

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

Posgrado en Ciencias Químico Biológicas

“Efecto de factores neuroendócrinos de A549_{NED} sobre la actividad antineoplásica de Linfocitos T citotóxicos *in vitro*”

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Presenta

M. en C. Alicia Irasema Mendieta Trejo

Dirigida por

Dra. Laura Cristina Berumen Segura

Santiago de Querétaro, Qro., noviembre de 2018



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias Químico Biológicas

“Efecto de factores neuroendócrinos de A549_{NED} en la actividad antineoplásica de Linfocitos T citotóxicos *in vitro*”.

Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctorado en Ciencias Químico Biológicas

Presenta:
Alicia Irasema Mendieta Trejo

Dirigido por:
Dra. Laura Cristina Berumen Segura

Firma

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Presidente

Firma

Dra. María Guadalupe García Alcocer
Secretario

Alejandra Rojas M.

Firma

Dra. Alejandra Rojas Molina
Vocal

Firma

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera
Suplente

Firma

Dra. Rosa Elvira Núñez Anita
Suplente

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
(Noviembre, 2018)

RESUMEN

El cáncer de pulmón es una enfermedad de importancia mundial, debido a su alta tasa de mortalidad en ambos sexos. Un factor importante en el desarrollo de esta enfermedad es la presencia del fenotipo neuroendócrino el cual ha sido correlacionado con una disminución de la sobrevivencia, un incremento en el número de células tumorales así como el incremento en el porcentaje de metástasis. Un aspecto clave en el fenotipo neuroendócrino es la formación de gránulos neurosecretorios con la propiedad fundamental de secretar una gran variedad de factores, como hormonas y neurotransmisores. En años recientes se ha incrementado el interés por estos factores en su tarea como inmunomoduladores, una inquietud trascendental al respecto, es identificar su labor en la comunicación multidireccional que existe dentro del microambiente tumoral.

Hasta el momento no se conoce completamente el efecto inmunomodulador de los factores secretados por el fenotipo neuroendócrino del cáncer de pulmón. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los factores secretados por la línea de adenocarcinoma pulmonar con fenotipo neuroendócrino (A549_{NED}), en la actividad citotóxica de células inmunes (Jurkat) *in vitro*.

La línea de adenocarcinoma de pulmón fue tratada con agentes que incrementan la concentración intracelular de [cAMP] hasta por 120 horas (3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, 0.5 mM), forskolina (FSK, 0.5 mM) o su combinación (I+F) para observar cambios en la adquisición del fenotipo neuroendócrino como morfología, número de neuritas, cromogranina A (CgA por FACS). Se utilizaron cocultivos y la evaluación de la liberación de fluorescencia para evidenciar la interacción de las células citotóxicas (C: Jurkat) versus células blanco (B: A549/GFP), y para observar el efecto de la diferenciación neuroendócrina en la actividad citotóxica, utilizando como células blanco a las células A549 de origen (A549_{CTRL}) y transdiferenciadas (A549_{NED}).

Nuestros resultados muestran cambios en la morfología de A549 (tamaño y presencia de proyecciones de tipo neurita), disminución en la tasa de proliferación, la sobreexpresión del marcador neuroendócrino Cromogranina A, y un patrón

diferencial de la secreción de aminas biogénicas, observados a partir de 120 horas de tratamiento sugiriendo la generación de un fenotipo neuroendócrino terminal. La liberación de fluorescencia de las células A549/GFP después de los cocultivos B:C mostró un incremento dependiente de la proporción B:C.

La adquisición del fenotipo neuroendócrino disminuye la liberación de fluorescencia de las células blanco en cocultivos de 24 horas, sugiriendo una disminución de la citólisis. Del mismo modo, el medio condicionado por sí sólo disminuyó la proliferación y viabilidad de las células Jurkat, corroborando la importancia de la secreción de factores solubles.

Los datos actuales apoyan la generación del fenotipo neuroendócrino de la línea celular A549 (A549_{NED}), estable por 48 horas después la retirada de agonistas de cAMP. En los cocultivos con células citotóxicas, se encontró evidencia de la disminución de la citólisis mediada por la adquisición del fenotipo neuroendócrino y los factores solubles secretados.

ABSTRACT

Lung cancer is one of the leading causes of deaths by cancer in both sexes worldwide. A primary concern of this disease is the presence of neuroendocrine phenotype which has been correlated to a decreased survival, an increased number of peripheral tumor cells and an increased percentage of metastasis. A key aspect of NE phenotype is the formation of secretory granules with the fundamental property of secreting a great variety of factors such as hormones and neurotransmitters. In recent years, there has been an increasing interest in the role of these factors as immunomodulators, and their role in the multidirectional communication within the tumor microenvironment.

It remains unclear the immunomodulator effect of factors secreted in neuroendocrine phenotype of lung cancer. The objective of this work was to test the effect of factors secreted by the lung adenocarcinoma cell line (A549_{NED}) with neuroendocrine phenotype on the cytotoxic activity of immune cells (Jurkat) *in vitro*.

The human lung adenocarcinoma A549 cells were treated with [cAMP] increasing agents up to 120 hours 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 0.5 mM), forskolin (FSK, 0.5 mM) or both (I+F) to observe the changes in the phenotype acquisition: morphology and neurite number (Light microscopy), Chromogranin A (CgA by FACS). Cocultures and fluorescence release were used to evaluate the interaction of cytotoxic activity of T lymphocytes (C: Jurkat) against target cells (T: A549/GFP) and to observe the effect of the neuroendocrine differentiation on the cytotoxic activity, using as target cells original A549 cells (A549_{CTRL}) and transdifferentiated cells (A549_{NED}).

