-driven small cell lung cancer. *IScience*, 24(11), 103224. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103224>.

**Carter-Su, C.**, y Schwartz, J. (2016). Growth hormone signaling pathways. *Growth Hormone and IGF Research*, 28, 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2015.09.002>.

**Chan, B. A.**, y Hughes, B. G. M. (2015). Targeted therapy for non-small cell lung cancer : current standards and the promise of the future. *Transl Lung Cancer Res*, 4(1), 36–54. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2014.05.01>.

**Chang, K. T.**, Huang, C. Y. F., Tsai, C. M., Chiu, C. H., y Lok, Y. Y. (2005). Role of IL-6 in neuroendocrine differentiation and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289(3 33-3), 438–445. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00033.2005>.

**Chang, Y.**, Kim, S. Y., Choi, Y. J., So, K. S., Rho, J. K., Kim, W. S., Lee, J. C., Chung, J. H., y Choi, C. M. (2013). Neuroendocrine differentiation in acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 75(3), 95–103. <https://doi.org/10.4046/trd.2013.75.3.95>.

**Chen, W. K.**, Kuo, W. W., Hsieh, D. J. Y., Chang, H. N., Pai, P. Y., Lin, K. H., Pan, L. F., Ho, T. J., Viswanadha, V. P., y Huang, C. Y. (2015). CREB negatively regulates IGF2R gene expression and downstream pathways to inhibit hypoxia-induced H9c2 cardiomyoblast cell death. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 27921–27930. <https://doi.org/10.3390/ijms161126067>.

**Chen, Y.**, Nowak, I., Huang, J., Keng, P. C., Sun, H., Xu, H., Wei, G., y Lee, S. O. (2014). Erk/MAP kinase signaling pathway and neuroendocrine differentiation of non-small-cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 9(1), 50–58.

<https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000034>.

**Cheung, W. K. C., y Nguyen, D. X. (2015).** Lineage factors and differentiation states in lung cancer progression. *Oncogene*, *34*(47), 5771–5780. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.85>.

**Christopoulos, P. F., Philippou, A., y Koutsilieris, M. (2015).** Pattern of IGF-1 variants' expression in human cancer cell lines using a novel q-RT-PCR approach. *Anticancer Research*, *35*(1), 107–116.

**Cieślak-Pobuda, A., Knoflach, V., Ringh, M. V., Stark, J., Likus, W., Siemianowicz, K., Ghavami, S., Hudecki, A., Green, J. L., y Łos, M. J. (2017).** Transdifferentiation and reprogramming: Overview of the processes, their similarities and differences. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1864*(7), 1359–1369. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.04.017>.

**Deeble, P. D., Murphy, D. J., Parsons, S. J., y Cox, M. E. (2001).** Interleukin-6- and Cyclic AMP-Mediated Signaling Potentiates Neuroendocrine Differentiation of LNCaP Prostate Tumor Cells. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(24), 8471–8482. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.24.8471-8482.2001>.

**Dyson, H. J., y Wright, P. E. (2016).** Role of intrinsic protein disorder in the function and interactions of the transcriptional coactivators CREB-binding Protein (CBP) and p300. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(13), 6714–6722. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.692020>.

**Esposito, S., Leonardi, A., Lanciotti, L., Cofini, M., Muzi, G., y Penta, L. (2019).** Vitamin D and growth hormone in children: a review of the current scientific knowledge. *Journal of Translational Medicine*, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1840-4>.

**Fox, S. I. (2016).** *Human Physiology, the 14th edition* (4 ed.). Mc Graw Hill.

**Garg, A., Sui, P., Verheyden, J. M., Young, L. R., y Sun, X. (2019).** Consider the

lung as a sensory organ: A tip from pulmonary neuroendocrine cells. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 132). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.12.002>.

**GLOBOCAN.** (2020). *International Agency for research on Cancer Lung*. [Consultado 2022 marzo 20] Disponible en: <http://gco.iarc.fr/>.

**Guerrero-López,** C. M., Serván-Mori, E., Rodríguez-Franco, R., Montañez-Hernández, J. C., y Gómez-Dantés, H. (2019). Lung cancer in Mexico: Findings from the Global Burden of Disease Study, 1990-2016. *Salud Publica de Mexico*, 61(3), 240–248. <https://doi.org/10.21149/9932>.

