



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA TRANSDIFERENCIACIÓN
NEUROENDÓCRINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA
ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA 2 EN LAS
CÉLULAS A549”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MIRIAM AGUILAR UGALDE

DIRIGIDA POR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2023.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Efecto de la transdiferenciación neuroendócrina sobre
la expresión de la enzima convertidora de
angiotensina 2 en las células A549

por

Miriam Aguilar Ugalde

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](#).

Clave RI: FQLIN-267739



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA TRANSDIFERENCIACIÓN
NEUROENDÓCRINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA
ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA 2 EN LAS
CÉLULAS A549”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

MIRIAM AGUILAR UGALDE

DIRIGIDA POR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SINODALES

**Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA
DIRECTOR**

**Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER
SINODAL**

**Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ
SINODAL**

**M. en C. JAZMÍN ESMERALDA SOTO HERNÁNDEZ
SINODAL**

A mi familia, con la que empecé y la que he ganado a lo largo del camino.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Berumen por hacerme parte de su laboratorio, por su guía, su paciencia y su confianza, porque la docencia es una labor que se hace de corazón y lo demuestra siempre.

A la M. en C. Jazmín Soto por asesorarme, por enseñarme técnicas de laboratorio, buena música, datos curiosos y lo más importante, que la amistad llega cuando menos te lo esperas.

A la Dra. Guadalupe García por su orientación, por compartir sus conocimientos y experiencia.

Al Dr. Sergio Romero por su ayuda y por esa primera clase de la carrera que marcó mi perspectiva.

A la Dra. Irasema Mendieta por ser la persona que mantenía el laboratorio en orden y, sobre todo, lo alegraba.

A Odalis y Rebe por todas las frustraciones y corajes que compartimos, pero también por todas las pequeñas victorias.

A Dulce, Ricardo, Ana Lau, Paco, Diana, Vale, Sara y a todos mis compañeros del laboratorio por su ayuda y por hacerme sentir bienvenida.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al Posgrado en Ciencias Químico Biológicas por brindarme un espacio para realizar este proyecto.

A Aline Vargas por ser mi mentora y amiga, por transmitirme no solo su conocimiento, sino su amor por la ciencia.

A Nohemí, Shenandoha, Dani y Noemí por su amistad, sus consejos y por darme ánimos todo el tiempo.

A Larissa, Deborah, Pau, Angie, Gime, Ricardo y María Pau por hacer de la carrera una experiencia inolvidable.

A Mario por escucharme y por ser la persona que, a pesar de todo, siempre me mantuvo optimista.

A Jonathan, Alexa, Gustavo, Iván y Lina por acompañarme en este viaje durante tantos años y demostrarme que la familia también se escoge.

A Karen y Toño por siempre creer en mí y ser mi mayor inspiración. Qué dicha ser su hermana mayor.

A mis papás Liliana y Antonio por su esfuerzo, su amor incondicional y por ser mi modelo a seguir. Por cada domingo que me llevaron, por cada llamada para preguntarme cómo estuvo mi día, por cada comida especial que me esperaba los viernes en casa. Esta tesis también es de ustedes.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Cáncer	1
1.2 Cáncer de pulmón	2
1.3 Transdiferenciación neuroendócrina	4
1.4 Células A549	5
1.5 COVID-19	6
1.6 SARS-CoV-2	7
1.7 ECA2	9
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 General	12
3.2 Específicos	12
4. METODOLOGÍA	13
4.1 Materiales	13
4.2 Métodos	13
4.2.1 Cultivo de células A549	13
4.2.2 Obtención de células A549 _{NED} a partir de células A549	14

4.2.3 Determinación del marcador neuroendócrino	14
4.2.4 Evaluación de la expresión de ECA2	15
4.2.5 Análisis estadístico	15
4.2.6 Disposición de residuos	16
5. RESULTADOS	17
5.1 El tratamiento con IBMX y FSK induce la transdiferenciación neuroendócrina en las células A549	17
5.2 La enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) se expresa en las células A549 y A549 _{NED}	20
6. DISCUSIÓN	22
7. CONCLUSIONES	26
8. REFERENCIAS	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Número de casos nuevos de cáncer en México en el 2020 en a) hombres de todas las edades y b) mujeres de todas las edades	2
2	Porcentaje de pacientes que presentan cada tipo de cáncer de pulmón	3
3	Casos positivos estimados y defunciones confirmadas por COVID-19 en México	7
4	Mecanismo de entrada del SARS-CoV-2 mediado por ECA2	8
5	Componentes del sistema renina-angiotensina (RAS)	9
6	Efectos morfológicos del tratamiento con IBMX y FSK sobre las células A549	18
7	Expresión del marcador neuroendócrino sinaptofisina	19
8	Expresión de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2)	21

RESUMEN

La línea celular A549 es ampliamente utilizada como modelo *in vitro* para estudiar el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), en donde las células tumorales pueden transdiferenciarse a un fenotipo neuroendócrino. Derivado de la pandemia por COVID-19, es necesario verificar que emplear células A549 en estudios es seguro, puesto que, el virus SARS-CoV-2 reconoce a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) como receptor para ingresar a la célula huésped y ésta se expresa en células del epitelio pulmonar. Por lo anterior, se evaluó la expresión de ECA2 en las células A549 y A549 con transdiferenciación neuroendócrina (A549_{NED}) inducida por 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y forskolina (FSK) mediante PCR de punto final, empleando dos cebadores identificados como ECA2N3 y ECA2N4. Contrario a lo obtenido por otros autores, se encontró que ECA2 se expresa tanto en células A549 como en A549_{NED}. Aunque se observó una tendencia al cambio en la expresión de ECA2 entre A549 y A549_{NED}, los resultados mostraron que la diferencia no fue significativa ($p = 0.6248$ y $p = 0.5235$), por lo que no se puede garantizar que la expresión aumente o disminuya por la transdiferenciación neuroendócrina. Dado que se observó que ECA2 sí se expresa en las células A549, pese a que se había reportado que su expresión no era detectable, se recomienda manipularlas siguiendo las medidas de bioseguridad para evitar que se conviertan en un foco de riesgo potencial.

1. ANTECEDENTES

1.1 Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades multifactoriales capaz de desarrollarse en diversas partes del cuerpo, se caracteriza por una proliferación anormal de células que forman tumores o neoplasias malignas y que, posteriormente, pueden diseminarse a otro sitio (OMS, 2021).

La transformación de células normales en tumorales, conocida como carcinogénesis, ocurre por la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos principalmente en genes que regulan el ciclo celular como los genes supresores de tumores y oncogenes (Lahouel y col., 2020). La progresión del cáncer se ve influenciada por factores genéticos del individuo, así como por agentes externos que pueden ser clasificados como carcinógenos químicos, físicos y biológicos (Das y col., 2020).

El cáncer es un problema de salud pública que afecta a la población mundial, con alrededor de 19 millones de casos nuevos y 10 millones de muertes en el 2020; ha sido catalogado como una de las principales causas de defunción en el mundo (Sung y col., 2021; OMS, 2021).

El INEGI reportó que entre enero y agosto del 2020 se registraron 60,421 defunciones por tumores malignos en México, de las cuales el 51 % correspondieron a mujeres y el 49 % restante a hombres. Asimismo, encontraron que conforme avanza la edad, la tasa de defunción incrementa (INEGI, 2021).

De acuerdo con el número de casos nuevos reportados en el 2020 (Figura 1), entre los hombres mexicanos los tipos de cáncer más comunes fueron de próstata, colorrectal, de estómago, de pulmón y linfoma no Hodgkin. Mientras que, en las mujeres predominó el cáncer de mama, cervicouterino, de tiroides y colorrectal (Globocan, 2020).

A pesar de que en México el cáncer de pulmón no ocupa el primer lugar en incidencia, se le considera el más letal, ya que cada año mueren alrededor de 8,000 mexicanos por esta neoplasia (Secretaría de Salud, 2018).

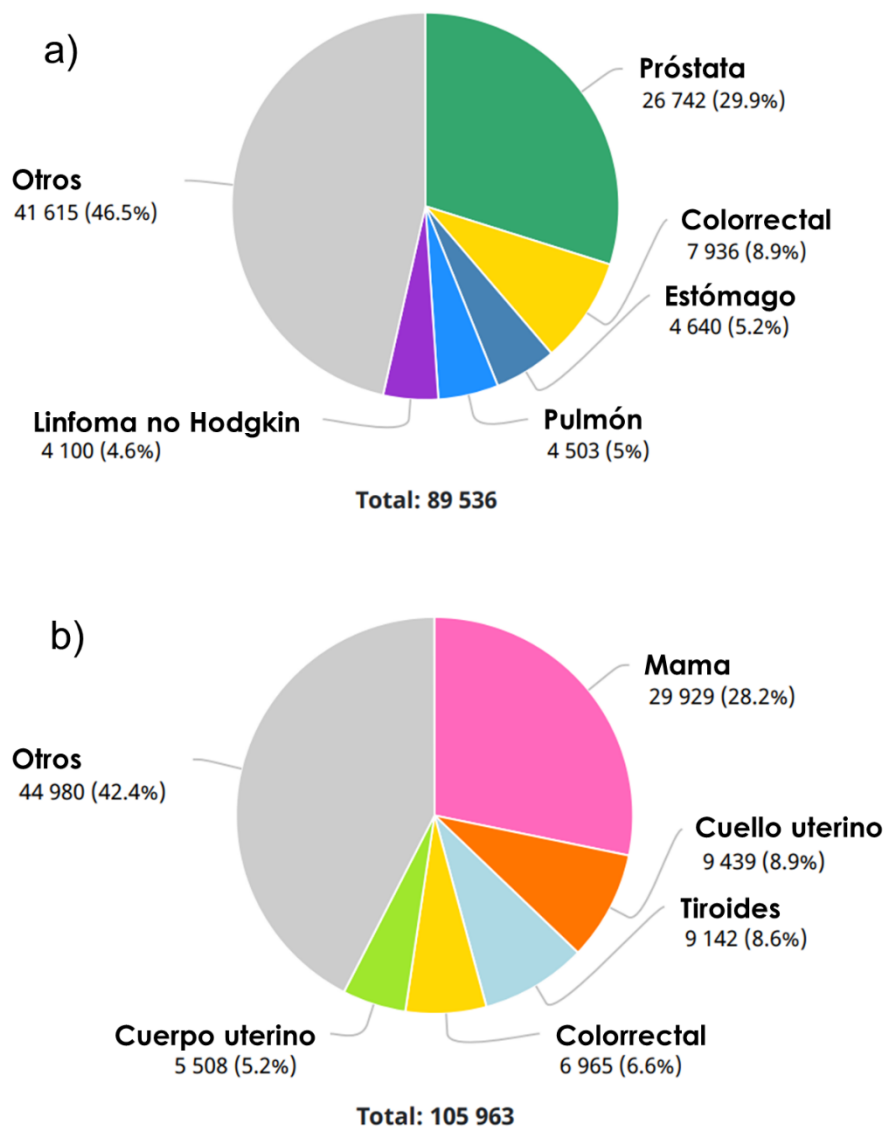


Figura 1. Número de casos nuevos de cáncer en México en el 2020 en a) hombres de todas las edades y b) mujeres de todas las edades. Modificado de Globocan, 2020.

