



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**Facultad de Medicina**

**Licenciatura en Biomedicina**

**Instituto de Fisiología**

**Laboratorio de Neuroendocrinología**

**Título de Tesis:**

**“Efecto de IGF-1 sobre la expresión de biomarcadores de células madre tumorales en las células A549 provenientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas.”**

**Para obtener el Título de:**

**Licenciada en Biomedicina**

**Presenta:**

**Natalia Herrera Castillo**

**Director de Tesis**

**D.C. Eduardo Monjaraz Guzmán**

*Eduardo Monjaraz G.*

**Puebla, Pue.**

**Junio, 2025.**

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN .....	5
1. ANTECEDENTES .....	6
1.1 Antecedentes generales .....	6
1.1.1 Generalidades del cáncer .....	6
1.1.2 Cáncer de pulmón .....	7
1.1.3 Cáncer de pulmón de células de no pequeñas .....	14
1.1.4 Células madre de cáncer .....	14
1.2.1 Factores de crecimiento similares a la insulina .....	18
1.2.2 Relación entre IGF-1/IGFR y las CSC de NSCLC .....	21
2. JUSTIFICACIÓN .....	22
3. HIPÓTESIS .....	23
4. OBJETIVOS .....	23
4.1 Objetivo General.....	23
4.2 Objetivos Específicos.....	23
5. MATERIAL Y MÉTODOS .....	24
5.1 Cultivo celular .....	24
5.2 Ensayo de proliferación celular.....	25
5.3 Experimentos de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR) .....	25
5.3.1 Extracción del Ácido Ribonucleico Total .....	25
5.3.2 Determinación de la cantidad y calidad del Ácido Ribonucleico Total.....	25

5.3.3 Síntesis de Ácido Desoxirribonucleico Complementario/ Retro Transcripción (RT).....	26
5.3.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	26
5.3.5 Separación electroforética y densitometría .....	28
5.4 Análisis de datos.....	28
6. RESULTADOS .....	28
6.1 Las células A549 expresan el ARNm que codifica para los diferentes elementos del sistema IGF (IGF-1, IGF1R, IGF-2 e IGF2R).....	28
6.2 IGF-1 favorece la capacidad proliferativa de las células A549. ....	29
6.3 IGF-1 influye sobre la expresión de elementos moleculares relacionados a la capacidad proliferativa de las células A459.....	30
6.4 IGF-1 influye sobre la expresión de biomarcadores de células madre de cáncer (CSC) en la línea celular A549. ....	31
7. DISCUSIÓN .....	32
8. CONCLUSIONES.....	42
9. BIBLIOGRAFÍA .....	42

## ABREVIATURAS

<b>ABC</b>	Proteínas transportadoras dependientes de ATP
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>ALDH1</b>	Aldehído deshidrogenasa 1
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>CSC</b>	Células madre de cáncer
<b>GH</b>	Hormona de crecimiento
<b>IARC</b>	Agencia Internacional sobre la Investigación en Cáncer
<b>IGF</b>	Factor de Crecimiento Similiar a la Insulina
<b>IGF-1</b>	Factor de Crecimiento Similiar a la Insulina Tipo 1
<b>IGF-2</b>	Factor de Crecimiento Similar a la Insulina Tipo 2
<b>IGF1R</b>	Receptor del Factor de Crecimiento Similiar a la Insulina Tipo 1
<b>IGF2R</b>	Receptor del Factor de Crecimiento Similiar a la Insulina Tipo 2
<b>IGFBP</b>	Proteínas Transportadoras de los Factores de Crecimiento Similares a la Insulina
<b>IR</b>	Receptor de Insulina
<b>ITG-<math>\alpha</math></b>	Integrina alfa
<b>ITG-<math>\beta</math></b>	Integrina beta
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>NSCLC</b>	Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>RT</b>	Retrotranscripción
<b>RT-PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Retrotranscripción
<b>SCLC</b>	Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino

## RESUMEN

El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) representa uno de los mayores desafíos en el campo de la oncología, debido a su alta incidencia, mortalidad y resistencia a los tratamientos convencionales. Este trabajo de investigación se centra en evaluar el efecto del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) sobre la proliferación celular y la expresión de biomarcadores relacionados con el fenotipo de células madre de cáncer (CSC) en la línea celular A549, modelo representativo del NSCLC.

Una de las principales complicaciones del cáncer de pulmón de células no pequeñas es su alta recurrencia, y esto se debe fundamentalmente, a que las células tumorales transitan hacia un fenotipo de célula madre, lo que les confiere quimiorresistencia y alta capacidad de autorrenovación. Diversos estudios han mostrado que la presencia de IGF-1 favorece el desarrollo y la progresión de diferentes tipos de tumores. Por lo que el propósito del presente trabajo de tesis es determinar si la presencia de IGF-1 favorece la capacidad proliferativa de las células A549, provenientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas, y si este efecto está relacionado con un incremento en los niveles de expresión de biomarcadores moleculares relacionados al fenotipo de células madre.

Los resultados obtenidos muestran que el IGF-1 promueve un incremento significativo en la proliferación celular y un aumento en la expresión de elementos moleculares relacionados al ciclo celular como Ciclina B y Ki-67. Además, se observó que IGF-1 no solo actúa como un mitógeno, sino como un factor inductor del fenotipo de célula madre.

Estos hallazgos refuerzan la relevancia de IGF-1 y su receptor, como potencial blanco terapéutico en el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas. Además, abre nuevas líneas de investigación para entender los mecanismos moleculares que subyacen a la resistencia tumoral y la agresividad en este tipo de cáncer.

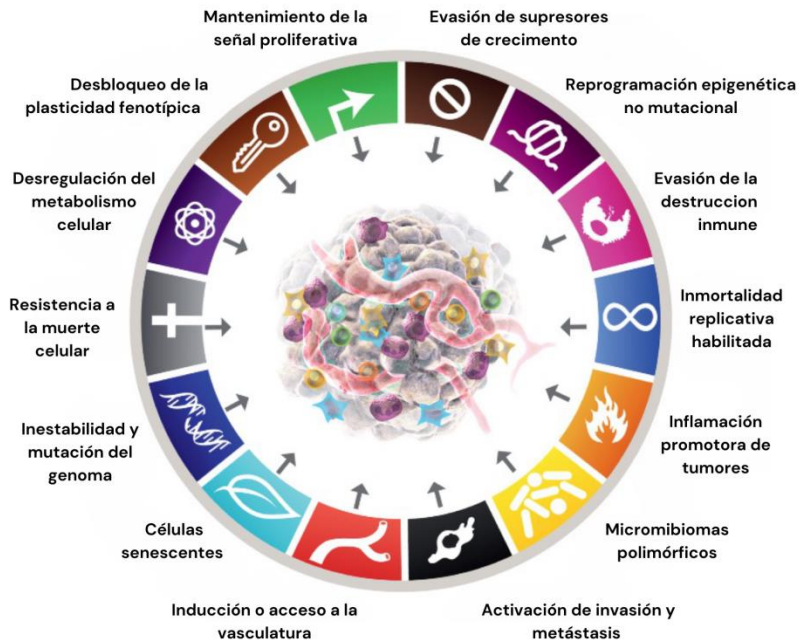
# 1. ANTECEDENTES

## 1.1 Antecedentes generales

### 1.1.1 Generalidades del cáncer

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define al cáncer como un grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Se caracteriza por la rápida multiplicación de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales, propagándose e invadiendo otros órganos y tejidos a través de un proceso denominado metástasis. La metástasis es considerada como la principal causa de muerte provocada por el cáncer (OMS, 2022). La Agencia Internacional sobre la Investigación del Cáncer (IARC, del inglés *International Agency for Research in Cancer*) reportó en 2022, que se le atribuyeron casi 10 millones de defunciones a esta enfermedad, considerándola una de las principales causas de muerte a nivel mundial (IARC, 2022).

Esta enfermedad es resultado de una acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas (**Figura 1**) que les permite a las células sobrevivir, replicarse y evadir mecanismos que regulan la apoptosis, la proliferación y el ciclo celular (Hanahan, 2022). Las alteraciones genéticas, ya sean hereditarias o esporádicas, pueden afectar los mecanismos responsables de mantener y reparar el ácido desoxirribonucleico (ADN) dañado (Meza-Junco et al., 2006). Como consecuencia a estos cambios, las células normales se transforman en células tumorales malignas (Sociedad Americana del Cáncer, 2019).



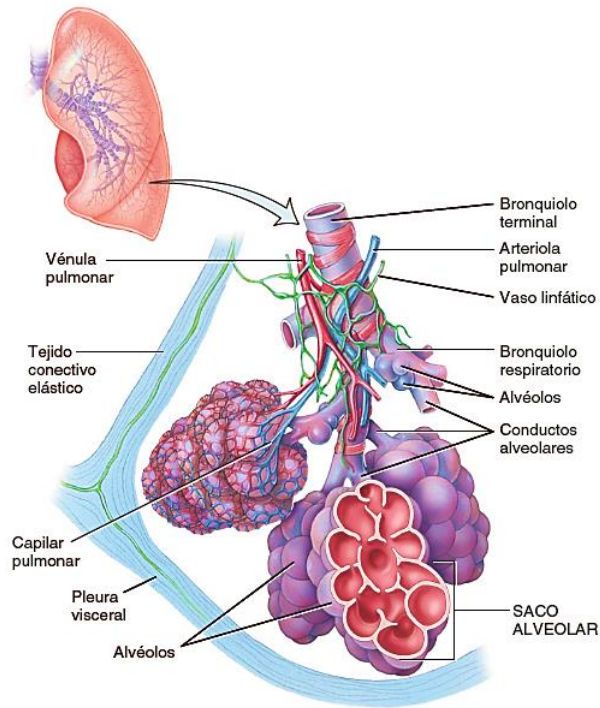
**Figura 1.** Mecanismos celulares y moleculares que le permiten a las células desarrollar y adquirir capacidades fenotípicas durante el desarrollo y progresión tumoral. Imagen modificada. (Hanahan, 2022).

Dentro de los tipos de cáncer con mayor número de casos nuevos registrados hasta el 2022 a nivel mundial se encuentran: pulmón (2.48 millones), mama (2.29 millones), colorrectal (1.92 millones), próstata (1.46 millones), gástrico (0.968 millones) y hepático (0.866 millones), considerando ambos sexos y todas las edades (International Agency of Research in Cancer, 2022). En cuestión del número de muertes ocasionadas por cáncer, el cáncer de pulmón se lleva el primer lugar con 1.8 millones (18%) (GLOBOCAN, 2022), dado esto, se considera al cáncer de pulmón como un serio problema de salud pública, tanto por incidencia como mortalidad, lo que vuelve imprescindible continuar con el estudio que permita caracterizar y descubrir nuevos blancos terapéuticos, así como comprender el agresivo comportamiento de esta enfermedad.

### 1.1.2 Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es una enfermedad heterogénea que surge como resultado de la desregulación del crecimiento de las células anormales y la evasión de los

mecanismos que mantienen la homeostasis en los pulmones (Morton et al., 2022). Anatómicamente, la tráquea se bifurca para formar lo que se conoce como el árbol bronquial hasta llegar a los alvéolos (**Figura 2**), estos se componen por dos tipos de células; las más numerosas son las tipo I, son células epiteliales pavimentosas simples y constituyen el sitio principal del intercambio entre el oxígeno y el dióxido de carbono, mientras que las células alveolares tipo II, también conocidas como células septales, son células epiteliales cúbicas cuyas superficies tienen microvellosidades y secretan líquido alveolar que contiene surfactante capaz de mantener húmeda la superficie entre las células y el aire, y a su vez, reducir la tensión superficial para disminuir la tendencia de los alvéolos a colapsar, se encuentran en menor proporción y se disponen entre las células tipo I (Tortora & Derrickson, 2013). El cáncer de pulmón se origina a partir de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en estas células, donde la carcinogénesis de una célula normal a un carcinoma invasivo es un proceso de varios pasos precedido por una lesión premaligna, como hiperplasia, metaplasia o displasia del epitelio bronquial (Panani & Roussos, 2006). Por lo tanto, el estudio histopatológico del cáncer de pulmón basado en sus características celulares y moleculares es parte esencial para clasificar, diagnosticar y manejar esta enfermedad con mayor eficiencia.

