



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ESTRADIOL EN LA  
EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS  
ACOPLADO A PROTEÍNA G SOBRE EL FENOTIPO  
NEUROENDÓCRINO DE LA LÍNEA CELULAR A549”**

**TESIS INDIVIDUAL**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**SARA DIANA TRUJILLO CHÁVEZ**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2024.**



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Evaluación del efecto de estradiol en la expresión del receptor de estrógenos acoplado a proteína G sobre el fenotipo neuroendócrino de la línea celular A549.

**por**

Sara Diana Trujillo Chávez

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

**Clave RI:** FQLIC-234681



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ESTRADIOL EN LA  
EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS  
ACOPLADO A PROTEÍNA G SOBRE EL FENOTIPO  
NEUROENDÓCRINO DE LA LÍNEA CELULAR A549”

TESIS INDIVIDUAL  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

SARA DIANA TRUJILLO CHÁVEZ

DIRIGIDA POR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SINODALES

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

DIRECTOR

Dra. ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO

SINODAL

MSP. JUANA SUSANA FLORES ROBLES

SINODAL

DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

SINODAL

## DEDICATORIA

*A mis padres, hermanos, Elenita y a mi Corazón. Por ayudarme a crecer y ser valiente.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Laura Berumen, por su guía, sus enseñanzas, su paciencia y su admirable vocación que me inspiró desde clases y en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Irasema Mendieta, por el apoyo desde el primer día en el laboratorio hasta el final de las técnicas, por su alegría y por los cafés. A la Maestra Susana Flores, por ser una gran maestra de clases y de vida. Al Dr. Sergio Romero, por ampliar mis perspectivas sobre la carrera en cada una de sus clases y como egresada.

Al Posgrado en Ciencias Químico Biológicas por brindarme el espacio para desarrollar este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio con los que nos dimos ánimos para no rendirnos: Dulce, May, Esbeidy, Vale, Ana, Judith, Abi, Mary e Hiram.

A mi equipo de laboratorio y amigas de toda la vida; Dany, Caro, Rose, Cris y Alma.

A mi novio, que con su amor me ayudó a salir de todos los obstáculos, con las técnicas y con la redacción y por recordarme que puedo lograrlo todo.

A mis tías que me han acompañado desde preescolar, Tere, Lupita...y Elenita, gracias por la curiosidad por mi carrera.

A mi papá, por su amor y por mantenerme optimista.

A mis hermanos y mi mamá, por apoyarme en mi camino por la ciencia, que con su amor y alegría me ayudaron a levantarme y a creer en mi cuando yo no podía hacerlo. Soy una parte de todos ustedes y aquí les dejo un pedacito de lo que logramos.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1  Cáncer de pulmón	1
1.1.1  Clasificación del cáncer de pulmón	1
1.1.2  Tumores neuroendócrinos de pulmón	5
1.2  Estrógenos	6
1.2.1  Receptores de Estrógeno	9
1.2.2  Eventos genómico y no genómicos mediados por estrógenos	11
1.3  Características del receptor de estrógenos acoplado a proteína G	13
1.3.1  Estructura y localización	13
1.3.2  Ligandos y señalización	14
1.3.3  Función biológica	15
1.4  Importancia de GPR30 en el cáncer de pulmón	18
2. HIPÓTESIS	21
3.1  General	22
3.2  Específicos	22
4. METODOLOGÍA	23
4.1  Materiales	23
4.2  Métodos	24

4.2.1 Cultivo celular	24
4.2.2 Transdiferenciación neuroendócrina	24
4.2.3 Tratamiento de A549 y A549 <sub>NED</sub> con E2	24
4.2.4 Ensayo de proliferación y viabilidad con azul de tripano	25
4.2.5 Ensayo de MTT	25
4.2.6 RT-PCR (Aislamiento de ARN, síntesis de ADNc, RT-PCR)	26
4.2.7 Análisis estadístico	27
4.2.8 Disposición de residuos	28
5. RESULTADOS	29
5.1 Estradiol aumenta la proliferación en células A549	29
5.2 El tratamiento con IBMX+ FSK induce el fenotipo neuroendócrino A549 <sub>NED</sub>	30
5.3 El estradiol afecta la morfología y la proliferación de A549 <sub>NED</sub>	30
5.4 Los fenotipos A549 <sub>NED</sub> y A549 <sub>NED+E2</sub> expresan sinaptofisina	30
5.5 El estradiol aumenta la expresión de GPER en A549 y A549 <sub>NED</sub>	33
6. DISCUSIÓN	35
6.1 Efecto del estradiol sobre la línea celular A549	35
6.2 Transdiferenciación de células A549 al fenotipo neuroendócrino A549 <sub>NED</sub>	36
6.3 Efecto del estradiol sobre el fenotipo neuroendócrino de A549	37
6.4 Expresión de GPER en A549 <sub>E2</sub> y A549 <sub>NED+E2</sub>	38
7. CONCLUSIONES	43
8. REFERENCIAS	44

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Características epidemiológicas de alteraciones moleculares en cáncer de pulmón de células no pequeñas.	4
2	Acciones atribuidas al receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER) en cada tipo de célula del sistema inmune.	18
3	Características de los oligos empleados para la reacción de PCR.	27



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química de estrógenos endógenos.	6
2	Síntesis de estrógeno en células de la teca y en células de Leydig.	8
3	Vía genómica a través de los receptores nucleares ER $\alpha$ y ER $\beta$ .	13
4	Modelo de vías de señalización mediada por GPER en el cáncer.	16
5	Cambios en la proliferación de A549 con el tratamiento de estradiol.	29
6	Tratamiento de la línea celular A549 con IBMS+FSK [0.05 mM].	31
7	Tratamiento de A549 <sub>NED</sub> con estradiol (E2).	32
8	Expresión del marcador neuroendócrino sinaptofisina (SYP).	32
9	Expresión de GPER en A549 y A549 <sub>E2</sub> .	33
10	Evaluación de la expresión de GPER.	34

## RESUMEN

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte en México y el mundo. Se ha reportado que puede presentar transdiferenciación en un fenotipo neuroendócrino que se traduce en un pronóstico menos favorable para los pacientes. Los estrógenos son importantes para el desarrollo de esta neoplasia. El receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER) es un receptor involucrado en respuestas rápidas no genómicas y se ha encontrado en una alta expresión en células cancerosas de pulmón. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar los cambios producidos por el estradiol (E2) sobre la proliferación de una línea celular de adenocarcinoma de pulmón (A549) y la expresión de GPER en su fenotipo neuroendócrino A549<sub>NED</sub>. El efecto sobre la proliferación se determinó mediante los ensayos de azul de tripano y MTT donde se encontró una diferencia significativa ( $p=0.0020$  y  $p < 0.0001$ , respectivamente) en el grupo tratado con estradiol (A549<sub>E2</sub>). La obtención del fenotipo neuroendócrino se realizó mediante el tratamiento con IBMX+FSK, utilizando sinaptofisina (SYP) como marcador específico del fenotipo. La expresión de SYP fue significativamente diferente en ambos grupos A549<sub>NED</sub> y A549<sub>NED+E2</sub> con respecto del grupo control A549 ( $p=0.0007$  y  $p=0.0204$ ). Finalmente, se evaluó la expresión relativa de GPER en el fenotipo neuroendócrino A549<sub>NED+E2</sub> obteniendo una diferencia significativa contra A549<sub>NED</sub> ( $p=0.0001$ ). Los resultados de este estudio sugieren seguir indagando sobre el papel de los estrógenos en el cáncer de pulmón así como mayor precaución en tratamientos hormonales, considerando especialmente como grupo de riesgo a mujeres menopáusicas afectadas por esta neoplasia.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1 Cáncer de pulmón**

El cáncer de pulmón ha sido reconocido como una de las principales causas de muerte por cáncer en México y en el mundo. A través de la base de datos GLOBOCAN 2020 se han reportado las estimaciones epidemiológicas causadas por el cáncer de pulmón. Para el 2020 alcanzó una incidencia de más de 2 millones de casos y casi 1.8 millones de muertes (Sharma, 2022). En el mismo año, en México se registraron 195 mil casos nuevos y 90 mil muertes por este tipo de cáncer (International Agency for Research on Cancer, 2020). Según el Instituto Nacional de Salud Pública en México, su alta mortalidad se ve explicada por ser una patología asintomática o “silenciosa” en los estadios tempranos por lo que se tiene una detección tardía cuando los pacientes llegan a etapas avanzadas (Gobierno de México, 2021).

Se han asociado los siguientes factores de riesgo: fumar, tanto en fumadores como en personas no fumadoras expuestas al humo, partículas tóxicas en el aire, sexo, genes o envejecimiento; aunque la causa más común de cáncer de pulmón es el tabaquismo (Hosseini y col., 2022). Al igual que la mayoría de los tumores malignos, el cáncer de pulmón se compone de subpoblaciones de células, con distintas características moleculares, resultando en una heterogeneidad intratumoral, por lo que es fundamental comprender cada aspecto biológico para el desarrollo de diagnósticos, terapias o tratamientos (Herbst y col., 2018).

#### **1.1.1 Clasificación del cáncer de pulmón**

Existen 2 formas principales de cáncer de pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas (que se presenta en el 85 % de los casos) y cáncer de pulmón de células pequeñas (15 % de los casos) (Thai y col., 2021).

El cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), es un carcinoma que se origina a partir de células madre neuroendócrinas de pulmón, se presenta en 13-15 % de todos los casos de cáncer de pulmón con un mal pronóstico cuyo principal factor se relaciona con los carcinógenos del tabaco. La clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce dos subtipos: CPCP y CPCP combinado (Rudin y col., 2021). El CPCP se produce en las células epiteliales del sistema respiratorio, se propaga en los ganglios linfáticos regionales y en los vasos linfáticos submucosos en ausencia de una invasión bronquial (Karuppasamy y col., 2021). Debido al lento progreso del tratamiento clínico, la tasa de supervivencia a 5 años del CPCP se ha mantenido por debajo del 7 % durante muchos años (Liang y col., 2022).

El cáncer de pulmón de células pequeñas engloba múltiples alteraciones genéticas, incluidas variaciones en los genes supresores de tumores, mutaciones en los factores de transcripción, modificación de la cromatina y receptores de tirosina quinasas o sus componentes de señalización. De hecho, el 95 % de los tumores revelan pérdida de la proteína del retinoblastoma 1 (RB1) y más del 65 % presentan mutaciones en la proteína p53 (Raso y col., 2021).

Por su parte, el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) se divide histológicamente en carcinoma de células grandes (5-10 %), carcinoma de células escamosas (25-30 %) y adenocarcinoma (Bruno y col., 2021). Las evidencias de la literatura apoyan que el carcinoma de pulmón de células escamosas deriva de los bronquios y avanza hacia la carina bronquial. El adenocarcinoma en el epitelio glandular de células madre bronquioalveolares o neumocitos tipo II. Además, el carcinoma de células grandes muestra disminución de morfología escamosa o glandular clásica (Karuppasamy y col., 2021). Entre la clasificación de CPCNP, los adenocarcinomas son el subtipo más frecuente, seguidos por los carcinomas de células escamosas (Thai y col., 2021), la comprensión profunda de los diferentes subtipos y su heterogeneidad es muy útil para abordar y definir potenciales estrategias de tratamiento para pacientes con esta patología (Passaro y col., 2021).

Así mismo, desde el 2004, año en el que se identificaron mutaciones oncogénicas activadoras en el dominio tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), se ha descrito un número cada vez mayor de alteraciones oncogénicas activadoras en el CPCNP, en las que se incluyen: mutaciones o amplificaciones de la proteína cinasa del linfoma anaplásico (ALK), el receptor de tirosina cinasa neurotrófico (NTRK), el oncogén del sarcoma viral de rata de Kirsten (KRAS), protooncogén B-Raf (BRAF), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR, también conocido como MET) y receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), así como las fusiones de (ALK) el protooncogén ROS 1 (ROS1) (Kerr y col., 2021; Passaro y col., 2021). De igual forma, estas alteraciones moleculares cuentan con diferentes características epidemiológicas (Cuadro 1) que se han observado dependiendo del subtipo, sexo, prevalencia, edad o si son fumadores. En el caso de los adenocarcinomas, se han reportado principalmente mutaciones en EGFR, ALK y ROS1. Por otro lado, EGFR, HER y ROS1 se presentan mayormente en pacientes mujeres y aquellos CPCNP con mutación en MET se han correlacionado con una edad más avanzada en el momento del diagnóstico en comparación con los cánceres de pulmón con mutación en EGFR, KRAS y BRAF (Fois y col., 2021).

Actualmente se están investigando otros biomarcadores y se recomienda su análisis siempre que sea posible. A pesar de la respuesta inicial a las terapias dirigidas, las mutaciones concurrentes y la heterogeneidad tumoral pueden afectar de manera diferente la respuesta al tratamiento, por lo que es crucial una descripción molecular precisa de los mecanismos de resistencia así como las características epidemiológicas del paciente (Bruno y col., 2021).

Cuadro 1. Características epidemiológicas de alteraciones moleculares en CPCNP (modificada de Fois y col., 2021).

Gen	Prevalencia	Edad	Género	No fumadores/ Fumadores	Histología
EGFR	40-50 % en población asiática	Pacientes jóvenes	Mujeres	No fumadores	Adenocarcinoma
ALK	1-10 % de CPCNP	Pacientes jóvenes	No definido	No fumadores	Adenocarcinoma
ROS1	0.9-2.6 % de CPCNP	Pacientes jóvenes	Mujeres	No fumadores	Adenocarcinoma
KRAS	30-40 % de CPCNP, más común en caucásicos	Pacientes jóvenes	¿Hombres? No definido	Fumadores	Adenocarcinoma
BRAF	2-4 % de CPCNP	No definido	V600E en mujeres y otros en hombres	Fumadores	Adenocarcinoma
MET	Mutaciones en 1-10 % de CPCN	Edad avanzada	No definido	Fumadores	Adenocarcinoma y Carcinoma de células escamosas
HER2	Mutaciones en 2-3 %	No definido	Mutaciones en mujeres y amplificaciones en hombres	Mutaciones en no fumadores y amplificaciones en ex-fumadores	Adenocarcinoma y raramente en Carcinoma de células escamosas

Ya que el cáncer de pulmón presenta características clinicopatológicas muy variadas, además de la clasificación de CPCP y CPCNP, desde 1967 la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido la clasificación de tumores pulmonares bajo los siguientes principios: la morfología, con apoyo de la inmunohistoquímica y las técnicas moleculares. Desde el 2021 incluso, se hace un mayor énfasis en anomalías moleculares individuales (Nicholson y col., 2022). Se han realizado estas divisiones específicamente por la creciente necesidad de diferenciar el CPCNP en tipos de

células específicas que permitan obtener una clasificación patológica y genética más precisa de los tumores de pulmón (Mariën y col., 2022).

### 1.1.2 Tumores neuroendócrinos de pulmón

Entre las subclasificaciones del cáncer de pulmón se encuentran los tumores neuroendócrinos de pulmón (NETs), los cuales son un grupo de tumores raros con patogenia heterogénea que se originan en células neuroendócrinas de captación y descarboxilación de precursores de aminas (APUD) de células de Kulchitsky (Savu y col., 2022) o pueden derivarse a partir de la transdiferenciación neuroendócrina de tipos de células epiteliales específicas de órganos (Kawasaki y col., 2023). El término “neuroendócrino” se divide en “neuro” que se basa en la presencia de gránulos de núcleo denso y “endocrino” por la síntesis de monoaminas (Chandrasekaran y col., 2023).

