

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EXPRESIÓN DEL RECEPTOR A NEUROPEPTIDO 5Y (Y5R)
EN UNA LÍNEA CELULAR A549 DE FENOTIPO
NEUROENDÓCRINO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

RODRÍGUEZ PALMA ITZEL ODALIS

DIRIGIDA POR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2023.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



Expresión del receptor a neuropéptido 5Y (Y5R) en una
línea celular A549 de fenotipo neuroendócrino

por

Itzel Odalis Rodríguez Palma

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQLIN-267620-0223-223



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EXPRESIÓN DEL RECEPTOR A NEUROPEPTIDO 5Y (Y5R)
EN UNA LÍNEA CELULAR A549 DE FENOTIPO
NEUROENDÓCRINO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

RODRÍGUEZ PALMA ITZEL ODALIS

DIRIGIDA POR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SINODALES

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA
DIRECTOR

M. en C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE
SINODAL

Dra. KARLA ISABEL LIRA DE LEÓN
SINODAL

M. en C. JAZMÍN ESMERALDA SOTO
HERNÁNDEZ
SINODAL

Para mi heroína que lucha cada día con coraje, esperanza y valentía. Esto es para ti mamá.

Para mi impulsor de sueños, mi héroe y mi más grande admirador. Esto es para ti papá.

Para mis compañeros incondicionales. Esto es para ustedes hermanos.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá Josefina Palma, por inspirarme y enseñarme a ser valiente. Por iluminarme aquellos días en que ya no podía más. Por siempre impulsarme a cumplir mis sueños. Pero sobre todo por demostrarme que no hay nada imposible siempre y cuando se tenga una oportunidad, fuerza y mucho corazón. Espero que este trabajo de investigación inspire a más personas, para que un día, nadie tenga que pasar por lo que estas viviendo tu.

A mi papá Joel Rodríguez, por demostrarme que los sueños empiezan a construirse desde las 5 de la mañana en una bicicleta. Por sacrificar gran parte de tu tiempo para que mis hermanos y yo podamos cumplir nuestras metas. Por estar al pie de cañón y enseñarme a nunca darme por vencida.

A mi hermana Carina Rodríguez, por haberme brindado la fuerza que necesitaba para poder continuar con mi sueño, no fue fácil estar lejos de casa, pero tu compañía hizo que mis días fueran menos solitarios. Por tu sacrificio, por brindarme tu apoyo incondicional y por ser mi modelo a seguir.

A mi hermana Denisse Rodríguez, por demostrarme que una decisión no nos define, porque al nunca rendirte me enseñaste como es que debemos afrontar la vida. Por tus ocurrencias que hicieron la carga menos pesada.

A mi hermano José Rodríguez, por enseñarme todos los días que podemos mejorar. Por enseñarme a ver la vida de otra manera. Al estar orgulloso de mí, me motivas a ser cada vez mejor.

A mi gran amiga y compañera Rebeca Tavera, por ser parte esencial de mi vida universitaria. Por tu compañía, tus consejos, pero sobre todo por tu apoyo. Por fin culminamos el propósito que perseguimos por tanto tiempo.

A la Dra. Laura Berumen por haberme abrigado a lo largo de estos meses, por brindarme las herramientas y el conocimiento necesario para culminar este trabajo. Por creer en mí.

A la M. en C. Jazmín Soto, la Dra. Irasema Mendieta y la M. en C. Dulce Caraveo, por haber sido parte fundamental en este trabajo de investigación. Porque sus enseñanzas y consejos me hicieron una mejor investigadora, lo atesorare por siempre.

A la Dra. Karla Lira y a la M. en C. Alma Bertadillo, por haberme acompañado a lo largo de este trabajo, por sus consejos y por su tiempo dedicado.

A mi compañera y amiga Miriam Aguilar, por enseñarme que sin importar que tan difícil se vea el panorama, siempre hay una luz al final del túnel. Lo logramos.

A Fernanda Romero, por tus ocurrencias y tu forma de ser que me acompañaron e hicieron más llevadera mi vida foránea, por alentarme siempre.

A mis amigos Yohali García, Ana Saucedo, Mónica Martínez, Ulises Bustamante, Ale Cerón y Blanca Jiménez por aligerar la carga que conlleva ser estudiante universitario, por su compañía y las aventuras.

A mi alma mater y mi segunda casa a lo largo de cinco años, a la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Facultad de Química por haberme brindado un espacio y herramientas que me ayudaron a cumplir mis metas.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Panorama mundial del cáncer	1
1.2 Cáncer	1
1.2.1 Cáncer de pulmón	3
1.2.1.1 Clasificación	3
1.2.1.1.1 Cáncer de pulmón en células pequeñas	4
1.2.1.1.2 Cáncer de pulmón de células no pequeñas	4
1.2.1.2 Diagnóstico	5
1.2.1.3 Tratamiento	6
1.3 Tumores neuroendócrinos de pulmón	8
1.3.1 Transdiferenciación	8
1.4 Receptores de neuropéptidos	9
1.4.1 Receptor a neuropéptido 5Y (Y5R)	10
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 General	12
3.2 Específicos	12
4. METODOLOGÍA	13
4.1 Materiales	13
4.1.1 Cultivo celular	13
4.1.2 Reactivos	13
4.2 Métodos	13

4.2.1 Transdiferenciación de células de adenocarcinoma de pulmón al fenotipo neuroendócrino	13
4.2.1.1 Mantenimiento del cultivo celular	14
4.2.1.2 Disgregación	14
4.2.2 Evaluación transdiferenciación neuroendócrina: marcadores neuroendócrinos	14
4.2.3. RT-PC	15
4.2.3.1 Extracción de ARN	15
4.2.3.1.1 Purificación de ARN	15
4.2.3.2 RT-PCR sinaptofisina y Y5R	15
4.2.4 Electroforesis productos de amplificación	17
4.2.5 Análisis estadístico	18
4.2.6 Manejo de residuos	18
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSIÓN	24
7. CONCLUSIONES	28
8. REFERENCIAS	29

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Mezcla de reacción ADNc (parte 1)	16
2. Mezcla de reacción ADNc (parte 2)	16
3. Mezcla de reacción RT-PCR	17
4. Oligonucleótidos gen de referencia, marcador neuroendócrino y receptor a neuropéptido 5Y (Y5R)	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Distribución de la incidencia y mortalidad de tipos de cánceres más comunes a nivel mundial	3
2. Transdiferenciación neuroendócrina de las células A549 por agentes que incrementan el AMPc	19
3. Validación RT-PCR	20
4. Análisis de la transdiferenciación neuroendocrina de las células A549	21
5. Análisis de la expresión del Y5R en células A549 de fenotipo neuroendócrino	22

RESUMEN

De acuerdo con las estimaciones de GLOBOCAN, el cáncer se encuentra entre las primeras razones de mortalidad en el mundo, siendo el cáncer de pulmón la principal causa de muerte a nivel mundial por cáncer en el año 2020. El diagnóstico del cáncer de pulmón generalmente no es capaz de realizarse en etapas tempranas y su tratamiento principal causa múltiples efectos secundarios. Se puede dividir al cáncer de pulmón histológicamente, por sus siglas en inglés, como cáncer de pulmón en células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), destacando de este último, a su subtipo denominado carcinoma neuroendócrino de pulmón de células grandes; este subtipo y el SCLC son clasificados como tumores neuroendócrinos de alto grado (TNE por sus siglas en inglés). Estos TNE suelen caracterizarse por formación de gránulos que secretan varios marcadores neuroendócrinos como cromogranina-A, sinaptofisina y CD56; uno de los receptores de péptidos más comunes notificados en los TNE son los receptores de neuropéptido Y (NPY), siendo Y5R uno de los tres subtipos principales de receptores NPY. La activación del receptor a neuropéptido 5Y (Y5R) aumenta la proliferación celular, mientras que su inhibición atenúa el crecimiento celular. En este estudio se demostró un aumento en la expresión de Y5R en líneas celulares A549 de fenotipo neuroendócrino empleando las técnicas de RT-PCR y electroforesis, lo que abre las puertas a futuras investigaciones para evaluar el posible papel de este neuropéptido como un objetivo farmacológico para el tratamiento, o como elemento de diagnóstico en etapa temprana de este tipo de cáncer.

1. ANTECEDENTES

1.1 Panorama mundial del cáncer

De acuerdo con las estimaciones de GLOBOCAN (Global Cancer Observatory), el cáncer es una de las causas más importantes de mortalidad en el mundo, en el año 2020 hubo 19.3 millones de nuevos casos de cáncer y alrededor de 10 millones de muertes a nivel mundial.

Tiene una tasa de mortalidad mayor de la que poseen los accidentes cerebrovasculares y las enfermedades coronarias que actualmente presentan una disminución en muchos países, en comparación del cáncer que va en aumento; GLOBOCAN estima que para el año 2040 en todo el mundo se producirán 28.4 millones de casos nuevos de cáncer, cifra que representa un aumento del 47 % con respecto a los nuevos casos presentados en el 2020. En México conforme los datos reportados por el INEGI en el año 2021, el cáncer se ubicó en el cuarto lugar de las principales causas de muerte, presentando 90,124 defunciones (INEGI, 2022; Sung y col., 2021).

1.2 Cáncer

Se denomina cáncer a la enfermedad provocada por la desregulación de las vías celulares que son críticas, es decir, de aquellas que conducen a: una mayor supervivencia y proliferación celular, una reducción de la muerte celular y a la invasión y diseminación de estas células por todo el cuerpo, resultante de la acumulación en mutaciones de secuencias específicas de ADN. Se puede considerar a esta enfermedad como un proceso evolutivo, mediante el cual las células se diversifican genéticamente, es decir, que las células de este padecimiento presentan una expresión génica desordenada (Goodall y Wickramasinghe, 2021; Hayes, 2021; Sung y col., 2021).