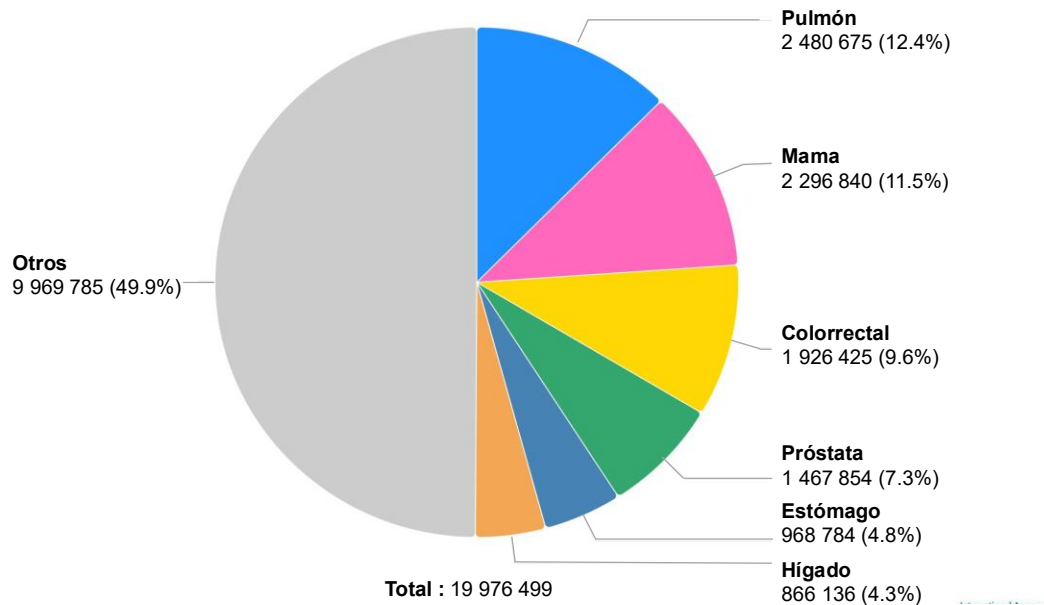


**Figura 2.** Diagrama de una porción de un lobulillo pulmonar (Tortora & Derrickson, 2013).

### A) Epidemiología mundial

Respecto a la incidencia, la última estimación de GLOBOCAN en 2022 declaró 2,480,675 nuevos casos diagnosticados de cáncer de pulmón a nivel mundial (**Figura 3**), reconociéndolo como el tipo de cáncer más común, considerando ambos sexos y todas las edades (GLOBOCAN, 2022). Con un estimado de 1,572,045 nuevos casos, el cáncer de pulmón es el tipo de cáncer más común en hombres y el tercer tipo más común en mujeres con 908,630 casos (GLOBOCAN, 2022).

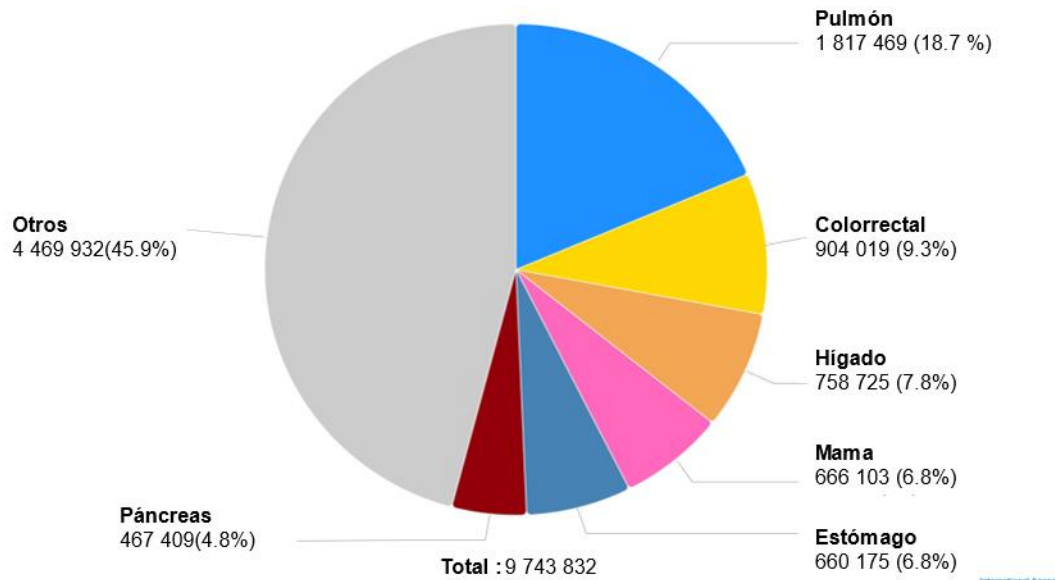
**Estimación del número de casos nuevos en 2022, Mundial, ambos sexos, todas las edades .**



**Figura 3.** Gráfica de los nuevos casos diagnosticados de cáncer a nivel mundial. Imagen modificada (GLOBOCAN, 2022).

En cuestión de mortalidad, los datos de GLOBOCAN en 2022, arrojan al cáncer de pulmón como la primera causa de muerte ocasionada por cáncer a nivel mundial (considerando ambos sexos y todas las edades) (**Figura 4**). Ese mismo año, se estimaron 1,817,469 muertes debido a este tipo de cáncer, representando el 18.7 % del total de defunciones ocasionadas por cáncer. En hombres, el cáncer de pulmón es el principal responsable de las muertes ocasionadas por esta enfermedad, con un estimado de 1,233,241 defunciones, mientras que en mujeres representa el segundo tipo de cáncer más mortal después del cáncer de mama con un estimado de 607,465 fallecimientos a nivel mundial (GLOBOCAN, 2022).

**Estimación del número de muertes en 2020, Mundial, ambos sexos, todas las edades.**

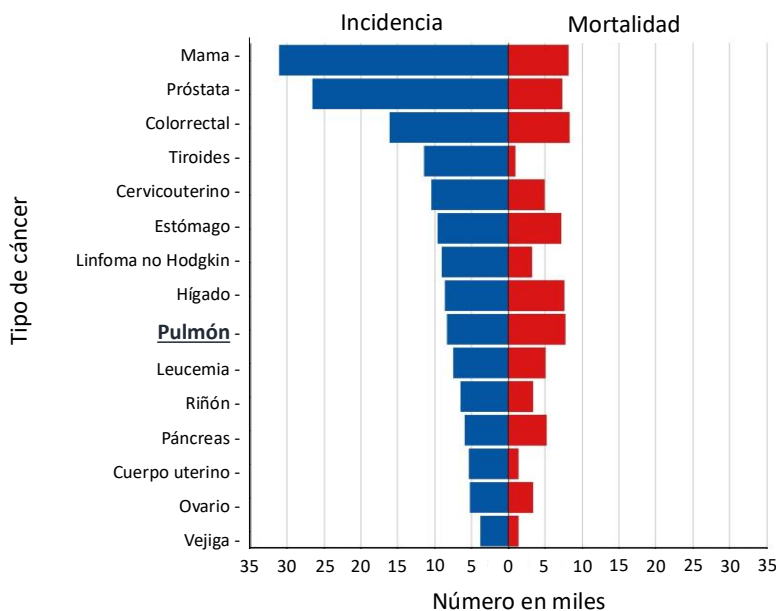


**Figura 4.** Gráfica de la mortalidad provocada por cáncer a nivel mundial. Imagen modificada (GLOBOCAN, 2022).

*B) Epidemiología nacional*

De acuerdo con los datos de GLOBOCAN en 2022, el cáncer de pulmón en México ocupó el noveno lugar en incidencia debido a que se registraron 8,275 casos nuevos, sin embargo, se posicionó en tercer lugar en cuestión de mortalidad con 7,808 número de defunciones (**Figura 5**), esto considerando ambos sexos y todas las edades (GLOBOCAN, 2022). En hombres, el cáncer de pulmón ocupa el cuarto lugar en incidencia con 5,062 casos nuevos en 2022 y el segundo en mortalidad, después del cáncer de próstata, con 4,820 de defunciones. En mujeres el cáncer de pulmón ocupa el onceavo lugar en cuestión de incidencia con 3,195 nuevos casos en 2022 y el séptimo lugar en mortalidad con 2,998 defunciones el mismo año (GLOBOCAN, 2022).

### Estimación de la incidencia y mortalidad en 2022, Mundial, ambos sexos, todas las edades.



**Figura 5.** Gráfica de incidencia y mortalidad del cáncer en México. Imagen modificada (GLOBOCAN, 2022).

#### C) Sintomatología

El cáncer pulmón puede manifestar diversos síntomas indicativos de su aparición, entre los más comunes se encuentran (World Health Organization, 2023):

- Tos persistente.
- Dolor en el pecho.
- Dificultad respiratoria.
- Tos con sangre.
- Fatiga.
- Pérdida de peso sin causa aparente.
- Infecciones en los pulmones de manera recurrente.

#### D) Factores de riesgo

El cáncer de pulmón es una enfermedad de etiología variable, resultado de diferentes factores de riesgo que predisponen su desarrollo. Entre los factores de riesgo no modificables se encuentra la edad, se estima que el 53% de los casos ocurre

en personas de 55-74 años, mientras que el 37% restante ocurre en mayores de 75 años (Thandra et al., 2021). Globalmente, los hombres son dos veces más propensos a ser diagnosticados y a morir de cáncer de pulmón en comparación con las mujeres, se sugiere que esto se debe a la diferencia en el consumo de tabaco respectivamente. Así mismo, el historial familiar juega un papel clave al considerar la presencia de algún componente donde se involucran los genes *CY1A1*, *TP53*, *ALK* y *BRAF*, lo que las vuelve más susceptibles a desarrollar cáncer de pulmón a pesar de no ser fumadoras (Thandra et al., 2021).

Dentro de los factores de riesgo modificables, se considera al tabaquismo como la causa más común del cáncer de pulmón, se estima que este hábito es el responsable del 85-90% de los casos de este tipo de cáncer (Thandra et al., 2021). Otros factores de riesgo incluyen la exposición a radiación como tratamiento para otros tipos de cáncer, la contaminación del aire, la exposición a ciertos metales (cromo, níquel, arsénico, entre otros) y algunas enfermedades como fibrosis pulmonar o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Faraz Siddiqui & Siddiqui, 2019).

#### *E) Diagnóstico y tratamiento*

Los métodos de diagnóstico para el cáncer de pulmón incluyen el examen físico, imagenología (rayos-X, tomografía computarizada, resonancia magnética), broncoscopia, biopsia para una examinación histopatológica y pruebas moleculares que permitan identificar mutaciones genéticas o biomarcadores para proporcionar una mejor opción de tratamiento (World Health Organization, 2023).

Dependiendo del estadio, la histología, las alteraciones genéticas y la condición del paciente, el tratamiento para el cáncer de pulmón usualmente consiste en cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y terapia molecular dirigida, ya sea de manera exclusiva o combinada (Alexander et al., 2020). Pese a los esfuerzos por mejorar la tasa de supervivencia de los pacientes al proporcionar mejores tratamientos, en los casos avanzados, las células tumorales son capaces de presentar resistencia mediante diferentes mecanismos intrínsecos y proceder a invadir tejidos distantes (Wang et al., 2021). Desde la última década, el tratamiento para el este tipo de cáncer ha cambiado drásticamente debido al descubrimiento de diferentes biomarcadores que

han dado pie a un tratamiento dirigido capaz de mantener la tasa de supervivencia de los pacientes de 3-5 años en promedio. Lamentablemente, menos del 25% de los pacientes con cáncer de pulmón son beneficiados con la terapia dirigida, esto debido a que no todos presentan alteraciones genéticas o aún no se han descrito los blancos farmacológicos específicos (Wang et al., 2021).

### **1.1.3 Cáncer de pulmón de células de no pequeñas**

El cáncer de pulmón cuenta con un gran rango de características histo-clínico-patológicas que permiten clasificarlo en cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, del inglés *small cell lung cancer*) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, del inglés *non-small cell lung cancer*) que representan el 15% y el 85% del total de diagnósticos respectivamente (Thai et al., 2021).

Los subtipos principales del cáncer de pulmón de células no pequeñas son (European Sociocety for Medical Oncology, 2019):

1. Carcinoma de células grandes (carcinoma indiferenciado): este tipo representa aproximadamente el 10-15% de todos los cánceres de pulmón y recibe su nombre por el aspecto que presentan las células bajo examinación microscópica.
2. Carcinoma de células escamosas: representan aproximadamente un 25-30% de todos los cánceres de pulmón; se desarrolla en las células escamosas que recubren las vías respiratoria, a menudo se encuentra en los bronquios y generalmente es causado por el tabaquismo.
3. Adenocarcinoma: representan alrededor del 40% de todos los cánceres de pulmón. Estos tumores surgen en las células productoras de mucina que recubren las vías respiratorias (células caliciformes) y tiende a localizarse en las áreas periféricas del pulmón.