Our results showed changes in the A549 cell morphology (size and presence of neurite-like projections), decreased proliferation rate, the overexpression of neuroendocrine marker chromogranin A, and a differential pattern of biogenic amines, observed in the treatments at 120 hours, suggesting the generation of a terminal neuroendocrine phenotype. The fluorescence release of A549/GFP after C: T co-cultures showed an increasing cytolytic effect that depended of C:T ratio. The neuroendocrine acquisition diminishes the fluorescence release of target cells in 24

h co-culture, indicating a decreased cytolysis. Also, the conditioned medium alone decreased proliferation and viability of Jurkat cells, suggesting the important role of soluble factors secreted.

The current data support the generation of a neuroendocrine phenotype from A549 cell line (A549_{NED}), stable for 48 hours after cAMP stimuli withdrawal. In co-cultures with CTL, there is evidence of diminished cytolysis by means of the acquisition of the neuroendocrine phenotype and the soluble factors secreted.

Esta tesis se realizó bajo la tutoría de la Dra. Laura Cristina Berumen Segura en el Unidad de investigación en Genética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Este trabajo fue financiado parcialmente por la UAQ (FCQ201820). El autor fue apoyado con una beca de Posgrado CONACYT (No. De becario: 286837).

Agradezco el respaldo académico de la Universidad Autónoma de Querétaro, así como al Posgrado en Ciencias Químico Biológicas por abrirme las puertas para continuar mi desarrollo académico.

Agradezco el apoyo técnico de QFB. Daniela San Juan Mora, LB. Viviana Trejo Becerra, LB. Dulce Caraveo Gutiérrez.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a mi familia por ser ejemplo de constancia, por inculcarme el amor y valor de la educación.

Agradezco especialmente a mis padres Alicia y Alfonso su infinito apoyo, amor, impulso y confianza.

A mis hermanos: Pily, Maribel, Raciél y Toño muchas gracias por su cariño, regaños y ayuda constante; por estar presentes siempre, aún en la distancia.

A Mario por ser mi cómplice, mi oído y mi pepe grillo.

Martin muchas gracias por su apoyo y consejos.

Roque gracias por la paciencia.

Any, Alexis, Arath y Johann gracias por las sonrisas que liberan el estrés.

A mis formadoras, de todas tomo un poco para el continuar el camino pendiente.

Dra. Laura Berumen muchas gracias por brindarme un espacio en su laboratorio, por su confianza, por la formación integral y por ser el mejor ejemplo de rectitud y ética.

Dra. Rosa Elvira Núñez Anita muchas gracias por compartir su conocimiento, por permitirme trabajar en conjunto y su interés en mi formación.

Dra. Guadalupe García, Dra. Jessica escobar y Dra. Alejandra Rojas les agradezco su apoyo fundamental en el proyecto y su interés en mi desarrollo profesional.

A mis compañeras del doctorado: Norma Olgún y Daniella Medina, mi sincero agradecimiento por demostrar un interés en el crecimiento mutuo, y mi admiración por la dedicación y el ímpetu que le imprimen a sus proyectos.

A todos mis compañeros en la Unidad de Investigación Genética muchas gracias por crear un ambiente de profesionalismo, apoyo y amistad: Jesús, Alfredo, Magda, Eli, Claudia, Heliana, Uriel, Carlos, Dani.

Agradezco también por la fortuna de conjuntar la amistad y la pasión por la ciencia Karla, Andy, Triny, David, Ale, y Dulce.

A mis compañeras de vida Sonia, Eme y Treicy, gracias por compartir el trayecto conmigo.

ÍNDICE GENERAL

Contenido

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS.....	vii
ÍNDICE GENERAL	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Histología y fisiología del aparato respiratorio	3
Cáncer de pulmón	6
Cáncer neuroendócrino	10
Síndromes híper secretores	11
Células neuroendócrinas en tumores.....	12
Microambiente tumoral	13
Respuesta inmune antitumoral	14
Evasión de la respuesta inmune antitumoral.....	17
Sistema Neuro-inmuno-endócrino	19
Inmunomoduladores	22
Dopamina y sistema inmune	24
Serotonina y sistema inmune	25
Inmunoterapia.....	28
JUSTIFICACIÓN	30
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	32
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	32
OBJETIVO GENERAL.....	32
OBJETIVOS PARTICULARES	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
Material.....	33
Diseño experimental	33
Metodología	35
Transdiferenciación de células de adenocarcinoma de pulmón al fenotipo	