**Guevara-Aguirre,** J., Guevara, A., Palacios, I., Pérez, M., Prócel, P., y Terán, E. (2018). GH and GHR signaling in human disease. *Growth Hormone and IGF Research*, 38, 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2017.12.006>.

**Hage,** M., Kamenický, P., y Chanson, P. (2019). Growth Hormone Response to Oral Glucose Load: From Normal to Pathological Conditions. *Neuroendocrinology*, 108(3), 244–255. <https://doi.org/10.1159/000497214>.

**Hassanpour,** S. H., y Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127–129. <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001>.

**Herrera-Martínez,** A. D., Hofland, L. J., Gálvez Moreno, M. A., Castaño, J. P., De Herder, W. W., y Feelders, R. A. (2019). Neuroendocrine neoplasms: Current and potential diagnostic, predictive and prognostic markers. *Endocrine-Related Cancer*, 26(3), R157–R179. <https://doi.org/10.1530/ERC-18-0354>.

**Hor,** P., Punj, V., Calvert, B. A., Castaldi, A., Miller, A. J., Carraro, G., Stripp, B. R., Brody, S. L., Spence, J. R., Ichida, J. K., Ryan (Firth), A. L., y Borok, Z. (2020). Efficient Generation and Transcriptomic Profiling of Human iPSC-Derived Pulmonary Neuroendocrine Cells. *IScience*, 23(5).

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101083>.

- Hu, C. D., Choo, R., y Huang, J. (2015).** Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: A mechanism of radioresistance and treatment failure. *Frontiers in Oncology*, 5(APR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00090>.
- Ireland, A. S., Micinski, A. M., Kastner, D. W., Guo, B., Wait, S. J., Spainhower, K. B., Conley, C. C., Chen, O. S., Guthrie, M. R., Soltero, D., Qiao, Y., Huang, X., Tarapcsák, S., Devarakonda, S., Chalishazar, M. D., Gertz, J., Moser, J. C., y Oliver, T. G. (2020).** MYC Drives Temporal Evolution of Small Cell Lung Cancer Subtypes by Reprogramming Neuroendocrine Fate. *Cancer Cell*, 38(1), 60-78.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.05.001>.
- Kashiwagi, K., Ishii, J., Sakaeda, M., Arimasu, Y., Shimoyamada, H., Sato, H., Miyata, C., Kamma, H., Aoki, I., y Yazawa, T. (2012).** Differences of molecular expression mechanisms among neural cell adhesion molecule 1, synaptophysin, and chromogranin A in lung cancer cells. *Pathology International*, 62(4), 232–245. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2011.02781.x>.
- Kasprzak, A., Kwasniewski, W., Adamek, A., y Gozdzicka-Jozefiak, A. (2017).** Insulin-like growth factor (IGF) axis in cancerogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 772, 78–104. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.08.007>.
- Kasprzak, A., y Szaflarski, W. (2020).** Role of alternatively spliced messenger RNA (mRNA) isoforms of the insulin-like growth factor 1 (IGF1) in selected human tumors. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 19). <https://doi.org/10.3390/ijms21196995>.
- Korrodi-Gregório, L., Soto-Cerrato, V., Vitorino, R., Fardilha, M., y Pérez-Tomás, R. (2016).** From proteomic analysis to potential therapeutic targets: Functional profile of two lung cancer cell lines, A549 and SW900, widely studied in pre-

clinical research. *PLoS ONE*, 11(11), 1–27.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165973>.

**Kreisler, A.,** Strissel, P. L., Strick, R., Neumann, S. B., Schumacher, U., y Becker, C. M. (2010). Regulation of the NRSF/REST gene by methylation and CREB affects the cellular phenotype of small-cell lung cancer. *Oncogene*, 29(43), 5828–5838. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.321>.

**Kudoh, S.,** Tenjin, Y., Kameyama, H., Ichimura, T., Yamada, T., Matsuo, A., Kudo, N., Sato, Y., y Ito, T. (2020). Significance of achaete-scute complex homologue 1 (ASCL1) in pulmonary neuroendocrine carcinomas; RNA sequence analyses using small cell lung cancer cells and Ascl1-induced pulmonary neuroendocrine carcinoma cells. *Histochemistry and Cell Biology*, 153(6), 443–456. <https://doi.org/10.1007/s00418-020-01863-z>.

**Kuo, C. S.,** y Krasnow, M. A. (2015). Formation of a Neurosensory Organ by Epithelial Cell Slithering. *Cell*, 163(2), 394–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.021>.