1.2 Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón se clasifica por su histología en cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) y no pequeñas (CPCNP). El CPCNP es el tipo más común y comprende al adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes (Figura 2) (Clark y Alsubait, 2021; Ruiz-Cordero y Devine, 2020).

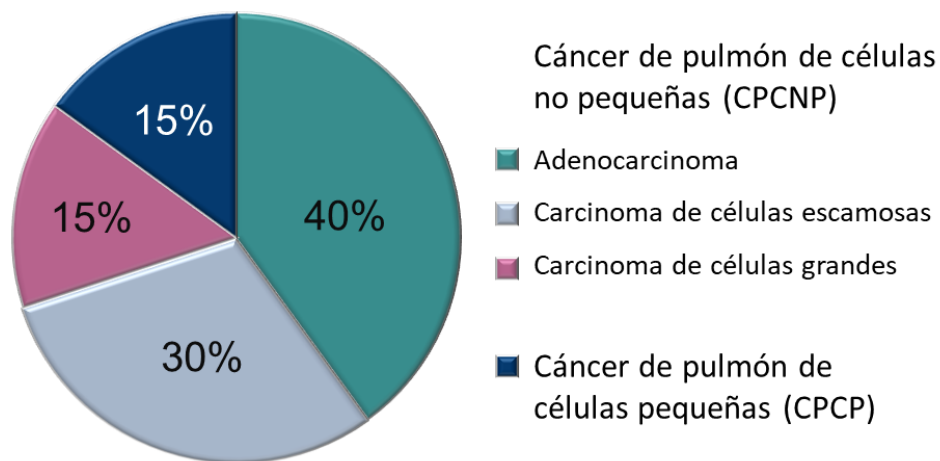


Figura 2. Porcentaje de pacientes que presentan cada tipo de cáncer de pulmón. Modificado de Ruiz-Cordero y Devine, 2020.

El consumo de tabaco es el principal factor de riesgo; se considera que fumar causa el 30 % de muertes por cáncer de pulmón debido a que el humo del tabaco contiene alrededor de 60 compuestos que son considerados carcinógenos, como aldehídos, monóxido de carbono, benceno, hidrocarburos aromáticos policíclicos y nitrosaminas (Padilla-Raygoza y col., 2020; Omare y col., 2021).

En el 2020, el cáncer de pulmón se convirtió en la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial con un estimado de 1.8 millones de defunciones (18 %), y en el segundo tipo más diagnosticado con alrededor de 2.2 millones de casos nuevos (11.4 %) (Sung y col., 2021).

En México se reportaron 7,588 casos nuevos de cáncer de pulmón en el 2020, correspondientes al 3.9 % del total de casos, asimismo 7,100 muertes (7.9 %) fueron ocasionadas por este tipo de cáncer (Globocan, 2020).

En la mayoría de los casos, el CPCNP se diagnostica en etapas tardías en las que la escisión quirúrgica ya no es una opción, por lo que se recurre a la quimioterapia; sin embargo, en ciertas condiciones las células tumorales no responden a dicho tratamiento, como es el caso de la transdiferenciación neuroendócrina (El-Hussien y Hassan, 2021).

1.3 Transdiferenciación neuroendócrina

El proceso de transdiferenciación consiste en que una célula diferenciada perteneciente a un linaje se convierte en una célula de otro diferente, comúnmente en respuesta a estrés severo, por ejemplo, tras una lesión inducida por naftaleno (Ouadah y col., 2019; Thankamony y col., 2021). Si bien, este fenómeno tiene un papel importante durante la renovación homeostática y reparación de tejidos, en etapas avanzadas de ciertos tipos de cáncer, las células tumorales pueden transdiferenciarse a un fenotipo neuroendócrino (NED) (Yao y col., 2018).

La transdiferenciación de las células tumorales a células NED les permite generar diversidad intratumoral, sobrevivir en condiciones limitadas de oxígeno o nutrientes, adaptarse a los cambios en el microambiente durante la metástasis y superar el estrés inducido por la exposición a un fármaco (Thankamony y col., 2021).

Las células NED fueron reportadas por primera vez en cáncer de próstata, se caracterizan por tener gránulos densos que producen y secretan mediadores que normalmente se encuentran en el sistema nervioso, conocidos como marcadores neuroendócrinos, entre los que se encuentran: cromogranina A, sinaptofisina y enolasa neuronal específica (Grigore y col., 2015; Mjølnes y col., 2017).

La Sinaptofisina (SIP) es una proteína de membrana que participa en el ensamblaje de las vesículas sinápticas y a su vez regula la liberación de neurotransmisores (Wallrafen y col., 2018). Es comúnmente utilizada para la detección de células NED en tumores pulmonares debido a su alta sensibilidad y especificidad (Miura y col., 2021).

A través de inmunohistoquímica y microscopía electrónica se ha observado transdiferenciación neuroendócrina en carcinomas pulmonares (Grigore y col., 2015). Aproximadamente el 10 % de los casos de CPCNP presentan células NED, lo que conlleva un peor pronóstico para el paciente, debido a que promueven una mayor tasa de proliferación, metástasis y menor efectividad en el tratamiento ya que tienden a ser quimioresistentes (Rubin y col., 2020; El-Hussien y Hassan, 2021).

1.4 Células A549

El epitelio pulmonar está conformado principalmente por células alveolares tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2), que son células epiteliales especializadas. Las células AT2 llevan a cabo distintas funciones involucradas en la respuesta inmunitaria innata dentro del pulmón, producen surfactante pulmonar que reduce la tensión superficial en los alveolos y evita que colapsen, ayudan a limpiar el líquido alveolar a través del transporte activo de sodio, y actúan como progenitores autorrenovables para diferenciarse en células AT1 y reemplazarlas cuando han sido dañadas. Además, a partir de diversos estudios se cree que en las células AT2 se origina el adenocarcinoma de pulmón, el cual es el subtipo más común de CPCPN (Sainz de Aja y col., 2021). Debido a esto, surgió la necesidad de contar con modelos *in vitro* del epitelio pulmonar, en especial de las células AT2.

Los cultivos celulares son modelos *in vitro* ampliamente utilizados para el estudio del cáncer, ya que proveen un ambiente celular controlado, fácil de escalar y replicar. Permiten evaluar el comportamiento de las células en diversas condiciones, así como la eficacia y toxicidad de fármacos (Nossa y col., 2021).

El cultivo de células A549 se ha popularizado como un modelo consistente y reproducible para el estudio de diversas patologías pulmonares. La línea celular A549 fue establecida tras aislar y cultivar tejido canceroso del pulmón de un hombre caucásico de 58 años (Giard y col., 1973). Son células escamosas con morfología tipo epitelial y crecimiento adherente que forma una monocapa (ATCC, 2021). Posteriormente, se determinó que las células A549 presentan propiedades, morfológicas, metabólicas y de transporte similares a las de las células AT2, por lo que pueden emplearse como modelo *in vitro* para estudiar enfermedades que afectan a las mismas (Foster y col., 1998).

La ATCC determinó que las células A549 requieren un nivel de bioseguridad 1 (BSL1); sin embargo, los riesgos asociados al cultivo de dichas células se ven modificados por los procedimientos llevados a cabo dentro de cada laboratorio y por situaciones extraordinarias como el brote de la enfermedad COVID-19 (ATCC, 2021).

1.5 COVID-19

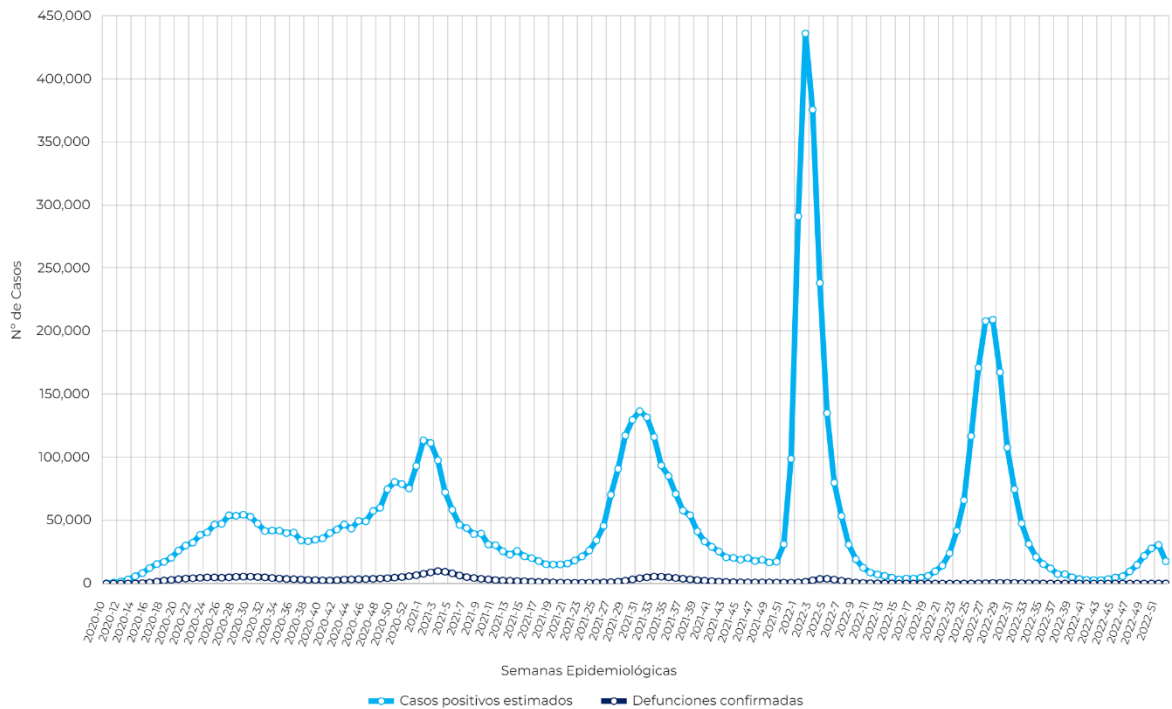
En diciembre del 2019 se reportaron en Wuhan, China los primeros casos de una infección viral de origen indefinido. Posteriormente, en enero del 2020, a partir de muestras de pacientes, se logró identificar y caracterizar el virus causante, al cual se le denominó SARS-CoV-2. Ese mismo mes, la OMS lo declaró una emergencia de salud pública internacional, debido a su alta patogenicidad en humanos. En febrero del 2020 se le dio el nombre de COVID-19 a la enfermedad respiratoria ocasionada por el virus SARS-CoV-2 y para marzo fue declarada pandemia, por el elevado número de contagios, puesto que ya había rebasado los 500,000 casos (Carvalho y col., 2021).

