



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



**“Evaluación del efecto de la inhibición de la vía Notch en la morfología y proliferación de células A549 neuroendócrinas”**

**TESIS**

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

**PRESENTA:**

CARLOS MANUEL URIBE VILLARREAL

**DIRIGIDA POR:**

DRA. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

QUERÉTARO  
ABRIL DE 2021  
MÉXICO



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



**“Evaluación del efecto de la inhibición de la vía Notch en la morfología y proliferación de las células A549 neuroendócrinas”**

**TESIS**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**CARLOS MANUEL URIBE VILLARREAL**

**DIRIGIDA POR:**

**DRA LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA**

SINODALES

Dra. Laura Cristina Berumen Segura  
Presidente

\_\_\_\_\_

Dra. María Guadalupe García Alcocer  
Secretario

\_\_\_\_\_

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera  
Vocal

\_\_\_\_\_

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga  
Suplente

\_\_\_\_\_

Dra. Alicia Irasema Mendieta Trejo  
Suplente

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Directora Facultad de Ciencias Químicas

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

Centro Universitario  
Santiago de Querétaro  
Abril 2021

## **AGRADECIMIENTOS.**

El presente proyecto fue realizado bajo la dirección de la Dra. Laura Cristina Berumen Segura en las instalaciones del Posgrado en Ciencias Químico-Biológicas de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. El financiamiento provino de los proyectos con número A1-S-25275 (CONACYT) y FCQ201820 (UAQ).

Agradezco al CONACYT por la beca proporcionada durante el transcurso de la maestría (CVU: 931067).

A la Doctora Berumen por guiarme por segunda ocasión en la realización de una tesis, desde el planteamiento hasta su terminación.

A mis sinodales: la Doctora Alcocer, por sus valiosísimas clases y por ayudar a moldear esta investigación; la Doctora Escobar, por su apoyo y tutorías; La Doctora Mendieta, por su trabajo pionero en el tema de la transdiferenciación neuroendócrina en el cáncer de pulmón y la Doctora Hernández, por compartirme sus conocimientos y experiencia.

A Jessy y Arely con quienes las horas en el laboratorio se pasaron entre experimentos exitosos y frustrados, risas, tortas y todo tipo de vivencias.

A mis amigos químicos medicinales: Valeria, Enrique, Daniel y Jonathan.

A todos en el laboratorio: Ale Nabi, Irasema (nuevamente), Eli, Cesar, Jazmín, Freddie, Lau y Mireya, por su amistad y disposición a ayudar.

A Iván Fernández y Argenis Álvarez, por su amistad tan especial.

A Carlos Ortiz.

A mis papas y hermanos, por ser apoyo incondicional y mis fuerzas para seguir adelante.

## ÍNDICE.

RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1 CÁNCER DE PULMÓN.....	13
2.1.1 Relevancia.....	13
2.1.2 Clasificación.....	14
2.1.3. Tratamiento.....	16
2.2 TRANSDIFERENCIACIÓN.....	17
2.2.1 Transdiferenciación en la fisiología del pulmón.....	18
2.2.2 Transformación entre tipos de cáncer de pulmón.....	19
2.2.3 Transdiferenciación neuroendócrina.....	20
2.3 VÍA NOTCH.....	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	25
5. HIPÓTESIS.....	25
6. OBJETIVOS.....	26
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	26
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
7.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	27
7.2.1 Cultivo celular.....	27
7.2.2 Inducción de la transdiferenciación neuroendócrina.....	27
7.2.3 Inhibición de la vía Notch.....	27
7.2.4 Ensayos de proliferación celular.....	28
7.2.5 Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa.....	28
7.2.6 Análisis estadístico.....	30
8. RESULTADOS.....	31
8.1 TRANSDIFERENCIACIÓN NEUROENDÓCRINA EN CÉLULAS A549.....	31
8.2 INHIBICIÓN DE LA VÍA NOTCH EN CÉLULAS A549 <sub>NE</sub> .....	34
8.3 EXPRESIÓN DE ASCL1 Y REST EN CÉLULAS A549 <sub>NE</sub> .....	39
8.4 EXPRESIÓN DEL EGFR EN LAS CÉLULAS A549 <sub>NE</sub> .....	40

9. DISCUSIÓN.....	42
9.1 TRANSDIFERENCIACIÓN NEUROENDÓCRINA EN CÉLULAS A549.....	42
9.2 INHIBICIÓN DE LA VÍA NOTCH EN LAS CÉLULAS A549 <sub>NE</sub> .....	44
9.3 EXPRESIÓN DE ASCL1 Y REST EN LAS CÉLULAS A549 <sub>NE</sub> .....	47
9.4 EXPRESIÓN DEL EGFR EN CÉLULAS A549 <sub>NE</sub> .....	49
10. CONCLUSIONES.....	50
11. REFERENCIAS.....	51

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla		Página
1	Terapias dirigidas e inmunoterapia para el tratamiento del CPCNP.	17
2	Investigaciones sobre la TNE en el cáncer de pulmón.	21
3	Secuencias de los cebadores utilizados para el PCR.	29
4	Temperaturas y tiempos específicos para la amplificación de los genes diana.	30

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura		Página
1	Número de casos y muertes de los principales tipos de cáncer en el 2020.	13
2	La vía Notch.	22
3	Proliferación de células A549 cultivadas en medio de diferenciación.	31
4	Efecto del medio de diferenciación en la morfología de las células A549.	32
5	Efecto del medio de diferenciación en la expresión de la NSE.	33
6	Efecto del DAPT en el porcentaje de células A549 viables.	34
7	Efecto del DAPT en la morfología de las células A549.	35
8	Inhibición de la vía Notch en células A549 <sub>NE</sub> en dos modalidades experimentales.	36
9	Efecto del DAPT en el porcentaje de células A549 <sub>NE</sub> viables cultivadas en medio estándar y medio de diferenciación.	36
10	Efecto del DAPT en la morfología de las células A549 <sub>NE</sub> cultivadas en medio estándar.	37
11	Efecto del DAPT en la morfología de las células A549 <sub>NE</sub> cultivadas en medio de diferenciación.	38
12	Expresión de Ascl1 en células A549 en proceso de transdiferenciación.	39
13	Expresión de REST en las células A549 y A549 <sub>NE</sub> .	39
14	Expresión de Ascl1 en células A549 <sub>NE</sub> tratadas con DAPT.	40
15	Expresión del EGFR en las células A549 y A549 <sub>NE</sub> .	41
16	Mecanismos propuestos de la TNE.	48

## ACRÓNIMOS.

<b>ADC</b>	Adenocarcinoma
<b>cAMP</b>	AMP cíclico
<b>CgA</b>	Cromogranina A
<b>CCE</b>	Carcinoma de células escamosas
<b>CNCG</b>	Carcinoma neuroendócrino de células grandes
<b>CPCNP</b>	Carcinoma de pulmón de células no pequeñas
<b>CPCP</b>	Carcinoma de pulmón de células pequeñas
<b>EGF*</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EGFR*</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>IBMX</b>	3-isobutil-metilxantina
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>DECN</b>	Dominio extracelular Notch
<b>DICN</b>	Dominio intracelular Notch
<b>NSE*</b>	Enolasa específica de neuronas
<b>SYN*</b>	Sinaptofisina
<b>TC</b>	Tumores carcinoides
<b>TCA</b>	Tumores carcinoides atípicos
<b>TCT</b>	Tumores carcinoides típicos

*\* Por sus siglas en inglés.*

**DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:**

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

**RESUMEN.**

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial. Los tumores de este órgano son particularmente agresivos y frecuentemente desarrollan resistencia terapéutica. Recientemente, la transformación del adenocarcinoma (ADC) en carcinoma de pulmón de células pequeñas (CPCP) ha demostrado ser un mecanismo de resistencia emergente y de pronóstico desalentador en pacientes tratados con inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la inactivación de la vía Notch en la proliferación y morfología de las células A549 con diferenciación neuroendócrina inducida. Esto con la finalidad de explorar los posibles eventos celulares y moleculares involucrados en la transición del ADC a CPCP. La transdiferenciación neuroendócrina (TNE) se modeló en las células A549 mediante la estimulación con 8-Br-cAMP y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) durante 72 horas; la expresión de Ascl1 no fue detectada durante las primeras horas del proceso de transdiferenciación ni en las células A549<sub>NE</sub> con fenotipo terminal. Asimismo, la inhibición de la vía Notch mediante cultivos con DAPT tampoco indujo la expresión de Ascl1, ni cambios en la proliferación o morfología de las células A549<sub>NE</sub>. Se concluye que la TNE inducida por agentes que incrementan el cAMP es un proceso de transdiferenciación directa que no requiere de la expresión de Ascl1 y que la inhibición de la vía Notch por sí sola no suscita la transición a CPCP en las células A549<sub>NE</sub>.

**Palabras clave:** cáncer de pulmón, adenocarcinoma, A549, transdiferenciación neuroendócrina.

## ABSTRACT.

Lung cancer is the cancer type with the highest incidence and mortality worldwide. Lung tumours are particularly aggressive and often develop therapeutic resistance. Recently, SCLC transformation has proven to be an emerging resistance mechanism with poor prognosis in patients treated with epidermal growth factor receptor inhibitors. The present investigation aimed to evaluate the effect of the inhibition of the Notch signalling pathway on the morphology and proliferation of the A549 cells with induced neuroendocrine differentiation to explore the possible cellular and molecular events required for SCLC transformation. Neuroendocrine differentiation (NED) was modelled in A549 cells by stimulation with 8-Br-cAMP and IBMX for 72 hours; expression of Ascl1 was detected neither during the first hours of the transdifferentiation process nor in the terminal phenotype of the A549<sub>NE</sub> cells. Furthermore, inhibition of the Notch pathway by DAPT did not induce Ascl1 expression or changes in the proliferation and morphology of the A549<sub>NE</sub> cells. In conclusion, NED is a direct transdifferentiation process that does not require Ascl1 expression. In addition, inhibition of the Notch signalling pathway is not enough to promote SCLC transformation in the A549<sub>NE</sub> cells.

## 1. INTRODUCCIÓN.

El cáncer de pulmón es uno de los tipos de cáncer más comunes a nivel mundial (IARC, 2020b). En el 2020 fue responsable de más de 1.7 millones de muertes que correspondieron a casi el 20 % del total de muertes generadas por cáncer (IARC, 2020b). Los principales factores asociados a su prominente mortalidad son la ausencia de diagnóstico temprano y el inevitable desarrollo de resistencia a la quimioterapia (Langer y col., 2010; Semenova y col., 2015; Duma y col., 2019).

Los mecanismos de resistencia en los tumores de pulmón han sido ampliamente estudiados. En el caso del adenocarcinoma, esto han llevado al desarrollo de nuevas terapias dirigidas al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que bloquean eficazmente su señalización aún en presencia de mutaciones secundarias asociadas a la resistencia tumoral (Herbst y col., 2018). No obstante, mientras que esta vía oncogénica es bloqueada cada vez más exitosamente, un nuevo mecanismo de resistencia es promovido simultáneamente. En los últimos años se ha reportado que el tratamiento de ciertos adenocarcinomas con inhibidores del EGFR de nueva generación suscita una transformación del fenotipo de adenocarcinoma a carcinoma de pulmón de células pequeñas (CPCP), una de las formas más agresivas que se conocen del cáncer de pulmón (Niederst y col., 2015; Gazdar y col., 2017). Este fenómeno conocido como transformación al CPCP ha sido fuertemente asociado con la recurrencia tumoral, la resistencia terapéutica y una supervivencia reducida.

Con base en la naturaleza neuroendócrina de los tumores de CPCP, se ha propuesto que la transdiferenciación neuroendócrina (TNE) podría ser un paso intermedio en la transición del ADC al CPCP. La TNE es un proceso por medio del cual ciertas líneas celulares de adenocarcinoma adquieren propiedades típicas de los linajes neural y neuroendócrino, tales como la formación de estructuras tipo neurita y la capacidad de sintetizar y secretar neuropéptidos y aminas biogénicas (Zhu y col, 2018; Mendieta y col., 2018).

Debido a lo anterior, es necesaria la investigación sobre los posibles mecanismos involucrados en la transición del ADC al CPCP. El presente trabajo propone que esta transición pudiera ser modelada en las células A549, provenientes de adenocarcinoma, mediante el silenciamiento de la vía Notch dentro de un contexto neuroendócrino (proporcionado por la TNE). En efecto, el silenciamiento de la vía Notch es una alteración frecuente en el CPCP, que permite a las células acceder al factor de transcripción Ascl1, un regulador maestro de la diferenciación neural y neuroendócrina cuya expresión está

restringida a las células progenitoras de estos linajes (George y col., 2015; Dennis y col., 2019). De este modo, la investigación aquí reportada tuvo como objetivo el evaluar los efectos de la inhibición de la vía Notch en la morfología y proliferación de las células A549 transdiferenciadas a neuroendócrinas.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1 CÁNCER DE PULMÓN.

#### 2.1.1 Relevancia.

El concepto del cáncer comprende una gama de enfermedades que han acompañado al ser humano desde sus orígenes (Faguet, 2015). Estas enfermedades se derivan de la misma naturaleza pluricelular de la especie a través de la corrupción de los mecanismos que controlan la proliferación y diferenciación celular (Campisi, 2005; Hanahan y Weinberg, 2011). Habitualmente el cáncer ocurre en individuos de edad avanzada como consecuencia del desgaste de las barreras antitumorales del organismo (Campisi, 2005; Fane y Weeraratna, 2020); no obstante, el cáncer se ha esparcido a otros sectores poblacionales en las últimas décadas gracias a la presencia de factores de riesgo en el ambiente (p. ej. radiación, asbestos y virus) y en los estilos de vida modernos (p. ej. dieta, consumo de alcohol y obesidad) (Anand y col., 2008; OMS, 2021).

Actualmente el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, por lo que su relevancia se ve reflejada en el número de muertes que se reportan cada año. En el 2020 alrededor de diez millones de defunciones fueron atribuidas a este conjunto de enfermedades y se prevé que esta cifra continúe aumentando de manera proporcional al crecimiento de la población (IARC, 2020a; OMS, 2021).



Figura 1. Número de casos (a) y muertes (b) de los principales tipos de cáncer en el 2020 (IARC, 2020a).

Entre los diferentes tipos de cáncer que existen el de pulmón destaca debido a su alta incidencia y mortalidad (Figura 1). En el 2020 se reportaron 2,207,771 casos nuevos y 1,796,144 muertes, las cuales correspondieron al 18 % del total de muertes por cáncer en ese mismo año (Figura 1b) (IARC, 2020b). La elevada incidencia del cáncer de pulmón se correlaciona notablemente con el consumo “epidémico” del tabaco, el cual es el principal factor de riesgo para desarrollar cáncer de pulmón y es el causante de aproximadamente el 22 % de las muertes por cáncer (Islami y col., 2015; OMS, 2021). Asimismo, su elevada mortalidad se atribuye principalmente a la falta del diagnóstico temprano y a la agresividad de este tipo de tumores, que comúnmente presentan tasas de supervivencia a cinco años que van del 7 % al 15.9 % (Chen y col., 2014a; Gazdar y col., 2017).

### **2.1.2 Clasificación.**

Todo cáncer está conformado por células que se dividen de manera descontrolada y que tienen el potencial de invadir otros tejidos y órganos (Hanahan y Weinberg, 2011). Además de estas propiedades fundamentales, los tumores exhiben características adicionales, morfológicas y fisiológicas, que son heredadas del tejido que les da origen y que constituyen la base de la clasificación de los distintos tipos de cáncer.

En el caso del cáncer de pulmón, la clasificación responde tradicionalmente a los patrones histológicos observados en los tumores a través de la microscopía de luz. Así, con base en el tamaño celular, surgen primeramente dos grandes categorías: el carcinoma de pulmón de células pequeñas y el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (Chen y col., 2014a; Sabari y col., 2017).

El carcinoma de pulmón de células pequeñas (CPCP) es una de las formas más agresivas que se conocen del cáncer de pulmón (Semenova y col., 2015). Corresponde al 15 % de los tumores pulmonares y su incidencia se encuentra estrechamente relacionada con el consumo de tabaco, por lo que afecta a fumadores de alto consumo de manera prácticamente exclusiva (Semenova y col., 2015; Sabari y col., 2017). Los tumores de este tipo se caracterizan por su rápido crecimiento y por su habilidad de efectuar metástasis desde etapas tempranas de su desarrollo (Gazdar y col., 2017). A nivel histológico se encuentran conformados por células con diferenciación neuroendócrina que poseen escaso citoplasma, bordes poco definidos y gránulos de núcleo denso (Sabari y col., 2017). Consecuentemente son positivos a marcadores moleculares propios del linaje

neural/neuroendócrino, como Ascl1, DOPA descarboxilasa (DDC), Cromogranina A, NCAM1/ CD56, neurolasina específica de neuronas y sinaptofisina (Semenova y col., 2015; Gazdar y col., 2017). Entre sus alteraciones genéticas, la inactivación de los genes TRP53 y Rb1 ocurre casi en la totalidad de los tumores del CPCP, mientras que otras alteraciones de relevancia suceden con menor frecuencia, como las amplificaciones en los genes de la familia MYC y la inactivación de la vía Notch (George y col., 2015). Notablemente, con base en los patrones de expresión génica se reconocen dos fenotipos o subtipos del CPCP, que son el clásico y el variante. El primero se distingue por la expresión del factor de transcripción Ascl1 y niveles elevados de marcadores neuroendócrinos, mientras que el segundo es regulado por el factor de transcripción NeuroD1 y exhibe poca diferenciación neuroendócrina (Sabari y col., 2017; Gazdar y col., 2017)

El carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) era originalmente considerado (y tratado) como una sola entidad; sin embargo, con base en los patrones genéticos y la expresión de marcadores moleculares actualmente se sabe que abarca en realidad tres entidades diferentes, que son el adenocarcinoma (ADC), el carcinoma de células escamosas (CCE) y el carcinoma de células grandes (CCG) (Langer y col., 2010; Chen y col., 2014a).

