



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN PRDM14 EN
UNA LÍNEA CELULAR A549 DE FENOTIPO
NEUROENDÓCRINO”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

REBECA ABIGAIL TAVERA GARCÍA

DIRIGIDA POR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



Análisis de la expresión del gen PRDM14 en una línea
celular A549 de fenotipo neuroendócrino

por

Rebeca Abigail Tavera García

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

Clave RI: FQLIN-243977-0223-223



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN PRDM14 EN
UNA LÍNEA CELULAR A549 DE FENOTIPO
NEUROENDÓCRINO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA

REBECA ABIGAIL TAVERA GARCÍA

DIRIGIDA POR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SINODALES

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA. _____

DIRECTORA

M. en C. JAZMÍN ESMERALDA SOTO HERNÁNDEZ _____

SINODAL

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER _____

SINODAL

Dra. JESICA ESTHER ESCOBAR CABRERA _____

SINODAL

A mi mamá y a todas las personas que lucharon valientemente contra el cáncer.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Berumen por apoyarme y aceptarme en su laboratorio, por brindarme de su conocimiento y orientación tanto para lo desconocido como para la resolución de problemas, así como su paciencia durante todo este proceso.

A la M en C. Jazmín Soto por capacitarme y enseñarme a trabajar en un laboratorio de investigación, por impulsarme a aprender más y por sus consejos que me permitieron llegar hasta el final de esta investigación.

A la Dra. Guadalupe Alcocer por enriquecer mis conocimientos y por su interés en apoyarme en la realización de esta tesis.

A la Dra. Jesica Escobar por contribuir y asesorarme durante todo este tiempo de trabajo.

A la Dra. Irasema Mendieta por brindarme sus conocimientos, consejos y recursos importantes, por estar pendiente de mi trabajo y brindarme su paciencia y guía.

A mi compañera de laboratorio y de la carrera Odalis por su amistad, por su apoyo incondicional, por sus consejos, por ser y estar siempre y por sus conocimientos que fueron pilares en mi trabajo de investigación.

A mi compañera de laboratorio Miriam por brindarme de sus consejos, por su apoyo y motivación, por ser parte de MOR.

A mi papá y a mis hermanos por haberme tenido paciencia y por apoyarme durante todo este tiempo desde el inicio de mi carrera hasta la finalización de mi tesis.

A mi compañera de laboratorio Dulce por siempre brindarme de un consejo y por su ayuda en los momentos difíciles.

A mi amigos de la carrera, Alejandra, Fernanda, Moni, Caro, Guadalupe y Ulises por inspirarme, motivarme y por permitirme tener de su amistad y apoyo por más de 5 años.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Cáncer	1
1.2 Cáncer de pulmón	3
1.3 Células neuroendócrinas	7
1.4 PRDM14	9
2. HIPÓTESIS	10
3. OBJETIVOS	11
3.1 General	11
3.2 Específicos	11
4. METODOLOGÍA	12
4.1 Materiales y células	12
4.2 Métodos	12
4.3 Manejo de desechos	16
5. RESULTADOS	18
6. DISCUSIÓN	28
7. CONCLUSIONES	33
8. REFERENCIAS	34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Primers para la RT-PCR	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Grupo control día 1 del tratamiento.	18
2	Grupo control día 4 del tratamiento.	19
3	Grupo tratado con IBMX día 1 del tratamiento.	19
4	Grupo tratado con IBMX día 4 del tratamiento.	20
5	Grupo tratado con FSK día. 1 de tratamiento.	21
6	Grupo tratado con FSK día 4 del tratamiento.	21
7	Grupo tratado con FSK e IBMX día 1 del tratamiento.	22
8	Grupo tratado con FSK e IBMX día 4 del tratamiento.	23
9	Verificación de la expresión del gen de referencia GAPDH y el marcador neuroendócrino SYP en los grupos de tratamiento, IBMX (0.5 mM), FSK (0.5 mM) e I+F (0.5 mM).	24
10	Expresión del marcador neuroendócrino: sinaptofisina (SYP) en los grupos de tratamiento.	25
11	Expresión del gen de referencia: GAPDH en los grupos de tratamiento.	25
12	Verificación de la expresión del gen PRDM14 en los grupos de tratamiento , IBMX (0.5 mM), FSK (0.5 mM) e I+F (0.5 mM).	26
13	Expresión del gen PRDM14 en células de cáncer de pulmón A549 con fenotipo neuroendócrino.	27

Resumen

El cáncer esta caracterizado por un crecimiento anormal de las células. El cáncer de pulmón es un tipo de cáncer cuyo principal factor de riesgo es el tabaquismo. Un tumor neuroendócrino pulmonar puede secretar hormonas y factores que tienen un impacto sobre la proliferación de las células cancerosas. El PRDM14 (proteína de dedos de zinc del dominio PR) es un gen con baja expresión en tejidos humanos, sin embargo, se ha encontrado presente en varios tipos de cánceres sólidos. El objetivo fue analizar la expresión del gen PRDM14 en la línea celular A549 fenotipo neuroendócrino. Las células fueron tratadas con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, 0.5 mM), forskolina (FSK, 0.5 mM) o su combinación (I+F, 0.5 mM) por 96 h. Se realizó una RT-PCR para confirmar la transdiferenciación, así como la expresión de PRDM14. Los resultados muestran cambios morfológicos en los grupos de tratamiento, con una expresión predominante del marcador neuroendócrino sinaptofisina en el grupo I+F. El gen PRDM14 se expresó en todos los grupos de tratamiento, la cual fue significativamente mayor en el grupo I+F. Se atribuyen los cambios morfológicos al incremento de la concentración intracelular de cAMP lo que favoreció la expresión de genes característicos del crecimiento de proyecciones de tipo neurita y el incremento del tamaño celular. La sobreestimulación de la vía MERK/Erk por los fármacos promovió la expresión del gen PRDM14 y la sobreexpresión en el grupo I+F causada por un posible efecto aditivo. Se transdiferenció la línea celular A549 a fenotipo neuroendócrino, la cual expresó al gen PRDM14.

ANTECEDENTES

1.1 Cáncer

El cáncer es un conjunto anomalías en la homeostasis celular que se caracteriza por un crecimiento anormal de las células con la capacidad de diseminarse y proliferar en zonas diferentes a la de origen, proceso conocido como metástasis en el cual van adaptando su metabolismo y en el que las células se diseminan a cualquier órgano o tejido. Las células cancerosas tienen la característica de alterar las vías celulares las cuales le confieren una capacidad de supervivencia, una mayor proliferación celular y una disminución de la muerte celular. El cáncer puede presentarse debido a múltiples causas las cuales se agrupan en dos categorías: factores genéticos y externos o ambientales (Hayes, 2021).

El cáncer se encuentra entre las primeras 10 causas de muerte a nivel mundial en el 2019 y es una carga importante para el sistema sanitario. De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en el 2021 a nivel mundial hubo 10 millones de muertes por cáncer, los tipos que causaron más muertes entre los hombres son el de pulmón, próstata, colorrectal, hígado y estómago. En las mujeres el de mama, pulmón, colorrectal, cérvico uterino y ovario. La tendencia a futuro que se prevé para esta letal enfermedad es un aumento en la incidencia hasta un 60 % en los próximos 20 años, lo que podría causar un colapso en el sistema de salud, considerando un crecimiento a unos 30 millones de nuevos casos de los 20 millones de casos nuevos que hay actualmente, principalmente en países en desarrollo (OPS, 2021). En México, entre inicios y mediados del 2020 se registraron más de medio millón de muertes, de las cuales 9 % se deben a tumores cancerígenos (INEGI, 2021).

Cuando hablamos de carcinogénesis nos referimos al origen de un proceso, en el cual una sucesión de eventos favorece la mutación de células que tienden a proliferar descontroladamente, quedando fuera de los controles biológicos de regulación tumoral (Civetta, 2011; Klaunig y Wang, 2018).

La carcinogénesis consta de tres etapas: iniciación, promoción y progresión. Para que cambie el fenotipo de una célula considerada normal y se transforme en otra cancerosa es necesario que ocurran alteraciones en varios genes y a lo largo del tiempo, incluso años tras una exposición prolongada de un carcinógeno y éstos no solo afectan a la célula. Las mutaciones genéticas dirigen a la modificación de los elementos que codifican para un gen normal y siguiendo con la carcinogénesis dan lugar a:

- I. Los cánceres heredables por mutaciones en uno o ambos alelos de las células germinales.
- II. Los cánceres esporádicos, donde las alteraciones genéticas dependen de los mutágenos ambientales o agentes genotóxicos (virus, radiaciones o sustancias químicas) (Civetta, 2011; Klaunig y Wang, 2018).

En la tendencia a generar un cáncer no heredable, la mutación de algunos genes conduce a consecuencias metabólicas que podrían significar una ruta hacia la carcinogénesis. Los cánceres esporádicos se deben principalmente a una exposición ambiental, donde un 80 % es debido a la presencia de agentes carcinógenos físicos y químicos. Los diferentes tipos de cánceres que generan los carcinógenos químicos pueden actuar como inhibidores o activadores de enzimas que participan entre otras en la transducción de señales. Se encuentran dos mecanismos por los cuales los genes pueden alterarse:

- I. Genético: se producen alteraciones estructurales del genoma por cambios en la disposición de los propios genes o cambios en las bases nitrogenadas del ADN, por ejemplo, las mutaciones, translocaciones o deleciones.
- II. Epigenético: se generan cambios en la expresión génica, al alterarse la actividad enzimática que le controla, resultando en cambios en los parámetros de crecimiento y muerte celular (Civetta, 2011; Klaunig y Wang, 2018).

