



**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**  
**Instituto de Fisiología**  
**Maestría en Ciencias Fisiológicas**



**Laboratorio de Neuroendocrinología**

***EFFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO TIPO 2 (FGF-2)  
SOBRE LA CAPACIDAD MIFRATORIA DE LA LÍNEA CELULAR A549,  
PROVENIENTE DE CÁNCER DE PULMÓN***

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

PRESENTA

**Biol. Luis Raúl Angulo Cruz**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. EDUARDO MONJARAZ GUZMÁN.**

Junio 2022

PUEBLA, PUE.

# AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado, para la realización del proyecto mediante la beca como alumno de Maestría.

Agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, por el apoyo otorgado, para la realización de este proyecto mediante la beca de conclusión de tesis.

Agradezco al Dr. Monjaraz por su tiempo y paciencia en la dirección de la presente tesis.

Agradezco a mi familia por el apoyo incondicional en cada una de las partes del proceso de tesis y a mis compañeros de laboratorio que me instruyeron en las técnicas apropiadas

# ÍNDICE

---

<b>ABREVIATURAS</b> .....	
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>GENERALIDADES</b> .....	3
<b>CÁNCER DE PULMON</b> .....	3
EPIDEMIOLOGÍA .....	3
FACTORES DE RIESGO .....	6
CLASIFICACIÓN .....	9
<b>METÁSTASIS</b> .....	9
<b>TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA</b> .....	11
<b>FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLASTICO TIPO 2</b> .....	12
ACCION BIOLOGICA.....	12
RECEPTORES .....	13
VIA DE SEÑALIZACIÓN .....	14
<b>ANTECEDENTES</b> .....	16
<b>JUSTIFICACION</b> .....	18
<b>HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>OBJETIVOS</b> .....	19
<b>MÉTODOLOGIA</b> .....	20
CULTIVO DE LA LINEA CELULAR .....	20
ENSAYO DE EXPRESIÓN GÉNICA .....	21
MIGRACIÓN EN CAMARAS TRANSWELL .....	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	25

<b>RESULTADOS</b> .....	27
<b>DISCUSIÓN</b> .....	33
<b>CONCLUSIONES</b> .....	36
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	37

## ABREVIATURAS

---

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
<b>AKT</b>	Proteína cinasa B
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EMT</b>	Transición Epitelio Mesénquima
<b>ERK</b>	Proteína cinasa regulada por señales extracelulares
<b>FGF-2</b>	Factor de crecimiento fibroblástico tipo 2
<b>FGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento fibroblástico
<b>FOXO1</b>	Factor de transcripción <i>forkhead</i>
<b>FRS2<math>\alpha</math></b>	Proteína adaptadora de la vía FGFs
<b>GLOBOCAN</b>	Observatorio mundial del cáncer
<b>Grb2</b>	Proteína adaptadora 2
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógenos
<b>MMP-14</b>	Metaloproteinasa 14
<b>MMP-2</b>	Metaloproteinasa 2
<b>MMP-9</b>	Metaloproteinasa 9
<b>MMPs</b>	Metaloproteinasas
<b>mTOR</b>	Blanco de rapamicina
<b>NSCLC</b>	Carcinoma de pulmón de células no pequeñas
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PBS</b>	Buffer de fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PI3K</b>	Proteína cinasa dependiente de fosfoinositol 3
<b>PIP3</b>	Fosfatidil-inositol 3,4,5 trifosfato
<b>PKC</b>	Proteína cinasa dependiente de calcio
<b>PLC<math>\gamma</math></b>	Fosfolipasa c isoforma gama
<b>RT</b>	Transcripción reversa
<b>SCLC</b>	Carcinoma de pulmón de células pequeñas
<b>SH2</b>	Src-homóloga 2
<b>SNAI1</b>	Factor de transcripción de dedos de zinc
<b>STAT 1-3</b>	Transductor de Señal y Activador de Transcripción
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Actina alfa de músculo liso

## RESUMEN

El cáncer de pulmón es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, ya que representa ser la primera causa de muerte por cáncer en la población adulta. En México, durante el año 2020, se reportaron 7,588 nuevos casos de cáncer de pulmón y 7,100 muertes por complicaciones de la enfermedad, convirtiéndose en la tercera causa de muerte por cáncer a nivel nacional, por debajo del cáncer de mama y cáncer de próstata. El cáncer de pulmón se clasifica en dos tipos: a) carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y, b) carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC). El NSCLC representa el 75% del total de casos de cáncer de pulmón.

La principal causa de muerte por cáncer es la metástasis, iniciada por la transformación fenotípica que sufren las células tumorales, pasando de un fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal, proceso conocido como transición epitelio-meséquima (EMT), transición que estimula su capacidad migratoria y por ende su capacidad metastásica. Diversas evidencias muestran que la presencia de factores de crecimiento en el microambiente tumoral, inducen la EMT, destacando la participación del Factor de Crecimiento Fibroblástico tipo 2 (FGF-2) en diferentes tipos de cáncer, como el de mama, ovario, próstata, entre otros.

Las células tumorales provenientes de cáncer de pulmón, sobre-expresan FGF-2, así como su receptor específico, FGFR1, sin conocerse a detalle su participación en la EMT. Por lo que el propósito del presente trabajo, es investigar el efecto que ejerce FGF-2 sobre la capacidad migratoria, como reflejo de la EMT, en las células tumorales de pulmón A549, las cuales son un modelo experimental de carcinoma de células no pequeñas.

Ensayos de migración en cámara transwell, muestran que la presencia crónica de FGF-2 exagera la capacidad migratoria de las células A549, y que este efecto se ve acompañado por cambios en los niveles de expresión del ARNm que codifica

para  $\alpha$ -SMA y MMP-2, los cuales son considerados marcadores moleculares de la EMT.

Los resultados iniciales que obtuvimos, muestran la participación del FGF-2 sobre la capacidad metastásicas de las células A549. Esto pudiera en un futuro, proponer al receptor de FGF-2 (FGFR1), como un blanco farmacológico para inhibir la metástasis de cáncer de pulmón.

## **INTRODUCCION**

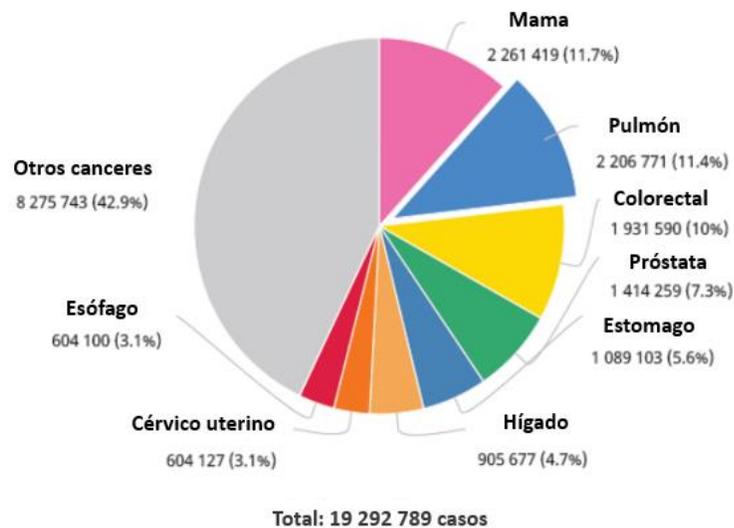
El cáncer es una enfermedad tan antigua como el mismo hombre, y que le ha acompañado muy probablemente desde su aparición, hace aproximadamente 4 millones de años (Salazar & Sánchez, 2014). El cáncer se define como una enfermedad provocada por un grupo de células atípicas o transformadas, que se multiplican sin control y de manera autónoma, cuyo crecimiento puede invadir de manera local o a distancia, otros tejidos y órganos. El origen del cáncer se debe al desajuste en la homeostasis de diversos procesos celulares, tales como supervivencia, crecimiento, proliferación y reparación celular, todo esto, debido a alteraciones en el genoma, provocados por factores físicos y químicos (Pelengaris & Khan, 2013). A diferencia de las células normales, las células tumorales autogeneran señales inductoras de crecimiento y suprimen la expresión de señales inductoras de muerte, entre otras señales (Hejmadi, 2010; Hanahan & Weinberg, 2000).

## **EPIDEMIOLOGIA**

El cáncer se ha convertido en la segunda causa de muerte a nivel mundial, solo por debajo de las enfermedades cardiovasculares, representando 9,9 millones de defunciones en el año 2020 (Sung et al., 2021). Es importante destacar que más del 70% de muertes por esta causa, se registraron en países de ingresos bajos o medianos, estimándose que esta cifra para el año 2030, podría llegar a superar los 13 millones de muertes (OMS, 2018). Además del impacto que tiene el cáncer en la salud pública, lo tiene en el aspecto económico, ya que el gasto que representa el cuidado y atención de los pacientes con cáncer, es superior al 1 billón de dólares anuales (Salazar & Sánchez, 2014).

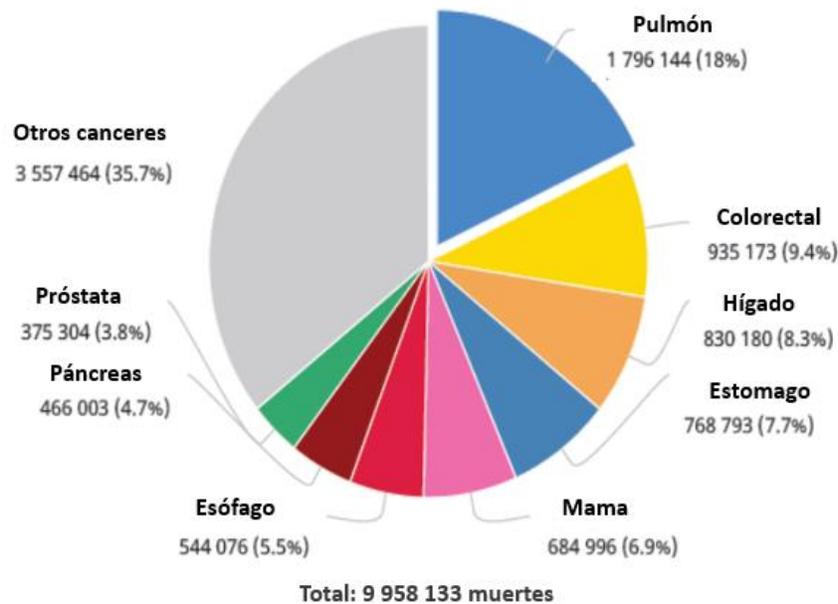
Los tipos de cáncer con mayor incidencia reportados en el año 2020 a nivel mundial fueron: cáncer de mama (2,261,419 casos al año , 11.7%), cáncer de pulmón (2,206,771 casos al año, 11.4%), cáncer colón-rectal (1,931,590 casos al año, 10%) y cáncer de próstata (1,414,259 casos al año, 7.3%), de un total de 19,292,789 de nuevos casos diagnosticados (Figura 1). Con respecto a la mortalidad en ese mismo año, el cáncer de pulmón ocupó el primer lugar, con 1, 796,144 defunciones al año (18%) y el cáncer colorectal, el segundo lugar, con 935,173 muertes por año (9.4%), de un total de 9, 958,133 muertes causadas por cáncer (Sung, et al., 2021) (Figura 2).