El Adenocarcinoma es el subtipo del CPCNP que ocurre con mayor frecuencia. Esta categoría admite a todos aquellos tumores epiteliales con diferenciación glandular que surgen principalmente en las vías aéreas alveolares y broncoalveolares (Chen y col., 2014a). Usualmente son positivos a marcadores como el Factor de Transcripción Tiroide 1 (TTF1), la proteína surfactante C (SPC) y la keratina 7 (KRT7), por lo que se cree que se derivan de células progenitoras de los neumocitos y las células club (esta noción se basa también en investigaciones con modelos murinos modificados genéticamente) (Chen y col., 2014a; Chalela y col., 2017). El diagnóstico de estos tumores generalmente se realiza en etapas avanzadas de la enfermedad, habiéndose desarrollado metástasis en el 20 % de los casos en órganos como el cerebro, hueso, glándulas adrenales e hígado (Langer y col., 2010). En cuanto a su perfil genético, comúnmente presentan alteraciones en los genes KRAS, EGFR, TP53, STK11, ALK y MET notablemente, los tumores que expresan mutaciones simultáneas de KRAS y EGFR tienen mayor riesgo de desarrollar resistencia a las terapias dirigidas contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Herbst y col., 2018).

Por otra parte, el carcinoma de células escamosas comprende un conjunto de tumores que surgen en las vías aéreas centrales y que tienen una fuerte asociación al consumo de tabaco (Langer y col., 2010; Chen y col., 2014a). Originalmente, este subtipo de cáncer de pulmón era considerado el predominante; sin embargo, su incidencia ha disminuido significativamente debido a estrategias preventivas relacionadas al consumo de tabaco (Gandara y col., 2015). Estos tumores tienen su origen en las células basales que se localizan en el epitelio bronquial y expresan marcadores como el factor de transcripción SOX2, p63 y las citoqueratinas 5 y 6 (Chen y col., 2014a). Desde el punto de vista genético, el CCE se caracteriza por sus alteraciones en p53, CDKN2A y en la vía de PI3K; interesantemente, las mutaciones más frecuentes de estas patologías proveen poca oportunidad para el desarrollo de terapias dirigidas (Gandara y col., 2015; Herbst y col., 2018).

Finalmente, el carcinoma de células grandes (CCG) es la categoría a la cual son asignados los tumores que no cuentan con patrones de diferenciación glandular o escamosa (Chen y col., 2014a). En algunos casos, la expresión de marcadores neuroendócrinos (NCAM, sinaptofisina y cromograninas) define a un subgrupo denominado como carcinoma neuroendócrino de células grandes, el cual entra en la clasificación de tumores neuroendócrinos de alto grado y pobremente diferenciados junto con el CPCP (Langer y col., 2010; Sabari y col., 2017).

### **2.1.3. Tratamiento.**

El tratamiento de los tumores del pulmón depende de la categoría a la que pertenecen y del estadio en el que se encuentran al momento de realizarse el diagnóstico. En el caso del CPCNP, la detección temprana posibilita la opción de la cirugía para aquellos tumores localizados que presentan nula o poca invasión; no obstante, la mayoría de las veces el CPCNP es diagnosticado en etapas avanzadas en las que la existencia de metástasis es muy común (Langer y col., 2010; Duma y col., 2019). En estos escenarios el tratamiento se basa en el “doblete terapéutico”, el cual consiste en la combinación de un compuesto platinado (cisplatino, carboplatino, etc.) y un agente citotóxico (paclitaxel, docetaxel, gemcitabina, irinotecán, etc.) (Herbst y col., 2018; Duma y col., 2019). Por otro lado, el tratamiento del CPCP abarca casi siempre este último esquema, siendo viable la cirugía en raras ocasiones (Alvarado y Morales, 2016; Gazdar, 2017). Asimismo, la radioterapia

usualmente complementa a la quimioterapia en el tratamiento del CPCP, ya que las células de estos tumores son particularmente sensibles a la radiación debido a sus ritmos de proliferación acelerados (Alvarado y Morales, 2016; Sabari y col., 2017).

**Tabla 1.** Terapias dirigidas e inmunoterapia para el tratamiento del CPCNP (Herbst y col., 2018; Duma y col., 2019).

Blanco	Agente
EGFR	Gefitinib, erlotinib, afatinib, osimertinib. Cetuximab, necitumumab.
ALK	Crizotinib, ceritinib, alectinib, lorlatinib.
BRAF	Dabrafenib.
MEK	Trametinib.
Angiogénesis	Bevacizumab y ramucirumab.

La investigación de las mutaciones y alteraciones genéticas de alta frecuencia en el cáncer de pulmón ha fomentado el desarrollo de nuevas moléculas dirigidas contra proteínas específicas, involucradas en la regulación de procesos clave para la subsistencia tumoral. Estas terapias han incrementado considerablemente la efectividad del tratamiento del cáncer de pulmón; sin embargo, las recaídas y el desarrollo de resistencia terapéutica siguen siendo un problema (Semenova y col., 2015; Sabari y col., 2017). En particular, un mecanismo de resistencia que ha ganado atención en los últimos años es la transformación del ADC en CPCP en pacientes prescritos con inhibidores del Factor de crecimiento epidérmico; si bien, poco se conoce sobre este fenómeno hasta el momento, se cree que es producto de un proceso conocido como transdiferenciación (Niederst y col., 2015, Gazdar y col., 2017).

## 2.2 TRANSDIFERENCIACIÓN.

Si bien, todas las células en un organismo comparten la misma información genética, la mayoría solo tiene acceso a una fracción de la totalidad de genes contenidos en el ADN como consecuencia de patrones epigenéticos establecidos durante la diferenciación. La

expresión específica de ciertos genes induce en la célula un conjunto de características que la comprometen con una función, dando como resultado la especialización celular (Gilbert y Barresi, 2016a).

La identidad celular normalmente es estable dentro de los tejidos, sin embargo, ciertas células tienen el potencial de inducir cambios drásticos en su fenotipo y redireccionarse hacia otra estirpe, es decir, pueden cambiar su identidad previa por otra a través de un proceso conocido como transdiferenciación (Merrel y Stanger, 2016).

Se han propuesto dos mecanismos a través de los cuales una célula puede efectuar la transdiferenciación; el primero describe una vía directa mientras que el segundo involucra una vía indirecta más compleja. En la vía directa, la célula cesa de transcribir los genes propios de su linaje y activa simultáneamente la expresión de genes característicos de un linaje distinto. En contraste, la vía indirecta requiere de un paso adicional de desdiferenciación, caracterizado por la adquisición de un estado pluripotencial que se pierde en el momento en el que la célula retoma la diferenciación, pero hacia su nuevo fenotipo (Xu y col., 2014).

### **2.2.1 Transdiferenciación en la fisiología del pulmón.**

La evidencia reportada hasta el momento sugiere que la transdiferenciación es un proceso común en las células del tejido pulmonar necesario para su reparación y mantenimiento (Rawlins y col., 2009; Danahay y col., 2015).

Las células club pulmonares han demostrado tener la capacidad de proliferar para autorrenovarse y dar origen a células ciliadas en zonas determinadas de los bronquios y la tráquea, razón por la cual se les ha atribuido una función progenitora o de célula madre aun cuando son consideradas como diferenciadas (Rawlins y col., 2009). El proceso de transdiferenciación de células Clara a ciliadas exhibe intermediarios celulares con marcadores de ambos fenotipos y puede ser inducido mediante la inhibición de la señalización Notch (Lafkas y col., 2015).

Por otro lado, los neumocitos tipo I y tipo II, son células epiteliales que conforman los alveolos y son originadas por un mismo progenitor durante el desarrollo del pulmón. Sin embargo, una vez que el pulmón ha madurado, los neumocitos tipo II son los encargados de autorrenovarse por medio de la proliferación y de diferenciarse en neumocitos tipo I durante el mantenimiento y reparación de los alveolos. Debido a su capacidad de

proliferación y reprogramación celular hacia neumocitos tipo I, se les ha atribuido también un rol de células progenitoras (Desai y col., 2014). De igual manera, se ha demostrado que, en ciertas condiciones, los neumocitos tipo I también pueden llegar a autorrenovarse e incluso dar origen a neumocitos tipo II, demostrando una retención de la plasticidad celular por parte de ambos tipos celulares aun cuando el compromiso para cada linaje se lleve a cabo desde etapas tempranas del desarrollo (Jain y col., 2015; Frank y col., 2019).

Otras funciones de la transdiferenciación en el pulmón están relacionadas con la enfermedad. La metaplasia de células caliciformes sucede cuando se compromete la homeostasis de las vías aéreas (como en el caso del asma) y se caracteriza por un incremento en el número de células caliciformes, teniendo como consecuencia una mayor producción de mucosa (Danahay y col., 2015). Si bien, el origen de dicho mecanismo no se ha elucidado completamente, la evidencia indica que la proliferación celular juega un papel menor en la metaplasia, sugiriendo la activación de la transdiferenciación (Boucherat y col., 2013).

### **2.2.2 Transformación entre tipos de cáncer de pulmón.**

La evidencia presentada previamente, muestra como el pulmón es un órgano que cuenta con una gran plasticidad celular, por lo que se ha propuesto que las células cancerígenas podrían acceder a estos mecanismos de transdiferenciación, volviendo más complejo el estudio de las células de origen de los diferentes tipos de cáncer de pulmón (Jain y col., 2015).

En el caso de la transición de ADC a CCE, ésta se observa principalmente en respuesta a terapia con inhibidores del EGFR. La transición de ADC a CCE se encuentra bastante estudiada y puede inducirse *in vivo* en modelos murinos mediante la inactivación de Lkb1 en tumores de ADC KRAS<sup>+</sup>. El silenciamiento de Lkb1 da lugar a la transición de los tumores de ADC hacia CCE, proceso que conlleva una serie de cambios epigenéticos que permiten el cambio en la expresión de genes escamosos dependiente de la actividad del Complejo Represor Polycomb 2 (CRP2). De manera similar, la inhibición *in vitro* de EZH2 en la línea celular A549, genera un aumento en el número de células positivas para el NGFR, un marcador específico de las células basales, consideradas como las células de origen del CCE (Zhang y col., 2017).

Por otro lado, la conversión de ADC a CPCP ha adquirido mayor relevancia clínica debido a sus implicaciones en el pronóstico de la enfermedad. Si bien, se cree que solo un pequeño porcentaje de pacientes desarrolla transición de CPCNP a CPCP de manera esporádica, se ha observado que la terapia con inhibidores del EGFR es un factor de riesgo para la transformación de ADC a CPCP. Una vez que sucede la transdiferenciación de ADC a CPCP, la ventana de vida de los pacientes post-diagnóstico se ve reducida a 6 meses (Ahmed y col., 2018). A nivel molecular, parece ser que la pérdida de la expresión del EGFR y de la proteína Retinoblastoma son dos eventos necesarios para la adquisición del fenotipo del CPCP, siendo el primero el responsable de la resistencia y el segundo una mutación indispensable para la existencia de este tipo de tumores (Niederst y col., 2015). Desafortunadamente, se desconocen los mecanismos involucrados en la transición de ADC a CPCP de manera que, hasta el momento, no ha podido modelarse experimentalmente.

### **2.2.3 Transdiferenciación neuroendócrina.**

La transdiferenciación neuroendócrina (TNE) es proceso a través del cual las células tumorales con diferenciación epitelial adquieren características morfológicas y fisiológicas típicas de las células neuroendócrinas; tales como la formación de procesos celulares tipo neurita y la secreción de sustancias neuroendócrinas (Walker y col., 2006; Mendieta y col., 2018).

La TNE fue originalmente descubierta en líneas celulares de cáncer de próstata y su estudio ha llevado a la actual noción de que este fenómeno representa un mecanismo de resistencia terapéutica de gran importancia a nivel clínico (Braadland y col., 2015). Por otro lado, en el cáncer de pulmón poco se conoce hasta el momento sobre la TNE. Los avances reportados hasta el momento se resumen en la Tabla 2.

Los marcadores moleculares más utilizados para estudiar la TNE son la cromogranina A, la sinaptofisina y la enolasa específica de neuronas (Chen y col., 2014b; Zhu y col., 2018). La cromogranina A es una proteína ácida, localizada principalmente dentro de las vesículas densas, donde es almacenada junto con otras moléculas de secreción y procesada para dar origen a péptidos con actividad biológica, como son la vasostatina, pancreastina y catestanina (Bartolomucci y col., 2011). De manera similar, la sinaptofisina es una proteína de membrana, que es necesaria para la fusión de membranas, plasmática y vesicular, durante la secreción de moléculas al espacio extracelular (Arthur y Stowell, 2007).

**Tabla 2.** Investigaciones sobre la TNE en el cáncer de pulmón.

<b>Referencia.</b>	<b>Avance.</b>
Chang y col., 2005a.	La interleucina 6 promueve la proliferación celular y disminuye la expresión del marcador neuroendócrino NSE en las células de adenocarcinoma de pulmón NCI-H1355 y NCI-H820.
Chang y col., 2005b.	La interleucina 6 promueve la proliferación de las células NCI-H820 a través de p38 MAPK y reduce la expresión de NSE mediante STAT3.
Walker y col., 2006.	Inducción de la TNE en células Lu-CSF-1 (ADC) y NCI-H157 (CCE) mediante la estimulación con 8-Br-cAMP e IBMX al 0.5 mM por 72 horas.
Chen y col., 2014b.	La inducción de la TNE mediante 8-Br-cAMP e IBMX induce la expresión de la NSE a través de Erk1/2 en las células NCI-H157.
Zhu y col., 2018.	La expresión de marcadores neuroendócrinos aumenta en células A549 tratadas con dosis crecientes de radiación.
Mendieta y col. 2018.	Las células A549 neuroendócrinas modulan la actividad citolítica de células Jurkat a través de la secreción de sustancias neuroendócrinas.

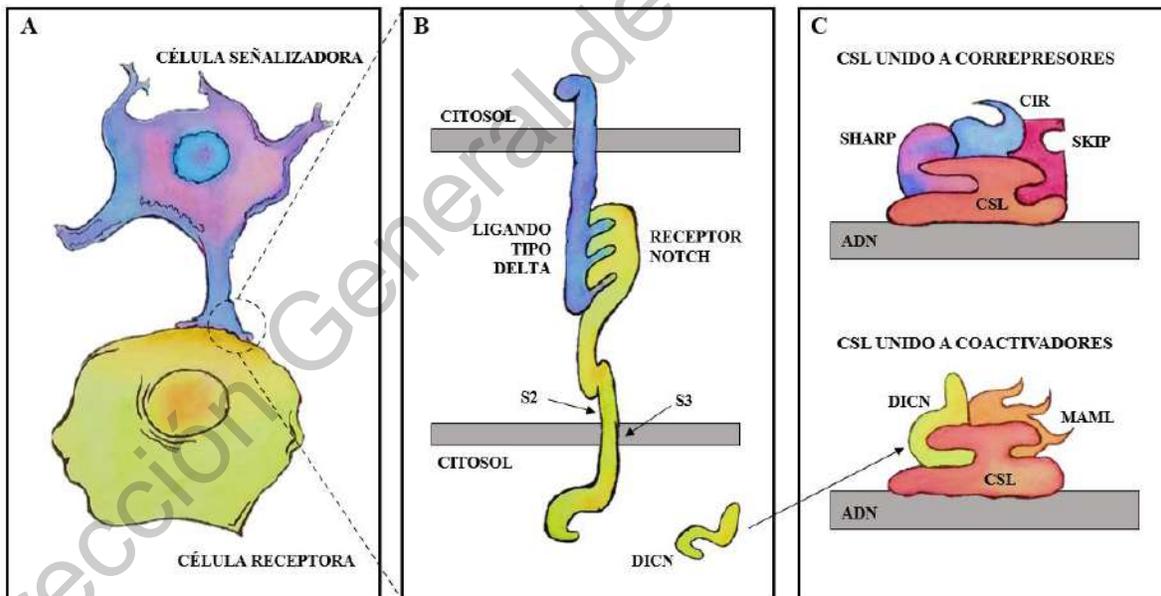
### 2.3 VÍA NOTCH.

La vía de señalización Notch es un mecanismo de comunicación celular que tiene lugar cuando las membranas plasmáticas de dos células se encuentran lo suficientemente cerca para permitir la interacción de los receptores Notch con sus ligandos (Figura 2) (Gilbert y Barresi, 2016b). En los seres humanos esta vía se compone de cuatro receptores (Notch1, 2, 3, y 4), tres ligandos tipo Delta (DLL1, DLL3 y DLL4) y dos ligandos tipo Serrate (Jag1, Jag2); todos los anteriores son proteínas integrales de la membrana plasmática a excepción de DLL3, que se localiza en las membranas de compartimentos intracelulares (Steinbuck y Winandy, 2018).