1.2 Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es un tipo de cáncer en cuya clasificación histológica están los subtipos: cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en el cual se encuentran los subtipos adenocarcinoma, carcinoma escamoso y carcinoma de células grandes (Ruiz-Cordero y Devine, 2020). El cáncer de pulmón de células pequeñas representa cerca del 15 % de los diagnósticos de cáncer de pulmón, causando más de 200,000 muertes al año a nivel mundial, es considerado uno de los más mortales debido a que aproximadamente el 70 % de los casos ya se encuentran en un estado metastásico en donde su mediana de supervivencia oscila entre 7 a 12 meses una vez diagnosticado (Huang y col., 2021; Ko y col., 2020; Sung y col., 2021).

En la metástasis del cáncer del pulmón los principales órganos afectados son los ganglios linfáticos, el cerebro y los huesos. En ella participan elementos clave tales como el microambiente tumoral (en él está implicada la formación de la matriz extracelular), las células madre del cáncer de pulmón, la linfangiogénesis y la angiogénesis, que hacen a este tipo de metástasis un proceso complejo (Xie y col., 2021).

El microambiente del cáncer de pulmón se compone por células estromales cancerígenas de pulmón y matriz extracelular que proporciona un ambiente favorable para la proliferación y crecimiento de las células cancerígenas. La relevancia del microambiente tumoral viene dada por la relación con las células tumorales y su potencial de invasión a otros órganos al promover su desarrollo. Las células tumorales acidifican el microambiente produciendo grandes cantidades de ácido láctico que desempeña un papel promotor del crecimiento de las células tumorales (Xie y col., 2021).

Actualmente las posibles causas de la carcinogénesis de pulmón siguen sin esclarecerse por completo (Li y col., 2021). El factor de riesgo que continúa liderando el cáncer de pulmón tanto en hombres como en mujeres es el tabaquismo, entre el 80 y 90% de los diagnósticos están relacionados directamente con los agentes

carcinogénicos que se liberan de la combustión del tabaco, ya sea que se consideren fumadores pasivos o activos (Corrales y col., 2020; Ruiz-Cordero y Devine, 2020), a pesar de esto hay predisposición de desarrollar cáncer en aquellas personas consideradas como no fumadoras debido a la propia susceptibilidad genética. Se conocen otros factores de riesgo en el cáncer de pulmón tales como el humo de tabaco ambiental, el uso de sistemas que liberan nicotina, drogas recreativas, la contaminación del aire, quema de biomasa, uranio, radio y radón, exposiciones ocupacionales como al asbesto, el ejercicio, la alimentación, enfermedades crónicas pulmonares y la predisposición genética (Bade y De la Cruz, 2020).

Se conocen varios genes relacionados con el ciclo celular y el riesgo de desarrollo de cáncer de pulmón, entre los que se encuentran los supresores de tumores (p53 y p73), así como los implicados en la apoptosis (FAS y FASL). Existen genes que pueden ser biomarcadores, los cuales permiten conocer el estadio del cáncer y su susceptibilidad a desarrollar cáncer de pulmón. Aquellos cambios en el ADN que han sido adquiridos o que son epigenéticos, de igual manera conducen a una mayor susceptibilidad al cáncer de pulmón, entre los cuales están incluidos la metilación del ADN, la desacetilación de histonas y fosforilación, que tienen la capacidad de modificar la expresión génica (Bade y De la Cruz, 2020).

La metilación del ADN es de relevancia en la represión de la expresión génica que de igual manera tiene un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad génica. La metilación sucede en las islas de dinucleótidos CpG, cuando este proceso ocurre en las células cancerosas hay una disminución en la metilación de la citosina que propicia un incremento de la recombinación mitótica, lo que genera una inestabilidad cromosómica. Además, la hipometilación de los elementos transponibles provoca un aumento en la transposición dentro del genoma lo que lleva a una activación de oncogenes. Las histonas además de ser proteínas de "empaquetamiento de ADN", también son reguladores de la actividad génica cuando son modificadas postraduccionalmente, las cuales pueden ser la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación. La desacetilación está mediada por histonas desacetilasas (HDAC) y su actividad aumentada se relaciona

con cromatina condensada, transcripcionalmente inactiva, la sobreexpresión de HDAC puede generar el silenciamiento de genes supresores de tumores (TSG) y la transcripción aberrante causada por la expresión mutación alterada de los genes que codifican la histona acetiltransferasa (HAT) o las enzimas HDAC o sus asociados de unión, las cuales están directamente relacionadas con la carcinogénesis (Ansari y col., 2016; Wen y col., 2011).

Los factores genéticos que generan susceptibilidad a desarrollar cáncer de pulmón incluyen los genes de alta penetrancia y baja frecuencia; genes de baja penetrancia y alta frecuencia; y polimorfismos epigenéticos adquiridos (Bade y col., 2020). Los polimorfismos son alteraciones en el genoma, se presentan por mutaciones que ocurren como: inserciones de secuencias cortas de nucleótidos (SNP), repeticiones de una secuencia corta un número variable de veces o deleciones. Los SNP representan cerca del 90% de la variación de una secuencia y pueden llegar afectar la eficacia de los mecanismo de reparación, favoreciendo de esta forma la mutagénesis y genotoxicidad, así como alterar el efecto de la terapia farmacológica como la supervivencia (Reyes y col., 2021).

En los últimos 20 años se han estudiado genes de susceptibilidad que sean de baja penetrancia y alta frecuencia, sin embargo, a pesar de haberse reportado una variedad de más de 1000 estudios no se ha llegado a un común acuerdo, se atribuye a la heterogeneidad genética que explica en parte el riesgo variable, sin embargo, no dilucida por completo el fenómeno del cáncer. Se ha informado en un estudio que los genes ATM, CXCR2, CYP1A1, CYP2E1, ERCC1, ERCC2, FGFR4, SOD2, TERT y TP53 tienen una relación significativa con la susceptibilidad al cáncer de pulmón. De igual manera la susceptibilidad a los agentes carcinogénicos se ve afectada por la sensibilidad al mutágeno y sus diferencias particulares (Bade y col., 2020).

Se han relacionado con riesgos de cáncer de pulmón: la presencia de polimorfismos en las enzimas de reparación por escisión de bases (XRCC1 y OGG1), escisión de nucleótidos (ERCC1, XPD y XPA) y de rupturas de doble cadena (XRCC3) y las diferentes vías de reparación de desajustes (Bade y col., 2020).

En los últimos diez años se han ido observando cambios en la epidemiología y la prevención del cáncer de pulmón, esto debido a distintos patrones de tabaquismo, al nuevo conocimiento en la genética del cáncer de pulmón, a la influencia del sistema inmunológico y al descubrimiento de una amplia variedad de nuevos medicamentos antineoplásicos (Bade y col., 2020).

De acuerdo con los datos del *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) en el 2020 a nivel mundial se registraron 2,206,771 de casos nuevos de cáncer de pulmón en hombres de todas las edades, los cuales representan el 11.4 %. En el caso de las mujeres de todas las edades se registraron 770,828 nuevos casos representando el 8.4 %. El cáncer de pulmón se encuentra en primer lugar como los cánceres más frecuentes en hombres, el tercer lugar para las mujeres y el segundo lugar para ambos sexos. El cáncer de pulmón se encuentra posicionado como el primer tipo de cáncer con más alta tasa de mortalidad, tan solo en el 2020 se registraron 1,796,144 muertes (18 % de las muertes por cáncer) (Sung y col., 2021).

El cáncer pulmón y sus subtipos comprenden diferentes modificaciones genéticas, características morfológicas, diagnósticos, tratamientos y transcriptómicas (Ruiz-Cordero y Devine, 2020).

La detección temprana del cáncer de pulmón es complicada, en sus fases tempranas es de vital importancia para los pacientes que sean candidatos a una cirugía, para mejorar el pronóstico de supervivencia. Los métodos de diagnóstico principalmente utilizados son la radiografía de tórax, tomografías computarizadas y exámenes de sangre utilizando marcadores tumorales (Houston, 2020). La presencia y progresión del cáncer se pueden determinar con niveles elevados de marcadores tumorales, los cuales pueden ser altamente específicos a ciertos tipos de cáncer. Por lo tanto, los marcadores tumorales son de gran importancia al momento de la caracterización del cáncer, cuya finalidad es ser aplicable al diagnóstico, detección y pronóstico. Los marcadores comúnmente utilizados son la enolasa específica de neuronas (NSE), el fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA 21-1), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de carcinoma de células escamosas (SCCA), antígeno de carcinoma 125

(CA125) y antígeno de polipéptido tisular (TPA), se han transformado en parte del control clínico en la terapéutica del cáncer de pulmón (Yang y col., 2019).

Los tratamientos clínicos actuales para el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) incluyen la cirugía para los candidatos, radioterapia y quimioterapia o terapia dirigida como el cisplatino, etopósido, irinotecan y basados en platino según sea el caso que lo requiera, y para el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) radioterapia, ablación con radiofrecuencia, crioablación, terapia dirigida y quimioterapia principalmente con durvalumab, pembrolizumab, carboplatino, placlitaxel y basados en platino (Wang y col., 2022). El descubrimiento constante de las características moleculares del cáncer de pulmón ha expandido la comprensión de su origen y sus interacciones celulares específicas de cada subtipo. Estos cambios genéticos proporcionan las posibles dianas terapéuticas, para las cuales cada vez se desarrollan medicamentos más eficaces (Ruiz-Cordero, 2020).

1.3 Células neuroendócrinas

Se le conoce al tipo de células epiteliales que revisten las vías respiratorias grandes y pequeñas como células neuroendócrinas pulmonares que forman conjuntos pequeños que representan el 0.4 % de todas las células epiteliales en las vías respiratorias (Noguchi y col., 2020).

Estas células neuroendócrinas se pueden encontrar distribuidas como poblaciones agrupadas denominadas cuerpos neuroepiteliales (CNE) asociadas a las fibras nerviosas intraepiteliales cuya función fisiológica es ser elemento sensitivo del pulmón o también se pueden encontrar solas en las vías respiratorias. Una característica especial de este tipo de células es que tienen comportamiento de células madre, lo que les confiere la capacidad de ser parte de la respuesta regenerativa al daño severo de las vías respiratorias (Noguchi y col., 2020).