**Número estimado de nuevos casos en 2020, en todo el mundo, ambos sexos, todas las edades**



**Figura 1.** Gráfica de los nuevos casos diagnosticados de cáncer a nivel mundial. (Sung, et al., 2021).

Número estimado muertes en 2020, en todo el mundo, ambos sexos, todas las edades



**Figura 2.** Gráfica de la mortalidad provocada por cáncer a nivel mundial, (Sung, et al., 2021).

El cáncer en México es la tercera causa de muerte, solo por detrás de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes mellitus, reportándose más de 90,222 muertes y 195,499 nuevos casos de cáncer en el año 2020 (GLOBOCAN, 2020). Los siete principales tipos de cáncer que padece la población mexicana son: cáncer de mama (29,929 casos al año), cáncer de próstata (26,742 casos al año), cáncer colorectal (14,901 casos al año), cáncer de tiroides (11,227 casos al año), cáncer cérvico-uterino (9,439 casos al año), cáncer de estómago (8,804 casos al año) y cáncer de pulmón (7,588 casos al año). El cáncer de pulmón es uno de los más agresivos, ocupa la séptima posición en cuanto su incidencia y el cuarto lugar en mortalidad, reportándose 7,100 muertes por año (Tabla 1) (GLOBOCAN, 2020).

**TABLA 1**

**Incidencia y mortalidad de cáncer de pulmón en México**

**México**  
Fuente: Globocan

**Incidencia y mortalidad por tipos de cáncer**

Cáncer	Nuevos casos				Muertes			
	Número	Rango	(%)	CUM.risk	Número	Rango	(%)	CUM.risk
Mama	29 929	1	15.3	6.31	7 931	1	6.9	2.14
Próstata	26 742	2	13.7	12.56	7 457	3	18	5.65
Colorectal	14 901	3	7.6	-	7 755	2	9.4	-
Tiroides	11 227	4	5.7	1.02	956	18	-	0.21
Cérvico uterino	9 439	5	4.8	2.01	4 335	9	7.7	1.17
Estomago	8 804	6	4.5	1.69	6 735	6	8.3	1.4
Pulmón	7 588	7	3.9	1.71	7 100	5	3.4	1.64
Higado	7 536	8	3.9	1.69	7 175	4	5.5	1.64

**CÁNCER DE PULMÓN**

A nivel mundial, con respecto al cáncer de pulmón, se diagnosticaron 2, 206,771 de nuevos casos y se reportaron 1, 796,144 de muertes en el año 2020. Este tipo de cáncer, representa la primera causa de muerte por esta enfermedad (18%) (Sung et al., 2021). En México, ocupa el cuarto lugar de mortalidad por este padecimiento, contabilizándose 7,100 defunciones por año (Thandra, 2019; Sun, et al, 2021).

**Factores de riesgo**

- **Tabaquismo**

Es el factor de riesgo de cáncer de pulmón más importante y prevalente. El humo del tabaco contiene más de 7,000 productos químicos, incluidos al

menos, 69 carcinógenos identificados, y aunque solo alrededor del 15% de los fumadores desarrollan cáncer de pulmón, entre el 80 y el 90 % de los diagnósticos de cáncer de pulmón se atribuyen al tabaquismo, esto pudiera ser debido a los fumadores pasivos, pues diversos estudios han encontrado carcinógenos en el humo de cigarrillo, que incluyen hidrocarburos aromáticos policíclicos, nitrosaminas y aminas aromáticas. En concordancia con lo anterior, se ha encontrado que la nicotina y su metabolito cotinina, así como los carcinógenos del tabaco, están presentes en la orina de las personas que nunca han fumado y que están expuestas al humo de cigarrillo. Una meta-análisis publicada en el año 2018, reportó que la exposición al humo de cigarrillo de manera pasiva, aumenta en un 25%, el riesgo de sufrir cáncer de pulmón en comparación con los que nunca han fumado y tampoco han estado expuestos al humo de cigarrillo (Schabath & Cote, 2020).

- ***Exposición al radón***

El radón, es un gas radiactivo invisible, inodoro e insípido que se encuentra en el suelo y se produce naturalmente durante la desintegración radiactiva del torio y el uranio. A nivel mundial, del 3 al 14% de los casos de cáncer de pulmón diagnosticados, se atribuyen a la exposición al radón (Schabath & Cote, 2020).

- ***Edad***

La incidencia de cáncer de pulmón es baja en personas menores de 40 años y aumenta de manera significativa en el rango de edad de los 75 a los 80 años (Malothora, et al., 2016; Thandra, et al. 2021).

- ***Género***

Los hombres presentan mayor incidencia y mortalidad por cáncer de pulmón que las mujeres. En cuanto la incidencia, en el año 2020, se diagnosticaron 1,435,943 hombres y 607,465 mujeres, y en relación a la mortalidad durante ese mismo año, murieron 1,188,679 hombres y 607,465 mujeres

(GLOBOCAN, 2020). Una probable explicación a esta diferencia por género, es que hay un mayor porcentaje de hombres fumadores que mujeres fumadoras (27.1% en hombres y 8.7% en mujeres). Sin embargo, las mujeres tienden a ser más susceptibles al cáncer de pulmón, ya que desarrollan de manera más común, mutaciones en los genes CY1A1 y TP53, así como un aumento en la expresión de receptores a estrógenos (Sameth et al., 2009; Malothora et al., 2016; Thandra et al. 2021).

- ***Historia familiar y genética***

Se ha observado que un historial familiar positivo de cáncer de pulmón aumenta el factor de riesgo en 1.7 veces, incluso se relacionó con una aparición temprana. Un análisis de vinculación de genealogías de alto riesgo, identificó la susceptibilidad a padecer cáncer de pulmón, cuando se presentaban alteraciones en los *locus* 5p15 (que incluye el gen de la transcriptasa reversa de la telomerasa), 6q23-25 (que regula la señalización de la proteína G) y 15q25, que se ha demostrado que incrementa la dependencia de nicotina (Malothora et al., 2016; Thandra et al. 2021).

- ***Enfermedades inflamatorias***

Algunas enfermedades que causan inflamación crónica respiratoria, se han asociado con un mayor riesgo de padecer cáncer de pulmón, por ejemplo, pacientes con antecedentes de tuberculosis, su factor de riesgo es de 1.5-2, y pacientes con antecedentes de EPOC, enfisema o bronquitis crónica, el factor de riesgo va de 2 a 3 veces (Malothora et al., 2016; Schabath y Cote 2020).

## **Clasificación**

El cáncer de pulmón se clasifica en dos tipos: a) carcinoma de pulmón de células no pequeñas y b) carcinoma de pulmón de células pequeñas. El SCLC, representa aproximadamente el 25% de los casos de cáncer de pulmón, es muy agresivo y de proliferación rápida. Este tipo de carcinoma, es el que muestra mayor relación con el tabaquismo, ya que el 98% de los pacientes que lo presentan, cuentan con historial de tabaquismo. Por su parte, el NSCLC, representa más del 75% de los casos de cáncer de pulmón, de los cuales, aproximadamente el 40 % son adenocarcinomas, del 25 al 30 %, son carcinomas de células escamosas (epidermoide) y del 10 al 15 % son carcinomas de células grandes. El adenocarcinoma, es el tipo más común en pacientes no fumadores y se origina a partir de células productoras de moco, clasificándose en cuatro tipos: acinar, papilar, bronquioalveolar y variedad solida secretora (Hoyos et al., 2017; Schabath & Cote, 2020).

Se ha considerado un tercer tipo de cáncer de pulmón llamado mesotelioma, el cual se presenta típicamente en la pleura, y su origen está muy relacionado a la exposición a asbesto. Este tipo de cáncer pulmonar es agresivo y mortal, pues es de difícil diagnóstico (Velasco & Zarco, 2009).

## **METASTASIS**

La metástasis es el proceso por el cual las células que conforman los tumores malignos iniciales, se dispersan e invaden sitios distantes del cuerpo, donde subsecuentemente forman nuevas colonias que pueden desarrollar tumores secundarios (Pecorino, 2012). La metástasis es la principal causa de muertes en

pacientes con cáncer, pues más del 90% de las muertes asociadas a cáncer, son a consecuencia de ésta.

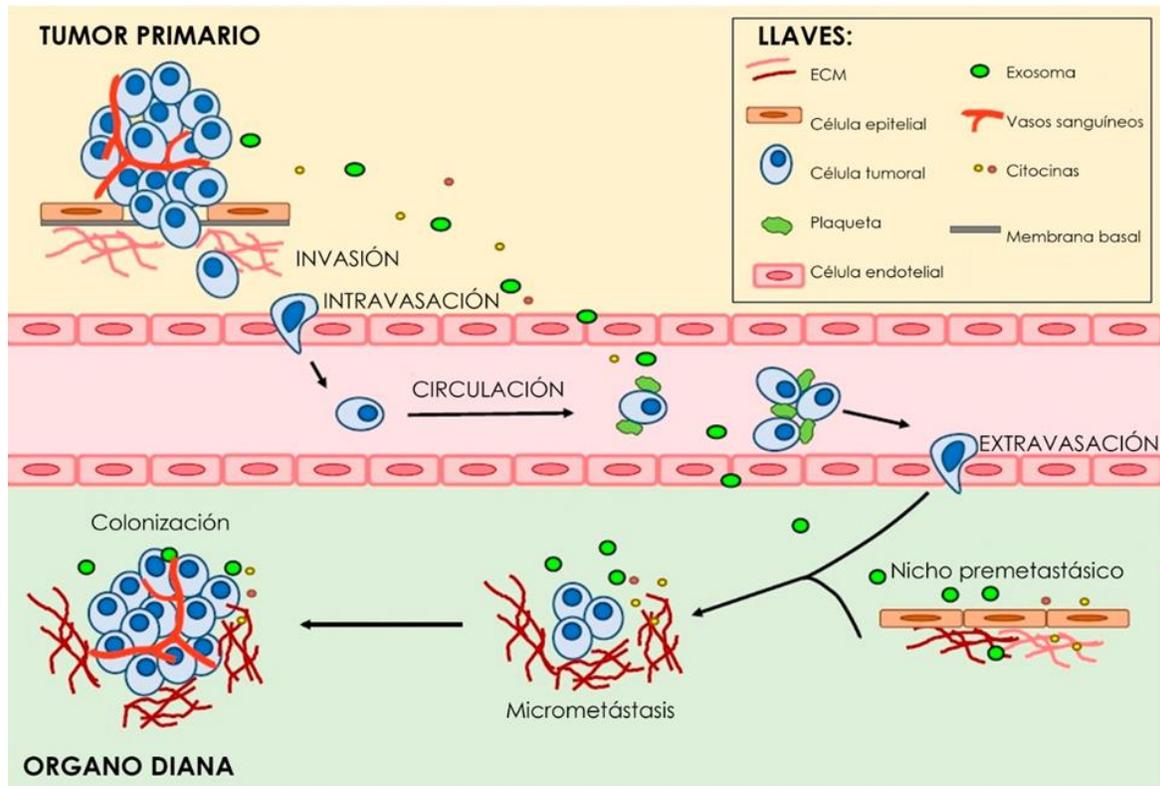
La metástasis se presenta de manera posterior a la finalización de una compleja sucesión de eventos biológicos celulares, denominados colectivamente, cascada de invasión-metástasis (Figura 3). El primer paso de la cascada de invasión metastásica es la activación de la transición epitelio mesenquimal (EMT), durante la cual inicia la invasión local del tumor primario. Este proceso es iniciado por la activación de varias vías de señalización, que regulan la organización del citoesqueleto, y la pérdida de adhesión de las células tumorales a la matriz extracelular circundante y/o a la membrana basal. Esta nueva condición, permite a las células tumorales movilizarse, lo que les permitirá expandirse al tejido circundante (Cuadrado, et al.2017).