Los receptores Notch nacen a partir de una proteína que durante su procesamiento temprano es escindida dentro de las cisternas trans-Golgi en el sitio S1, dando lugar a dos

monómeros que inmediatamente forman un complejo estabilizado por enlaces iónicos dependientes de calcio (Steinbuck y Winandy, 2018). Este complejo recibe entonces una serie de glicosilaciones en sus repeticiones tipo EGF del dominio extracelular (necesarias para el reconocimiento de sus ligandos) y finalmente es transportado a la membrana plasmática (Hori y col., 2013).

Al interactuar con alguno de sus ligandos, los receptores Notch sufren un cambio conformacional que desenmascara los sitios S2 y S3 en el dominio extracelular (DECN), los cuales son reconocidos y escindidos por las proteasas ADAM y  $\gamma$ -secretasa respectivamente (Figura 2B) (Hori y col., 2013; Steinbuck y Winandy, 2018). Este procesamiento tiene como consecuencia la liberación del dominio intracelular (DICN) al citoplasma de la célula receptora, mientras que el DECN es endocitado junto con el ligando por la célula señalizadora (Steinbuck y Winandy, 2018). El DICN contiene dos secuencias de localización nuclear que le permiten dirigirse al núcleo, donde se asocia con CSL para formar un complejo activador de la transcripción (Figura 2C) (Hori y col., 2013).



**Figura 2.** La vía Notch (Borggreffe y Oswald, 2009; Steinbuck y Winandy, 2018).

CSL también conocido como RBP-J es un factor de transcripción que en ausencia del DICN se encuentra asociado a un conjunto de proteínas represoras (SHARP, CIR, KyoT2, etc),

que impiden la transcripción de sus genes diana a través del reclutamiento de enzimas deacetilasas. Por el contrario, cuando la vía Notch está activada el DICN desplaza al complejo correpresor y recluta a una serie de coactivadores entre los que se encuentran MAML (mastermind) y la acetiltransferasa p300, teniendo como consecuencia la transcripción de genes de la familia Hes y Hey (Borggreve y Oswald, 2009).

La vía Notch es conocida principalmente por regular la especificación y diferenciación celular durante el desarrollo de los organismos, así como por su rol en el mantenimiento de las células madre. Asimismo, interviene también en otros procesos como el control de la proliferación y la apoptosis (Borggreve y Oswald, 2009).

En el caso del CPCP la vía Notch juega un papel importante en la regulación de la diferenciación neuroendócrina y se encuentra inactivada en el 25 % de los tumores de este tipo (George y col., 2015; Lim y col., 2017). La inactivación de la vía Notch tiene como consecuencia la pérdida de la expresión de REST, un represor transcripcional encargado de impedir la expresión de genes neuroendócrinos como Ascl1 (Gazdar y col., 2017; Lim y col., 2017). A su vez Ascl1 es un factor de transcripción del tipo hélice-bucle-hélice, que es considerado como un “regulador maestro” de la diferenciación neural y neuroendócrina (Ball, 2004), cuyas funciones en el cáncer se asocian a la promoción de la proliferación y supervivencia celular, así como a la inducción de la expresión de marcadores neuroendócrinos (Osada y col., 2005; Augustyn y col., 2014).

En las células A549 la expresión forzada de ASCL1 es suficiente para inducir un fenotipo similar al del CPCP a través de la adquisición de una morfología redonda, la pérdida de expresión de E-cadherina y un aumento en el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto (Osada y col., 2008). Si bien, la expresión de ASCL1 se encuentra restringida a los tumores neuroendócrinos de pulmón, se ha reportado la presencia de marcadores neuroendócrinos en el CPCNP (Feng y col., 2016), por lo que en este trabajo se estudió la participación de estos factores (Notch y Ascl1) en la transdiferenciación de las células A549 inducida por 8-Br-cAMP e IBMX.

### 3. JUSTIFICACIÓN.

El cáncer de pulmón es una enfermedad de gran importancia a nivel mundial debido a su elevada incidencia y mortalidad. Uno de los factores asociados a su letalidad es la habilidad de estos tumores para generar resistencia terapéutica en casi la totalidad de los casos. Si bien, las nuevas estrategias terapéuticas permiten atacar distintos blancos moleculares de manera efectiva, incluso cuando se han generado mutaciones de resistencia en los mismos, existen otros mecanismos a los que las células tumorales pueden recurrir para poder escapar de la amenaza que representan estos tratamientos.

Uno de estos mecanismos, que ha ido adquiriendo mayor atención en los últimos años, es la activación de procesos de plasticidad celular relacionados con la adquisición de un fenotipo tumoral completamente diferente al diagnosticado originalmente. Clínicamente, se han reportado casos de pacientes con ADC que desarrollan CPCP en respuesta al tratamiento con inhibidores del EGFR. Estos casos tienen como consecuencia una disminución drástica del tiempo de vida promedio de los pacientes a seis meses una vez diagnosticada la conversión del tumor.

Aunque todavía no se conocen con precisión los mecanismos moleculares involucrados en la transición de ADC a CPCP, se ha propuesto a la transdiferenciación neuroendócrina (TNE) como un posible intermediario. La TNE es un proceso mediante el cual las células epiteliales adquieren un fenotipo similar al de las células neuroendócrinas, caracterizado por la formación de proyecciones del citoesqueleto tipo neurita, la secreción de aminas biogénicas y neuropéptidos y la interrupción del ciclo celular. La teoría de que las células “tipo neuroendócrinas” podrían representar un paso intermedio entre el ADC y el CPCP está respaldada por el hecho de que líneas celulares de cáncer de pulmón como la A549 recurren a la adquisición del este fenotipo para generar resistencia a la radioterapia o al Gefitinib (inhibidor del EGFR), sin embargo, los posibles cambios moleculares necesarios para la conversión de células “tipo neuroendócrinas” a CPCP aún no se han explorado.

Por la razón anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo el evaluar el efecto de la inhibición de la vía Notch en las células A549 transdiferenciadas a neuroendócrinas, con la finalidad de explorar una posible alteración por la cual tendrían que pasar las células de ADC para transformarse en CPCP.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.**

¿Es posible inducir mediante la inhibición de la vía Notch un fenotipo similar al del CPCP en las células A549 neuroendócrinas?

#### **5. HIPÓTESIS.**

La inhibición de la vía Notch induce la expresión de Ascl1 en las células A549 neuroendócrinas, permitiendo la activación de la proliferación y la adquisición de un fenotipo no adherente.

## **6. OBJETIVOS.**

### **6.1 OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar el efecto de la inhibición de la vía Notch en la morfología y proliferación de las células A549 neuroendócrinas.

### **6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Inducir la transdiferenciación neuroendócrina en las células A549.
2. Identificar por RT-PCR la expresión de la enolasa específica de neuronas en las células en las células A549<sub>NE</sub>.
3. Identificar por RT-PCR la expresión de Ascl1 en las células A549<sub>NE</sub>.
4. Evaluar el efecto de la inhibición de la vía Notch con DAPT en la proliferación de las células A549<sub>NE</sub>.
5. Registrar los cambios morfológicos inducidos por el DAPT en las células A549<sub>NE</sub>.
6. Comparar por RT-PCR los niveles de expresión del EGFR a nivel ARNm en las células A549 y A549<sub>NE</sub>.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **7.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL.**

#### **7.2.1 Cultivo celular.**

La línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549 fue cultivada en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Corning®) al 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco®) adicionado con penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL) (Gibco®). Las condiciones de incubación incluyeron una atmósfera húmeda a una concentración del 5 % de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 37 °C.

La conservación de la morfología celular y la pureza de los cultivos fueron regularmente evaluados por microscopía.

#### **7.2.2 Inducción de la transdiferenciación neuroendócrina.**

De acuerdo con la metodología reportada por Walker y colaboradores (2006), la transdiferenciación neuroendócrina fue modelada *in vitro* a través de la estimulación de la vía del AMP cíclico con los agentes 8-Br-cAMP (Sigma-Aldrich) e IBMX (Sigma-Adrich). Para ello se preparó un medio de diferenciación con las mismas características recién especificadas pero adicionado con IBMX y 8-Br-cAMP, ambos a una concentración final de 0.5 mM. Los periodos de diferenciación tuvieron invariablemente una duración de 72 horas, entre las cuales el medio fue renovado a las 48 horas.

#### **7.2.3 Inhibición de la vía Notch.**

La vía de señalización Notch fue silenciada en las células A549 mediante la acción del compuesto DAPT (Sigma Aldrich), un inhibidor de la  $\alpha$ -Secretasa (Hu y col., 2018). De manera similar a la sección anterior, el DAPT fue previamente añadido al medio de cultivo a concentraciones finales de 10 y 20 µM. Las células fueron sometidas a dichas soluciones por periodos de 72 horas, dentro de los cuales el medio fue renovado cada 24 horas.

#### 7.2.4 Ensayos de proliferación celular.

Se sembraron 25,000 células por pozo en placas de cultivo para células adherentes (p24, 1.9 cm<sup>2</sup>/pozo) y se llevaron a incubación. Veinticuatro horas más tarde, las células recibieron lavados con solución PBS y fueron cultivadas en medio DMEM sin SFB. Tras 24 horas de sincronización del ciclo celular, se realizaron nuevamente lavados y el medio sin suero fue sustituido por medio de diferenciación o por medio con DAPT.

Para la recolección de células los cultivos fueron lavados con solución PBS y sometidos a solución de tripsina por 15 minutos en la incubadora para separar las células de la placa de cultivo. Posteriormente, la solución de tripsina fue inactivada y homogenizada con medio de cultivo DMEM frío. De la solución resultante se tomó una muestra, la cual fue diluida en azul de tripano en proporciones de 1:3 o 1:5 dependiendo de la confluencia celular.

La cuantificación de las células viables se determinó por el método de exclusión de azul de tripano con una cámara de Neubauer. El número total de células fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$T = \left( \frac{\bar{X} * N}{D * C} \right) * V$$

Donde  $T$  es el número de células por mililitro,  $\bar{X}$  el número de células promedio por cuadrante de 1 mm<sup>2</sup>,  $N$  el factor de Neubauer (10,000 mL<sup>-1</sup>),  $D$  la dilución en azul de tripano (1/3 o 1/5),  $C$  el número de cuadrantes (1 mm<sup>2</sup>) considerados para el conteo (5) y  $V$  el volumen de la solución de la cual se tomó la muestra.

#### 7.2.5 Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa.

Las células A549 fueron sembradas en pozos de 9.5 cm<sup>2</sup> y llevadas a incubación, donde permanecieron hasta que los cultivos alcanzaron al menos el 85 % de confluencia. Llegado este punto, las células fueron lavadas y cultivadas en medio normal o medio de diferenciación por 72 horas para posteriormente ser recolectadas por tripsinización. La suspensión con las células fue centrifugada a 8,000 r.p.m. por 10 minutos y el pellet obtenido fue inmediatamente disuelto en reactivo TRIzol™. La extracción del ARN total de las células se realizó mediante el kit "Direct-Zol RNA miniPrep" (Zymo Research Corp.). La concentración y pureza del ARN fueron determinadas con un Espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop®).

Posteriormente, la síntesis de cadenas de ADN complementario se llevó a cabo con los reactivos del kit “First Strand cDNA Synthesis Kit” (Thermo Scientific) utilizando los primers Oligo (dT)<sub>18</sub>. Nuevamente, La concentración y pureza de los ácidos nucleicos fueron determinadas con un Espectofotómetro ND-1000 (NanoDrop®).

**Tabla 3.** Secuencias de los cebadores utilizados para el PCR.

Gen	Secuencia	Amplicón	Referencia
ASCL1	F: 5'-CGACTTCACCAACTGGTTCT	294 pb	Kasim y col., 2014. NCBI: NM_004316.4
	R: 5'-CCGTGAATGATTGGAGTGC		
REST	F: 5'- GAGGAGGAGGGCTGTTTACC	160 pb	Su y col., 2006. NCBI: NM_005612.5
	R: 5'- TCACAGCAGCTGCCATTTAC		
NSE	F: 5'-GGCTACACGGAAAAGATCGTTATT	101 pb	Morell y col., 2016. NCBI: NM_001975.3
	R: 5'-GAAGGATCAGTGGGAGACTTGAA		
NCAM	F: 5'- GGAACCCAGTGCACCTAAGCT	124 pb	Tenjin y col., 2019. NCBI: NM_001386289.1
	R: 5'- CGCTCGGTACCTGACCAGAT		
CgA	F: 5'- AACCGCAGACCAGAGGACCA	102 pb	Balboa y col., 2018. NCBI: NM_001275.4
	R: 5'-GTCTCAGCCCCGCCGTAGT		
EGFR	F: 5'-ATCTCCGAAAGCCAACAAG	244 pb	Shen y col., 2010. NCBI: NM_005228.5
	R: 5'-GCGACGGTCCTCCAAGTAG		
β-Actina	F: 5'-CCATCATGAAGTGTGACGTGG	175 pb	NCBI: NM_001101.5
	R: 5'-ACGGAGTACTTGCGCTCAGGA		

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó el kit GoTaq® Green MasterMix (Promega) y los cebadores reportados en la Tabla 3 (Invitrogen™). Se realizaron ensayos para determinar las condiciones óptimas requeridas para la amplificación de cada gen, las cuales se resumen en la Tabla 4.

Finalmente, los productos de las reacciones fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2.7 %, utilizando solución amortiguadora TBE (Tris base, ácido bórico y EDTA) y aplicando un voltaje de 90 mV. Como patrón de referencia se corrió en cada electroforesis un marcador de peso molecular de 50 a 500 pb. Los geles fueron revelados con bromuro de etidio y registrados con un fotodocumentador.

**Tabla 4.** Temperaturas y tiempos específicos para la amplificación de los genes diana.

Gen	Desnat.	Desnat.	Alineamiento	Elongación	Ciclos	Elongación
ASCL1	95 °C. 2 min.	95 °C. 35 s.	58 °C, 45 s.	72 °C, 25 s.	36	72 °C. 5 min.
REST			58.5 °C, 45 s.	72 °C, 20 s.		
NSE			58.5 °C, 45 s.	72 °C, 30 s.		
NCAM1			60 °C, 45 s.	72 °C, 20 s.		
CgA			59 °C, 45 s.	72 °C, 20 s.		
EGFR			58 °C, 45 s.	72 °C, 25 s.		

#### 7.2.6 Análisis estadístico.

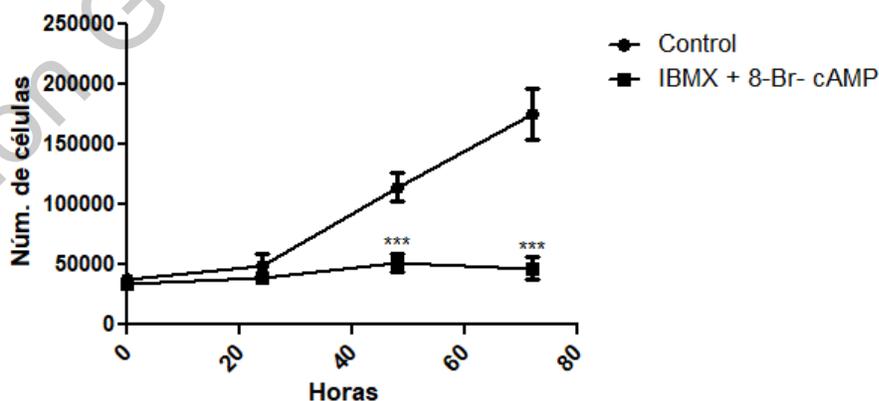
Los ensayos de proliferación se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes. Los datos recolectados fueron analizados mediante las pruebas t-Student o ANOVA de una vía y Tukey *post hoc* en el programa GraphPad Prism6®.