Estas diversificaciones derivan en su mayoría de mutaciones, siendo tres vías metabólicas las más afectadas: la vía glucolítica aeróbica, la vía catabólica de la glutamina y el metabolismo de carbono. La alteración de estas vías permite que las

células cancerosas generen grandes cantidades de macromoléculas como los aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos, así como los intermediarios metabólicos que requiere para impulsar el crecimiento acelerado y la división celular. De la misma manera el desarrollo del cáncer implica la activación de oncogenes, la inactivación de genes supresores de tumores, y el deterioro de los programas apoptóticos en las células. Unas de las vías oncogénicas que se presentan con mayor frecuencia es la cascada de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), cuando se afecta uno de sus ejes, se alteran los mecanismos de recambio, la señalización redox y la apoptosis mediada, dando como resultado la transformación, progresión y metástasis oncogénicas. La evasión de la apoptosis por las células cancerígenas es posible al regular función biosintética, la generación de energía y la dinámica de red de las mitocondrias. Por todo lo descrito, actualmente se ha buscado encontrar que moléculas o alteración de dichas moléculas desencadena alguna de las actividades previamente mencionadas. Una de las estructuras más estudiadas en la actualidad es la mitocondria, al ser el sitio de los interruptores metabólicos, se considera clave para que las células normales adquieran un fenotipo maligno. De la misma manera se han estudiado las alteraciones de las actividades que desempeñan los factores de transcripción, ya que se ha visto que estas modificaciones pueden desencadenar los subtipos de los cánceres más comunes, por ello al ser el ARN una de las transcripciones de estos factores, se demostró que para dar origen al cáncer el procesamiento de este ARN se tiene que alterar, exponiendo así su relevancia. Si bien lo mencionado anteriormente son solo algunas causas responsables de las carcinogénesis, son suficientes para ayudarnos a entender por qué esta enfermedad puede desarrollarse en cualquier parte del cuerpo humano, debido a que las moléculas alteradas se ubican en todos los tejidos, es por ello que en la actualidad existen muchos tipos de cánceres conocidos a nivel mundial, siendo uno de los más relevantes el cáncer de pulmón (Goodall y Wickramasinghe, 2021; Nam y col., 2021; Tan y col., 2021; Gyamfi y col., 2022,).

1.2.1 Cáncer de pulmón

Con un estimado de 2.2 millones de nuevos casos y 1.8 millones de muertes según las estimaciones de GLOBOCAN, el cáncer de pulmón fue segundo cáncer más comúnmente diagnosticado y la principal causa de muerte a nivel mundial por cáncer en el año 2020 (Figura 1), lo que quiere decir que de cada 10 nuevos casos diagnosticados aproximadamente uno fue cáncer de pulmón y una de cada cinco muertes presentadas (18 %) fue a causa de este tipo de cáncer. En los hombres a nivel mundial el cáncer de pulmón es la principal causa de morbilidad y mortalidad por cáncer. Aunado a lo anterior, la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón a los 5 años después del diagnóstico es solo del 10 % al 20 %. En el año 2020 en México se registraron 7 mil 588 casos nuevos y cerca 7 mil 100 muertes según las estimaciones del centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, 2021; Sung y col., 2021).

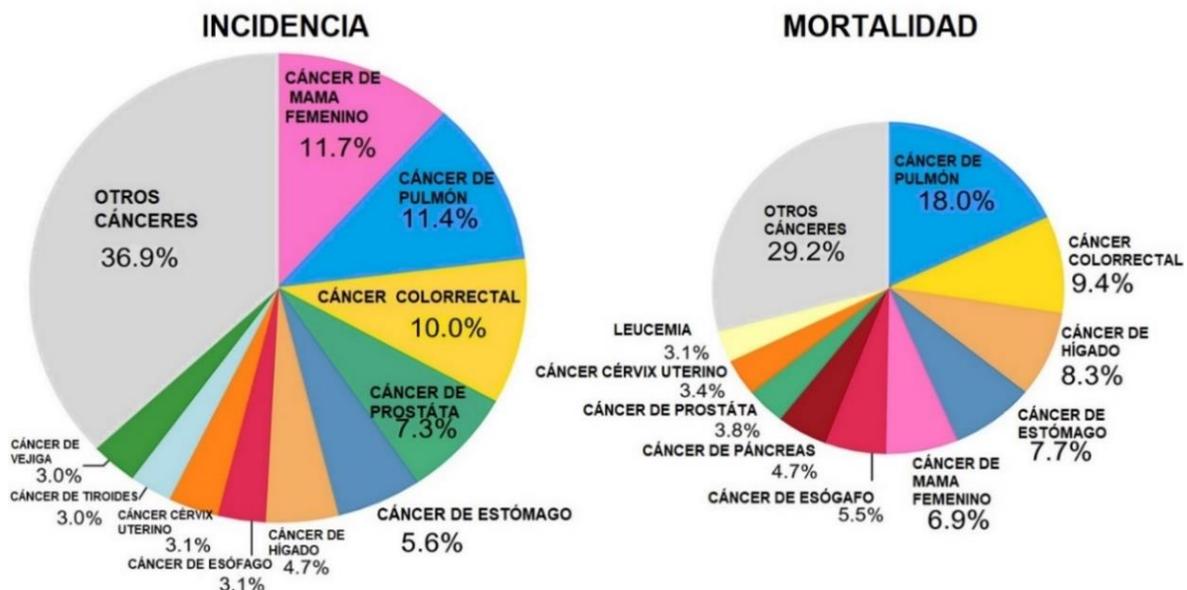


Figura 1. Distribución de la incidencia y mortalidad de tipos de cánceres más comunes a nivel mundial (Modificado de Sung y col., 2021).

1.2.1.1 Clasificación

El cáncer de pulmón se refiere a tumores que se originan en el parénquima pulmonar o dentro de los bronquios. Se puede dividir histológicamente, por sus siglas en inglés,

como cáncer de pulmón en células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), representando este último aproximadamente del 80 al 85 % de todos los cánceres de pulmón. Su fisiopatología hasta nuestros días sigue siendo muy compleja por lo que no se ha comprendido del todo, pero se sabe que las mutaciones genéticas comunes responsables del desarrollo de cáncer de pulmón son MYC, BCL2 y p53 para el cáncer de pulmón de células pequeñas; mientras que el EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), KRAS y p16 son comunes para el cáncer de pulmón de células no pequeñas (Zhang y col., 2019; Siddiqui y Siddiqui, 2021).

1.2.1.1.1 Cáncer de pulmón en células pequeñas

De acuerdo con la clasificación de tumores de pulmón emitida por la OMS en el año 2015, los SCLC se definen como carcinomas malignos con características neuroendócrinas, es decir que forman parte del grupo de las neoplasias neuroendócrinas del pulmón (NEN).

Este tipo de cáncer se caracteriza por células pequeñas con escaso citoplasma y sin nucléolos diferenciados, se clasifica en dos subtipos SCLC y SCLC combinado. Al tener un mayor tiempo de duplicación tiende a hacer metástasis temprano, por ello, se considera una enfermedad sistémica en el momento del diagnóstico. Es por lo anterior que se denomina como un tumor neuroendócrino de alto grado, debido a que los pacientes presentan un pronóstico muy precario, con una tasa de supervivencia global a 5 años de sólo el 16.4 % (Iyoda y col., 2020; Lantuejoul y col., 2020; Rudin y col., 2021; Siddiqui y Siddiqui, 2021).

1.2.1.1.2 Cáncer de pulmón de células no pequeñas

El NSCLC presenta como subtipos histológicos predominantes, al adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas (ADC y SqCC respectivamente, por sus siglas en inglés). El adenocarcinoma representa del 40 al 50 % de los casos, se caracteriza por la formación de glándulas neoplásicas, y por la expresión de marcadores de neumocitos, con o sin expresión de napsina, o mucina intracitoplasmática. Por su

parte el carcinoma de células escamosas representa del 20 al 30 % de los casos, se caracterizan por la presencia de queratina y/o desmosomas intercelulares en pruebas citológicas, o por la expresión de p40, p63, CK5, CK5/6 o desmogleína en pruebas inmunohistoquímicas. En el año 2015, la OMS clasificó a los carcinomas neuroendócrinos de pulmón de células grandes como un subtipo distinto de carcinoma pulmonar de células grandes y, por lo tanto, como un subtipo de NSCLC. Estos tumores se caracterizan por células grandes con abundante citoplasma, alta tasa mitótica y marcadores neuroendócrinos detectados por inmunohistoquímica como la cromogranina-A, sinaptofisina y CD56. Estos marcadores, junto con otros métodos son relevantes para la detección de la enfermedad, su valor diagnóstico va a depender de la etapa en la cual pueden emplearse, por ello estos tienden a ser muy diversos (Zhang y col., 2019; Ferrara y col., 2021; Siddiqui y Siddiqui, 2021).

1.2.1.2 Diagnóstico

Los principales métodos de detección del cáncer de pulmón son: examen de rayos X de tórax, tomografía computarizada de dosis baja, la citología exfoliativa de esputo, la broncoscopia y la biopsia pulmonar. La tomografía computarizada (TC) de dosis baja es actualmente el estándar de atención en el cribado de pacientes con alto riesgo de cáncer de pulmón, además la adquisición de información funcional en forma de tomografía por emisión de positrones (PET) se ha convertido en un complemento indispensable para completar la estadificación y el diagnóstico (Kanghong y col., 2021; Sim y col., 2020). Sin embargo, las formas de diagnóstico antes descritas generalmente no son capaces de identificar esta patología en etapas tempranas, de ahí surge la necesidad de encontrar nuevas herramientas de diagnóstico con alta especificidad y sensibilidad, como lo son los biomarcadores, los cuales pueden ser de gran ayuda para el diagnóstico temprano del cáncer de pulmón. Los biomarcadores “tradicionales” (tisulares y/o sanguíneos) en la última década, han servido de guía para el hallazgo de esta enfermedad, actualmente los esfuerzos se han orientado a encontrar biomarcadores solubles, que se asocien a tumores, en

muestras más accesibles y/o no invasivas: fluidos corporales (sangre, orina), líquido cefalorraquídeo y derrame pleural (Nooreldeen y col., 2021).