Los cuerpos neuroepiteliales tienen la capacidad de comunicarse con el sistema nervioso, inmunológico y percibir sus entornos. Cuando se producen lesiones físicas, químicas o infecciones, se activa este sistema de respaldo característico del epitelio en las vías respiratorias, con el fin de contrarrestar y reparar el daño causado. Por

tales razones tanto las CNE como las células neuroendócrinas pulmonares son de vital importancia en el sistema respiratorio y su interacción con el medio externo (Noguchi y col., 2020).

Un tumor neuroendócrino puede provenir de las células neuroendócrinas, dando como consecuencia cánceres neuroendócrinos que son poco comunes en la clínica y son considerados como genéticamente heterogéneos (Webster y Thirlwell, 2021). Se pueden originar como se mencionó en células del sistema endocrino difuso que se encuentran extensamente distribuidas en el cuerpo. La transformación de células normales a células cancerosas neuroendócrinas, tiene diferentes grados de malignidad que van desde los de menor grado de malignidad, con baja capacidad proliferativa hasta los más agresivos con una rápida proliferación celular (Peri y Fazio, 2020).

Los tumores neuroendócrinos pulmonares considerados de bajo grado e intermedio son los carcinoides típicos, atípicos y carcinomas completos, los de mayor grado son el carcinoma neuroendócrino de células grandes y el carcinoma de células pequeñas (Peri y Fazio, 2020; Metovic y col., 2021).

La importancia clínica de estos tumores viene dada por la falta de métodos diagnósticos que diferencien los de bajo grado de los de alto grado, esto tendría un impacto directo en la terapéutica haciéndola más especializada, según el tipo de tumor neuroendócrino pulmonar, incluso para los de alto grado daría una perspectiva diferente en las alternativas terapéuticas (Borczuk, 2020).

El fenotipo neuroendócrino en células de cáncer de pulmón se puede obtener mediante una transdiferenciación celular. La transdiferenciación es un tipo de reprogramación celular, a través del cual una célula diferenciada es capaz de convertirse a otra, mediante el uso de factores de transcripción específicos de linaje, moléculas pequeñas, miARN e incluso con una reprogramación mediada por exosomas, dejando completamente a un lado el concepto de la irreversibilidad en diferenciación celular demostrando la capacidad plástica de la célula, hacia una dirección específica. Este fenotipo es capaz de secretar hormonas y factores que

pueden tener un impacto directo o indirecto sobre la proliferación de las células cancerosas. Uno de los genes potenciadores de cáncer es el gen PRDM14 el cual tiene una baja expresión en un tejido sano, sin embargo, en ciertos tipos de cánceres sólidos se presenta como potenciador cancerígeno (Anam y col., 2021).

1.4 PRDM14

Las proteínas de dedos de zinc del dominio PR (PRDM) regulan la diferenciación celular principalmente las células madre embrionarias (He y col., 2021). El PRDM14 tiene baja expresión en tejidos humanos, mientras que se ha encontrado en varios estudios que PRDM14 al ser un regulador transcripcional, se presenta en varios tipos de cánceres sólidos en donde puede actuar como un potenciador de procesos cancerosos (Ou y col., 2018).

El PRDM14 es de gran relevancia para el proceso de desarrollo temprano de los mamíferos, tiene la capacidad de regular la pluripotencia y proporcionar células germinales primordiales (PGC) por medio de cambios epigenéticos, entre los cuales se encuentra la desmetilación del ADN, inhibición de genes de diferenciación, activación de genes potenciadores y el establecimiento de marcas de cromatina bivalente en los promotores, por lo que la expresión errónea, podría llevar al desarrollo de cáncer, promoviendo la pluripotencia de células somáticas, autorrenovación y la reprogramación epigenética (Tracey y Justice, 2019).

De manera especial los tumores que expresan PRDM14 tienen la particularidad de inestabilidad genómica, un alto grado de aneuploidía, con deleciones y duplicaciones recurrentes en un modelo de ratón y que son consistentes con un error en la reparación de DSB (double-strand break), que coincide con las encontradas en la leucemia linfoblástica de células T (Tracey y Justice, 2019).

La regulación del gen PRDM14 sugiere un posible blanco farmacológico a las células cancerosas y como posible biomarcador de progresión del cáncer (Ou y col., 2018).

2. HIPÓTESIS

El gen PRDM14 se encuentra expresado en la línea celular A549 fenotipo neuroendócrino.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Establecer que la línea celular A549 fenotipo neuroendócrino expresa el gen PRDM14.

3.2 Específicos

- Transdiferenciar las células de cáncer de pulmón A549 al fenotipo neuroendócrino.
- Demostrar una exitosa transdiferenciación de las células A549 al identificar el marcador neuroendócrino sinaptofisina mediante la técnica de RT-PCR.
- Analizar la expresión del gen PRDM14 y realizar la comparación con la expresión en células de cáncer de pulmón A549 y con las células de cáncer de pulmón con fenotipo neuroendócrino.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales y células

Se empleó la línea celular A549 de adenocarcinoma de pulmón humano de ATCC (CCL-185).

Se utilizaron los siguientes reactivos: suero fetal bovino (FBS) (Pambiotech) al 10 %, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina, DMEM (GIBCO, ref: 11995-065 500 mL), tripsina (Sigma, ref: T4049-500 mL), 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (Sigma, cat: 15879-100MG), forskolina (MedChemExpress, cat: HY-15371), ARN Direct-zol (Zymo research, cat. R2050), TRI Reagent (ZymoResearch, cat: R2050-1-50), RevertAid first strand cDNA (Thermo Fisher Scientific, ref: K1622), GoTaq Green Master Mix (Promega, cat: M7122), agarosa (Sigma, ref: A9539-100G), tampón TAE 50X (Invitrogen, cat: 24710-030), EZ Load Precision Molecular Mass Ruler (#1708356), azul de tripano (Sigma, cat: T6146-25G). Los primers para PRDM14 y marcadores neuroendócrinos se obtuvieron de Invitrogen.

4.2 Métodos

4.2.1 Mantenimiento y cultivo celular

Se utilizó la línea celular A549, las células se mantuvieron en el medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina a 37 °C con CO₂ al 5 % en una incubadora de células con una atmósfera humidificada (Mendieta y col., 2018).

4.2.2 Viabilidad celular

Se preparó una suspensión celular tripsinizando (2 mL de tripsina) y neutralizando 1:1 con medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Se tomaron 100 µL de la suspensión celular y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 2 mL, se tomó un volumen 1:1 de solución azul de tripano al 0.4 % (p/v) y se añadió al tubo, se mezcló bien y se dejó reposar de 5-15 minutos. En seguida se transfirieron 10 µL de mezcla de suspensión

de células-azul de tripano a ambas cámaras del hemocitómetro. Comenzando con la cámara 1, se contaron todas las células en el cuadrado central de 1 mm y cuatro cuadrados de esquina de 1 mm, se repitió el procedimiento para la cámara 2, se realizó el conteo 3 veces (ATCC, 2022).

4.2.3 Transdiferenciación al fenotipo neuroendócrino

Se cultivaron 3 muestras a una densidad de 2×10^5 células/mL por pocillo de la línea celular A549 en placas de 12 pocillos en el medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomina por un periodo de 24 horas a 37 °C con CO₂ al 5 %, posterior al tiempo de incubación los pocillos se lavaron con 300 μ L de PBS y en seguida fueron tratados con 0.5 mM isobutil- metil-xantina (0.5 mM IBMX), 0.5 mM de forskolina (0.5 mM FSK) e IBMX con FSK en medio fresco durante 72 horas. Se evaluó la proliferación y la morfología de las células por medio de la microscopía óptica. Posterior a la transdiferenciación las células se utilizaron para metodologías analíticas adicionales (Mendieta y col., 2018).

4.2.4 Extracción de ARN

4.2.4.1 Preparación del tampón

Se adicionaron 10 mL de etanol (95-100 %) a los 40 mL de concentrado prelavado de ARN Direct-zol, posteriormente se agregaron 48 mL de etanol al 100 % (52 mL de etanol al 95 %) a los 12 mL de concentrado de tampón de lavado de ARN. Finalmente, se reconstituyó la DNAsa I liofilizada con agua libre de DNAsa/RNAsa, se mezcló por inversión suave y se guardaron alícuotas congeladas, se agregaron 275 μ L de agua #E1011-A (1500 U).

4.2.4.2 Preparación de muestras

Se agregaron 3 volúmenes de TRI Reagent a 1 volumen de suspensión de células, se centrifugó a 12,000 rpm por 1 minuto y se transfirió el sobrenadante a un tubo libre de nucleasas (Zymo Research, 2021).

4.2.4.3 Purificación de ARN

Se agregó un volumen igual de etanol (95-100 %) a una muestra lisada en TRI Reagent y se mezcló, posteriormente se transfirió la mezcla a una columna Zymo-Spin III CG en un tubo de recolección y se centrifugó a 12,000 rpm por 1 minuto. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de recolección y se desechó el flujo continuo (Zymo Research, 2021).

Se realizó un tratamiento con DNAsa I de la siguiente forma:

- (D1) Se agregaron 400 μL de tampón de lavado de ARN a la columna y se centrifugó.
- (D2) En un tubo sin RNAsa, se agregaron 5 μL de DNAsa I (6 U/ μL), 75 μL de tampón de digestión de ADN y se mezcló por inversión suave. Se agregó la mezcla directamente a la matriz de la columna.
- (D3) Se incubó a temperatura ambiente (20-30 °C) durante 15 minutos.

En seguida se agregaron 400 μL de Direct-zol RNA PreWash a la columna y se centrifugó a 12,000 rpm por 1 minuto. Se desechó el RNA PreWash que se encontraba en el tubo colector y se repitió este paso, a continuación, se agregaron 700 μL de tampón de lavado de ARN a la columna y se centrifugó durante 1 minuto y finalmente se transfirió la columna con cuidado a un tubo sin RNAsa (Zymo Research, 2021).