Los pulmones son el segundo sitio más común en desarrollar tumores neuroendócrinos después del sistema gastrointestinal, representan el 30 % de todos los NETs y se asocian con características histológicas adversas, pronóstico negativo y mayor capacidad de respuesta a la quimioterapia (Bellizzi A., 2020). Estos tumores expresan marcadores neuroendócrinos como la sinaptofisina y la cromagranina dentro del epitelio pulmonar (Shaurova y col., 2020).

En diferentes células cancerosas de próstata, pulmón y del sistema gastrointestinal se ha reportado la transdiferenciación neuroendócrina que se ve reflejada en una menor esperanza de vida de los pacientes (Mendieta y col., 2021; Chang y col., 2023).

Se descrito el rol de hormonas esteroides y sus receptores sobre tumores neuroendócrinos de mama (Sun y col., 2022), próstata (Abdulfatah y col., 2021) y en la glándula pituitaria, en esta última se han propuesto como alternativa los antiestrógenos para su tratamiento (Haydar y col., 2020).

Actualmente no se ha investigado el efecto de hormonas esteroides como el estradiol sobre la diferenciación neuroendócrina de pulmón. Este órgano responde a estas hormonas y sus receptores se expresan e involucran en diferentes aspectos importantes para su desarrollo y función que incluso pueden asociarse con la patogenia de enfermedades crónicas respiratorias como el cáncer de pulmón (Leach y col., 2021).

## 1.2 Estrógenos

El término “estrógeno” proviene de las palabras griegas *oistros* (frenesí, en celo) y *gennan* (producir) (Fuentes y Silveyra, 2019). Los estrógenos son un conjunto de hormonas sexuales que incluyen estrona (E1), estradiol (E2) y estriol (E3) (Figura 1), su estructura central se compone de 17 enlaces carbono-carbono dispuestos como cuatro anillos fusionados (tres anillos de ciclohexano y un anillo de ciclopentano) derivada de la biosíntesis del colesterol (Fuentes y Silveyra, 2019; Orzolek y col., 2022).

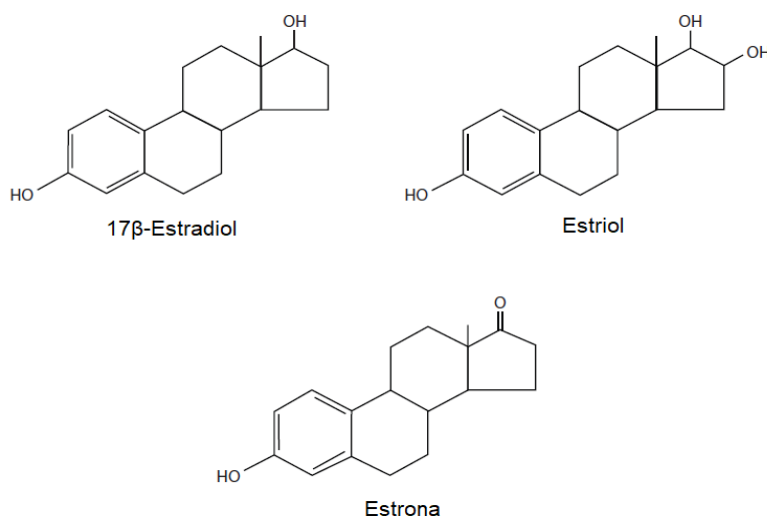


Figura 1. Estructura química de estrógenos endógenos (modificada de Awolaran, 2015).



Estas hormonas esteroideas regulan el desarrollo y la función de mecanismos fisiológicos, no sólo femeninos, sino también masculinos. Los esteroideos se sintetizan principalmente en los ovarios (E2 y progesterona), los testículos (andrógenos, testosterona) y las glándulas suprarrenales (cortisol, andrógenos) (Luo y Liu, 2020). En los ovarios, la síntesis de estrógeno empieza en las células de la teca con la síntesis de andrógenos, posteriormente en las células de granulosa, la enzima aromatasa (CYP19A1) es responsable de la bioconversión de andrógenos en estrógenos (Orzolek y col., 2022). En la gónada masculina, los estrógenos se sintetizan en las células de Sertoli, las células de Leydig y en espermatozoides (Figura 2) (Guercio y col., 2020).

La aromatasa se expresa también en el endometrio, vasos sanguíneos, hígado, pulmón, hueso, piel, tejido adiposo y cerebro. Los sitios principales donde se encuentran los estrógenos son los ovarios, gónadas, la placenta y el tejido cerebral, aunque también pueden detectarse en la piel, los huesos, el cerebro, el hígado, los pulmones y las glándulas suprarrenales (Orzolek y col., 2022).

Los estrógenos cumplen un papel crítico en la homeostasis de la glucosa, la homeostasis de los lípidos, el metabolismo óseo, la función cerebral, el crecimiento folicular, el crecimiento esquelético y la ovulación, entre otra variedad de funciones que dependen de sus señales (Patel y col., 2018). La palabra estrógeno se usa comúnmente para referirse al estradiol (E<sub>2</sub> o 17β-estradiol), debido a su relevancia fisiológica, además, es la hormona estrogénica más potente debido a su alta afinidad por los receptores de estrógeno (ER) (Ezhilarasan, 2020).

En general, la familia de estrógenos puede atravesar las membranas celulares hidrofóbicas, uniéndose a los receptores asociados a la membrana y a los receptores que se localizan en el núcleo, desencadenando cambios en la transcripción y en la expresión de genes (Dobbs y col., 2018).

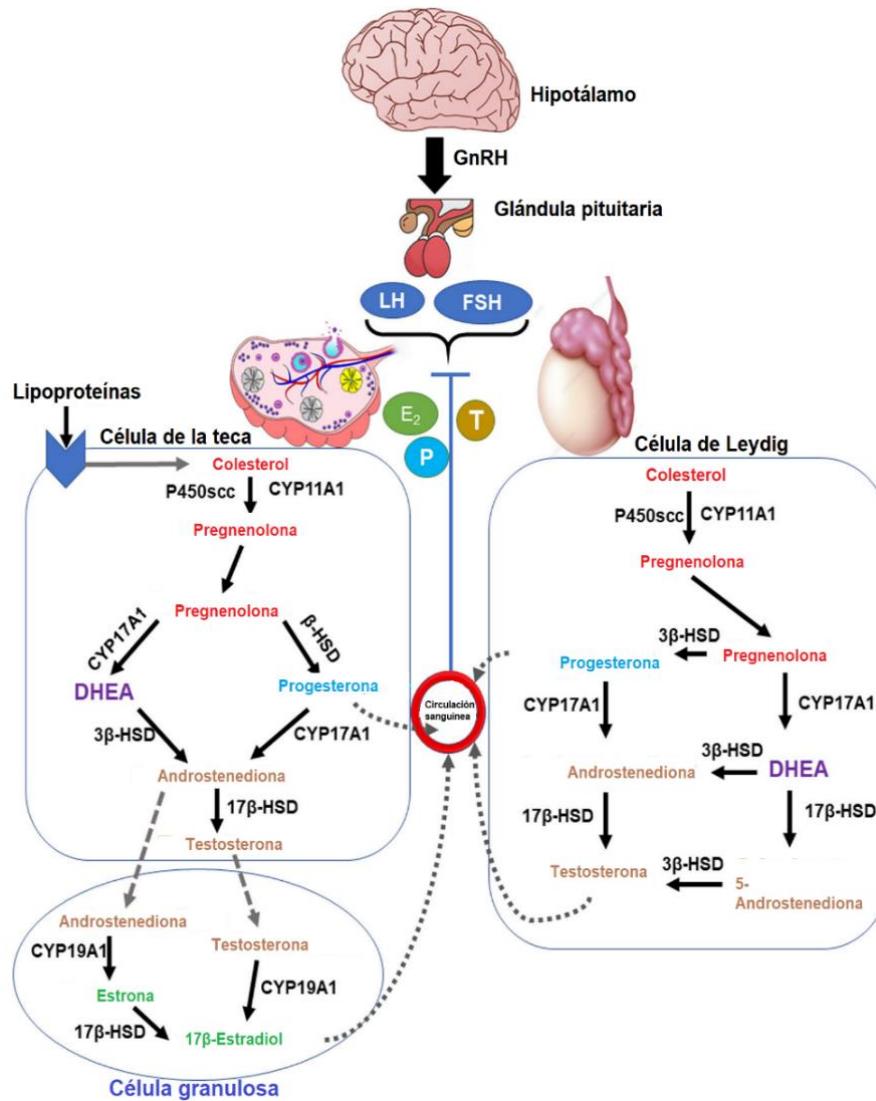


Figura 2. Síntesis de estrógeno en células de la teca y en células de Leydig. P450scc, ruptura de la cadena lateral P450; CYP11A1; 3β-HSD, 3β hidroxioesteroide deshidrogenasa; CYP17A1, citocromo P-450, familia 17, subfamilia A, gen del polipéptido 1; 17β-HSD, 17β-hidroxioesteroide deshidrogenasa (modificada de Ambhore y col., 2021).

### 1.2.1 Receptores de Estrógeno

Los estrógenos actúan sobre los tejidos diana a través de los receptores nucleares ER $\alpha$  y ER $\beta$ ; y los receptores de estrógeno acoplados a la proteína G unidos a la membrana (GPER/GPR30) (Fuentes y Silveyra, 2019).

El receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) y el receptor de estrógenos beta (ER $\beta$ ) tienen estructuras similares y fueron identificados y clonados respectivamente en 1986 y 1996, se unen al estrógeno con afinidades parecidas pero sus distribuciones tisulares son distintas (Chen, y col., 2019; Milette y col., 2019). Por su parte, el receptor de estrógenos alfa es codificado por el gen *Esr1* ubicado en el cromosoma 6 humano; por otro lado, el receptor beta es codificado por el gen *Esr2* encontrado en el cromosoma 14 (Porrás y col., 2021). El ER $\alpha$  está presente en la glándula mamaria, el útero, los ovarios (células tecaales), los huesos, los órganos reproductores masculinos (testículos, epidídimo, próstata), el hígado y los tejidos adiposos. Mientras que ER $\beta$  se encuentra en la próstata (epitelio), la vejiga, el ovario (células de la granulosa), el colon, el tejido adiposo, pulmones y el sistema inmune. No obstante, ambos subtipos se presentan en los sistemas nervioso central y cardiovascular (Saha y col., 2019).

Diferentes células inmunitarias, incluidos los linfocitos y los macrófagos, expresan ER $\alpha$  y ER $\beta$ , por lo que el estrógeno puede inducir respuestas inmunitarias según la expresión celular de los receptores de estrógeno. Específicamente, las células B y las células dendríticas expresan los niveles más altos de ARNm de ER en comparación con cualquier otro tipo de célula inmunitaria (Mateus y col., 2022). Se ha comprobado que la señalización del ER $\alpha$  promueve el desarrollo de nuevas células inmunitarias al actuar sobre los progenitores hematopoyéticos (Millas y Duarte, 2021).

Además, la expresión de los receptores de estrógenos (ER) modula la función de leucocitos: los niveles bajos de estrógeno tienden a aumentar la síntesis de citoquinas proinflamatorias y los niveles altos disminuyen su producción.

Adicionalmente, el estrógeno promueve la respuesta adaptativa de las células T contra la infección viral mediante el aumento de la proliferación de neutrófilos. También, induce la diferenciación de monocitos en células dendríticas inflamatorias, lo que induce una mayor producción de citoquinas e IFN y activa las células T auxiliares 1 (Th1) (Wehbe y col., 2021). Así mismo, se ha demostrado que la diferenciación de células dendríticas como células de Langerhans a partir de progenitores mieloides es promovida al agregar  $E_2$  *in vitro* e inhibida por antagonistas de ER y la deficiencia de ER $\alpha$  (Quatrini y col., 2021).

Por otro lado, en el sistema respiratorio, múltiples estudios han demostrado que los estrógenos y su señalización cumplen un papel importante no solo en el desarrollo pulmonar normal sino también en la fisiopatología del cáncer de pulmón (Li y col., 2022). La literatura ha reportado que los estrógenos promueven la producción de surfactante y el crecimiento de las vías respiratorias y el parénquima pulmonar (Yong y col., 2021). Se ha documentado que ER $\beta$  es la forma predominante en el pulmón y en células epiteliales bronquiales (Li y col., 2022, Millas y col., 2021) por lo que este receptor tiene un papel importante en el músculo liso bronquial, actuando como “protector” frente a las crisis de asma debido a la reducción del número de células del músculo liso y la hiperreactividad bronquial. También se requiere para el mantenimiento de la matriz extracelular en el pulmón (Millas y col., 2021).

Aunque aún resulta complejo el papel de ER $\beta$  en el cáncer de pulmón, se ha documentado que bajo ciertas condiciones experimentales, ER $\beta$  estimula la proliferación de células de carcinoma de pulmón de células no pequeñas a través de la activación extranuclear no genómica de la señalización de AMPc, Akt y MAPK. Otros informes sugieren que la expresión citoplasmática de ER $\beta$  está asociada con la resistencia a la terapia con inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Mal y col., 2020).

Por su parte, el receptor de estrógeno acoplado a proteína G (GPER), originalmente llamado “receptor 30 acoplado a proteína G” (GPR30), es un receptor involucrado en

respuestas rápidas no genómicas. Contrario a los receptores de estrógeno (alfa o beta), que son solubles y se encuentran en el citoplasma o en el núcleo celular, el GPR30, es un receptor transmembrana que se expresa tanto en la membrana plasmática (MP) como en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Tutzauer y col., 2020).

En las décadas de 1960 y 1970, dos estudios informaron los efectos rápidos celulares de E2 (estradiol) en la síntesis de cAMP (Szego y Davis, 1967) y la movilización de calcio (Pietras y Szego, 1977) asociados a la membrana que no involucraban la transcripción, por lo que se les denominó vías de señalización no genómicas o extranucleares. En 1997, se identificó y clonó por primera vez un nuevo receptor acoplado a proteína G (GPCR) de siete dominios transmembrana, nombrado GPR30, el cual fue clasificado como un GPCR huérfano sin ligandos endógenos afines (Luo y Liu, 2020). Más adelante, en 2005 los grupos de investigación de Thomas y col. y Revankar y col., proporcionaron datos para demostrar que E2 se une directamente a GPR30 o GPER, actuando como un receptor de estrógenos unido a la membrana. En 2007, por primera vez se investigó el papel fisiológico de GPR30 *in vivo* en hepatocitos de ratas demostrando el efecto no genómico de E2 en la reducción de la lesión hepática mediante la vía dependiente de la proteína quinasa A (PKA) a través de GPER pero no de ER $\alpha$  (Luo y Liu, 2020).

### 1.2.2 Eventos genómico y no genómicos mediados por estrógenos

Al introducirse en la membrana plasmática, los estrógenos interactúan con los receptores intracelulares ER $\alpha$  y ER $\beta$ , esta unión desencadena efectos directos sobre las secuencias de ADN. Alternativamente, el estrógeno puede activar cascadas de señalización intracelular mediante la acción de GPER y/o ER $\alpha$  y ER $\beta$ . Las diferencias en los eventos celulares y moleculares que conducen a la regulación de la expresión génica en la que los complejos estrógeno-receptor pueden unirse directa o indirectamente al ADN, conduce a eventos de señalización mediados por estrógenos que se pueden dividir en dos: 1) genómicos (vía directa), a través de los receptores

nucleares y 2) no genómicos (vía indirecta), ejecutados por el receptor de estrógeno acoplado a la proteína G (Fuentes y Silveyra, 2019).

1) Vía de eventos genómicos: Los receptores nucleares de tipo I en los que se incluyen los ER $\alpha$  y ER $\beta$ , se mantienen en un estado inactivo en el citosol. Ambos receptores tienen un grupo amino terminal que es responsable de la activación de la transcripción independiente del ligando, en el centro un dominio de unión al ADN (DBD) y en el extremo carboxilo un dominio de unión al ligando (LBD). Cuando un ligando esteroide entra a través de la membrana celular y se une al receptor, éste se transloca al núcleo, se une a los elementos de respuesta al estrógeno (ERE) y se homodimeriza. Posteriormente, el homodímero se une a sitios palindrómicos específicos cerca de los genes en el ADN genómico, lo que conduce a la represión o activación de la expresión génica (Figura 3) (Cole y col., 2019; Amir y col., 2021).