### **1.1.4 Células madre de cáncer**

El cáncer de pulmón es considerado como la primera causa de muerte ocasionada por cáncer a nivel mundial, esto debido a que la mayoría de los pacientes

desarrollan tumores secundarios que frecuentemente causan una recaída mortal (Walcher et al., 2020). Se ha demostrado que existen poblaciones celulares heterogéneas dentro del mismo tumor, que presentan diferencias genéticas y fenotípicas, otorgándoles múltiples capacidades y características (Herrerros-Pomares, 2022). Una de las principales razones a las que se le atribuye la poca respuesta al tratamiento, es la presencia de un nicho de células tumorales capaces de sobrevivir a la terapia convencional como la quimioterapia y la radioterapia (Cortes-Dericks & Galetta, 2022), a estas células se les conoce como células madre de cáncer (CSC, del inglés *cancer stem cells*).

El concepto de CSC surgió después de que, en 1997, Bonnet y Dick demostraran que la leucemia mieloide aguda está organizada de manera jerárquica al ser originada de una célula hematopoyética primitiva. Desde entonces, la presencia de CSC se ha reportado en múltiples tipos de cáncer, como el de mama, cerebro, colon, páncreas y pulmón (Herrerros-Pomares, 2022). Las CSC son una subpoblación de las células tumorales, con alta capacidad de proliferación, autorrenovación y diferenciación (Su et al., 2021). La presencia de este tipo de células se relaciona directamente con la resistencia a la quimioterapia y por consiguiente la recurrencia del cáncer mediante la progresión tumoral y la metástasis (Walcher et al., 2020).

La investigación del cáncer de pulmón ha evidenciado algunos de los mecanismos celulares y moleculares que presentan estas células, donde se incluye la división asimétrica y autorrenovación, es decir, la facultad de generar una CSC hija y una población de células con una alta capacidad proliferativa que les permite mantener su pluripotencialidad y a su vez, el tamaño de su población (Herrerros-Pomares, 2022). Las CSC pueden regular su ciclo celular al enlentecerlo y entrar en un estado de latencia conocido como senescencia. Son capaces de entrar la fase G0 del ciclo celular de manera reversible en respuesta a diferentes estímulos y reactivarse a través de mecanismos moleculares y transcripcionales (Aramini et al., 2022). Además, utilizan las proteínas transportadoras ABC (del inglés, *ATP-binding cassette*) donde se incluyen las ABCG2, ABCB1 o ABCC1, que les confieren la capacidad de resistencia al extraer los fármacos del interior de la célula con el fin de evadir su efecto citotóxico

(Herreros-Pomares, 2022). Así mismo, pueden evadir diferentes tipos de muerte celular; como sobrevivir a la pérdida de adhesión a un sustrato conocido como anoikis, además de poder crecer sin la necesidad de una superficie sólida ya que sintetizan altos niveles de factores de crecimiento y receptores de matriz extracelular. Pueden sobreexpresar moléculas antiapoptóticas como BCL2 y BCLXL, que actúan como reguladores negativos de la permeabilización de la membrana mitocondrial, liberan citocromo C, survivina (perteneciente a los inhibidores de la apoptosis), y niveles más bajos de caspasa 8 (Herreros-Pomares, 2022). De igual forma tienen la capacidad de escapar del sistema inmune innato y adaptativo, cambiar el microambiente tumoral a uno inmunosupresor y pro-tumorigénico y adquirir un cambio de fenotipo de epitelial a mesenquimal (Cortes-Dericks & Galetta, 2022).

#### - **Biomarcadores de las CSC**

Debido al importante papel que juegan las CSC en el desarrollo tumoral, se ha recurrido a el uso de biomarcadores que permitan identificarlas y diferenciarlas, ya que podría resultar en un mejor diagnóstico, predicción de vida del paciente y mayor eficiencia de la terapia dirigida (Zheng et al., 2022). Las CSC de pulmón fueron identificadas por primera vez en 1981 por Carney y colaboradores. Este grupo encontró que, 1.5% de las células tumorales provenientes de pacientes con adenocarcinoma de pulmón eran capaces de formar colonias cuando eran cultivadas *in vitro* y reconstituir tumores cuando eran inoculadas en ratones. Desde entonces, han continuado los estudios que afirman la existencia de biomarcadores y genes indicadores de pluripotencialidad asociados al fenotipo de célula madre de cáncer (Cortes-Dericks & Galetta, 2022). Algunos de los biomarcadores principales de las CSC de pulmón incluyen marcadores de superficie como CD44, CD133, y marcadores intracelulares como la aldehído deshidrogenasa (ALDH1), NANOG, OCT4, entre otros. (Zheng et al., 2022).

- **CD133:** es una glicoproteína de 120 kDa que se encuentra en la superficie celular y se expresa en las subpoblaciones de células indiferenciadas en tumores sólidos; se ha reportado la expresión de este marcador en adenocarcinoma pancreático, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata,

color, cerebro, riñón y pulmón. La alta expresión de esta proteína se relaciona a tumorigénesis, metástasis y quimiorresistencia de las CSC (Barzegar et al., 2018).

- **SOX2:** es un factor de transcripción que juega un papel importante en la regulación de las células madre embrionarias y pluripotentes inducidas. La alta expresión de SOX2 resulta clave para conferir el fenotipo de célula madre a más de una docena de tumores (melanomas, osteosarcomas, mama, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, entre otros); estas células tienen una gran capacidad de iniciar y propagar tumores, de quimiorresistencia, realizar la transición epitelio mesenquimal y evadir del sistema inmune (Al Mamun et al., 2018).
- **Nestina:** es una proteína que forma parte de la familia de filamentos intermedios y se encuentra expresado en una variedad de células madre, tanto normales como tumorales. La alta expresión de esta proteína se asocia a procesos de angiogénesis, proliferación celular y metástasis, por lo que ha sido considerada como un marcador de CSC en tipos de cáncer como: cerebro, cérvix, útero, próstata, ovarios, testículos, páncreas y recientemente en el de pulmón (Jaramillo et al., 2021).
- **CD44:** es una glicoproteína de membrana de tipo I y forma parte de la familia de moléculas de adhesión celular. Es una proteína que pesa entre 85-200 compuesta de 742 aminoácidos. Se expresa en la mayoría de los tumores y es un potencial marcador de CSC. Las células con alta expresión de CD44 tienen altas capacidades de autorrenovación, diferenciación y migración, lo que facilita la metástasis; diferentes estudios han demostrado que existe una mayor expresión de esta glicoproteína en NSCLC en comparación con el SCLC (Zheng et al., 2022).
- **ALDH1:** es una enzima de 50-55 kDa compuesta de 501 aminoácidos responsable de la oxidación de aldehídos y de la regulación de la diferenciación de células madre normales. ALDH1 es un potencial marcador para las CSC en tumores sólidos y su expresión se correlaciona positivamente con el fenotipo de tipo epitelial en NSCLC. Las células con mayor expresión de esta enzima tienen

mayores capacidades de autorrenovación, tumorigénesis y quimiorresistencia (Zheng et al., 2022).

- **NANOG**: es un factor de transcripción capaz de promover la proliferación celular, la renovación y las propiedades de célula madre. Se compone de 305 aminoácidos aproximadamente y es de gran importancia para la diferenciación de las células tumorales (Zheng et al., 2022).
- **ITG- $\alpha$** : la integrina alfa también conocida como CD49, es una glicoproteína que participa en la unión de las células a la matriz extracelular. La activación de estas proteínas se asocia a procesos de diferenciación, motilidad, polaridad, proliferación, supervivencia y apoptosis. Se propone que la integrina alfa resulta ser un importante regulador de la autorrenovación y capacidad de formar tumores en CSC (Krebsbach & Villa, 2017).
- **ITG- $\beta$** : la integrina beta también conocida como CD29, es glicoproteína que participa principalmente en la unión de las células a la matriz extracelular, la supervivencia, la proliferación y la migración, sin embargo, su desregulación resulta en la proliferación de células tumorales, invasión, supervivencia, autorrenovación y quimiorresistencia de las CSC (Wu et al., 2022).

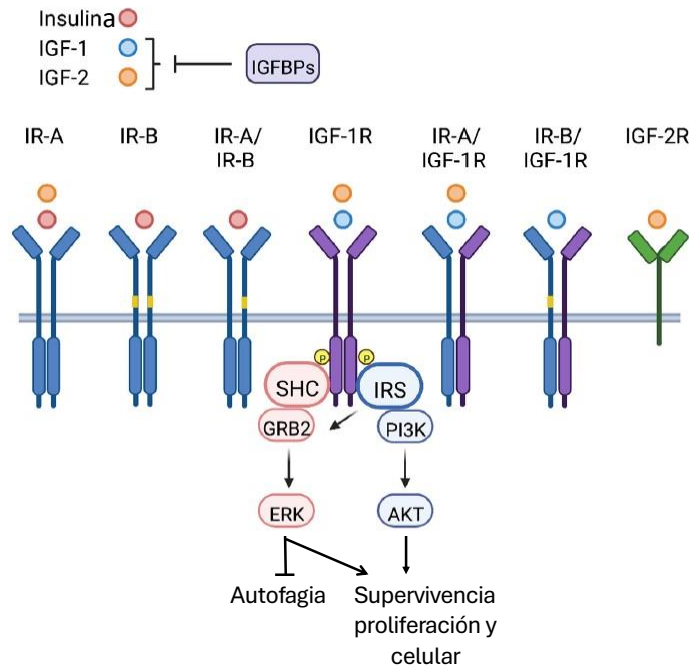
## 1.2 Antecedentes Específicos

### 1.2.1 Factores de crecimiento similares a la insulina

Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF, del inglés *insuline-like growth factors*) son péptidos con una masa molecular de alrededor de 7.5 kDa relacionados estructuralmente con la proinsulina, se sintetizan en el hígado y son capaces de estimular a largo plazo el crecimiento, la diferenciación, la proliferación celular y potenciar la acción de la insulina (Granada, 2006), mientras que a corto de plazo, son capaces de regular la utilización y captación de la glucosa y aminoácidos, así como el metabolismo de lípidos y proteínas (Mancarella et al., 2021). Existen dos tipos de IGF; IGF-1 (también conocido como somatomedina-C) y el IGF-2 (también conocido como somatomedina-A).

IGF-1 se correlaciona con el estado secretor de la somatotropina, también conocida como hormona del crecimiento (GH, del inglés *growth hormone*) en la vida posnatal, mientras que IGF-2 tiene una mayor relevancia en la etapa fetal. En los fluidos biológicos, los IGF circulan unidas en su mayor parte a una de las seis proteínas transportadoras (IGFBP, del inglés *insuline-like growth factor binding proteins*) encargadas de regular su biodisponibilidad y su interacción con su receptor; estas proteínas junto a los propios IGF, la insulina y tres tipos de receptores de membrana donde se incluye el receptor de insulina (IR, del inglés *insulin receptor*), el receptor de IGF-1 (IGF1R) y el receptor de IGF-2 (IGF2R) componen el llamado sistema IGF (Mancarella et al., 2021).

La actividad del sistema IGF inicia cuando uno de los ligandos (IGFs o insulina) se une a su receptor afín. Los dos principales receptores involucrados son IGF1R e IR, ambos son receptores transmembranales de tipo tirosina cinasa compuestos de dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$  responsables de la unión del ligando y de la transducción de las señales, respectivamente (Mancarella et al., 2021). IGF1R se expresa en una variedad de tejidos y su activación resulta en la regulación de la supervivencia, proliferación, diferenciación celular y la síntesis de proteínas. Por otro lado, el receptor de insulina existe en dos isoformas; IR-A, que se expresa principalmente en tejido fetal y células tumorales, y el IR-B, que se expresa en tejidos adultos y regula funciones metabólicas. La alta similitud y la frecuente coexpresión de IGF1R e IR determinan la formación de receptores híbridos, compuestos por un hemirreceptor de IGF-1 y un hemirreceptor de insulina (Mancarella et al., 2021). Debido a las distintas conformaciones de los receptores (**Figura 6**), los ligandos presentan diferentes afinidades respectivamente, por ejemplo, la insulina tiene mayor afinidad por IR >> híbrido IR/IGF1R > IGF1R; IGF-1 presenta mayor afinidad por IGF1R > híbrido IR/IGF1R > IR; IGF2 presenta mayor afinidad por IGF1R/IGF2R > IR-A > híbrido IR/IGF1R >> IR-B (Mancarella et al., 2021). La complejidad de este sistema ha dado pie a la investigación de sus componentes individuales y los efectos celulares que ejercen en la fisiología y la enfermedad (Scalia et al., 2022).