Para el NSCLC, la detección de mutaciones de EGFR, BRAF y MET, así como el análisis de translocaciones de ALK (quinasa del linfoma anaplásico), ROS1, RET y NTRK se han incorporado en los estándares de diagnóstico. Algunos marcadores tumorales ayudan a diferenciar el SCLC del NSCLC. Los marcadores tumorales probados con más frecuencia son el factor de transcripción tiroideo 1, CD56, sinaptofisina y cromogranina. Característicamente, el NSCLC se asocia con un síndrome paraneoplásico (Imyanitov y col., 2021; Siddiqui y Siddiqui, 2021). En conjunto, estos métodos de diagnóstico proporcionan información sobre las características histológicas, la profundidad de la invasión, el tipo de mutación y el modo de propagación; misma que es relevante para determinar el tratamiento a llevar a cabo (Ferrara y col., 2021; Siddiqui y Siddiqui, 2021).

1.2.1.3 Tratamiento

El tratamiento principal para el NSCLC, la neoplasia maligna más común de cáncer de pulmón, hasta los últimos años es la quimioterapia, donde los múltiples efectos secundarios producidos por este tratamiento llevaron al desarrollo de la biotecnología celular y molecular, mismas que han comenzado a apuntar a genes clave y moléculas reguladoras, surgiendo así los fármacos dirigidos, usados para el tratamiento en la conocida terapia dirigida. Esta terapia hace referencia al uso de medicamentos dirigidos específicamente para el tratamiento del NSCLC; la ventaja de estos fármacos sobre los usados para las quimioterapias es que pueden combinarse específicamente con los sitios cancerígenos induciendo así una muerte específica en las células cancerosas, presentado una mayor eficacia y menos efectos secundarios que la quimioterapia. Además de la terapia dirigida, se han buscado otros enfoques para el tratamiento, uno de estos han sido las vías de mutaciones específicas (Ye y col., 2021).

Al descubrirse en la década de los 2000 que mutaciones específicas son las encargadas de codificar proteínas que son críticas para el crecimiento y la replicación

celular, se ha propuesto como enfoque en los últimos años bloquear las vías, PI3K-AKT-mTOR, STAT, MAPK que conducen a la proliferación celular y la aparición de tumores, mejorando así la supervivencia en los pacientes. Las mutaciones más estudiadas en los últimos años son EGFR y ALK. La vía de señalización de EGFR puede suprimirse por los inhibidores de la tirosina quinasa entre los que se encuentra erlotinib, gefitinib y afatinib; para las mutaciones en ALK se incluyen los inhibidores específicos como crizotinib, ceritinib y alectinib (Siddiqui y Siddiqui, 2021; Ye y col., 2021).

Otro enfoque en esta terapia es el bloqueo de puntos de control inmunológicos; al regular a la baja la activación de las células T, las vías de estos puntos mantienen una tolerancia periférica, es decir, que los tumores pueden utilizar estas células para formar un estado inmunosupresor en el que los tumores crecen sin ser reconocidos y eliminados por el sistema autoinmune; por lo tanto, es un método prometedor para restaurar las respuestas inmunes antitumorales. Otro tipo de tratamiento es llevado a cabo por la inmunoterapia, la cual es la encargada de estimular el sistema inmunológico ayudándolo a reconocer las células cancerosas como extrañas, aumentando de este modo la capacidad de respuesta, en los últimos años se ha descubierto que hay varios puntos de control para disminuir la autoinmunidad y la autodestrucción de las células del cuerpo por parte de este sistema. El receptor 1 de muerte programada (PD-1) es uno de los más relevantes de estos puntos por estar involucrado en la regulación a la baja de las células T y por ser el encargado de promover la auto-tolerancia al interactuar con dos proteínas: PD-L1 y PD-L2, dando como resultado la inactivación de las células T activadas. Como tratamiento específico existen anticuerpos aprobados para PD-1 y su ligando, que inhiben el receptor PD-1 directamente o se unen a PD-L1 evitando así que inhabilite la célula T activada, de los más mencionados encontramos a: nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab y alectinib (Huang y col., 2021; Siddiqui y Siddiqui, 2021).

Para el cáncer de pulmón de células pequeñas, muchos estudios mostraron que tienen un efecto notable en el tratamiento del SCLC, las combinaciones de multi-ICI

con inmunoterapia / quimiorradioterapia; así como la combinación inmunoterapia y terapia dirigida (Siddiqui y Siddiqui, 2021).

1.3 Tumores neuroendócrinos de pulmón

Los TNE son neoplasias que se originan en las células productoras de hormonas del sistema endocrino. Se conocen tres hipótesis que explican la aparición de TNE. La primera hipótesis se basa en el supuesto de que estas neoplasias derivan de células neuroendócrinas maduras que sufren una transdiferenciación debido a la aparición de mutaciones, la segunda hipótesis propone que se derivan de los progenitores de las células neuroendócrinas que sufren mutaciones y por último se cree que pueden derivar de células no neuroendócrinas que adquieren características neuroendócrinas durante la carcinogénesis debido a la pérdida de ciertos genes. Como se mencionó anteriormente el SCLC y los carcinomas neuroendócrinos de pulmón de células grandes, un subtipo de NSCLC, se clasifican como tumores neuroendócrinos de alto grado. Los TNE constituyen una familia heterogénea de neoplasias que van desde lesiones bastante leves con una larga esperanza de vida hasta tumores extremadamente agresivos. Estos tumores suelen caracterizarse por la formación de gránulos que secretan varios marcadores neuroendócrinos tales como la sinaptofisina, cromagranina, NSE; así como de la producción de hormonas peptídicas y / o aminas biogénicas (Pelosi y col., 2017; Mendieta y col., 2018; Patel y Galoian, 2018; Bellizzi, 2020; Iyoda y col., 2020; Savu y col., 2022). Los modelos de ratón de SCLC humano proporcionan pruebas sólidas para apoyar un modelo en el que el SCLC puede originarse a partir de células las neuroendócrinas de pulmón (PNECs) que comprenden una población única en el pulmón. Es decir, que las células diana malignas sufrieron una transdiferenciación de las PNECs (Yao y col., 2018; Chen y col., 2019; Herrera-Martínez y col., 2019).

1.3.1 Transdiferenciación

Las células se pueden convertir de uno a otro linaje por medio de la reprogramación de linaje, en este término se incluye la transdiferenciación donde hay una

reprogramación de tipos celulares especializados, es decir, se presenta una diferenciación morfológica y molecular completa entre las células iniciales y finales. Tanto las mutaciones somáticas como la señalización extracelular pueden participar en la inducción de la reprogramación del linaje; en el caso de las PNECs se desconoce los mecanismos moleculares que controlan su transdiferenciación para la generación del SCLC (Yao y col., 2018, Hybiak y col., 2020). La transdiferenciación puede ser llevada a cabo actualmente en los laboratorios; entre una de sus funciones se encuentra el estudio en el microambiente tumoral de las hormonas peptídicas y / o aminas biogénicas producidas por los tumores neurogénicos, debido a que estos podrían estar relacionados con la progresión del cáncer. Para lograr cambios tan considerables en el fenotipo celular y lograr la transdiferenciación se requieren factores que conduzcan a la pérdida de la identidad antigua para la inducción de una nueva identidad (Pelosi y col., 2017; Bellizzi, 2020; Hybiak y col., 2020). La transdiferenciación de células de adenocarcinoma de pulmón al fenotipo neuroendócrino se puede realizar in vitro al exponer las células a agentes que elevan o imitan el cAMP intracelular, como lo son isobutilmetilxantina y forskolina, agotamiento de andrógenos, radiación ionizante e inhibición por contacto promovida por una alta densidad celular (Mendieta y col., 2018; Hybiak y col., 2020).

1.4 Receptores de neuropéptidos

Como se mencionó anteriormente los tumores del fenotipo neuroendócrino suelen caracterizarse por la formación de gránulos, conocidos por sus siglas en inglés ESG (gránulos secretores endocrinos) que expresan varios marcadores neuroendócrinos y secretan hormonas peptídicas y / o aminas biogénicas. Uno de los receptores de péptidos más comunes notificados en los TNE son los receptores de neuropéptido Y. Los neuropéptidos son factores cruciales en la estimulación y en la supresión del crecimiento tumoral, el sistema nervioso promueve la metástasis al modular las cascadas metastásicas a través de la liberación neuropéptidos de las fibras nerviosas que rodean e incrustan al tumor. En resumen, la secreción de neuropéptidos puede influir en el crecimiento metastásico y la invasividad, lo que es un rasgo muy

característico de los TNE, por ello puede ser un importante objetivo farmacológico para el tratamiento de este tipo de tumor (Pelosi y col., 2017; Bellizzi, 2020; Gao y col., 2022).