2) Por el contrario, los eventos no genómicos se ejecutan a través de la vía mediada por membrana, en la que el ligando actúa a través de GPER e involucra la activación de mecanismos de transducción de señales con la posterior producción de segundos mensajeros intracelulares, la regulación de AMPc y la activación de proteínas quinasas de cascadas de señalización que resultan en cambios indirectos en la expresión génica. Las cascadas de proteína quinasa se pueden clasificar en cuatro principales: 1) la vía de la fosfolipasa C (PLC)/proteína quinasa C (PKC), 2) la cascada Ras/Raf/MAPK 3) la cascada de fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K)/Akt cinasa y 4) la vía de señalización de AMPc/proteína quinasa A (PKA). Además, la unión de GPER a los estrógenos promueve la activación dependiente de estrógenos de la adenilil ciclasa y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La siguiente fosforilación de factores de transcripción por parte de las proteínas quinasas señaladas anteriormente puede alterar su función y capacidad para unirse a secuencias genómicas para afectar la expresión génica. Los ejemplos de factores de transcripción que se ven afectados por estos mecanismos de señalización incluyen: Elk-1, CREB, la proteína beta de unión al potenciador de CCAAT (C/EBP $\beta$ ),

el factor nuclear NF- $\kappa$ B y la familia de transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT) (Fuentes y Silveyra, 2019).

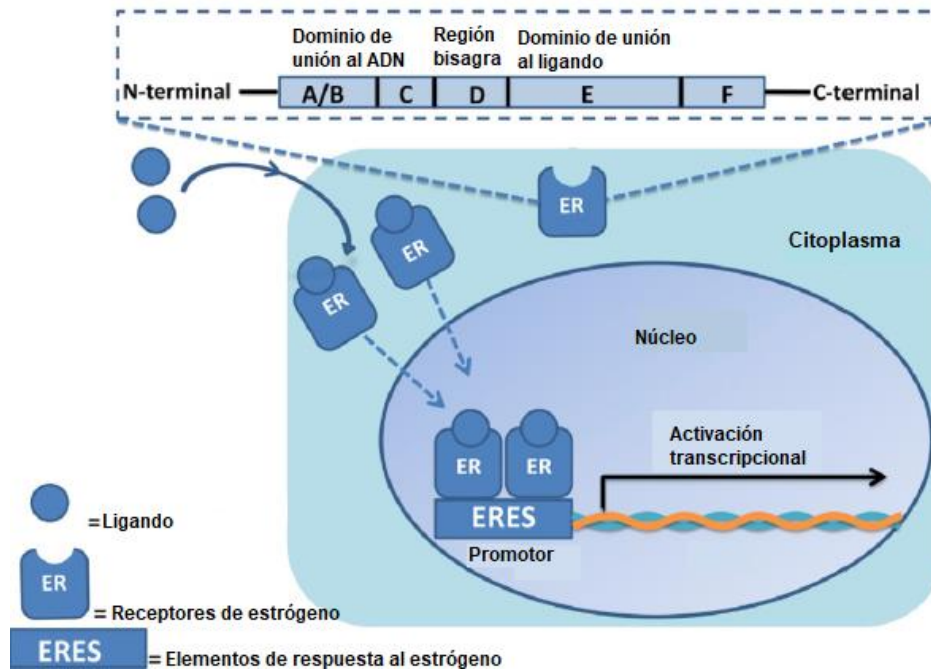


Figura 3. Vía genómica a través de los receptores nucleares ER $\alpha$  y ER $\beta$  (modificada de Jin y col., 2020).

### 1.3 Características del receptor de estrógenos acoplado a proteína G

#### 1.3.1 Estructura y localización

El gen GPER humano está ubicado en el cromosoma 7p22.3 y contiene un marco de lectura abierto de 1128 pb que codifica una proteína de 375 aminoácidos. La proteína de GPER consiste en siete dominios transmembrana unidas por tres bucles extracelulares y tres bucles intracelulares, un dominio N extracelular y un dominio C intracelular. En el dominio N, hay tres asparaginas conservadas: Asn25, Asn32 y Asn44 (la asparagina 44 es indispensable para la estructura y actividad del receptor) (Qie y col., 2021).

GPER se expresa en varios tejidos como la placenta, el corazón, los pulmones, el hígado, el cerebro, las mamas, la próstata, musculo esquelético y tejidos linfoides (Ulhaq y col., 2021).

### 1.3.2 Ligandos y señalización

GPER se define por ser un receptor que media múltiples eventos de señalización no genómicos inducidos por E2 y otras sustancias similares, que se caracteriza por ser: (1) muy rápido, en minutos o incluso segundos y (2) insensible a la transcripción de ADN y a los inhibidores de la síntesis de proteínas (Figueira y col., 2018).

Las tres formas fisiológicas de estrógeno (estrone, E<sub>2</sub> y estriol) pueden actuar como ligandos de GPER. La estrone y el E<sub>2</sub> se han descrito como agonistas de GPER, mientras que el estriol actúa como antagonista. Además de los estrógenos, otras moléculas se han descrito como agonistas de GPER que incluyen agentes terapéuticos como: dietilestilbestrol, tamoxifeno y su metabolito 4-hidroxitamoxifeno, etinilestradiol, raloxifeno y fulvestrant, así como xenoestrógenos como bisfenol A y fitoestrógenos como resveratrol, zearalenona y genisteína. Igualmente existen otros ligandos que se han sintetizado como G1 que actúa como agonista selectivo y dos antagonistas selectivos, G15 y G36 (Hernández y col., 2020).

Las respuestas mediadas por GPER se han descrito en varios tipos de células e involucran varios mecanismos moleculares y vías de señalización. Después de la unión del ligando, GPER inicia la señalización intracelular mediante la activación de proteínas G heterotriméricas, compuestas por subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , siendo esta última conocida como complejo  $\beta\gamma$ . En general, la subunidad  $G\alpha$  ( $G\alpha$ ) se disocia del complejo heterotrimérico  $G\alpha\beta\gamma$  y las subunidades libres ( $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ ) activan distintas vías de señalización intracelular (Figura 4) (Figueira y col., 2018), incluida la movilización de segundos mensajeros, como  $Ca^{2+}$  y óxido nítrico (NO), la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR), la vía inducida por HIF, la vía de señal Notch, la vía del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR), la vía



NF- $\kappa$ B, la vía Hippo/YAP y la activación de vías de señalización aguas abajo como la vía de señalización de PI3K/AKT (Qie y col., 2021; Wang y col., 2022). La interacción con estas vías de señalización influye en la expresión de proteínas, la apoptosis, la proliferación celular, la migración y el crecimiento celular (DeLeon y col., 2020).

### 1.3.3 Función biológica

Aunque GPER fue nombrado oficialmente por la Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica en el año 2007, aún resulta complejo descifrar totalmente las funciones fisiológicas de GPER como un ER novedoso en la salud y la enfermedad, debido a la naturaleza compleja de los eventos celulares iniciados de E2 que involucran múltiples receptores, sus diferentes ligandos, varias cascadas de señalización celular, unión directa de E2-GPER al ADN y regulación de la expresión génica (Luo y Liu, 2020). Sin embargo, cada vez existen más estudios para descifrar las diferentes funciones que ejecuta GPER sobre diferentes tejidos y enfermedades.

En la obesidad, investigaciones pasadas han sugerido que la deficiencia de GPER aumenta el peso corporal y disminuye el gasto de energía, además, regula la deposición de grasa en varios tejidos para mantener la salud metabólica (Sharma y Prossnitz, 2021). Se ha comprobado que en varios modelos murinos, el agonista GPER no esteroideo G-1 (G1) puede aliviar las complicaciones por obesidad y defectos metabólicos que conducen a la diabetes, reduciendo la resistencia a la insulina y la inflamación, y mejorando la homeostasis de la glucosa *in vivo*. Es por ello que GPER se propone como un objetivo terapéutico, con G1 como un agente útil para el tratamiento contra la diabetes (Shahcheraghi y col., 2021).

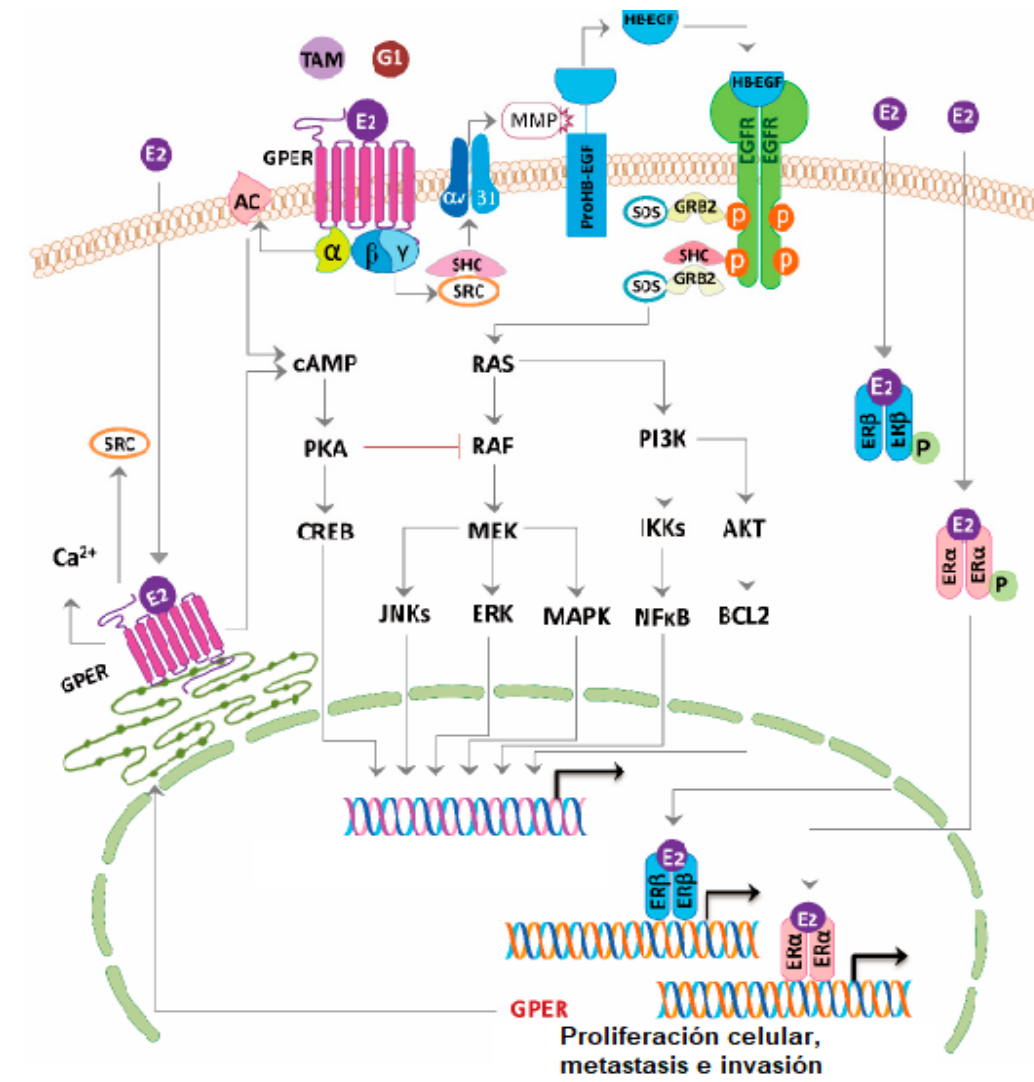


Figura 4. Modelo de vías de señalización mediada por GPER en el cáncer (modificada de Hsu y col., 2019). SRC, coactivador del receptor de esteroides; SHC, proteína adaptadora SHC; MMP, metaloproteína de matriz, proHB-EGF, factor de crecimiento similar al EGF de unión a proheparina; HB-EGF, factor de crecimiento similar al EGF que se une a la heparina; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; cAMP, adenosinmonofosfato cíclico; PKA, proteína cinasa A; CREB, elementos de unión de respuesta cAMP; RAF, fibrosarcoma rápidamente acelerado; MEK, proteína cinasa cinasa activada por mitógeno; cinasa regulada por señales extracelulares; PI3K, fosfatidilinositol-3-kinasa; IKKs, cinasas de los inhibidores de NF-κB; NF-κB, potenciador del factor nuclear de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; AKT, proteína cinasa B; BCL2, linfoma de células B2.

GPR30 también juega un papel fundamental en la inducción de los efectos antihipertensivos de E2. La activación selectiva de GPR30 reduce la presión arterial a través de una rápida vasodilatación y protege al corazón de lesiones hipertensivas, además, en la hipertensión, se ha demostrado que la activación de GPR30 con su agonista G1, disminuye la proliferación y migración de células musculares lisas vasculares coronarias (Aryan y col., 2020).

Aunque el papel de GPR30 aún resulta controversial en el sistema inmunológico, el ARNm de GPER se expresa en células hematopoyéticas CD34+, CD38+ y células maduras del sistema inmunitario por lo que GPR30 se ve involucrado el desarrollo y función de estas células (Cuadro 2) (Notas y col., 2020).

En el sistema nervioso, se ha reportado que la activación de GPER desencadena diferentes vías de señalización en las células neurales que dan como resultado respuestas específicas del tipo de célula. En las neuronas, la activación de GPER está asociada con la activación de vías que conducen a la promoción de la supervivencia celular. En los astrocitos, la activación selectiva de GPER con G1 induce su apoptosis, sin tener impacto en la supervivencia neuronal (Roque y Baltazar, 2019).

En cáncer de mama, GPER activa múltiples vías intracelulares que regulan los mecanismos críticos involucrados en el crecimiento, la invasión y la metástasis. GPER también se ha asociado a señales en los fibroblastos asociados al cáncer, lo que contribuye a la expresión de factores protumorales dentro del microambiente tumoral, como citocinas inflamatorias y factores angiogénicos (De Francesco y col., 2018).

Cuadro 2. Acciones atribuidas a GPR30 en cada tipo de célula del sistema inmune (Notas y col., 2020).

Tipo de célula	Acción
Linfocitos T	Induce IL-10 en las células T CD4+. Aumenta la expresión de Foxp3 de las células T CD4+ y las células T Foxp3 positivas.
Linfocitos B	Disminuye la proliferación de células B inducida por la activación. Aumenta IgG (memoria). Mejora la producción de anticuerpos naturales (en ratones).
Monocitos/Macrófagos	Disminuye la expresión de TLR4. Bloquea la respuesta inflamatoria a LPS y la expresión de PGE2, IL-6 y TNF $\alpha$ . Media la acción antiinflamatoria de E2 en monocitos humanos activados por LPS y macrófagos diferenciados <i>in vitro</i> a través de la interacción con E $\alpha$ y NF $\kappa$ B.
Eosinófilos	Aumenta la quimiotaxis inducida por CCL11. Bloquea la apoptosis espontánea dependiente de caspasa-3 en eosinófilos en reposo. Aumenta la apoptosis en eosinófilos estimulados por IL-5.
Neutrófilos	Aumenta la expresión de IL1b, CXCL8 y COX2.

#### 1.4 Importancia de GPR30 en el cáncer de pulmón

GPER se expresa en diferentes tejidos por lo que su función se ve reflejada en el sistema nervioso, sistema inmunológico, sistema cardiovascular, sistema respiratorio, metabolismo óseo, metabolismo de la glucosa en el páncreas, función renal y por supuesto, en el sistema reproductivo (Jung, 2019).