Para eluir el ARN, se agregaron 50 μL de agua libre de DNAsa/RNAsa directamente a la matriz de la columna y se centrifugó. Alternativamente, para el uso de ARN altamente concentrado $\geq 25 \mu\text{L}$ de elución. El ARN eluido se almacenó congelado hasta su uso (Zymo Research, 2021).

4.2.5 Síntesis de ADNc

Se descongeló, mezcló y centrifugó todos los componentes del kit RevertAid first strand ADNc, posteriormente se conservaron en hielo. Se agregaron a un tubo estéril libre de nucleasas en hielo 1 μg de ARN total, después 1 μL del Oligo (dT)18 primer y al final de agua libre de nucleasas hasta un volumen de 12 μL , se dejó incubar por

5 minutos a una temperatura de 65 °C y en seguida se colocó en hielo durante 1 minuto. A continuación, se agregaron 4 µL de 5X buffer de reacción, después 1 µL de RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL), 2 µL de dNTP Mix (10 mM) y finalmente se adicionaron 1 µL del RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL). Se mezclaron y centrifugaron suavemente por un corto periodo de tiempo, después se incubaron durante 60 min a 42 °C y se terminó la reacción calentando a 70 °C durante 5 min (Thermo Scientific, 2013).

4.2.6 RT-PCR

Para la RT-PCR se descongeló la mezcla GoTaq Green Master Mix a temperatura ambiente, se agitó en vórtex el Master Mix, luego se puso brevemente en una microcentrífuga para recoger el material del fondo del tubo, después se preparó en hielo la mezcla de reacción con 12.5 µL de GoTaq Green Master Mix (2X), 0.25-2.5 µL primer forward (10 µM), 0.25-2.5 µL primer reverse (10 µM), 1-5 µL de ADN molde y finalmente de agua libre de nucleasas hasta un volumen de 25 µL. Se colocaron las reacciones en un termociclador precalentado a 95 °C y se realizó la PCR a 60°C y a 35 ciclos (Promega, 2021).

Cuadro 1. Primers para la RT-PCR

	Primer forward	Primer reverse
Secuencia gen PRDM14	TGGAGACAGACCATAACCAG TGT	TGATGTGTGTGCGGAGTAT G
Secuencia GAPDH	CCACTCCTCCACCTTTGAC	TCCTCTTGTGCTGCTCTTGC TGG
Secuencia Sinaptofisina	AGACAGGGAACACATGCAA G	TCTCCTTAAACACGAACCAC AG

(Na y col., 2021; Rodríguez, 2022).

4.2.7 Electroforesis gel agarosa

Los productos de la RT-PCR se analizaron con una electroforesis en gel de agarosa. Se preparó una solución al 2 % de agarosa disuelta en tampón TAE 1X en calentamiento y bajo agitación vigorosa, a continuación, se dejó enfriar la disolución

de agarosa hasta llegar a una temperatura entre los 50-60 °C. Después del enfriamiento se preparó la bandeja del gel-agarosa y se esperó a solidificar a temperatura ambiente para poner el peine, posteriormente se llenó la cámara de electroforesis con el tampón de electroforesis 1X hasta cubrir el gel.

Se prepararon las muestras de ADN amplificado (10 µL) y el marcador EZ Load Precision Molecular Mass Ruler, a continuación, se cargaron las muestras en los pocillos, se conectó el tanque y se aplicó un voltaje de 80 V hasta un periodo de tiempo de 40 minutos. Al finalizar la electroforesis se reveló el gel en el fotodocumentador ChemiDoc XRS+ de Bio-Rad (Merck, 2022).

4.2.8 Análisis estadístico

Los datos se presentaron como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó con la paquetería GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.). Se realizó una prueba de los múltiples grupos mediante una ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Los experimentos con células se realizaron por triplicado. Se consideró que $P < 0.05$ indicaba una diferencia estadísticamente significativa.

4.3 Manejo de desechos

Los residuos peligrosos de tipo químicos siguieron el siguiente procedimiento de manejo:

1. Se identificó la peligrosidad de la sustancia: Se revisó previamente la ficha de seguridad de cada sustancia empleada.
2. Envasar y etiquetar. Los envases deben ser específicos para contener sustancias químicas, por lo que se usó polipropileno de alta densidad, vidrio ámbar y acero inoxidable en caso de ser necesario, de igual manera se usaron las etiquetas del sistema GHS. Los restos de las sustancias en estado sólido, papel o sanitas que se hayan contaminado con RP, fueron dispuestos en bolsa gris o naranja de polipropileno de alta densidad.

3. Almacenar temporalmente: Se almacenaron en un cuarto dentro del edificio de posgrado para ciencias químico biológicas.
4. Disposición final (Trirsa S.A. de C.V. o la empresa registrada en el sistema de proveedores de la UAQ).

5. RESULTADOS

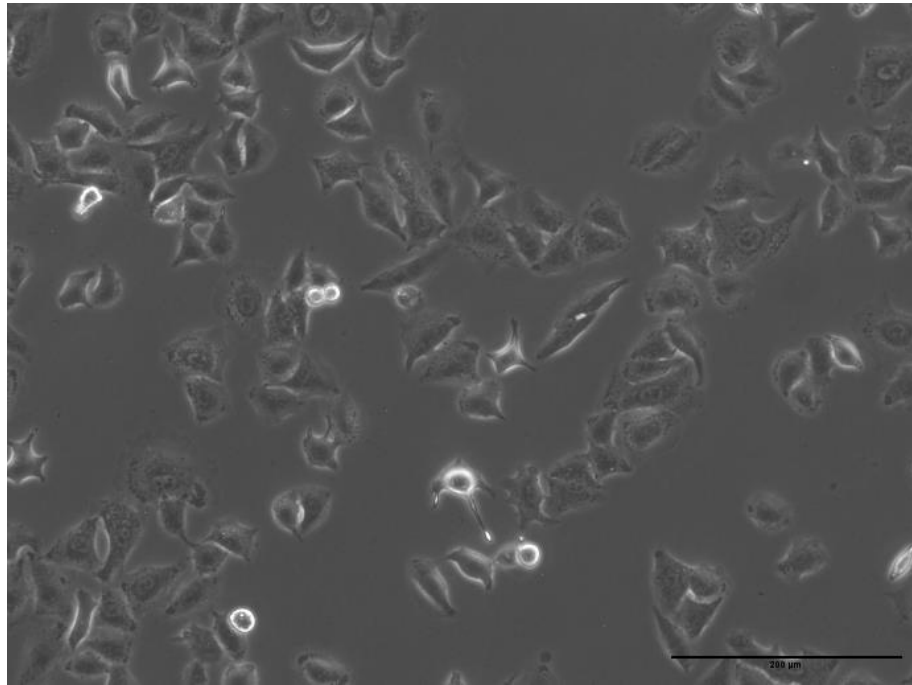


Figura 1. Grupo control día 1 del tratamiento. El grupo control corresponde a células A549 a las 24 h sin tratamiento, la figura muestra una micrografía representativa de tres experimentos diferentes. La barra en la micrografía corresponde a 200 μm .

La morfología de las células A549 fue monitoreada después ser tratadas con fármacos que incrementan el cAMP por microscopía óptica. En la Figura 1 se observan las células A549 sin tratamiento a las 24 horas de la siembra con una morfología regular poligonal. Las células se mantuvieron en medio de crecimiento DMEM sin suero fetal bovino.

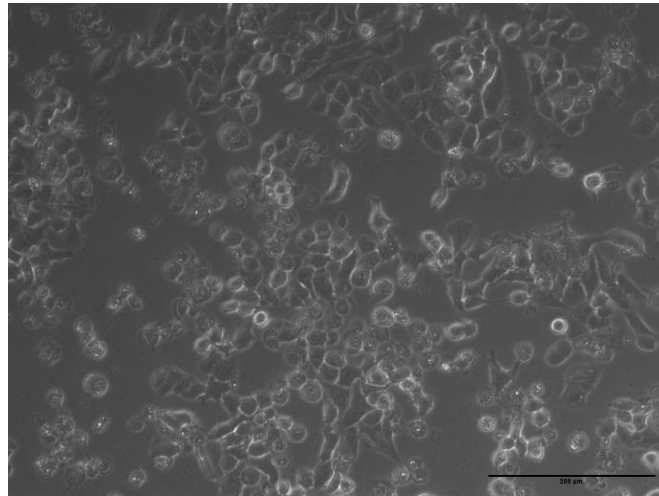


Figura 2. Grupo control día 4 del tratamiento. El grupo control corresponde a células A549 a las 96 h sin tratamiento, la figura muestra una micrografía representativa de tres experimentos diferentes. La barra en la micrografía corresponde a 200 μm .

En la Figura 2 se muestran las células A549 sin tratamiento a las 96 horas de tratamiento. Las células se mantuvieron en medio de crecimiento DMEM sin suero fetal bovino. Se redondearon y se desprendieron de la monocapa, se observaron más pequeñas y oscuras (no refringentes), características propias de las células muertas, hay una menor confluencia de células vivas a la inicial.

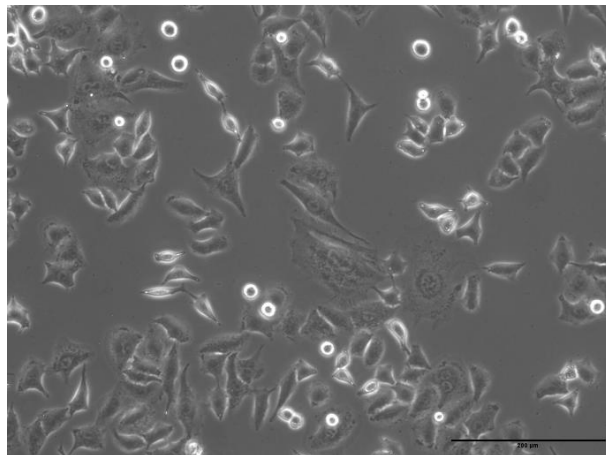


Figura 3. Grupo tratado con IBMX día 1 del tratamiento. Tratamiento con IBMX (0.5 mM) a las 24 horas de tratamiento, la figura muestra una micrografía representativa de tres experimentos diferentes. La barra en la micrografía corresponde a 200 μm .