neuroendócrino.	35
Cocultivo de células blanco con células citotóxicas.	36
Determinación del porcentaje de proliferación.	36
Determinación del porcentaje de viabilidad.....	37
Cuantificación y medición de las proyecciones de tipo neurita en células transdiferenciadas.....	38
Determinación del marcadores celulares membranales e intracelulares por citometría de flujo.....	39
Determinación de la liberación de fluorescencia en cocultivo de células blanco <i>versus</i> citotóxicas.....	41
Identificación de aminas biógenas en las células de adenocarcinoma de pulmón humano A549 _{CTRL} y A549 _{NED} por HPLC.....	41
Análisis estadístico	43
RESULTADOS.....	43
Efectos de la transdiferenciación al fenotipo neuroendócrino.....	43
Efecto de los fármacos FSK, IBMX e I+F en la morfología celular de A549 ..	43
Efecto de los fármacos FSK, IBMX e I+F en la proliferación de A549	44
Efecto de los fármacos FSK, IBMX e I+F la formación de proyecciones de tipo neurita en las células A549.	45
Efecto de los fármacos FSK, IBMX e I+F sobre los marcadores de fenotipo neuroendócrino en las células A549.	47
Efecto de la retirada de los fármacos FSK, IBMX e I+F en la morfología de A549.	49
Efecto de los fármacos FSK, IBMX e I+F la producción y secreción de aminas biógenas (noradrenalina, adrenalina, dopamina, serotonina)	50
Efectos de la interacción del cocultivo de células blanco (A549 _{CTRL} y A549 _{NED}) <i>versus</i> células citotóxicas (Jurkat).	51
Efectos de la interacción del cocultivo de células blanco (A549 _{CTRL} y A549 _{NED}) <i>versus</i> células citotóxicas (Jurkat) en la viabilidad de A549 y Jurkat.	51
Efectos de la interacción del cocultivo de células blanco (A549 _{CTRL} y A549 _{NED}) <i>versus</i> células citotóxicas (Jurkat) en la liberación de fluorescencia.....	53
Efecto de los factores neuroendócrinos sobre la actividad de células citotóxicas.	56
Efecto del medio condicionado en la proliferación y viabilidad de células Jurkat.	56
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES.....	64
REFERENCIAS.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la histología del tracto respiratorio..	6
Figura 2. Gráfico de incidencia y mortalidad por cáncer en ambos sexos (2018).	7
Figura 3. Esquema de la clasificación histológica del cáncer pulmonar.	9
Figura 4. Esquema propuesto del origen de los tipos de cáncer.	10
Figura 5. Sinopsis inmunológica y cascadas de señalización de citotoxicidad.	17
Figura 6. Mecanismos de comunicación entre el sistema inmune y el cerebro.	21
Figura 7. Efecto de Serotonina en proliferación y viabilidad e identificación de receptores a serotonina en células Jurkat.	28
Figura 8. Esquema del diseño experimental del proyecto.	35
Figura 9. Efecto de fármacos que incrementan la concentración celular de [cAMP] sobre la morfología de las células A549.	44
Figura 10. Efecto de fármacos que incrementan la concentración celular de [cAMP] sobre la tasa de proliferación de las células A549.	45
Figura 11. Efecto de fármacos que incrementan la concentración celular de [cAMP] sobre el porcentaje de proyecciones de tipo neurita en las células A549.	46
Figura 12. Efecto de fármacos que incrementan la concentración celular de [cAMP] sobre la formación de proyecciones de tipo neurita en las células A549.	47
Figura 13. Efecto de fármacos que incrementan la concentración celular de [cAMP] sobre los marcadores de fenotipo neuroendócrino en las células A549.	48
Figura 14. Efecto de la retirada de fármacos que incrementan la concentración celular de [cAMP] sobre la morfología de las células A549.	50
Figura 15. Efecto de la diferenciación neuroendócrina de A549 sobre la secreción de aminas biógenas.	50
Figura 16. Efecto de la interacción del cocultivo de células blanco:citotóxicas (B:C) sobre la viabilidad de las células blanco.	52
Figura 17. Efecto de la interacción del cocultivo de células blanco <i>versus</i> citotóxicas (B:C) sobre la viabilidad de las células citotóxicas.	53
Figura 18. Citólisis directa en cocultivos de células blanco vs citotóxicas (B:C).	54
Figura 19. Efecto de la diferenciación neuroendócrina sobre la citólisis directa en cocultivos de células blanco vs citotóxicas (B:C).	55
Figura 20. Efecto de los factores NE de A549 _{NED} sobre la proliferación de las células Jurkat.	57
Figura 21. Efecto de los factores NE de A549 _{NED} sobre la viabilidad de las células Jurkat.	57
Figura 22. Diagrama del mecanismo propuesto para la diferenciación	

neuroendócrina.....	58
Figura 23. Efecto de la diferenciación neuroendócrina de A549 sobre la actividad citotóxica de Jurkat.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compendio de las familias de receptores a DA humanos (Arreola <i>et al.</i> , 2016).....	24
Tabla 2. Compendio de las familias de receptores a 5-HT humanos (Berumen <i>et al.</i> , 2012).....	26
Tabla 3. Inmunoterapias aprobadas para el tratamiento de cánceres humanos...	30

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es considerado una enfermedad ampliamente distribuida entre la población mundial de hombres y mujeres. En México, esta tendencia se conserva, con un porcentaje de incidencia de nuevos casos reportados de 7.8 % en hombres y 2.5% en mujeres en 2014; además, este porcentaje incrementa con la edad. Este tipo de cáncer presenta una tasa mortalidad de 10.35% en México (2014) y un 14.5% a nivel mundial (2018), lo cual representa una de las mayores tasas de muertes por cáncer. El pronóstico de vida para los pacientes puede aumentar o disminuir por factores clínicos, histológicos y moleculares; en años recientes, se propusieron varios tipos de clasificaciones de cáncer de pulmón que incluyen estas características.

Uno de los factores recientemente agregados es la presencia del fenotipo neuroendócrino, que se puede encontrar en varios tipos de cáncer de pulmón y disminuye la esperanza de vida del paciente. Los tumores que presentan este fenotipo muestran una población celular heterogénea, con células de morfología poligonal, cromatina gruesa, y positivas a biomarcadores neuroendócrinos como las cromograninas, sinaptofisina y enolasa neuronal; adicionalmente tienen la capacidad de producir y secretar hormonas biogénicas y peptídicas por medio de gránulos neurosecretorios.

Dicha producción y secreción favorece la comunicación de las células neoplásicas dentro de su microambiente tumoral, con otros tipos celulares como las células estromales, endoteliales, y de sistema inmune. En este contexto, se genera una interacción neuro-inmuno-endócrina, que genera una comunicación multidireccional por medio de factores autócrinos y parácrinos que intervienen en la tumorigénesis y afectan la actividad de las células del sistema inmune, cuya función es identificar y eliminar a las células neoplásicas.

Dentro de la interacción con el sistema inmune, es de suma importancia la relación con las células citotóxicas, en particular con los linfocitos T citotóxicos y las células naturales asesinas (NK), por su participación en la respuesta inmune antitumoral. Estas células son las responsables de reconocer a las células neoplásicas a través

de la presencia de moléculas de histocompatibilidad de tipo I (HLA-I) o la ausencia de las mismas, y posteriormente de favorecer la muerte de las mismas por medio de gránulos citolíticos que forman poros en la membrana y activan cascadas pro-apoptóticas, dependientes e independientes de la mitocondria. Por estas lo antes mencionado, es necesaria más información para entender cómo influye la adquisición del fenotipo neuroendócrino sobre la interacción entre las células citotóxicas y tumorales. El objetivo de este trabajo fue identificar el efecto inhibitorio de los factores neuroendócrinos secretados por la línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano A549_{NED} sobre la actividad de los linfocitos T citotóxicos *in vitro*.