La evidencia recolectada respalda el papel de GPER/GPR30 en la progresión del cáncer y la metástasis, especialmente en los cánceres dependientes de estrógenos, como el cáncer de mama. Sin embargo, la señalización de GPER puede afectar de manera diferente el desarrollo del tumor no solo por el tipo de tejido, sino también dependerá del tipo de ligando (Chevalier y col., 2021).

En la actualidad, la expresión de GPER se ha correlacionado con características negativas del cáncer, incluido el tamaño tumoral, supervivencia celular, proliferación, migración, metástasis, la recurrencia del tumor y la producción de citoquinas que promueven estos efectos (Grande y col., 2020; Hernández y col., 2020).

En condiciones fisiológicas normales, los estrógenos participan en el desarrollo de los pulmones. Los receptores ER y GPER involucran acciones genómicas y no genómicas por lo que es crucial evaluar el nivel de expresión de estos receptores sobre el cáncer de pulmón (Maitra y col., 2021).

GPER está presente en los tejidos pulmonares y células epiteliales bronquiales normales. En condiciones fisiológicas completas, varios tejidos humanos, incluidos los pulmones, están sujetos a acciones no genómicas de E2-GPER. Así mismo, se ha observado una alta expresión de GPER en el tejido de cáncer de pulmón humano y de ratones, además de las líneas celulares de cáncer de pulmón como A549. En estas células, GPER se localiza predominantemente en el citoplasma (Jung, 2019; Maitra y col., 2021). A pesar de esto, los mecanismos por los que GPER actúa sobre el cáncer de pulmón aún no están del todo elucidados.

En investigaciones pasadas, Jala y col., 2012, demostraron que las secciones de tejido de adenomas pulmonares murinos así como adenocarcinomas pulmonares humanos, carcinomas de células escamosas y carcinomas pulmonares de células no pequeñas mostraron una expresión de GPER consistentemente más alta en el tumor en relación con el tejido no tumoral circundante. Por otro lado, Zhu y col., 2016, reportaron que la activación de GPER puede inhibir la migración de células CPCNP humanas a través de la supresión de las señales de IKK- $\beta$ /NF- $\kappa$ B. Además, se ha observado que la señalización de GPER induce la metaloproteinasas de matriz (MMP) en células de cáncer de pulmón humano y la metástasis pulmonar disminuye drásticamente en los ratones knockout (KO) para GPER (Jung, 2019).

Recientemente, en el estudio llevado a cabo por Shen y col., 2020, se reportó que la activación de GPER puede promover el crecimiento celular de NSCLC al regular la señalización de NOTCH1 metilado de YAP1-TEAD/QKI/circNOTCH1/m6A.

Aunque existen diferentes opiniones sobre la relevancia de estrógenos en la aparición y desarrollo del cáncer de pulmón, cada vez más estudios como el de proponen que la síntesis y modulación de estrógenos se presenta como un factor de alto riesgo y complicaciones en el CPCNP ya que los receptores de estrógeno (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) y GPER/GPR30 y sus vías de señalización, desempeñan múltiples funciones de gran importancia (Maitra y col., 2021; Inoue y col., 2023; May y col., 2023). Además, el efecto de GPER sobre tumores neuroendócrinos de pulmón no se ha reportado. Es entonces que dirigirse a los estrógenos y sus receptores, solos o combinados con otros tratamientos, puede ser una nueva estrategia para combatir el cáncer de pulmón, así mismo, es crucial entender el efecto de estradiol sobre GPER en subclasificaciones como los tumores neuroendócrinos.

## **2. HIPÓTESIS**

El estradiol (E2) incrementa la expresión de GPER y aumenta mayormente la proliferación en la línea celular A549 en comparación con el fenotipo neuroendócrino A549<sub>NED</sub>.

### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1 General

Evaluar los cambios producidos por E2 en la expresión de GPER y en la proliferación de la línea celular A549 en comparación con el fenotipo neuroendócrino A549<sub>NED</sub>.

#### 3.2 Específicos

- Analizar la proliferación y viabilidad de A549 por efecto de E2 a través del ensayo de azul de tripano y MTT.
- Transdiferenciar las células A549 para obtener su fenotipo neuroendócrino.
- Analizar la expresión de GPER en la línea celular control A549 y A549<sub>NED</sub> mediante RT-PCR.
- Evaluar el efecto de estradiol sobre la expresión de GPER en A549<sub>E2</sub> y A549<sub>NED+E2</sub>.



## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales

El cultivo de la línea celular A549 de adenocarcinoma de pulmón humano (ATCC) se realizó en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 11995065, Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) (10082147, Gibco) y 100 U/mL de solución de penicilina-estreptomicina (P4333, Sigma-Aldrich, EUA).

Los conteos se realizaron con solución de azul de tripano (25-900-CI, CORNING) y el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (475989, Sigma Aldrich).

Los tratamientos con estradiol se realizaron con  $\beta$ -Estradiol (E2) para cultivo celular (E2758, Sigma Aldrich).

La extracción de RNA se llevó a cabo utilizando el reactivo TRIzol (R2050-1-200, Zymo Research) y Direct-zol RNA MiniPrep Kit (R2050, Zymo Research). Para continuar con la síntesis de cadenas complementarias de DNA se empleó Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (K1621, Thermo Scientific).

Se empleó GoTaq Green Master Mix (M7122, Promega) para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la revelación de sus productos se realizó con agarosa (A9539, Sigma-Aldrich), GeneRuler 100 bp DNA Ladder (SM0241, Thermo Scientific) y bromuro de etidio UltraPure (15585011, Invitrogen).

La diferenciación neuroendócrina se realizó con forskolina (FSK) (HY15371, Med Chem Express) y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (I5879, Sigma Aldrich).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Cultivo celular

El cultivo de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano A549 (CELL BIOLABS, AKR-209) se realizó en medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) y 2 % de penicilina y estreptomycin, las condiciones de incubación se mantuvieron constantes a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %. Los subcultivos se realizaron hasta que se observaba el 80 % de confluencia celular y los lavados necesarios se llevaron a cabo con tampón fosfato salino 1x (PBS).

### 4.2.2 Transdiferenciación neuroendócrina

La transdiferenciación de la línea celular A549 al fenotipo neuroendócrino se realizó utilizando el método descrito por Mendieta y col., 2021 con algunas modificaciones. En placas de cultivo de 6 pozos se sembraron 2.5x10<sup>5</sup> células en 1 mL de medio DMEM completo y se dejaron incubando por 24 horas a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %. Pasado este tiempo, las células se lavaron con PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se les adicionó 1 mL de medio DMEM sin suero fetal bovino (SFB) suplementado con los inductores IBMX 0.5 mM + FSK 0.5 mM. Las células se incubaron bajo las condiciones iniciales durante 72 horas con cambio de medio a las 48 h. Los cambios morfológicos se observaron y se documentaron con fotografías con un microscopio invertido a las 0, 24, 48 y 72 horas del tratamiento.

### 4.2.3 Tratamiento de A549 y A549<sub>NED</sub> con E<sub>2</sub>

Para evaluar el efecto del estradiol las células A549 y A549<sub>NED</sub> fueron tratadas con β-estradiol (E<sub>2</sub>) a una concentración de 100 nM. Para el caso de la línea celular A459, se sembraron 2.5x10<sup>5</sup> células con DMEM completo en placas de 6 pozos y se incubaron por 24 h. Pasado el tiempo, se realizó un lavado con PBS 1X y se adicionó una concentración de estradiol [100 nM]. El tratamiento con E<sub>2</sub> tuvo una duración de 48 horas y posteriormente se realizó la extracción de ARN para su siguiente análisis.

En cuanto al tratamiento de las células A549<sub>NED</sub> con E2, primero se obtuvo el fenotipo neuroendócrino con el método descrito anteriormente. Una vez concluido el tratamiento de 72 h para adquirir células A549<sub>NED</sub> se adicionó estradiol [100 nM] a las células y se incubaron durante 48 horas para finalizar con la extracción de ARN de A549<sub>NED+E2</sub>.

#### 4.2.4 Ensayo de proliferación y viabilidad con azul de tripano

El porcentaje de proliferación de cada grupo se determinó con el método realizado por Mendieta y col., 2018 con algunas modificaciones. Se sembraron  $1.5 \times 10^5$  de células A549 en placas de 24 pozos con 300  $\mu$ L DMEM completo. Después de 24 horas se trató a las células con 300  $\mu$ L E<sub>2</sub> [100 nM]. Posterior a las 24 h con el tratamiento se realizó el conteo con azul de tripano al 0.04 %, realizando un lavado con PBS y agregando tripsina para despegar las células. Se tomaron 10  $\mu$ L de la suspensión celular y se agregaron a 10  $\mu$ L de azul de tripano (dilución 1:1), a continuación se colocaron 10  $\mu$ L de esta dilución en cada lado de la cámara de Neubauer para realizar el conteo con un microscopio invertido a las 24 y 48 horas del tratamiento.

#### 4.2.5 Ensayo de MTT

En conjunto con el ensayo de azul de tripano se realizó el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) para evaluar el cambio en la proliferación efectuado por el estradiol. Para ello, se siguió el protocolo del proveedor (Sigma Aldrich).

Primero, en una placa de 24 pozos se sembraron  $1.5 \times 10^5$  células con medio DMEM completo y se dejaron incubando por 24 horas. Pasado el tiempo, se realizó un lavado y se agregaron 300  $\mu$ L de E<sub>2</sub> [100 nM] a las células. Después de 24 horas de tratamiento, se retiró el medio dejando un volumen final de 100  $\mu$ L a los cuales se les adicionó 10  $\mu$ L de MTT y se incubaron por 4 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Posterior a la incubación se revisaron las células bajo el microscopio y se observó el cambio

en la morfología y el color, después, se desechó todo el medio y se agregaron 100  $\mu$ L de solución solubilizadora a cada pocillo. Finalmente, se transfirieron 50  $\mu$ L de cada muestra a una microplaca de 96 pocillos y se detectó la absorbancia en un lector de microplaca a 570 nm.

#### 4.2.6 RT-PCR (Aislamiento de ARN, síntesis de ADNc, RT-PCR)

Después de terminar con el tiempo de cada tratamiento las células fueron lavadas con PBS y despegadas con tripsina, seguido de una centrifugación para obtener un pellet de células. Posteriormente el sobrenadante fue removido para resuspender el botón celular en el reactivo TRIZol y se continuó con la extracción del ARN de las células con el kit Direct-zol RNA MiniPrep Plus.

Una vez obtenido el ARN total de las células A549 se verificó su pureza con el espectrofotómetro NanoDrop, así como su integridad con un gel de agarosa al 2 % en donde las muestras fueron cargadas con TrackIT Buffer (Invitrogen).

Después de revisar la pureza e integridad del ARN se empleó el kit First Strand cDNA synthesis (Thermo Fisher Scientific) para la síntesis de cadenas complementarias siguiendo el protocolo del proveedor. Primero, se agregaron los componentes de la reacción de hibridación que consisten en: Buffer, oligo DT, dNTPs, hexámero, ARN y agua libre de nucleasas. Posteriormente se colocaron los componentes de retrotranscripción (Buffer, inhibidor de ARNasa, RTasa y agua libre de nucleasas) y finalmente la reacción se llevó a cabo en un termociclador a 70 °C por 10 min.

Después de la síntesis de las cadenas complementarias de cDNA, se realizó la amplificación por PCR de punto final para la identificación del marcador neuroendócrino sinaptofisina, así como de GPER a través de GoTaq® Green Master Mix (Promega). En tubos de PCR se agregaron los siguientes componentes para alcanzar un volumen total de 25  $\mu$ L: GoTaq® Green Master Mix, ADNc los respectivos cebadores sentido 5'->3' (forward) y cebador antisentido 3'->5' (reverse) y agua libre de nucleasas.

En cada reacción de PCR se empleó como gen de referencia la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) así como su control negativo. Las características de los oligos empleados se describen en el Cuadro 3.

Las condiciones térmicas del termociclador fueron programadas como se indica a continuación: desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos a 95 °C durante 30 segundos de desnaturalización, alineamiento a 54.7 °C para SYp y 59.0 °C para GPER durante 30 segundos, elongación a 72 °C durante 1 minuto y elongación final por 5 minutos a 72 °C.

Posteriormente los productos fueron cargados con un marcador de peso molecular en un gel de agarosa al 2 % a 75 V por 40 min. Terminado el tiempo, se realizó la tinción del gel con bromuro de etidio durante 20 minutos y se reveló con un fotodocumentador (BIO-RAD) para su posterior análisis.

Cuadro 3. Características de los oligos empleados para la reacción de PCR.

Gen	Cebador/Oligo	Secuencia (5'->3')	Tamaño de producto
GAPDH	Forward Reverse	TTGCCCTCAACGACCACTTT TGGTCCAGGGGTCTTACTCC	120 pb
SYP	Forward Reverse	GTGCTGCAATGGGTGTTTCG CCGTGGCCAGAAAGTCCAG	349 pb
GPER	Forward Reverse	TTCCGCGAGAAGATGACCATCC TAGTACCGCTCGTGCAGGTTGA	113 pb

#### 4.2.7 Análisis estadístico

Cada ensayo fue realizado por triplicado. Los datos se analizaron a través de las pruebas t de Student y ANOVA (una vía o dos vías) mediante la prueba Tukey utilizando el programa GraphPad Prims 8.

#### 4.2.8 Disposición de residuos

Toda la experimentación fue ejecutada de manera que se produjera la menor cantidad posible de desechos. En el caso de residuos sólidos que tenían contacto con el cultivo celular fueron desechados en bolsas rojas de RPBI y entregados a ECOLSERVI. Los residuos líquidos utilizados para cultivo fueron inactivados 10 min con hipoclorito de sodio al 0.5 %.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Estradiol aumenta la proliferación en células A549

Para corroborar el efecto del estradiol (E2) sobre la proliferación de la línea celular A549 se realizó el conteo celular con el colorante de exclusión azul de tripano y con el ensayo de MTT.

En el ensayo con azul de tripano se encontró una diferencia significativa ( $p= 0.0020$ ) a las 48 horas con un aumento en el número de células hasta de 600 % en el grupo con tratamiento de E2 [100 nM] con respecto al grupo control (Figura 5.A). En otras palabras, tras sembrar 150,000 células y agregar una concentración de estradiol 100 nM la población aumentó hasta casi 1 millón de células en tan solo 48 h. Además se obtuvo un incremento de un 50 % en la proliferación de las 24 a 48 horas en A549<sub>E2</sub>.

El aumento en la proliferación también se observó en la densidad óptica (O.D., 570 nm) mostrada en el ensayo de MTT ( $p < 0.0001$ ), donde la O.D. fue mayor en A549<sub>E2</sub> en comparación con el grupo control (Figura 5.B). Ambas pruebas demuestran que el estradiol aumenta la proliferación de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano A549.