Los síntomas más comunes de COVID-19 incluyen fiebre, tos, disnea, dificultad para respirar y fatiga, pero en algunos casos se presentan también pérdida del olfato o gusto. El desarrollo de la enfermedad depende de diferentes factores, se sabe que las personas de edad avanzada tienen mayor riesgo de hospitalización y de requerir ventilación mecánica, asimismo, comorbilidades como hipertensión, diabetes y obesidad incrementan la probabilidad de muerte por COVID-19 (Fernández-Rojas y col., 2021).

El 27 de febrero del 2020 se confirmó el primer caso de COVID-19 en México, alcanzando un pico de infección en la semana 28 que posteriormente logró reducirse gracias a las medidas de confinamiento. Sin embargo, a partir de la semana 40 se registró nuevamente un aumento de casos con una reducción consecutiva, lo que se denominó como otra ola de COVID-19 (Figura 3) (Aguilar-Madera y col., 2021).

En diciembre del 2020, México dio inicio a la etapa 1 de vacunación dirigida al personal de salud de primera línea de atención a COVID-19. Debido a la disponibilidad de las vacunas, el calendario de vacunación continuó de forma escalonada, priorizando grupos de riesgo hasta llegar al resto de la población (Secretaría de Salud, 2022).

Pese a que se aplicaron vacunas de Pfizer-BioNTech, Cansino, COVAX, AstraZeneca, Sputnik V, Sinovac, Janssen o Moderna a toda la población, las olas de COVID-19 continuaron durante el 2022, llegando a más de 400,000 casos positivos estimados en la semana 2 (Figura 3) (Secretaría de Salud, 2022).



El virus SARS-CoV-2 comparte aproximadamente el 79 % de la secuencia de su genoma con el SARS-CoV y el 50 % con el MERS-CoV; no obstante, la mayor variación se encuentra en su proteína S. La subunidad S1 de la proteína S del SARS-CoV-2 tiene 2 dominios funcionales un N-terminal y un C-terminal; en este último se encuentra el dominio de unión al receptor (RBD), que tiene un papel crucial en la entrada del virus a las células humanas (Hu y col., 2021). Por su parte, la subunidad S2 está involucrada en la fusión del virión con la célula (Naqvi y col., 2020).

Para ingresar a la célula huésped la proteína S del SARS-CoV-2 reconoce como receptor a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2), una proteína transmembrana con la que se une a través de su dominio de unión al receptor (RBD) (Shang y col., 2020). Posteriormente, la proteína S es escindida por la proteína transmembranal furina, causando que la subunidad S1 y la subunidad S2 se disocien. Mientras que S1 regula la unión del virus a la membrana de la célula huésped al reconocer al receptor ECA2, S2 es activada proteolíticamente en su sitio de escisión S2' por TMPRSS2, una proteasa transmembrana, lo que favorece la fusión de las membranas celulares (Jackson y col., 2022). Finalmente, el virus SARS-CoV-2 entra a la célula mediante endocitosis, donde libera su nucleocápside permitiendo la salida del ARN genómico viral al citoplasma (Figura 4) (Pastrian-Soto, 2020).

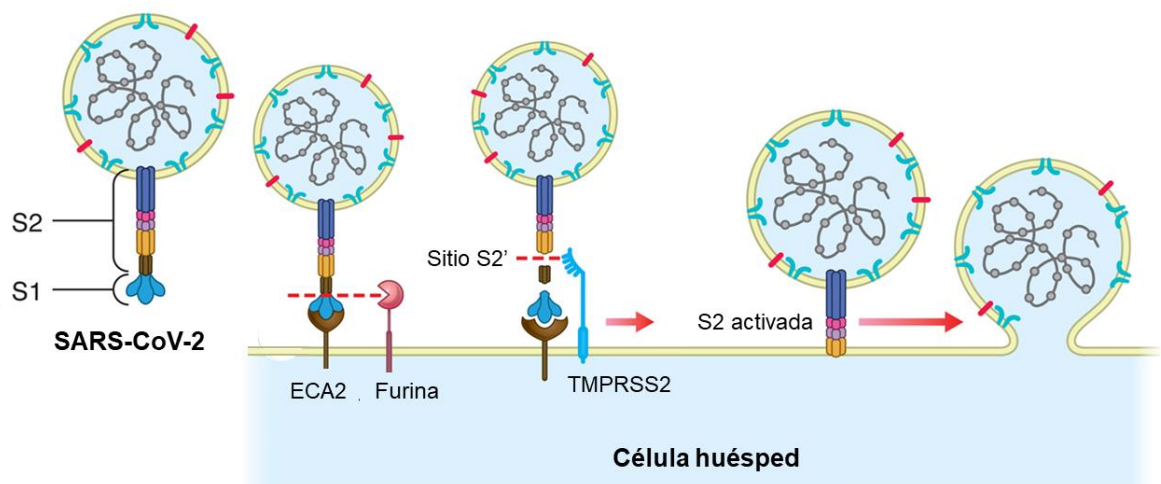


Figura 4. Mecanismo de entrada del SARS-CoV-2 a la célula huésped mediado por ECA2. Modificado de Rangu y col., 2022.

1.7 ECA2

La enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) es una proteína transmembrana formada por 805 aminoácidos y codificada por el gen ECA2. Se puede encontrar en células epiteliales de diferentes órganos como pulmones, riñón, estómago, y corazón. En los pulmones, las células alveolares tipo 2 (AT2) son las que mayormente expresan la proteína ECA2 (Ambrocio-Ortiz y col., 2021).

La ECA2 está involucrada en la respuesta inmunitaria y homeostasis del pulmón, puesto que es un regulador del sistema renina-angiotensina (RAS) (Ambrocio-Ortiz y col., 2021). Cuando la angiotensina 2 (Ang II) se une al receptor RcAT1 (Ang II/ RcAT1) media la vasoconstricción, la hipertrofia, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la inducción de hipoxia y la activación de citocinas proinflamatorias. Asimismo, Ang II/ RcAT1 aumenta la retención de agua y sodio en la sangre, generando un mayor volumen de líquido extracelular que conlleva a la hipertensión (Muhanna y col., 2020).

La principal función de ECA2 es la degradación peptídica de Ang II para producir el péptido antiinflamatorio angiotensina (1-7) que moviliza procesos regenerativos endógenos e inhibe la señalización de Ang II/ RcAT1 mediante su unión al receptor MAS (Figura 5) (Muhanna y col., 2020; Soto y col., 2020).

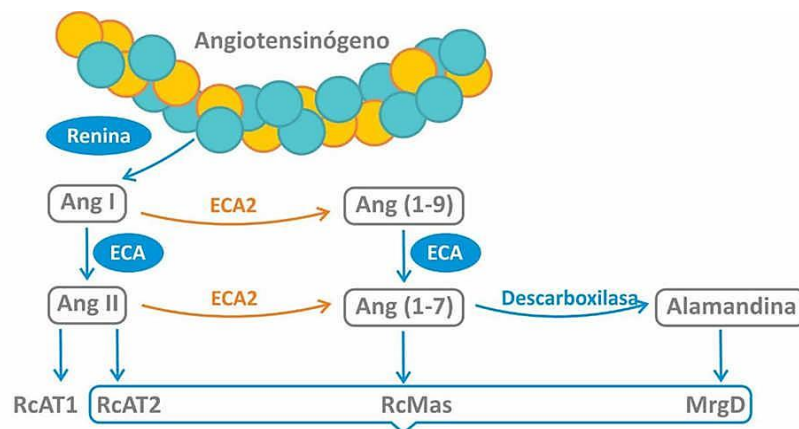


Figura 5. Componentes del sistema renina-angiotensina (RAS). RcAT1: receptor de Ang II tipo 1; RcAT2: receptor de Ang II tipo 2; RcMas: receptor Mas de Ang 1-7; MrgD: receptor Mas acoplado a proteína G tipo D. Modificado de Choi y col., 2020.

La alta expresión de ECA2 en los pulmones puede justificar que las células pulmonares sean el principal objetivo del virus SARS-CoV-2, ya que el nivel de expresión de ECA2 es determinante para el tropismo del mismo (Adil y col., 2021). Las células alveolares tipo 2 (AT2) representan el 83 % de las células que expresan ECA2 en los pulmones (Zhang y col., 2020). Dado que las células A549 son células alveolares con propiedades similares a las células AT2, existe la posibilidad de que, al cultivarlas para estudiar patologías respiratorias como el cáncer de pulmón, permitan la replicación del virus SARS-CoV-2 conforme a su nivel de expresión de ECA2.

A partir de diversos estudios en los que se utilizaron como modelo *in vitro* las células A549 transfectadas con un vector que indujo la sobreexpresión de ECA2 (Chuang y col., 2020; Lambkin-Williams y col., 2020; Sandra y col., 2020; Yaqub y col., 2021), se puede inferir que la proteína es expresada en cantidades poco significativas de manera natural en esta línea celular, por lo que no representaría un riesgo para quienes la emplean. No obstante, para estudiar condiciones como la transdiferenciación neuroendócrina en tumores pulmonares, las células A549 son sometidas a un tratamiento con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y forskolina (FSK) (Mendieta y col., 2018), lo que podría modificar la expresión de ECA2 convirtiéndose un foco de riesgo potencial.