## 8. RESULTADOS.

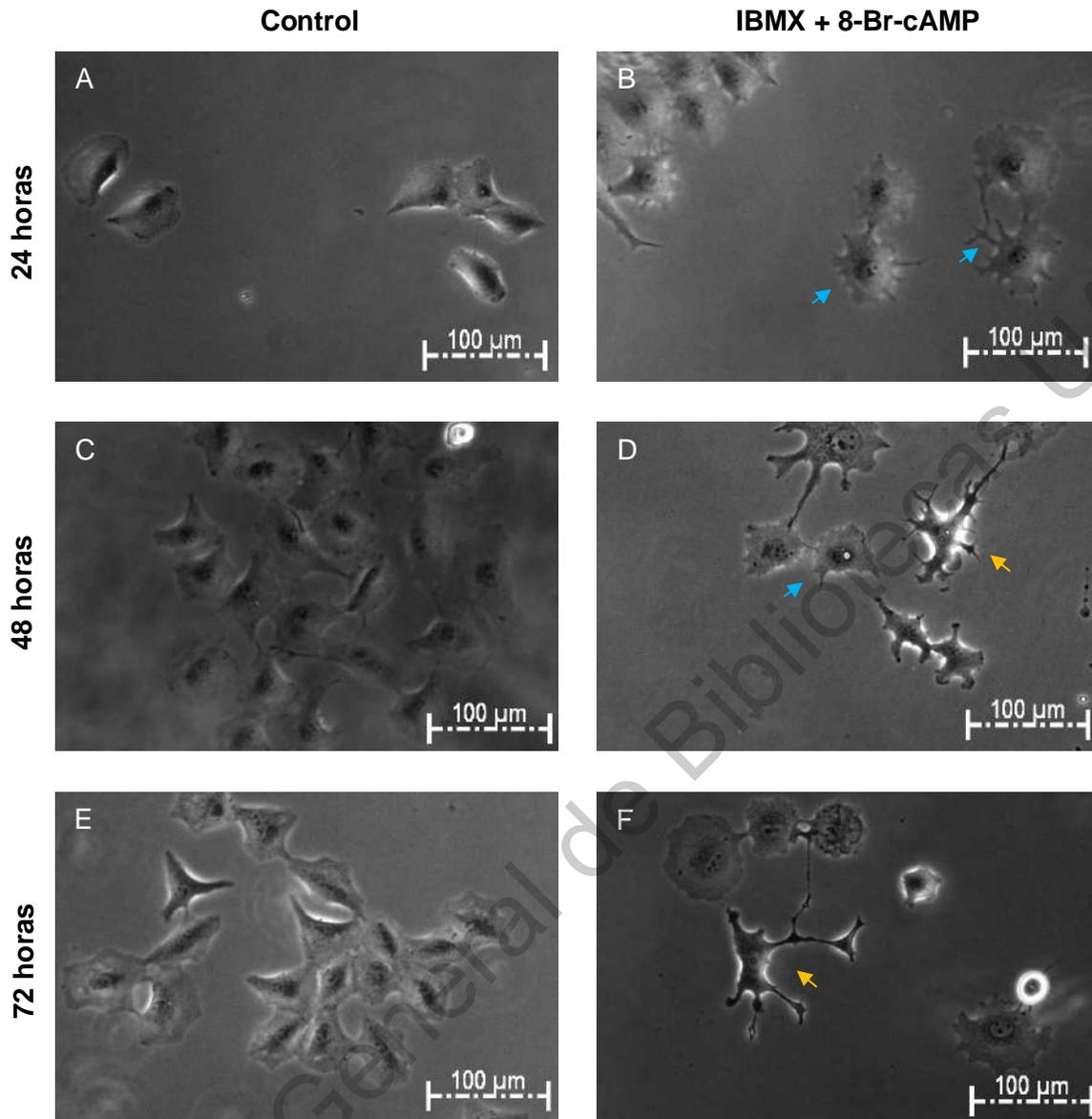
### 8.1 TRANSDIFERENCIACIÓN NEUROENDÓCRINA EN CÉLULAS A549.

Como fue anteriormente establecido, la transdiferenciación neuroendócrina (TNE) está definida por una serie de rasgos, morfológicos y fisiológicos, que la distinguen de otros procesos celulares y que pueden ser fácilmente evaluados de manera independiente. Por esta razón, el modelado experimental de la TNE generalmente se valida con respecto a tres diferentes enfoques, que son: la proliferación, la morfología celular y la expresión de marcadores neuroendócrinos. Este criterio fue utilizado para evaluar la adquisición de propiedades neuroendócrinas en las células A549 cultivadas en medio de diferenciación (0.5 mM IBMX, 0.5 mM 8-Br-cAMP).

Comenzando con la proliferación, en la Figura 3 se reporta el efecto que tuvo el medio de diferenciación sobre las células A549 a lo largo de las 72 horas requeridas para completar la TNE. Como era de esperarse, la curva de las células tratadas con IBMX y 8-Br-cAMP mantuvo una pendiente con un valor aproximado al cero, indicando que la proliferación fue en su mayoría interrumpida, mientras que la viabilidad no sufrió afectación alguna. En cambio, la curva de las células control adquirió rápidamente una pendiente positiva característica de los cultivos en fase de crecimiento exponencial (Freshney, 2016). Adicionalmente, el análisis estadístico de las medias de ambos grupos reveló diferencias significativas desde las 48 horas de tratamiento.



**Figura 3.** Proliferación de células A549 cultivadas en medio de diferenciación. Los datos se representan con la media  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre medias, determinadas mediante la prueba t-Student ( $p < 0.05$ ).

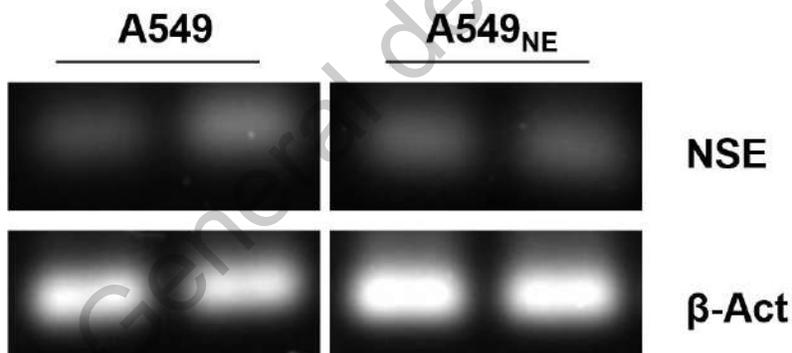


**Figura 4.** Efecto del medio de diferenciación en la morfología de las células A549. Micrografías representativas de las células A549 cultivadas en medio estándar y medio de diferenciación.

Continuando con el siguiente rasgo, las micrografías contenidas en la Figura 4 documentan los cambios morfológicos que fueron impuestos en las células A549 durante el proceso de diferenciación. Como puede observarse, bajo condiciones estándar de cultivo las células A549 exhibieron un fenotipo poligonal y uniforme (sin variaciones pronunciadas entre células); por el contrario, en presencia del medio de diferenciación las células adoptaron formas irregulares con procesos celulares de grosor y longitud variable. Notablemente, dos

fenotipos sobresalieron: el primero consistente en cuerpos celulares de forma circular, con elongaciones cortas y relativamente gruesas (flechas azules en las figuras 4B y 4D), y el segundo caracterizado por cuerpos celulares de forma irregular y ricos en procesos delgados de mayor longitud (flechas naranjas en las figuras 4D y 4F). Ambos fenotipos estuvieron presentes desde las primeras 24 horas de diferenciación hasta la finalización del tratamiento, siendo el primero el predominante. Asimismo, una gran parte de las células permaneció inmutada (al menos desde el punto de vista morfológico), preservando su fenotipo original a lo largo del tratamiento.

Por último, se compararon los niveles de expresión de la enolasa específica de neuronas a nivel de ARN mensajero en las células A549 cultivadas en presencia y ausencia del medio de diferenciación. Como puede apreciarse en la Figura 5, la NSE ya se encontraba expresada en las células A549 sin estimular y no sufrió cambios al sustituir el medio. En contraste, la expresión de la cromogranina A no fue detectada en ninguno de los grupos (ANEXO 1, Figura A).



**Figura 5.** Efecto del medio de diferenciación en la expresión de la NSE.

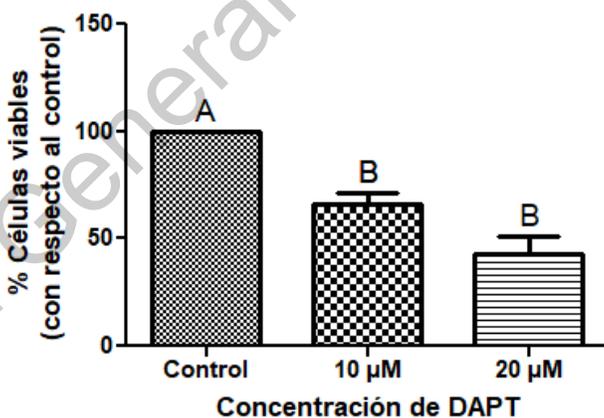
En conjunto, el cese de la proliferación celular, la formación de procesos celulares tipo neurita y la expresión de la NSE proporcionan evidencia suficiente para argumentar que las células A549 cultivadas en el medio de diferenciación durante 72 horas adquirieron una diferenciación neuroendócrina. Por consiguiente, en las secciones subsecuentes las células A549 pertenecientes a este grupo experimental serán referidas como A549<sub>NE</sub> (A549 neuroendócrinas).

## 8.2 INHIBICIÓN DE LA VÍA NOTCH EN CÉLULAS A549<sub>NE</sub>.

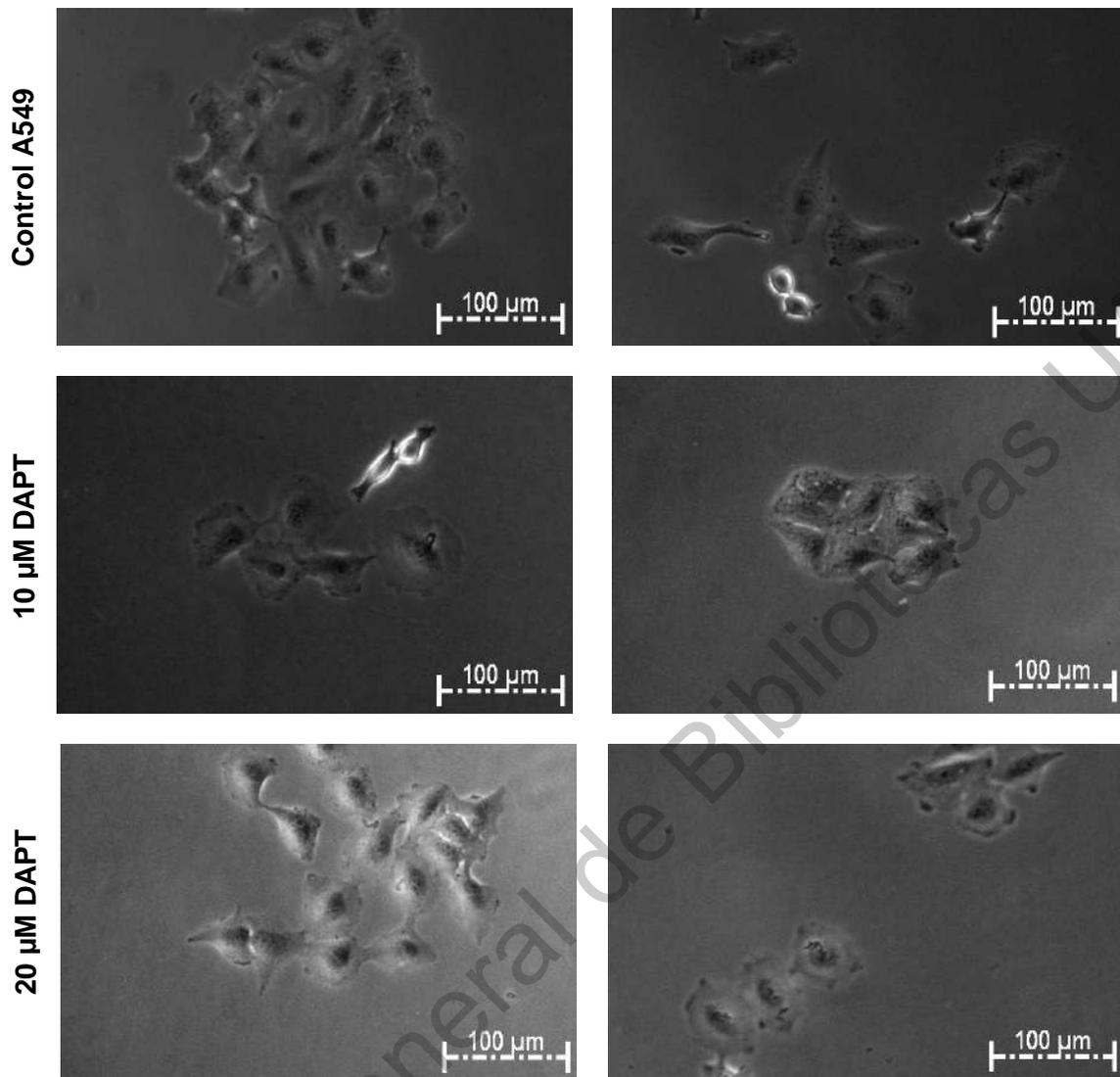
Dado que la inducción experimental de la TNE *in vitro* fue llevada a cabo exitosamente, se procedió con la siguiente fase, la cual buscaba determinar si la adquisición de propiedades neuroendócrinas por parte de las células A549 pudiera ser un factor de riesgo, para que alteraciones como el silenciamiento de la vía Notch suscitasen en ellas un comportamiento similar al del CPCP.

Primeramente, las células A549 sin TNE fueron cultivadas en presencia del DAPT a dos concentraciones diferentes durante un periodo de 72 horas. Como indica la Figura 6, el DAPT causó una disminución en el porcentaje de células viables del 33 % a la concentración de 10  $\mu$ M de DAPT y del 57 % a la de 20  $\mu$ M de DAPT. De manera similar, al comparar el número de células al inicio y al final del tratamiento, el mismo efecto fue observado con respecto a la proliferación celular (ANEXO I, Figura B).

Por otro lado, respecto a la morfología, las células A549 no experimentaron alteraciones a ninguna de las concentraciones de DAPT (Figura 7); siendo, desde este punto de vista, indistinguibles de las células control.

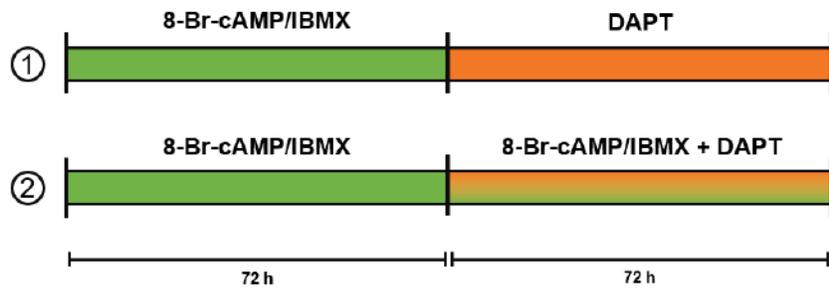


**Figura 6.** Efecto del DAPT en el porcentaje de células A549 viables. Los datos se representan con la media  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas con respecto al control determinadas mediante las pruebas ANOVA de una vía y Tukey *post hoc* ( $p < 0.05$ ).



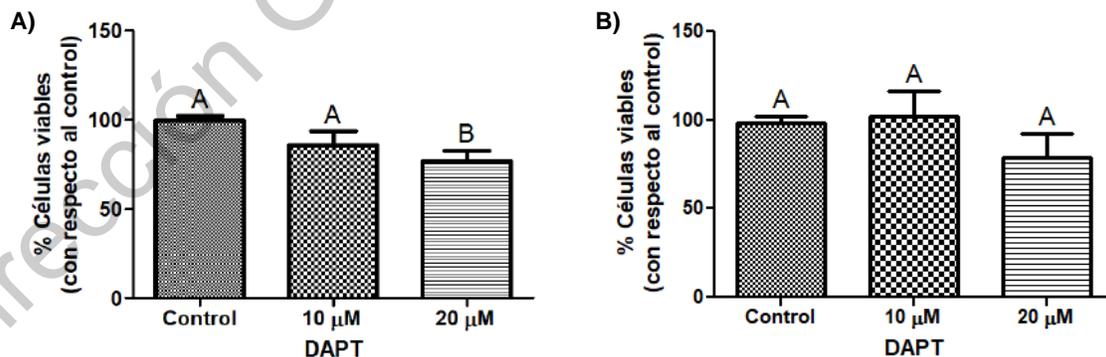
**Figura 7.** Efecto del DAPT en la morfología de las células A549. Micrografías representativas de las células a las 72 horas de tratamiento.

Posteriormente, el mismo ensayo fue realizado con las células A549<sub>NE</sub>. Para ello, el experimento se realizó en dos modalidades distintas: en la primera el medio de diferenciación fue retirado al terminar la transdiferenciación y sustituido por medio estándar adicionado con DAPT; mientras que en la segunda el DAPT fue diluido en el mismo medio de diferenciación (Figura 8).