**Kuslich, C. D.,** Chui, B., y Yamashiro, C. T. (2018). Overview of PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 27, 1–34. <https://doi.org/10.1002/cpet.27>.

**Laneve, P.,** Gioia, U., Andriotto, A., Moretti, F., Bozzoni, I., y Caffarelli, E. (2010). A minicircuitry involving REST and CREB controls miR-9-2 expression during human neuronal differentiation. *Nucleic Acids Research*, 38(20), 6895–6905. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq604>.

**Leonetti, A.,** Facchinetti, F., Minari, R., Cortellini, A., Rolfo, C. D., Giovannetti, E., y Tiseo, M. (2019). Notch pathway in small-cell lung cancer: from preclinical evidence to therapeutic challenges. *Cellular Oncology*, 42(3), 261–273. <https://doi.org/10.1007/s13402-019-00441-3>.

- Li, J., Neumann, I., Volkmer, I., y Staeger, M. S. (2011).** Down-regulation of achaete-scute complex homolog 1 (ASCL1) in neuroblastoma cells induces up-regulation of insulin-like growth factor 2 (IGF2). *Molecular Biology Reports*, 38(3), 1515–1521. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0259-z>.
- Lu, M., Flanagan, J. U., Langley, R. J., Hay, M. P., y Perry, J. K. (2019).** Targeting growth hormone function: strategies and therapeutic applications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0036-y>.
- Mahapatra, N. R., Mahata, M., O'Connor, D. T., y Mahata, S. K. (2003).** Secretin activation of chromogranin A gene transcription. Identification of the signaling pathways in cis and in trans. *Journal of Biological Chemistry*, 278(22), 19986–19994. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207983200>.
- Majchrzak-Baczmańska, D., y Malinowski, A. (2016).** Does IGF-1 play a role in the biology of endometrial cancer? *Ginekologia Polska*, 87(8), 598–604. <https://doi.org/10.5603/GP.2016.0052>.
- Melosky, B. (2017).** Low grade neuroendocrine tumors of the lung. *Frontiers in Oncology*, 7(JUN), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00119>.
- Mendieta, I., Nuñez-Anita, R. E., Pérez-Sánchez, G., Pavón, L., Rodríguez-Cruz, A., García-Alcocer, G., y Berumen, L. C. (2018).** Effect of A549 neuroendocrine differentiation on cytotoxic immune response. *Endocrine Connections*, 7(5), 791–802. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0145>.
- Mendieta, I., Rodríguez-Nieto, M., Nuñez-Anita, R. E., Menchaca-Arredondo, J. L., García-Alcocer, G., y Berumen, L. C. (2021).** Ultrastructural changes associated to the neuroendocrine transdifferentiation of the lung adenocarcinoma cell line A549. *Acta Histochemica*, 123(8). <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151797>.
- Metovic, J., Barella, M., Bianchi, F., Hofman, P., Hofman, V., Remmelink, M., Kern,**

I., Carvalho, L., Pattini, L., Sonzogni, A., Veronesi, G., Harari, S., Forest, F., Papotti, M., y Pelosi, G. (2021). Morphologic and molecular classification of lung neuroendocrine neoplasms. *Virchows Archiv*, 5–19. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-03015-z>.

**Minami, K., Tanaka, Y., Ogawa, H., Jimbo, N., y Nishio, W. (2019).** *Neuroendocrine marker staining pattern categorization of small-sized pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma.* 10, 2152–2160. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13202>.

**Mollaoglu, G., Guthrie, M. R., Böhm, S., Brägelmann, J., Can, I., Ballieu, P. M., Marx, A., George, J., Heinen, C., Chalishazar, M. D., Cheng, H., Ireland, A. S., Denning, K. E., Mukhopadhyay, A., Vahrenkamp, J. M., Berrett, K. C., Mosbrugger, T. L., y Oliver, T. G. (2017).** MYC Drives Progression of Small Cell Lung Cancer to a Variant Neuroendocrine Subtype with Vulnerability to Aurora Kinase Inhibition. *Cancer Cell*, 31(2), 270–285. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.12.005>.

**Moody, T. W. (2019).** Peptide receptors as cancer drug targets. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1–8. <https://doi.org/10.1111/nyas.14100>.

**Moody, T. W., Moreno, P., y Jensen, R. T. (2015).** Peptides Neuropeptides as lung cancer growth factors. *Peptides*, 72, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.03.018>.