ANTECEDENTES

Histología y fisiología del aparato respiratorio

El aparato respiratorio es un sistema que consta de una porción respiratoria y una porción conductora. Está compuesto por una serie de vías aéreas con bifurcación repetida proveniente de la tráquea para comunicarse con el exterior; las vías aéreas disminuyen progresivamente en diámetro y longitud hasta el área distal, los bronquiolos, que está unida a los alveolos -la unidad funcional de los pulmones- por medio de un área de transición con características de ambas, bronquiolos y alveolos (en humanos); las tres regiones en conjunto son los mayores componentes de los dos pulmones que conforman la porción respiratoria del aparato respiratorio. Este sistema túbulo-alveolar está compuesto de tejido estromal y epitelial que contiene una gran variedad de poblaciones celulares distribuidas en diferentes sitios anatómicos, con la finalidad de renovar el oxígeno y eliminar dióxido de carbono (Chang *et al.*, 2008; Ross y Pawlina, 2007; West, 2012).

El estroma está conformado por una matriz de tejido conectivo compuesto por una amplia variedad celular, como cartílago bronquial, músculo liso, tejido nervioso, fibroblastos, linfocitos y macrófagos (Ross y Pawlina, 2007; West, 2012).

El compartimento epitelial contiene una gran variedad de poblaciones celulares; al menos 49 tipos celulares distintos se han identificado en el epitelio humano adulto de las cuales, al menos 12 tipos están bien diferenciados. El sistema respiratorio está completamente delineado por una capa continua de células epiteliales que le permiten mantener su funcionamiento fisiológico normal, sin embargo, la distribución anatómica de cada tipo celular está correlacionada con la función fisiológica que desempeña en cada segmento de la vía aérea (Chang *et al.*, 2008).

La tráquea y los bronquios proximales están especializados en atrapar y remover partículas y microorganismos, por medio de la secreción de moléculas surfactantes, mucina y péptidos antimicrobianos, y la limpieza o aclaramiento mucociliar, estas funciones son posibles gracias a las células basales, secretoras ciliadas y no ciliadas; también algunas células pulmonares neuroendócrinas (PNECs) que

representan menos del 1% de la población epitelial y se encuentran en las bifurcaciones de las vías aéreas (Chang *et al.*, 2008).

El epitelio de los bronquiolos distales está conformado por células columnares de clara no ciliadas y células pulmonares neuroendócrinas; en él se lleva a cabo una mínima función mucociliar debido a su estrechez, sin embargo, su mayor función es censar y acondicionar el aire que ingresa. Las PNECs pueden encontrarse solas o agrupadas formando cuerpos neuroepiteliales (NEB) en la unión de los conductos broncoalveolares. Se sabe que las PNECs están invadas en la parte basal y tienen microvellosidades que se proyectan hacia el lumen de la vía aérea en su superficie apical. Participan en el desarrollo y reparación de tejidos no endócrinos, por medio de la producción y liberación del contenido de gránulos neurosecretorios como respuesta a estímulos fisiológicos como la hipoxia, con la finalidad de alterar los niveles hormonales periféricos y el comportamiento endócrino-dependiente; su función fisiológica en las vías aéreas es como quimiorreceptores para la detección de oxígeno, regulación del flujo sanguíneo pulmonar, control del tono bronquial, mantenimiento del nicho de células madre, etc. (Branchfield, 2015; Chang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2012a). Además, han sido señaladas como parte del repertorio de respuestas neuronales a la activación del sistema inmune, por medio de la alteración de los niveles hormonales (Branchfield, 2015; Song *et al.*, 2012a).

La región alveolar del pulmón también es conocida como la zona respiratoria, es el lugar donde se produce el intercambio gaseoso entre el aire y la sangre. Cada alveolo se encuentra adyacente a una red de capilares que permite la cercanía entre la sangre y el aire inspirado que se encuentra en la luz alveolar. Las células alveolares de Tipo 1 y 2 (AT1 y AT2), así como las células en cepillo constituyen el epitelio alveolar, mientras que las AT1 se especializan en el intercambio de oxígeno, las células cuboidales AT2 se encargan de la secreción de surfactante que previene el colapso pulmonar (Chang *et al.*, 2008; Ross y Pawlina, 2007; West, 2012).

Se ha observado una estrecha relación entre las células neuroendócrinas de los NEB y las células epiteliales alveolares; estudios recientes sugieren que las PNECs comparten un linaje común con las células alveolares tanto de progenitores

comunes como separados durante la ontogenia pulmonar, lo que contribuye a la plasticidad que retienen las PNECs en etapas adultas y que les permite regenerar a las poblaciones de células de clara y ciliadas posterior a algunas lesiones (Linnoila, 2006; Song *et al.*, 2012a).

A diferencia de otros tipos celulares, se considera que las PNECs tienen una función evolutiva conservada pues se encuentran presentes en los pulmones de la mayoría de especies examinadas incluyendo anfibios, reptiles, aves, mamíferos y en filamentos branquiales de peces. En individuos sanos las células neuroendócrinas son numerosas en tejidos fetales y disminuyen gradualmente durante la madurez del individuo. Las células neuroendócrinas pulmonares son el primer tipo celular diferenciado en aparecer en el epitelio, lo que implicaría que la especialización ontogénica del pulmón comenzaría con progenitores de naturaleza neuroendócrina (Linnoila, 2006; Song *et al.*, 2012a).