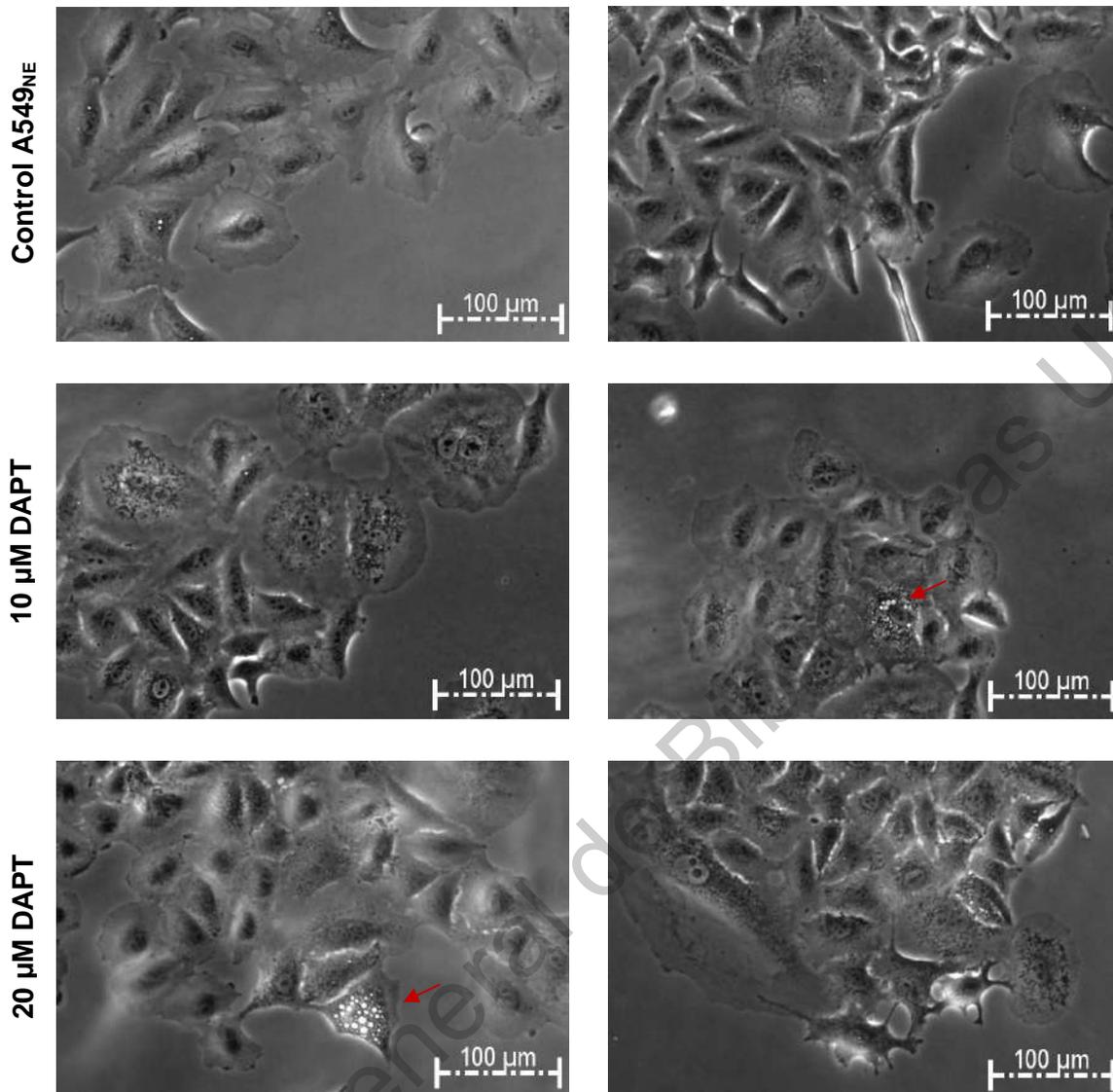


**Figura 8.** Inhibición de la vía Notch en las células A549<sub>NE</sub> en dos modalidades experimentales.

En el experimento 1 las células A549<sub>NE</sub> respondieron con una tendencia similar a la de las células A549 (Figura 6) pero de manera menos pronunciada, siendo el número de células significativamente menor al del control únicamente en el tratamiento con DAPT al 20  $\mu$ M (Figura 9A). Esto sugirió que las células A549<sub>NE</sub> probablemente retomaron la proliferación poco después de que el medio de diferenciación hubiera sido remplazado por medio estándar, implicando que sufrieron una reversión del fenotipo neuroendócrino. En contraste, en el experimento 2 no se encontraron cambios significativos en el porcentaje de células viables, así como ninguna tendencia, a ninguna de las concentraciones de DAPT (Figura 9B). Ahora bien, cuando las células fueron vistas bajo el microscopio, se observó que los procesos celulares tipo neurita se habían perdido en la mayoría de las células A549<sub>NE</sub> del experimento 1, pero no en las del experimento 2; lo cual reforzó la noción de que la TNE había sido revertida en ausencia del medio de diferenciación (Figuras 10 y 11).



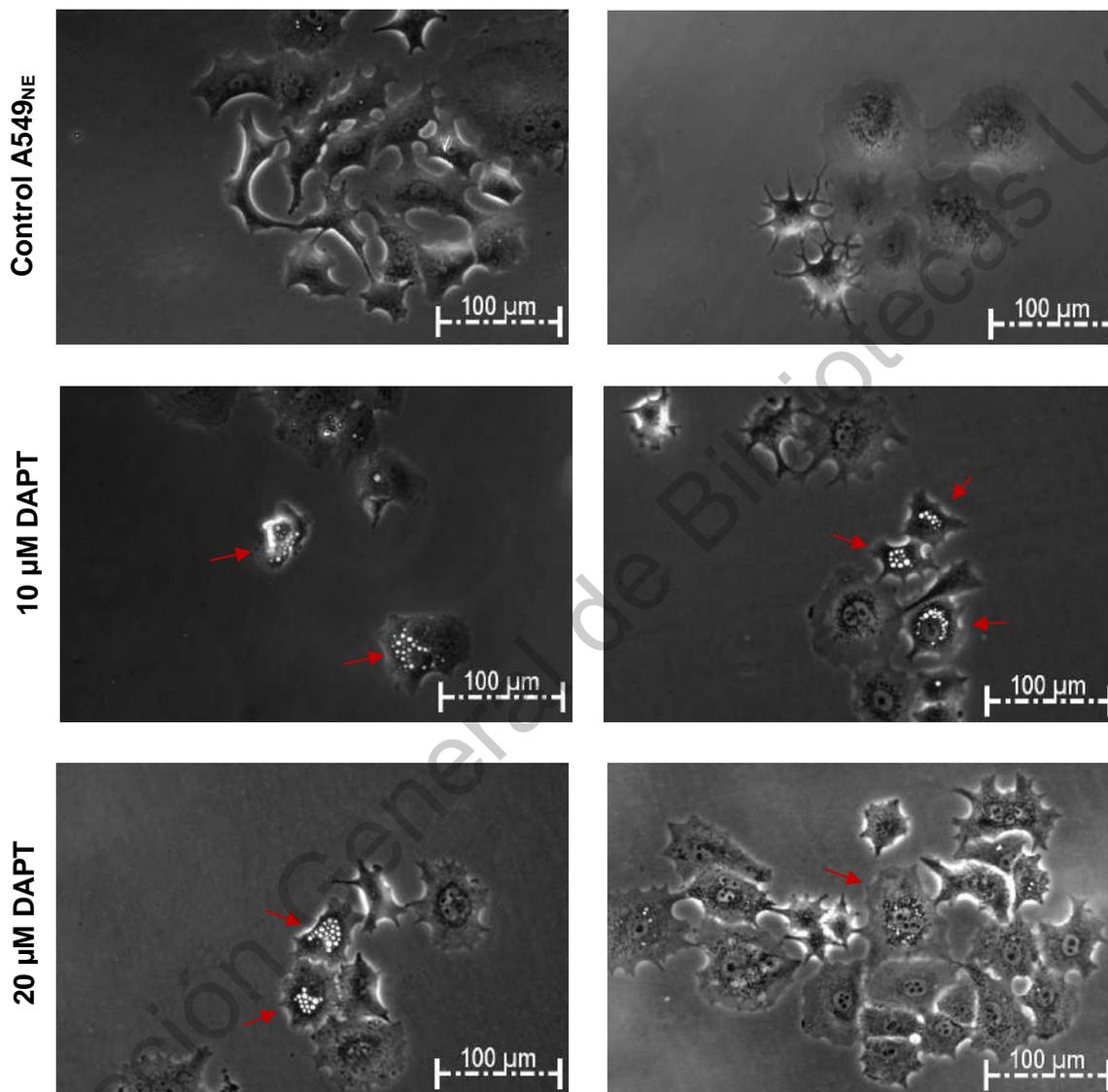
**Figura 9.** Efecto del DAPT en el porcentaje de células A549<sub>NE</sub> viables cultivadas en A) medio estándar y B) medio de diferenciación. Los datos se representan con la media  $\pm$  el error estándar de 3 experimentos independientes. Las letras indican diferencias significativas entre grupos, determinadas mediante las pruebas ANOVA de una vía y Tukey *post hoc* ( $p < 0.05$ ).



**Figura 10.** Efecto del DAPT en la morfología de las células A549<sub>NE</sub> cultivadas en medio estándar (experimento 1). Micrografías representativas de las células A549<sub>NE</sub> a las 72 horas de tratamiento.

Otro evento observado fue la presencia de múltiples vesículas intracelulares en algunas de las células A549<sub>NE</sub> del experimento 1. Tales cuerpos eran grandes y se encontraban localizados principalmente alrededor del núcleo celular o, en pocas ocasiones, distribuidos uniformemente en el citoplasma (flechas rojas en la Figura 10). Interesantemente, lo mismo sucedió en el experimento 2 pero de manera más notoria y frecuente, sobre todo a la concentración de DAPT de 10  $\mu\text{M}$  (flechas rojas en la Figura 11). Con base en esto, se infiere que las células A549<sub>NE</sub> que conservaron la diferenciación neuroendócrina fueron más

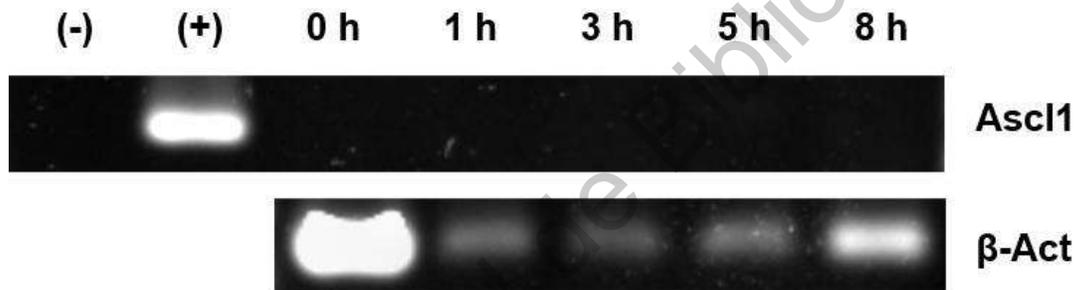
susceptibles a este efecto del DAPT que las células A549<sub>NE</sub> en proceso de reversión. Igualmente, es necesario señalar que solo una fracción de las células A549<sub>NE</sub> del experimento 2 exhibieron esta respuesta.



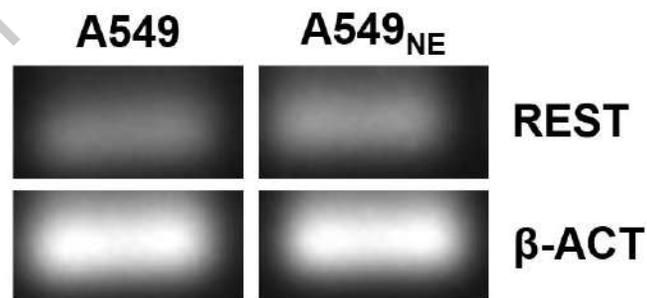
**Figura 11.** Efecto del DAPT en la morfología de las células A549<sub>NE</sub> cultivadas en medio de diferenciación (experimento 2). Micrografías representativas de las células A549 a las 72 horas de tratamiento.

### 8.3 EXPRESIÓN DE ASCL1 Y REST EN CÉLULAS A549<sub>NE</sub>.

Con la finalidad de explorar los mecanismos moleculares por medio de los cuales las células A549 acceden a los controles genéticos del linaje neuroendócrino durante la TNE, la expresión del factor de transcripción Ascl1 fue examinada durante las etapas tempranas del proceso. Para ello, las células A549 fueron estimuladas con medio de diferenciación durante periodos de 1, 3, 5 y 8 horas e inmediatamente recolectadas para la obtención del ARN. Como indica la Figura 12, el mRNA de Ascl1 no fue detectado en ninguna de las muestras, pero sí en el control positivo correspondiente al ARN de células SK-N-AS de neuroblastoma. Notablemente, a las ocho horas de transdiferenciación varias células ya exhibían la morfología neuroendócrina (ANEXO I, Figura C).



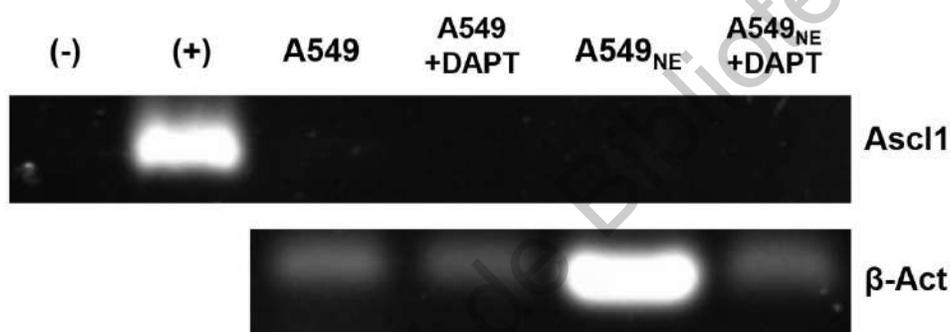
**Figura 12.** Expresión de Ascl1 en células A549 en proceso de transdiferenciación. Imágenes representativas de un pool de células A549 a diferentes horas de tratamiento con 8-Br-cAMP e IBMX.



**Figura 13.** Expresión de REST en las células A549 y A549<sub>NE</sub>. Imágenes representativas de un pool de células A549 a las 72 horas de tratamiento con 8-Br-cAMP e IBMX.

De la misma manera, Ascl1 tampoco fue detectado en las células A549<sub>NE</sub> a las 72 horas de diferenciación (Figura 14), por lo que se procedió a comparar los niveles de expresión de REST antes y después de la transdiferenciación. Como indica la Figura 13, no hubo cambios apreciables en los niveles de expresión de este gen a nivel de mRNA.

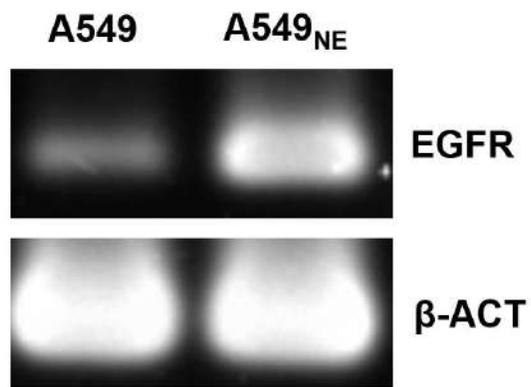
Por último, las células A549<sub>NE</sub> fueron tratadas con DAPT al 20  $\mu$ M (diluido en medio de diferenciación) durante 72 horas, para evaluar la posibilidad de que la expresión de Ascl1 se encontrara reprimida por la vía Notch de manera similar a como sucede en los tumores del CPCP. Nuevamente, Ascl1 no fue detectado en ninguno de los grupos experimentales (Figura 14).



**Figura 14.** Expresión de Ascl1 en células A549<sub>NE</sub> tratadas con DAPT. Imágenes representativas de un pool de células A549 a las 72 horas de tratamiento con DAPT.

#### 8.4 EXPRESIÓN DEL EGFR EN LAS CÉLULAS A549<sub>NE</sub>.

Dado que se ha reportado que la expresión del receptor de andrógenos se ve disminuida en la línea celular de cáncer de próstata LNCaP como resultado de la TNE (Shen y col., 1997); se quiso determinar si el mismo efecto tendría lugar en las células A549, pero con el EGFR. Inesperadamente, el ARNm del receptor incrementó drásticamente en las células A549<sub>NE</sub> en comparación con las células A549 control (Figura 15).



**Figura 15.** Expresión del EGFR en células A549 y A549<sub>NE</sub>. Imágenes representativas de un pool de células A549 a las 72 horas de tratamiento.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 9. DISCUSIÓN.

### 9.1 TRANSDIFERENCIACIÓN NEUROENDÓCRINA EN CÉLULAS A549.

La estimulación exógena de la vía del cAMP/PKA/CREB es la metodología más utilizada para modelar y estudiar la transdiferenciación neuroendócrina (TNE) *in vitro* en líneas celulares de cáncer de pulmón y próstata; para ello usualmente se utiliza el IBMX (3-isobutilmetilxantina) en combinación con 8-Br-cAMP. El IBMX es un inhibidor selectivo de las fosfodiesterasas, enzimas encargadas de hidrolizar el cAMP y cGMP en AMP y GMP respectivamente, mientras que el 8-Br-cAMP es una molécula análoga al AMP cíclico que cuenta con una mayor permeabilidad y resistencia a la degradación (Yan y col., 2016; Schwede y col., 2000). Juntos, estos agentes elevan y sostienen las concentraciones intracelulares del cAMP dando como resultado la activación de PKA y posteriormente la de CREB, promoviendo así la TNE (Hu y col., 2015). Aunque, la secuencia de eventos moleculares que tiene lugar inmediatamente después de la activación de la vía cAMP/PKA/CREB no se conoce a profundidad, el desenlace es consistentemente similar en las líneas celulares susceptibles a la TNE.

La interrupción de la proliferación en las células A549 cultivadas en medio de diferenciación (Figura 3) coincidió con lo observado en previas investigaciones. Mendieta y colaboradores (2018) reportaron el mismo efecto al inducir la TNE en células A549 mediante una combinación de IBMX y forskolina, mientras que Walker y colaboradores (2006) obtuvieron resultados similares usando la metodología aquí descrita, pero aplicada a la línea celular de carcinoma escamoso NCI-H157. De igual manera, el mismo fenómeno se repite en diversas líneas celulares de adenocarcinoma de próstata (Hu y col., 2015).