1.4.1 Receptor neuropéptido 5Y (Y5R).

El neuropéptido Y (NPY) es un péptido de 36 aminoácidos amidados en el extremo COOH, sus acciones están mediadas por al menos seis tipos diferentes de receptores (Y1R-Y6R) que están acoplados a proteínas G. Se ha reportado sobreexpresión de neuropéptido Y (NPY) y su sistema receptor en varios tipos de cánceres; estudios recientes han demostrado que el neuropéptido Y actúa como supresor del cáncer en el cáncer de mama y los efectos están mediados por los receptores 1 y 5 del neuropéptido Y (Y1R y Y5R). Y1R, Y2R e Y5R son los tres subtipos principales de receptores NPY que median las funciones biológicas de NPY en humanos y ratas. Se observó expresión de Y5R en las líneas celulares MCF-7, T47D, MDA-MB-231, MDA-MB-468, HS578T y BT-549. En líneas celulares, la activación de Y5R aumenta la actividad de la quinasa regulada por señal extracelular (ERK) 1/2 y la proliferación celular, mientras que su inhibición atenúa el crecimiento celular. Sin embargo, aún se desconoce si el receptor Y5R se expresa en líneas celulares de A549 fenotipo neuroendócrino. Conocerlo abre las puertas a futuras investigaciones para evaluar el papel de este neuropéptido como un objetivo farmacológico para el tratamiento de una manera menos invasiva para el paciente oncológico, permitiéndole así una mejor calidad de vida; o como diagnóstico en etapas tempranas que permita disminuir la tasa de mortalidad de este tipo de cáncer (Sheriff y col., 2010; Pelosi y col., 2017; Gao y col., 2022).

2. HIPÓTESIS

El receptor a neuropéptido 5Y (Y5R) se expresa en una línea celular A549 de fenotipo neuroendócrino.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Identificar la expresión del receptor a neuropéptido Y5 (Y5R) en línea celular A549 de fenotipo neuroendócrino.

3.2 Específicos

- Evaluar la transdiferenciación de la línea celular A549 fenotipo neuroendócrino mediante la expresión de marcador neuroendócrino (sinaptofisina) por RT-PCR.
- Determinar la expresión del receptor a neuropéptido Y5R en los productos de amplificación por electroforesis.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano A549 en las siguientes condiciones de cultivo: Medio DMEM (GIBCO, 11995-065 500 mL) suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (Mendieta y col., 2018).

4.1.2 Reactivos

Se emplearon los siguientes reactivos, para el cultivo celular y tratamiento: DMEM (GIBCO, 11995-065 500 mL), suero fetal bovino (FBS), azul de tripano (SIGMA, T6146-25G), 3-isobutil-1-metilxantina (SIGMA, I5879-100MG), forskolina (MCE, HY-15371), tripsina (SIGMA, T4049-500 mL). Para la extracción de RNA y RT-PCR: TRI Reagent (ZYMO RESEARCH, R2050-1-50), RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermoscientific, K1622), GoTaq Green Master Mix (Promega, M7122) y para la electroforesis: EZ Load Precision Molecular Mass Ruler (BioRad, 1708356), agarosa (SIGMA, A9539-100G), DNA typing grade (Life Technologies, 24710-030).

Los cebadores de sinaptofisina y GADPH utilizados en la RT-PCR se obtuvieron de Invitrogen y T4 oligo, respectivamente.

4.2 Métodos

4.2.1 Transdiferenciación de células de adenocarcinoma de pulmón al fenotipo neuroendócrino

Para inducir el fenotipo neuroendócrino, se sembraron por triplicado células de adenocarcinoma de pulmón humano A549 a una densidad de 2.5×10^5 células/mL en placas de 6 pocillos, en alícuotas de 2000 µL en DMEM, para proceder con su incubación por 24 horas a 37 °C y 5 % CO₂; transcurrido el tiempo se lavaron los pocillos con 500 µL de PBS. Posterior al lavado, se trataron las células con DMEM

suplementado con: 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, 0,5 mM), forskolina (FSK, 0,5 mM) e IBMX + FSK (I + F) en medio fresco, se realizó un cambio de medio suplementado a las 48 horas. El tratamiento tuvo una duración de 96 horas, en las cuales se evaluaron los cambios morfológicos contra un grupo control en DMEM sin suero fetal bovino; así como la conservación de los cambios morfológicos (redondeo del cuerpo celular y formación de proyecciones similares a neuritas) a las 24 h después de la retirada del tratamiento (Mendieta, 2018).

4.2.1.1 Mantenimiento del cultivo celular

La línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano A549 se mantuvo en incubación a 37 °C y 5 % de CO₂. El medio se renovó en función del crecimiento celular, cuando el cultivo se encuentre al 80 % de confluencia, se disgregaron las células mecánicamente, aspirándolas y descargándolas suavemente contra fondo de la caja con una micropipeta (Mendieta y col., 2018).

4.2.1.2 Disgregación

Se retiró y desechó el medio de cultivo aspirándolo para lavar la monocapa celular con 500 µL de PBS; a continuación, se agregaron 500 µL de tripsina y se incubó de 5 a 15 minutos 37 °C y 5 % CO₂ de atmósfera húmeda hasta que la capa de células se dispersó. Se agregó 1:1 el medio cultivo y se disgregaron las células pipeteando suavemente. Se agregaron las alícuotas apropiadas de la suspensión celular a nuevos recipientes a una confluencia entre 2x10³ y 1x10⁴ células viables/cm² (ATCC, 2021).

4.2.2 Evaluación transdiferenciación neuroendócrina: marcadores neuroendócrinos

La expresión del marcador neuroendócrino sinaptofisina se evaluó por medio RT-PCR. El ARN total se aisló usando el reactivo trizol como se describirá posteriormente. Se usaron dos microgramos de ARN total del fenotipo neuroendócrino, de las células sin transdiferenciar (grupo control) y de la línea celular SK-N-AS (control positivo) para la síntesis de ADNc. Se utilizaron 10 µL para examinar la expresión de sinaptofisina (Fisher Scientific SL, 2020).

4.2.3. RT-PCR

4.2.3.1 Extracción del ARN

Se lisaron las células A549 de fenotipo neuroendócrino, del grupo control y del control positivo (línea celular SK-N-AS), resuspendiendo las células sedimentadas con 300 μL de trizol por cada 10^6 células aproximadamente y se mezcló completamente para proceder a la purificación de ARN (Zymo research, 2021).

4.2.3.1.1 Purificación del ARN

Se agregó un volumen igual de etanol (95-100 %) a la muestra lisada en trizol y se mezcló bien. Posteriormente se transfirió la mezcla a una columna Zymo-Spin IIC en un tubo de recolección y se centrifugó. Esta columna se transfirió a un nuevo tubo de recolección y se desechó el sobrenadante. A continuación, se realizó el tratamiento con DNasa I, para ello se añadieron 400 μL RNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó durante 2 minutos a 12,000 rpm. En un tubo libre de ARNasa, se agregaron 5 μL de DNasa I (6 U/ μL) y 75 μL de DNA Digestion Buffer, se mezclaron con inversión suave. Esta mezcla se agregó directamente a la matriz de la columna y se incubó a temperatura ambiente (20-30 °C) durante 15 minutos. Cumplido el tiempo de incubación se añadieron 400 μL de Direct-zol RNA PreWash a la columna y se centrifugó; el sobrenadante se desechó. Finalmente, se añadieron 700 μL de RNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó durante 1 minuto a 12,000 rpm, finalizado el tiempo, la columna se transfirió con cuidado a un tubo libre de ARNasa. Para eluir el ARN, se agregaron 50 μL de agua libre de DNAasa/RNAasa directamente a la matriz de la columna y se centrifugó 2 minutos a 12,000 rpm (Zymo Research, 2021).

4.2.3.2 RT-PCR sinaptofisina y Y5R.

Se obtuvo el ADN complementario (ADNc) siguiendo las instrucciones del fabricante para el kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis. A un tubo estéril libre nucleasas que se encontraba en hielo, se le agregaron en el siguiente orden: 1 μL del ARN purificado, 1 μL de Oligo (dt₁₈) primer y agua libre de nucleasas hasta completar los

12 μ L (Cuadro 1); esta mezcla se incubó a 65 °C durante 5 min y se enfrió en hielo durante 1 min.

Cuadro 1. Mezcla de reacción ADNc (parte 1).

Reactivo	Cantidad
ARN purificado (2 μ g)	1 μ L
Oligo (dt ₁₈) primer (100 μ M)	1 μ L
Agua libre de nucleasas	Hasta completar los 12 μ L
Volumen total	12 μ L

A continuación, se le añadieron en el siguiente orden: 4 μ L de tampón de reacción 5x, 1 μ L de inhibidor de ARNasa RiboLock (20 U/ μ L), 2 μ L de 10 mM dNTP Mix y 1 μ L RevertAid M-MuLV RT (200 U/ μ L) (Cuadro 2); se mezclaron y centrifugaron brevemente. Posteriormente, se procedió a incubar durante 60 min a 42 °C la mezcla; transcurrido este tiempo se calentó a 70 °C durante 5 min. El producto se almacenó a -20 °C para la PCR posterior (Fisher Scientific SL, 2020).

Cuadro 2. Mezcla de reacción ADNc (parte 2).

Reactivo	Cantidad
Tampón de reacción 5x	4 μ L
Inhibidor de ARNasa RiboLock (20 U/ μ L)	1 μ L
dNTP Mix (10 mM)	2 μ L
RevertAid M-MuLV RT (200 U/ μ L)	1 μ L
Volumen total	20 μ L

Para analizar la expresión del receptor para neuropéptido Y5R en líneas celulares A549 fenotipo neuroendócrino se siguieron las instrucciones del fabricante para el GoTaq Green Master Mix. Se realizó la mezcla de reacción que se describe en el Cuadro 3. Los oligonucleótidos (primers) correspondientes a GAPDH y Y5R fueron diseñados (Cuadro 4), Y5R se diseñó con Primer-BLAST, tomando en cuenta para su diseño las plantillas de BLAST correspondientes a las secuencias NM_001317091.2, NM_001317092.2, NM_006174.4, XM_011532017.2, XM_005263038.3, XM_017008256.1, XM_017008255.1 y XM_011532015. Por su parte los oligonucleótidos de sinaptofisina fueron tomados de la literatura.