Por lo anterior, es necesario evaluar los niveles de expresión de ECA2 en los linajes celulares que son usualmente empleados como modelos *in vitro* en estudios de cáncer de pulmón, para garantizar la seguridad del personal que forma parte de los proyectos de investigación dentro de los laboratorios.

2. HIPÓTESIS

El nivel de expresión de la proteína ECA2 en las células A549 se modifica cuando son tratadas con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y forskolina (FSK) para su transdiferenciación neuroendócrina.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar el nivel de expresión de la proteína ECA2 en las células A549 y A549 tratadas con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y forskolina (FSK) para su transdiferenciación neuroendócrina (A549_{NED}).

3.2 Específicos

- Obtener células A549_{NED} a partir de células A549 tratadas con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y forskolina (FSK).
- Determinar la presencia de sinaptofisina (SIP) en las células A549_{NED} como marcador neuroendócrino empleando PCR de punto final.
- Evaluar la expresión de ECA2 en las células A549 y A549_{NED} mediante PCR de punto final.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

Para el cultivo celular se emplearon la línea celular A549/GFP de adenocarcinoma de pulmón humano (AKR-209, Cell Biolabs, Inc., EUA), placas de cultivo de 6 pozos (92006, TPP, Suiza), medio DMEM (11995065, Gibco, EUA) suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (FBS) (10082147, Gibco, EUA) y 100 U/mL de solución de penicilina-estreptomicina (P4333, Sigma-Aldrich, EUA), tampón fosfato salino 1 X (PBS) (70011044, Gibco, EUA) y solución de tripsina-EDTA 0.25 % (T4049, Sigma-Aldrich, EUA).

La transdiferenciación neuroendócrina se llevó a cabo usando forskolina (FSK) (HY-15371, MedChemExpress, EUA) y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (I5879, Sigma-Aldrich, EUA).

Se utilizaron TRI Reagent (R2050-1-200, Zymo Research, EUA) y Direct-zol RNA MiniPrep Kit (R2050, Zymo Research, EUA) para extraer el ARN total de las células. La síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó empleando Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (K1621, Thermo Scientific, EUA).

Para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y revelar los productos se utilizaron GoTaq Green Master Mix (M7122, Promega, EUA), agarosa (A9539, Sigma-Aldrich, EUA), BenchTop 100bp DNA Ladder (G8291, Promega, EUA) y bromuro de etidio UltraPure (15585011, Invitrogen, EUA).

4.2 Métodos

4.2.1 Cultivo de células A549

A partir de la metodología de Cooper y col. (2016) y de Mendieta y col. (2018), las células A549 se sembraron a una densidad de 2.5×10^5 células/mL en placas de cultivo de 6 pozos con medio DMEM suplementado con 10 % de FBS y 100 U/mL de penicilina-estreptomicina. Se incubaron por 24 horas a 37 °C y con CO₂ al 5 %.

4.2.2 Obtención de células A549_{NED} a partir de células A549

Pasadas las 24 h, se lavaron las células con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1 X. Posteriormente, la mitad de las células, correspondientes al grupo control, fueron tratadas con medio DMEM sin suplementar y el resto con medio DMEM suplementado con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y forskolina (FSK) a una concentración de 0.5 mM. Ambos tratamientos tuvieron una duración de 96 h, realizando un cambio de medio a las 48 h. Para confirmar la transdiferenciación neuroendócrina exitosa de las células A549, se observaron los cambios en su morfología empleando un microscopio invertido y se documentaron tomando fotos a las 0, 24, 48, 72 y 96 h.

4.2.3 Determinación del marcador neuroendócrino

Se extrajo el ARN total de las células A549 y A549_{NED} empleando TRIzol Reagent y Direct-zol RNA MiniPrep Kit siguiendo el procedimiento del manual del fabricante (Zymo Research, 2023). Se determinó la concentración y calidad del ARN obtenido en un espectrofotómetro NanoDrop y su integridad por electroforesis en gel de agarosa al 3 %. Posteriormente, se sintetizó el ADNc a partir del ARN total utilizando Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit que incluye cebadores hexaméricos aleatorios y Oligo(dT)₁₈ (Thermo Fisher Scientific, 2022). Se analizó el ADNc obtenido en un espectrofotómetro NanoDrop para determinar su calidad y concentración.

Mediante PCR de punto final se amplificó el producto correspondiente a la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de expresión constitutiva y al gen sinaptofisina (SIP) empleando sus respectivos cebadores. Se esperó un producto de 181 pb para GAPDH (directo: CCACTCCTCCACCTTTGAC, inverso: TCCTCTTGCTGCTCTTGCTGG) y uno de 123 pb para SIP (directo: AGACAGGGAACACATGCAAG, inverso: TCTCCTTAAACACGAACCACAG) (Fosado y col., 2023).

Las condiciones para la PCR, usando GoTaq Green Master Mix, se establecieron de acuerdo con el protocolo del fabricante (Promega, 2021) en 30 ciclos: desnaturalización inicial por 2 min a 95 °C, desnaturalización por 30 s a 95 °C,

alineamiento por 1 min a 60 °C, elongación por 1 min a 72 °C y elongación final por 5 min a 72 °C.

Se corrieron los productos de las reacciones por electroforesis en gel de agarosa al 2 % a 80 V por 45 min, seguido de 30 min de tinción con bromuro de etidio y se reveló en un transiluminador de luz UV para su análisis.

4.2.4 Evaluación de la expresión de ECA2

A partir del ADNc obtenido de las células A549 y A549_{NED}, se amplificó por PCR el producto correspondiente al gen de la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ECA2) utilizando dos pares de cebadores obtenidos de la literatura, los cuales se identificaron como ECA2N3 (Lee y col., 2021) y ECA2N4 (Zhang y col., 2019).

Se esperó un producto de 238 pb para ECA2N3 (directo: GGACCCAGGAAATGTTTCAGA, inverso: GGCTGCAGAAAGTGACATGA) y de 126 pb para ECA2N4 (directo: CGAGTGGCTAATTTGAAACCAAGAA, inverso: ATTGATACGGCTCCGGGACA).

Las condiciones para la PCR de los cebadores ECA2N3 se establecieron en 35 ciclos: desnaturalización inicial por 2 min a 95 °C, desnaturalización por 30 s a 95 °C, alineamiento por 1 min a 60 °C, elongación por 1 min a 72 °C y elongación final por 5 min a 72 °C. Por otro lado, las condiciones para la PCR de los cebadores ECA2N4 se establecieron en 40 ciclos: desnaturalización inicial por 2 min a 95 °C, desnaturalización por 30 s a 95 °C, alineamiento por 1 min a 60 °C, elongación por 1 min a 72 °C y elongación final por 5 min a 72 °C.

Se corrieron los productos de las reacciones por electroforesis en gel de agarosa al 2 % a 80 V por 45 min, seguido de 30 min de tinción con bromuro de etidio y se reveló en un transiluminador de luz UV para su análisis.

4.2.5 Análisis estadístico

Los geles revelados se digitalizaron y analizaron con el software Image J. La diferencia en la expresión de SIP y ECA2 entre las células A549 y A549_{NED} se evaluó

mediante la prueba t de Student utilizando el software GraphPad Prism 8. Los datos de los experimentos por triplicado se expresaron como la media \pm SEM (error estándar de la media), donde $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

4.2.6 Disposición de residuos

De acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 “Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo”, los residuos generados de cultivo celular se depositaron en bolsas de polietileno de color rojo para residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI). Se almacenaron temporalmente para su posterior recolección y transporte por la empresa ECOLSERVI Industrial, quienes se encargan del tratamiento y disposición final (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2003).

Los geles teñidos con bromuro de etidio, así como los guantes y las puntas de pipeta contaminados, se colocaron en una bolsa de plástico sellada dentro de una caja de cartón resistente. La caja llevaba una etiqueta con la leyenda “geles con bromuro de etidio” y se almacenó temporalmente hasta su posterior recolección por la empresa ECOLSERVI Industrial (EH&S, 2019).

5. RESULTADOS

5.2 El tratamiento con IBMX y FSK induce la transdiferenciación neuroendócrina en las células A549

Las células A549 que fueron tratadas con IBMX-FSK (0.5 mM) por 96 h, desarrollaron una morfología poligonal con proyecciones tipo neurita, la cual es característica de las células que presentan un fenotipo neuroendócrino (A549_{NED}) (Mendieta y col., 2018). Asimismo, se observó que las células A549_{NED} tuvieron una menor tasa de proliferación en comparación con el grupo control (Figura 6).

Por otro lado, a las 24 h unas cuantas células del grupo control empezaron a mostrar alargamientos similares a las células A549_{NED} (Figura 6). Esto se puede atribuir a la privación de suero fetal bovino (SFB), ya que se ha reportado que en ausencia de SFB, las células pueden presentar un fenotipo más elongado e incluso ramificaciones similares a las neuritas (Freitas y col., 2019; Thomson y col., 2022). Esta falta de nutrientes también pudo haber ocasionado que gran parte de las células control murieran a las 96 h.

El tratamiento con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y forskolina (FSK) a una concentración de 0.5 mM promovió la obtención de células A549 con fenotipo neuroendócrino (A549_{NED}) debido a que, tanto IBMX como FSK, aumentan los niveles de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) e inducen efectos mediados por el mismo (Lv y col., 2019). El AMPC activa a la proteína cinasa A (PKA) que a su vez puede estimular la actividad del factor de transcripción CREB, esta cascada de señalización contribuye a varios procesos biológicos relevantes para la progresión del cáncer, entre ellos la transdiferenciación neuroendócrina (Zhao y Li, 2019).