Además de las PNECs, el epitelio pulmonar contiene nichos de poblaciones de células pluripotenciales distribuidas a lo largo de todo el sistema, lo que le permite mantener la integridad de las vías aéreas y responder eficientemente al daño, aunque aún se encuentra en investigación la identificación de las subpoblaciones de las células pluripotenciales (Chang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2005).

Debido a su función, el epitelio pulmonar se encuentra expuesto a diversos daños provocados por el ambiente (microorganismos, partículas tóxicas, etc.); dentro de este tejido existen diferentes vías para contrarrestar el daño (mucina, aclaramiento mucociliar, plasticidad por células pluripotenciales y PNECs, etc.), no obstante en ocasiones estos daños son difíciles de reparar y dan lugar a diferentes patologías. Las enfermedades del aparato respiratorio más frecuentes son: bronquitis, neumonía, asma, neumotórax, edema pulmonar, embolia pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y cáncer.

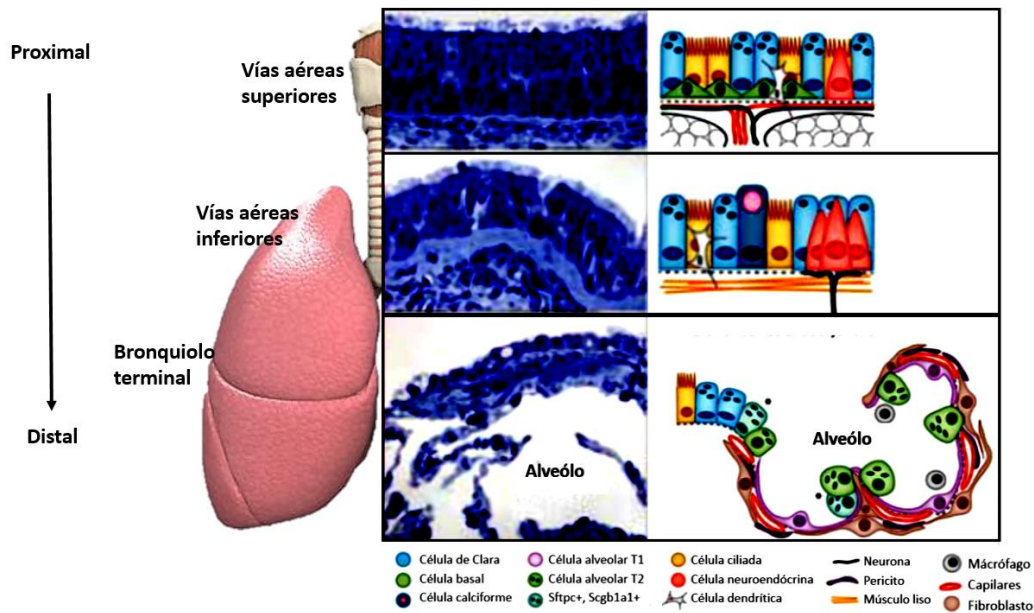


Figura 1. Diagrama de la histología del tracto respiratorio. Modificado de Semenova, 2015 (Semenova *et al.*, 2015).

Cáncer de pulmón

El cáncer es una familia de enfermedades que se caracteriza por el crecimiento anormal de células causado por múltiples cambios en la expresión génica que favorece un descontrol de la proliferación celular y la muerte celular. Además, favorece la evolución a una población de células que pueden invadir tejidos y hacer metástasis a sitios distantes, causando morbilidad, y sin tratamiento, la muerte del hospedero (Ruddon, 2007).

Esta patología es un problema de salud mundial debido a su alto índice de morbilidad y mortalidad; en 2018 se estima que se registrarán aproximadamente 18 millones de casos en el mundo, que provocarán alrededor de 9.6 millones de muertes a nivel mundial (Bray, 2018). En México, según datos reportados por la INEGI de 2016, esta enfermedad es la tercera causa de mortalidad en general, con una tasa de 10.35 defunciones anuales en la población en general (Bray, 2018; Ferlay J, 2018; INEGI, 2017). Los principales factores de riesgo para el desarrollo de cáncer son: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol, estos

factores además están presentes en un tercio de las muertes por cáncer en el mundo (Ferlay J, 2018; Mao *et al.*, 2016).

De manera específica, el cáncer de pulmón representa la primera causa de incidencia en ambos sexos a nivel mundial (2.1 millones), así como la primer causa de muerte por cáncer en ambos sexos; en 2018 se estima que generará un 19.78% de todas las muertes por cáncer. En México está reportado como la tercera causa de muerte por cáncer en pacientes de 30-59 años. Tiene una tasa de sobrevivencia de 52.2 % contra el 15.6 % de los cánceres en general, sin embargo este índice disminuye a 3.6% cuando se presenta proveniente de metástasis (Ferlay J, 2018; Mao *et al.*, 2016).

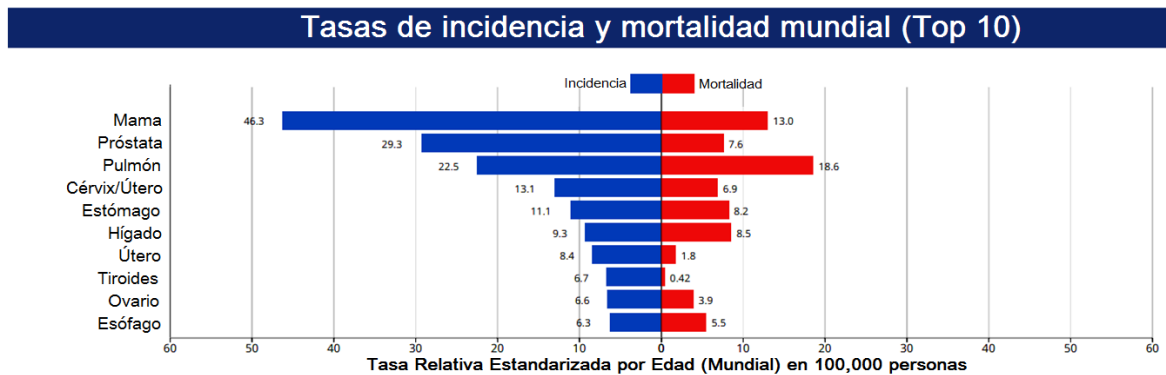


Figura 2. Gráfico de incidencia y mortalidad por cáncer en ambos sexos (2018). Modificado de Cancer Today GLOBOCAN-IARC, 2018 (Ferlay J, 2018).