El segundo paso de la cascada de invasión metastásica, se conoce como Intravasación, y se refiere a la capacidad que tienen las células tumorales de pasar entre las células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos, para ser transportadas por la sangre o la linfa, respectivamente, a sitios distantes de su punto de origen.

El tercer paso, es la supervivencia de las células tumorales mientras circulan en sangre, pues deben sobrevivir a la anoikisis, que es un tipo de apoptosis causada por pérdida de adhesión celular, y evitar ser reconocidas y eliminadas por las células del sistema inmune, específicamente, las células NK (*natural killer*). El cuarto paso comienza cuando las células tumorales salen de los vasos sanguíneos, proceso conocido como extravasación, para llegar a su tejido u órgano diana. Las células tumorales en el nuevo tejido, comenzarán a crecer y crear microcolonias, adaptándose a las nuevas condiciones del microambiente tisular (Cuadrado *et al.*, 2017).

El quinto y último paso de la cascada de invasión metastásica, es la proliferación de las nuevas microcolonias, ya que muchas de las células recién diseminadas,

pueden permanecer quiescentes durante meses (Valastyan & Weinberg, 2011; Lerón & Pareja, 2019).



**Figura 3.** Etapas de la transición epitelio mesenquimal (modificado de Cuadrado *et al.*, 2017).

## TRANSICIÓN EPITELIO- MESÉNQUIMA

La transición epitelio-mesénquima es el proceso mediante el cual, las células epiteliales dejan de expresar marcadores moleculares de fenotipo epitelial, como es la E-cadherina, la cual es una proteína importante para mantener la uniones intercelulares y con ello la integridad de la barrera epitelial, y comienzan a expresar a su vez, proteínas características de fenotipo mesenquimal, favoreciendo la

remodelación de la matriz extracelular y con ello su capacidad migratoria (Moustakas & Heldin, 2007).

La EMT, como muchos otros procesos biológicos, requiere la presencia de factores de transcripción, factores de señalización y otras moléculas que aseguren la transformación de un fenotipo epitelial hacia un fenotipo mesenquimal. Entre los diferentes factores de crecimiento que se han descrito como inductores de la EMT, se pueden mencionar al TGF- $\beta$ , EGF, FGF, HGF e *Wnt*, entre otros. El efecto inductor que ejercen los factores de crecimiento sobre la EMT, es mediado por la expresión de un conjunto particular de factores de transcripción, denominados factores de transcripción asociados a la EMT (EMT-TF), identificados como *Snail-1*, *Snail-2*, *Twist* y *ZEB1*. Los EMT-TF tienen un efecto represor sobre la expresión de los marcadores moleculares del fenotipo epitelial: E-cadherina, claudina, ocludinas y desmoplaquinas; proteínas importantes para el mantenimiento de las uniones celulares y la polaridad celular (Said & Williams, 2011; Troncoso *et al.*, 2017).

La interacción de las células tumorales con su microambiente local, inducen la producción de factores de crecimiento, citocinas y otros mensajeros químicos, capaces de activar la EMT (Gahaderi & Niknejad, 2021).

El control de la metástasis, resulta sumamente importante para limitar la progresión tumoral y con ello extender la supervivencia y calidad de vida de los pacientes, por lo que resulta importante, conocer los mecanismos moleculares a través de los cuales, los factores de crecimiento inducen la EMT, considerando esta transición como el paso inicial de la metástasis (León & Pareja, 2019).

Entre los diferentes factores de crecimiento relacionados con la EMT está el factor de crecimiento fibroblástico tipo 2, que promueve la formación mesodérmica y la migración de células mesenquimales, durante la embriogénesis. Específicamente, durante la gastrulación, el FGF-2 induce la expresión de *Snail-1*, quien reprime directamente la expresión de E-cadherina (Moustaka y Heldin 2007).

## **FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO TIPO 2 (FGF-2)**

El FGF-2 es una proteína conformada por 146 aminoácidos y con un peso molecular de 16 a 18 KDa (Baretio & Laube, 2005). El FGF-2 pertenece a la superfamilia de Factores de Crecimiento Fibroblástico que está conformada hasta por 23 miembros, siendo los más abundantes el FGF-1 y el FGF-2 (Bickfall *et al.*, 1997).

Los FGF se expresan en casi todos los tejidos y cumplen funciones esenciales en las primeras etapas del desarrollo embrionario (organogénesis), y en la etapa adulta, funcionan como factores homeostáticos, para el mantenimiento, reparación, regeneración de tejidos y órganos. Los FGF secretados al medio extracelular, regulan de manera autocrina, paracrina y endocrina, procesos celulares fundamentales que incluyen la proliferación, la supervivencia, la migración, la diferenciación y el metabolismo (Bickfall *et al.*, 1997; Ornitz & Itoh, 2015).

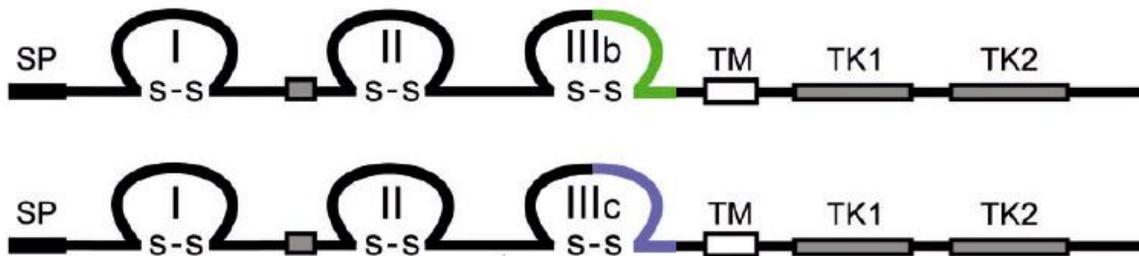
La presencia de FGF-2 estimula la migración, proliferación y angiogénesis en células endoteliales, mientras que, a nivel del sistema nervioso, participa en la diferenciación y supervivencia neuronal. Adicionalmente, el FGF-2 favorece la diferenciación de las células pulmonares, la regeneración de la piel, el mantenimiento de la presión sanguínea y el desarrollo del musculo liso (Bickfall *et al.* 1997; Beenken y Mohammadi 2009; Ornitz y Itoh 2015).

### **Receptor a FGF-2**

Se han descrito hasta la fecha 4 diferentes receptores para FGF-2: FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4. Particularmente, el FGF-2 se une con alta afinidad al FGFR1, tanto en sus isoformas IIIb y IIIc, activando las vías de señalización MAPK/ERK1-2 y PI3K/AKT/mTOR (Figura 4) (Lau *et al.*, 2013).

El FGFR1 está conformado por aproximadamente 800 aminoácidos, distribuidos en tres dominios: un dominio extracelular tipo inmunoglobulina, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con dos sitios de actividad tirosina cinasa

(TK1 y TK2) (Figura 4). La presencia de heparán sulfato (HS) y Hs proteoglicano (HSPG) es importante para la unión del FGF-2 a su receptor, así como para la estabilidad de la molécula, respectivamente (Bikfall *et al.*, 1997; Powers, 2000; Ornitz & Itoh, 2015).

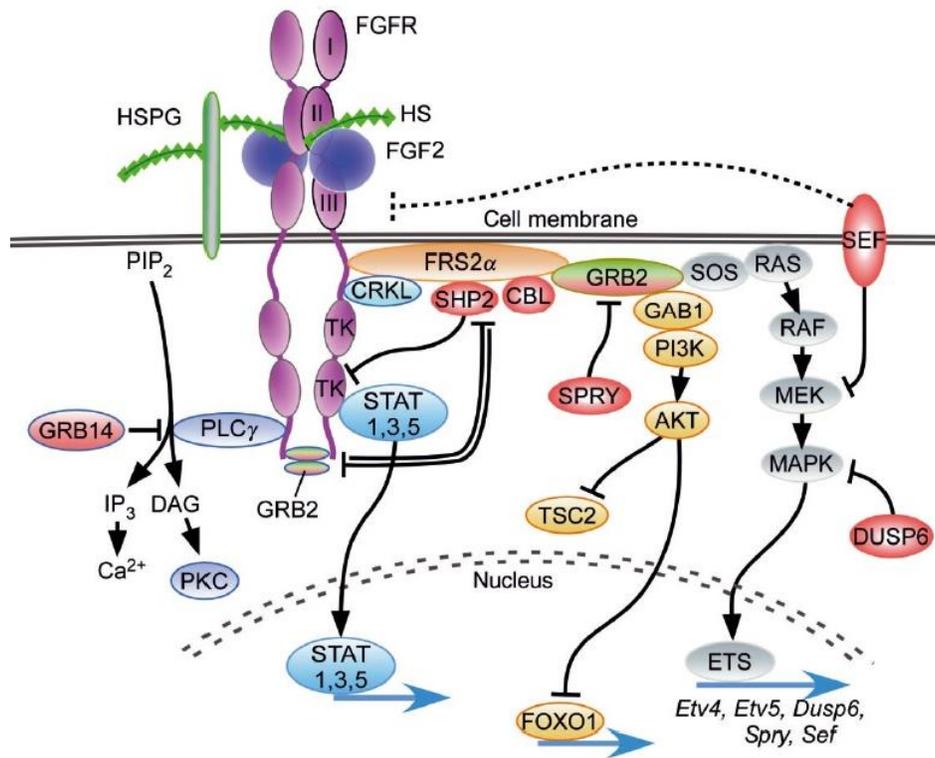


**Figura 4.** Esquema de las dos isoformas del receptor FGFR1: IIIb (fenotipo epitelial) y IIIc (fenotipo mesenquimal) (Ornitz & Itoh, 2015).