**Figura 6.** Distintas conformaciones de los receptores y su afinidad por los ligandos. Imagen modificada. (Lee et al., 2022).

### 1.2.1 Sistema IGF en el cáncer

IGF1R se expresa en tejido normal ejerciendo múltiples funciones fisiológicas en el desarrollo, crecimiento y la nutrición. Lamentablemente, IGF1R se encuentran comúnmente sobreexpresado en tumores malignos con el propósito de mantener a las células a través de señales proliferativas sostenidas, eventos antiapoptóticos, invasión, metástasis y resistencia al tratamiento (Yuan et al., 2018). La excesiva activación de IGF1R les permite a las células tumorales aumentar la glucólisis y disminuir la sensibilidad a ambientes de hipoxia, pH bajo y poca glucosa (Yuan et al., 2018). Otros mecanismos incluyen: la sobreexpresión del receptor, alteraciones en la disponibilidad del ligando, desregulación de los efectores de señalización río abajo y de manera menos común, mutaciones en los receptores (Mancarella et al., 2021). Así mismo, investigaciones recientes han demostrado que los receptores a insulina se ven incrementados en tejido tumoral y en líneas celulares de cáncer en comparación con sus contrapartes normales, demostrando que la sobreexpresión del IR tiene un potencial pro-oncogénico; esto a su vez refleja la necesidad de las células tumorales

de potenciar su ingesta de nutrientes y satisfacer sus demandas metabólicas (Scalia et al., 2022).

IGF-1 e IGF-2 poseen funciones autocrinas, paracrinas y endocrinas desencadenadas por la unión con IGF1R, capaces de promover la autorrenovación, proliferación celular, diferenciación, supervivencia, metabolismo, metástasis, resistencia al tratamiento y el fenotipo de CSC (Li et al., 2021) en diferentes tumores humanos ya sean mesenquimales, epiteliales o hematopoyéticos a través de la activación de dos principales vías de señalización: PI3K/AKT y MAPK/ERK (Mancarella et al., 2021).

La vía de señalización comienza cuando uno de los ligandos (insulina, IGF-1 o IGF-2) se une a su respectivo receptor. Tanto IR como IGFR sufren una trans-autofosforilación por su receptor intrínseco de tipo tirosin cinasa. Los principales adaptadores de señalización reclutados a estos receptores son las proteínas SHC e IRS, que a su vez son fosforilados por IR e IGF1R para activar la cascada de señalización. SHC regula la estimulación de ERK, resultado en la inducción de la proliferación celular; mientras que el reclutamiento y activación de PI3K depende de IRS, dando lugar a la fosforilación de AKT (Lee et al., 2022). La activación de AKT juega un papel crucial en la regulación de la supervivencia celular, apoptosis y síntesis de proteínas requeridas para la proliferación celular (Haisa, 2013). La progresión del ciclo celular esta positivamente regulada por la señalización de IGF1R a través de los puntos de control que se encuentran en las distintas fases del ciclo. Se incrementa la actividad ribosomal para facilitar la transición de la fase G0 a G1, la expresión de ciclina D1 para facilitar la transición G1 a S y las ciclinas A y B para promover la transición de la fase G2 a M (Haisa, 2013).

### **1.2.2 Relación entre IGF-1/IGFR y las CSC de NSCLC**

Está demostrado que la señalización desencadenada por IGF1R es capaz de regular la propiedad de célula madre en varios modelos de cáncer, como en el colorrectal, el de mama o en el carcinoma hepatocelular, donde se ha documentado que el complejo IGF-1/IGF1R se encuentra regulado positivamente, sobre todo después de haber estado expuesto a inflamación crónica, cirrosis o el virus de hepatitis

B (Chen et al., 2021). Chen y colaboradores, en 2016, encontraron que la señalización de IGF1R promueve la expresión de genes de pluripotencialidad como OCT4 y NANOG en pacientes con carcinoma hepatocelular infectados con el virus de hepatitis B, esenciales para la tumorigénesis de las CSC *in vitro* e *in vivo*. En el caso del adenocarcinoma de pulmón, Xu y colaboradores han evidenciado que el complejo IGF-1/IGF1R activa la vía de señalización PI3K/AKT para inducir la expresión de genes de pluripotencialidad y a la vez, promover la expresión de genes reguladores de la tumorigénesis y la autorrenovación, como NANOG, correlacionándolo de manera clínica con una menor tasa de supervivencia en los pacientes (Xu et al., 2013).

## 2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón representa un grave problema de salud pública, a nivel mundial es el tipo de malignidad más común, y la principal causa de muerte por tumor maligno. A nivel nacional, en hombres, el cáncer de pulmón ocupa el segundo lugar en mortalidad, sólo después del cáncer de próstata.

Dentro de los diferentes tipos de cáncer de pulmón, el cáncer de pulmón de células no pequeñas representa el 85% del total de los casos diagnosticados y se caracteriza por originar tumores secundarios capaces de persistir a pesar de los tratamientos convencionales, poniendo en riesgo la vida del paciente. Una de las principales explicaciones de este comportamiento se le atribuye a la presencia de células tumorales con fenotipo de células madre, las cuales se caracterizan por poseer una alta capacidad de proliferación, autorrenovación, invasión, tumorigénesis, metástasis y quimiorresistencia. Recientemente se ha asociado la adquisición de este fenotipo de células madre en diferentes tipos de tumores, debido a la presencia crónica de factores de crecimiento, tales como el IGF-1

Por ello, resulta importante evaluar el efecto que ejerce el IGF-1 sobre la capacidad proliferativa de las células de cáncer de pulmón, y si además incide, en la inducción del fenotipo de célula madre. El conocimiento de esto, nos permitirá

eventualmente, proponer blancos farmacológicos para un tratamiento más eficiente de los pacientes que padecen cáncer de pulmón, mejorando su pronóstico y calidad de vida.

### **3. HIPÓTESIS**

La presencia de IGF-1 incrementa la capacidad proliferativa de las células A549 y el nivel de expresión de biomarcadores del fenotipo de células madre de cáncer.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo General**

Determinar si la exposición prolongada de IGF-1 incrementa el tamaño de la población celular, así como la proporción de células que presentan el fenotipo de células madre de cáncer en la línea A549.

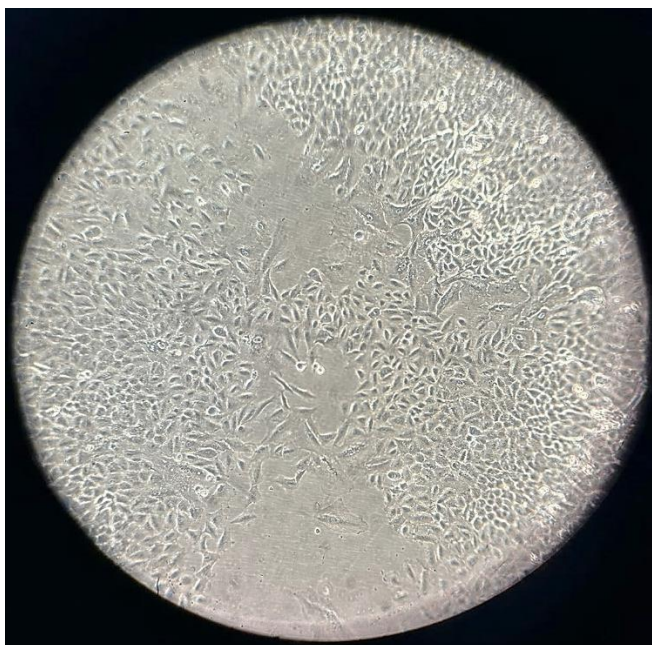
#### **4.2 Objetivos Específicos**

1. Identificar la presencia del ARNm que codifica para IGF-1 y su receptor (IGF-1R) en la línea celular A549.
2. Evaluar el efecto de IGF-1 sobre la capacidad proliferativa de las células A549.
3. Evaluar si la exposición crónica de IGF-1 altera la expresión del ARNm que codifica para diferentes biomarcadores de células madre de cáncer (NANOG, ITG- $\beta$ , ITG- $\alpha$ , CD133, CD44, OCT4, ALDH1, Nestina).

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular A549 para el estudio experimental in vitro del cáncer de pulmón de células no pequeñas. Estas células fueron aisladas de un adenocarcinoma de pulmón perteneciente a un hombre caucásico de 58 años y tienen una morfología de tipo epitelial similar a las células escamosas encontradas en el tejido pulmonar, son adherentes y crecen en monocapa. Las células fueron sembradas en caja Petri con medio de cultivo Advanced-DMEM (Gibco®, EUA) suplementado con 4% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico (10,000 µg/ml de estreptomina, 10,000 unidades/ml de penicilina y 25µg/ml de anfotericina B), se mantuvieron en una incubadora a 37°C en una atmósfera húmeda y una mezcla de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire (**Figura 7**).



**Figura 7.** Imagen del cultivo celular de la línea A549 provenientes de adenocarcinoma de pulmón.

## **5.2 Ensayo de proliferación celular**

Las células A549 fueron tripsinizadas y sembradas en placas de 6 pozos (iniciando con 10,000 células por pozo) utilizando el medio de cultivo Advanced-DMEM (Gibco®, EUA) suplementado con 4% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico (10,000 µg/ml de estreptomicina, 10,000 unidades/ml de penicilina y 25µg/ml de anfotericina B). Una vez que alcanzaron una confluencia aproximada del 60%, se inició el tratamiento con IGF-1 a diferentes concentraciones (100 ng/ml y 200 ng/ml) por 24, 48, 72 y 96 horas. Posteriormente las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en medio de cultivo, se tomó una alícuota de la suspensión celular y se realizó el recuento celular con un microscopio y una cámara de Neubauer, además, se evaluó el nivel de expresión de ARNm que codifica para Ki-67, como marcador de la división celular. Finalmente se obtuvo el número de células expresado de forma porcentual.

## **5.3 Experimentos de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR)**

### **5.3.1 Extracción del Ácido Ribonucleico Total**

La extracción de ARN total de las células A549 se realizó utilizando el kit comercial Cell Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen Biotech). Antes de comenzar el proceso de extracción, las células fueron sometidas al proceso de tripsinización, que consiste en retirar el medio y realizar dos lavados con 5 ml de buffer de fosfatos (PBS) y agregar 500µl de Tripsina-EDTA al 0.25% para despegar las células de la caja Petri, y se continuaron con las indicaciones de uso estandarizado del proveedor.

### **5.3.2 Determinación de la cantidad y calidad del Ácido Ribonucleico Total**

A partir del ARN total extraído se determinó la cantidad y calidad por espectrofotometría. Se utilizó una solución compuesta de 4µl de muestra y 196µl de agua estéril para obtener un volumen final de 200µl. Se evaluó la concentración a una longitud de onda de 260nm a 280nm (A260nm/A280nm), considerando una muestra de buena calidad con cociente de entre 1.6 y 2.0.

### 5.3.3 Síntesis de Ácido Desoxirribonucleico Complementario/ Retro Transcripción (RT)

Se realizó la síntesis de Ácido Desoxirribonucleico complementario (ADNc) a partir del ARN extraído de las células A549 de las diferentes condiciones. Se igualaron las concentraciones de ARN de cada condición y se agregaron 6µl de la mezcla de RT a cada muestra (**Tabla 1**). Se utilizó el kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA) y se llevó a cabo el proceso de enlongación en el termociclador bajo las siguientes condiciones: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 5 minutos a 85°C y finalmente a 4°C.

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen (1X)</b>
Buffer de RT	4µl
Random Primer	1µl
dNTP's	0.5µl
Transcriptasa Inversa	0.5µl
<b>Total</b>	<b>6µl</b>

**Tabla 1.** Mezcla de reactivos para RT.

### 5.3.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica que permite amplificar una secuencia de ADN, este proceso se llevó a cabo mediante el kit DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific, EUA) siguiendo las indicaciones del proveedor, del cual se realizó una mezcla de reactivos de PCR (**Tabla 2**) compuesto de; buffer DreamTaq, agua libre de nucleasas, los oligonucleótidos sentido y antisentido y la muestra de RT para la amplificación específica.