En la Figura 3 las células A549 se trataron por 24 h con IBMX (0.5 mM), se observaron las pocas células que comenzaron a generar proyecciones tipo neurita modificando su forma regular poligonal. Las células se mantuvieron en medio de crecimiento DMEM sin suero fetal bovino.

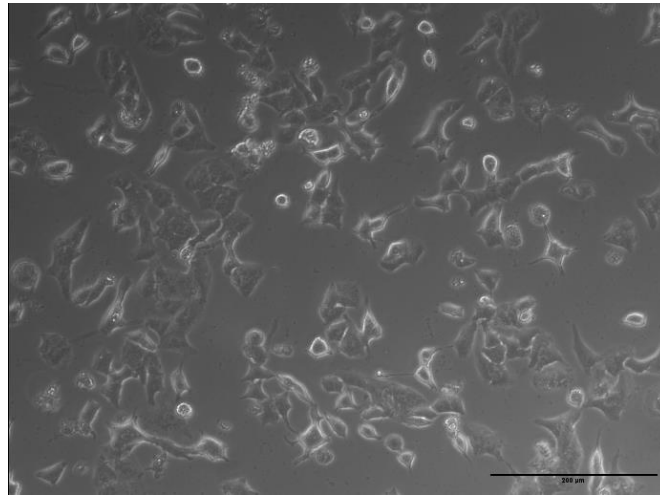


Figura 4. Grupo tratado con IBMX día 4 del tratamiento. Tratamiento con IBMX (0.5 mM) a las 96 horas de tratamiento, la figura muestra una micrografía representativa de tres experimentos diferentes. La barra en la micrografía corresponde a 200 μ m.

En la Figura 4 se muestran a las células A549 a las 96 h de tratamiento con IBMX (0.5 mM), se observaron en su mayoría células con la morfología del fenotipo neuroendócrino, proyecciones típicas tipo neurita modificando su forma regular poligonal, redondeo y aumento del cuerpo celular, así como un decrecimiento en la población de células vivas. Las células se mantuvieron en medio de crecimiento DMEM sin suero fetal bovino con un cambio de medio a las 48 horas.

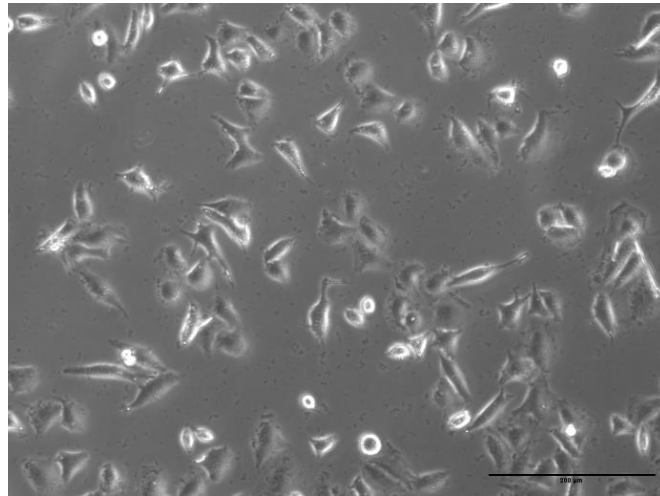


Figura 5. Grupo tratado con FSK día 1 de tratamiento. Tratamiento con FSK (0.5 mM) a las 24 horas de tratamiento, la figura muestra una micrografía representativa de tres experimentos diferentes. La barra en la micrografía corresponde a 200 μ m.

En la Figura 5 se observan a las células A549 a las 24 h de tratamiento con FSK (0.5 mM), se muestran a las pocas células que comenzaron a generar proyecciones tipo neurita modificando su forma regular poligonal, redondeo y aumento del cuerpo celular. Las células se mantuvieron en medio de crecimiento DMEM sin suero fetal bovino.

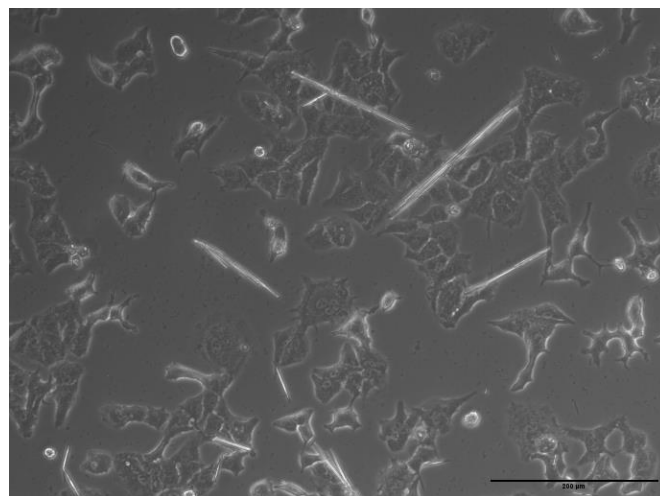


Figura 6. Grupo tratado con FSK día 4 del tratamiento. Tratamiento con FSK (0.5 mM) a las 96 horas de tratamiento, la figura muestra una micrografía representativa de tres experimentos diferentes. La barra en la micrografía corresponde a 200 μ m.

En la Figura 6 las células A549 a las 96 h de tratamiento con FSK (0.5 mM), se observaron en su mayoría células con la morfología del fenotipo neuroendócrino, proyecciones típicas tipo neurita modificando su forma regular poligonal, redondeo y aumento del cuerpo celular, así como un decrecimiento en la población de células vivas, se muestran cristales típicos causados por la FSK a la concentración de 0.5 mM. Las células se mantuvieron en medio de crecimiento DMEM sin suero fetal bovino con un cambio de medio a las 48 horas.

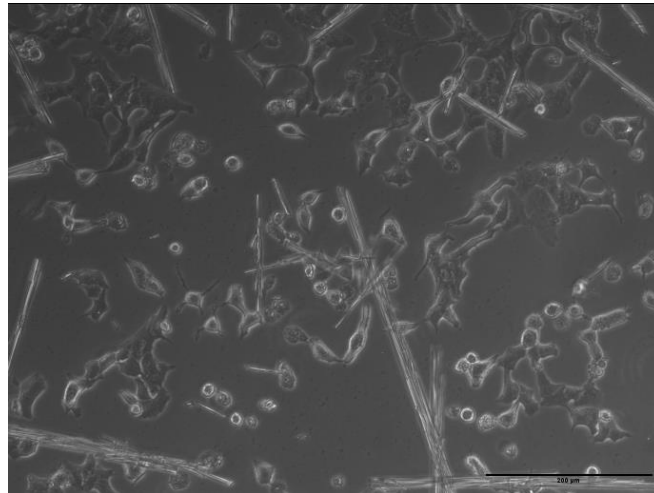


Figura 7. Grupo tratado con FSK e IBMX día 1 del tratamiento. Tratamiento con FSK e IBMX (0.5 mM) a las 24 horas de tratamiento, la figura muestra una micrografía representativa de tres experimentos diferentes. La barra en la micrografía corresponde a 200 μm .

En la Figura 7 se muestran las células A549 a las 24 h de tratamiento con FSK e IBMX (0.5 mM), se observaron en su mayoría células con la morfología del fenotipo neuroendócrino, proyecciones típicas tipo neurita modificando su forma regular poligonal, redondeo y aumento del cuerpo celular y una confluencia aproximada del 60%. Las células se mantuvieron en medio de crecimiento DMEM sin suero fetal bovino.

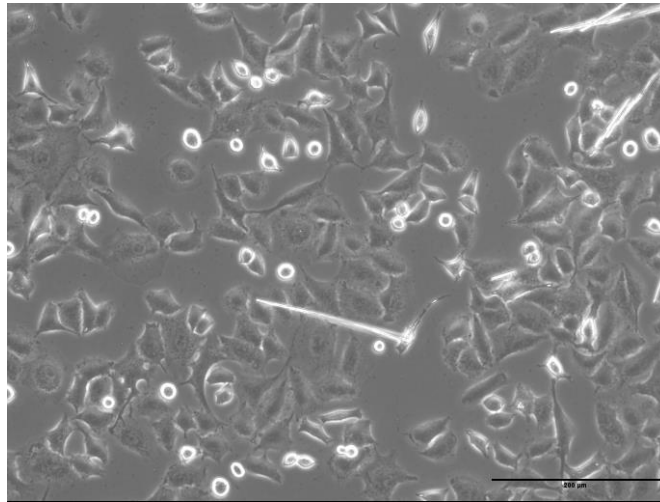


Figura 8. Grupo tratado con FSK e IBMX día 4 del tratamiento. Tratamiento con FSK e IBMX (0.5 mM) a las 96 horas de tratamiento, la figura muestra una micrografía representativa de tres experimentos diferentes. La barra en la micrografía corresponde a 200 μm .

En la Figura 8 se muestran las células A549 a las 96 h de tratamiento con FSK e IBMX (0.5 mM), se observaron en su mayoría células muertas y una menor población de ellas con la morfología del fenotipo neuroendócrino, proyecciones típicas tipo neurita, redondeo y aumento del cuerpo celular. Se observaron cristales típicos causados por la FSK a la concentración de 0.5 mM. Las células se mantuvieron en medio de crecimiento DMEM sin suero fetal bovino con un cambio de medio a las 48 horas.