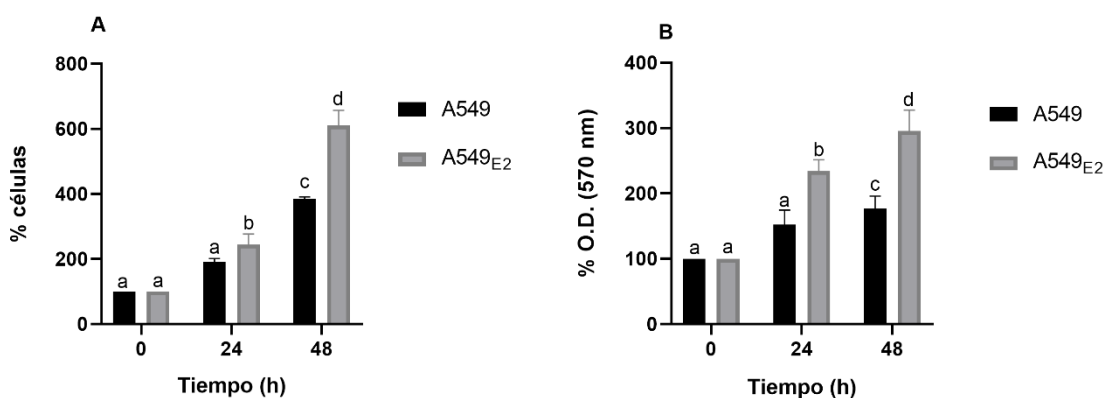


Figura 5. Cambios en la proliferación de A549 con el tratamiento de estradiol. A) Ensayo de azul de tripano y B) Ensayo de MTT. Ambos tratamientos se realizaron con estradiol [100 nM] a las 24 y 48 horas, expresada como la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media), ANOVA de dos vías, prueba *post hoc* de Tukey (n=3).

## 5.2 El tratamiento con IBMX+ FSK induce el fenotipo neuroendócrino A549<sub>NED</sub>

Posterior a las 72 horas de tratamiento con IBMX+FSK [0.5 mM], se observó la presencia de características morfológicas específicas del fenotipo neuroendócrino mostradas en la Figura 6, en donde se aprecian células con proyecciones tipo neurita. A las 24 horas del tratamiento se observaron algunas células con proyecciones, a las 48 horas se apreció un aumento en células con proyecciones más largas, finalmente, a las 72 horas se observaron células con el fenotipo neuroendócrino similar a neurita, con proyecciones largas, además se tuvo una reducción en la densidad celular en comparación con el grupo control en el cual las células siguieron proliferando.

## 5.3 El estradiol afecta la morfología y la proliferación de A549<sub>NED</sub>

El tratamiento con IBMX+FSK redujo la densidad celular y produjo un cambio en la morfología con proyecciones alargadas en A549<sub>NED</sub>. Sin embargo, al adicionar estradiol (E2) por 48 horas más sobre el fenotipo neuroendócrino (A549<sub>NED+E2</sub>), se observó una pérdida de la morfología tipo neurita, regresando a la morfología característica de la línea celular A549, así como un incremento en la proliferación celular después de 48 h del tratamiento con E2 (Figura 7).

## 5.4 Los fenotipos A549<sub>NED</sub> y A549<sub>NED+E2</sub> expresan sinaptofisina

En conjunto con la observación de la morfología tipo neurita, se realizó la técnica de PCR de punto final (RT-PCR) para corroborar la transdiferenciación de los fenotipos A549<sub>NED</sub> y A549<sub>NED+E2</sub>, a través de la expresión del marcador neuroendócrino sinaptofisina (SYP). En la Figura 8.A se puede observar un producto de 349 pb (pares de bases) que corresponde al peso del amplicón de la sinaptofisina en ambos fenotipos (A549<sub>NED</sub> y A549<sub>NED+E2</sub>), demostrando su transdiferenciación.



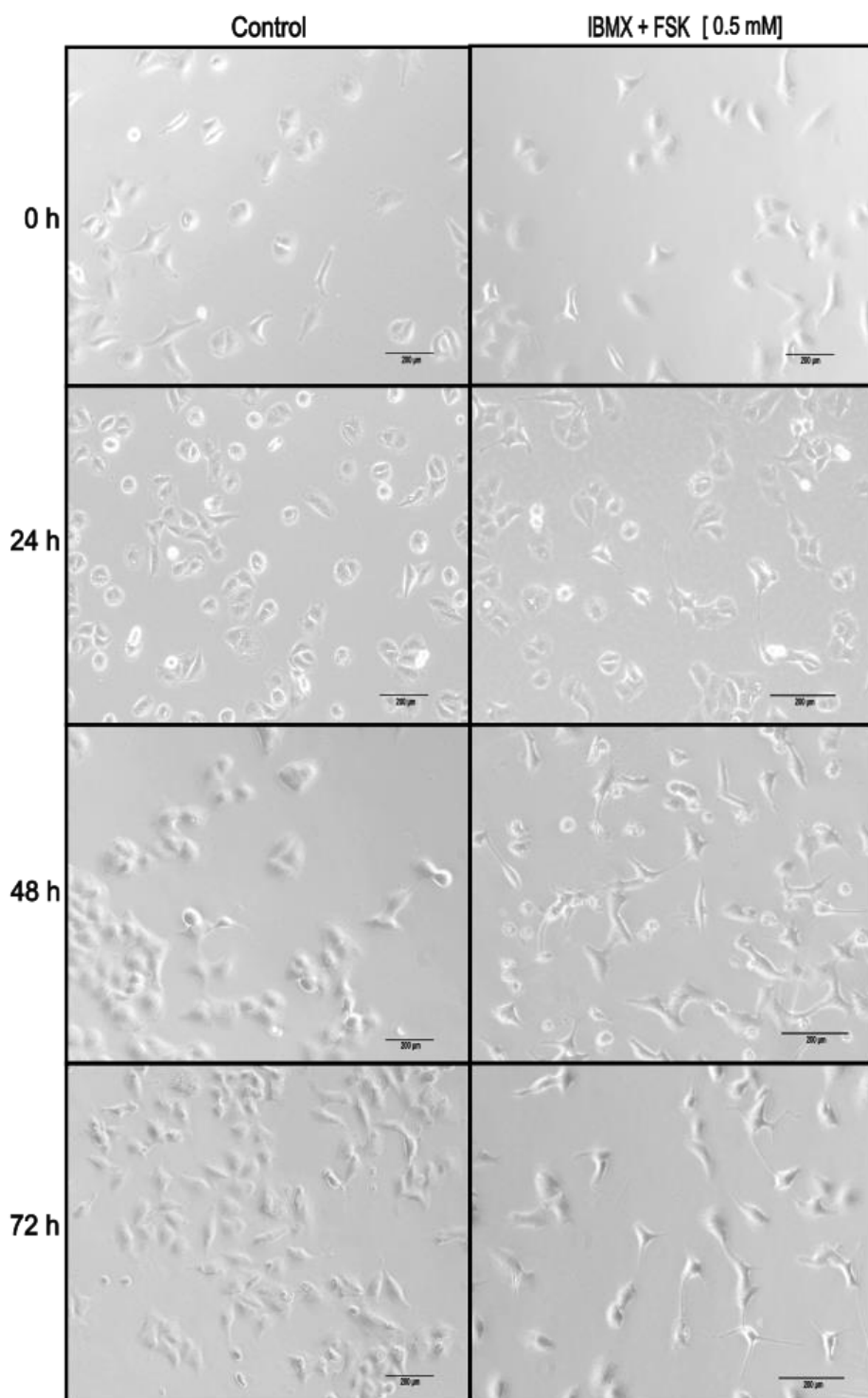


Figura 6. Tratamiento de la línea celular A549 con IBMX+FSK [0.05 mM]. Se muestran cambios en la morfología a las 24, 48 y 72 horas respecto al control A549.

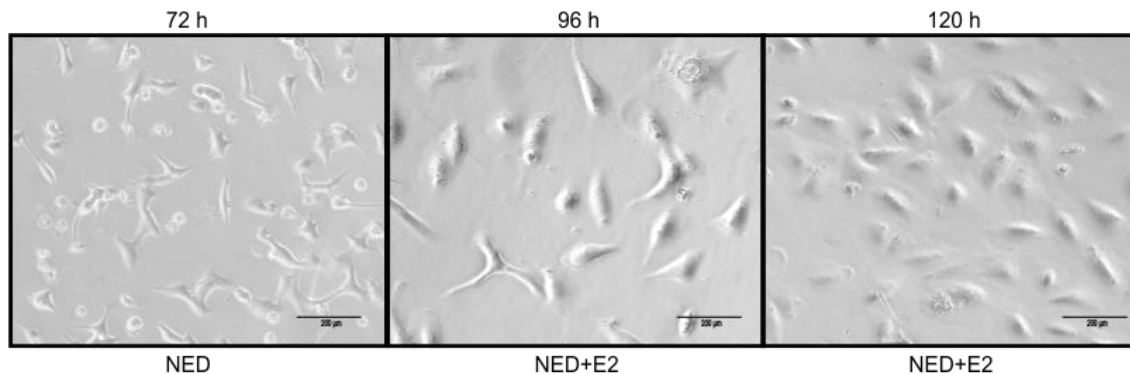


Figura 7. Tratamiento de A549<sub>NED</sub> con estradiol (E2). Pasadas las 72 h del tratamiento con IBMX+FSK, se adicionó E2 [100 nM] por 48 horas más.

Adicionalmente, el gel fue digitalizado en ImageJ y se evaluó el nivel de expresión relativa entre SYP respecto a GAPDH mediante la prueba de ANOVA de una vía utilizando GraphPad Prims 8.

Los resultados obtenidos indican la expresión de SYP en los fenotipos inducidos por el tratamiento con IBMX+FSK (Figura 8.A), además de una diferencia significativa de la expresión de SYP en A549<sub>NED</sub> ( $p = 0.0007$ ) y en A549<sub>NED+E2</sub> ( $p = 0.0204$ ) respecto

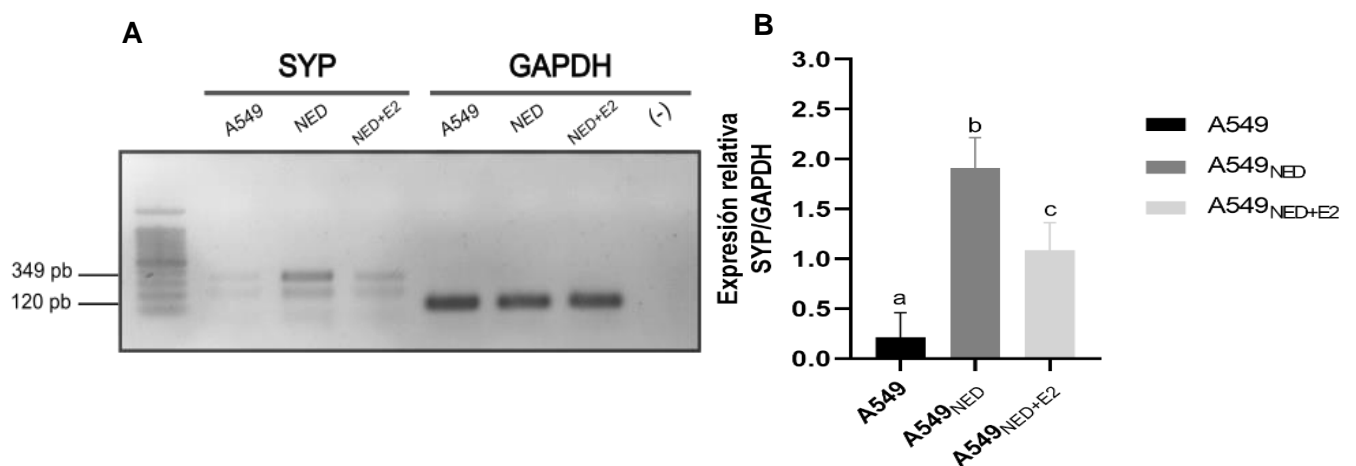


Figura 8. Expresión del marcador neuroendócrino sinaptofisina (SYP). A) Amplificación del producto de SYP (349 pb) y el gen de referencia GAPDH (120 pb) con su control negativo (-). B) Grafica de barras de la expresión relativa de SYP en A549, A549<sub>NED</sub> y A549<sub>NED+E2</sub>, expresada como la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media), ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey ( $n=3$ , \*\*\*,  $p = 0.0009$ ).

a A549, donde la expresión de SYP en A549<sub>NED</sub> es aproximadamente 3.5 veces mayor con relación a A549 (Figura 8.A), lo que demuestra la correcta obtención del fenotipo neuroendócrino llevado a cabo con tratamiento de IBMX+FSK.

### 5.5 El estradiol aumenta la expresión de GPER en A549 y A549<sub>NED</sub>

Se llevó a cabo la técnica de PCR punto final para corroborar la expresión de GPER en la línea celular A549 y evaluar los cambios de expresión en A549 tratada con E2 (A549<sub>E2</sub>). El gel fue digitalizado en ImageJ y se evaluó el nivel de expresión relativa normalizada entre GPER y GAPDH mediante la prueba t de Student utilizando GraphPad Prism 8.

En el gel de la Figura 8.A se muestran los productos correspondientes a GPER y GAPDH (113 y 120 pb, respectivamente) indicando la expresión de GPER en A549 y A549<sub>E2</sub>. Mediante la relación normalizada entre GPER/GAPDH, se corroboró que el tratamiento con estradiol aumenta significativamente la expresión de GPER ( $p=0.0001$ ) duplicando su expresión (Figura 9.B).

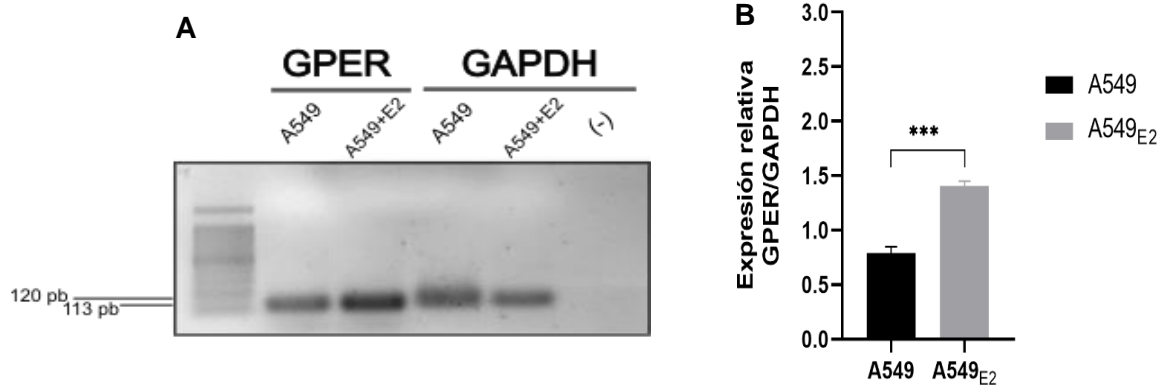


Figura 9. Expresión de GPER en A549 y A549<sub>E2</sub>. A) Gel con los productos de GPER (113 pb) y el gen de referencia GPADH (120 pb). B) Grafica de barras con la expresión relativa de GPER en A549 y A549<sub>E2</sub>, expresada como la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media) prueba t de Student ( $n=3$ , \*\*\*,  $p=0.0001$ ).

Con base en estos resultados sobre el efecto de E2, se realizó nuevamente la PCR agregando los grupos A549<sub>NED</sub> y A549<sub>NED+E2</sub> para analizar la expresión de GPER.

La Figura 10.A demuestra la expresión de GPER en todos los grupos de estudio con un producto de 113 pb. A través del método de Tukey de múltiples comparaciones se obtuvo una diferencia significativa de la expresión relativa de GPER entre A549 y A549<sub>E2</sub> ( $p=0.0005$ ) y A549<sub>NED</sub> contra A549<sub>NED+E2</sub> ( $p=0.0001$ ). Es de destacar que en la Figura 10.B la expresión relativa de GPER en A549<sub>NED+E2</sub>, si bien aumenta con el efecto de E2, no rebasa la expresión de A549 y A549<sub>E2</sub>.