**Moody, T. W., Nuche-Berenguer, B., y Jensen, R. T. (2016).** Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, and their receptors and cancer. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity*, 23(1), 38–47. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000218>.

**Nakamura, T., Aoki, K., y Matsuda, M. (2008).** FRET imaging and in silico simulation: Analysis of the signaling network of nerve growth factor-induced neuritogenesis. *Brain Cell Biology*, 36(1–4), 19–30.

<https://doi.org/10.1007/s11068-008-9028-5>.

- Namekata**, K., Watanabe, H., Guo, X., Kittaka, D., Kawamura, K., Kimura, A., Harada, C., y Harada, T. (2012). Dock3 regulates BDNF-TrkB signaling for neurite outgrowth by forming a ternary complex with Elmo and RhoG. *Genes to Cells*, 17(8), 688–697. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2012.01616.x>.
- Nurwidya**, F., Andarini, S., Takahashi, F., Syahrudin, E., y Takahashi, K. (2016). Implications of insulin-like growth factor 1 receptor activation in lung cancer. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 23(3), 9–21.
- Öberg**, K. (2018). The Genesis of the Neuroendocrine Tumors Concept: From Oberndorfer to 2018. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 47(3), 711–731. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2018.05.003>.
- Oleinikov**, K., Avniel-Polak, S., Gross, D. J., y Grozinsky-Glasberg, S. (2019). Carcinoid Syndrome: Updates and Review of Current Therapy. *Current Treatment Options in Oncology*, 20(9). <https://doi.org/10.1007/s11864-019-0671-0>.
- OMS**, O. M. de la S. (2017). *The Global Impact of Respiratory. Second Edition*. [Consultado: 2022 marzo 04] Disponible en: [https://static.physoc.org/app/uploads/2019/04/22192917/The\\_Global\\_Impact\\_of\\_Respiratory\\_Disease.pdf](https://static.physoc.org/app/uploads/2019/04/22192917/The_Global_Impact_of_Respiratory_Disease.pdf).
- OMS**, O. M. de la S. (2022). *Cancer*. [Consultado: 2022 marzo 04] Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Oronsky**, B., Ma, P., Morgensztern, D., y Carter, C. (2017). Nothing But NET: A Review of Neuroendocrine Tumors and Carcinomas. *Neoplasia (United States)*, 19(12), 991–1002. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.09.002>.
- Oser**, M. G., Niederst, M. J., Sequist, L. V, Engelman, J. A., General, M., Cancer, H., y Medical, H. (2016). Transformation from non-small-cell lung cancer to

small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. *Lancet Oncol*, 16(4), 1–18. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71180-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71180-5). Transformation.

**Ouadah**, Y., Rojas, E. R., Riordan, D. P., Capostagno, S., Kuo, C. S., Krasnow, M. A., Ouadah, Y., Rojas, E. R., Riordan, D. P., Capostagno, S., y Kuo, C. S. (2019). Rare Pulmonary Neuroendocrine Cells Are Stem Cells Regulated by Rb , p53 , and Notch. *Cell*, 179(2), 403-416.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.010>.

**Pernicová**, Z., Slabáková, E., Fedr, R., Šimečková, Š., Jaroš, J., Suchánková, T., Bouchal, J., Kharraishvili, G., Král, M., Kozubík, A., y Souček, K. (2014). The role of high cell density in the promotion of neuroendocrine transdifferentiation of prostate cancer cells. *Molecular Cancer*, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-113>.

**Promega**. (2021). *GoTaq® Green Master Mix Protocol*. [Consultado: 2022 marzo 04] Disponible en: [https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-protocol.pdf?rev=87143910365a492eb4bd0933f903621a&sc\\_lang=en](https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-protocol.pdf?rev=87143910365a492eb4bd0933f903621a&sc_lang=en).

**Qiu**, Han, Yang, J. K., y Chen, C. (2017). Influence of insulin on growth hormone secretion, level and growth hormone signalling. *Sheng Li Xue Bao : [Acta Physiologica Sinica]*, 69(5), 541–556. <https://doi.org/10.13294/j.aps.2017.0062>.

**Qiu**, Huan, Jin, B. M., Wang, Z. F., Xu, B., Zheng, Q. F., Zhang, L., Zhu, L. Y., Shi, S., Yuan, J. B., Lin, X., Gao, S. Bin, y Jin, G. H. (2020). MEN1 deficiency leads to neuroendocrine differentiation of lung cancer and disrupts the DNA damage response. *Nature Communications*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14614-4>.