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen (1X)</b>
Buffer DreamTaq	6 µl
Fw primer	10 µl
Rv primer	1 µl
Agua libre de nucleasas	1 µl
Muestra de RT	2 µl
<b>Total</b>	<b>20 µl</b>

**Tabla 2.** Mezcla de reactivos necesarios para PCR.

Los oligonucleótidos utilizados se muestran a continuación (**Tabla 3**):

Oligo-nucleótidos	Dirección	Secuencia	Tamaño (pb)	T (°C)
<b>β-actina</b>	Forward	CAAGAGATGGCCACGGCT	218 pb	72.9
	Reverse	TCCTTCTGCATCCTGTCCGGCA		72.5
<b>Ki-67</b>	Forward	AGTACCAGGAGGTGAGGATAA	415pb	61.5
	Reverse	CTGCACTGGAGTTCCCATAAA		62.3
<b>NANOG</b>	Forward	CCTACAATCCAGCTCTTTGG	422 pb	61.7
	Reverse	CTCAGGCATTGGTGAAGATT		62.1
<b>Nestina</b>	Forward	CACTCAGAGGGAAGGAGATAGA	290 pb	61.8
	Reverse	GATGGAGCAGGCAAGAGATT		63.7
<b>CD44</b>	Forward	ACCCAAAGGGTGAAGCTATTT	248 pb	62.9
	Reverse	CCATTCTCAGCTCTTCCTGATAC		63.3
<b>CD133</b>	Forward	GAGACCCAAGACTCCCATAAAG	244 pb	63.1
	Reverse	CCCAGGACACAGCATAGAATAA		63.1
<b>ITGβ</b>	Forward	TGATCCTGTGTCCCATTGTAAG	531 pb	64.0
	Reverse	GTCAGTCCCTGGCATGAATTA		64.2
<b>ALDH1</b>	Forward	GCAGACCTGCACAAGAATGA	481 pb	61.5
	Reverse	TGTAGAGCTCGTCCTGCTGA		61.3
<b>OCT-4</b>	Forward	GACGGCATCGCAGCAGCTTGG ATACAC	384 pb	78.5
	Reverse	GAGAAGGCGAAGTCCGGAAG		64.4
<b>ITGα</b>	Forward	CGTTCCAGACAGTACAGTACAG CTAAC	273 pb	60.9
	Reverse	GCTCTGTGGTCTACATCAATCT C		63.3

**Tabla 3.** Descripción de los oligonucleótidos utilizados.

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, 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. Se realizaron de 20 a 40 ciclos, dependiendo de la muestra a evaluar para así obtener múltiples copias del fragmento de interés.

### 5.3.5 Separación electroforética y densitometría

A partir de los productos de PCR se realizó la electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.2% donde se cargaron las muestras adicionadas con DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, EUA) (9µl por pozo) para separar los amplicones. Se utilizó un marcador de peso molecular de ADN (4µl por pozo) para aproximar el tamaño de las bandas observadas. La electroforesis se realizó bajo las siguientes condiciones: 65V y 400A por 80 min. Posteriormente se capturaron las imágenes del gel mediante un fotodocumentador (Gel Documentation System, Bc AXYGEN) para proceder a la densitometría de las bandas a través del Software ImageJ (NIH, EUA).

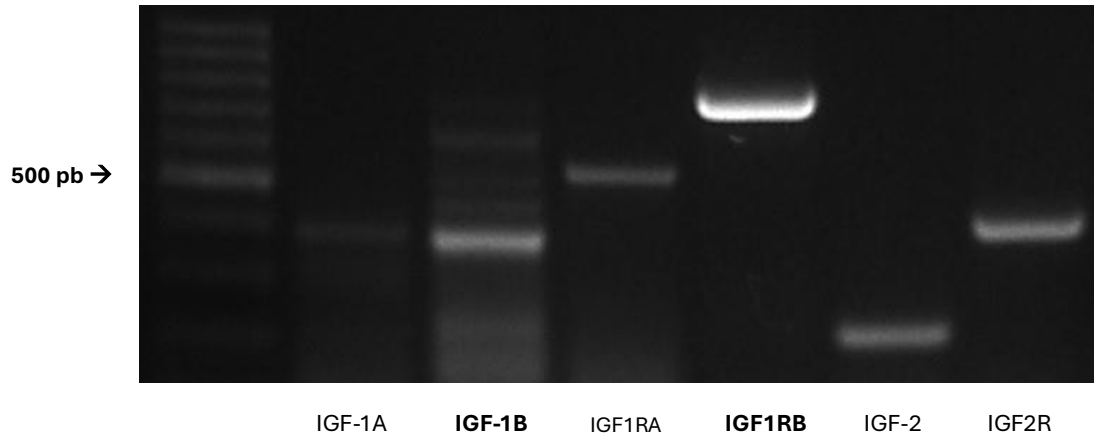
### 5.4 Análisis de datos

El análisis estadístico y gráficos se realizaron mediante el Software SigmaPlot 11.0 (Jandel Corporation, EUA). Se utilizó la prueba *t de Student* para evaluar la diferencia entre grupos, para considerar la diferencia estadísticamente significativa  $p$  debe ser menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Las células A549 expresan el ARNm que codifica para los diferentes elementos del sistema IGF (IGF-1, IGF1R, IGF-2 e IGF2R).

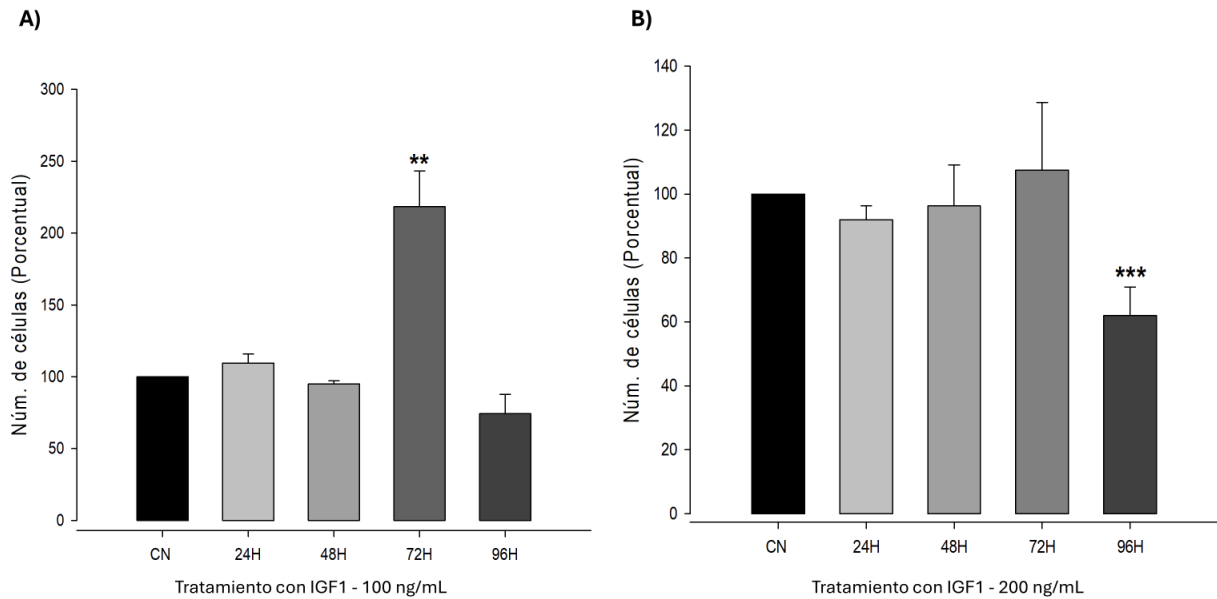
Inicialmente se decidió determinar si las células A549 expresan el ARNm que codifica para los diferentes elementos que componen el sistema IGF, se realizaron ensayos de RT-PCR para determinar los niveles de expresión en condiciones basales. Se observó que las células A549 expresan los 4 elementos, sobresaliendo la expresión de IGF-1B e IGF1RB sobre los niveles de IGF-2 y su receptor (**Figura 8**).



**Figura 8.** Nivel de expresión de ARNm para los diferentes elementos del sistema IGF; IGF-1A, IGF-1B, IGF1RA, IGF1RB, IGF-2 e IGF2R. Se realizaron tres experimentos independientes ( $n=3$ ).

## 6.2 IGF-1 favorece la capacidad proliferativa de las células A549.

Dado que IGF-1 y su receptor (IGF1R) sobresalieron en los niveles de expresión, se decidió considerarlos para los experimentos subsiguientes. Procedimos a investigar si la presencia de IGF-1 es capaz de modificar la capacidad proliferativa de las células A549. Se consideraron dos dosis para los diferentes tratamientos con IGF-1, las concentraciones fueron 100 ng/ml y 200 ng/ml durante 24, 48, 72 y 96 horas; al finalizar el tratamiento se realizó el conteo celular empleando una cámara Neubauer. Respecto al tratamiento con IGF-1 a 100 ng/ml se pudo observar un aumento significativo del 125% aprox. de la población celular hasta las 72 horas, sin embargo, este efecto no se mantuvo horas posteriores. En el caso del tratamiento con dosis de 200 ng/ml, no se mostró una diferencia estadística hasta las 96 horas, donde se observó una reducción significativa del 40% de la población celular (**Figura 9**).



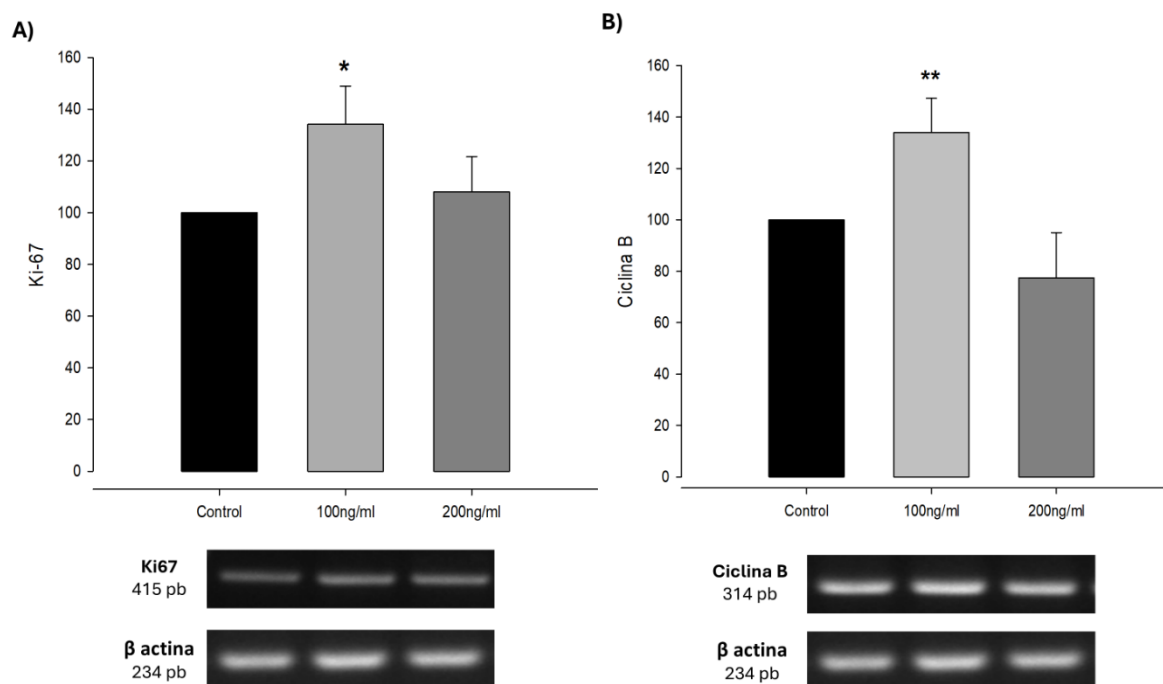
**Figura 9.** Las células A549 fueron tratadas con IGF-1 durante 24, 28, 72 y 96 horas a dos diferentes concentraciones, 100 ng/ml y 200 ng/ml. Al finalizar el tratamiento se realizó el conteo celular mediante una cámara de Neubauer. A) Las células tratadas con 100 ng/ml de IGF-1 mostraron un aumento significativo a las 72 horas, mientras que B) aquellas tratadas con 200 ng/ml de IGF-1 mostraron una reducción significativa hasta las 96 horas con respecto al control. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes ( $n=3$ ), (\*\*) el valor de  $p \leq 0.01$ , (\*\*\*) el valor de  $p \leq 0.001$ .

### 6.3 IGF-1 influye sobre la expresión de elementos moleculares relacionados a la capacidad proliferativa de las células A459.

Es un hecho que el IGF-1 induce un incremento en el tamaño de la población celular, por lo que se decidió identificar los elementos moleculares relacionados con la capacidad proliferativa de las células, que pudieran ser alterados por la presencia de IGF-1. Se determinó por RT-PCR el nivel de expresión del ARNm que codifica para Ki-67, marcador nuclear de proliferación celular y de Ciclina B, elemento que participa en la transición de la fase G2 a la M del ciclo celular, en ausencia y presencia de IGF-1 a concentraciones de 100 ng/ml y 200 ng/ml durante 72 horas de tratamiento. Los resultados obtenidos demuestran que el nivel de expresión de ARNm tanto para Ki-67 como Ciclina B aumentan significativamente un 30% aproximadamente tras la exposición a IGF-1 a una concentración de 100 ng/ml durante 72 horas, mientras que a una concentración de 200 ng/ml no se observaron cambios significativos en la

expresión de ambos elementos moleculares, esto con respecto al 100% de la condición control (**Figura 10**).