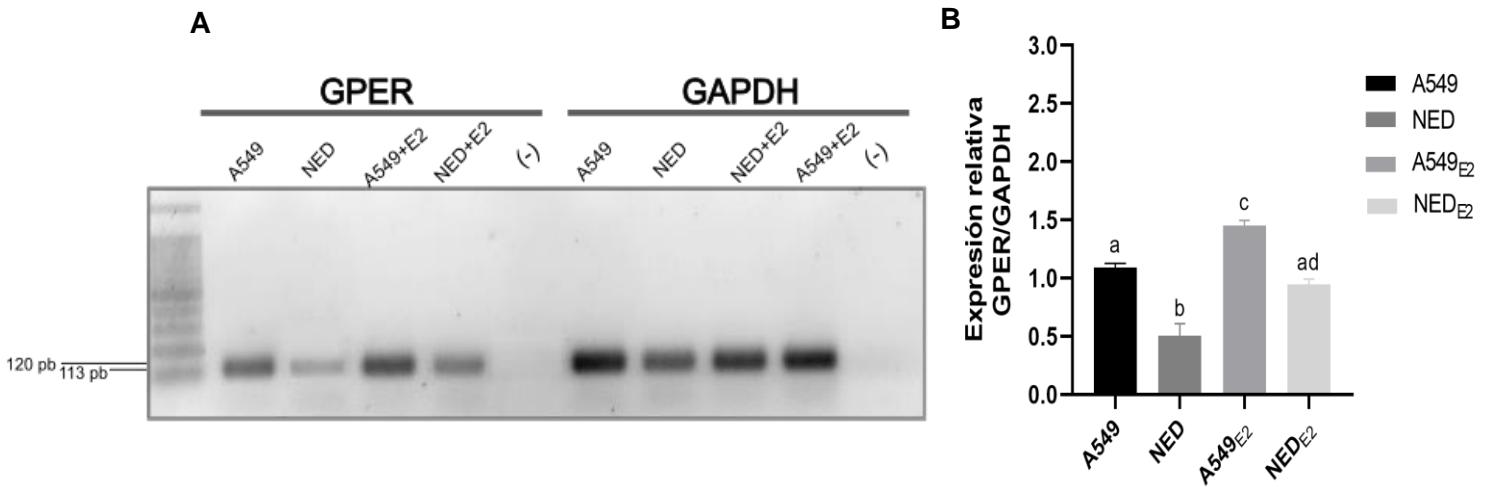


Figura 10. Evaluación de la expresión de GPER. A) Gel con los productos amplificados por PCR de GPER (113 pb) en la línea celular A549, A549 tratada con estradiol [100 nM] (A549<sub>E2</sub>), el fenotipo neuroendócrino NED y A549<sub>NED</sub> tratado con estradiol [100 nM] (NED<sub>E2</sub>), así como el gen de referencia GAPDH (120 pb). B) Expresión relativa normalizada de GPER en los grupos de estudio mencionados, expresada como la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media), ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey ( $n=3$ , \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ).

Los resultados del presente trabajo demuestran la expresión de GPER en el fenotipo neuroendócrino de pulmón y tal como se señaló en la hipótesis, GPER se expresa en el fenotipo neuroendócrino de adenocarcinoma de pulmón y la expresión de este receptor se incrementa en los grupos tratados con estradiol A549<sub>E2</sub> y A549<sub>NED+E2</sub>, en comparación con sus controles.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Efecto del estradiol sobre la línea celular A549

El efecto de estradiol sobre la proliferación de la línea celular A549 se evaluó empleando los ensayos de azul de tripano y MTT. Con ambos se tuvieron varios aspectos a considerar, como el número de células sembradas, la superficie del pozo y el volumen de medio para evitar la insuficiencia de nutrientes debido a la estimulación del estradiol sobre la confluencia celular.

Aunque el MTT es un ensayo extensamente utilizado, en este estudio se encontraron algunas complicaciones debido a su naturaleza citotóxica causada por la evaporación de disolventes volátiles de la solución solubilizadora (Riss y col., 2016). Por lo que se realizó un acomodo de células de tal forma que el MTT y la solución solubilizadora no intoxicaran a las células de los pozos contiguos afectando la continuidad del ensayo. Además se tuvo en cuenta la cantidad de células sembradas ya que como lo reporta Ghasemi y col., 2021, un elevado número de células puede resultar en una rápido consumo de MTT afectando la densidad óptica (O.D.), esto podría explicar las diferencias entre el porcentaje de proliferación obtenido con el ensayo de azul de tripano.

Finalmente, respecto a la concentración usada en este estudio, se eligió una concentración de estradiol 100 nM, la cual es una concentración de E2 endógena (Liu y col., 2019) y que en los ensayos de proliferación realizados resultó más eficiente que concentraciones más bajas, no obstante otros autores como He y col., 2019 y Gutiérrez y col., 2022 emplearon E2 [10 mM] con los que igual obtuvieron un aumento en la proliferación y viabilidad celular en la línea celular A549.

En el presente trabajo se corroboró que el tratamiento con estradiol incrementa la proliferación de la línea celular A549, en tan solo 48 horas el aumento de la densidad celular fue significativo, resultado que coincide con Rodríguez y col., 2018 y Siegfried, 2022, que además reportan mayor resistencia a la apoptosis, estimulación de

angiogénesis, migración y metástasis en presencia del estrógeno. Estas respuestas al estrógeno se ven explicadas debido a que las células del músculo liso de las vías respiratorias, las células endoteliales vasculares y las células epiteliales bronquiales responden a  $\beta$ -estradiol (E2) (Siegfried J, 2022), mismo que en el CPCNP es producido por la aromatasa que se localiza tanto en componentes de las células epiteliales de los tumores de pulmón como en macrófagos infiltrantes (Hsu y col., 2017).

A través de sus receptores, E2 desempeña un papel crítico en la tumorigénesis, el pronóstico y la respuesta al tratamiento del CPCNP (Smida y col., 2020). Por medio de la vía genómica, el complejo E2/ER induce la proliferación celular de CPCNP así como la progresión del ciclo celular al estimular la expresión de genes dependientes de estrógenos, como c-myc, ciclina D y la proteína Id (inhibidor del ADN). En cuanto a la vía no genómica, E2 activa diversas vías que promueven la proliferación celular y aumentan el crecimiento tumoral, como AMPc, PI3K, MAPK, AKT y ERK (Rodriguez y Ávila, 2021), mediante estas vías se puede explicar el aumento en la proliferación obtenido en este trabajo.

## 6.2 Transdiferenciación de células A549 al fenotipo neuroendócrino A549<sub>NED</sub>

Posteriormente se realizó la transdiferenciación utilizando el tratamiento con IBMX + FSK que anteriormente se han reportado como inductores del fenotipo neuroendócrino en A549 (Fosado y col., 2023). Para validar la diferenciación de A549 a A549<sub>NED</sub> se empleó el marcador neuroendócrino sinaptofisina (SYP), la cual es una glicoproteína de unión a calcio que es el principal constituyente proteico de membrana integral de las vesículas sinápticas de las neuronas (Juhlin, 2021) y desempeña funciones como la formación de sinapsis, exocitosis y endocitosis de las vesículas sinápticas (Cousin, 2021; Uhlig y col., 2022). Es entonces que SYP se expresa en neuronas y células neuroendócrinas (Tomita, 2020), debido a esto y a su alta sensibilidad, es ampliamente utilizada como marcador para identificar tumores neuroendócrinos (Hinterleitner y col., 2021).

En los resultados reportados en este estudio se presentó una doble banda en el producto de SYP, una correspondiente al producto de SYP y otra cuya causa podría deberse a la formación de dímeros de cebadores que se presenta por la complementariedad en el extremo 3' de los cebadores haciendo que se traslapen entre sí formando amplicones de menor tamaño (Bolívar y col., 2014), como se presentó en el gel de la Figura 8.A. Sería adecuado probar nuevas secuencias de cebadores para descartar una baja especificidad o bien una alta complementariedad entre estos que reduzca o elimine las posibilidades de la formación de dímeros.

### 6.3 Efecto del estradiol sobre el fenotipo neuroendócrino de A549

Después de corroborar la correcta transdiferenciación, se evaluó el efecto de E2 directamente sobre el fenotipo neuroendócrino.

Anteriormente se ha reportado que la inducción a un fenotipo neuroendócrino en cultivos celulares se ve acompañado por una reducción en el crecimiento y proliferación celular (Merkens y col., 2022). Así mismo, se ha comprobado que el fenotipo neuroendócrino de A549 inducido por IBMX+FSK se caracteriza por una baja proliferación (Mendieta y col., 2021).

Sin embargo, en el presente estudio, después de tratar al fenotipo neuroendócrino con E2 [100nM] (A549<sub>NED+E2</sub>), se observó un aumento en la densidad celular a pesar del tratamiento con FSK, que se ha reportado como anticancerígeno e inhibidor de la migración y proliferación celular (Salzillo y col., 2023). Además, se observó una pérdida de morfología del fenotipo neuroendócrino semejante a neurita en la mayoría de las células (Figura 7) y una reducción en la expresión relativa de SYP mostrada en la Figura 8, por lo que se podría suponer que el estradiol a través de sus receptores tiene un efecto de regresión de la transdiferenciación neuroendócrina al fenotipo original A549.

Se ha descrito que cerca del 30 % de los tumores neuroendócrinos (NETs) expresan receptores de estrógeno (ER) (Barros y col., 2023). En tumores neuroendócrinos de

pituitaria no funcionante, se ha reportado que los receptores de estrógeno se expresan ampliamente y pueden ser utilizados como biomarcadores potenciales para predecir el tamaño e invasividad de este tipo de tumor (Haydar y col., 2020). En tumores neuroendócrinos de mama la expresión de los ER pueden contribuir a un pronóstico negativo (Eyvaz y col., 2022).

Investigaciones pasadas demostraron que los ER se expresan en tumores neuroendócrinos de pulmón y aunque no es un órgano diana, el tejido pulmonar tiene una de las mayores capacidades de unión para  $\beta$ -estradiol. A pesar del papel controversial del estrógeno en NETs de pulmón, se ha demostrado que la terapia antiestrógeno logra inhibir el crecimiento en líneas celulares de cáncer de pulmón (Sica y col., 2008). Aunque no existen estudios respecto a la importancia de GPER en tumores neuroendócrinos de pulmón, se ha reportado una alta expresión y actividad en el epitelio bronquial de cáncer de pulmón de células no pequeñas e *in vitro*, el estrógeno incrementa la proliferación, migración e invasión a través de GPER (Rodríguez y Ávila, 2021), se podría suponer que la acción de estradiol sobre GPER es relevante en la proliferación de tumores neuroendócrinos de pulmón.

#### 6.4 Expresión de GPER en A549<sub>E2</sub> y A549<sub>NED+E2</sub>

Para la identificación de GPER en los grupos de estudio se utilizó la técnica de PCR de punto final que presenta diversas ventajas como la sensibilidad, ya que es capaz de detectar cantidades pequeñas de ADN o ARN; además, permite la obtención de resultados en una menor cantidad de tiempo por su facilidad de manejo y demuestra ser más rentable (Garibyan y Avashia, 2013; Liu HY y col., 2019). Sin embargo, serán necesarios más estudios con otras técnicas de cuantificación absoluta como la técnica de PCR en tiempo real, que permitan la identificación exacta de la cantidad de ADN o ARN presente en las muestras.

Estudios anteriores han demostrado niveles de expresión altos del receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER) en carcinomas de pulmón (Li y col., 2022) así como en la línea celular A549 (Jung, 2019).



Para validar el objetivo de este trabajo, se evaluó la expresión de GPER en células A549 y su fenotipo neuroendócrino A549<sub>NED</sub>. Se encontró que GPER se expresa en el tumor neuroendócrino de pulmón y dicha expresión es aumentada aproximadamente el doble en los fenotipos tratados con estradiol (A549<sub>E2</sub>, A549<sub>NED+E2</sub>) en comparación con sus respectivos controles.

GPER es una proteína transmembrana de siete dominios que a través del estrógeno lleva a cabo múltiples procesos celulares que no dependen de la regulación génica y ocurren instantáneamente, en un lapso de tiempo de segundos a minutos, por lo que son efectos no genómicos rápidos (Chen y col., 2022). Algunos de estos procesos son incrementar las concentraciones de AMPc y la movilización de calcio intracelular, lo que resulta en la activación de vías de señalización como PI3K/AKT, EGFR/ERK1/2 y Ras/MAPK que regulan la transcripción de genes asociados a la proliferación y sobrevivencia celular. Entre estos genes se incluyen a c-fos, la ciclina D, B y A involucrados en el ciclo celular y la proliferación (Clusan y col., 2023).

El calcio (Ca<sup>2+</sup>) es conocido como un poderoso segundo mensajero, es activado por numerosos receptores y desempeña un papel crítico en diversos procesos biológicos, como la diferenciación, proliferación, migración y muerte celular (Raynard y col., 2022), estos eventos con frecuencia se observan desregulados en células de cáncer de pulmón en estadios avanzados (Tran, 2021). Adicionalmente, el papel de la concentración del Ca<sup>2+</sup> en la diferenciación neuroendócrina se ha establecido claramente en el cáncer de próstata (Fiorio y Gkika, 2020), incluso se asocia al calcio como un impulsor de NETs, ya que un aumento de la densidad en la corriente de Ca<sup>2+</sup> afecta la proliferación y progresión de este tipo de tumores (Bery y col., 2020). Se ha demostrado que GPER afecta la movilización de calcio desde las reservas intracelulares, lo que activa la proteína cinasa C (PKC) estimulando los canales de calcio de la membrana plasmática (Girgert y col., 2019; Prossnitz y Barton, 2023), este flujo de Ca<sup>2+</sup> tiene efecto sobre la proliferación celular de diversas líneas celulares (Hernández y col., 2020).

Al igual que el calcio, el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) es un segundo mensajero importante implicado en una amplia variedad de procesos celulares, que incluyen el crecimiento, la diferenciación y la transcripción genética (Parsons y col., 2023). Además, se ha reportado que en cáncer de próstata es uno de los principales inductores de la diferenciación neuroendócrina, promoviendo cambios morfológicos de las células, así como la producción y secreción de marcadores neuroendócrinos como la enolasa neuroespecífica (NSE), SYP o cromogranina A (CgA) (Merkens y col., 2022). Por otra parte, estudios anteriores han demostrado que GPER controla la vía del adenosín monofosfato cíclico/proteína cinasa A/proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (AMPc/PKA/CREB), modulando positivamente la expresión de reguladores del ciclo celular como las ciclinas D1 y E1 y las cinasas dependientes de ciclina 2 y 6 (CDK2 y CDK6) (Chuang y col., 2020).

En el cáncer de pulmón el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una de las principales mutaciones oncogénicas (40-89 % de casos en CPCNP) que a su vez presenta una comunicación bidireccional entre los receptores de estrógeno nucleares (ER) y el receptor de estrógeno de membrana GPER (Black y col., 2023). Este receptor a través de la vía EGFR/ERK1/2 induce la regulación de las metaloproteinasas de la matriz, proteínas esenciales en la proliferación, invasión y metástasis en células de cáncer de pulmón (Hassanein y col., 2021; Peña y col., 2022).

Así mismo EGFR, es expresado en 60 % de los tumores neuroendócrinos de pulmón y regula el crecimiento tumoral a través de la señalización de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y fosfatidilinositol-3-kinasa/proteína cinasa B (PI3K/AKT), vías de señalización importantes en la progresión del ciclo celular y la proliferación celular (Maharjan y col., 2021; Merkens y col., 2022).

Ya que los mecanismos mencionados previamente se ven involucrados en la biología de los tumores neuroendócrinos y en su diferenciación, también son regulados por GPER se podría suponer que este receptor se asocia a la progresión de los tumores

neuroendócrinos de pulmón mediante la señalización del AMPc,  $Ca^{2+}$  o EGFR. Dichas vías podrían explicar los resultados obtenidos en este trabajo, ya que se evaluó la expresión de GPER en A549 y en su fenotipo neuroendócrino A549<sub>NED</sub>, así como el cambio en la expresión de este receptor causado por la adición de estradiol (E2) [100 nM].