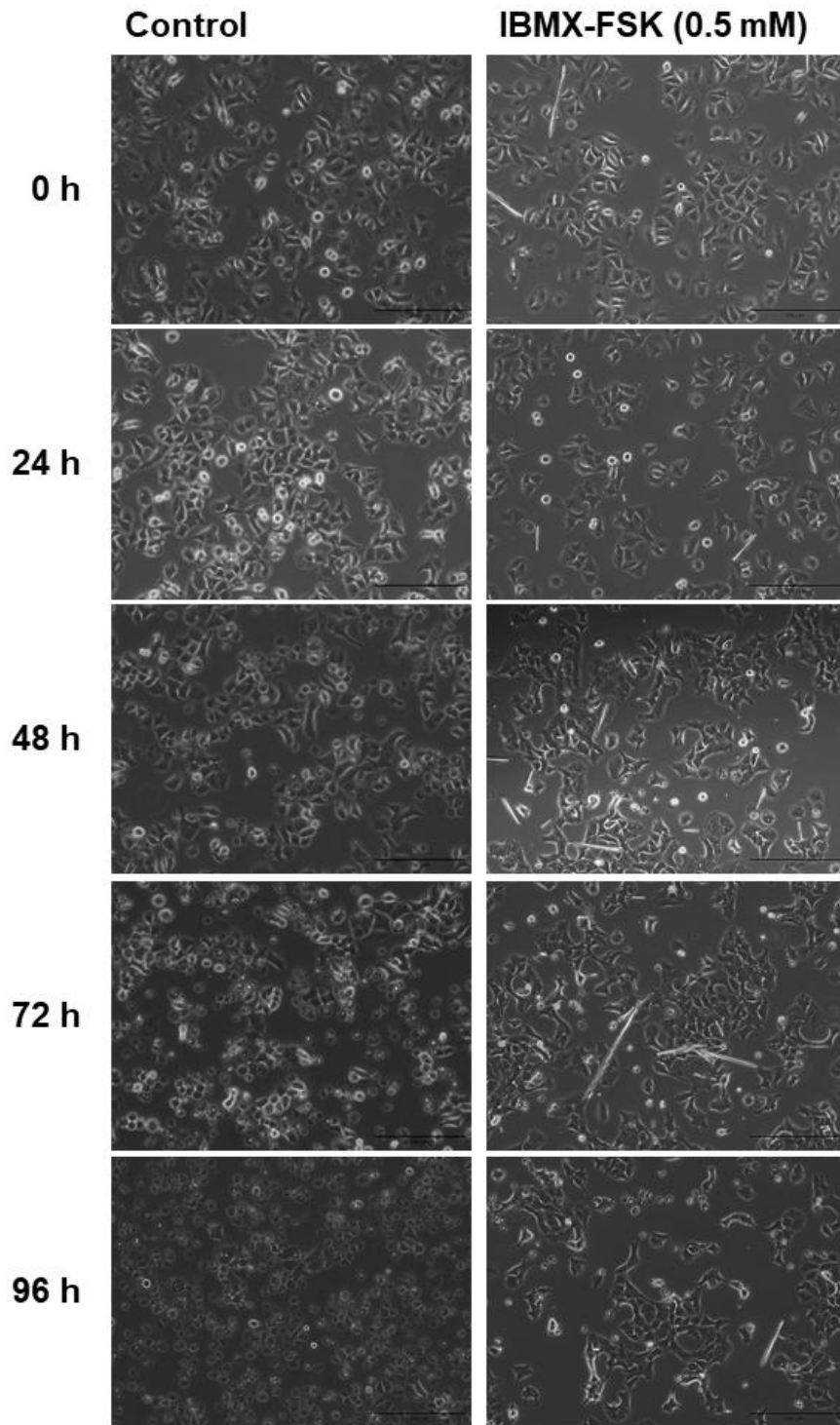


Figura 6. Efectos morfológicos del tratamiento con IBMX y FSK sobre las células A549. Las células fueron tratadas con IBMX y FSK (0.5 mM) por 96 h, con un cambio de medio a las 48 h. Se muestran fotografías representativas de cada 24 h del tratamiento.

Para corroborar la transdiferenciación de las células A549 a A549_{NED}, se evaluó la expresión de un marcador neuroendocrino. Se ha reportado que la activación de CREB en células NED induce la expresión de marcadores neuroendócrinos (Zhang y col., 2018), siendo sinaptofisina (SIP) uno de los más comunes (Kriegsmann y col., 2021). En comparación con las células A549, en las células A549_{NED} se ha observado un aumento en la expresión de sinaptofisina de 1.491 veces (Fosado y col., 2023).

La diferencia en la expresión de sinaptofisina entre las células A549 y A549_{NED} se determinó a través del revelado de un gel de agarosa donde, tal y como se esperaba, se obtuvo un producto de 123 pb correspondiente al gen SIP amplificado por PCR (Figura 7A) (Fosado y col., 2023).

El gel se digitalizó en Image J para posteriormente evaluar en GraphPad Prism 8 el cambio en el nivel de expresión de SIP relativa a GAPDH mediante la prueba t de Student (Figura 7B). El nivel de expresión de SIP se normalizó de acuerdo con el de GAPDH. Dado que se presentó una diferencia significativa ($p = 0.0159$) de aproximadamente 3.51 veces entre A549 y A549_{NED} (Figura 7B), se reafirmó que el tratamiento con IBMX-FSK induce la transdiferenciación neuroendócrina.

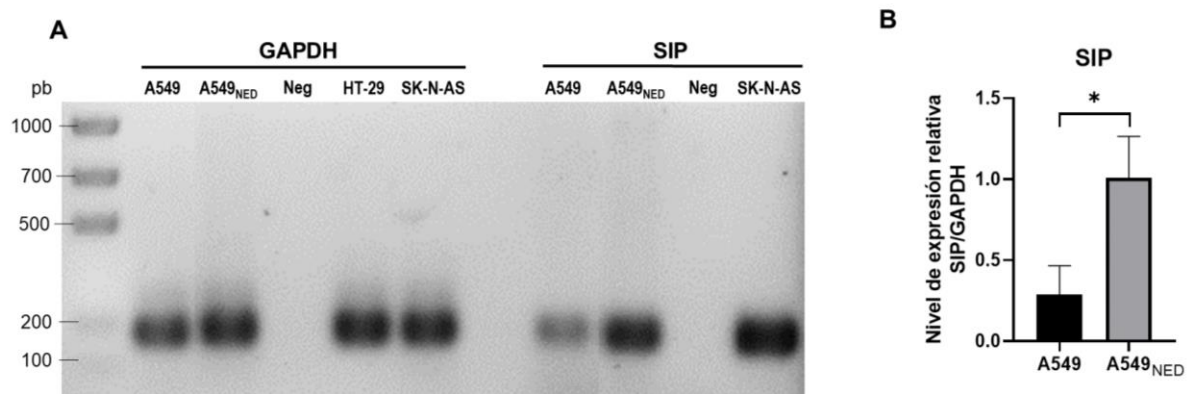


Figura 7. Expresión del marcador neuroendócrino sinaptofisina. A) Producto correspondiente a sinaptofisina (SIP) amplificado por PCR a partir del ADNc de células A549 y A549_{NED}, donde las células SK-N-AS de neuroblastoma fueron utilizadas como control positivo. B) Gráfica de barras de la diferencia en el nivel de expresión de SIP entre A549 y A549_{NED}, expresada como la media \pm SEM (error estándar de la media) ($n = 3$, $* p < 0.05$).

5.2 La enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) se expresa en las células A549 y A549_{NED}

Para evaluar la expresión de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) en las células A549 y A549_{NED} se utilizaron como referencia dos pares de cebadores obtenidos de la literatura. Los cebadores identificados como ECA2N3 fueron empleados para valorar la expresión de ECA2 por PCR cuantitativa en múltiples líneas celulares de pulmón humano, con o sin tratamiento de pirrolidina ditiocarbamato; sin embargo, ECA2 no fue detectable en ninguna de las condiciones en las células A549 (Lee y col., 2021). Por otro lado, los cebadores etiquetados como ECA2N4 sirvieron para estimar exitosamente la expresión de ECA2 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama mediante PCR cuantitativa (Zhang y col., 2019).

El revelado del gel de agarosa con los productos de las reacciones de PCR correspondientes al gen ECA2 permitió corroborar que las bandas resultantes fueron de 238 pb con los cebadores ECA2N3 y de 126 pb con ECA2N4 (Figura 8A y 8C), en concordancia con lo que se ha reportado anteriormente (Lee y col., 2021; Zhang y col., 2019). De igual manera, con los dos cebadores se observó que tanto A549 como A549_{NED} expresan ECA2.

El gel fue digitalizado en Image J y el nivel de expresión de ECA2 se normalizó de acuerdo con el nivel de expresión de GAPDH. Posteriormente, utilizando la prueba t de Student se analizó la diferencia en el nivel de expresión relativa de ECA2 entre las células A549 y A549_{NED}. A pesar de que ECA2 pareció disminuir tras la transdiferenciación neuroendócrina inducida por IBMX-FSK en el caso de los cebadores ECA2N3, la diferencia obtenida no fue significativa debido a la alta variabilidad ($p = 0.6248$) (Figura 8B). De igual manera, se observó que ECA2 tuvo una tendencia a aumentar con los cebadores ECA2N4; no obstante, la diferencia tampoco fue significativa ($p = 0.5235$) (Figura 8D). Por lo tanto, no se podría asegurar que la transdiferenciación neuroendócrina inducida por IBMX-FSK aumente o disminuya la expresión de ECA2 en las células A549.