El consumo de tabaco es conocido como el principal factor de riesgo del cáncer de pulmón, no obstante, existen otros factores que contribuyen al desarrollo de esta enfermedad, entre ellos se encuentran: factores hereditarios, ser fumador pasivo, dietas bajas en retinoides y carotenoides, enfermedades previas como bronquitis y enfisema, contaminación ambiental, exposición a moléculas como asbestos y radón, entre otras. La IARC ha señalado 12 factores de riesgo ocupacionales entre los que están incluidos la exposición a arsénico, aluminio, asbestos, sílica cristalina, bis-cloro-metileter, cadmio, berilio, cromo hexavalente, níquel, radón, hollín y humos de gasificación de coque y carbón (Mao *et al.*, 2016; Minna *et al.*, 2002; Mollberg *et al.*, 2011).

El tabaco contiene más de 60 carcinógenos conocidos, entre ellos se encuentran hidrocarburos policíclicos y nitrosamina (4-metilamino-1-(3-piridil)-1-butanona); estos cancerígenos se unen al DNA formando aductos y mutaciones puntuales, como la transversión de G-T en genes que codifican para proteínas como p53 y K-ras. A nivel mundial, se ha estimado que alrededor de 80% de los casos en hombres y el 50% de los casos en mujeres en el mundo son causados por fumar; estas cifras se conservan en el caso de fumadores pasivos. Además, algunos estudios sugieren que la correlación con el riesgo entre consumidores de tabaco está más relacionada con el tiempo de exposición al tabaco, que con el número de cigarros consumidos por día. Éstas cifras aumentan si se suman otros factores como la susceptibilidad genética en cromosomas como la región 15q25 que contiene 3 regiones del gen del receptor nicotínico de acetilcolina, polimorfismos que reducen la actividad de la familia de la enzima glutatión S transferasa, incrementan la actividad del citocromo p450 o la exposición adicional a asbestos que aumenta hasta 59 el riesgo de cáncer pulmonar (Mao *et al.*, 2016; Minna *et al.*, 2002).

A pesar de los avances tecnológicos en la detección y el diagnóstico de esta enfermedad la mayoría de los casos se detectan en fases avanzadas, aproximadamente el 15% de los casos se detecta en fases tempranas. Los síntomas más comunes presentes en la enfermedad son tos, dolor torácico, dificultad para respirar (disnea), expectoración de sangre (hemoptisis), pérdida de peso, entre otros signos pulmonares (ISSSTE, 2009; Mao *et al.*, 2016).

La clasificación más común de este tipo de cáncer es histológica y agrupa a varios tipos de cáncer en 2 grandes grupos. El cáncer de pulmón de células no pequeñas y el cáncer de pulmón de células pequeñas, NSCLC y SCLC respectivamente, por sus siglas en inglés. Esta clasificación permite agrupar características histológicas, moleculares, epigenéticas y clínicas para cada subtipo (Ginsberg *et al.*, 2001).

El carcinoma de células no pequeñas agrupa a los tumores carcinoides, carcinoma de células grandes (9%), carcinomas de glándulas salivares, carcinoma de células escamosas (30%), carcinoma con elementos pleiomórficos, sarcomatoides o sarcomatosos y adenocarcinoma (41%). El carcinoma de células pequeñas (SCLC) es considerado una neoplasia del tracto respiratorio que representa

aproximadamente un 14.1% de los casos (Mollberg *et al.*, 2011). Además, es el subtipo más agresivo, con mayor incidencia en pacientes fumadores, tasa de supervivencia a 5 años menor a 7%, mayor resistencia a la quimioterapia y un mayor porcentaje de células positivas a marcadores neuroendócrinos como cromogranina, CGRP y NCAM1 (Semenova *et al.*, 2015; Sorhaug, 2007).