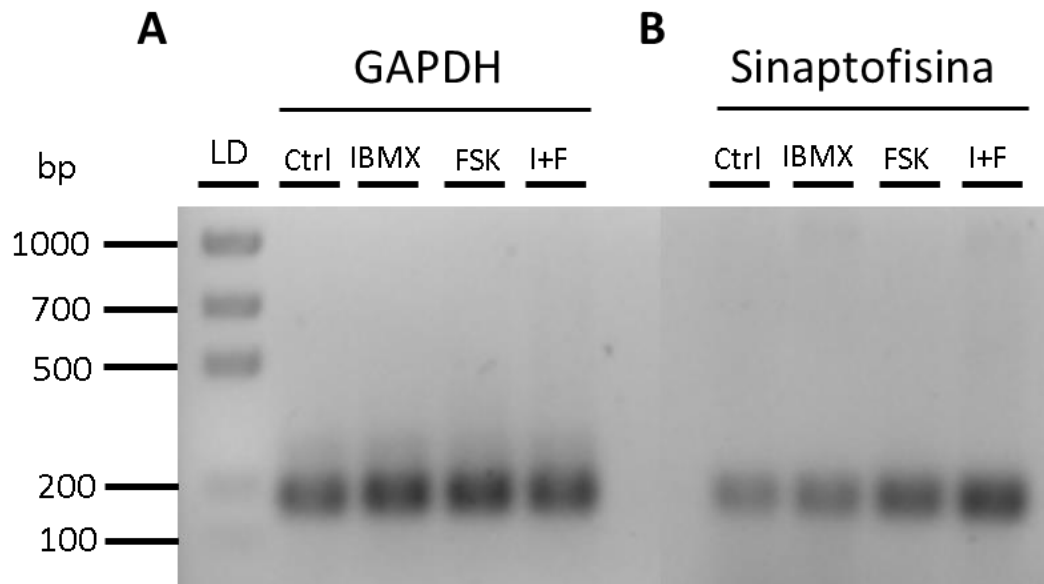


Figura 9. Verificación de la expresión del gen de referencia GAPDH y el marcador neuroendócrino SYP. Células A549 tratadas con IBMX (0.5 mM), FSK (0.5 mM) e I+F (0.5 mM) por 96 h.

En la Figura 9 A) el amplicón del gen de referencia GAPDH y B) el marcador neuroendócrino SYP se basó en RT-PCR del ADNc de las células A549 tratadas por 96 h con IBMX (0.5 mM), FSK (0.5 mM) o I+F (0.5 mM) con un cambio de medio a las 48 h. La amplificación se realizó a 60 °C por 30 ciclos y se reveló en un gel de agarosa al 2 %. Se observaron bandas de 122 pb para GAPDH y de 123 pb para SYP.

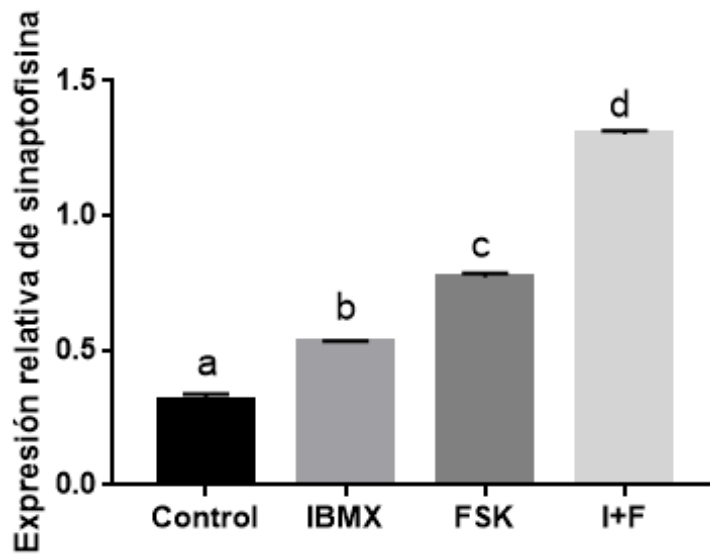


Figura 10. Expresión del marcador neuroendócrino en las células A549: sinaptofisina (SYP). Células A549 tratadas con IBMX (0.5 mM), FSK (0.5 mM) o I+F(0.5 mM) por 96 h.

En la Figura 10 se observa la cuantificación de las células A549 que fueron tratadas por 96 h con IBMX (0.5 mM), FSK (0.5 mM) o I+F (0.5 mM) con un cambio de medio a las 48 h. El nivel de expresión de SYP se representó como un nivel de expresión relativo frente a la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), n=3 por triplicado. ANOVA de una vía, análisis *post hoc* Tukey (letras distintas $p < 0.05$).

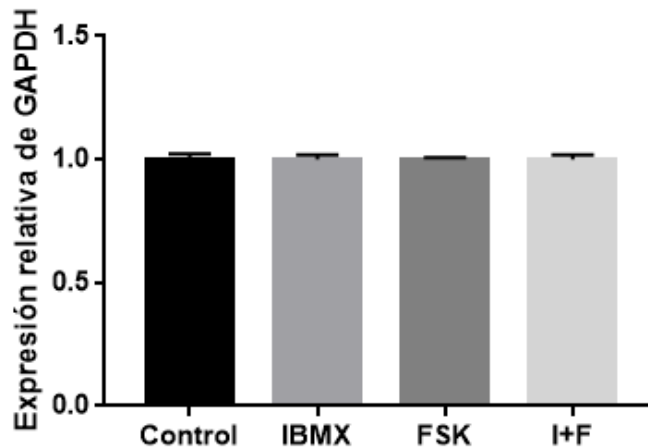


Figura 11. Expresión del gen de referencia: GAPDH en los grupos de tratamiento. Células A549 tratadas con IBMX (0.5 mM), FSK (0.5 mM) o I+F(0.5 mM) por 96 h.

En la Figura 11 se observa la cuantificación de las células A549 que fueron tratadas por 96 h con IBMX (0.5 mM), FSK (0.5 mM) o I+F (0.5Mm) con un cambio de medio a las 48 h. El nivel de expresión de GAPDH se representó como un nivel de expresión relativa al grupo control, n=3 por triplicado. ANOVA de una vía, análisis *post hoc* Tukey.

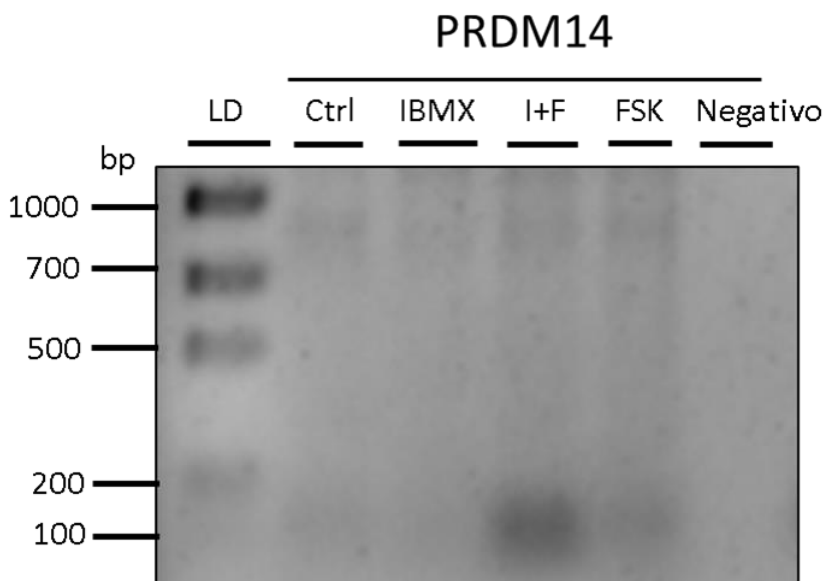


Figura 12. Verificación de la expresión del gen PRDM14 en los grupos de tratamiento. Células A549 tratadas con IBMX (0.5 mM), FSK (0.5 mM) e I+F(0.5 mM) por 96 h.

En la Figura 12 se observa la expresión del gen PRDM14 que se basó en una RT-PCR del ADNc de las células A549 tratadas por 96 h con IBMX (0.5 mM), FSK (0.5 mM) o I+F (0.5 mM) con un cambio de medio a las 48 h. La amplificación se realizó a 60 °C por 35 ciclos y se reveló en un gel de agarosa al 2 %. Se observaron bandas de 129 pb PRDM14.

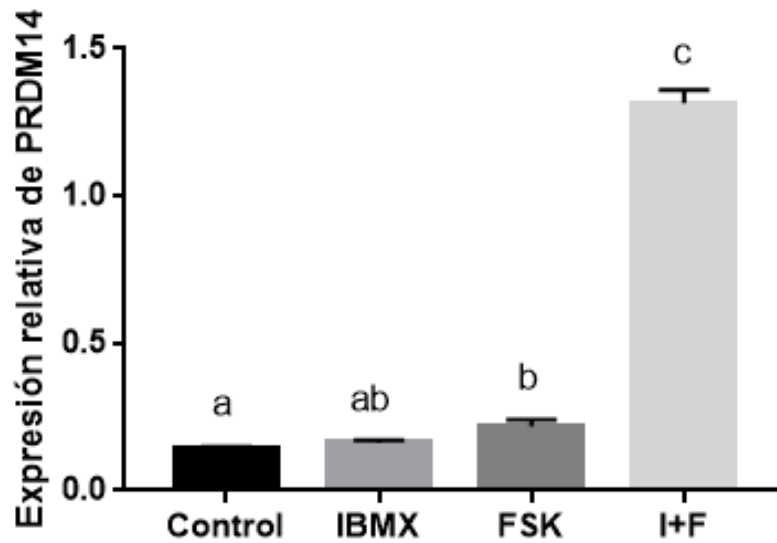


Figura 13. Expresión del gen PRDM14 en células de cáncer de pulmón A549 con fenotipo neuroendócrino. Células A549 tratadas con IBMX (0.5 mM), FSK (0.5 mM) e I+F (0.5 mM) por 96 h.