Los resultados comprueban la expresión de GPER en el tumor neuroendócrino de pulmón y un aumento del doble en su expresión relativa con la adición de E2 (A549<sub>NED+E2</sub>) en comparación con A549<sub>NED</sub>.

GPER inicia su señalización incrementando la concentración de AMPc y la movilización intracelular de calcio, ambos mensajeros importantes para la diferenciación neuroendócrina y la proliferación de los tumores neuroendócrinos. Al mismo tiempo en que ocurre la estimulación de las vías de señalización dependientes de AMPc y la liberación de calcio, el estrógeno actúa a través de GPER para transactivar a EGFR que promueve la proliferación, invasión y migración celular en cáncer de pulmón. Podría suponerse con base a los resultados observados en este trabajo, que estas vías de señalización también son reguladas por GPER en tumores neuroendócrinos de pulmón, ya que se observó un aumento en la proliferación y una diferencia significativa en la expresión relativa de GPER en A549<sub>NED+E2</sub>.

Es de reconocer que el aumento en la proliferación de A549<sub>NED</sub> tratado con estradiol también podría deberse a la actividad de los receptores nucleares  $Er\alpha$  y  $Er\beta$ . Debido al alcance de este estudio no fue posible comparar la expresión de GPER entre los tres receptores en NETs. Algunos autores señalan que la afinidad del estradiol es menor en GPER en comparación con los ER (Orzolek y col., 2022), sin embargo, autores como Rouhimoghadam y col., 2020 mencionan que la constante de disociación (Kd) puede ser difícil de comparar debido al hecho de que los ER y GPER se expresan en diferentes niveles y existen en diferentes entornos fisicoquímicos. Sin embargo, en este trabajo, el hecho de llevar a cabo los ensayos con el tratamiento

de E2 solo por 48 horas fue con el propósito de observar las respuestas rápidas que pudiera efectuar el estradiol a través de GPER.

Son necesarios estudios posteriores que evalúen la expresión de los tres receptores de estrógeno en tumores neuroendócrinos de pulmón y comprueben si el aumento de la proliferación estimulada con E2 es causada por alguno de los receptores nucleares, por GPER o por los tres receptores de estrógeno al mismo tiempo.

Estudios recientes han descrito la importancia de los receptores de estrógeno ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$  y GPER) en el desarrollo y progresión del cáncer de pulmón (Inoue y col., 2023; May y col., 2023; Tani y col., 2023), dicha relevancia se debe al alto porcentaje de expresión de los receptores de estrógeno en pacientes con cáncer de pulmón (60-80 %) (Rodríguez y Ávila, 2021). Debido a este hecho y a que GPER regula diferentes vías de señalización que también se ven asociadas con la diferenciación y desarrollo de tumores neuroendócrinos, valdría la pena seguir indagando en la señalización de GPER y los receptores nucleares sobre los NETs, ya que a pesar de la contribución de estos receptores, su señalización conjunta puede brindar información importante para futuras terapias antiestrógeno y prevención de la diferenciación neuroendócrina en cáncer de pulmón.

## 7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo confirmaron la expresión del receptor de estrógenos acoplado a proteína G en el fenotipo neuroendócrino de adenocarcinoma de pulmón inducido por el tratamiento con IBMX+FSK. Además, se demostró un aumento en la proliferación celular y en la expresión de GPER en el fenotipo neuroendócrino tratado con estradiol. Son necesarios estudios posteriores para evaluar si el aumento de la proliferación celular de A549<sub>NED</sub> fue debido a la acción de GPER, de los receptores nucleares (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) o de la actividad conjunta de los tres receptores.

Aunque la relevancia de los ER y GPER aún se sigue estudiando en el cáncer de pulmón, los resultados de este trabajo respaldan el considerar las diferencias sexuales y hormonales en el cáncer de pulmón y sus diferentes fenotipos. Se propone tomar precauciones con los tratamientos hormonales, especialmente en mujeres menopáusicas con cáncer de pulmón.

Finalmente, se requieren seguir elucidando los mecanismos de señalización regulados por GPER en el cáncer de pulmón, así como aquellos que pudieran dar lugar a un fenotipo neuroendócrino y su progresión.

## 8. REFERENCIAS

**Abdulfatah E**, Reichert Z, Davenport M, Chinnaiyan A, Dadhania V, Wang X, Mannan R, Kunju L, Hollenbeck B, Montgomery J, Kaffenberger S, Morgan T, Alva A, Palapattu G, Vaishampayan U, Alumkal J, Spratt D, Udager A, Mehra R. De Novo Neuroendocrine Transdifferentiation in Primary Prostate Cancer—a Phenotype Associated with Advanced Clinico-Pathologic Features and Aggressive Outcome. *Med. Oncol.* **2021**; 38 (3).

**Ambhore N**, Kalidhindi R, Sathish V. Sex-Steroid Signaling in Lung Diseases and Inflammation. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Springer International Publishing: Cham **2021**; 1303: 243–273.

**Amir S**, Shah S, Mamoulakis C, Docea A, Kalantzi O, Zachariou A, Calina D, Carvalho F, F.; Sofikitis N, Makrigiannakis A, Tsatsakis A. Endocrine Disruptors Acting on Estrogen and Androgen Pathways Cause Reproductive Disorders through Multiple Mechanisms: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**; 18: 1464.

**Aryan L**, Younessi D, Zargari M, Banerjee S, Agopian J, Rahman S, Eghbali M. The Role of Estrogen Receptors in Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**; 21: 4314.

**Barros M**, Strosberg J, Al-Toubah T, de Jesus V, Durant L, Mello C, Riechelmann R. HORMONET: a phase II trial of tamoxifen for estrogen/progesterone receptor-positive neuroendocrine tumors. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* **2023**; 15, 17588359231186041.

**Awolaran O**. Cellular Mechanisms of Oestrogen in Breast Cancer Development. *Open Access J. Sci. Technol.* **2015**; 3.

**Bellizzi A**. Immunohistochemistry in the Diagnosis and Classification of Neuroendocrine Neoplasms: What Can Brown Do for You? *Hum. Pathol.* **2020**; 96, 8–33.

**Bery F**, Cancel M, Chantôme A, Guibon R, Bruyère F, Rozet F, Mahéo K., Fromont G. The Calcium-Sensing Receptor Is A Marker and Potential Driver of Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer. *Cancers (Basel)* **2020**; 12 (4), 860.

**Bolivar A**, Rojas A, García P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina* **2014**; 3(1), 25-33.

**Bruno R**, Ali G, Poma A, Fontanini G. Non-Small Cell Lung Cancer Molecular Characterization of Advanced Disease with Focus on Sex Differences: A Narrative Review. *Precis. Canc. Med.* **2021**; 4: 14–14.

**Chang H**, Chen K, Chang Y, Shih J, Yu C. Lung Adenocarcinoma with Neuroendocrine Differentiation: Molecular Markers Testing and Treatment Outcomes. *J. Formos. Med. Assoc.* **2023**; 122 (8), 731–737.

**Chevalier N**, Hinault C, Clavel S, Paul R, Fenichel P. GPER and Testicular Germ Cell Cancer. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2021**; 11:600404

**Chen C**, Gong X, Yang X, Shang X, Du Q, Liao Q, Xie R, Chen Y, Xu J. The Roles of Estrogen and Estrogen Receptors in Gastrointestinal Disease. *Oncol. Lett.* **2019**; 18: 5673–5680.

**Chen P**, Li B, Ou L. Role of Estrogen Receptors in Health and Disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2022**; 13.

**Chuang S**, Chen C, Chou Y, Ho M, Chang J. G Protein-Coupled Estrogen Receptor Mediates Cell Proliferation through the cAMP/PKA/CREB Pathway in Murine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**; 21 (18), 6490.

**Clusan L**, Ferrière F, Flouriot G, Pakdel F. A Basic Review on Estrogen Receptor Signaling Pathways in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**; 24 (7), 6834.

**Cole T**, Short K, Hooper S. The Science of Steroids. Semin. Fetal Neonatal Med. **2019**; 24: 170–175.

**Cousin, M.** A. Synaptophysin-dependent Synaptobrevin-2 Trafficking at the presynapse-Mechanism and Function. J. Neurochem. **2021**; 159 (1), 78–89.

**De Francesco E**, Maggiolini M, Musti A. Crosstalk between Notch, HIF-1 $\alpha$  and GPER in Breast Cancer EMT. Int. J. Mol. Sci **2018**; 19: 2011.

**DeLeon C**, Wang D, Arnatt C. G Protein-Coupled Estrogen Receptor, GPER1, Offers a Novel Target for the Treatment of Digestive Diseases. Front. Endocrinol. (Lausanne) **2020**; 11: 578536.

**Dobbs R**, Malhotra N, Greenwald D, Wang A, Prins G, Abern M. Estrogens and Prostate Cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis. **2018**; 22:185–194

**Esparza S.** Modificaciones En La Expresión de Receptores a Serotonina 5-HT<sub>2C</sub> Y 5-HT<sub>5A</sub> En El Hipocampo de Ratas Con Obesidad Inducida Por Dieta. **2018**.

**Eyvaz K**, Alikanoğlu A, Hamamci E, Kazan M, Çakir T. Neuroendocrine Carcinoma of the Breast: A Case Report and Review of the Literature. Eur. Res. J. **2022**; 8 (4), 550–553.

**Ezhilarasan D.** Critical Role of Estrogen in the Progression of Chronic Liver Diseases. Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. **2020**; 19: 429–434.

**Figueira M**, Cardoso H, Socorro S. The Role of GPER Signaling in Carcinogenesis: A Focus on Prostate Cancer. In Recent Trends in Cancer Biology: Spotlight on Signaling Cascades and microRNAs; Springer International Publishing: Cham **2018**; 1: 59–117.

**Fiorio A**, Gkika D. Ca<sup>2+</sup> Channel Toolkit in Neuroendocrine Tumors. Neuroendocrinology **2020**; 110 (1–2), 147–154.



**Fois S**, Paliogiannis P, Zinellu A, Fois, A, Cossu A, Palmieri G. Molecular Epidemiology of the Main Druggable Genetic Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**; 22: 612.

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

**Fuentes N**, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol.* **2019**; 116:135–170.

**Garibyan L**, Avashia N. Polymerase chain reaction. *The Journal of Investigative Dermatology* **2013**; 133(3), 1–4.

**Ghasemi M**, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**; 22 (23), 12827.

**Girgert R**, Emons G, Gründker C. Estrogen Signaling in ER $\alpha$ -Negative Breast Cancer: ER $\beta$  and GPER. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2019**; 9.

**Gobierno de México**, Instituto Nacional de Salud Pública. México contra el cáncer de pulmón **2021**. Disponible en: <https://www.insp.mx/avisos/mexico-frente-al-cancer-de-pulmon>

**Grande F**, Occhiuzzi M, Lappano R, Cirillo F, Guzzi R, Garofalo A, Jacquot Y, Maggiolini M, Rizzuti B. Computational Approaches for the Discovery of GPER Targeting Compounds. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2020**; 11: 517.

**Guercio G**, Saraco N, Costanzo M, Marino R, Ramirez P, Berensztein E, Rivarola M, Belgorosky A. Estrogens in Human Male Gonadotropin Secretion and Testicular Physiology from Infancy to Late Puberty. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2020**; 11: 72.

**Gutiérrez C**, Santerre A, León L, Aguilar I, Castañeda R, Dueñas S, Dueñas J. Proliferation and Apoptosis Regulation by G Protein-coupled Estrogen Receptor in Glioblastoma C6 Cells. *Oncol. Lett.* **2022**; 24 (1).

**Hassanein S**, Ibrahim S, Abdel-Mawgood A. Cell Behavior of Non-Small Cell Lung Cancer Is at EGFR and MicroRNAs Hands. *Int J Mol Sci.* **2021**; 22(22):12496.

**Haydar A**, Kamaruddin N, Sukor N, Azizan E, Omar A. Estrogen Receptors in Nonfunctioning Pituitary Neuroendocrine Tumors: Review on Expression and Gonadotroph Functions. *J. Endocr. Soc.* **2020**; 4(12).

**He M**, Yu W, Chang C, Miyamoto H, Liu X, Jiang K, Yeh S. Estrogen Receptor  $\alpha$  Promotes Lung Cancer Cell Invasion via Increase of and Cross-talk with Infiltrated Macrophages through the CCL2/CCR2/MMP9 and CXCL12/CXCR4 Signaling Pathways. *Mol. Oncol.* **2020**; 14(8), 1779–1799.

**Herbst R**, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* **2018**; 553: 446–454.

**Hernández C**, Villegas J, Pereira A. Expression and Role of the G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPR30/GPER) in the Development and Immune Response in Female Reproductive Cancers. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2020**; 11, 544.

**Hinterleitner M**, Sipos B, Wagner V, Grottenthaler J, Lauer U, Zender L, Hinterleitner C. Platelet-Expressed Synaptophysin (pSyn) as Novel Biomarker in Neuroendocrine Malignancies. *Cancers.* **2021**; 13(10):2286.

**Hosseini H**, Monsefi R, Shadroo S. Deep Learning Applications for Lung Cancer Diagnosis: A Systematic Review. **2022**.

**Hsu L**, Chu N, Lin Y, Kao S. G-Protein Coupled Estrogen Receptor in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**; 20: 306.

**Inoue C**, Miki Y, Suzuki T. New Perspectives on Sex Steroid Hormones Signaling in Cancer-Associated Fibroblasts of Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers*. **2023**; 15(14):3620.

**International Agency for Research on Cancer**. Cancer Today. Global Cancer Observatory WHO **2020**; Disponible en: <http://bit.ly/3bsvutw>

**Jala V**, Radde B, Haribabu B, Klinge C. Enhanced Expression of G-Protein Coupled Estrogen Receptor (GPER/GPR30) in Lung Cancer. *BMC Cancer* **2012**; 12: 624.

**Jin J**, Wu P, Zhang X, Li D, Wong W, Lu Y, Sun N, Zhang K. Understanding the Interaction of Estrogenic Ligands with Estrogen Receptors: A Survey of the Functional and Binding Kinetic Studies. *J Environ Sci Health C Toxicol Carcinog* **2020**; 38: 142–168.

**Juhlin C**. Second-Generation Neuroendocrine Immunohistochemical Markers: Reflections from Clinical Implementation. *Biology (Basel)* **2021**; 10 (9)874.

**Jung J**. Role of G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Cancer Progression. *Toxicol. Res.* **2019**; 35: 209–214.

**Karuppasamy R**, Veerappapillai S, Maiti S, Shin W, Kihara D. Current Progress and Future Perspectives of Polypharmacology: From the View of Non-Small Cell Lung Cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2021**; 68: 84–91.

**Kawasaki K**, Rekhtman N, Quintanal Á, Rudin C. Neuroendocrine Neoplasms of the Lung and Gastrointestinal System: Convergent Biology and a Path to Better Therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2023**; 20 (1), 16–32.

**Kerr K**, Bibeau F, Thunnissen E, Botling J, Ryška A, Wolf J, Öhrling K, Burdon, P, Malapelle U, Büttner R. The Evolving Landscape of Biomarker Testing for Non-Small Cell Lung Cancer in Europe. *Lung Cancer* **2021**; 154:161–175.

**Leach D**, Brooke G, Bevan C. Roles of Steroid Receptors in the Lung and COVID-19. *Essays Biochem.* **2021**; 65: 1025–1038.

**Li H**, Chen H, Shi J, Fan Q, Zhou Z, Tang X, Wang Y, Liu Y. ER $\beta$  Overexpression May Not Be a Direct Prognostic Factor in Patients with NSCLC: A Meta-Analysis. *Int. J. Biol. Markers* **2022**; 3936155221105521.