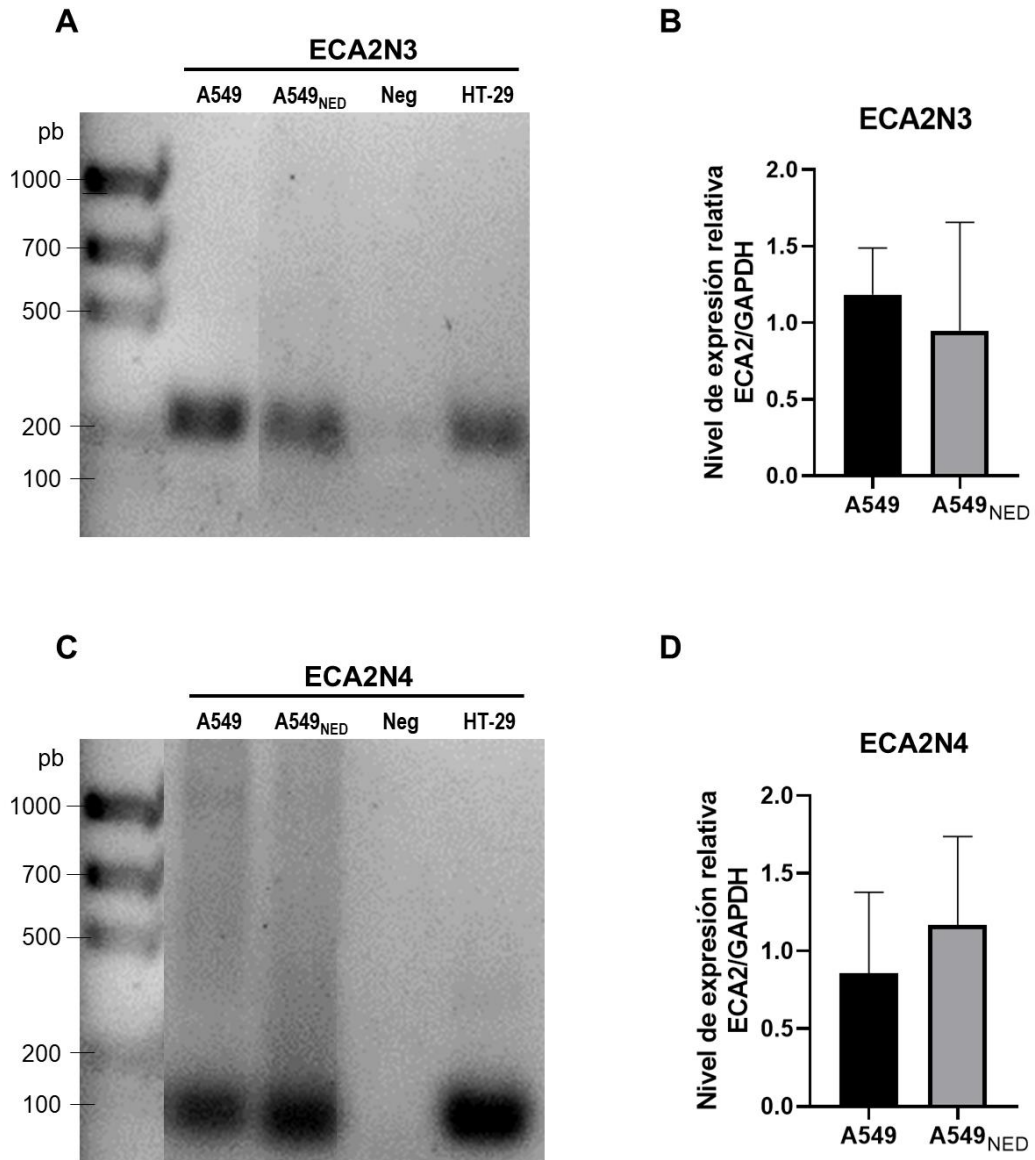


Figura 8. Expresión de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2). Producto correspondiente a ECA2 amplificado por PCR empleando los cebadores A) ECA2N3 y C) ECA2N4. En ambos casos se utilizó ADNc de células A549, A549_{NED} y HT-29, siendo las últimas el control positivo. Gráfica de barras de la diferencia en el nivel de expresión de ECA2 entre A549 y A549_{NED}, expresada como la media \pm SEM (error estándar de la media) (n = 3, * p < 0.05) usando B) ECA2N3 y D) ECA2N4.

6. DISCUSIÓN

La enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) es un importante regulador del sistema de renina-angiotensina (RAS) que además tiene un papel clave en el mecanismo de entrada del SARS-CoV-2 a la célula huésped, ya que al ser una proteína transmembrana es reconocida como receptor por el virus (Beyerstedt y col., 2021). A raíz de la pandemia ocasionada por COVID-19, es de suma importancia evaluar los niveles de expresión de ECA2 en las líneas celulares utilizadas como modelos *in vitro* para el estudio de patologías pulmonares, puesto que ECA2 se expresa en células del epitelio pulmonar y los pulmones son los principales afectados por esta enfermedad altamente infecciosa (Pinto y col., 2020).

En el presente estudio se evaluó la expresión de ECA2 en la línea celular A549 mediante PCR de punto final. Los resultados obtenidos mostraron que ECA2 se expresa en las células A549, contrario a diversos autores que han tenido que sobreexpresar ECA2 a través de un vector, debido a que obtuvieron que el nivel de expresión no fue detectable en células A549 control (Chuang y col., 2020; Lambkin-Williams y col., 2020; Sandra y col., 2020; Yaqub y col., 2021). La diferencia en el nivel de expresión de ECA2 en las células A549 entre diversos estudios, se puede atribuir a que cuando se emplean líneas celulares cancerosas a menudo los resultados son difíciles de reproducir debido al alto grado de variación entre las cepas (Ben-David y col., 2018).

Asimismo, se evaluó la expresión de ECA2 en células A549 con transdiferenciación neuroendócrina (A549_{NED}) inducida por un tratamiento con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y forskolina (FSK), ya que comúnmente se utilizan para estudiar dicha condición en tumores pulmonares (Fosado y col., 2023; Mendieta y col., 2018). Nuevamente se obtuvo que ECA2 se expresa incluso cuando las células presentan un fenotipo neuroendócrino.

El gen correspondiente a ECA2 humana se localiza en el cromosoma Xp22, está conformado por 40 kb que comprenden 22 intrones y 18 exones. En GenBank se pueden encontrar 6 diferentes variantes de transcripción, que son: variante de

transcripción 1 (NM_001371415.1), variante de transcripción 2 (NM_021804.3), variante de transcripción 3 (NM_001386259.1), variante de transcripción 4 (NM_00138260.1), variante de transcripción 5 (NM_001388452.1), y variante de transcripción 6 (NM_001389402.1) (Badawi y Ali, 2021).

La isoforma conocida como ECA2 de longitud completa es codificada por las variantes de transcripción 1 y 2, comprende 18 exones y genera una proteína de 805 aminoácidos y 120 kDa. La variante de transcripción 3 codifica la segunda isoforma de ECA2, que es una proteína de 786 aminoácidos idéntica a ECA2 de longitud completa excepto que está truncada en el dominio citoplásmico. La tercera isoforma de ECA2 es generada por las variantes de transcripción 4 y 6, está compuesta por 694 aminoácidos, tiene un 95 % de similitud a ECA2 de longitud completa, pero carece de algunos exones en la región 3' UTR (Badawi y Ali, 2021).

Se ha reportado una cuarta isoforma de 52 kDa y 459 aminoácidos identificada como dECA2 (Onabajo y col., 2020), MIRb-ECA2 (Ng y col., 2020) o ECA2 corta (Blume y col., 2021). Es una proteína inestable codificada por la variante de transcripción 5. Tiene el extremo N-terminal más corto con diferentes regiones 5' UTR en comparación con ECA2 de longitud completa, carece de actividad de carboxipeptidasa y no cuenta con sitios de unión de alta afinidad al SARS-CoV-2 (Badawi y Ali, 2021; Blume y col., 2021; Ramal-Sanchez y col., 2022).

Utilizando la herramienta Primer-Blast del NCBI se identificó que los productos obtenidos de la PCR utilizando los cebadores ECA2N3 (Lee y col., 2021) pueden corresponder a las variantes de transcripción 1, 2, 3, 4 y 6. Por otro lado, con los cebadores ECA2N4 (Zhang y col., 2019) se pueden conseguir las variantes de transcripción 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Es decir, los cebadores ECA2N3 son específicos para la primera, segunda y tercera isoforma, y los cebadores ECA2N4 para las mismas y adicionalmente la cuarta isoforma correspondiente a ECA2 corta (dECA2 MIRb-ECA2). Lo anterior podría justificar que ECA2 tenga un comportamiento distinto dependiendo de los cebadores empleados, puesto que no codifican las mismas variantes de transcripción. Mientras que, en el caso de ECA2N3 el nivel de expresión

relativa de ECA2 tuvo una tendencia a disminuir en las células A549_{NED}, con ECA2N4 hubo una tendencia a aumentar; no obstante, dado que la diferencia no fue significativa en ninguno de los casos ($p = 0.6248$ y $p = 0.5235$), no es posible garantizar que la transdiferenciación neuroendócrina inducida por IBMX-FSK aumente o disminuya el nivel de expresión de ECA2 en las células A549.

Se ha encontrado que diversos agentes son capaces de inducir la expresión de ECA2, entre ellos los interferones ($IFN\alpha$, $IFN\beta$) (Beacon y col., 2021) y la interleucina 6 (IL-6), puesto que estimula al transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), el cual ha sido identificado como un factor de transcripción de ECA2 (Liang y col., 2022). Dado que el tratamiento con IBMX-FSK aumenta los niveles de AMPc y éste a su vez promueve la síntesis de IL-6 (Tanabe y col., 2016), es relevante corroborar si la transdiferenciación neuroendócrina inducida por IBMX-FSK está involucrada en la regulación de la expresión de ECA2 a través de STAT3.

Debido al alcance del estudio no se identificó el comportamiento específico de cada isoforma ante la transdiferenciación neuroendócrina; no obstante, los resultados sugieren que la diferencia en las tendencias de expresión de ECA2 entre las células A549 y A549_{NED} radica en ECA2 corta. Dado que los cebadores ECA2N3 no son específicos para ECA2 corta, si hubiera un aumento en la expresión no lograría ser detectado con estos cebadores. Por otro lado, los cebadores ECA2N4 al ser específicos para varias isoformas, entre ellas ECA2 corta, permitirían detectar este cambio y la expresión tendría tendencia a aumentar. Por lo anterior, se recomendaría realizar este estudio empleando cebadores que solo codifiquen ECA2 corta, para verificar si el tratamiento con IBMX-FSK induce su expresión en las células A549.

A través de un análisis multi-ómico de la expresión de ECA2 que involucró 28,000 muestras que comprendían tejidos sanos, diferentes tipos de cáncer y enfermedades crónicas comunes, se encontró que ECA2 es regulada al alza en pacientes con enfermedades crónicas y carcinomas, entre ellos adenocarcinoma pulmonar, en comparación con los controles (Li y col., 2020). Por lo anterior, fue propuesto que los pacientes con ciertos tipos de cáncer y enfermedades crónicas podrían presentar

una mayor expresión de ECA2, lo que los haría más susceptibles a la infección por SARS-CoV-2 (Li y col., 2020). No obstante, ante la existencia de variantes de ECA2, es importante realizar un perfil de expresión más específico, puesto que, como se sugiere en el presente estudio, el nivel de expresión de ECA2 obtenido podría depender de la expresión de una variante en específico, por lo que, la susceptibilidad del paciente podría depender no solo del nivel de expresión de ECA2 sino de la variante expresada. Por ejemplo, dado que ECA2 corta no contribuye a la entrada del SARS-CoV-2 a la célula, un aumento en su expresión no representaría un mayor riesgo para los pacientes.