En la Figura 13 se observa la cuantificación de las células A549 que fueron tratadas por 96 h con IBMX (0.5 mM), FSK (0.5 mM) o I+F (0.5 mM) con un cambio de medio a las 48 h. El nivel de expresión de PRDM14 se representó como un nivel de expresión relativo frente a la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), n=3 por triplicado. ANOVA de una vía, análisis post hoc Tukey (letras distintas $p < 0.05$).

6. DISCUSIÓN

La diferenciación celular se realizó mediante 3 métodos, el primero fue utilizando forskolina (FSK), el segundo fue con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y el tercero fue con la combinación de los dos métodos anteriores (I+F), como se puede observar en la Figura 1 del primer día de tratamiento las células del grupo control (A549) crecieron como una monocapa extendida, con una morfología epitelial regular de aspecto cuboidal y poligonal, mientras que como se muestra en las Figuras 3,5 y 7, las células de los tres grupos de tratamiento en el primer día a pesar de mostrar en su mayoría características regulares, comenzaron su proceso hacia la neurodiferenciación, cambiando su forma poligonal hacia una cuyas aristas se empezaron a extender (Foster y col., 1998). Para el último día de tratamiento las células del grupo control mantuvieron su morfología original, pero con una confluencia de células vivas menor a la inicial (Figura 2). Las células que fueron tratadas con FKS, IBMX e I+F al 4 día de tratamiento se mostraron con un aumento en el tamaño celular y la generación de proyecciones tipo neurita, como se muestra en las Figuras 4, 6 y 8, debido al aumento en la concentración intracelular de cAMP. Los tratamientos con FSK e I+F mostraron mayor cantidad de células con proyecciones en comparación a las observadas en el grupo control y en el tratado con IBMX (Mendieta y col., 2018).

Se ha demostrado que los fármacos FSK (análogo de adenilato ciclasa) e IBMX (inhibidor de la fosfodiesterasa) incrementan la concentración intracelular de cAMP lo que propicia las modificaciones morfológicas neuroendócrinas, esto sucede a partir de dos vías principales: el primero es un mecanismo denominado “clásico” en el cual hay una liberación de PKA, subunidad catalítica y el mecanismo que promueve la activación de las proteínas EPAC, denominado como alternativo (Mendieta y col., 2018).

En el mecanismo clásico se favorece la fosforilación de la serina 133 de CREB al activarse PKA, la fosforilación promueve que se expresen ND1, ASCL1 y TTF1 que son factores de transcripción bHLH, estos inducen la expresión de NCAM1 y SYP.

La sobreexpresión de SYP se ve promovida por la disminución que CREB induce en el factor de transcripción de silenciamiento de RE1 (REST) (Mendieta y col., 2018).

En el mecanismo alternativo el aumento de cAMP intracelular promueve al mismo tiempo la unión de cAMP al factor intercambiador de nucleótidos de guanina (Epac) que esté a su vez activa a la GTPasa específica Rap 1, lo que favorece un cambio conformacional que genera un aumento en el intercambio de la actividad hacia Rap1. La activación del efector B-Raf se favorece por la unión de GTP con Rap1 y activa la vía de las proteínas MAP quinasas, MEK y Erk1/2, con el fin de inducir la transcripción Egr1 y Vilina2, los cuales son genes que promueven el desarrollo de las proyecciones de tipo neurita y el aumento del cuerpo celular (Mendieta y col., 2018).

La diferenciación neuroendócrina *in vivo* tiene la característica de secretar sustancias bioactivas hacia el torrente sanguíneo o por diferentes patrones citológicos, así como la detección inmunohistoquímica de proteínas neurosecretoras características como la sinaptofisina y la cromogranina A. La sinaptofisina es la más importante que tiene como función regular la endocitosis de vesículas sinápticas, esta molécula es un marcador inmunohistoquímico común, con alta sensibilidad y limitada especificidad, principalmente para los tumores de alto grado (Uhlig y col., 2022).

Los cambios morfológicos en los grupos de tratamiento fueron causados por los fármacos FSK e IBMX que propiciaron la diferenciación neuroendócrina, sin embargo, cada grupo de tratamiento mostró un comportamiento diferente, se cuantificó el marcador neuroendócrino sinaptofisina con el fin de rectificar que tales modificaciones morfológicas fueran causadas por la neurodiferenciación. La Figura 9B mostró que los grupos FSK e I+F sobre expresaron a sinaptofisina respecto al control y como se observa en la Figura 10 la expresión del grupo tratado con I+F es significativamente mayor respecto al control en comparación con los otros grupos de tratamiento. El tratamiento combinado género mayores cambios morfológicos que los otros grupos, Mendieta y colaboradores sugieren que se debe a un efecto aditivo favoreciendo un aumento de cAMP intracelular. Por el contrario, el fármaco FSK es más específico puesto que solo activa a la adenilato ciclasa, se cree que el IBMX

propicia la activación de diferentes vías mediante la inhibición de la fosfodiesterasa. La familia de las fosfodiesterasas puede degradar a cAMP y cGMP generando un incremento en la concentración intracelular de estas y la consecuente activación de PKA y PKG (Mendieta y col., 2018).

En una variedad de cánceres, se encuentran un tipo celular denominado células madre cancerosas (CSC) con la facultad de promover y mantener el crecimiento tumoral (Cascales-Angosto, 2009), tienen características similares a las células madre que se encuentran en los tejidos, tales como la autorrenovación y la división celular asimétrica que generan células mayormente diferenciadas y éstas forman en su mayoría el tumor. Las células madre se pueden encontrar en un estado indiferenciado en su entorno hasta que se activan. Las CSC pueden pasar por un cambio morfológico mesenquimatoso a epitelial según su cambio de estado y facilitan un tejido que no está bajo control apropiado (Tracey y Justice, 2019).

Hay tres modelos propuestos que sugieren el origen de las CSC, el primero dice que las células madre residentes reciben señales aberrantes que las hacen perder el contexto con su entorno dando como resultado crecimiento descontrolado, el segundo hace referencia a que por una mala regulación de los oncogenes o de los genes supresores de tumores se pueden secuestrar una vía de las células madre en células progenitoras parcialmente diferenciadas con el fin de que se vea favorecida la autorrenovación y potencia, por último el tercer modelo nos habla de que una inapropiada regulación de oncogenes o supresores de tumores, puede impulsar un proceso de desdiferenciación en las células que ya encuentran totalmente diferenciadas y de tal manera adquirir una capacidad de autorrenovación. Muchas vías moleculares que conceden pluripotencia a las células embrionarias se encuentran también en las CSC y ambas expresan factores de transcripción pioneros como POU5f1, SOX2, PRDM14 y NANOG (Tracey y Justice, 2019).

El PRDM14 juega una función importante en el desarrollo temprano de los mamíferos al regular la pluripotencia y establecer las CGP a través de cambios epigenéticos. Se ha demostrado que la expresión forzada de este gen puede reprogramar células

adultas en células madre pluripotentes. Este gen se encuentra en diferentes complejos de proteínas que pueden reprimir o activar la transcripción en varios tipos de células y diferentes etapas de diferenciación, la principal proteína de interacción de PRDM14 es el factor de unión al núcleo, dominio runt, subunidad alfa 2 translocado a 2 (CBFA2T2) miembro de la familia ETO, el complejo PRDM14/CBFA2T2 reprime a los genes implicados en la diferenciación debido a la activación de POU5F1, SOX2 y NANOG considerados genes de potencia. Este complejo tiene la capacidad de reprimir a la histona metiltransferasa eucromatina EHMT1, que tiene la función de regular el balance entre la metilación y la trimetilación de la histona 3 lisina 9. Hay evidencia que propone que las modificaciones globales de cromatina controlados por este complejo PRDM14/CBFA2T2 regulan el equilibrio entre la especificación del linaje y la autorrenovación de células pluripotentes (Tracey y Justice, 2019).

Es por esta razón que se supone que la expresión errónea de PRDM14 propicia el desarrollo de cáncer al favorecer la reprogramación epigenética, la autorrenovación y la pluripotencia en las células somáticas, así mismo proporciona un modelo de origen y comportamiento de los CSC. Cuando se activa la pluripotencia en las células somáticas esto conduce a aneuploidía y alteraciones en el número de copias cuando se originan las células iPS (células madre pluripotentes inducidas) (Tracey y Justice, 2019).

Los datos y la información reportada respaldan los resultados obtenidos que se muestran en la Figura 12, el gen PRDM14 se encuentra expresado en la células de adenocarcinoma de pulmón A549 y las de fenotipo neuroendócrino, lo que promueve la autorrenovación de CSC, aumentando la población de células progenitoras que son predispuestas a reordenamientos genómicos que favorecen el desarrollo del cáncer, esto puede ocurrir en muchos tipos de células diferentes (Tracey y Justice, 2019).

Como se mencionó anteriormente FSK activa a la adenilato-ciclasa que favorece la elevación intracelular de cAMP para que aguas abajo de la señalización se active

MEK y Erk1/2, Erk2 se une y activa por fosforilación a genes de pluripotencia como el PRDM14. La activación de la señalización de MEK/Erk promueve la diferenciación de ESC y controla la autorrenovación, por su similitud se podría inferir que tiene el mismo efecto en las CSC. Este mecanismo explica que la sobreestimulación de estas vías favorece la sobreexpresión del gen PRDM14 respecto al control en los grupos tratados con FSK e I+F, como se muestra en la Figura 13. En el caso del grupo I+F que mostró una expresión significativamente mayor a los otros se le atribuyó a un efecto aditivo. La expresión errónea del gen PRDM14 condujo al desarrollo inicial del cáncer (Okuzaki y col., 2019; Chen y col., 2015; Mendieta y col., 2018).

Por lo tanto, los resultados sugieren que la expresión del gen PRDM14 en la línea celular A549 fenotipo neuroendócrino puede ser utilizada como herramienta en la detección y diferenciación de los tipos de cánceres neuroendócrinos de alto grado y de bajo grado.