Se uso gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen de referencia.

Cuadro 3. Mezcla de reacción RT-PCR.

Reactivo	Cantidad
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12.5 µL
Upstream primer, 10 µM	0.25-2.5 µL
Downstream primer, 10 µM	0.25-2.5 µL
ARN molde	1-5 µL
Agua libre de nucleasas	Hasta completar los 25 µL

El programa de PCR consistió en 30 ciclos de una desnaturalización inicial de 30 segundos a 95 °C, hibridación de 1 min a 60 °C y 5 min de extensión a 72 °C (Promega, 2022).

Cuadro 4. Oligonucleótidos gen de referencia, marcador neuroendócrino y receptor a neuropéptido 5Y (Y5R).

Primer Marcador	Forward 5' ⇒ 3'	Reverse 3' ⇒ 5'	Amplicón esperado (pb)
Sinaptofisina (Rodríguez, 2022)	AGACAGGGAAC ACATGCAAG	TCTCCTTAAAC ACGAACCACAG	123
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	CCACTCCTCCAC CTTTGAC	TCCTCTTGTGC TGCTCTTGCTG G	181
Receptor a neuropéptido 5Y (Y5R)	AGTCTTCTTGGC TTTATGGG	GCCATGGTTTG CTGTT AAAT	315

4.2.4 Electroforesis productos de amplificación.

El análisis de los productos de amplificación se realizó por electroforesis en un gel de agarosa a una concentración porcentual p/v de 2 % con el buffer TAE. Se cargaron en los pocillos correspondientes, 10 µL de los productos de amplificación y 3 µL del marcador molecular EZ Load Precision Molecular Mass Ruler. Se corrió hasta que el tinte migró a una distancia adecuada, posteriormente, se sumergió el gel en una solución de bromuro de etidio. Se visualizó el gel en el sistema de documentación de geles Gel Doc XR+ de Bio Rad (Lee, 2012; Promega, 2022).

4.2.5 Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de los resultados mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para las comparaciones entre grupos, las diferencias con $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas utilizando el software Graphpad (Mendieta y col., 2018; Sheriff y col., 2010).

Los niveles relativos de ARNm se normalizaron al nivel de ARNm de GADPH.

4.2.6 Manejo de residuos

Los desechos que se produjeron en la realización de este trabajo de investigación se trataron de acuerdo con las pautas que establece el “Manual de manejo de residuos peligrosos biológicos infecciosos (RPBI) para laboratorios de docencia e investigación” y el “Manual de manejo de residuos peligrosos (RP) para laboratorios de docencia e investigación” de la Facultad de Química.

5. RESULTADOS

El progreso de transdiferenciación de células A549, inducido a causa de 96 horas del tratamiento por DMEM suplementado con IBMX (0.5 mM) y/o FSK (0.5 mM) se observa en la Figura 2. Se evaluaron los cambios morfológicos mediante micrografías a 40 X, las células de los tres grupos de tratamiento mostraron aumento del tamaño, redondeo del cuerpo celular y proyecciones tipo neurita, en comparación con el grupo control al transcurrir el periodo de tratamiento. Así mismo, se visualiza una disminución de la proliferación celular en los grupos tratados.

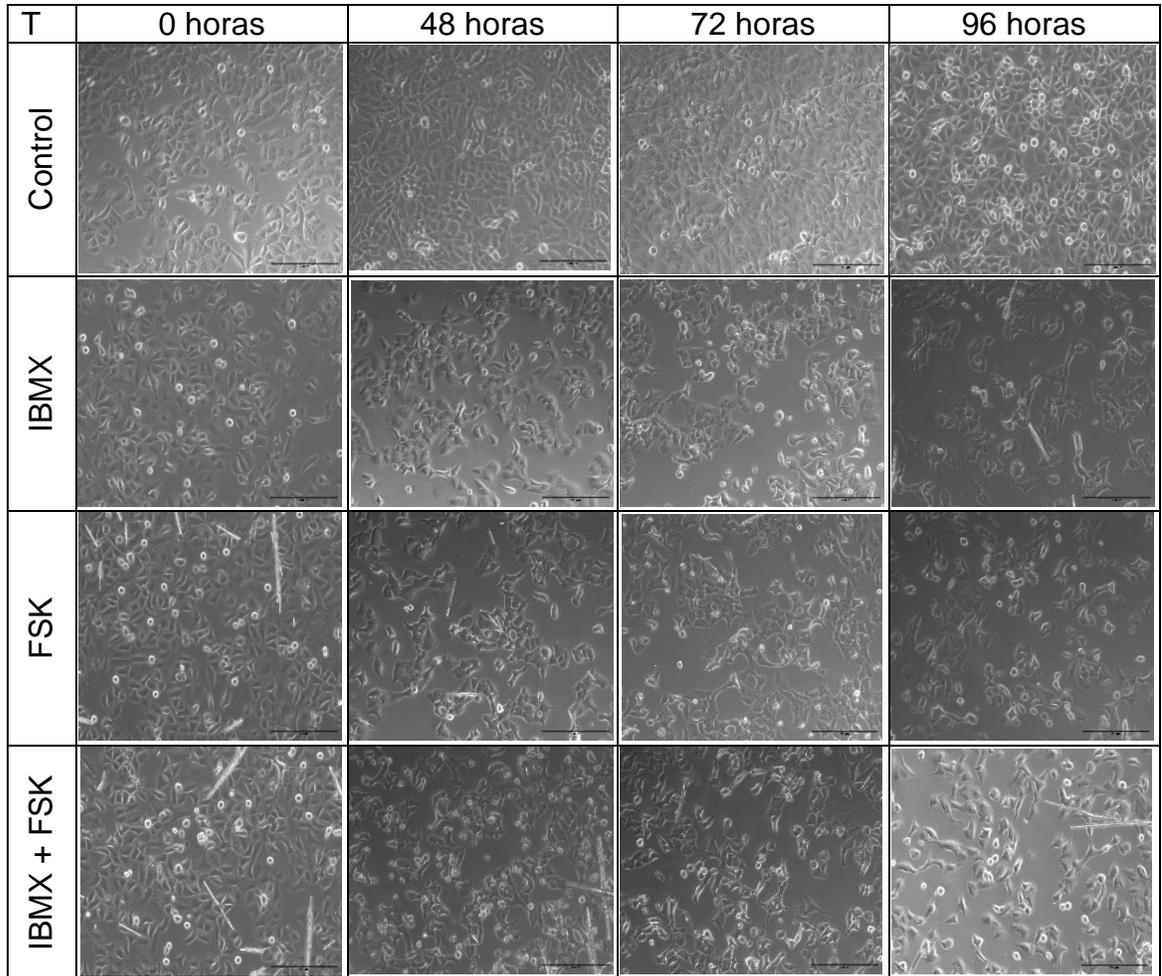


Figura 2. Transdiferenciación neuroendócrina de las células A549 por agentes que incrementan el AMPc.

La validación de la RT-PCR a través del control positivo y negativo de expresión se presenta en la Figura 3. La ausencia de expresión en el control negativo y la banda en el control positivo (SK-N-AS) en GADPH, demostró que la amplificación que se observó en los grupos tratados y en el control en la Figura 3 era correspondiente a la presencia de ADNc en las muestras. Dando así fiabilidad a los datos, descartando que las bandas obtenidas en experimentos posteriores fueron por algún tipo de contaminación.

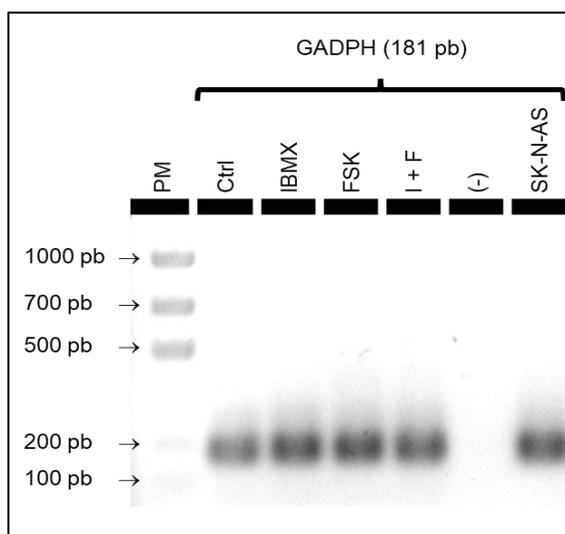


Figura 3. Validación RT-PCR. PM: marcador de peso molecular, GADPH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, Ctrl: control, IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina, (-): control negativo y SK-N-AS: control positivo.

Una imagen representativa del gel de agarosa al 2 % de los productos de la RT-PCR (30 ciclos) y un gráfico de barras para el análisis de la expresión de los genes de las células A549 y A549 fenotipo neuroendócrino, se representa en la Figura 4A y 4B respectivamente. En la Figura 4A la ausencia de expresión en el control negativo y la banda a 123 pb en el control positivo (SK-N-AS), corroboró que las amplificaciones obtenidas eran las correspondientes a SYP, descartando alguna contaminación. En la Figura 4B se percibe un incremento en la expresión relativa de sinaptofisina en los grupos tratados en comparación con el grupo control. El grupo tratado que presentó mayor expresión de SYP fue el combinado (IBMX + FSK), en contra parte con el menos expresado que fue el tratamiento con IBMX.