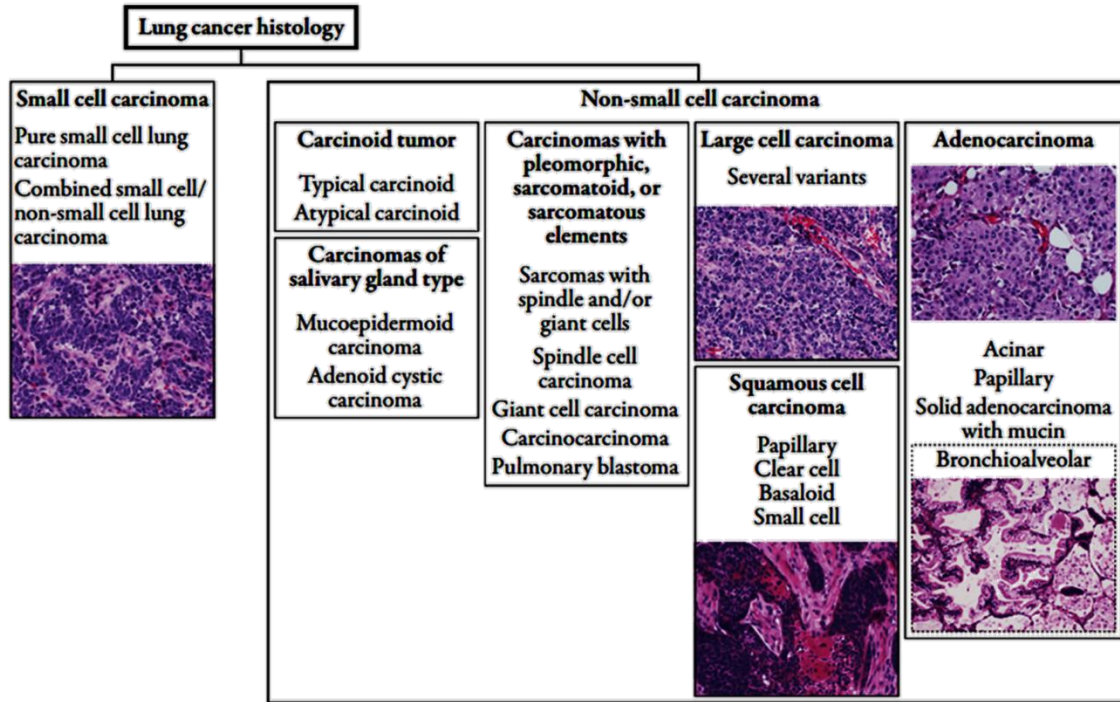


Figura 3. Esquema de la clasificación histológica del cáncer pulmonar. Modificado de Molberg, 2014 (Mollberg *et al.*, 2011).

Esta clasificación ha permitido hacer una correlación entre el tipo histológico de las células pulmonares con el tipo de tumor que se desarrolla. Se ha sugerido que el carcinoma escamoso que se presenta en vías aéreas superiores podría originarse a partir de células basales; el carcinoma de células grandes presente en tejido broncoalveolar, a partir de células de clara, basales y calciformes. El adenocarcinoma se encuentra más comúnmente en tejidos periféricos y podría provenir de células AT1 y AT2. Por último, el carcinoma de células pequeñas que aparece frecuentemente en vías aéreas centrales, comparte algunas características con células neuroendócrinas, por lo que ha sugerido que el SCLC se deriva de PNECs o de progenitores neuroendócrinos; esta hipótesis se ha demostrado en

modelos murinos, sin embargo aún no se dispone de modelos que permitan rastrear los eventos tempranos que permiten la transformación de las células neuroendócrinas. Sólo el 15% del NSCLC presenta características neuroendócrinas y presentan características biológicas similares al SCLC (Blanpain, 2013).

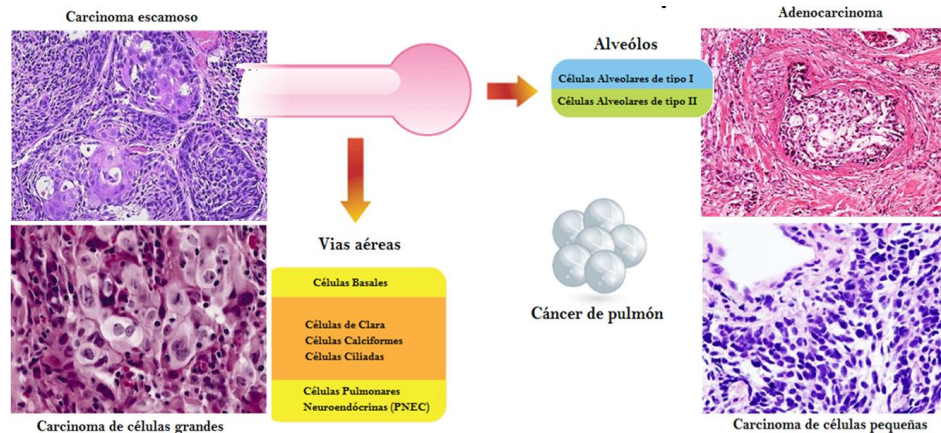


Figura 4. Esquema propuesto del origen de los tipos de cáncer. Modificado de Banplain, 2013 (Blanpain, 2013).

Sin embargo, en esta clasificación se excluyen subtipos de cáncer que presentan características histológicas y moleculares heterogéneas, por lo que en años recientes, diversos autores han generado nuevas clasificaciones de tumores a partir de técnicas de secuenciación genómica y proteómica, que permiten distinguir entre subtipos de cáncer mucho más específicos. Uno de éstos subtipos de cáncer es el cáncer neuroendócrino (Bhattacharjee *et al.*, 2001; Travis *et al.*, 2011).

Cáncer neuroendócrino

Los tumores de células neuroendócrinas o tumores neuroendócrinos son neoplasias epiteliales con una diferenciación neuroendócrina predominante, pueden originarse de cualquier parte del cuerpo. Sólo el 15% del NSCLC presenta características neuroendócrinas y presentan características biológicas similares al SCLC. En México, en 66% de los casos con tumores neuroendócrinos están localizados en el tracto enteropancreático, mientras que, sólo el 7% corresponde a cáncer pulmonar (Chang *et al.*, 2013; Hernández-López *et al.*, 2015).

En neoplasias gastrointestinales, de próstata, tiroides, timo y pulmón esta característica se ha correlacionado con un fenotipo más agresivo, pues disminuye la tasa de supervivencia de los pacientes, aumenta el porcentaje de tumores resistentes a fármacos, así como el número de células tumorales circulantes, de metástasis y el porcentaje de reincidencia (Duerr y Chung, 2007; Isaka *et al.*, 2012; Iyoda *et al.*, 2007; Modlin *et al.*, 2014; Stovold *et al.*, 2013).

Estos tumores en general, presentan una población heterogénea, con tasa de proliferación baja, morfología poligonal, con cromatina gruesa y un patrón de distribución en nidos, rosetas, trabéculas y acinos, con la formación de nuevos organelos como gránulos neurosecretorios (Iyoda *et al.*, 2007; Oberg *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2012b).

Se ha encontrado que estos tumores son positivos a los marcadores de fenotipo neuroendócrino como CgA, SYP y NSE. Y producen otros analitos biológicamente activos como hormonas, péptidos y aminas (Conteduca *et al.*, 2014; Oberg *et al.*, 2015).