Estos resultados indican que la dosis de 100ng/ml de IGF-1, favorece el incremento de la población celular y elementos moleculares relacionados, mientras que, a una dosis más alta, no se observó un cambio significativo en la expresión de estos elementos.

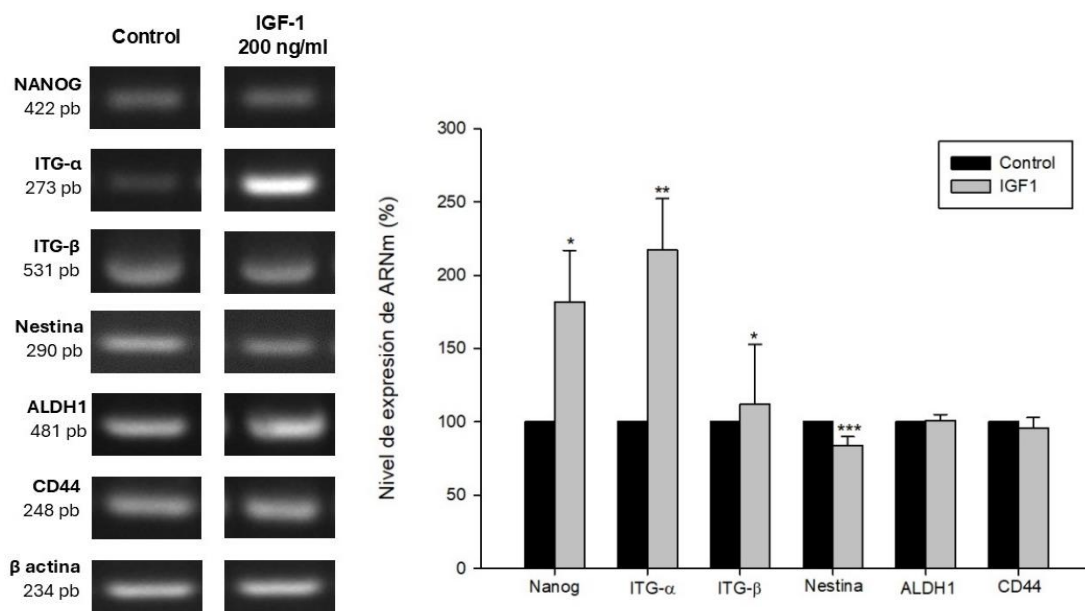


**Figura 10.** Expresión de elementos moleculares que participan en la proliferación de las células A549 posterior al tratamiento con IGF-1. Las células fueron tratadas con 100 y 200 ng/ml de IGF-1 durante 72 horas. **(A)** Se cuantificó el nivel de expresión de ARNm que codifica para Ki-67 y Ciclina B **(B)** con respecto al control. Todos los datos fueron normalizados con respecto a los niveles de expresión de ARNm que codifica para β actina, considerado como control de expresión. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes (n=3), (\*) el valor de  $p \leq 0.05$ , (\*\*) el valor de  $p \leq 0.01$ .

#### 6.4 IGF-1 influye sobre la expresión de biomarcadores de células madre de cáncer (CSC) en la línea celular A549.

Dado que los resultados obtenidos anteriormente demostraron que IGF-1 puede favorecer a una de las características principales de la progresión tumoral, que es la proliferación, se decidió investigar, si la presencia de este factor de crecimiento sería capaz de incidir sobre la adquisición del fenotipo de células madre de cáncer. Para

poner a prueba esta posibilidad, se evaluó el nivel de expresión del ARNm que codifica para diferentes biomarcadores moleculares relacionados con el fenotipo de célula madre de cáncer, en condiciones de ausencia y presencia de 200 ng/ml de IGF-1 por 72 horas (**Figura 11**). Los resultados obtenidos son variables, por ejemplo, se observa que la presencia de IGF-1 induce un incremento significativo en los niveles de expresión de NANOG, ITG- $\alpha$ , e ITG- $\beta$ ; una reducción en la expresión de Nestina; y no se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de CD44 y ALDH1.



**Figura 11.** El tratamiento con IGF-1 provocó resultados variables para los diferentes biomarcadores evaluados. Las células fueron tratadas 200 ng/ml de IGF-1 durante 72 horas. Se cuantificó el nivel de expresión de ARNm que codifica para NANOG, ITG- $\alpha$ , ITG- $\beta$ , Nestina, ALDH1 y CD44 para la condición control y la experimental. Todos los datos fueron normalizados con respecto a los niveles de expresión de ARNm que codifica para  $\beta$  actina. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes ( $n=3$ ), (\*) el valor de  $p \leq 0.05$ , (\*\*) el valor de  $p \leq 0.01$ , (\*\*\*) el valor de  $p \leq 0.001$ .

## 7. DISCUSIÓN

El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) es una enfermedad que surge como resultado de una acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en las células. Actualmente, se reconoce a este tipo de cáncer como uno de los principales desafíos en el área oncológica debido a su alta incidencia y su elevado

índice de mortalidad a nivel mundial (GLOBOCAN, 2022). Este tipo de cáncer es particularmente problemático debido a la capacidad de las células del NSCLC para generar tumores secundarios que persisten a pesar de los tratamientos convencionales. A este comportamiento se le atribuyen mecanismos complejos como la metástasis, resistencia a tratamientos y recurrencia tumoral, procesos en los que las células madre de cáncer (CSC) juegan un papel crucial (Zheng et al., 2022). Este grupo de células madre poseen una alta capacidad de inducir la proliferación, autorrenovación, diferenciación y quimiorresistencia, contribuyendo significativamente a la agresividad de este tumor (Herrerros-Pomares, 2022).

La investigación sobre los factores que regulan el fenotipo de células madre tumorales se vuelve fundamental. Recientemente, se ha identificado que la alta expresión de factores de crecimiento, entre ellos, el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) y su receptor, está asociada con la adquisición de características desdiferenciadas en estas células tumorales (Yuan et al., 2018). Por tanto, es primordial evaluar el impacto de IGF-1 sobre la expresión de genes relacionados con la pluripotencialidad de las células madre tumorales en NSCLC.

En el presente trabajo, se plantearon objetivos específicos enfocados en evaluar la presencia de ARNm que codifica para IGF-1 y su receptor, así como en determinar si la exposición crónica al IGF-1 incrementa la proporción celular en la línea A549, un modelo representativo del NSCLC, y el efecto que ejerce sobre la expresión de biomarcadores relacionados con el fenotipo de células madre de cáncer. Estos objetivos buscan proporcionar una comprensión más detallada sobre cómo IGF-1 podría contribuir a la progresión y resistencia del NSCLC, con el potencial de identificar nuevos blancos terapéuticos que podrían mejorar el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes.

Para establecer la evaluación del efecto de IGF-1 sobre las células A549, se llevó a cabo una serie de ensayos de RT-PCR que permitieron confirmar la expresión basal de ARNm de los componentes del sistema IGF en estas células. Se demostró que las células A549 expresan todos los elementos evaluados: IGF-1, IGF1R, IGF-2 e IGFR2.

Esto indica que las células A549 tienen la capacidad intrínseca para responder a las señales mediadas por el sistema IGF-1. Entre los componentes evaluados, la expresión de IGF-1 e IGF1R fue particularmente destacada, sugiriendo que las células A549 son capaces de recibir y responder de manera efectiva a las señales del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1). La evidencia sugiere que la elevada expresión de estos componentes puede deberse a la producción autocrina de las células malignas para aumentar las concentraciones intratumorales de IGF-1 e IGF-2. (Westley & May, 2013). Este hallazgo es consistente con la literatura que indica que la presencia de IGF-1 e IGF1R juega un papel sumamente importante en la regulación del crecimiento celular, *in vivo* e *in vitro* (Brodt et al., 2001) y el pronóstico del paciente en diversos contextos de cáncer. Por ejemplo, en cáncer de colon, de próstata, de mama, y de pulmón, diversos estudios demostraron que un aumento en la expresión del receptor de IGF-1, tanto a nivel de ARNm como de proteína, se correlaciona con un mayor índice de metástasis y una menor tasa de supervivencia (Westley & May, 2013). Esto proporciona una base sólida para explorar como la exposición crónica a IGF-1 influye en la biología de las células A549 y en la expresión de biomarcadores relacionados al fenotipo de CSC.

Aunque también se detectó la expresión de IGF-2 e IGF2R, estos elementos no serán el foco principal de esta discusión. La razón es que el enfoque de este estudio se encuentra en el papel específico de IGF-1 y su receptor en la modulación de la proliferación celular y en las características de las células madre tumorales de la línea A549. El análisis detallado de IGF-2 y su receptor excede el alcance de este estudio y podría ser abordado en futuras investigaciones.

La hipótesis de este estudio planteaba que la presencia de IGF-1 e IGF1R incrementaría la proporción de células A549 a través de su impacto en la proliferación celular. Los resultados mostraron que el tratamiento con IGF-1 a 100 ng/ml provocó un aumento significativo de aproximadamente el 125% en la población celular hasta las 72 horas. Este incremento inicial en la proliferación celular respalda la hipótesis de que IGF-1 actúa como un promotor del crecimiento celular. Al unirse el ligando a IGF1R, un receptor de tipo tirosina cinasa, se desencadena la activación de las vías

de señalización PI3K/AKT y MAPK/ERK, desempeñando un papel crucial en la regulación de la supervivencia, la autorrenovación y la proliferación celular, procesos estrechamente vinculados al mantenimiento de CSC (Westley & May, 2013). No obstante, el efecto proliferativo no se mantuvo a lo largo del tiempo, ya que la tasa de población celular se estabilizó en los intervalos posteriores. Esto podría indicar que, a pesar del efecto inicial positivo, la capacidad proliferativa inducida por IGF-1 está regulada por mecanismos que limitan el crecimiento a largo plazo o que las células desarrollan una respuesta adaptativa a la exposición crónica de IGF-1.

En contraste, el tratamiento con IGF-1 a 200 ng/ml resultó en una reducción significativa del 40% en la población celular a las 96 horas. Este resultado sugiere que dosis más altas de IGF-1 pueden tener efectos adversos sobre la proliferación celular, posiblemente a través de la sobreestimulación de vías de señalización que conducen a la apoptosis o la inhibición del crecimiento celular (Westley & May, 2013). Este efecto contradictorio en dosis más altas no invalida la hipótesis, pero indica que el impacto de IGF-1 en la proliferación celular es dosis-dependiente.

En relación con los resultados descritos previamente, se decidió evaluar cómo IGF-1 modula la expresión de elementos moleculares clave en la proliferación celular. Específicamente, se midió la expresión del ARNm de Ki-67, un marcador nuclear de proliferación y Ciclina B, marcador que juega un importante papel en la transición de la fase G2 a la M del ciclo celular.

Los resultados mostraron que IGF-1 a 100 ng/ml incrementó significativamente la expresión de Ki-67 y Ciclina B en aproximadamente un 30% en comparación con el control. Este hallazgo es consistente con el aumento observado en la población celular bajo el mismo tratamiento, sugiriendo que IGF-1 estimula la proliferación celular al activar estos marcadores asociados con la progresión del ciclo celular. La elevación en Ki-67 y Ciclina B proporciona una explicación molecular para el aumento de la proliferación celular observado anteriormente.

En contraste, con la administración de IGF-1 a 200 ng/ml, no se detectaron cambios significativos en la expresión de estos marcadores. Este resultado se alinea con la disminución de la población celular observada a esta concentración, sugiriendo

que dosis más altas de IGF-1 pueden inducir respuestas que limitan la proliferación o activan mecanismos de regulación negativa.

Se puede concluir que existe una relación dosis-dependiente en la respuesta de las células A549 a IGF-1. Mientras que concentraciones bajas (100 ng/ml) promueven la proliferación celular y aumentan la expresión de marcadores de proliferación, concentraciones más altas (200 ng/ml) parecen tener efectos inhibitorios. La conexión entre los resultados de la capacidad proliferativa y la expresión de elementos moleculares proporciona una visión integral de cómo IGF-1 regula la proliferación en células A549 y destaca la importancia de ajustar la dosis para optimizar la respuesta celular.