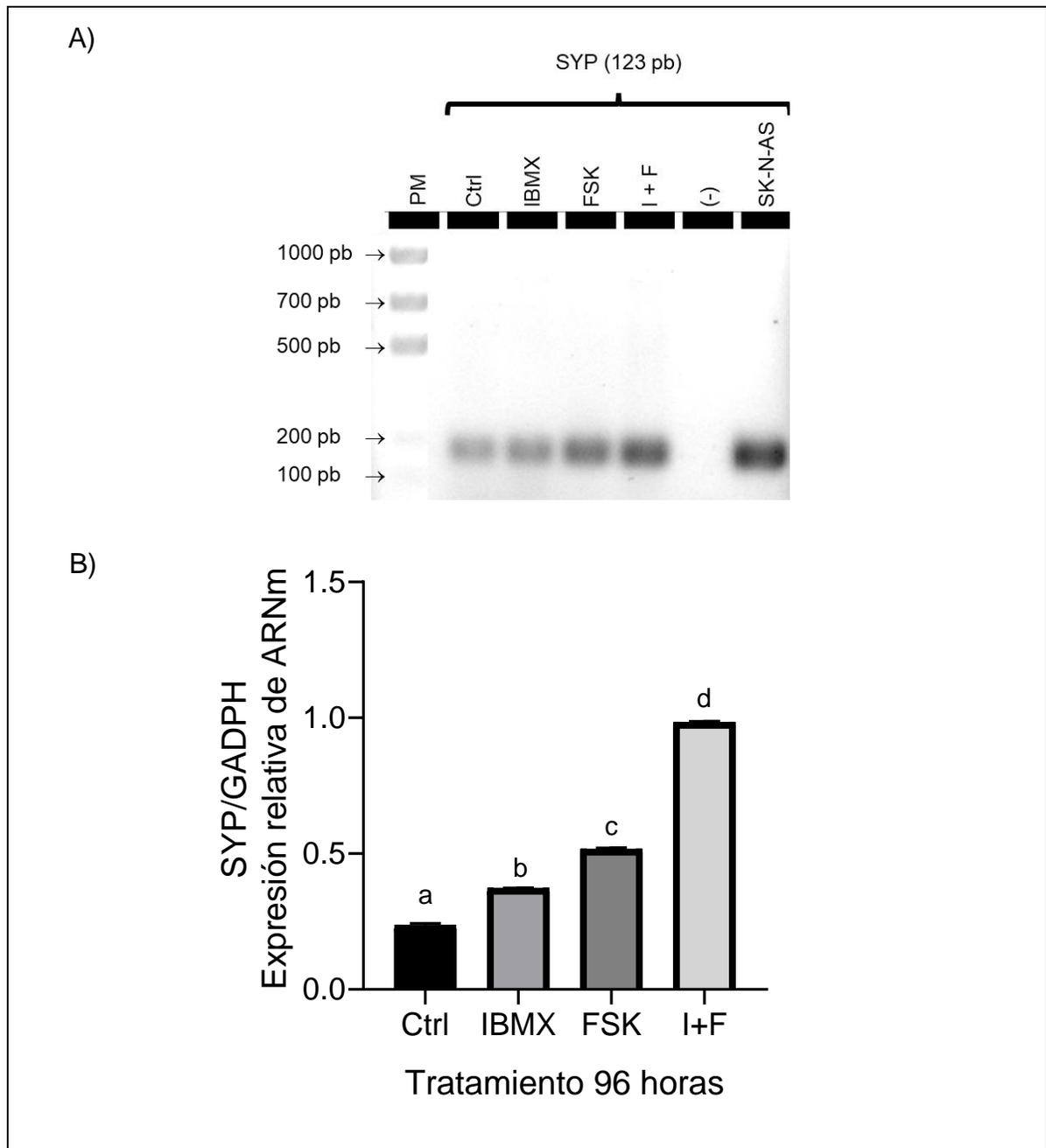


Figura 4. Análisis de la transdiferenciación neuroendócrina en células A549. PM: marcador de peso molecular, Ctrl: control, SYP: sinaptofisina, FSK: forskolina; IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina, SK-N-AS: control positivo y (-): control negativo. Para el análisis se empleó ANOVA de una vía y Tukey como análisis post hoc, diferencia significativa ($p < 0.05$), $n = 3$ por triplicado. Letras diferentes para representar diferencia significativa entre todos los grupos ($p < 0.01$).

Imagen representativa del gel de agarosa al 2 % de los productos de la RT-PCR (30 ciclos) y un gráfico de barras para el análisis de la expresión de los genes de las células A549 y A549 fenotipo neuroendócrino, se representa en la Figura 5A y 5B respectivamente. En la Figura 5A la ausencia de banda en el control negativo y expresión a 315 pb en el control positivo (SK-N-AS), demostró que las bandas obtenidas eran las correspondientes a Y5R, descartando algún tipo de contaminación. En la Figura 5B se percibe un incremento en la expresión relativa del gen de interés en los grupos tratados en comparación con el grupo control. El grupo tratado que presentó mayor expresión de Y5R fue el combinado, contrario con IBMX que fue el que presentó menor expresión.

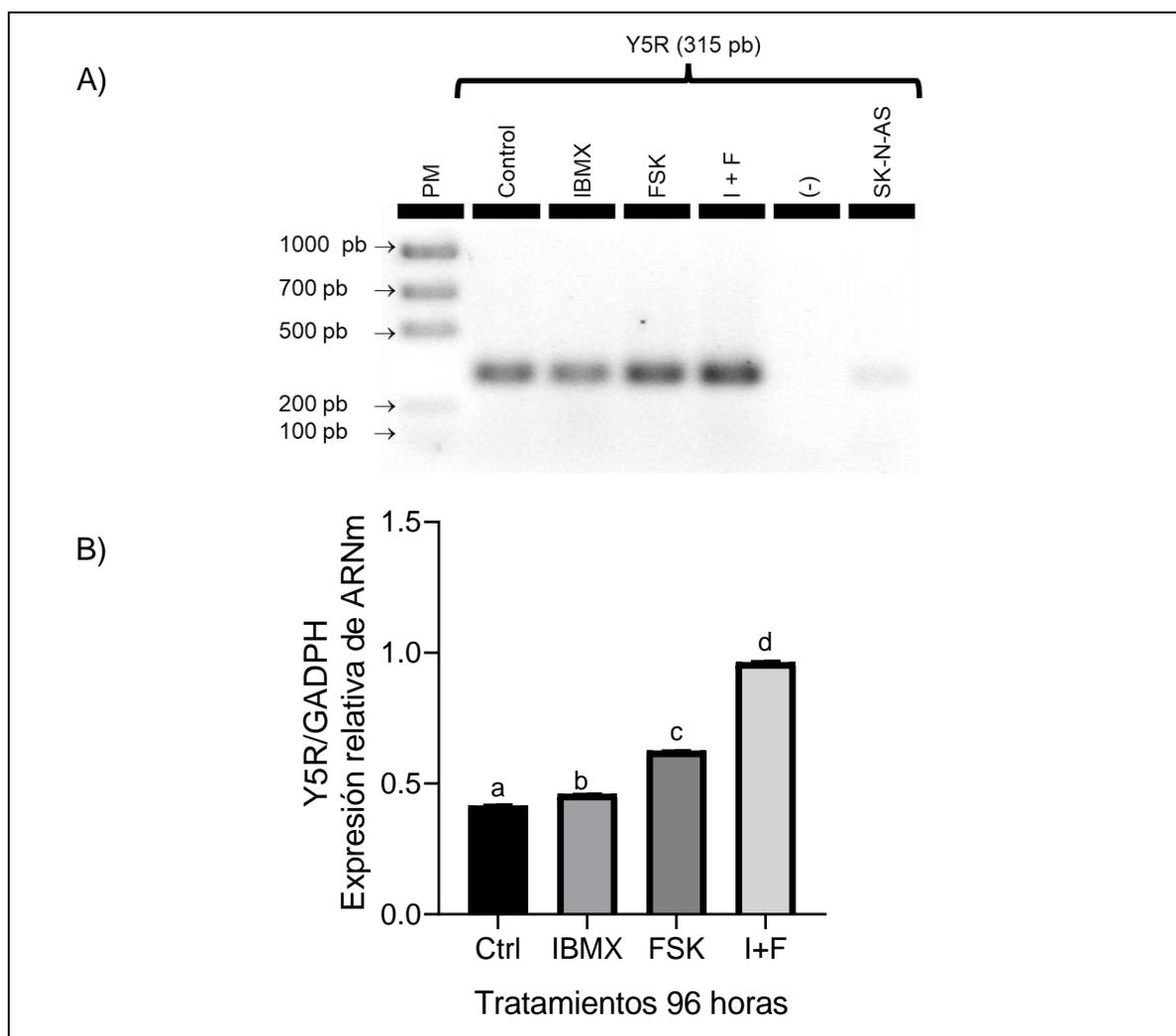


Figura 5. Análisis de la expresión del Y5R en células A549 de fenotipo neuroendócrino. PM: marcador de peso molecular, Ctrl: control, Y5R: receptor a

neuropéptido 5Y, FSK: forskolina; IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina, SK-N-AS: control positivo y (-): control negativo. Para el análisis se empleó ANOVA de una vía y Tukey como análisis post hoc, diferencia significativa ($p < 0.05$), $n = 3$ por triplicado. Letras diferentes para representar diferencia significativa entre todos los grupos ($p < 0.01$).