La razón por la cual la TNE suprime tan eficientemente la proliferación yace en el principio de que la diferenciación celular y la proliferación son procesos mutuamente excluyentes (Ruijtenberg y van den Heuvel, 2016; Soufi y Dalton, 2016). Durante el desarrollo de los organismos las células con ciclo celular activo inhiben la función de los factores de transcripción inductores de la diferenciación a través de la acción de sus complejos ciclina/CDK; por el contrario, cuando es preciso llevar a cabo la especialización celular, dichos factores de transcripción toman el control y se aseguran de bloquear la expresión de los genes ligados al ciclo celular, dirigiendo a las células a un estado de diferenciación terminal (Ruijtenberg y van den Heuvel, 2016). Esto sugiere primeramente que las células A549 requieren de la acción de al menos un factor de transcripción que les conceda el acceso al programa neuroendócrino y, en segundo lugar, que dicha molécula sea

probablemente un regulador del desarrollo con la capacidad de contrarrestar el ciclo celular (Soufi y Dalton, 2016).

Al mismo tiempo, otras evidencias señalan que la diferenciación neuroendócrina y la proliferación pueden coexistir manteniendo su incompatibilidad. Chang y colaboradores (2005a) demostraron que la línea celular de adenocarcinoma de pulmón H820 elevaba su ritmo de proliferación en respuesta a la estimulación con Interleucina 6, mientras que simultáneamente disminuía la expresión de la enolasa específica de neuronas (NSE). Asimismo, Zhu y colaboradores (2018) al exponer prolongadamente a las células A549 a dosis crecientes de radiación, generaron una cepa radiorresistente con propiedades neuroendócrinas potenciadas. Si bien, este último caso podría ser resultado de un proceso de mutagénesis y selección natural que permitió la fusión de la diferenciación neuroendócrina (morfología y marcadores) con un estado proliferativo, es bien sabido que varias líneas celulares y tumores no neuroendócrinos de pulmón expresan comúnmente marcadores neuroendócrinos (Linnoila y col., 1988; Jensen y col., 1990). Esto explica por qué tanto la NSE como la NCAM1 pudieron ser detectadas por RT-PCR en las células A549 parentales en ausencia del medio de diferenciación (Figura 3; ANEXO I, Figura A).

La expresión de marcadores neuroendócrinos en células proliferantes carentes de morfología neuroendócrina podría sugerir que la adquisición parcial de propiedades neuroendócrinas es posible. De esta manera, las células podrían beneficiarse de la síntesis y secreción de hormonas y neuropéptidos para favorecer la supervivencia y proliferación a través de mecanismos autócrinos y parácrinos. De acuerdo con Deeble y colaboradores (2007) las células LNCaP tipo neuroendócrinas promueven la proliferación de las células LNCaP sin TNE a través de mecanismos de señalización parácrina. Por lo tanto, lo mismo podría suceder con aquellas células que exhibieran rasgos neuroendócrinos atenuados, pero obviamente en menor magnitud; en efecto, la línea celular LNCaP también produce neurotensina y péptidos relacionados con la bombesina, aunque no en la misma cantidad que su contraparte neuroendócrina (Deeble y col., 2007). En este mismo sentido, entre los primeros estudios que se hicieron sobre la TNE *in vitro* en cáncer de próstata, Bang y colaboradores describieron este fenómeno como parte de la “naturaleza bifásica” de las células LNCaP y PC-3-M, sugiriendo que ciertas células pueden fluctuar entre ambos fenotipos, especialmente si se toma en cuenta la reversibilidad de la TNE (Bang y col., 1994; Shen y col., 1997).

Finalmente, la ausencia de expresión de la cromogranina A en las células A549<sub>NE</sub> contrasta con otras investigaciones en las que la TNE induce la expresión de este marcador. No obstante, es evidente que la respuesta celular es dependiente del estímulo utilizado para modelar la TNE e, incluso, de variaciones esporádicas en la misma línea celular. Mendieta y colaboradores (2018) observaron un incremento en el número de células positivas (determinado por citometría de flujo) para cromogranina A al inducir la TNE en células A549 mediante la combinación de forskolina e IBMX durante 120 horas; mientras que Chang y colaboradores (2013) pudieron detectar la expresión de la cromogranina A (por Western Blot) en las células A549, pero no observaron cambios de expresión al tratarlas con cAMP e IBMX. De manera similar, reportaron también un incremento drástico en la expresión de la NCAM1 mientras que en el presente trabajo se mantuvo en niveles apenas detectables (evaluado por RT-PCR) (Anexo I, Figura A) (Chang y col., 2013). Adicionalmente, la técnica utilizada también juega un rol importante, puesto que la expresión génica consta de varios mecanismos de regulación que pueden funcionar a nivel de la epigenética, transcripción, traducción y modificación postraducciona (Gilbert y Barresi, 2016c). Afortunadamente, existen otras maneras de evaluar la TNE desde el punto de vista fisiológico, por ejemplo, se ha utilizado también la expresión de la neurotensina y el péptido intestinal vasoactivo como marcadores neuroendócrinos, así como la detección de serotonina en el medio de cultivo (Mendieta y col., 2018; Zhu y col., 2018).

## **9.2 INHIBICIÓN DE LA VÍA NOTCH EN LAS CÉLULAS A549<sub>NE</sub>.**

El DAPT es una herramienta farmacológica que se utiliza frecuentemente a nivel experimental con la finalidad de modelar el silenciamiento de la vía Notch (Olsauskas-Kuprys y col., 2013). Esta molécula ejerce sus efectos a través de la modulación alostérica de la subunidad catalítica del complejo  $\alpha$ -secretasa, la Presenilina1/2, previniendo la escisión de una variedad de proteínas transmembranales que son reconocidas por esta proteasa, entre las cuales se encuentran los receptores Notch (Olson y Albright, 2008).

De los cuatro receptores Notch las células A549 expresan el 1, 2 y 3 (Zheng y col., 2007; Liu y col., 2014). Por consiguiente, dado que el DAPT es incapaz de discriminar entre los substratos de la  $\alpha$ -secretasa, la respuesta observada de las células A549 a dicho agente fue de carácter global, es decir, un efecto conjunto de la inactividad de los tres receptores. La disminución de la proliferación de las células A549 cultivadas en DAPT coincidió con la investigación de Hu y colaboradores (2018), en donde el DAPT causó una disminución en

el porcentaje de células viables de magnitud similar a la aquí reportada a las concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{M}$ . Asimismo, Liu y colaboradores (2014) observaron una disminución modesta en la viabilidad de las células A549, pero congruente con la concentración de DAPT de 2  $\mu\text{M}$  que evaluaron.

Estas evidencias indican que la proliferación de las células A549 se encuentra regulada en parte por la vía Notch, lo coincide con la noción de que esta vía funge como un oncogén en el CPCNP, mientras que en el CPCP es considerada como un supresor de tumores (Wael y col., 2014). De los tres receptores Notch expresados por las células A549, la señalización obstruida del 2 y 3 es a la que con mayor certeza se le podría atribuir la extenuación de la proliferación celular. Esto es debido a que el silenciamiento del receptor Notch1 en las células A549 favorece la proliferación y disminuye simultáneamente la apoptosis, mientras que su sobreexpresión genera el efecto contrario (Zheng y col., 2007; Wael y col., 2014); por consiguiente, de ser predominante la influencia de este receptor sobre el ciclo celular, su silenciamiento habría causado un incremento en el porcentaje de células viables. Por el contrario, el silenciamiento específico del receptor Notch3 en las mismas células conlleva una mayor sensibilidad a la apoptosis y la supresión de la proliferación celular (Hassan y col., 2016), lo cual podría estar asociado al efecto observado en la Figura 5. Notablemente, el silenciamiento de Notch3 resulta en la pérdida de la expresión de c-Myc, sugiriendo que la inducción de este gen es uno de los mecanismos mediante los cuales la vía Notch modula la proliferación en esta línea celular (Demarest y col., 2008; Hassan y col., 2016). Asimismo, el receptor Notch2 tiene una función similar a la de Notch3 en las células A549, con la particularidad de que es capaz de regular las propiedades de célula troncal, ya que su inhibición incrementa la proporción de células A549 positivas a CD133 (un marcador de células troncales de cáncer de pulmón), promueve la formación de microesferas e induce la expresión de factores de transcripción asociados a células progenitoras (KLF4, SOX2 y NANOG) (Wang y col., 2018).

Aunado a lo anterior, Hu y colaboradores (2018) reportaron que el cultivo de células A549 en presencia del DAPT a 20  $\mu\text{M}$  por 48 horas eleva significativamente la expresión de la proteína proapoptótica Bax y aminora al mismo tiempo la expresión de Bcl-2, acrecentando consecuentemente el porcentaje de células en apoptosis a aproximadamente el triple. Esto significa que la disminución en la viabilidad de las células A549 expuestas al DAPT fue consecuencia de la alteración de mecanismos que regulan tanto la proliferación celular como la apoptosis, los cuales a su vez se encuentran gobernados por la señalización de los receptores Notch2 y Notch3.

Con respecto a la inhibición de la vía Notch en las células A549<sub>NE</sub>, la ausencia de proliferación en el experimento 2 refutó la hipótesis de que el silenciamiento de esta vía, dentro de un contexto neuroendócrino, podría conducir a la transición hacia un fenotipo similar al del CPCP (al menos desde el punto de vista de la morfología y proliferación). En líneas celulares provenientes de CPCP, los receptores Notch1 y 3 regulan negativamente el ciclo celular, de manera que al ser silenciados la expresión de marcadores de proliferación se ve incrementada, así como el número de células por campo (Wael y col., 2014; Hassan y col., 2016). Asimismo, la expresión exógena de Notch1 en las células H1688 de CPCP causa una disminución en la expresión de marcadores neuroendócrinos y promueve la morfología epitelial, evidenciando una función reguladora de la diferenciación neuroendócrina (Wael y col., 2014). Estas diferencias en la respuesta celular sugieren que la TNE no necesariamente comparte los mismos mecanismos con el CPCNP; no obstante, para fundamentar esta conclusión sería necesario evaluar otras líneas celulares, además de la A549.

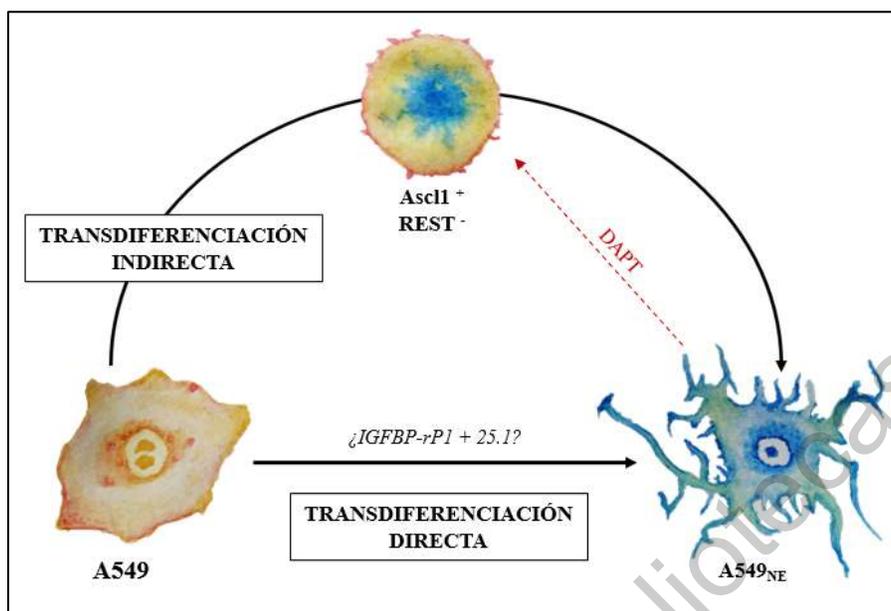
Por otro lado, la tendencia que exhibieron las células A549<sub>NE</sub> en el Experimento 1 junto con la pérdida de la morfología neuroendócrina confirman que la TNE es un proceso reversible en esta línea celular. Previamente, Mendieta y colaboradores (2018) reportaron la conservación del fenotipo neuroendócrino hasta 48 horas después de remover la forskolina e IBMX del medio de cultivo, lo cual concuerda con lo aquí observado, puesto que, aunque a las 72 horas la morfología neuroendócrina había sido completamente desplazada por el fenotipo original (Figura 10), la comparación de los grupos control de los experimentos 1 y 2 reveló que no hubo cambios estadísticamente significativos en el número de células (Anexo I, Figura D). Lo anterior indica, primeramente, que la proliferación se encontraba apenas en proceso de ser retomada en las células A549<sub>NE</sub> desprovistas del medio de diferenciación y, en segundo lugar, que la diferencia significativa entre el grupo control y el tratamiento con DAPT al 20  $\mu$ M del experimento 1 (Figura 9A) podría ser atribuida a los efectos proapoptóticos del DAPT (Hu y col., 2018). Estas evidencias corroboran que la TNE depende fuertemente de la presencia de un estímulo externo o un agente inductor como ha sido propuesto para líneas celulares de cáncer de próstata (Cox y col., 1999; Pernicová y col., 2014; Hu y col., 2015).

Finalmente, en relación con la formación de vesículas en el interior de las células A549<sub>NE</sub> tratadas con DAPT a continuación se consideran dos posibles escenarios. En el primero, con base en el tamaño y apariencia de las vesículas podría proponerse que estas son en realidad vacuolas autofágicas (Rukkijakan y col., 2016; Liu y col., 2017), lo cual implicaría

una relación entre la autofagia y la vía Notch, siendo la primera regulada por la segunda en las células A549<sub>NE</sub>, pero no en las A549, sugiriendo a su vez que la TNE provee este nexo. La implicación anterior se basa también en el hecho de que la autofagia generalmente es efectuada bajo circunstancias de estrés como la carencia de aminoácidos, glucosa o factores de crecimiento, o por hipoxia (Dikic y Elazar, 2018); luego, dado que ninguna de esas condiciones fue modelada experimentalmente (el medio de cultivo fue renovado cada 24 horas), la formación de vesículas podría atribuirse a la acción del DAPT. En el segundo escenario, las células A549<sub>NE</sub> podrían haber entrado en proceso de “methuosis”, el cual es un tipo de muerte celular que comienza con la aparición de grandes vacuolas, originadas por pinocitosis, que no logran fusionarse con los lisosomas y, en consecuencia, se acumulan en el citosol (Maltese y Overmeyer, 2014). Notablemente, ambos procesos están completamente relacionados con la muerte celular: la methuosis por su propia idiosincrasia y la autofagia por ser un mecanismo de supervivencia que intenta evitar la apoptosis, aunque en ocasiones sea un preámbulo de esta (Rukkijakan y col., 2016, Dikic y Elazar, 2018). Evidentemente son necesarias más investigaciones para determinar la causa de tales vacuolas; este sentido, tanto la autofagia como la methuosis tienen sendos marcadores moleculares y características distintivas, como la naturaleza ácida de las vacuolas autofágicas, no así la de las pinocíticas, y la activación de vías de señalización específicas (Huang y col., 2013; Maltese y Overmeyer, 2014).

### **9.3 EXPRESIÓN DE ASCL1 Y REST EN LAS CÉLULAS A549<sub>NE</sub>.**

Con base en la evidencia de que las células A549 no requieren de la expresión de Ascl1 para adquirir propiedades neuroendócrinas se propone que la TNE es un proceso de transdiferenciación directa, en dónde la expresión de genes del linaje neuroendócrino sucede de manera simultánea con la regulación a la baja de los genes correspondientes al linaje epitelial alveolar (Xu y col., 2014). Una ventaja de esta modalidad es que las células A549 podrían llevar a cabo la TNE de manera rápida, esquivando la necesidad de un proceso previo de desdiferenciación (Figura 16). Esto concuerda con el hallazgo de que 8 horas de estimulación con medio de diferenciación son suficientes para que algunas células adopten la morfología neuroendócrina (Anexo I, Figura C). En este mismo sentido, se ha reportado que las células A549 pueden incrementar significativamente la expresión de marcadores neuroendócrinos dentro de un periodo de seis horas cuando son expuestas a la radiación (Zhu y col., 2018).



**Figura 16.** Mecanismos propuestos de la TNE.

Si bien, la TNE parece ser un proceso directo e independiente de la expresión de Ascl1, la identidad de la molécula que regula este mecanismo en este modelo permanece desconocida. Dado que los factores de transcripción juegan un papel fundamental en la diferenciación celular (Gilbert y Barresi, 2016c), es muy probable que el gen en cuestión sea una proteína de esta índole, cuya expresión se encuentra modulada por CREB. Una opción serían las proteínas IGFBP-rP1 y 25.1, las cuales cuando son expresadas concomitantemente tienen la capacidad de inducir la TNE en líneas celulares de CPCNP (Walker y col., 2006). Ciertamente, se sabe que IGFBP-rP1 es una proteína de secreción y que 25.1 es miembro del complejo ESCRT-III (Haugk y col., 2000; Maity y col., 2019); sin embargo, ambas proteínas han sido observadas en el núcleo celular, sugiriendo que podrían tener otras funciones relacionadas con el control de la expresión génica (Wilson y col., 2001). Definitivamente, más investigaciones sobre el tema son necesarias, puesto que la elucidación de los mecanismos de regulación de la TNE podría ayudar a identificar blancos terapéuticos para evitar la resistencia tumoral.

Con respecto a la evaluación de los niveles de expresión de REST en las células A549 y A549<sub>NE</sub>, podría inferirse que su función no fue alterada durante la TNE (Figura 13); sin embargo, de acuerdo con Zhu y colaboradores (2014) la TNE modula la función de este

gen a través de la degradación de la proteína y no a nivel de la transcripción, razón por la cual los niveles de ARNm permanecen inmutados.