Se ha reportado que la expresión de ECA2 corta puede ser inducida por virus o tratamientos con interferones; sin embargo, estos no influyen en la expresión de ECA2 de longitud completa (Onabajo y col., 2020). Asimismo, se ha observado que en adenocarcinoma pulmonar se expresan niveles más altos de ECA2 de longitud completa en comparación con ECA2 corta, mientras que, en carcinoma de células escamosas sucede lo contrario, lo que sugiere una dependencia del linaje celular o que hay adaptaciones transitorias al microambiente local (Ng y col., 2020).

Finalmente, dado que la línea celular A549 es ampliamente utilizada en estudios de patologías pulmonares, principalmente en aquellas que afectan a las células alveolares tipo 2 (AT2), se recomienda mantener precauciones en su manejo, puesto que, aunque se ha reportado que el nivel de expresión de ECA2 en células A549 no es detectable (Lee y col., 2021), se observó que la variabilidad entre cepas de una misma línea celular, así como la existencia de diversas isoformas pueden generar resultados distintos, por lo que sería posible que las células A549 lleguen a ser un foco de riesgo ante la pandemia por COVID-19.

7. CONCLUSIONES

Con base en los resultados de esta tesis se confirma que la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) se expresa en células A549 con o sin tratamiento de IBMX-FSK, pese a que anteriormente se haya reportado que su expresión no es detectable en las células sin tratar. La existencia de variantes de transcripción que codifican distintas isoformas y la variabilidad entre cepas de una línea celular pueden ocasionar que se observe la expresión de ECA2 en cultivos celulares bajo diferentes condiciones de experimentación. Por lo tanto, se debe tomar en cuenta que la variabilidad entre estudios conlleva resultados diferentes, por lo que es necesario tomar precauciones y seguir todas las medidas de bioseguridad al manipular cualquier cultivo ya que representan riesgos potenciales, incluyendo el de contaminación por SARS-CoV2. De igual forma, dado que la variante ECA2 corta no contribuye a la entrada del SARS-CoV-2 a la célula, es relevante identificar por rt-PCR cuantitativa si su expresión es inducida por IBMX-FSK y dicho tratamiento podría tener relevancia en la generación de cepas celulares menos susceptibles al virus, lo que podría sugerir algún blanco farmacológico de apoyo para el tratamiento de la infección viral. Además, este proyecto contribuye en información valiosa para verificar la expresión diferencial de las variantes de la enzima que sirve como receptor viral, y colaborar como base para la investigación clínica de pacientes con susceptibilidad diferente a la infección por SARS-CoV-2.

8. REFERENCIAS

Adil MT, Rahman R, Whitelaw D, Jain V, Al-Ta'an O, Rashid F, Munasinghe A, Jambulingam P. SARS-CoV-2 and the pandemic of COVID-19. *Postgraduate Medical Journal*. **2021**; 97(1144): 110-116.

Aguilar-Madera CG, Espinosa-Paredes G, Herrera-Hernández EC, Briones Carrillo JA, Valente Flores-Cano J, Matías-Pérez V. The spreading of Covid-19 in Mexico: A diffusional approach. *Results in physics*. **2021**; 27(104555).

Alvarado-Amador I, Bandera-Anzaldo J, Carreto-Binagh LEi, Pavón-Romero GF, Alejandre-García A. Etiología y fisiopatología del SARS-CoV-2. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*. **2020**; 33(s1): s5-s9.

Ambrocio-Ortiz E, Pérez-Rubio G, Del Ángel-Pablo AD, Buendía-Roldán I, Chávez-Galán L, Hernández-Zenteno RJ, Ramírez-Venegas A, Rojas-Serrano J, Mejía M, Pérez-Padilla R, Guadarrama-Pérez C, Falfán-Valencia R. Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) in the Context of Respiratory Diseases and Its Importance in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection. *Pharmaceuticals (Basel)*. **2021**; 14(8): 805.

ATCC. A549 CCL-185 human cells. 2021. [Consultado 2021 octubre 11]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/ccl-185>

Badawi S, Ali BR. ACE2 Nascence, trafficking, and SARS-CoV-2 pathogenesis: the saga continues. *Human genomics*. **2021**; 15(1): 8.

Beacon TH, Delcuve GP, Davie JR. Epigenetic regulation of ACE2, the receptor of the SARS-CoV-2 virus1. *Genome*. **2021**; 64(4), 386–399.

Ben-David U, Siranosian B, Ha G, Tang H, Oren Y, Hinohara K, Strathdee CA, Dempster J, Lyons NJ, Burns R, Nag A, Kugener G, Cimini B, Tsvetkov P, Maruvka YE, O'Rourke R, Garrity A, Tubelli AA, Bandopadhyay P, Tsherniak A, ... Golub TR. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature*. **2018**; 560(7718): 325–330.

Beyerstedt S, Casaro EB, Rangel ÉB. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. **2021**; 40(5): 905–919.

Blume C, Jackson CL, Spalluto CM, Legebeke J, Nazlamova L, Conforti F, Perotin JM, Frank M, Butler J, Crispin M, Coles J, Thompson J, Ridley RA, Dean LSN, Loxham M, Reikine S, Azim A, Tariq K, Johnston DA, Skipp PJ, ... Mennella V. (2021). A novel ACE2 isoform is expressed in human respiratory epithelia and is upregulated in response to interferons and RNA respiratory virus infection. *Nature genetics*. **2021**; 53(2): 205–214.

Carvalho T, Krammer F, Iwasaki A. The first 12 months of COVID-19: a timeline of immunological insights. *Nature Reviews Immunology*. **2021**; 21(4): 245–256.

Choi M, Aiello EA, Ennis IL, Villa-Abrille MC. El SRAA y el SARS-CoV-2: el acertijo a resolver [The RAAS and SARS-CoV-2: A riddle to solve]. *Hipertension y riesgo vascular*. **2020**; 37(4): 169–175.

Chuang HC, Tsai SW, Shie RH, Lu YC, Song SR, Huang SH, Peng HY, Yang HY. A novel lung alveolar cell model for exploring volatile biomarkers of particle-induced lung injury. *Scientific Reports*. **2020**; 10(1): 15700.

Clark SB, Alsubait S. *Non Small Cell Lung Cancer*. StatPearls Publishing. 2021. [Consultado 2021 octubre 11]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32965978/>

Cooper JR, Abdullatif MB, Burnett EC, Kempell KE, Conforti F, Tolley H, Collins JE, Davies DE. Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and Differentiation towards an Alveolar Type II Pneumocyte Phenotype. *PLOS ONE*. **2016**; 11(10): e0164438.

Das S, Kundu M, Jena BC, Mandal M. Causes of cancer: physical, chemical, biological carcinogens, and viruses. En: Subhas K, Rui R. *Biomaterials for 3D Tumor Modeling*. Kharagpur: Elsevier, **2020**: 607–641.

EH&S. Ethidium bromide disposal. 2019. [Consultado 2021 octubre 21]. Disponible en: <https://www.ehs.pitt.edu/sites/default/files/docs/03-015EthidiumBromideDisposal.pdf>

EI-Hussien M, Hassan M. Neuroendocrine Differentiation in Non-Small Cell Lung Cancer and its Relation to Different Pathologic Features: An Immunohistochemical Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology*. **2021**; 6(1): 49-55.

Fernández-Rojas MA, Luna-Ruiz Esparza MA, Campos-Romero A, Calva-Espinosa DY, Moreno-Camacho JL, Langle-Martínez AP, García-Gil A, Solís-González CJ, Canizalez-Román A, León-Sicairos N, Alcántar-Fernández J. Epidemiology of COVID-19 in Mexico: Symptomatic profiles and presymptomatic people. *International Journal of Infectious Diseases*. **2021**; 104: 572–579.

Fosado R, Soto-Hernández JE, Núñez-Anita RE, Aceves C, Berumen LC, Mendieta I. (2023). Neuroendocrine Differentiation of Lung Cancer Cells Impairs the Activation of Antitumor Cytotoxic Responses in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*. **2023**; 24(2): 990.

Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Experimental Cell Research*. **1998**; 243(2): 359–366.

Freitas D, Balmaña M, Poças J, Campos D, Osório H, Konstantinidi A, Vakhrushev SY, Magalhães A, Reis CA. Different isolation approaches lead to diverse glycosylated extracellular vesicle populations. *Journal of extracellular vesicles*. **2019**; 8(1): 1621131.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. **1973**; 51(5):1417-1423.

Globocan. Mexico. 2021. [Consultado 2021 octubre 11]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>

Grigore AD, Ben-Jacob E, Farach-Carson MC. Prostate cancer and neuroendocrine differentiation: more neuronal, less endocrine? *Frontiers in Oncology.* **2015**; 5(37): 1-19.

Hu B, Guo H, Zhou P, Shi Z-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology.* **2021**; 19: 141–154.

INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero). 2021. [Consultado 2021 octubre 11]. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_NaL.pdf.

Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature reviews. Molecular cell biology.* **2022**; 23(1): 3–20.

Kriegsmann K, Zgorzelski C, Muley T, Christopoulos P, Thomas M, Winter H, Eichhorn M, Eichhorn F, von Winterfeld M, Herpel E, Goeppert B, Stenzinger A, Herth FJF, Warth A, Kriegsmann M. Role of Synaptophysin, Chromogranin and CD56 in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung lacking morphological features of neuroendocrine differentiation: a retrospective large-scale study on 1170 tissue samples. *BMC cancer.* **2021**; 21(1): 486.

Lahouel K, Younes L, Danilova L, Giardiello FM, Hruban RH, Groopman J, Kinzler KW, Vogelstein B, Geman D, Tomasetti C. Revisiting the tumorigenesis timeline with a data-driven generative model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **2020**; 117(2): 857–864.

Lambkin-Williams R, Mann A, Shephard A. Inhibition of viral and bacterial trigger-stimulated prostaglandin E2 by a throat lozenge containing flurbiprofen: An in vitro study using a human respiratory epithelial cell line. *SAGE Open Medicine.* **2020**; 8: 1-6.

Lee MC, Chen YK, Tsai-Wu JJ, Hsu YJ, Lin BR. Zinc supplementation augments the suppressive effects of repurposed NF- κ B inhibitors on ACE2 expression in human lung cell lines. *Life sciences.* **2021**; 280(119752).

Li Y, Xu Q, Ma L, Wu D, Gao J, Chen G, Li H. Systematic profiling of ACE2 expression in diverse physiological and pathological conditions for COVID-19/SARS-CoV-2. *J Cell Mol Med.* **2020**; 24(16): 9478-9482.