6. DISCUSIÓN

Para determinar la expresión del receptor a neuropéptido Y5 (Y5R) en línea celular A549 de fenotipo neuroendócrino, se realizó el tratamiento para la conversión de la línea celular al linaje requerido. En la Figura 2 se observa el progreso de transdiferenciación de células A549 con dos agentes elevadores de las concentraciones intracelulares. A las 96 horas de tratamiento, las células de los tres grupos IBMX, FSK e IBMX + FSK, mostraron características neuroendócrinas que consistieron en aumento del tamaño, redondeo del cuerpo celular y proyecciones tipo neurita, en comparación con el grupo control. De acuerdo con Mendieta y colaboradores, la elevación sostenida de AMPc intracelular por FSK, (un agonista de adenilato ciclasa) o IBMX (inhibidor de fosfodiesterasas), fue la encargada de promover la adquisición de estas características neuroendócrinas a través de dos mecanismos (Figura 5): mediante una vía clásica que involucra la liberación de las subunidades catalíticas de PKA (proteína quinasa A) o una vía alternativa que promueve la activación de la vía EPAC (factor de intercambio de guanina). La activación de PKA (se observa en la Figura 5 con línea continua) promueve la fosforilación de la serina 133 del elemento de respuesta a cAMP (CREB), lo que a su vez estimula la translocación de factores de transcripción básicos altamente conservados con hélice-bucle-hélice (factores de transcripción bHLH), como ND1 (neuro D1) y ASCL1 (homólogo 1 de Achaete-scute), encargados de regular al alza la expresión de moléculas como NCAM1 (molécula de adhesión de células neurales 1) y SYP, respectivamente. Por otro lado, CREB promueve, la disminución del factor de transcripción de silenciamiento de RE1 (REST). La baja de este factor de transcripción silenciado REST contribuye a la regulación positiva de SYP. El otro mecanismo descrito en otras líneas celulares (se observa en la Figura 5 con línea discontinua) establece que la elevación del AMPc intracelular promueve simultáneamente la unión de AMPc a un factor de intercambio de guanina específico de Rap1 (pequeña proteína relacionada con GTPasa Ras), a través de EPAC1. El Rap1 unido a GTP estimula el efector B-Raf para activar MEK y Erk1/2 (proteínas quinasas activadas por mitógeno), para regular al alza la transcripción de dos genes,

Egr1 y Vili2 (proteína de respuesta de crecimiento temprano 1 y vilin2) que promueven el crecimiento de neuritas y aumentan el tamaño celular (Mendieta, 2018; Mendieta y col., 2018; Mendieta y col., 2021; Gheorghişan-Gălăţeanu y col, 2023). Por otro lado, se observó en la Figura 2, la disminución de la confluencia conforme avanzaba el tratamiento, esto se debe a una inhibición de la proliferación celular reportada por Mendieta en experimentos previos. El tratamiento de las células con FSK e IBMX + FSK inhibe la proliferación después de 48 horas con respecto al control, mientras que IBMX inhibe la proliferación después de 72 horas de manera significativa (Tio y col., 2010; Mendieta, 2018; Mendieta y col., 2021).

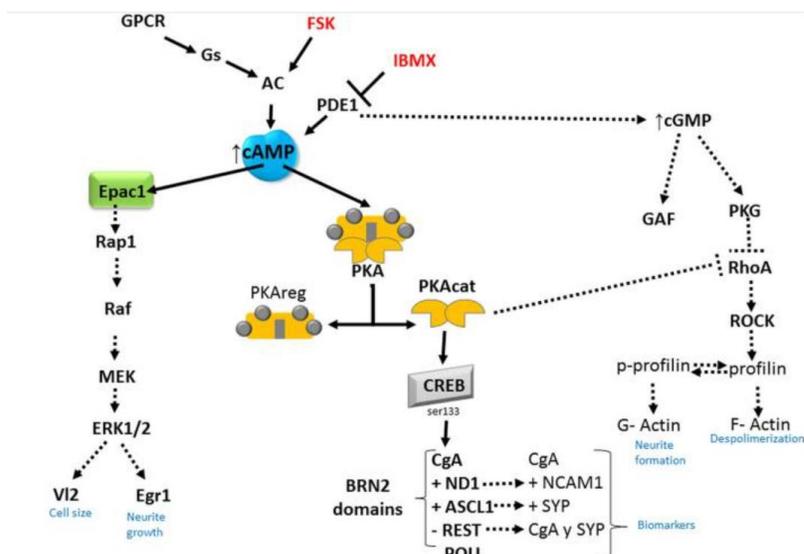


Figura 5. Mecanismos propuestos de la transdiferenciación neuroendócrina por agentes elevadores de AMPc (Mendieta y col., 2018).

Para determinar si los cambios morfológicos observados se deben a la transdiferenciación, se cuantificó el marcador neuroendócrino sinaptofisina. Como se mencionó anteriormente, al someter a una célula a este tipo de tratamiento, se da como resultado de las reacciones moleculares, un alza en la expresión de este gen. Se visualiza en la Figura 4A y 4B, que los tres grupos presentan entre si una diferencia significativa en la expresión de SYP, con respecto al grupo control y entre ellos ($p < 0.05$), siendo el grupo con el tratamiento combinado con más expresión,

esto como resultado de un efecto aditivo entre los dos agentes que elevan del AMPc como se explicó anteriormente. Con los cambios morfológicos mostrados por las células y por la sobreexpresión de SYP, queda demostrando la adquisición del fenotipo neuroendócrino en las células A549 (Ishii y col., 2022; Gheorghisan-Gălăţeanu y col, 2023).

Posteriormente, se analizó la expresión del gen de interés: el receptor a neuropéptido 5Y (Y5R). Si bien la presencia de este receptor ha sido confirmada en otras líneas celulares, en este trabajo se tuvo como objetivo demostrar su presencia en una línea celular A549 NED (fenotipo neuroendócrino) por su posible relevancia diagnóstica y objetivo farmacológico. En la Figura 5A y 5B se muestra la expresión de Y5R en las células A549 NED obtenidas por diversos tratamientos. Se puede visualizar en la Figura 5B, que existe una diferencia significativa en la expresión de este neuropéptido entre los grupos tratados y el grupo control ($p < 0.05$), por lo que se puede afirmar que la expresión de esta proteína aumenta en una línea celular A549 neuroendócrina. Este tipo de línea celular presenta ESG (gránulos secretores endocrinos, por sus siglas en inglés), orgánulos encargados de secretar moléculas de forma selectiva. Entre estos se encuentran aquellos encargados de liberar neurotransmisores peptídicos, como lo son los receptores a neuropéptido Y5 (Y5R). Si bien el mecanismo del porque la transdiferenciación lleva al alza la expresión de estos gránulos no se ha dilucidado aún, hallazgos recientes en células no neuroendócrinas han demostrado que moléculas relacionadas con la expresión de ESG están controlados por REST, por lo que los mecanismos de expresión de REST podrían ayudar a explicar el alza de la expresión de Y5R. Lo anterior fue explicado por Ishii y col., en su estudio utilizaron H1299, una línea celular de cáncer no neuroendócrino (no NEC) derivada del pulmón, sus resultados arrojaron que la desactivación de REST es indispensable para la expresión ESG en células no endocrinas. Por lo que se podría deducir que una célula que presente una desactivación de REST, aumentará la expresión de estos gránulos; como lo es la línea celular A549 NED. Hay que recordar que al transdiferenciar esta línea celular con IBMX y FSK, se activó PKA lo que a su vez promovió la fosforilación de la serina 133 del elemento de respuesta a cAMP (CREB), que resultó en la baja de REST

(explicado a detalle anteriormente). Como REST no se encontraba disminuido potencialmente en el grupo control (se ha demostrado la presencia de ESG en líneas celulares no NEC), este expresó el neuropéptido en menor cantidad que los grupos tratados, quienes ya presentaban un alza en el factor. De los tres grupos, el que presentó una mayor expresión del Y5R fue el tratamiento combinado, al tener un efecto doble por ambos tratamientos en la disminución de REST (Figura 4B) (Kashiwagi y col., 2012; Volante y col, 2021; Ishii y col., 2022). Es importante aclarar que los resultados de Y5R tienden a ser muy variables entre cada experimento, por lo que los valores obtenidos pueden no representar de manera idónea la expresión del gen.

Como se puede ver, el mecanismo de inhibición de REST en un futuro puede ayudar a dilucidar por completo la manera en que se da la transdiferenciación de los adenocarcinomas de pulmón a los fenotipos neuroendócrinos.

7. CONCLUSIONES

1. Se transfirió una línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano A549 a su fenotipo neuroendócrino a través del tratamiento en DMEM suplementado con IBMX (0.5 mM) y/o FSK (0.5 mM).
2. Se comprobó la obtención del fenotipo neuroendócrino por la presencia de su morfología celular característica (aumento del tamaño, redondeo del cuerpo celular y proyecciones tipo neurita) así como la expresión del marcador neuroendócrino sinaptofisina.
3. La expresión del receptor a neuropéptido 5Y (Y5R) incrementó en la línea celular A549 fenotipo neuroendócrino.
4. Se observó una diferencia significativa, en la expresión del marcador neuroendócrino sinaptofisina y el receptor a neuropéptido 5Y (Y5R) entre todos los grupos tratados.
5. El tratamiento combinado IBMX (0.5 mM) + FSK (0.5 mM) presentó una mayor expresión del marcador neuroendócrino sinaptofisina y del receptor a neuropéptido 5Y (Y5R).

8. REFERENCIAS

ATCC. A549: CCL-185™ [monografía en internet]. Manassas: ATCC 2021, **2021** [consultado 2022 enero 05]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/ccl-185>

Bellizzi A.M. Immunohistochemistry in the diagnosis and classification of neuroendocrine neoplasms: what can brown do for you? *Hum Pathol.* **2020**;96:8-33.

Chen HJ, Poran A, Unni AM, Huang SX, Element O, Snoeck HW, Varmus H. Generation of pulmonary neuroendocrine cells and SCLC-like tumors from human embryonic stem cells. *J Exp Med.* **2019**;216:674-687.

Ferrara MG, Stefani A, Simbolo M, Pilotto S, Martini M, Lococo F, Vita E, Chiappetta M, Cancellieri A, D'Argento E, Trisolini R, Rindi G, Scarpa A, Margaritora S, Milella M, Tortora G, Bria E. Large Cell Neuro-Endocrine Carcinoma of the Lung: Current Treatment Options and Potential Future Opportunities. *Frontiers in oncology.* **2021**;11:650293.