### Vía de señalización FGF-2

La vía de señalización de FGF-2/FGFR1, empieza cuando el FGF-2 se une a su receptor FGFR1 entre los dominios IgII y IgIII, dicha unión es estabilizada con ayuda del heparán sulfato (HS) característico de los receptores a FGF. Una vez unido FGF-2 a su receptor mencionan este se dimeriza y fosforila lo que dará lugar a la activación de las dos vías asociadas a la actividad FGF-2/FGFR1: RAS-MAPK y PI3K-AKT (Figura 5). La activación de estas vías empieza por la fosforilación de FRS2 $\alpha$ , una proteína adaptadora que se une a CRKL la cual es fosforilada en la Y463 del receptor (Ornitz & Itoh, 2015; Takase *et al.*, 2016; Pascual *et al.*, 2020). A continuación, se describen a detalles las vías relacionadas con la activación del receptor FGFR1 por su ligando FGF-2.

La vía RAS-MAPK se inicia por la unión y posterior fosforilación, de la proteína adaptadora CRKL a la Y463, posterior a este evento la proteína adaptadora FRS2 $\alpha$  se unirá y fosforilará en la proteína CRKL, a continuación la FRS2 $\alpha$  activada promoverá la unión de la proteína GRB2 a FRS2 $\alpha$ . GRB2 activa la vía RAS-MAPK a través del reclutamiento de SOS, En consecuencia la activación de MAPK regula la expresión de diversos genes diana a través de la activación de factores de transcripción específicos de transformación (ETS) como Etv4 (Pea3) y Etv5 (Erm), además de la expresión de inhibidores de la vía de FGF-2 como lo son SPRY, DUPS6 y SEF. En contraste con la vía PI3k-AKT inicia después de la activación de FRS2 $\alpha$  que se une a la proteína GAB1 y activa PI3K. AKT, cuya función es inhibir la activación de moléculas blanco, como la proteína de caja *forkhead* (FOXO1). Por su parte FOXO1, un efector proapoptótico, es inactivado por AKT, lo que hace que salga del núcleo y promueva la supervivencia celular. Adicional a esto, AKT también activa la vía mTOR a través de fosforilación inhibición de TSC2, estimulando finalmente el crecimiento celular y proliferación (Pascual *et al.*, 2000; Billotet *et al.*, 2004; Tuner & Grouse, 2010; Ornitz & Itoh, 2015).



**Figura 5:** Vía de señalización activada por la unión de FGF-2 a FGFR1 (modificada de Ornitz & Itoh, 2015).

## ANTECEDENTES

### FGF-2 y Cáncer

La activación de FGFR1 por FGF-2 regula numerosos procesos celulares, tales como: proliferación, diferenciación y supervivencia, lo que cual lo hace susceptible de estudio, para entender las bases moleculares del origen, desarrollo y progresión tumoral, ya que una desregulación de dichos procesos, está implicado en muchos tipos de cáncer (Turner & Grose, 2014; Ornitz & Itoh, 2015).

Diversas evidencias científicas muestran que la sobre-expresión de FGF-2, como de su receptor, están relacionados positivamente con la progresión del cáncer de

mama (Jong *et al.*, 1998), cáncer de ovario (Steel *et al.*, 2001), cáncer de vejiga (Martino *et al.*, 2012), cáncer de hígado (Matsubara *et al.*, 2017), cáncer de próstata (Wang *et al.*, 2020) y cáncer de pulmón (Miura *et al.*, 2019), entre otros.

El silenciamiento de los genes que codifican para FGF-2 y FGFR1 en modelos de melanoma humano y de cáncer de pulmón, causan la reducción drástica en el tamaño del tumor, por lo que se sugiere, que la inhibición de la señalización de FGF-2 puede proponerse como un blanco farmacológico (Beenken & Mohammadi, 2009; Wang *et al.*, 2020).

### **FGF-2 y EMT**

La EMT es un proceso tanto fisiológico como patológico, que se presenta en la embriogénesis, reparación de tejidos y en los procesos neoplásicos (Troncoso *et al.* 2017). Se ha descrito la participación de la vía de señalización activada por FGF-2, en la EMT durante la embriogénesis y la reparación de tejidos (Arvelo *et al.*, 2016; Moustakas & Heledin, 2007).

En el año 2002, Strutz y colaboradores, observaron que al tratar de manera crónica células del epitelio tubular de ratón con FGF-2, se favorecía la EMT, ya que las células eran capaces de migrar, sus niveles de vimentina, MMP-9, MMP-2, estaban elevados y los de citoqueratina reducidos (Strutz *et al.*, 2002).

El silenciamiento del ARNm que codifica para FGF-2, empleando el miR-646, reduce la capacidad metastásica de las células A549, provenientes de cáncer de pulmón, al inhibir la EMT (Wang *et al.*, 2020). La presencia de FGF-2 en células de cáncer de ovario reduce la expresión de E-cadherina, marcador molecular de la EMT, a través de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR y de la vía MAPK/ERK (Lau *et al.*, 2013).

El silenciamiento de FGF-2, en células de adenocarcinoma pulmonar, disminuye la expresión de vimentina y la morfología celular, pasa del fenotipo mesenquimal, al fenotipo epitelial (Miura *et al.*, 2019, Blaz *et al.*, 2021).

## **JUSTIFICACIÓN**

El cáncer es la tercera causa de muerte a nivel mundial, dentro de estas neoplasias, destaca el cáncer de pulmón, pues representa el 18% de las muertes provocadas por esta enfermedad. El cáncer de pulmón, ha sido ampliamente relacionado con el consumo de tabaco y exposición a contaminantes ambientales, una gran mayoría de los pacientes desarrollan metástasis, principal causa de su muerte. Por lo que resulta sumamente importante entender a detalle, el mecanismo molecular involucrado, esto con el fin de proponer blancos farmacológicos para mejorar el pronóstico y calidad de vida del paciente.

Un elemento central para el inicio de la metástasis es la EMT, por lo que el propósito del presente trabajo, es investigar la participación del FGF-2, que se ha visto relacionado en procesos como la migración celular y la regulación de factores de transcripción asociados a la EMT, en el desarrollo y la progresión del cáncer de pulmón, específicamente en la línea celular A549, la cual deriva de un adenocarcinoma pulmonar de células no pequeñas, que es el tipo de cáncer pulmonar más común (75% de los casos).

## **HIPÓTESIS**

La presencia de FGF-2 incide sobre la transición epitelio-mesénquima de las células tumorales A549, mejorando su capacidad migratoria.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar si la presencia de FGF-2 incide sobre la transición epitelio-mesénquima de las células tumorales A549, mejorando su capacidad migratoria.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar si la presencia de FGF-2 favorece la capacidad migratoria de las células A549.
2. Investigar si las células A549 expresan el receptor FGFR1 a nivel de ARNm.
3. Determinar si la presencia de FGF-2 regula los niveles de expresión del ARNm que codifica para marcadores moleculares del fenotipo mesenquimal, así como de las metaloproteinasas.

# METODOS

## Cultivo de la línea celular A549

Las células A549 es una de las líneas celulares de cáncer pulmonar más utilizadas. Fue obtenida a partir de tejido proveniente de un paciente caucásico de 58 años de edad con carcinoma pulmonar. Las células A549 se sembraron en matraces de cultivo de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup> de superficie, con medio de cultivo Advanced-DMEM (Gibco, EUA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-Glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico (25µg/ml de anfotericina B, 10,000 µg/ml de estreptomicina y 10,000 unidades/ml de penicilina). Se mantuvieron dentro de una incubadora a 37° C con una atmosfera húmeda del 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. El medio de cultivo se renovó cada 48 horas y cada 4 días las células se cosecharon. La cosecha de células consistió en los siguientes pasos: retirar el medio de cultivo y lavar 2 veces con 5 ml de PBS 1X estéril, adicionar 2 ml de tripsina y dejar reposar por 5 min, posteriormente se mezcló con 4 ml de medio de cultivo, de la suspensión celular obtenida se transfirió a un tubo cónico y se centrifugo a 1500 rpm por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular que quedo en el tubo es resuspendida con medio de cultivo fresco, a partir del cual, se tomaron alícuotas para regenerar el cultivo madre, y el resto de la suspensión celular se utilizó para sembrar las células que se utilizaron para los experimentos posteriores. Para realizar los experimentos, las células se sembraron en placas de 6 pozos a las cuales se les dio tratamientos a distintas concentraciones y a diferentes tiempos según sea necesario en 1.5 ml de medio de cultivo por pozo. Para ello las células sembradas debieron tener una confluencia del más del 50 por ciento para dar comienzo a cada uno de los tratamientos dependiendo del tiempo en el que se mantuvieron las células, se realizaron recambios de medio cada 24 horas agregando en cada recambio el mismo tratamiento. Todo esto en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

## **Ensayo de RT-PCR de punto final**

### ***a) Extracción de ácido ribonucleico total (ARN<sub>T</sub>)***

Las células se sembraron en placas de 6 pozos, una vez que alcanzaron la confluencia esperada, se recambio el medio de cultivo y se dio inicio al tratamiento correspondiente, con recambio de medio cada 24 horas. Una vez considerado el tiempo respectivo al tratamiento se procedió a realizar la extracción del RNA total haciendo uso de un kit comercial FavorPrep TM, Tissue Total RNA Mini (Favorgene, Biotech Corp., China), siguiendo las instrucciones del fabricante: se retiró el medio de cultivo de las placas, se realizaron 2 lavados con PBS 1X, se preparó el buffer de lisis suplementado con 1% de  $\beta$ - mercapto-etanol y se agregó 350  $\mu$ L de buffer de lisis por pozo, con ayuda de una micropipeta se resuspendió y se transfirió el homogenado celular a la columna FARB que contenía el filtro blanco, se centrifugo a 12000 rpm por 2 min, se desechó la columna FARB y lo que quedo en el tubo colector se pasó a un tubo eppendorf de 2 ml, se agregaron 350  $\mu$ L de etanol al 70% en cada tubo. Se colocó en otra columna los filtros rojos y se les añadió lo obtenido en el tubo eppendorf, se centrifugó a 12000 rpm por 2 min y se retiró el sobrenadante, se realizó 1 lavado con buffer de lavado uno y 2 lavados con buffer de lavado dos. Tras cada lavado, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 min. Por último, las columnas se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril y se agregaron 30  $\mu$ L de agua libre de RNAsas. Se dejó reposar la muestra por 3 minutos a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos para obtener el RNA total.