7. CONCLUSIONES

- La línea celular A549 de adenocarcinoma de pulmón se transdiferenció al ser tratada por 96 horas utilizando los fármacos FSK (0.5 mM), IBMX (0.5 mM) y I+F (0.5 mM) cambiando su morfología inicial a una característica del fenotipo neuroendócrino.
- El marcador neuroendocrino sinaptofisina se expresó en las células tratadas con los agentes incrementadores de cAMP FSK e IBMX y se sobreexpresó en el grupo de tratamiento I+F atribuible a un efecto aditivo.
- El gen PRDM14 se sobreexpresó en la línea celular adenocarcinoma de pulmón con fenotipo neuroendócrino, brindando nuevos conocimientos que respalden la utilización de PRDM14 como biomarcador.

8. REFERENCIAS

- Anam** M B, Istiaq A, Kariya R, Kudo M, Ishtiyag Ahmad S A, Ito N, Okada S, y Ohta K. Ribosome induces transdifferentiation of A549 and H-111-TC cancer cell lines. *Biochemistry and Biophysics Reports*. **2021**; 26, 100946.
- Ansari** J, Shackelford R E, y El-Osta H. Epigenetics in non-small cell lung cancer: from basics to therapeutics. *Translational lung cancer research*. **2016**; 5: 155–171.
- ATCC**. Animal Cell Culture Guide. [monografía en internet]. Virginia: ATCC, **2022** [Consultado 2022 Mayo 18].<https://www.atcc.org/resources/culture-guides/animal-cell-culture-guide>
- Bade** B C, De la Cruz C S. Cáncer de pulmón 2020. *Clínicas de medicina torácica*. **2020**; 41: 1–24.
- Borczuk** A C. Pulmonary Neuroendocrine Tumors. *Surgical pathology clinics*. **2020**;13: 35–55.
- Cascales-Angosto** M. Células madre y cáncer. *Anales de la Real Academia de Doctores de España*. **2009**; 13: 61-81.
- Chen** H, Guo R, Zhang Q, Guo H, Yang M, Wu Z, Gao S, Liu L, Chen L. Erk signaling is indispensable for genomic stability and self-renewal of Mouse Embryonic Stem Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2015**; 112: E5936-E5943.
- Civetta** M, Domingo J. Carcinogénesis. *Salud Pública de México*. **2011**; 53: 405-414.
- Corrales** L, Rosell R, Cardona A F, Martín, C., Zatarain-Barrón, Z. L., y Arrieta, O. Lung cancer in never smokers: The role of different risk factors other than tobacco smoking. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. **2020**; 148: 102895.
- Foster** K, Oster C, Mayer M, Avery M, Audus K. Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Experimental Cell Research*. **1998**; 243: 359-366.
- Hayes** C. Cellular immunotherapies for cancer. *Irish Journal of Medical Science*. **2021**; 190: 41–57.
- He** S, Ma X, Zheng N, Wang G, Wang M, Xia W, y Yu D. PRDM14 mediates chemosensitivity and glycolysis in drug-resistant A549/cisplatin cells and their

progenitor A549 human lung adenocarcinoma cells. *Molecular medicine reports*. **2021**; 23: 149.

Houston T. Screening for Lung Cancer. *Medical Clinics of North America*. **2020**; 104:1037–1050.

Huang L L, Hu X S, Wang Y, Li J L, Wang H Y, Liu P, Xu J P, He X H, Hao X Z, Jiang P D, Liu Y T, Luo J, Zhou S Y, Wang J W, Yang J L, Qin Y, Yuan P, Lin L, y Shi Y K. Survival and pretreatment prognostic factors for extensive-stage small cell lung cancer: A comprehensive analysis of 358 patients. *Thoracic Cancer*. **2021**; 12: 1943-1951

INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer [monografía en internet]. México: INEGI, **2021** [consultado 2022 mayo 20]. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2022/dr/dr2021.pdf>

Klaunig J E, Y Wang Z. Oxidative stress in carcinogenesis. *Current Opinion in Toxicology*. **2018**; 7: 116-121.

Ko J, Winslo M M, y Sage J. Mechanisms of small cell lung cancer metastasis. *EMBO Molecular Medicine*. **2020**; 13: e13122

Li Q, Cai S, Li M, Zhou X, Wu G, Kang K, Yuan J, Wang R, Huyan T, y Zhang W. Natural killer cell exhaustion in lung cancer. *International Immunopharmacology*. **2021**; 96, 107764.

Mendieta I, Nuñez-Anita R E, Pérez-Sánchez G, Pavón L, Rodríguez-Cruz A, García-Alcocer G, & Berumen L C. Efecto de la diferenciación neuroendocrina A549 sobre la respuesta inmune citotóxica. *Conexiones endocrinas*. **2018**; 7: 791–802.

Merck. Nucleic Acid Electrophoresis Protocols & Introduction. [monografía en internet].Alemania: Merck KGaA, **2022** [Consultado 2022 Mayo 18]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/genomics/nucleic-acid-gel-electrophoresis/nucleic-acid-electrophoresis#Agarose-gel-electrophoresis-for-DNA>

Metovic J, Barella M, Bianchi F, Hofman P, Hofman V, Rimmelink M, Kern I, Carvalho L, Pattini L, Sonzogni A, Veronesi G, Harari S, Forest F, Papotti M y Pelosi G. Clasificación morfológica y molecular de las neoplasias neuroendocrinas de pulmón. *Virchows Archiv: una revista internacional de patología*. **2021**; 478: 5-19.

Na X Y, Hu X Q, Zhao Y, Hu C H, & Shang X S. LncRNA DNAJC3-AS1 functions as oncogene in renal cell carcinoma via regulation of the miR-27a-3p/PRDM14 axis. *European review for medical and pharmacological sciences.* **2021**; 25:1291–1301.

Noguchi M, Furukawa K T, y Morimoto M. Pulmonary neuroendocrine cells: physiology, tissue homeostasis and disease. *Disease Models & Mechanisms.* **2020**; 13: dmm046920.

Okuzaki Y, Kaneoka H, Suzuki T, Hagihara Y, Nakayama Y, Murakami S, Murase Y, Kuroiwa A, Iijima S, Nishijima Ki. PRDM14 and blimp1 control the development of chicken primordial germ cells. *Developmental Biology.* **2019**; 455: 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.06.018>

Organización Panamericana de la Salud. Día Mundial contra el Cáncer **2021**. OPS, 2021. <https://www.paho.org/en/enlace/burden-cancer>

Ou M, Li S, y Tang L. PRDM14: A Potential Target for Cancer Therapy. *Current cancer drug targets.* **2018**; 18: 945–956.

Peri M y Fazio N. Evaluación clínica de everolimus en el tratamiento de tumores neuroendocrinos de pulmón: selección de pacientes y consideraciones especiales. Una revisión sistemática y crítica de la literatura. *Cáncer de pulmón (Auckland, NZ).* **2020**; 11: 41–52.

Promega. GoTaq® Green Master Mix. [monografía en internet]. Wisconsin: Promega Corporation, **2021** [Consultado 2022 Mayo 18]. https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-protocol.pdf?rev=87143910365a492eb4bd0933f903621a&sc_lang=en

Reyes E, Rodeiro I, Herrera J y Cuétara E. Polimorfismos en genes de reparación del daño al material genético y cáncer de pulmón. *Revista Cubana de Medicina Militar.* **2021**; 51: e02201467.

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

Ricardo%20Fosado%20Rodr%c3%adguez%20%20%20%20-A.pdf.

Ruiz-Cordero R, Devine W P. Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy in Lung Cancer. *Surgical pathology clinics*. **2020**; 13: 17–33.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram MD, Jemal A. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA CÁNCER J CLIN*. **2021**; 71: 209–249.

Thermo Scientific. RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit [monografía en internet]. Massachusetts: Thermo Fisher Scientific Inc, 2013 [Consultado 2022 Mayo 18].

https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FMAN0012715_RevertAid_FirstStrand_cDNA_Syn_K1621_UG.pdf

Tracey L J, y Justice M J. Off to a bad start: Cancer initiation by pluripotency regulator PRDM14. *Trends in Genetics*. **2019**; 35: 489–500.

Uhlig R, Dum D, Gorbonkon N, Menz A, Büscheck F, Luebke A, Hube-Magg C, Hinsch A, Höflmayer D, Fraude C, Möller K, Bernreuther C, Lebok P, Weidemann S, Lennartz M, Jacobsen F, Clauditz T, Sauter G, Wilczak W, Steurer S, Minner S. Synaptophysin and chromogranin A expression analysis in human tumors. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **2022**; 555: 111726.

Wang Z, Kim J, Zhang P, Galvan J M, Jiang Y, Rong L. Current therapy and development of therapeutic agents for lung cancer. *Cell Insight*. **2022**; 1:100015.

Webster A P, y Thirlwell C. The evolving molecular landscape of intestinal and pulmonary neuroendocrine tumours. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*. **2021**; 19: 30–34.

Wen J, Fu J, Zhang W y Guo M. Genetic and epigenetic changes in lung carcinoma and their clinical implications. *Modern Pathology*. **2011**; 24: 932–943.

Xie S, Wu Z, Qi Y, Wu B, Zhu X. The metastasizing mechanisms of lung cancer: Recent advances and therapeutic challenges. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **2021**; 138: 111450.

Yang G, Xiao Z, Tang C, Deng Y, Huang H y He Z. Avances recientes en biosensores para la detección de biomarcadores de cáncer de pulmón. *Biosensores y Bioelectrónica*. **2019**; 141: 111416.

Zymoresearch. Direct-zol™ RNA Miniprep Plus [monografía en internet]. California: Zymo Research Corporation, **2021** [Consultado 2022 Mayo 18]. https://files.zymoresearch.com/protocols/_r2070t_r2070_r2071_r2072_r2073_direct-zol_rna_miniprep_plus_kit.pdf