La ausencia de *Ascl1* en las células A549<sub>NE</sub> tratadas con DAPT refuta la hipótesis de que la vía Notch reprime la expresión de este gen en el contexto de la TNE, esto quiere decir, que la inactivación de esta vía no es el mecanismo por medio del cual los ADC se transforman en CPCP. Tanto la conservación de la morfología como la falta de proliferación en las células A549<sub>NE</sub> con la vía Notch silenciada confirman que la expresión de este regulador maestro de la diferenciación neural/neuroendócrina no fue inducida. En efecto, la expresión forzada de *Ascl1* en las células A549 provoca cambios drásticos en la morfología celular, causando que las células se desprendan de la placa de cultivo y crezcan en agregados de manera similar a las células de CPCP (Osada y col., 2008). Este era el efecto que se esperaba obtener inhibiendo la vía Notch en las células A549<sub>NE</sub> en dado caso de que la TNE compartiera este mecanismo con el CPCP.

#### **9.4 EXPRESIÓN DEL EGFR EN CÉLULAS A549<sub>NE</sub>.**

El marcado aumento en la expresión del EGFR en las células A549<sub>NE</sub> denota que probablemente cumple un rol en la TNE. Puesto que las células A549 con diferenciación neuroendócrina no proliferan, el receptor podría proveer a las células una fuerte señal de supervivencia a través de la activación de AKT, ayudando así a prevenir la apoptosis (Wee y Wang, 2017). Dicho mecanismo podría ayudar en el desarrollo de resistencia a estímulos nocivos como la radioterapia (Zhu y col., 2018).

Por otro lado, esto contrasta con lo observado en las células LNCaP (de adenocarcinoma de próstata), en las que la TNE viene acompañada por la pérdida de expresión del receptor de andrógenos (Shen y col., 1997; Zhu y col., 2014). En el cáncer de próstata este fenómeno se encuentra fuertemente asociado a la resistencia tumoral, mientras que, en el cáncer de pulmón, podría suceder una situación similar, puesto que los casos de transformación de ADC a CPCP frecuentemente carecen de la expresión del EGFR (Niederst y col., 2015; Davies y col., 2018).

## 10. CONCLUSIONES.

1. La transdiferenciación neuroendócrina en las células A549 se lleva a cabo en una modalidad directa que es independiente de la expresión de Ascl1.
2. La inhibición de la vía Notch no induce cambios en la morfología o proliferación de las células A549<sub>NE</sub>.
3. El aumento en la expresión del EGFR en las células A549<sub>NE</sub> sugiere que tiene una función relevante en la TNE que podría estar asociada al fortalecimiento de señales antiapoptóticas y de supervivencia.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 11. REFERENCIAS.

**Ahmed**, T., Vial, M., Ost, D., Stewart, J., Hasan, M., *et al.* (2018). Non-small cell lung cancer transdifferentiation into small cell lung cancer: a case series. *Lung Cancer*, 122, 220-223.

**Alvarado**, G. y Morales, D. (2016). Treatment for small cell lung cancer, where are we now? -a review. *Transl Lung Cancer Res*, 5(1): 26-38.

**Anand**, P., Kunnumakara, A., Sundaram, C., Harikumar, K., Tharakan, S., *et al.* (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res*, 25(9), 2097-2116.

**Augustyn**, A., Borromeo, M., Wang, T., Fujimoto, J., Shao, C., *et al.* (2014). Ascl1 is a lineage oncogene providing therapeutic targets for high-grade neuroendocrine lung cancers. *Proc Natl Acad Sci*, 111(41), 14788-14793.

**Arthur**, C. y Stowell, M. (2007). Structure of synaptophysin: a hexameric MARVEL-domain channel protein. *Structure*, 15(6), 707-714.

**Balboa**, D., Saarimäki, J., Borshagovski, D., Survila, M., Lindholm, P., *et al.* (2018). Insulin mutations impair beta-cell development in a patient-derived iPSC model of neonatal diabetes. *Elife*, 7, e38519.

**Ball**, D. (2004). Achaete-scute homolog-1 and Notch in lung neuroendocrine development and cancer. *Cancer Lett*, 204(2), 159-169.

**Bang**, J., Pirnia, F., Fang, W., Kang, W., Sartor, O., *et al.* (1994). Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci*, 91(12), 5330-5334.

**Bartolomucci**, A., Possenti, R., Mahata, S., Fischer, R., Loh, P. y Salton, S. (2011). The extended granin family: structure, function, and biomedical implications. *Endocr Rev*, 32(6), 755-797.

**Borggreffe** T. y Oswald, F. (2009). The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci*, 66(10), 1631-1646.

**Boucherat**, O., Boczkowski, J., Jeannotte, L. y Delacourt, C. (2013). Cellular and molecular mechanisms of goblet cell metaplasia in the respiratory airways. *Exp Lung Res*, 39(4-5), 207-216.

**Braadland**, P., Ramberg, H., Hartvedt, H. y Austlid, K. (2015).  $\beta$ -adrenergic receptor signaling in prostate cancer. *Front Oncol*, 4, 375.

**Campisi**, J. (2005). Aging, tumor suppression and cancer: high wire-act! *Mech Ageing Dev*, 126(1), 51-58.

**Chalela**, R., Curull, V., Enríquez, C., Pijuan, L., Bellosillo, B., *et al.* (2017). Lung adenocarcinoma: from molecular basis to genome-guided therapy and immunotherapy. *J Thorac Dis*, 9(7), 2142-2158.

**Chang**, K., Huang, C., Tsai, C., Chiu, C. y Lok, Y. (2005a). Role of IL-6 in neuroendocrine differentiation and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289(3), 438-445.

**Chang**, K., Tsai, C., Chiou, Y., Chiu, C., Jeng, K. y Huang, C. (2005b). IL-6 induces neuroendocrine dedifferentiation and cell proliferation in non-small cell lung cancer cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289(3), 446-453.

**Chang**, Y., Kim, S., Choi, Y., So, K., Rho, J., *et al.* (2013). Neuroendocrine differentiation in acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Tuberc Respir Dis*, 75(3), 95-103.

**Chen**, Z., Fillmore, C., Hammerman, P., Kim, C. y Wong, K. (2014a). Non-small cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer*, 14(8), 535-546.

**Chen**, Y., Nowak, I., Huang, J., Keng, P., Sun, H., *et al.* (2014b). Erk/MAP kinase signaling pathway and neuroendocrine differentiation of non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 9(1), 50-58.

**Cox**, M., Deeble, P., Lakhani, S. y Parsons, S. (1999). Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: implications for prostate cancer progression. *Cancer Res*, 59(15), 3821-3830.

**Danahay**, H., Pessotti, A., Coote, J., Montgomery, B., Xia, D., *et al.* (2015). Notch2 is required for inflammatory cytokine-driven goblet cell metaplasia in the lung. *Cell Rep*, 10(2), 239-252.

**Davies**, A., Beltran, H. y Zoubeidi, Z. (2018). Cellular plasticity and the neuroendocrine phenotype in prostate cancer. *Nat Rev Urol*, 15(5), 271-286.

**Deeble**, P., Cox, M., Frierson, H., Sikes, R., Palmer, J., *et al.* (2007). Androgen-independent growth and tumorigenesis of prostate cancer cells are enhanced by the presence of PKA-differentiated neuroendocrine cells. *Cancer Res*, 67(8), 3663-3672.

**Demarest**, R., Ratti, F. y Capobianco, A. (2008). It's all about Notch. *Oncogene*, 27(38), 5082-5091.

**Dennis**, D., San, H. y Schuurmans, C. (2019). bHLH transcription factors in neural development, disease, and reprogramming. *Brain Res*, 1705, 48-65.

**Desai**, T., Brownfield, D. y Kransnow, M. (2014). Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. *Nature*, 507(7491), 190-194.

- Dikic, I.** y Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(6), 349-364.
- Duma, N.,** Santana, R. y Molina, J. (2019). Non-small cell lung cancer: epidemiology, screening, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc*, 94(8), 1623-1640.
- Faguet, G.** (2015). A brief history of cancer: age-old milestones underlying our current knowledge database. *Int J Cancer*, 136(9), 2022-2036.
- Fane, M.** y Weeraratna, A. (2020). How the ageing microenvironment influences tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 20(2), 89-106.
- Feng, J.,** Sheng, H., Zhu, C., Qian, X., Wan, D., *et al.* (2016). Correlation of neuroendocrine features with prognosis of non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 7(44), 71727-71736.
- Frank, D.,** Penkala, I., Zepp, J., Sivakumar, A., Linares, R., *et al.* (2019). Early lineage specification defines alveolar epithelial ontogeny in the murine lung. *Proc Natl Acad Sci*, 116(10), 4362-4371.
- Freshney, I.** (2016). Quantitation, *Culture of animal cells. A manual of basic technique and specialized applications* (pp. 483-511). EEUU: John Wiley & Sons.
- Gandara, D.,** Hammerman, P., Sos, M., Lara, P. y Hirsch, F. (2015). Squamous cell lung cancer: from tumor genomics to cancer therapeutics. *Clin Cancer Res*, 21(10), 2236-2243.
- Gazdar, A.,** Bunn, P. y Minna, J. (2017). Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. *Nat Rev Cancer*, 17(12), 725-737.
- George, J.,** Shan, J., Jin, S., Cun, Y., Ozretic, L., *et al.* (2015). Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*, 524(7563), 47-53.
- Gilbert, S.** y Barresi, M. (2016a). Specifying identity, *Developmental biology* (pp. 29-44). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Gilbert, S.** y Barresi, M. (2016b). Juxtacrine signalling for cell identity, *Developmental biology* (pp. 137-139). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Gilbert, S.** y Barresi, M. (2016c). Differential gene expression: mechanisms of cell differentiation, *Developmental biology* (pp. 45-94). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Hanahan, D.** y Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hassan W.,** Yoshida, R., Kudoh, S., Motooka, Y. e Ito, T. (2016). Evaluation of role of Notch3 signaling pathway in human lung cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 142(5), 981-993.

- Haugk, K.,** Wilson, H., Swisshelm, K. y Quinn, L. (2000). Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-related protein-1: an autocrine/paracrine factor that inhibits skeletal myoblast differentiation but permits proliferation in response to IGF. *Endocrinology*, 141(1), 100-110.
- Herbst, R.,** Morgensztern, D. y Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, 553(7689), 446-454.
- Hori, K.,** Sen, A. y Artavanis-Tsakonas, S. (2013). Notch signalling at a glance. *J Cell Sci*, 126(10), 2135-2140.
- Hu, C.,** Choo, R., y Huang, J. (2015). Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: a mechanism of radioresistance and treatment failure. *Front Oncol*, 5(90).
- Hu, B.,** Guo, J., Ye, Y., Du, T., Cheng, C., *et al.* (2018). Specific inhibitor of Notch-3 enhances the sensitivity of NSCLC cells to gemcitabine. *Oncol Rep*, 40(1), 155-164.
- Huang, W.,** Tsai, S., Peng, S., Lin, M., Chiang, J., *et al.* (2013). Kaempferol induces autophagy through AMPK and AKT signaling molecules and causes G2/M arrest via downregulation of CDK1/cyclin B in SK-HEP-1 human hepatic cancer cells. *Int J Oncol*, 42(6), 2069-2077.
- IARC** (2020a). Cancer tomorrow. Página electrónica. Recuperado el 14 de abril de 2021 de <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype>.
- IARC** (2020b). Cancer today. Página electrónica. Recuperado el 14 de abril de 2021 de <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>.
- Islami, F.,** Torre, L. y Jemal, A. (2015). Global trends of lung cancer mortality and smoking prevalence. *Transl Lung Cancer Res*, 4(4), 327-338.
- Jain, R.,** Barkauskas, C., Takeda, N., Bowie, E., Aghajanian, H., *et al.* (2015). Plasticity of Hopx+ type I alveolar cells to regenerate type II cells in the lung. *Nat Commun*, 6, 6727.
- Jensen, S.,** Gazdar, A., Cuttitta, F., Russell, E. y Linnoila, R. (1990). A comparison of synaptophysin, chromogranin, and L-Dopa decarboxylase as markers for neuroendocrine differentiation in lung cancer cell lines. *Cancer Res*, 50(18), 6068-6074.
- Kasim, M.,** Benko, E., Winkelmann, A., Mrowka, R., Staudacher, J., *et al.* (2014). Shutdown of achaete-scute homolog-1 expression by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP)-A2/B1 in hypoxia. *J Biol Chem*, 289(39), 26973-26988.
- Lafkas, D.,** Shelton, A., Chiu, C., de Leon, G., Yongmei, C., *et al.* (2015). Therapeutic antibodies reveal Notch control of transdifferentiation in the adult lung. *Nature*, 528(7580), 127-131.
- Langer, C.,** Besse, B., Gualberto, A., Brambilla, E. y Soria, J. (2010). The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 28(36), 5311-5320.

**Lim, J., Ibaseta, A., Fischer, M., Cancilla, B., O'Young, G., et al.** (2017). Intratumoural heterogeneity generated by Notch signalling promotes small-cell lung cancer. *Nature*, 545(7654), 360-364.

**Linnoila, R., Mulshine, J., Steinberg, S., Funa, K., Matthews, M., et al.** (1988). Neuroendocrine differentiation in endocrine and nonendocrine lung carcinomas. *Am J Clin Pathol*, 90(6), 641-652.

**Liu, J., Mao, Z., Huang, J., Xie, S., Liu, T., et al.** (2014). Blocking the Notch pathway can inhibit the growth of CD133-positive A549 cells and sensitize to chemotherapy. *Biochem Biophys Res Commun*, 444(4), 670-675.

**Liu, F., Gao, S., Yang, Y., Zhao, X., Fan, Y., et al.** (2017). Curcumin induced autophagy anticancer effects on human lung adenocarcinoma cell line A549. *Oncol Lett*, 14(3), 2775-2782.

**Maity, S., Caillat, C., Miguët, N., Sulbaran, G., Effantin, G., et al.** (2019). VPS4 triggers constriction and cleavage of ESCRT-III helical filaments. *Sci Adv*, 5(4).

**Maltese, W. y Overmeyer, J.** (2014). Methuosis: nonapoptotic cell death associated with vacuolization of macropinosome and endosome compartments. *Am J Pathol*, 184(6), 1630-1642.

**Mendieta, I., Nuñez, R., Pérez, G., Pavón, L., Rodríguez, A., et al.** (2018). Effect of A549 neuroendocrine differentiation on cytotoxic immune response. *Endocr Connect*, 7(5), 791-802.

**Merrell, A. y Stanger, B.** (2016). Adult cell plasticity *in vivo*: de-differentiation and transdifferentiation are back in style. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(7), 413-25.

**Morell, C., Bort, A., Vara, D., Ramos, A., Altamirano, M., et al.** (2016). Up-regulated expression of LAMP2 and autophagy activity during neuroendocrine differentiation of prostate cancer LNCaP cells. *PLoS One*, 11(9).

**Niederst, M., Sequist, L., Poirier, J., Mermel, C., Lockerman, E., et al.** (2015). RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer. *Nat Commun*, 6, 6377.

**OMS** (2021). Cancer. Página electrónica. Recuperado el 14 de abril del 2021 de <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

**Olsauskas-Kuprys, R., Zlobin, A. y Osipo, C.** (2013). Gamma secretase inhibitors of Notch signaling. *Onco Targets Ther*, 6, 943-955.

**Olson, R. y Albright, C.** (2008). Recent progress in the medicinal chemistry of gamma-secretase inhibitors. *Curr Top Med Chem*, 8(1), 17-33.

**Osada**, H., Tatematsu, Y., Yatabe, Y., Horio, Y. y Takahashi, T. (2005). Ash1 gene is a specific therapeutic target for lung cancers with neuroendocrine features. *Cancer Res*, 65(23), 10680-10685.

**Osada**, H., Tomida, S., Yatabe, Y., Tatematsu, Y., Takeuchi, T., *et al.* (2008). Roles of Achaete-scute homologue 1 in DKK1 and E-cadherin repression and neuroendocrine differentiation in lung cancer. *Cancer Res*, 68(6), 1647-1655.

**Pernicová**, Z., Slabáková, E., Fedr, R., Simecková, S., Jaros, J., *et al.* (2014). The role of high cell density in the promotion of neuroendocrine transdifferentiation of prostate cancer cells. *Mol Cancer*, 13, 113.

**Rawlins**, E., Okubo, T., Xue, Y., Brass, D., Auten, R., *et al.* (2009). The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. *Cell Stem Cell*, 4(6), 525-534.

**Ruijtenberg**, S. y van den Heuvel, S. (2016). Coordinating cell proliferation and differentiation: antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell cycle*, 15(2), 196-212.

**Rukkijakan**, T., Ngiwsara, L., Lirdprapamongkol, K., Svasti, J., Phetrak, N., *et al.* (2016). A synthetic 2,3-diarylindole induces cell death via apoptosis and autophagy in A549 lung cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 26(9), 2119-2123.

**Sabari**, J., Lok, B., Laird, J., Poirier, J. y Rudin, C. (2017). Unravelling the biology of SCLC: implications for therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 14(9), 549-561.

**Semenova**, E., Nagel, R. y Berns, A. (2015). Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer. *Genes Dev*, 29(14), 1447-1462.

**Schwede**, F., Maronde, E., Genieser, H. y Jastorff, B. (2000). Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs. *Pharmacol Ther*, 87(2-3), 199-266.