### ***b) Cuantificación de ARN***

Posterior a la extracción, se cuantificó la concentración y la calidad de ARN extraído mediante espectrofotometría. Para ello se empleó una dilución con 4  $\mu$ L de la muestra y 196  $\mu$ L de agua inyectable, para obtener un volumen final de 200  $\mu$ L; la concentración se evaluó a una longitud de onda de 260 nm y la integridad del ARN se evaluó como el cociente obtenido entre las longitudes de onda 260 nm y 280 nm (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>). El valor del cociente obtenido debió ubicarse en un rango de 1.8-2.0

para considerarse como una muestra de ARN de buena calidad y poder ser empleado en los ensayos de RT-PCR.

### ***c) Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc)***

Para la síntesis de la cadena de Ácido Desoxirribonucleico complementario al ARN extraído, se empleó el kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem, EUA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se hizo un “master mix” (mezcla de componentes) como se muestra en la tabla de abajo del cual se añadió 10  $\mu$ L de forma común a todas las muestras.

**TABLA 2**  
**Componentes para la RT**

Reactivo	Volumen
Buffer RT	4 $\mu$ l
<u>dNTPs</u>	2 $\mu$ l
<u>Random Primers</u>	1 $\mu$ l
<u>Reverse transcriptase</u>	0.5 $\mu$ l
MULL	
<b>Total</b>	<b>7.5 <math>\mu</math>l</b>

Para cada tubo de reacción se empleó un volumen final de 20  $\mu$ L, por lo que el volumen restante (10  $\mu$ L) se complementó con la muestra de ARN más agua. La cantidad de ARN por tubo de reacción fue de 4  $\mu$ g.

Se empleó un termociclador Mastercycler S50 (Eppendorf) para realizar el siguiente protocolo: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 5 minutos a 85°C y finalmente la temperatura de los tubos se llevó a 4°C, para ser almacenados en congelación hasta su empleo.

### ***d) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)***

A partir del ADN complementario obtenido en la retro-transcripción se realizó reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el Kit comercial DreamTaq PCR

Master Mix (Thermo Scientific, EUA), siguiendo las indicaciones del proveedor, con un volumen total de reacción mínimo de 20  $\mu$ L.

**TABLA 3**

**Componentes para la PCR**

Reactivo	Volumen
<u>Dream Tag</u>	10 $\mu$ l
Agua libre de nucleasas	6 $\mu$ l
Primer Forward	1 $\mu$ l
Primer Reverse	1 $\mu$ l
<u>ADNc</u>	2 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Se empleó un termociclador Mastercycler S50 (Eppendorf) para realizar el siguiente protocolo: 5 minutos a 94 °C, 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura media del oligonucleótido a utilizar, 1 minuto a 72°C, 10 minutos a 72°C y finalmente la temperatura de los tubos se llevó a 4°C para ser almacenados en congelación hasta su empleo.

Los oligonucleótidos utilizados para la PCR de punto final se muestran en la siguiente tabla:

**TABLA 4**

**Oligonucleótidos empleados para los ensayos de PCR**

Oligonucleótido	Secuencia		Tamaño del amplicon (pb)
FGFR1	Fwd:	GAGGCTACAAGGTCCGTTATG	336
	Rv:	CCATCTCTTTGTCCGGTGGTATTA	
Vimentina	Fwd:	AGAACCTGCAGGAGGCAGAAGAAT	201
	Rv:	CTTCCATTTACGCATCTGGCGTT	
$\alpha$ -SMA	Fwd:	GACCCTGAAGTACCCGATAGA	421
	Rv:	CTCAGCAGTAGTAACGAAGGAATAG	
MMP-2	Fwd:	AGAAGATCATGATGTCGGCCTGCT	686
	Rv:	GCGGATCCAGCGCCAGAGAGACAC	
MMP-9	Fwd:	CTTCCAAGGCCAATCCTACTC	438
	Rv:	GCCATTCACGTCGTCCTTAT	
MMP-14	Fwd:	GGAAGTTCTGGCCAAAATGA	314
	Rv:	AACAGGCCAAAGCTGATGCAGACAC	
$\beta$ -actina	Fwd:	CAAGAGATGGCCACGGCTGCT	218
	Rv:	CAAGAGATGGCCACGGCTGCT	

**e) Separación electroforética de los productos de PCR**

A partir de los productos de PCR se procedió a la separación electroforética, utilizando geles de agarosa al 1.2% teñidos con Bromuro de etidio (BrEt).

Para la preparación del gel se disolvieron 600 miligramos de agarosa en 50 mL de buffer TAE 1X, la solución se calentó por tiempos intermitentes de 30 segundos hasta un tiempo total de 1:30 minutos, se añadió 4  $\mu$ L de bromuro de etidio y se vertió en la cámara de electroforesis dejando gelificar por 30 minutos a temperatura ambiente.

El gel se cargó con 9  $\mu$ L de cada muestra. Como marcador de peso molecular se empleó el patrón de ADN comercial Gene Ruler 100 pb DNA Laddery junto con el con buffer 6X DNA Loading Dye (ambos de Thermo Scientific, EUA).

La separación electroforética se llevó a cabo en buffer TAE 1X a 65 Voltios durante 80 minutos; finalmente, se obtuvieron tres micrografías de cada uno de los geles en el fotodocumentador de geles AXYGEN.

#### **f) Densitometría**

Se realizó el análisis densitométrico de las bandas presentes en las imágenes obtenidas en el fotodocumentador utilizando el software ImageJ que es proporcionado gratuitamente por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (De sus siglas en inglés, NIH)

### **Ensayo de migración en cámaras transwell**

Para el ensayo se utilizaron Soportes Permeables Transwell® con membranas de policarbonato (poro de 8.0  $\mu\text{m}$ , Corning Incorporated, EUA). Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos con medio Advanced-DMEM, suplementado con 10% de FBS, 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico –antimicótico (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de anfotericina B, 10,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina y 10,000 unidades/ml de penicilina), una vez alcanzada la confluencia esperada, se recambió el medio de cultivo y se dio inicio al tratamiento de las células con 100 ng/ml de FGF-2 por 48 horas. Al finalizar el tratamiento se procedió a obtener una suspensión celular final de  $3 \times 10^5$  células/ml en medio de cultivo libre de suero fetal bovino. El ensayo de migración en cámaras transwell se realizó de la siguiente manera: a) en la parte inferior de la cámara se agregaron 750  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo completo y sobre la membrana de policarbonato de la cámara transwell se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular, dando un número final de 30,000 células sembradas; b) la placa con los insertos se incubó por 18 horas a 37°C, en 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>; c) con ayuda de un hisopo de algodón se retiraron las células que permanecieron en la parte superior de la membrana de policarbonato del inserto; d) las células que migraron permanecieron en la parte inferior de la membrana de policarbonato del inserto y fueron fijadas con una mezcla de metanol/acetona (1/1) por 20 minutos a

4°C; e) las células fueron teñidas con el colorante cristal violeta (0.05%) por 20 minutos; f) las células fueron lavadas varias veces con agua tridestilada con el fin de eliminar el exceso de colorante, dejándose finalmente el inserto en agua; g) las cámaras transwell se mantuvieron en refrigeración hasta el conteo celular; h) se realizaron microfotografías en un microscopio de campo claro que tiene acoplado una cámara modelo c10 plus (Jenoptick) y con el objetivo 10X; i) a partir de las microfotografías obtenidas se realizó el conteo celular empleando el programa *Image J*.

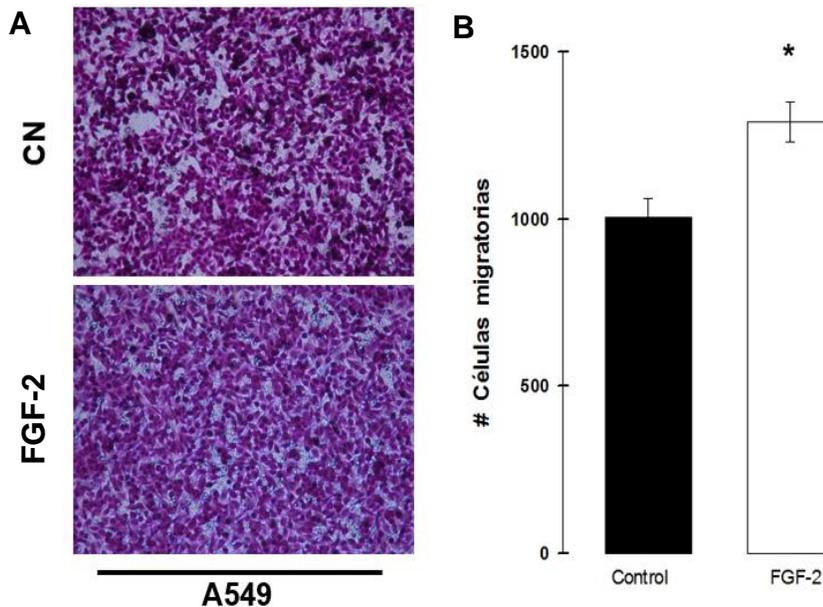
### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con el software SigmaPlot 11.0 (Jandel Corporation, EUA). Se utilizó la prueba *t de Student*, para muestras independientes con distribución normal y varianza homogénea, para evaluar la diferencia entre las medias de los datos obtenidos para cada grupo experimental; y se determinó si entre dichos parámetros las diferencias son estadísticamente significativas o no, tomándose como parámetro de significancia, un valor de  $p < 0.05$  (\*). Las gráficas muestran el valor promedio  $\pm$  error estándar.

# RESULTADOS

## FGF-2 promueve la capacidad migratoria de las células A549

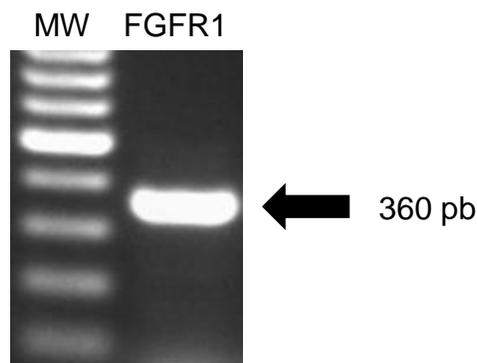
Inicialmente, decidimos investigar si la presencia de FGF-2 modificaba de alguna manera la capacidad migratoria de las células A549. Las células fueron mantenidas por 48 horas en presencia de 100 ng/ml de FGF-2. Al finalizar este periodo, las células fueron cosechadas para ser sembradas en los insertos de las cámaras transwell (30,000 células), se incubaron nuevamente durante 18 horas, manteniendo la presencia de FGF-2 en el medio de cultivo. Al finalizar la incubación, las células que migraron fueron fijadas, teñidas y fotografiadas. A partir de las microfotografías obtenidas se realizó el conteo celular utilizando el programa *Image J*. La Figura 6 muestra las microfotografías de las células que migraron bajo nuestras condiciones experimentales, observándose claramente que la presencia de FGF-2, induce un incremento superior al 25% en las células que migran con respecto a la condición control.