En el marco de esta investigación, se examinó la expresión de diversos biomarcadores característicos de las células madre tumorales en la línea A549 con el fin de evaluar si IGF-1, es capaz de promover este fenotipo en células provenientes de NSCLC. Entre los biomarcadores seleccionados para este análisis, se incluyeron SOX2, OCT4 y CD133 debido a su implicación documentada en el desarrollo tumoral y su relevancia en la caracterización de células madre de cáncer. A pesar de la aplicación rigurosa de los métodos experimentales en condiciones de tratamiento con 200 ng/ml de IGF-1 durante 72 horas, no se detectó la expresión de SOX2, OCT4 ni CD133. Es fundamental considerar que la expresión de biomarcadores de células madre tumorales puede variar significativamente dependiendo del tipo de cáncer y de la línea celular en estudio. En este contexto, la línea celular A549, es un modelo de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), mientras que los biomarcadores analizados, como SOX2, OCT4 y CD133, han mostrado en estudios previos, una sobreexpresión destacada en cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), tanto *in vivo* como *in vitro* (Guo et al., 2022).

Es importante señalar que la ausencia de expresión de estos biomarcadores no invalida el impacto de IGF-1 en las características de las células madre tumorales, puesto que investigaciones previas respaldan su participación y su repercusión sobre el pronóstico del paciente (Guo et al., 2022). Concluyendo que las características únicas de cada tipo de cáncer pueden influir en la regulación y la función de los

biomarcadores, lo que a su vez puede afectar los resultados obtenidos (Narita et al., 2014).

A pesar de que no se lograron capturar datos concluyentes sobre la expresión de SOX2, OCT4 y CD133, la evaluación de otros biomarcadores y aspectos relacionados con la función de IGF-1 sigue siendo relevante y ofrece una significativa sobre su impacto en la biología de las células A549.

A continuación, se discutirán los resultados obtenidos de cada uno de los biomarcadores evaluados en este estudio.

Nestina, es una proteína de la familia de filamentos intermedios que se expresa en diversas células madre, tanto normales como tumorales y su participación se asocia principalmente a procesos como la angiogénesis, proliferación celular y metástasis, por lo que se considera un marcador de gran impacto para las CSC en diferentes tipos de cáncer (Jaramillo et al., 2021). Un artículo publicado por Cheng, Z. y colaboradores en 2014, demostró que los niveles de nestina tanto a nivel de ARNm y a nivel de proteína, se expresaron en todas las líneas celulares de NSCLC, incluida la línea A549 y que los altos niveles de expresión se asociaron significativamente con los niveles del marcador proliferativo Ki-67 y un fenotipo celular poco diferenciado. Así mismo, comprobaron que a través del silenciamiento de nestina mediante de un siRNA, se reducen efectivamente las propiedades proliferativas de las células, confirmando que existe una relación positiva entre la expresión de este marcador y el grado de malignidad tumoral (Chen et al., 2014).

El tratamiento de las células A549 con IGF-1 a una concentración de 200 ng/ml durante 72 horas reveló una reducción significativa en la expresión del ARNm de nestina del 20%, en comparación con el control. Este resultado destaca a nestina como el único biomarcador evaluado que mostró una disminución en la expresión de ARNm.

Este hallazgo sugiere que IGF-1 ejerce un efecto inhibitor específico sobre nestina, lo que podría influir en los procesos asociados con este biomarcador, tales como la proliferación y la capacidad metastásica. A través de la consulta bibliográfica se propone que este comportamiento ocurra debido a que IGF-1 podría estar

modulando vías de señalización que afectan directamente la expresión de nestina, que induzca cambios en los factores de transcripción que controlan su expresión, que interfiera con la estabilidad del ARNm o dado que nestina está involucrada en la proliferación y la metástasis, los efectos de IGF-1 en estas funciones celulares podrían inducir una respuesta adaptativa en la que la célula reduce la expresión de nestina para contrarrestar los cambios inducidos por IGF-1 (Singh et al., 2018).

El siguiente biomarcador analizado fue CD44, una glicoproteína de membrana de tipo I que forma parte de la familia de moléculas de adhesión celular y que se expresa en la mayoría de los tumores (Thapa & Wilson, 2016). Dada su implicación en procesos clave como la autorrenovación, diferenciación y migración celular, CD44 se ha convertido en un marcador molecular de interés en el contexto del cáncer, ya que estas funciones facilitan la metástasis (Thapa & Wilson, 2016).

Diversos artículos han demostrado que la glicoproteína CD44 se expresa en tejido de cáncer de pulmón de tipo NSCLC y que su sobreexpresión regula positivamente la metástasis; Hu y colaboradores en 2018, demostraron que en la línea celular A549, CD44 se encuentra sobreexpresado y cuando este es inhibido mediante un siRNA, se suprime la habilidad de formar colonias y la proliferación de las células (Hu et al., 2018). Dado el anterior antecedente, se sugiere que, pese a que los resultados obtenidos en esta investigación no mostraron un cambio significativo tras la exposición a IGF-1 en la condición experimental, CD44 ya se encuentra sobreexpresado de manera basal en la línea A549, concluyendo que IGF-1 no afecta la expresión de este biomarcador ni los procesos celulares que promueve.

Adicionalmente, se evaluó la expresión de la aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1), esta forma parte de una superfamilia de enzimas encargadas de metabolizar y desintoxicar una variedad de aldehídos endógenos y exógenos. Así mismo, es considerada como un marcador prometedor para las células madre cancerosas (CSC) debido a que la alta expresión de esta enzima se asocia a un aumento en la capacidad de proliferación, autorrenovación y resistencia a la quimioterapia en células de cáncer de tipo epitelial (Zheng et al., 2022). En 2015, Wei y colaboradores, realizaron un estudio de meta-análisis con el fin de esclarecer el efecto que ejercen los altos niveles

de expresión de ARNm y de proteína de la ALDH1 sobre el NSCLC; a través del análisis de los datos, concluyeron que existe una correlación entre los altos niveles de ALDH1 y una mayor tasa de metástasis hacia los ganglios linfáticos y una menor tasa de supervivencia para el paciente (Wei et al., 2015). Años posteriores se observó el mismo efecto en diferentes tipos de cáncer sólidos (Wei et al., 2022).

Sin embargo, en este estudio los resultados mostraron que la expresión del ARNm de ALDH1 no experimentó modificaciones significativas en respuesta al tratamiento con IGF-1, mostrando un comportamiento similar en la expresión de CD44. Estos hallazgos plantean varias consideraciones. Primero, podría indicar que IGF-1 no influye directamente en la regulación de CD44 y ALDH1 en las células A549 bajo las condiciones experimentales utilizadas. Puede ser que el impacto de IGF-1 sobre ambos biomarcadores requiera condiciones adicionales, como diferentes concentraciones de IGF-1, tiempos de tratamiento más prolongados o la presencia de otros factores de crecimiento y señales moleculares que modulen la expresión de estos. También es posible que las células A549, en su estado basal, ya presenten niveles óptimos de CD44 y ALDH1 que no respondan a la estimulación con IGF-1. Este resultado sugiere que, aunque CD44 y ALDH1 son biomarcadores relevantes en el contexto de CSC y NSCLC, su regulación en respuesta a IGF-1 puede ser más compleja o dependiente de factores adicionales que deben ser investigados más a fondo en futuros estudios.

Entre los biomarcadores que mostraron un aumento en su expresión se encuentra NANOG, un factor de transcripción crucial en la regulación de la proliferación, renovación y diferenciación de células tumorales (MacLean et al., 2024). Tras tratar las células A549 con 200 ng/ml de IGF-1 durante 72 horas, se registró un incremento aproximado del 80% en la expresión de NANOG, en comparación con el control no tratado.

El aumento en la expresión de NANOG, sugiere que IGF-1 tiene un alto impacto en la regulación positiva de este factor de transcripción, y por consiguiente, un potenciamiento de las características asociadas al fenotipo de célula madre tumoral, como lo es la autorrenovación, la proliferación y el mantenimiento del estado

indiferenciado de las células (MacLean et al., 2024). A través de un estudio de meta-análisis sobre el impacto que tiene la alta expresión de NANOG en tumores sólidos, se reveló que ésta se asocia a una enfermedad más agresiva y un peor pronóstico para el paciente en múltiples tipos de cáncer, incluyendo el de pulmón (MacLean et al., 2024). Por lo tanto, estos resultados proponen estudiar más a fondo la relación entre IGF-1 y NANOG para esclarecer su función como un posible blanco terapéutico para pacientes con NSCLC.

Por último, se evaluó la expresión de ARNm de dos tipos de integrinas; ITG-  $\alpha$  e ITG-  $\beta$ , también conocidas como CD49 y CD29. Las integrinas son glicoproteínas transmembranales involucradas principalmente en la adhesión celular y la señalización. La familia de las integrinas se compone de 18 subunidades alfa y 5 subunidades beta, formando heterodímeros en la membrana celular capaces de modular interacciones clave entre las células y la matriz extracelular (MEC), permitiendo que las células respondan a estímulos del entorno (Xiong et al., 2021). Su activación promueve una variedad de procesos celulares críticos como la motilidad, polaridad celular, supervivencia, proliferación y diferenciación, factores esenciales para la biología de las células madre de cáncer (CSC) y su capacidad para mantener la heterogeneidad tumoral (Aksorn & Chanvorachote, 2019).

Continuando con el experimento, las células tratadas con 200 ng/ml de IGF-1 mostraron un aumento aproximado en la expresión de ARNm de ITG- $\alpha$  del doble respecto al grupo control. Este aumento significativo sugiere que IGF-1 desempeña un papel importante como modulador de la actividad de ITG- $\alpha$  en la línea A549.

El hecho de que ITG- $\alpha$  esté relacionado con la adhesión y migración celular (Aksorn & Chanvorachote, 2019) sugiere que este aumento en su expresión podría facilitar la capacidad de las células de NSCLC para migrar e invadir tejidos, apoyando su rol en el mantenimiento del fenotipo de células madre cancerosas.

La relevancia de ITG- $\alpha$  en el contexto del cáncer de pulmón radica también en su posible función como mediador de la señalización de supervivencia y resistencia a la apoptosis (Vachon, 2011). La alta expresión de integrinas como ITG- $\alpha$  puede generar señales que promueven la evasión de la muerte celular programada conocida

como anoikis, lo que favorece la persistencia de las CSC en microambientes tumorales desafiantes (Vachon, 2011). Esto implica que la inhibición de las vías de señalización mediadas por integrinas podría representar una estrategia terapéutica efectiva para reducir la capacidad de invasión y metástasis de las células tumorales. Por lo tanto, ITG- $\alpha$  podría representar un marcador importante en el seguimiento de la agresividad tumoral y una potencial diana terapéutica para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas.

De igual manera, la expresión de la integrina beta (ITG- $\beta$ ) tras la exposición a IGF-1 resulta relevante debido al papel de esta glicoproteína en procesos clave como la adhesión celular, la migración, la supervivencia y la proliferación de células tumorales (Xiong et al., 2021).

Se ha demostrado a través de diversos artículos que la MEC y las integrinas modulan la señalización de IGF1R a través de su activación, facilitando la proliferación celular y la motilidad. En 2016, Tahimic y col. demostraron que, mediante proteínas activadoras, las integrinas provocan la transactivación de IGF1R; y en 2017, Takada y col. observaron que IGF-1 es capaz de unirse tanto a IGF1R como a las integrinas para formar un complejo terciario que refuerza su señalización (Chen et al., 2021). En este caso, se observó un aumento del 10% con 200 ng/ml de IGF-1, estadísticamente significativo respecto al control. Esto podría sugerir una mayor activación de vías de señalización que favorecen la proliferación, la supervivencia y la quimiorresistencia, como PI3K/Akt y MAPK/Erk (Aksorn & Chanvorachote, 2019).

Mediante los resultados obtenidos es posible concluir que, bajo la concentración de IGF-1 evaluada, la señalización de ITG- $\alpha$  e ITG- $\beta$  podría estar contribuyendo a un entorno más favorable para la progresión tumoral y la supervivencia de las células A549 provenientes de NSCLC, lo que refuerza la importancia de las integrinas en el mantenimiento de las CSC en este tipo de cáncer. Esto a su vez sugiere la posibilidad de utilizar inhibidores de estas glicoproteínas como enfoque terapéutico para disminuir la capacidad metastásica de las células.