**Raposo**, A. A. S. F., Vasconcelos, F. F., Drechsel, D., Marie, C., Johnston, C., Dolle, D., Bithell, A., Gillotin, S., van den Berg, D. L. C., Ettwiller, L., Flicek, P.,

Crawford, G. E., Parras, C. M., Berninger, B., Buckley, N. J., Guillemot, F., y Castro, D. S. (2015). Ascl1 coordinately regulates gene expression and the chromatin landscape during neurogenesis. *Cell Reports*, 10(9), 1544–1556. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.025>.

**Reynoso-Noverón**, N., y Torres-Domínguez, J. A. (2018). Epidemiología del cáncer en México : carga global y proyecciones 2000-2020 Epidemiology of cancer in México : global burden and projections 2000-2020. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual*, 8(1), 9–15. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/40216>.

**Rozance**, P. J., y Rosenberg, A. A. (2017). Chapter 22 The Neonate. In *Obstetrics : Normal and Problem Pregnancies*. (Seventh Ed). Elsevier Inc. 468-498.e4.

**Sainath**, R., y Gallo, G. (2014). Cytoskeletal and signaling mechanisms of neurite formation. *Cell and Tissue Research*, 359(1), 267–278. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1955-0>.

**Sasi**, M., Vignoli, B., Canossa, M., y Blum, R. (2017). Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 469(5–6), 593–610. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1964-4>.

**Scoazec**, J. Y. (2019). Lung and digestive neuroendocrine neoplasms. From WHO classification to biomarker screening: Which perspectives? *Annales d'Endocrinologie*, 80(3), 163–165. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2019.04.011>.

**Semenova**, E. A., Nagel, R., y Berns, A. (2015). Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer. *Genes & Development*, 29(14), 1447–1462. <https://doi.org/doi:10.1101/gad.263145.115>.

**Skoulidis**, F., y Heymach, J. V. (2019). Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 19(9), 495-509. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0179-8>.

- Steven, A., y Seliger, B. (2016).** Control of CREB expression in tumors: From molecular mechanisms and signal transduction pathways to therapeutic target. *Oncotarget*, 7(23), 35454–35465. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7721>.
- Strober, W. (2015).** *Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability*. November, 3–5. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>.
- Svejda, B., Kidd, M., Timberlake, A., Harry, K., Kazberouk, A., Schimmack, S., Lawrence, B., Pfragner, R., y Modlin, I. M. (2013).** Serotonin and the 5-HT7 receptor: The link between hepatocytes, IGF-1 and small intestinal neuroendocrine tumors. *Cancer Science*, 104(7), 844–855. <https://doi.org/10.1111/cas.12174>.
- Tejeda, G. S., y Díaz-Guerra, M. (2017).** Integral characterization of defective BDNF/TrkB signalling in neurological and psychiatric disorders leads the way to new therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijms18020268>.
- Tenjin, Y., Kudoh, S., Kubota, S., Yamada, T., Matsuo, A., y Sato, Y. (2019).** Ascl1-induced Wnt11 regulates neuroendocrine differentiation, cell proliferation, and E-cadherin expression in small-cell lung cancer and Wnt11 regulates small-cell lung cancer biology. *Laboratory Investigation*, 99, 1622–1635. <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0277-y>.
- Thermo Fisher Scientific. (2013).** *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Ki*. [Consultado: 2022 marzo 04] Disponible en: [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0012716\\_RevertAid\\_FirstStrand\\_cDNA\\_Syn\\_K1622\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0012716_RevertAid_FirstStrand_cDNA_Syn_K1622_UG.pdf).
- Thompson, R., Casali, C., y Chan, C. (2019).** Forskolin and IBMX Induce Neural Transdifferentiation of MSCs Through Downregulation of the NRSF. *Scientific*

*Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39544-0>.

**Travis**, W.D., Brambilla, E., Burke, A., Marx, A., Nicholson, G. (2015a). *WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart: International Agency for Research on Cancer; 2015* (p. 412).

**Travis**, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., y Wistuba, I. (2015b). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(9), 1243–1260. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>.

**Wang**, H., Xu, J., Lazarovici, P., Quirion, R., y Zheng, W. (2018a). cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(August), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00255>.