Liang L, Wang D, Yu H, Wang J, Zhang H, Sun B, Yang F, Wang Z, Xie D, Feng R, Xu K, Wang G, Zhou G. Transcriptional regulation and small compound targeting of ACE2 in lung epithelial cells. *Acta Pharmacol Sinica.* **2022**; 43, 2895–2904.

Lv P, Wang W, Cao Z, Zhao D, Zhao G, Li D, Qi L, Xu J. Fsk and IBMX inhibit proliferation and proapoptotic of glioma stem cells via activation of cAMP signaling pathway. *Journal of cellular biochemistry.* **2019**; 120(1): 321–331.

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. *Endocrine connections.* **2018**; 7(5): 791–802.

Miura K, Shimizu K, Ide S, Mishima S, Matsuoka S, Takeda T, Eguchi T, Hamanaka K, Uehara T. A Novel Strategy for the Diagnosis of Pulmonary High-Grade Neuroendocrine Tumor. *Diagnostics.* **2021**; 11(11): 1945.

Mjølnes P, Sagatun L, Nordrum IS, Waldum HL. Neuron-Specific Enolase as an Immunohistochemical Marker Is Better Than Its Reputation. *Journal of Histochemistry, Cytochemistry.* **2017**; 65(12): 687-703.

Muhanna D, Arnipalli SR, Kumar SB, Ziouzenkova O. Osmotic Adaptation by Na⁺-Dependent Transporters and ACE2: Correlation with Hemostatic Crisis in COVID-19. *Biomedicines.* **2020**; 8(11): 460.

Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, Atif SM, Hariprasad G, Hasan GM, Hassan MI. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease.* **2020**; 1866(10): 165878.

Ng KW, Attig J, Bolland W, Young GR, Major J, Wrobel AG, Gamblin S, Wack A, Kassiotis G. Tissue-specific and interferon-inducible expression of nonfunctional ACE2 through endogenous retroelement co-option. *Nature genetics*. **2020**; 52(12): 1294–1302.

Nossa R, Costa J, Cacopardo L, Ahluwalia A. Breathing in vitro: Designs and applications of engineered lung models. *Journal of Tissue Engineering*. **2021**; 12: 1-128.

Omare MO, Kibet JK, Cherutoi JK, Kengara FO. A review of tobacco abuse and its epidemiological consequences. *Journal of Public Health*. **2021**; 1-16.

OMS. Cancer. 2021. [Consultado 2021 octubre 11]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Onabajo OO, Banday AR, Stanifer ML, Yan W, Obajemu A, Santer DM, Florez-Vargas O, Piontkivska H, Vargas JM, Ring TJ, Kee C, Doldan P, Tyrrell DL, Mendoza JL, Boulant S, Prokunina-Olsson L. Interferons and viruses induce a novel truncated ACE2 isoform and not the full-length SARS-CoV-2 receptor. *Nature genetics*. **2020**; 52(12): 1283–1293.

Ouah Y, Rojas ER, Riordan DP, Capostagno S, Kuo CS, Krasnow MA. Rare Pulmonary Neuroendocrine Cells Are Stem Cells Regulated by Rb, p53, and Notch. *Cell*. **2019**; 179(2): 403-416.e23.

Padilla-Raygoza N, Monroy-Torres R, Sandoval-Salazar C, Vera-Becerra LE, Patiño-López ME, García-Campos ML, Beltrán-Campos V, Ortega-Jiménez MC, Delgado-Sandoval SC, Ramírez-Gómez XS, Jimenez-García SN, López-Lemus HL. Cancer prevention programmes in Mexico: are we doing enough? *Ecancermedicalscience*. **2020**; 14: 997.

Pastrian-Soto G. Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. *International journal of odontostomatology*. **2020**; 14(3): 331-337.

Pinto BGG, Oliveira AER, Singh Y, Jimenez L, Gonçalves ANA, Ogava RLT, Creighton R, Peron JPS, Nakaya HI. ACE2 Expression is Increased in the Lungs of Patients with Comorbidities Associated with Severe COVID-19. medRxiv: the preprint server for health sciences. **2020**; 03.21.20040261.

Promega. GoTaq® Green Master Mix (M712) Protocol. 2021. [Consultado 2023 enero 10 para la escritura de tesis]. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-m712-protocol/#:~:text=GoTaq%C2%AE%20Green%20Master%20Mix%20is%20a%20premixed%20ready%2Dto,of%20DNA%20templates%20by%20PCR.>

Ramal-Sanchez M, Castellini C, Cimini C, Taraschi A, Valbonetti L, Barbonetti A, Bernabò N, Barboni B. ACE2 Receptor and Its Isoform Short-ACE2 Are Expressed on Human Spermatozoa. International Journal of Molecular Sciences. **2022**; 23(7): 3694.

Rangu R, Wander PL, Barrow BM, Zraika S. Going viral in the islet: mediators of SARS-CoV-2 entry beyond ACE2, Journal of Molecular Endocrinology. **2022**; 69(2): 63-79.

Rubin MA, Bristow RG, Thienger PD, Dive C, Imielinski M. Impact of Lineage Plasticity to and from a Neuroendocrine Phenotype on Progression and Response in Prostate and Lung Cancers. Molecular Cell. **2020**; 80(4): 562–577.

Ruiz-Cordero R, Devine WP. Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy in Lung Cancer. Surgical Pathology Clinics. **2020**; 13(1): 17-33.

Sainz de Aja J, Dost AFM, Kim CF. Alveolar progenitor cells and the origin of lung cancer. Journal of Internal Medicine. **2021**; 289(5): 629-635.

Sandra V, An J, Jo VL, Masha VD, Diane B, Witters H, Sylvie R, Lieve G, Lize D, Evelien F. Alternative air-liquid interface method for inhalation toxicity testing of a petroleum-derived substance. MethodsX. **2020**; 7: 101088.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. 2003 [Consultado 2021 octubre 18]. Disponible en: <http://salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>

Secretaría de Salud. Cada año mueren cerca de ocho mil mexicanos por cáncer de pulmón. 2021. [Consultado 2021 octubre 18]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/prensa/145-cada-ano-mueren-cerca-de-ocho-mil-mexicanos-por-cancer-de-pulmon?idiom=es>

Secretaría de Salud. Información de la vacuna. 2022. [Consultado 2023 enero 10]. Disponible en: <https://vacunacovid.gob.mx/>

Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, Li F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **2020**; 117(21): 11727-11734.

Silva JVJ, Merchioratto I, de Oliveira PSB, Rocha Lopes TR, Brites PC, de Oliveira EM, Weiblen R, Flores EF. End-point RT-PCR: A potential alternative for diagnosing coronavirus disease 2019 (COVID-19). Journal of virological methods. **2021**; 288: 114007.

SINAVE. COVID-19, México: Datos epidemiológicos. 2022. [Consultado 2023 enero 10]. Disponible en: <https://covid19.sinave.gob.mx/>

Soto M, diZerega G, Rodgers KE. Countermeasure and therapeutic: A(1-7) to treat acute respiratory distress syndrome due to COVID-19 infection. Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system. **2020**; 21(4): 1470320320972018.

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: A Cancer Journal for Clinicians. **2021**; 71(3): 209- 249.

Tanabe K, Kozawa O, Iida H. cAMP/PKA enhances interleukin-1 β -induced interleukin-6 synthesis through STAT3 in glial cells. *Cell Signal*. **2016**; 28(1): 19-24.

Thankamony AP, Subbalakshmi AR, Jolly MK, Nair R. Lineage Plasticity in Cancer: The Tale of a Skin-Walker. *Cancers*. **2021**; 13(14): 3602.

Thermo Fisher Scientific. RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit. 2022. [Consultado 2023 enero 10 para la escritura de tesis]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/mx/en/K1621>

Thomson AC, Schuhmann T, de Graaf TA, Sack AT, Rutten BPF, Kenis G. The Effects of Serum Removal on Gene Expression and Morphological Plasticity Markers in Differentiated SH-SY5Y Cells. *Cellular and molecular neurobiology*. **2022**; 42(6): 1829–1839.

Wallrafen R, Dresbach T. The Presynaptic Protein Mover Is Differentially Expressed Across Brain Areas and Synapse Types. *Frontiers in neuroanatomy*. **2018**; 12(58).

Wang X-M, Mannan R, Xiao L, Abdulfatah E, Qiao Y, Farver C, Myers JL, Zelenka-Wang A, McMurry L, Su F, Wang R, Pantanowitz L, Jentzen J, Wilson A, Zhang Y, Cao X, Chinnaiyan AM, Mehra R. Characterization of SARS-CoV-2 and host entry factors distribution in a COVID-19 autopsy series. *Communications Medicine*. **2021**; 1(24): 1-10.

Yao E, Lin C, Wu Q, Zhang K, Song H, Chuang P-T. Notch Signaling Controls Transdifferentiation of Pulmonary Neuroendocrine Cells in Response to Lung Injury. *Stem Cells*. **2018**; 36(3): 377–391.

Yaquib N, Wayne G, Birchall M, Song W. Recent advances in human respiratory epithelium models for drug discovery. *Biotechnology Advances*. **2021**: 107832.

Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Medicine*. **2020**; 46(4): 586-590.

Zhang Q, Lu S, Li T, Yu L, Zhang Y, Zeng H, Qian X, Bi J, Lin Y. ACE2 inhibits breast cancer angiogenesis via suppressing the VEGFa/VEGFR2/ERK pathway. Journal of experimental & clinical cancer research: CR. **2019**; 38(1): 173.

Zhang Y, Zheng D, Zhou T, Song H, Hulsurkar M, Su N, Liu Y, Wang Z, Shao L, Ittmann M, Gleave M, Han H, Xu F, Liao W, Wang H, Li W. Androgen deprivation promotes neuroendocrine differentiation and angiogenesis through CREB-EZH2-TSP1 pathway in prostate cancers. Nature communications. **2018**; 9(1): 4080.

Zhao Y, Li W. Beta-adrenergic signaling on neuroendocrine differentiation, angiogenesis, and metastasis in prostate cancer progression. Asian Journal of Andrology. **2019**; 21(3): 253-259.

Zymo Research. Direct-zol RNA Miniprep Kits. 2023. [Consultado 2023 enero 10 para la escritura de tesis]. Disponible en: <https://zymoresearch.eu/products/direct-zol-rna-miniprep-kits>