**Figura 6. Efecto de FGF-2 sobre la migración de las células A549.** Las células A549 se mantuvieron en presencia de 100ng/ml de FGF-2 por 48hrs. Posterior a este periodo, se realizó ensayos de migración en transwell, donde se sembraron 30000 células **A)** Se muestran micrografías representativas obtenidas con el objetivo 10x, del ensayo de migración en cámaras transwell. **B)** Cuantificación de las células que migran en la condición tratada con 100 ng/ml de FGF-2 con respecto a la condición control. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes, (\*) el valor de  $p$  es menor de 0.05.

### Expresión de FGFR1 en células A549

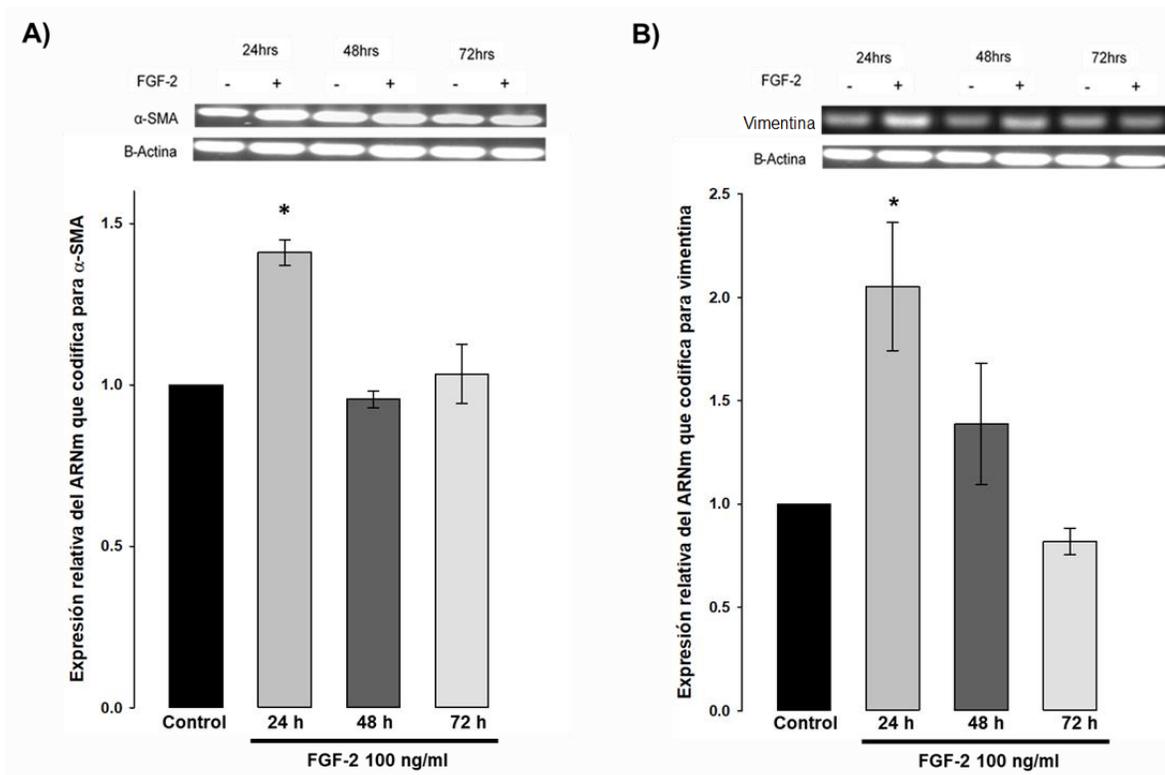
FGF-2 induce cambios significativos en la capacidad migratoria de las células A549, por lo que decidimos investigar si este efecto es mediado por su receptor, por lo que decidimos a continuación, evaluar si nuestro modelo experimental, expresa el ARNm que codifica su receptor específico FGFR1. Las células A549 se mantuvieron en condiciones de cultivo control, al alcanzar una confluencia mínima del 90%, se aisló y purificó el ARN total, a partir del cual realizamos el ensayo de expresión génica, específicamente RT-PCR de punto final. La Figura 7 muestra la imagen obtenida de la separación electroforética del producto de PCR amplificado. Las células A549 expresan el ARNm que codifica para FGFR1.



**Figura 7. Expresión del ARNm que codifica para FGFR1.** Las células A549 se mantuvieron en condiciones de cultivo control, se aisló y purificó el ARN total y por RT-PCR de punto final (35 ciclos) se determinó la presencia del ARN que codifica para FGFR1.

## **FGF-2 exacerba la expresión de marcadores moleculares del fenotipo mesenquimal**

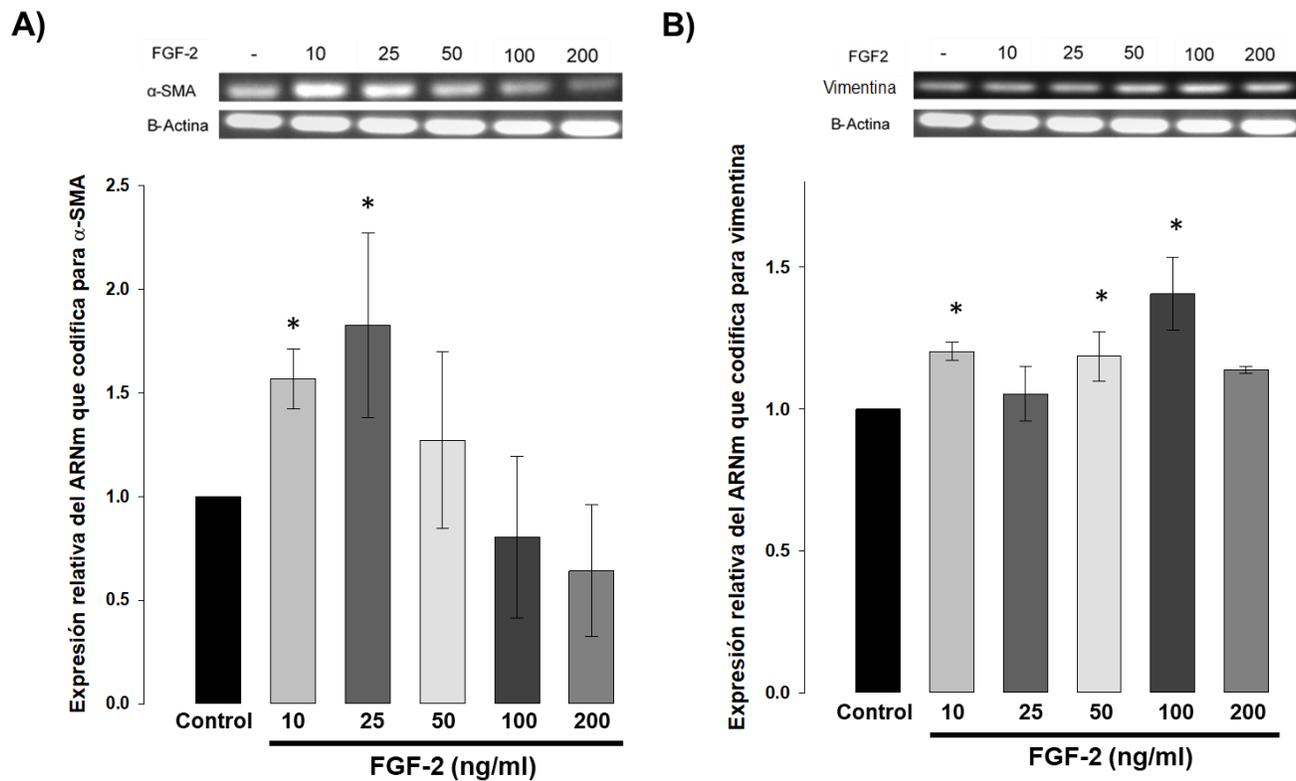
La capacidad migratoria de las células tumorales depende primordialmente de que éstas mantengan su fenotipo mesenquimal, por lo que decimos a continuación evaluar, si la presencia de FGF-2 favorece la expresión del ARNm que codifica para  $\alpha$ -SMA y vimentina, considerados como marcadores moleculares clásicos del fenotipo mesenquimal. Inicialmente, las células A549 fueron tratadas con 100 ng/ml de FGF-2 a diferentes tiempos de tratamiento: 24, 48 y 72 horas, para posteriormente aislar y purificar el ARNm total. Los resultados de la RT-PCR de punto final para  $\alpha$ -SMA y vimentina se muestran en la Figura 8. La presencia de FGF-2, induce un incremento significativo en el nivel de expresión de  $\alpha$ -SMA (Figura 8A) y de vimentina (Figura 8B) en las primeras 24 horas de tratamiento, sin observarse cambios aparentes a las 48 y 72 horas de tratamiento para el caso particular de  $\alpha$ -SMA, ya que, para vimentina, al prolongarse la duración del tratamiento, se observa una reducción significativa en sus niveles de expresión.



**Figura 8. El FGF-2 exacerba la expresión del ARNm que codifica para  $\alpha$ -SMA y vimentina en las primeras 24 horas de tratamiento.** Las células se mantuvieron en presencia de 100 ng/ml de FGF-2 a diferentes tiempos: 24, 48 y 72 horas. Transcurrido ese tiempo se realizó RT-PCR de punto final para determinar el nivel de expresión del ARNm que codifica para: **A)**  $\alpha$ -SMA y **B)** vimentina. Se muestra una imagen representativa para cada condición. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes, (\*) el valor de  $p$  es menor de 0.05. La normalización se realizó con respecto a los niveles de expresión del ARNm que codifica para  $\beta$ -actina, el cual es considerado como control.