**Shen**, R., Dorai, T., Szaboles, M., Katz, A., Olsson, C., *et al.* (1997). Transdifferentiation of cultured human prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in a hormone-depleted medium. *Urol Oncol*, 3(2), 67-75.

**Shen**, H., Yuan, Y., Sun, J., Gao, W. y Shu, Y. (2010). Combined tamoxifen and gefitinib in non-small cell lung cancer shows antiproliferative effects. *Biomed Pharmacother*, 64(2), 88-92.

**Soufi**, A. y Dalton, S. (2016). Cycling through developmental decisions: how cell cycle dynamics control pluripotency, differentiation and reprogramming. *Development*, 143(23), 4301-4311.

**Steinbuck**, M. y Winandy, S. (2018). A review of Notch processing with new insights into ligand independent Notch signalling in T-cells. *Front Immunol*, 9.

**Su, X.,** Gopalakrishnan, V., Stearns, D., Aldape, K., Lang, F., *et al.* (2006). Abnormal expression of REST/NRSF and Myc in neural stem/progenitor cells causes cerebellar tumors by blocking neuronal differentiation. *Mol Cell Biol*, 26(5), 1666-1678.

**Tenjin, Y.,** Kudoh, S., Kubota, S., Yamada, T., Matsuo, A., *et al.* (2019). Ascl1-induced Wnt11 regulates neuroendocrine differentiation, cell proliferation, and E-cadherin expression in small-cell lung cancer and Wnt11 regulates small-cell lung cancer biology. *Laboratory Investigation*, 99(11), 1622-1635.

**Wael, H.,** Yoshida, R., Kudoh, S., Hasegawa, K., Niimori-Kita, K., *et al.* (2014). Notch1 signaling controls cell proliferation, apoptosis and differentiation in lung carcinoma. *Lung cancer*, 85(2), 131-140.

**Walker, G.,** Antoniono, R., Ross, H., Paisley, T. y Oh, Y. (2006). Neuroendocrine-like differentiation of non-small cell lung carcinoma cells: regulation by cAMP and the interaction of mac25/IGFBP-rP1 and 25.1. *Oncogene*, 25(13), 1943-1954.

**Wang, X.,** Meng, Q., Qiao, W., Ma, R., Ju, W., *et al.* (2018). miR-181b/Notch2 overcome chemoresistance by regulating cancer stem cell-like properties in NSCLC. *Stem Cell Res Ther*, 9(1), 327.

**Wilson, E.,** Oh, Y., Hwa, V. y Rosenfeld, R. (2001). Interaction of IGF-binding protein-related protein 1 with a novel protein, neuroendocrine differentiation factor, results in neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(9), 4504-4511.

**Wee, P. y** Wang, Z. (2017). Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers*, 9(5), 52.

**Xu, L.,** Zhang, K. y Wang, J. (2014). Exploring the mechanisms of differentiation, dedifferentiation, reprogramming and transdifferentiation. *PLoS One*, 9(8), e105216.

**Yan, K.,** Gao, L., Cui, Y., Zhang, Y. y Zhou, X. (2016). The cyclic AMP signaling pathway: exploring targets for successful drug discovery (Review). *Mol Med Rep*, 13(5), 3715-3723.

**Zhang, H.,** Fillmore, C., Koyama, S., Redig, A., Chen, T., *et al.* (2017). Lkb1 inactivation drives lung cancer lineage switching governed by Polycomb repressive complex 2. *Nat Commun*, 8, 14922.

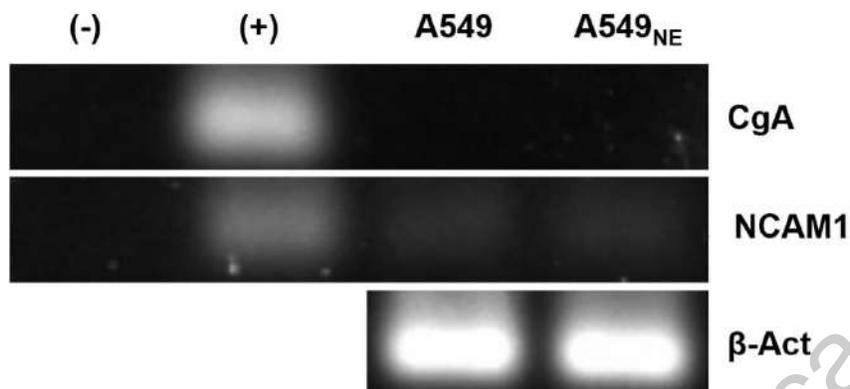
**Zheng, Q.,** Qin, H., Zhang, H., Li, J., Hou, L., *et al.* (2007). Notch signaling inhibits growth of the human lung adenocarcinoma cell line A549. *Oncol Rep*, 17(4), 847-852.

**Zhu, Y.,** Liu, C., Cui, Y., Nadiminty, N., Lou, W. (2014). Interleukin-6 induces neuroendocrine differentiation (NED) through suppression of RE-1 silencing transcription factor (REST). *Prostate*, 74(11), 1086-1094.

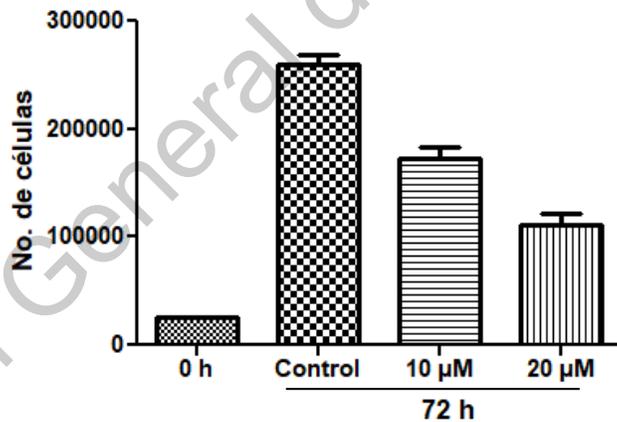
**Zhu, R., Yang, X., Xue, X., Shen, M., Chen, F., et al** (2018). Neuroendocrine differentiation contributes to radioresistance development and metastatic potential increase in non-small cell lung cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1865(12), 1878-1890.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

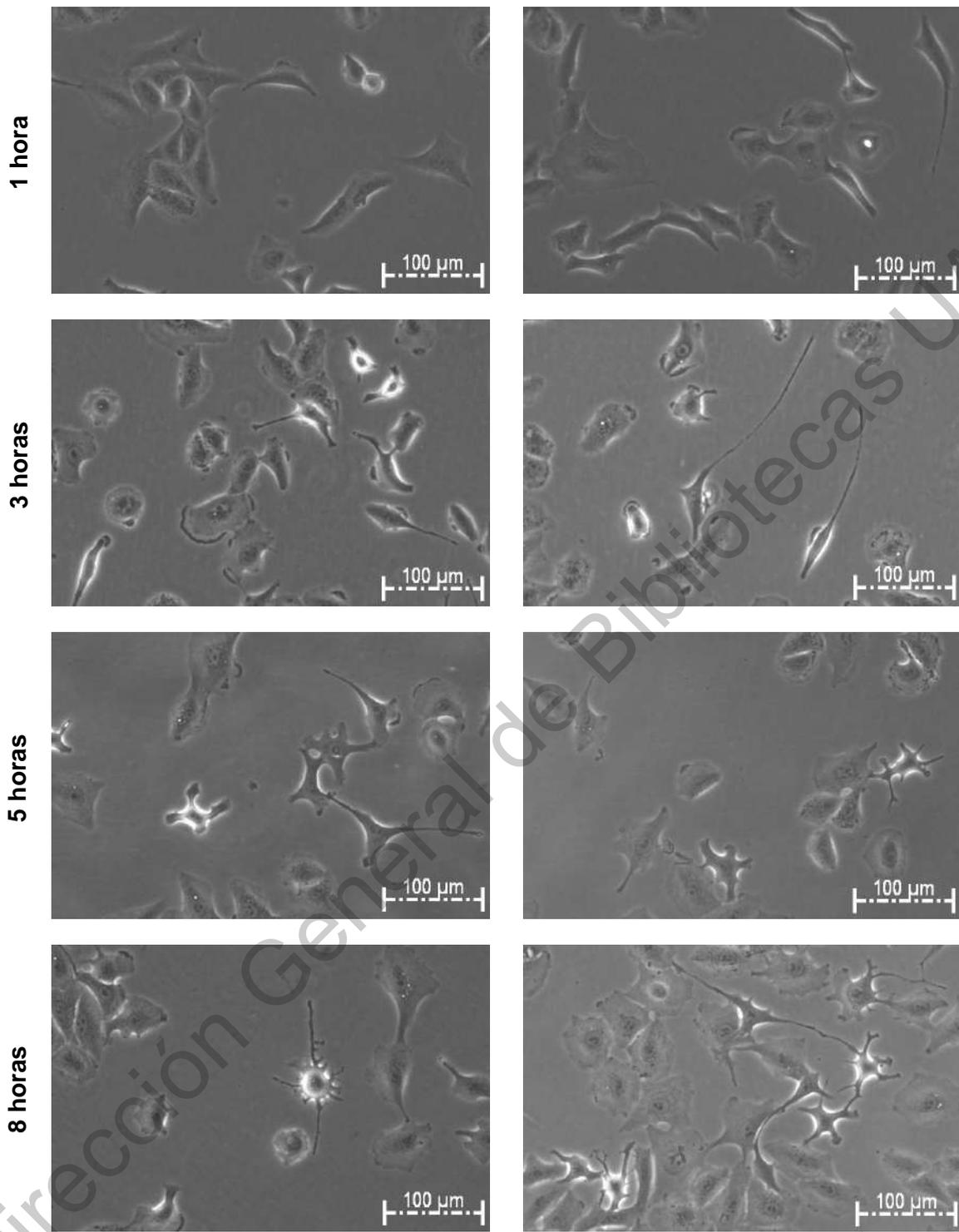
## ANEXO I



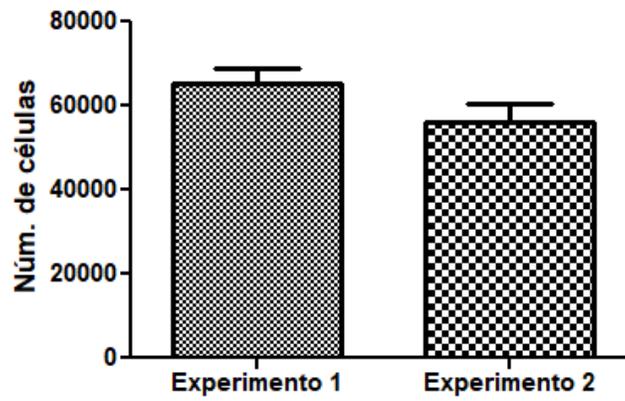
**Figura A.** Detección de Cromogranina A (CgA) y NCAM1 (CD56) en células A549 y A549<sub>NE</sub>. Para el control positivo se utilizó ARN proveniente de la línea celular SK-N-AS de neuroblastoma. Imágenes representativas de un pool de células A549 a las 72 horas de tratamiento.



**Figura B.** Proliferación de las células A549 tratadas con diferentes concentraciones de DAPT. Los datos se representan con la media  $\pm$  el error estándar de 3 experimentos independientes.



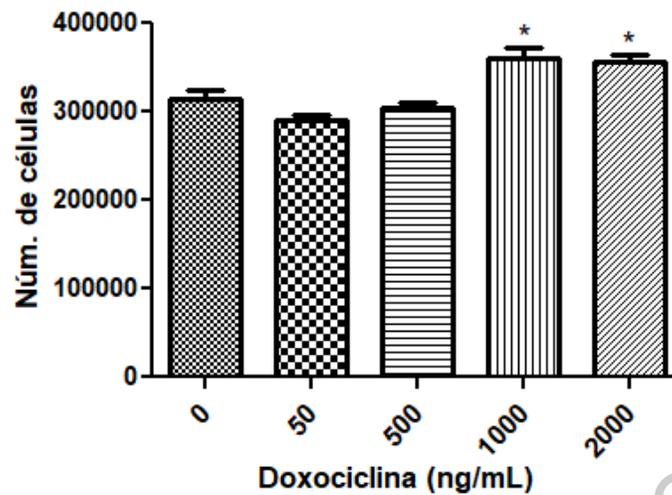
**Figura C.** Morfología de las células A549 a diferentes horas de exposición al medio de diferenciación. Imágenes representativas de un pool de células A549 a diferentes horas de tratamiento con 8-Br-cAMP e IBMX.



**Figura D.** Proliferación de las células A549<sub>NE</sub> cultivadas durante 72 horas en medio de cultivo estándar (experimento 1) o en Medio de diferenciación (experimento 2). Los datos se representan con la media  $\pm$  el error estándar de 3 experimentos diferentes. Ninguna diferencia significativa fue detectada mediante la prueba *t*-Student.

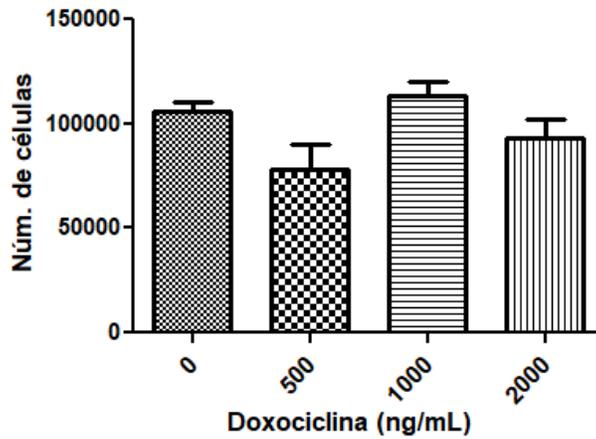
Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ANEXO II

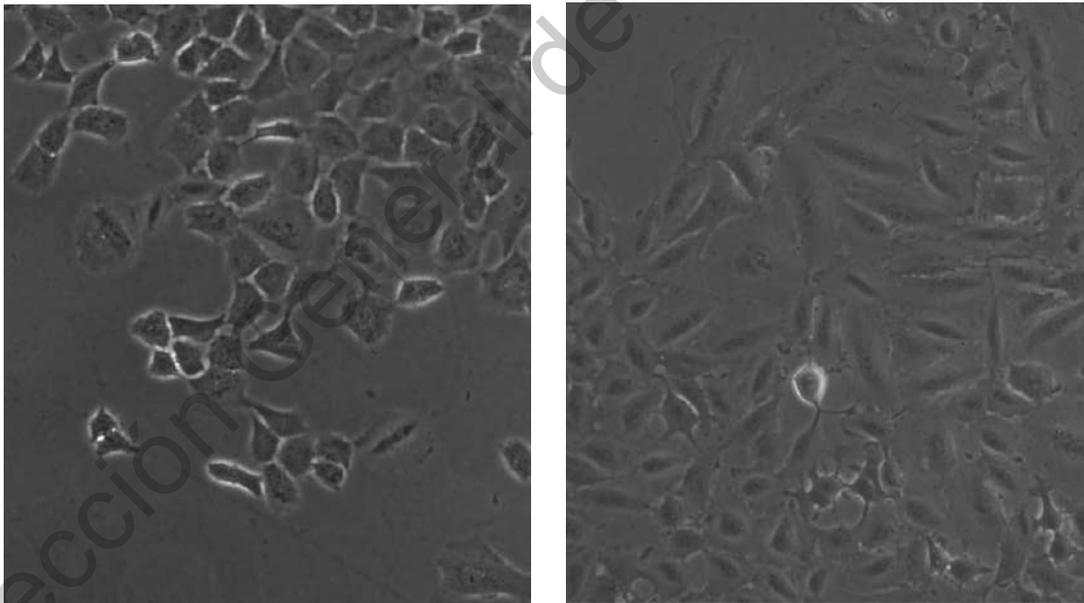


**Figura A.** Efecto de la inhibición (“knockdown”) de Rb1 en las células A549.

Las células A549 fueron transfectadas con un plásmido inducible por doxociclina para expresar un shRNA contra Rb1 (Addgene, Plásmido #66886). Primeramente, el plásmido fue amplificado en cultivos de *E. coli* en medio LB líquido a 37 °C usando ampicilina para la selección. El plásmido fue purificado con apoyo del E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit (Q-spin), cuantificado y finalmente transfectado en las células utilizando el kit Lipofectamin 3000®. Las células transfectadas exitosamente fueron seleccionadas en cultivos adicionados con Zeocina (Invitrogen) a 500 µg/mL durante seis semanas hasta que se observó el crecimiento de colonias. Para los ensayos de proliferación, se sembraron 50,000 células por pozo en presencia de Zeocina a 250 µg/mL y doxociclina a diferentes concentraciones. Resultados preliminares. Los datos se representan con la media ± el error estándar. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas con respecto al control determinadas mediante las pruebas ANOVA de una vía y Tukey *post hoc* ( $p < 0.05$ ).



**Figura B.** Efecto de diferentes concentraciones de doxociclina en la proliferación de las células A549 sin transfectar. Resultados preliminares. Los datos se representan con la media  $\pm$  el error estándar. No se encontraron diferencias significativas mediante las pruebas ANOVA de una vía y Tukey *post hoc* ( $p < 0.05$ ).



**Figura C.** Efecto del silenciamiento (“knockdown”) de Rb1 en la morfología de las células A549<sub>NE</sub>. Imágenes representativas de un pool de células A549 a las 72 horas de tratamiento con doxociclina.