Fisher Scientific SL. Thermo Scientific™ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit [monografía en internet]. Madrid: Thermo Fisher Scientific, **2020** [consultado 2022 enero 25]. Disponible en: <https://www.fishersci.es/shop/products/fermentas-revertaid-premium-first-strand-cdna-synthesis-kit/10387979>.

Rodríguez, R. EFECTO DE LA DIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA PULMONAR SOBRE LA ACTIVIDAD DE CÉLULAS CITOTÓXICAS DE RATÓN [monografía en internet]. México, Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro, **2022** [consultado 2023 enero 14]. Disponible en: <http://ri-ng.uaq.mx/bitstream/123456789/3883/1/FQLIN-267740-0922-1322-Ricardo%20Fosado%20Rodr%c3%adguez%20%20%20%20-A.pdf>.

Gao Z, Lei WI, Lee L. The Role of Neuropeptide-Stimulated cAMP-EPACs Signalling in Cancer Cells. *Molecules.* **2022**;27:311.

Gheorghişan-Gălăţeanu AA, Ilieşiu A, Lambrescu IM, Țăpoi DA. The Complex Histopathological and Immunohistochemical Spectrum of Neuroendocrine Tumors- An Overview of the Latest Classifications. *Int J Mol Sci.* **2023**;24:1418.

Goodall GJ, Wickramasinghe V.O. RNA in cancer. *Nat Rev Cancer.* **2021**;21:22-36.

Gyamfi J, Kim J, Choi J. Cancer as a Metabolic Disorder. *Int J Mol Sci.* **2022**; 23:1155.

Hayes C. Cellular immunotherapies for cancer. *Ir J Med Sci.* **2021**;190:41-57.

Herrera-Martínez AD, Hofland J, Hofland LJ, Brabander T, Eskens FALM, Gálvez Moreno MA, Luque RM, Castaño JP, de Herder WW, Feelder RA. Targeted Systemic Treatment of Neuroendocrine Tumors: Current Options and Future Perspectives. *Drugs.* **2019**;79:21-42.

Huang W, Chen JJ, Xing R, Zeng YC. Combination therapy: Future directions of immunotherapy in small cell lung cancer. *Transl Oncol.* **2021**;14:100889.

Hybiak J, Jankowska K, Machaj F, Rosik J, Broniarek I, Żyluk A, Hilderman GC, Małeckki A, Łos MJ, Urasińska Elż. Reprogramming and transdifferentiation - two key processes for regenerative medicine. *Eur. J. Pharmacol.* **2020**;85:173202.

Imyanitov EN, Iyevleva AG, Levchenko EV. Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current status and perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol.* **2021**;157:103194.

INEGI. CARACTERÍSTICAS DE LAS DEFUNCIONES REGISTRADAS EN MÉXICO DURANTE 2021 [monografía en internet]. México: INEGI, **2022** [consultado 2023 diciembre 14]. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2022/EDR/EDR2021_10.pdf

IARC. Estimated number of cases Mexico, both sexes, all ages [monografía en internet] Francia; GLOBOCAN, **2021** [consultado 2021 mayo 28]. Disponible en: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=484&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=7&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Atrue%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D&popul)

[bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=484&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=7&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Atrue%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D&popul](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=484&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=7&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Atrue%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D&popul)

ation_group_list=84,188,222,320,340,484,558,591&population_group_globocan_id=916#collapse-group-0-1.

Ishii J, Sato-Yazawa H, Kashiwagi K, Nakadate K, Iwamoto M, Kohno K, Miyata-Hiramatsu C, Masawa M, Onozaki M, Noda S, Miyazawa T, Takagi M, Yazawa T. Endocrine secretory granule production is caused by a lack of REST and intragranular secretory content and accelerated by PROX1. *J Mol Histol.* 2022 ;53:437-448.

Iyoda A, Azuma Y, Sano A. Neuroendocrine tumors of the lung: clinicopathological and molecular features. *Surg Today.* 2020;50:1578-1584.

Kanghong X, Chengpeng Z, Tiantian D, Abakundana Gabriel, Xue W, Xiaomeng L, Li S, Nan W, Xinquan J, Yi Z. Progress of exosomes in the diagnosis and treatment of lung cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2021;24:111111.

Kashiwagi K, Ishii J, Sakaeda M, Arimasu Y, Shimoyamada H, Sato H, Yazawa T. Differences of molecular expression mechanisms among neural cell adhesion molecule 1, synaptophysin, and chromogranin A in lung cancer cells. *Pathology International.* 2012;62:232–245.

Lantuejoul S, Fernandez-Cuesta L, Damiola F, Girard N, McLeer A. New molecular classification of large cell neuroendocrine carcinoma and small cell lung carcinoma with potential therapeutic impacts. *Transl Lung Cancer Res.* 2020; 9:2233-2244.

Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE.* 2012;62:3923.

Mendieta I. Efecto de factores neuroendócrinos de A549NED sobre la actividad antineoplásica de Linfocitos T citotóxicos in vitro [monografía en internet]. México, Querétaro: Universidad Autónoma de Queretaro, 2018 [consultado 2022 diciembre 29]. Disponible en: <http://ri-ng.uaq.mx/bitstream/123456789/1440/1/FQ-0033-Alicia%20Irasema%20Mendieta%20Trejo.pdf>.

Mendieta I, Nuñez-Anita RE, Pérez-Sánchez G, Pavón L, Rodríguez-Cruz A, García-Alcocer G, Berumen LC. Effect of A549 neuroendocrine differentiation on cytotoxic immune response. *Endocr Connect.* 2018;7:791-802.

Mendieta I, Rodríguez-Nieto M, Nuñez-Anita RE, Menchaca-Arredondo JL, García-Alcocer G, Berumen LC. Ultrastructural changes associated to the neuroendocrine

transdifferentiation of the lung adenocarcinoma cell line A549. *Acta Histochem.* **2021**;123:151797.

Nam AS, Chaligne R, Landau DA. Integrating genetic and non-genetic determinants of cancer evolution by single-cell multi-omics. *Nat Rev Genet.* **2021**;22:3-18.

Nooreldeen R, Bach H. Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci.* **2021**;22:866.

Patel P, Galoian K. Molecular challenges of neuroendocrine tumors. *Oncol Lett.* **2018**;15:2715-2725.

Pelosi G, Sonzogni A, Harari S, Albini A, Bresaola E, Marchiò C, Massa F, Righi L, Gatti G, Papanikolaou N, Vijayvergia N, Calabrese F, Papotti M. Classification of pulmonary neuroendocrine tumors: new insights. *Transl Lung Cancer Res.* **2017**;6:513-529.

Promega. GoTaq Green Master Mix (M712) Protocol [monografía en internet]. Wisconsin: Promega Corporation, **2022** [consultado 2022 enero 26]. <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-m712-protocol/>.

Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, Sage J. Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers.* **2021**;7:3.

Savu C, Melinte A, Diaconu C, Stiru O, Gherghiceanu F, Tudorica ŞDO, Dumitraşcu OC, Bratu A, Balescu I, Bacalbasa N. Lung neuroendocrine tumors: A systematic literature review (Review). *Exp Ther Med.* **2022**;23:176.

Sheriff S, Ali M, Yahya A, Haider KH, Balasubramaniam A, Amlal H. Neuropeptide Y Y5 receptor promotes cell growth through extracellular signal-regulated kinase signaling and cyclic AMP inhibition in a human breast cancer cell line. *Mol Cancer Res.* **2010**;8:604-14.

Siddiqui F, Siddiqui AH. Lung Cancer. Island: StatPearls Publishing . **2021**.

Sim AJ, Kaza E, Singer L, Rosenberg SA. A Review of the Role of MRI in Diagnosis and Treatment of Early Stage Lung Cancer. *Clinical and Translational Radiation Oncology.* **2020**;24:16-22.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA CÁNCER J CLIN.* **2021**;0:1-41.

Tan YQ, Zhang X, Zhang S, Zhu T, Garg M, Lobie PE, Pandey V. Mitochondria: The metabolic switch of cellular oncogenic transformation. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* **2021**;1876.

Tio M, Tan KH, Lee W, Wang TT, Udolph G. Roles of db-cAMP, IBMX and RA in aspects of neural differentiation of cord blood derived mesenchymal-like stem cells. *PLoS One.* **2010**;24:e9398.

Volante M, Mete O, Pelosi G, Roden AC, Speel EJM, Uccella S. Molecular Pathology of Well-Differentiated Pulmonary and Thymic Neuroendocrine Tumors: What Do Pathologists Need to Know?. *Endocr Pathol.* **2021**;32: 154-168.

Yao E, Lin C, Wu Q, Zhang K, Song H, Chuang PT. Notch Signaling Controls Transdifferentiation of Pulmonary Neuroendocrine Cells in Response to Lung Injury. *Stem Cells.* **2018**; 36:377-391.

Ye Z, Huang Y, Ke J, Zhu X, Leng S, Luo H. Breakthrough in targeted therapy for non-small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother.* **2021**;133:111079.

Zhang M, He J, Li T, Hu H, Li X, Xing H, Wang J, Yang F, Ma Q, Liu B, Tang C, Abliz Z, Liu X. Accurate Classification of Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) Pathology and Mapping of EGFR Mutation Spatial Distribution by Ambient Mass Spectrometry Imaging. *Front. Oncol.* **2019**; 9:804.

Zymo Research. Direct-zol™ RNA Miniprep TRIzol® In. RNA Out. [monografía en internet]. CA: 2022 Zymo Research corporation, **2021** [consultado 2022 diciembre 06]. Disponible en:

https://files.zymoresearch.com/protocols/_r2050_r2051_r2052_r2053_direct-zol_rna_miniprep.pdf