Una vez, que determinamos que a las 24 horas de tratamiento con FGF-2, se induce un incremento significativo en los niveles de expresión del ARNm que codifica para  $\alpha$ -SMA y vimentina, decidimos investigar si este efecto depende de la concentración de FGF-2, para cual procedimos a realizar una curva dosis-efecto. Las concentraciones de FGF-2 utilizadas fueron: 10, 25, 50, 100 y 200 ng/ml. Al finalizar el tratamiento, se aisló y purificó el ARN total para los ensayos de RT-PCR de punto final. El apartado A de la Figura 9 muestra que a las concentraciones de 10 y 25

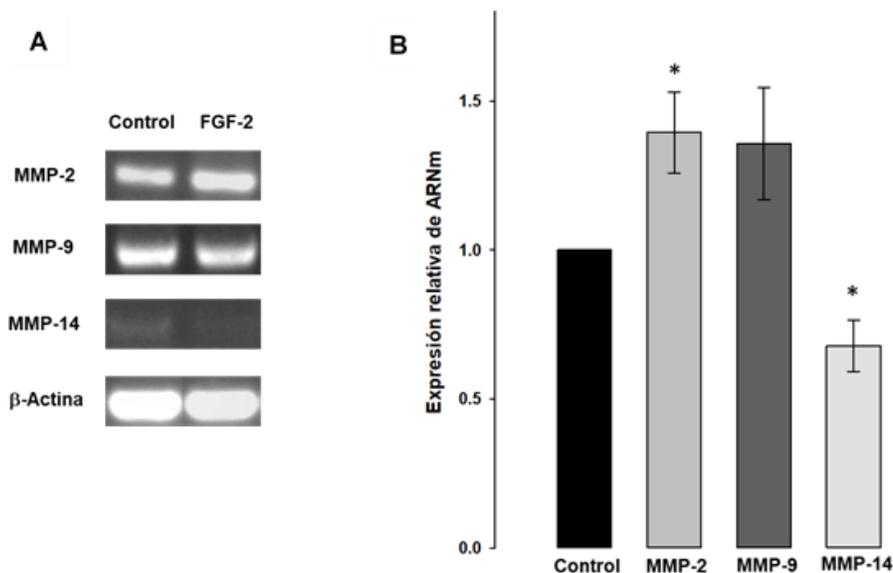
ng/ml de FGF-2 se observa un incremento significativo en los niveles de expresión del ARNm que codifica para  $\alpha$ -SMA, reduciéndose su expresión a partir de 50 ng/ml, hasta alcanzar la concentración máxima de 200 ng/ml. Por su parte, el nivel de expresión de vimentina se ve aumentado a partir de la concentración de 10 ng/ml de FGF-2, manteniéndose dicho efecto estimulador en todas las demás concentraciones (Figura 9B).



**Figura 9. Efecto dosis-dependiente del FGF-2 sobre la expresión del ARNm que codifica para  $\alpha$ -SMA y vimentina.** Las células se mantuvieron durante 24 horas a diferentes concentraciones de FGF-2: 10, 25, 50, 100 y 200 ng/ml. Transcurrido ese tiempo se realizó RT-PCR de punto final para determinar el nivel de expresión del ARNm que codifica para: **A)**  $\alpha$ -SMA y **B)** vimentina. Se muestra una imagen representativa para cada condición. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes, (\*) el valor de  $p$  es menor de 0.05. La normalización se realizó con respecto a los niveles de expresión del ARNm que codifica para  $\beta$ -actina, el cual es considerado como control.

## FGF-2 estimula la expresión de metaloproteinasas

La transición epitelio-mesénquima además de favorecer la capacidad migratoria de las células tumorales, exagera su capacidad invasiva, al incrementar los niveles de expresión de metaloproteinasas, enzimas que degradan los elementos proteicos de la matriz extracelular, dejando el camino libre para el tránsito de las células tumorales. En este sentido, decidimos investigar de manera preliminar, si la presencia de 100 ng/ml de FGF-2 por 24 horas, induce cambios en los niveles de expresión del ARNm que codifica para las principales metaloproteinasas relacionadas en la metástasis: MMP-2, MMP-9 y MMP-14. La Figura 10 muestra que el FGF-2 induce un incremento significativo en el nivel de expresión del ARNm que codifica para la MMP-2 y MMP-9, mientras que para el caso de la MMP-14, se observa una reducción de aproximadamente el 25% con respecto a la condición control.



**Figura 10. FGF-2 incide sobre los niveles de expresión del ARNm que codifica para diferentes metaloproteinasas.** Las células A549 fueron mantenidas en la presencia de 100ng/ml de FGF-2 por 24 horas. Transcurrido ese tiempo se realizó RT-PCR de punto final para determinar el nivel de expresión del ARNm que codifica para las metaloproteinasas: MMP-2, MMP-9 y MMP-14. **A)** Imagen representativa de los productos de PCR obtenidos. **B)** Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes, (\*) el valor de  $p$  es menor de 0.05. La normalización se realizó con respecto a los niveles de expresión del ARNm que codifica para  $\beta$ -actina, el cual es considerado como control

## DISCUSIÓN

La mortalidad de cáncer de pulmón representa la causa número uno de muertes por cáncer en el mundo. A pesar de que se conocen diferentes causas del cáncer de pulmón como el tabaquismo, el radón, el asbesto etc. También se debe considerar los factores genéticos que participan en la metástasis pues esta es la principal causa de muerte debida al cáncer.

El FGF-2 es un factor de crecimiento que se ha visto involucrado en la progresión, proliferación y metástasis en diferentes tipos de cáncer. Varios estudios han relacionado la sobreexpresión de FGF-2 con la expresión de diferentes marcadores moleculares de la EMT (Miura et al., 2019; Steel et al., 2001; Lau et al., 2013; Wang et al., 2021). Sin embargo, se desconoce con precisión el efecto que pudiera estar ejerciendo el FGF-2 sobre la EMT de células no pequeñas de cáncer de pulmón. En el presente estudio se buscó determinar si la presencia de FGF-2 incide sobre la transición epitelio-mesénquima de las células tumorales A549, exacerbando con ello su capacidad migratoria.

Existen evidencias que muestran que el tratamiento con FGF-2 favorece la migración celular en distintos tipos de neoplasias: cáncer de próstata, pulmón y esófago, (Liu *et al.*, 2015; Takase *et al.*, 2016; Baz *et al.*, 2021). Es por ello que lo primero que se decidió investigar fue si el FGF-2 era capaz de favorecer la capacidad migratoria de las células A549. El resultado obtenido muestra claramente que el FGF-2 estimula la capacidad migratoria de las células A549. Este dato es concordante con el presentado por el grupo de Baz y colaboradores en la misma línea celular (Baz *et al.*, 2021).

Se ha descrito en diferentes tipos celulares, que el efecto del FGF-2 es mediado por la activación específica de FGFR1, por lo que se decidió investigar, si las células A549 expresan el ARNm que codifica para dicho receptor. El ensayo de expresión génica mostró que las células A549 expresan el ARNm para dicho receptor, el cual pudiera estar involucrado en el efecto que ejerce el FGF-2 sobre la capacidad

migratoria de las células A549, para lo cual será necesario realizar experimentos de migración celular utilizando de manera simultánea FGF-2 con antagonistas específicos de FGFR1. Además, de complementar con experimentos de inmunodetección para determinar la presencia proteica de dicho receptor. El resultado obtenido a nivel de ARNm coincide con el reportado por los grupos de Schultheis y de Ortiz, igualmente en células provenientes de cáncer de pulmón (Schultheis *et al.*, 2014; Ortiz *et et al.*, 2015).

La capacidad migratoria de las células está fuertemente relacionada con el fenotipo mesenquimal de las células, de ahí que las células que sufren EMT, mejoran su capacidad migratoria. Con esta idea en mente, se decidió investigar, si la presencia crónica de FGF-2 favorece la EMT de las células A549, y una manera de evaluar dicha transición, es determinando los niveles de expresión del ARNm que codifica para marcadores moleculares del fenotipo mesénquimal, tales como  $\alpha$ -SMA, vimentina, N-cadherina, entre otros. Para fines del presente trabajo, se evaluó la expresión de  $\alpha$ -SMA y vimentina, tanto a diferentes concentraciones de FGF-2, como de duración del tratamiento.

La presencia de FGF-2 por 24 horas favorece la expresión del ARNm que codifica para  $\alpha$ -SMA y vimentina. Estos resultados se relacionan positivamente, con el presentado previamente por Miura y colaboradores, quienes demostraron que el silenciamiento de FGF-2 disminuye los niveles de expresión de vimentina en NSCLC. (Miura *et al.* 2019; Wang *et al.* 2020). Con respecto a la expresión de  $\alpha$ -SMA regulada por FGF-2, Strutz y colaboradores, mostraron en otros tipos epiteliales, que FGF-2 induce un incremento en la expresión de  $\alpha$ -SMA *et al.* (2002). Estos resultados nos permiten sugerir que el FGF-2 favorecen el fenotipo mésoenquimal de las células A549, y que este efecto depende tanto de la duración del tratamiento como de la concentración de FGF-2. Siendo la duración óptima de

24 horas y la concentración de 100 ng/ml, según nuestras propias condiciones experimentales.

La EMT no solamente favorece la capacidad migratoria de las células, sino también su capacidad invasiva, la cual se puede evaluar por ensayos de invasión en cámaras transwell o determinando los niveles de expresión del ARNm que codifica para algunas metaloproteinas, las cuales son proteasas que degradan las proteínas de la matriz extracelular, dejando el camino libre para que las células pueden moverse (Coronato et al., 2012). Los resultados obtenidos revelan de manera interesante que la presencia por 24 horas de FGF-2 aumentó la expresión del ARNm que codifica para MMP-2 y MMP-9 en las células A549. El efecto de FGF-2 sobre la expresión de metaloproteinasas ya había sido previamente reportado por Jeinniskens y colaboradores en la misma línea celular (Jeinniskens et al., 2006), por su parte, Strutz y su grupo, mostraron que el FGF-2 aumentaba la expresión de MMP-9 y MMP-2 en la línea celular NP-1 (Strutz et al., 2002).

Los resultados preliminares reportados en el presente trabajo, nos permiten sugerir un papel preponderante del FGF-2 sobre la capacidad migratoria de las células A549, a consecuencia del incremento del número de células que transitan del fenotipo epitelial a mesénquimal.

Adicional a nuestros resultados hay que considerar que existen otras vías que participan junto con el FGF-2 en procesos tumorales como la EMT o la migración. En este sentido el grupo de trabajo de Baz., demostró en células provenientes de cáncer pulmonar, que el FGF-2 participa junto con el TGF- $\beta$ , en la regulación de marcadores moleculares del fenotipo epitelial y mesenquimal, a su vez favoreciendo la migración (Baz et al. 2021).

El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte a nivel mundial debido a neoplasias. Un porcentaje muy alto de enfermos por cáncer de pulmón presentan metástasis, por lo que el FGFR1 activado por FGF-2, pudiera ser considerado un blanco farmacológico para inhibir o enlentecer el proceso metastásico de las células no pequeñas de carcinoma de pulmón.