**Li Z**, Pan Y, Liu Q, Wang J, Liu C, Qu L, Li D. Role of GPER1 in the Mechanism of EGFR-TKIs Resistance in Lung Adenocarcinoma. *Front. Oncol.* **2022**; 12.

**Liang J**, Guan X, Bao G, Yao Y, Zhong X. Molecular Subtyping of Small Cell Lung Cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2022**.

**Liu C**, Liao Y, Fan S, Fu X, Xiong J, Zhou S, Zou M, Wang J. G-Protein-Coupled Estrogen Receptor Antagonist G15 Decreases Estrogen-Induced Development of Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncol. Res.* **2019**; 27: 283–292.

**Liu HY**, Hopping G, Vaidyanathan U, Ronquillo Y, Hoopes P, Moshirfar M. Polymerase Chain Reaction and Its Application in the Diagnosis of Infectious Keratitis. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol.* **2019**; 8(3):152-155.

**Liu S**, Hu C, Li M, An J, Zhou W, Guo J, Xiao Y. Estrogen Receptor Beta Promotes Lung Cancer Invasion via Increasing CXCR4 Expression. *Cell Death Dis.* **2022**; 13 (1).

**Luo J**, Liu, D. Does GPER Really Function as a G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Vivo? *Frontiers in Endocrinology* **2020**; 11: 148.

**Lustberg M**, Ganju R, Ramaswamy B, Cherian M. Estrogen Receptor Beta (ER $\beta$ ): A Ligand Activated Tumor Suppressor. *Front. Oncol.* **2020**; 10: 587386.

**Maharjan C**, Ear P, Tran C, Howe J, Chandrasekharan C, Quelle D. Pancreatic neuroendocrine tumors: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Cancers* **2021**; 13(20), 5117.

**Maitra R**, Malik P, Mukherjee T. Targeting Estrogens and Various Estrogen-Related Receptors against Non-Small Cell Lung Cancers: A Perspective. *Cancers* **2022**; 14: 80.

**Mal R**, Magner A, David J, Datta J, Vallabhaneni M, Kassem M, Manouchehri J, Willingham N, Stover D, Vandeusen J, Sardesai S, Williams N, Wesolowski R, Lustberg M, Ganju RK, Ramaswamy B, Cherian MA. Estrogen Receptor Beta (ER $\beta$ ): A Ligand Activated Tumor Suppressor. *Front Oncol.* **2020**; 23, 10:587386.

**Mariën H**, Derveaux E, Vanhove K, Adriaensens P, Thomeer M, Mesotten L. Changes in Metabolism as a Diagnostic Tool for Lung Cancer: Systematic Review. *Metabolites* **2022**; 12: 545.

**Mateus D**, Sebastião A, Carrascal M, Carmo A, Matos A, Cruz M. Crosstalk between Estrogen, Dendritic Cells, and SARS-CoV-2 Infection. *Rev. Med. Virol.* **2022**; 32: e2290.

**May L**, Shows K, Nana P, Li H, Landry J. W. Sex Differences in Lung Cancer. *Cancers (Basel)* **2023**; 15 (12), 3111.

**Mendieta I**, Nuñez R ,Pérez G, Pavón L, Rodríguez A, García G, Berumen L. Effect of A549 Neuroendocrine Differentiation on Cytotoxic Immune Response. *Endocr. Connect.* **2018**; 7: 791–802.

**Mendieta I**, Rodríguez M, Nuñez R, Menchaca J, García G, Berumen L. Ultrastructural Changes Associated to the Neuroendocrine Transdifferentiation of the Lung Adenocarcinoma Cell Line A549. *Acta Histochem.* **2021**; 123: 151797.

**Merkens L**, Sailer V, Lessel D, Janzen E, Greimeier S, Kirfel J, Perner S, Pantel K, Werner S, von Amsberg G. Aggressive Variants of Prostate Cancer: Underlying Mechanisms of Neuroendocrine Transdifferentiation. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2022**; 41(1).

**Millette S**, Hashimoto M, Perrino S, Qi S, Chen M, Ham B, Wang N, Istomine R, Lowy A, Piccirillo C, Brodt P. Sexual Dimorphism and the Role of Estrogen in the Immune Microenvironment of Liver Metastases. *Nat. Commun.* **2019**; 10: 5745.

**Millas I**, Duarte M. Estrogen Receptors and Their Roles in the Immune and Respiratory Systems. *Anat. Rec. (Hoboken)* **2021**; 304: 1185–1193.

**Nicholson A**, Tsao M, Beasley M, Borczuk A, Brambilla E, Cooper W, Dacic S, Jain D, Kerr K, Lantuejou S, Noguchi M, Papotti M, Rekhtman N, Scagliotti G, van Schil P, Sholl L, Yatabe Y, Yoshida A, Travis W. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances since 2015. *J. Thorac. Oncol.* **2022**; 17: 362–387.

**Notas G**, Kampa M, Castanas E. G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Immune Cells and Its Role in Immune-Related Diseases. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2020**; 11: 579420.

**Orzolek I**, Sobieraj J, Domagała-Kulawik J. Estrogens, Cancer and Immunity. *Cancers (Basel)* **2022**, 14: 2265.

**Parimi V**, Goyal R, Poropatich K, Yang X. Neuroendocrine differentiation of prostate cancer: a review. *Am J Clin Exp Urol.* **2014**; 2 (4):273-85.

**Parsons E**, Hoffmann R, Baillie G. Revisiting the Roles of cAMP Signalling in the Progression of Prostate Cancer. *Biochem. J.* **2023**; 480 (20), 1599–1614.

**Passaro A**, Attili I, Rappa A, Vacirca D, Ranghiero A, Fumagalli C, Guarize J, Spaggiari L, de Marinis F, Barberis M, Guerini-Rocco E. Genomic characterization of concurrent alterations in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) harboring actionable mutations. *Cancers (Basel)* **2021**; 13:2172.

**Patel S**, Homaei A, Raju A, Meher B. Estrogen: The Necessary Evil for Human Health, and Ways to Tame It. *Biomed. Pharmacother* **2018**; 102: 403–411.

**Pietras R**, Szego C. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* **1977**, 265: 69–72.

**Peña K**, Hernández K, Bello C, Camacho I. Expression and Estrogen Regulation of G Protein-coupled Estrogen Receptor in Human Glioblastoma Cells. *Oncol. Lett.* **2022**; 24 (5).

**Porras L**, Ismail H, Mader S. Positive Regulation of Estrogen Receptor Alpha in Breast Tumorigenesis. *Cells* **2021**; 10: 2966.

**Prossnitz E**, Barton M. The G protein-coupled oestrogen receptor GPER in health and disease: an update. *Nat Rev Endocrinol* **2023**; 9, 407–424.

**Qie Y**, Qin W, Zhao K, Liu C, Zhao L, Guo L. Environmental Estrogens and Their Biological Effects through GPER Mediated Signal Pathways. *Environ. Pollut.* **2021**; 278: 116826.

**Quatrini L**, Ricci B, Ciancaglini C, Tumino N, Moretta L. Regulation of the Immune System Development by Glucocorticoids and Sex Hormones. *Front. Immunol.* **2021**; 12: 672853.

**Randhawa S**, Trikalinos N, Patterson G. Neuroendocrine Tumors of the Lung. *Thorac. Surg. Clin.* **2021**; 31:469–476.

**Raso M**, Bota-Rabassedas N, Wistuba I. Pathology and Classification of SCLC. *Cancers* **2021**; 13: 820.

**Rasoulpoor S**, Asgharzadeh M, Shabani S. A Mimic of the Tumor Microenvironment on GPR30 Gene Expression in Breast Cancer. *Multidiscip. Canc. Invest.* **2022**; 6: 1–8.

**Raynard C**, Ma X, Huna A, Tessier N, Massemin A, Zhu K, Flaman J, Moulin F, Goehrig D, Medard J, Vindrieux D, Treilleux I, Hernandez H, Ducreux S, Martin N,

Bernard D. NF- $\kappa$ B-dependent Secretome of Senescent Cells Can Trigger Neuroendocrine Transdifferentiation of Breast Cancer Cells. *Aging Cell*. **2022**; 21 (7).

**Revankar C**, Cimino D, Sklar L, Arterburn J, Prossnitz E. A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Science* **2005**; 307: 1625–1630.

**Riss T**, Moravec R, Niles A, Duellman S, Benink H, Worzella T, Minor L. Cell viability assays. U.S. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences **2016**.

**Rodriguez V**, Avila M. An Overview of Lung Cancer in Women and the Impact of Estrogen in Lung Carcinogenesis and Lung Cancer Treatment. *Front. Med. (Lausanne)* **2021**; 8.

**Rodriguez V**, Hernandez J, Arrieta O. Influence of Estrogen in Non-Small Cell Lung Cancer and Its Clinical Implications. *J. Thorac. Dis.* **2018**; 10(1), 482–497.

**Roque C**, Baltazar G. G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) activation triggers different signaling pathways on neurons and astrocytes. *Neural Regen Res* **2019**; 14: 2069-2070.

**Rouhimoghadam M**, Lu A, Salem A, Filardo E. Therapeutic Perspectives on the Modulation of G-Protein Coupled Estrogen Receptor, GPER, Function. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2020**; 11.

**Rudin C**, Brambilla E, Faivre-Finn C, Sage J. Small-Cell Lung Cancer. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2021**; 7: 3.

**Saha T**, Makar S, Swetha R, Gutti G, Singh S. Estrogen Signaling: An Emanating Therapeutic Target for Breast Cancer Treatment. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**; 177: 116–143.



**Savu C**, Melinte A, Diaconu C, Stiru O, Gherghiceanu F, Tudorica D, Dumitraşcu O, Bratu A, Balescu I, Bacalbasa N. Lung Neuroendocrine Tumors: A Systematic Literature Review (Review). *Exp. Ther. Med.* **2022**; 23: 176.

**Salzillo A**, Ragone A, Spina A, Naviglio S, Sapio L. Forskolin Affects Proliferation, Migration and Paclitaxel-Mediated Cytotoxicity in Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Lines via Adenylyl Cyclase/CAMP Axis. *Eur. J. Cell Biol.* **2023**; 102(2), 151292.

**Shahcheraghi S**, Aljabali A, Al Zoubi M, Mishra V, Charbe N, Haggag Y, Shrivastava G, Almutary A, Alnuqaydan A, Barh D, Dua K, Chellappan D, Gupta G, Lotfi M, Serrano-Aroca Á, Bahar B, Mishra Y, Takayama K, Panda P, Bakshi H, Tambuwala M. Overview of Key Molecular and Pharmacological Targets for Diabetes and Associated Diseases. *Life Sci.* **2021**; 278: 119632.

**Sharma G**, Prossnitz E. Targeting the G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) in Obesity and Diabetes. *Endocr Metab Sci* **2021**; 2: 100080.

**Sharma R**. Mapping of Global, Regional and National Incidence, Mortality and Mortality-to-Incidence Ratio of Lung Cancer in 2020 and 2050. *Int. J. Clin. Oncol.* **2022**; 27: 665–675.

**Shen Y**, Li C, Zhou L, Huang J. G Protein-Coupled Oestrogen Receptor Promotes Cell Growth of Non-Small Cell Lung Cancer Cells via YAP1/QKI/CircNOTCH1/M6A Methylated NOTCH1 Signalling. *J. Cell. Mol. Med.* **2021**; 25: 284–296.

**Siegfried J**. Sex and Gender Differences in Lung Cancer and Chronic Obstructive Lung Disease. *Endocrinology* **2022**; 163(2).

**Sica G**, Wagner P, Altorki N, Port J, Lee P, Vazquez M, Saqi A. Immunohistochemical Expression of Estrogen and Progesterone Receptors in Primary Pulmonary Neuroendocrine Tumors. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2008**; 32 (12), 1889–1895.

**Smida T**, Bruno T, Stabile L. Influence of Estrogen on the NSCLC Microenvironment: A Comprehensive Picture and Clinical Implications. *Front. Oncol.* **2020**; 10.

**Stockert J**, Horobin R, Colombo L, Blázquez A. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica* **2018**; 120(3), 159167.

**Szego C**, Davis J. Inhibition of Estrogen-Induced Cyclic AMP Elevation in Rat Uterus II: By Glucocorticoids. *Life Sci.* **1967**; 8: 1109–1116.

**Tani Y**, Kaneda H, Koh Y, Tamiya A, Isa S, Kubo A, Ogawa K, Matsumoto Y, Sawa K, Yoshimoto N, Mitsuoka S, Kawaguchi T. The Impact of Estrogen Receptor Expression on Mutational Status in the Evolution of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Lung Cancer* **2023**; 24 (2), 165–174.

**Thai A**, Solomon B, Sequist L, Gainor J, Heist R. Lung cancer. *The Lancet* **2021**; 398: 535–554.

**Thomas P**, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 2005; 146: 624-632.

**Tomita T**. Significance of Chromogranin A and Synaptophysin in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **2020**; 4632.

**Tran M**. Overview of Ca<sup>2+</sup> Signaling in Lung Cancer Progression and Metastatic Lung Cancer with Bone Metastasis. *Explor. Target. Antitumor Ther.* **2021**; 2, 249-265.

**Tutzauer J**, Sjöström M, Bendahl P, Rydén L, Fernö M, Leeb-Lundberg L, Alkner S. Plasma Membrane Expression of G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER)/G Protein-Coupled Receptor 30 (GPR30) Is Associated with Worse Outcome in Metachronous Contralateral Breast Cancer. *PLoS One* **2020**; 15: e0231786.

**Uhlig R**, Dum D, Gorbokon N, Menz A, Büscheck F, Luebke A, Hube C, Hinsch A, Höflmayer D, Fraune C, Möller K, Bernreuther C, Lebok P, Weidemann S, Lennartz M, Jacobsen F, Clauditz T, Sauter G, Wilczak W, Steurer S, Burandt E, Krech R, **Krech T**, Marx A, Simon R, Minner S. Synaptophysin and Chromogranin A Expression Analysis in Human Tumors. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2022**; 555 (111726), 111726.

**Ulhaq Z**, Soraya G, Milliana A, Tse W. Association between GPER Gene Polymorphisms and GPER Expression Levels with Cancer Predisposition and Progression. *Heliyon* **2021**; 7: e06428.

**Uhlig R**, Dum D, Gorbokon N, Menz A, Büscheck F, Luebke A, Hube C, Hinsch A, Höflmayer D, Fraune C, Möller K, Bernreuther C, Lebok P, Weidemann S, Lennartz M, Jacobsen F, Clauditz T, Sauter G, Wilczak W, Steurer S, Burandt E, Krech R, Krech T, Marx A, Simon R, Minner S. Synaptophysin and Chromogranin A Expression Analysis in Human Tumors. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2022**; 555 (111726), 111726.

**Wang X**, Hu C, Mo S, Xu, J, Liu Y, Xu H, Yuan L, Huang L, Yu J, Cheng X, Xu Z. GPR30 Activation Promotes the Progression of Gastric Cancer and Plays a Significant Role in the Anti-GC Effect of Huaier. *J. Oncol.* **2022**; 1: 2410530.

**Wehbe Z**, Hammoud S, Yassine H, Fardoun M, El-Yazbi A, Eid A. Molecular and Biological Mechanisms Underlying Gender Differences in COVID-19 Severity and Mortality. *Front. Immunol.* **2021**; 12: 659339.

**Yong V**, Jaggi T, Chan L, Chotirmall S. Sex Differences in Respiratory Infection. In *Physiology in Health and Disease*; Springer International Publishing: Cham **2021**; 1: 365–404.

**Zhu G**, Huang Y, Wu C, Wei D, Shi Y. Activation of G-Protein-Coupled Estrogen Receptor Inhibits the Migration of Human Non small Cell Lung Cancer Cells via IKK- $\beta$ /NF- $\kappa$ B Signals. *DNA and Cell Biology* **2016**; 35: 434–442.