## 8. CONCLUSIONES

1. Las células A549 expresan de manera diferencial el ARNm que codifica para los elementos moleculares del sistema IGF, en mayor proporción IGF-1 e IGF1R sobre IGF-2 y su receptor.
2. Existe una relación dosis-dependiente en la respuesta de las células A549 a IGF-1. A concentraciones bajas (100 ng/ml) se promueve la proliferación celular y aumenta la expresión de marcadores de proliferación, mientras que concentraciones más altas (200 ng/ml) parecen tener efectos inhibitorios.
3. IGF-1 disminuye la expresión del ARNm que codifica para Nestina en las células A549.
4. IGF-1 no ejerce ningún cambio significativo en los niveles de expresión de ARNm de CD44 y ALDH1.
5. IGF-1 es capaz de aumentar los niveles de expresión del ARNm que codifica para NANOG, ITG- $\alpha$  e ITG- $\beta$ .

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aksorn, N., & Chanvorachote, P. (2019). *Integrin as a Molecular Target for Anti-cancer Approaches in Lung Cancer*. *Anticancer Research*, 39(2), 541–548. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13146>
2. Al Mamun, M., Mannoor, K., Cao, J., Qadri, F., & Song, X. (2018). *SOX2 in cancer stemness: tumor malignancy and therapeutic potentials*. *Journal of Molecular Cell Biology*, 12(2), 85–98. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy080>
3. Alexander, M., Kim, S. Y., & Cheng, H. (2020). *Update 2020: Management of Non-Small Cell Lung Cancer*. *Lung*, 198(6), 897–907. <https://doi.org/10.1007/s00408-020-00407-5>
4. Aramini, B., Masciale, V., Grisendi, G., Bertolini, F., Maur, M., Guaitoli, G., Chrystel, I., Morandi, U., Stella, F., Dominici, M., & Haider, K. H. (2022). *Dissecting Tumor Growth: The Role of Cancer Stem*

Cells in Drug Resistance and Recurrence. *Cancers*, 14(4), 976. <https://doi.org/10.3390/cancers14040976>

5. Barzegar, A., Syahir, A., & Ahmad, S. (2018). CD133: beyond a cancer stem cell biomarker. *Journal of Drug Targeting*, 27(3), 257–269. <https://doi.org/10.1080/1061186x.2018.1479756>

6. Brodt, P., Fallavollita, L., Khatib, A.-M., Amir Abbas Samani, & Zhang, D. (2001). Cooperative Regulation of the Invasive and Metastatic Phenotypes by Different Domains of the Type I Insulin-like Growth Factor Receptor  $\beta$  Subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33608–33615. <https://doi.org/10.1074/jbc.m102754200>

7. Chen, P.-C., Kuo, Y.-C., Chuong, C.-M., & Huang, Y.-H. (2021). Niche Modulation of IGF-1R Signaling: Its Role in Stem Cell Pluripotency, Cancer Reprogramming, and Therapeutic Applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.625943>

8. Chen, Z., Wang, J., Cai, L., Zhong, B., Luo, H., Hao, Y., Yu, W., Wang, B., Su, C., Lei, Y., Bella, A. E., Xiang, A. P., & Wang, T. (2014). Role of the Stem Cell-Associated Intermediate Filament Nestin in Malignant Proliferation of Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE*, 9(2), e85584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085584>

9. Cortes-Dericks, L., & Galetta, D. (2022). Impact of Cancer Stem Cells and Cancer Stem Cell-Driven Drug Resiliency in Lung Tumor: Options in Sight. *Cancers*, 14(2), 267. <https://doi.org/10.3390/cancers14020267>

10. European Sociocety for Medical Oncology. (2019). *Cáncer de Pulmón de Celulas No Pequeñas*. *Www.esmo.org*. <https://www.esmo.org>

11. Faraz Siddiqui, & Siddiqui, A. H. (2019). *Lung Cancer*. *Nih.gov; StatPearls Publishing*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482357/>

12. GLOBOCAN. (2022a). *Cancer today*. *larc.fr*. <https://gco.iarc.fr/today/>

13. GLOBOCAN. (2022b). *Mexico*. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>

14. Granada, L. (2006). Factor de crecimiento similar a la insulina y sus proteínas de transporte. *Endocrinología Y Nutrición*, 53(7), 467–475. [https://doi.org/10.1016/s1575-0922\(06\)71133-0](https://doi.org/10.1016/s1575-0922(06)71133-0)

15. Guo, W., Qiao, T., & Li, T. (2022). The role of stem cells in small-cell lung cancer: evidence from chemoresistance to immunotherapy. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.11.006>

16. Haisa, M. (2013). The type 1 insulin-like growth factor receptor signalling system and targeted tyrosine kinase inhibition in cancer. *Journal of International Medical Research*, 41(2), 253–264. <https://doi.org/10.1177/0300060513476585>

17. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059>

18. Herreros-Pomares, A. (2022). Identification, Culture and Targeting of Cancer Stem Cells. *Life*, 12(2), 184. <https://doi.org/10.3390/life12020184>

19. Hu, B., Ma, Y., Yang, Y., Zhang, L., Han, H., & Chen, J. (2018). CD44 promotes cell proliferation in non-small cell lung cancer. *Oncology Letters*, 15(4), 5627–5633. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8051>

20. Hua, H., Kong, Q., Yin, J., Zhang, J., & Jiang, Y. (2020). Insulin-like growth factor receptor signaling in tumorigenesis and drug resistance: a challenge for cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 13. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00904-3>

21. International Agency for Research on Cancer. (2022). *Cancer today*. *larc.fr*. <https://gco.iarc.fr/today/home>

22. Jaramillo, G., Chávez, M.-L., Ancer, A., & Ortega, M. (2021). Nestin-Expressing Cells in the Lung: The Bad and the Good Parts. *Cells*, 10(12), 3413. <https://doi.org/10.3390/cells10123413>
23. Krebsbach, P. H., & Villa, L. G. (2017). The Role of Integrin  $\alpha 6$  (CD49f) in Stem Cells: More than a Conserved Biomarker. *Stem Cells and Development*, 26(15), 1090–1099. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0319>
24. Lee, J.-S., Tocheny, C. E., & Shaw, L. M. (2022). The Insulin-like Growth Factor Signaling Pathway in Breast Cancer: An Elusive Therapeutic Target. *Life (Basel, Switzerland)*, 12(12), 1992. <https://doi.org/10.3390/life12121992>
25. Li, J., Wang, J., Xie, D., Pei, Q., Wan, X., Xing, H. Rosie., & Ye, T. (2021). Characteristics of the PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways involved in the maintenance of self-renewal in lung cancer stem-like cells. *International Journal of Biological Sciences*, 17(5), 1191–1202. <https://doi.org/10.7150/ijbs.57871>
26. MacLean, M. R., Walker, O. L., Raj Pranap Arun, Fernando, W., & Marcato, P. (2024). Informed by Cancer Stem Cells of Solid Tumors: Advances in Treatments Targeting Tumor-Promoting Factors and Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 4102–4102. <https://doi.org/10.3390/ijms25074102>
27. Mancarella, C., Morrione, A., & Scotlandi, K. (2021). Novel Regulators of the IGF System in Cancer. *Biomolecules*, 11(2), 273. <https://doi.org/10.3390/biom11020273>
28. Meza-Junco, J., Montaña-Loza, A., & Aguayo-González, A. (2006). Bases moleculares del cáncer. *Revista de Investigación Clínica*, 58(1), 56–70. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-83762006000100008](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762006000100008)
29. Morton, D. A., Bo, F. K., & Albertine, K. H. (2022). Pulmones. In *Anatomía macroscópica. Un panorama general, 2e (Book, Section)*. McGrawHill. [accessmedicina.biblioteca.uap.elogim.com/content.aspx?aid=1195779665](https://accessmedicina.biblioteca.uap.elogim.com/content.aspx?aid=1195779665)
30. Narita, K., Matsuda, Y., Masahiro Seike, Naito, Z., Gemma, A., & Toshiyuki Ishiwata. (2014). Nestin regulates proliferation, migration, invasion and stemness of lung adenocarcinoma. *International Journal of Oncology*, 44(4), 1118–1130. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2278>
31. Organización Mundial de la Salud. (2022, February 2). Cáncer. *Www.who.int*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
32. Panani, A., & Roussos, C. (2006). Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Letters*, 239(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.06.030>
33. Scalia, P., Williams, S. J., Fujita-Yamaguchi, Y., & Giordano, A. (2022). Cell cycle control by the insulin-like growth factor signal: at the crossroad between cell growth and mitotic regulation. *Cell Cycle*, 22(1), 1–37. <https://doi.org/10.1080/15384101.2022.2108117>
34. Singh, K. P., Miaskowski, C., Dhruva, A. A., Flowers, E., & Kober, K. M. (2018). Mechanisms and Measurement of Changes in Gene Expression. *Biological Research for Nursing*, 20(4), 369–382. <https://doi.org/10.1177/1099800418772161>
35. Sociedad Americana del Cáncer. (2019). ¿Qué es el cáncer? *Cancer.org; American Cancer Society*. <https://www.cancer.org/es/investigacion.html>
36. Su, C., Zhang, J., Yarden, Y., & Fu, L. (2021). The key roles of cancer stem cell-derived extracellular vesicles. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00499-2>
37. Thai, A. A., Solomon, B. J., Sequist, L. V., Gainor, J. F., & Heist, R. S. (2021). Lung cancer. *The Lancet*, 398(10299), 535–554. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00312-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00312-3)

38. Thandra, K. C., Barsouk, A., Saginala, K., Sukumar Aluru, J., & Barsouk, A. (2021). Epidemiology of lung cancer. *Współczesna Onkologia*, 25(1), 45–52. <https://doi.org/10.5114/wo.2021.103829>
39. Thapa, R., & Wilson, G. D. (2016). The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer. *Stem Cells International*, 2016, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2016/2087204>
40. Tortora, G., J., & Derrickson, B. (2013). El Aparato Respiratorio. In *Principios De Anatomía Y Fisiología*. (pp. 929–934). EDITORIAL MÉDICA PANAMERICANA, S.A DE C.V.
41. Vachon, P. H. (2011). Integrin Signaling, Cell Survival, and Anoikis: Distinctions, Differences, and Differentiation. *Journal of Signal Transduction*, 2011, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2011/738137>
42. Walcher, L., Kistenmacher, A.-K., Suo, H., Kitte, R., Dluczek, S., Strauß, A., Blaudszun, A.-R., Yevsa, T., Fricke, S., & Kossatz-Boehlert, U. (2020). Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Frontiers in Immunology*, 11(1280). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01280>
43. Wang, M., Herbst, R. S., & Boshoff, C. (2021). Toward personalized treatment approaches for non-small-cell lung cancer. *Nature Medicine*, 27(8), 1345–1356. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01450-2>
44. Wang, Z., Li, W., Guo Qiongya, Wang, Y., Ma, L., & Zhang, X. (2018). Insulin-Like Growth Factor-1 Signaling in Lung Development and Inflammatory Lung Diseases. *BioMed Research International*, 2018, 1–27. <https://doi.org/10.1155/2018/6057589>
45. Wei, D., Peng, J.-J., Gao, H., Zhang, T., Tan, Y., & Hu, Y.-H. (2015). ALDH1 Expression and the Prognosis of Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Heart, Lung and Circulation*, 24(8), 780–788. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2015.03.021>
46. Wei, Y., Li, Y., Chen, Y., Liu, P., Huang, S., Zhang, Y., Sun, Y., Wu, Z., Hu, M., Qian, W., Wu, H., Liu, F., She, T., & Ning, Z. (2022). ALDH1: A potential therapeutic target for cancer stem cells in solid tumors. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1026278>
47. Westley, R. L., & May, F. E. B. (2013). A Twenty-First Century Cancer Epidemic Caused by Obesity: The Involvement of Insulin, Diabetes, and Insulin-Like Growth Factors. *International Journal of Endocrinology*, 2013, 1–37. <https://doi.org/10.1155/2013/632461>
48. World Health Organization. (2023, June 26). Lung cancer. *Www.who.int*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lung-cancer>
49. Wu, J., Wang, W., Li, Z., & Ye, X. (2022). The prognostic and immune infiltration role of ITGB superfamily members in non-small cell lung cancer. *American Journal of Translational Research*, 14(9), 6445–6466. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36247270>
50. Xiong, J., Yan, L., Zou, C., Wang, K., Chen, M., Xu, B., Zhou, Z., & Zhang, D. (2021). Integrins regulate stemness in solid tumor: an emerging therapeutic target. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01192-1>
51. Yuan, J., Yin, Z., Tao, K., Wang, G., & Gao, J. (2018). Function of insulin-like growth factor 1 receptor in cancer resistance to chemotherapy (Review). *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7276>
52. Zheng, Y., Wang, L., Yin, L., Yao, Z., Tong, R., Xue, J., & Lu, Y. (2022). Lung Cancer Stem Cell Markers as Therapeutic Targets: An Update on Signaling Pathways and Therapies. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.873994>