**Wang**, Z., Li, W., Guo, Q., Wang, Y., Ma, L., y Zhang, X. (2018b). Insulin-Like Growth Factor-1 Signaling in Lung Development and Inflammatory Lung Diseases. *BioMed Research International*, 2018, 17–19. <https://doi.org/10.1155/2018/6057589>.

**Wolterink**, R. G. J. K., Pirzgalska, R. M., y Veiga-fernandes, H. (2018). Previews Neuroendocrine Cells Take Your Breath Away. *Immunity*, 49(1), 9–11. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.06.010>.

**Xu**, H., Lee, M. S., Tsai, P. Y., Adler, A. S., Curry, N. L., Challa, S., Freinkman, E., Hitchcock, D. S., Copps, K. D., White, M. F., Bronson, R. T., Marcotrigiano, M., Wu, Y., Clish, C. B., y Kalaany, N. Y. (2018). Ablation of insulin receptor substrates 1 and 2 suppresses Kras-driven lung tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(16), 4228–4233. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718414115>.

- Yan, X., Liu, J., Ye, Z., Huang, J., He, F., Xiao, W., Hu, X., y Luo, Z. (2016).** CaMKII-Mediated CREB phosphorylation is involved in Ca<sup>2+</sup>-Induced BDNF mRNA transcription and neurite outgrowth promoted by electrical stimulation. *PLoS ONE*, 11(9), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162784>.
- Zhang, L., Seitz, L. C., Abramczyk, A. M., Liu, L., y Chan, C. (2011).** cAMP initiates early phase neuron-like morphology changes and late phase neural differentiation in mesenchymal stem cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(5), 863–876. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0497-1>.
- Zhang, Si yang, Hui, L. ping, Li, C. Yan, Gao, J., Cui, Z. Shi, y Qiu, X. Shan. (2016).** More expression of BDNF associates with lung squamous cell carcinoma and is critical to the proliferation and invasion of lung cancer cells. *BMC Cancer*, 16(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2218-0>.
- Zhang, Siyang, Guo, D., Luo, W., Zhang, Q., Zhang, Y., Li, C., Lu, Y., Cui, Z., y Qiu, X. (2010).** TrkB is highly expressed in NSCLC and mediates BDNF-induced the activation of Pyk2 signaling and the invasion of A549 cells. *BMC Cancer*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-43>.
- Zhang, W., Girard, L., Zhang, Y. A., Haruki, T., Papari-Zareei, M., Stastny, V., Ghayee, H. K., Pacak, K., Oliver, T. G., Minna, J. D., y Gazdar, A. F. (2018).** Small cell lung cancer tumors and preclinical models display heterogeneity of neuroendocrine phenotypes. *Translational Lung Cancer Research*, 7(1), 32–49. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2018.02.02>.
- Zheng, S., Wang, C., Yan, H., y Du, Y. (2021).** Blocking hsa\_circ\_0074027 suppressed non-small cell lung cancer chemoresistance via the miR-379-5p/IGF1 axis. *Bioengineered*, 12(1), 8347–8357. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1987053>.
- Zheng, W. H., y Quirion, R. (2006).** Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) induces the activation/phosphorylation of Akt kinase and cAMP response element-binding

protein (CREB) by activating different signaling pathways in PC12 cells. *BMC Neuroscience*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-51>.

**Zheng, X., Lu, G., Yao, Y., y Gu, W. (2019).** An autocrine IL-6/IGF-1R loop mediates emt and promotes tumor growth in non-small cell lung cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 15(9), 1882–1891. <https://doi.org/10.7150/ijbs.31999>.

**Zhu, S., Tian, H., Niu, X., Wang, J., Li, X., Jiang, N., Wen, S., y Chen, X. (2019).** Neurotensin and its receptors mediate neuroendocrine transdifferentiation in prostate cancer. *Oncogene*, 4875–4884. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0750-5>.

**Zhu, Y., Liu, C., Cui, Y., Nadiminty, N., Lou, W., y Gao, A. C. (2014).** Interleukin-6 induces neuroendocrine differentiation (NED) through suppression of RE-1 silencing transcription factor (REST). *Prostate*, 74(11), 1086–1094. <https://doi.org/10.1002/pros.22819>.

**Zuloaga, R., Fuentes, E. N., Molina, A., y Valdés, J. A. (2013).** The cAMP Response Element Binding protein (CREB) is activated by Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) and regulates myostatin gene expression in skeletal myoblast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440(2), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.09.067>.