## CONCLUSIONES

1. El FGF-2 estimula la capacidad migratoria de las células A549.
2. Las células A549 expresan FGFR1, receptor de mayor afinidad por FGF-2.
3. El FGF-2 favorece el mantenimiento del fenotipo mesénquimal de las células A549, aumentando la expresión de  $\alpha$ -SMA y vimentina en las primeras 24 horas de tratamiento.
4. El FGF-2 induce un incremento en los niveles de expresión de MMP-2 y MMP-9, lo cual pudiera incidir directamente sobre la capacidad invasiva de las células A549.

## BIBLIOGRAFÍA

1. American Joint Committee on Cancer. Lung. In: AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed. New York, NY: Springer;( 2018).589.
2. Barbeito CG, Laube PF Andrés (2005) Los factores de crecimiento. Aspectos básicos y potencialidades terapéuticas. *Analecta Veterinaria* 25 (1): 8-27
3. Beenken A. y Mohammadi M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 8(3): 235–253.
4. Bikfal Andreas, Klein Sharon, Pintucci Giuseppe, y Rifkin Daniel B. (1997). Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2. *Endocrine Reviews* 18 (1)
5. Billottet Clotilde, Elkhatib Nadia, Thiery Jean-Paul, y Jouanneau Jacqueline (2004). *Molecular Biology of the Cell* 15: 4725–4734,
6. Baz Lamis M.F.Lamis, Shoukry Nahla M. , Hafez Hani S., Guzy Robert D., y Salem Mohamed Labib (2021). Fibroblast Growth Factor 2 Augments Transforming Growth Factor Beta 1 Induced Epithelial-mesenchymal Transition in Lung Cell Culture Model. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* ; 19(4): 348–361
7. Brown Wells S., Tan Li, Smith Andrew, Gray Nathanael S. y Wendt Michael K. (2016). Covalent Targeting of Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibits Metastatic Breast Cancer. *Mol Cancer Ther*; 15(9)
8. Coronato Silvia, Laguens Graciela, Girolamo Vanda di (2012). Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *medicina* 72 (6),
9. Cuadrado Gómez, Laura, Tracey Natasha, Ma Ruoyu, Qian Binzhi y. Brunton Valerie G. (2017). Mouse models of metastasis: progress and prospects. *Disease Models & Mechanisms.* 10: 1061-1074
10. Ghaderi Madeh y Niknejad Azadeh (2021). Tumor Microenvironment: Involved Factors and Signaling Pathways in Epithelial-Mesenchymal Transition. *Int J Cancer Manag.* 14(7).
11. Giri Dipak, Ropiquet Frederic, y Titman Michael (1999). Alterations in Expression of Basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2) and Its Receptor FGFR-1 in Human Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research.* 5: 1063–1071
12. GLOBOCAN (2020). Cancer today. Disponible en línea <https://gco.iarc.fr/today/home>
13. Hanahan, D & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell press*, 100 (1), 57-70.
14. Hejmadi Momna. (2010). Introduction to cáncer biology: How cancer arise. Ventus Publishing. Disponible en línea [BookBoon.com](http://BookBoon.com)

15. Hoyos N., Montoro F.J., García J.J., Morales B., Pavón M.J. (2017). Cáncer de pulmón: ¿qué hay de nuevo? *Revista de Patología Respiratoria*. 20(2).
16. Jenniskens Y. M., W. Koevoet W., Bart A. C. W. Weinans H., Jahr H., Verhaar M. J. A. N (2006). Biochemical and functional modulation of the cartilage collagen network by IGF1, TGF $\beta$ 2 and FGF-2. *Osteoarthritis and Cartilage* 14(11)
17. Jong Johannes S., Diest Van Paul J, Van Valk Der Paul y Baak Jan P. A. (1998). Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer correlations with proliferation and angiogenesis. *Journal of Pathology*, 184: 53–57
18. Lau Man-Tat, So Wai-Kin, Leung Peter C. K. (2013). Fibroblast Growth Factor 2 Induces E-Cadherin Down- Regulation via PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK Signaling in Ovarian Cancer Cells. *PLOS ONE* 8 (3)
19. León Joel de, Pareja Arturo. (2019) Inmunología del cáncer: bases moleculares y celulares de la carcinogénesis. *Horiz Med (Lima)* 19(2): 84-92
20. Liu Man y Xing Lu-Qi (2017). Basic fibroblast growth factor as a potential biomarker for diagnosing malignant tumor metastasis in women. *Oncology Letters* 14: 1561-1567.
21. Malhotra Jyoti, Malvezzi Matteo, Negri Eva, Vecchia Carlo La y Boffetta Paolo (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J*. 48: 626–627.
22. Miura Kentaro, Oba Takaaki, Hamanaka Kazutoshi and Ito Ken-ichi (2019). FGF-2/FGFR1 pathway activation together with thymidylate synthase upregulation is induced in pemetrexed-resistant lung cancer cells. *Oncotarget* 10(11): 1171-1192
23. Martino Érica, Tomlinson Darren C., y Knowles Margaret A. (2012). A Decade of FGF Receptor Research in Bladder Cancer: Past, Present, and Future Challenges. *Advances in Urology*. 10
24. Matsubara Misako Sato, Matsubara Tsutomu, Daikoku Atsuko, Okina Yoshinori, Longato Lisa, Rombouts Krista, i Thuy Thanh Le Th, Adachi Jun, Tomonaga Takeshi, Ikeda Kazuo, Yoshizato Katsutoshi, Pinzani Massimo, y Kawada Norifumi.(2017). Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) regulates cytoglobin expression and activation of human hepatic stellate cells via JNK signaling. *J. Biol. Chem.* 292(46): 18961–18972
25. Moustakas Aristidis y Heldin Carl-Henrik. (2007). Signaling networks guiding epithelial–mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci*. 9 (10) 1512–1520
26. Organización Mundial de la Salud. (2018). Cáncer datos y cifras. Disponible en línea <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
27. Ornitz David M. y Itoh Nobuyuki (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *WIREs Dev Biol* 4:215–266

28. Pascual Jimenez Ana, Mitchell Kelly, Siebzehrubl Florian A. y Lathia Justin D. (2020) FGF-2: a novel druggable target for glioblastoma?. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 24 (4): 311-318
29. Pelengaris S. & Khan M. (2013). *The molecular biology of cancer: A bridge from bench to bedside*. John Wiley & Sons. 632.
30. Pecorino, L. (2012). *Molecular biology of cancer. Mechanisms, targets, and therapeutics*. Oxford University Press. 365 .
31. Powers C J, McLeskey S W y Wellstein A. (2000). Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer* 7 :165–197
32. Rivera Rivera S., Ruiz Calderillo G. y Quinana Quintana M. (2017): *Oncología general para profesionales de la salud de primer contacto: Epidemiología del cáncer y tendencias en una unidad médica de tercer nivel*. España. Permanyer 1-85
33. Said B.M Nur Akmarina, Williams Elizabeth D. (2011). Growth Factors in Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis. *Cells Tissues Organs* 193:85–97
34. Salazar Garza Jaime G, Sánchez Juárez Paula (2014): *Introducción, El Cáncer*. Universidad autónoma de Nuevo León 17-19
35. Samet, Jonathan M, Tang Erika Avila, Boffetta Paolo, Hannan Lindsay M., Marston., Susan Olivo., Thun Michael J, y Rudin Charles M. (2009): Lung Cancer in Never Smokers: Clinical Epidemiology and Environmental Risk Factors. *Clin Cancer Res* 15(18)
36. Schabath Matthew B, Cote Michele L. *Cancer Progress and Priorities: Lung cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 28(10): 1563–1579
37. Schultheis Anne M, Bos Marc, Schmitz Katja, Wilsberg Lea, Binot Elke, Wolf Jurgen, Buttner Reinhard y Schildhaus Hans-Ulrich (2014). Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) amplification is a potential therapeutic target in small-cell lung cancer. *Modern Pathology* 27: 214–221
38. Sahores Ana , Figueroa Virginia, May María, Liguori2 Marcos, Rubstein Adrián, Fuentes Cynthia, Jacobsen Britta M., Elía Andrés, Rojas Paola Paola, Sequeira Gonzalo R., Álvarez Michelle M., González Pedro, Gass Hugo, Hewitt5 Stephen, Molinolo Alfredo, Lanari Claudia y Lamb Caroline A. (2018). Increased High Molecular Weight FGF-2 in Endocrine-Resistant Breast Cancer. *Hormones and Cancer* 9:338–348
39. Steele, I.A., Edmonson, R.G., Bulmer, J.N., Bolger, B.S., Leung, H.Y., and Davies, B.R. (2001). Induction of FGF receptor 2-IIIb expression and response to its ligands in epithelial ovarian cancer. *Oncogene* 20: 5878–5887.
40. Strutz Frank, Zeisberg Michael Ziyadeh Fuad N., Yang Chang-Qing, Kalluri Raghu, Muller Gerhard A., y Neilson Eric G. (2002). Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney International*. 61: 1714–1728

41. Sung, H, Ferlay, J, Siegel, RL, Laversanne, M, Soerjomataram, I, Jemal, A, Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries (2021). *CA Cancer J Clin.*: 71: 209- 249.
42. Takase Nobuhisa, Koma Yu-ichiro, Urakawa Naoki, Nishio Mari, Arai Noriaki, Akiyama Hiroakic, Shigeoka Manabu, Kakeji Yoshihiro y Yokozak Hiroshi (2016). NCAM- and FGF-2-mediated FGFR1 signaling in the tumor microenvironment of esophageal cancer regulates the survival and migration of tumor-associated macrophages and cancer cells. *Cancer Letters* 380 (1): 47-58
43. Teven Chad M., Farina Evan M, Rivas Jane, Reid Russell R. (2014). Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases. *Genes & Diseases* 1: 199-213
44. Thandra Krishna Chaitanya 1, Barsouk Adam, Saginala Kalyan, Aluru Sukumar John, Barsouk Alexander (2019) Epidemiology of lung cancer. *Contemp Oncol (Pozn)* ; 25 (1): 45–52
45. Troncoso D, Madarriaga I, Aldana S, Herreño A, Chaparro V, Molina M, Rey L, Ramírez A, Montoya C, Valderrama A, Cañas A, Rojas A (2017). Transición epitelio mesénquima: de lo molecular a lo fisiológico. *Univ Med* 58(4)
46. Turner N. y Grose R. (2010) Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 10(2): 116-129
47. Valastyan Scott y Weinberg Robert A. (2011). Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* 147.
48. Velasco Moctezuma Carla R., Zarco Patiño M. (2009) Cáncer de pulmón Análisis de radiología México 1:33-45
49. Wang Meijuan, Mao Xinmei, Wang Shying (2020). Clinical significance of miR-139-5p and FGF-2 in ovarian cancer. *JBUON* 26(3): 663-669
50. Wesche, J., Haglund, K. & Haugusten, E.M., (2011) Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochemical Journal*, 437(2): 199-213