Síndromes híper secretorios

Se sabe que algunos tumores neuroendócrinos y adquieren la capacidad de sintetizar y modular sus propios factores neuroendócrinos. En pacientes con cáncer se ha pensado que algunas hormonas influyen en la tumorigénesis y metástasis por actividad autócrina o por interacciones célula-célula (Alonso-Gordoa *et al.*, 2015; Mazzocchi *et al.*, 2010; Modlin *et al.*, 2014).

En un estudio con ratones se observó que existe una correlación entre la incidencia de tumores pulmonares de fenotipo neuroendócrino que secreta POMC con un aumento del porcentaje de metástasis a hígado, aumento de LDH, baja supervivencia y mayor número de células tumorales circulantes; además, en estudios clínicos se ha observado un mayor porcentaje de tumores resistentes a fármacos, los pacientes presentan mayor tasa de mortalidad y mayor riesgo de reincidencia (Asamura *et al.*, 2006; Fisseler-Eckhoff y Demes, 2012).

Células neuroendócrinas en tumores

Se ha sugerido que las células neuroendócrinas de estos tumores podrían provenir del 1% de PNECs, de progenitores neuroendócrinos o de sufrir una transdiferenciación intratumoral; algunas de estas hipótesis se han demostrado en modelos murinos, sin embargo aún no se dispone de modelos que permitan rastrear los eventos tempranos que permiten la transformación de las células neuroendócrinas (Blanpain, 2013; Karachaliou *et al.*, 2016; Oser *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2012a; Stovold *et al.*, 2013).

La transdiferenciación es el proceso irreversible en el cual células totalmente diferenciadas cambian de un tipo celular a otro (Abate-Shen y Shen, 2000). La transdiferenciación neuroendócrina puede inducirse *in vitro* por medio de la exposición de células de adenocarcinoma de próstata (Jones y Palmer, 2012) y pulmón (Walker *et al.*, 2006) a diferentes estímulos, como la radiación ionizante fraccionada, inhibición por contacto, deprivación de andrógenos, niveles elevados de interleucina 6 (IL-6) o el aumento sostenido en la concentración intracelular de cAMP por medio de agonistas de cAMP, estimuladores de cAMP e inhibidores de la PDE, entre otros. De acuerdo al grupo de Bang y col., esta transdiferenciación puede ser reversible o terminal dependiendo del tipo de tratamiento y el tiempo de exposición (Bang *et al.*, 1994).

De manera general, estos estímulos permiten la activación y fosforilación de proteínas como EPACs y PKA, respectivamente; que activan factores de transcripción como CREB y STAT3, y a su vez favorecen la expresión de genes como protocaderina PC, Foxa, Hox1, NeuroD1, Mdk, APLP1, BIRC1, NOTCH3, REST, mac25/IGFBP-rP1 y 25.1 (Cindolo *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2015; Jones y Palmer, 2012; Santoni *et al.*, 2014; Terry y Beltran, 2014; Walker *et al.*, 2006).

Las células neuroendócrinas transdiferenciadas muestran una tasa de proliferación baja, cambios morfológicos como la formación de proyecciones de tipo neurita, aparición de gránulos secretores y la expresión de marcadores neuroendócrinos como CgA, NSE, CD56 y SYN (Conteduca *et al.*, 2014; de Herder, 2007; Lapuk *et al.*, 2012; Ramírez-Balderrama *et al.*, 2013), particularmente, en 2013 el grupo de

Chang y col. observaron que las células de adenocarcinoma de pulmón humano A549 pueden ser transdiferenciadas al fenotipo neuroendócrino al ser tratadas con cAMP e IBMX; estas células adquieren una morfología extendida, alargada y con una distribución dispersa en la superficie de cultivo. Además, expresan cromogranina A, sinaptofisina y una población CD56 positiva y otra CD56 negativa (Chang *et al.*, 2013).

Microambiente tumoral

Dado que se ha definido a la tumorigénesis como un proceso progresivo que transforma a las células normales en células altamente invasivas, algunos autores se han enfocado a los eventos moleculares e intracelulares que inducen dicha transformación, sin embargo, en años recientes han cobrado relevancia los factores fisiológicos que regulan el microambiente donde se desarrolla el tumor, mejor conocido como microambiente tumoral (compuesto por células estromales, células del sistema inmune, citocinas, factores neuroendócrinos y matriz extracelular).

El desarrollo del cáncer, de manera general, está condicionado por varios procesos que pueden verse afectados por la interacción existente dentro del microambiente tumoral, tanto de las poblaciones celulares existentes (células epiteliales, inmunes, del parénquima y neoplásicas) como de la composición de los mediadores fisiológicos neurotransmisores, hormonas y citocinas.

Hannahan y Weinberg describieron que las células tumorales han de presentar 6 alteraciones esenciales en su fisiología que las caracterizan. Posteriormente agregaron 4 características más a esta lista (Hannahan y Weinberg, 2011):

1. Autosuficiencia en la producción de señales de crecimiento
2. Insensibilidad a las señales de anticrecimiento
3. Evasión de la apoptosis
4. Pérdida de la limitación al potencial reproductivo
5. Estimulación de la angiogénesis
6. Invasión de tejidos y metástasis
7. La inestabilidad genética y mutaciones

8. La promoción de un estado inflamatorio
9. La reprogramación de la energía metabólica
10. Evasión del sistema inmune

Debido a que las células tumorales reaccionan en respuesta a las señales del ambiente por mecanismos autócrinos y parácrinos, la interacción entre las células tumorales y las células estromales e inmunes del huésped da lugar al microambiente tumoral (Entschladen *et al.*, 2006).

Respuesta inmune antitumoral

Hannah y Weinberg en 2011 señalaron a la evasión del sistema inmune como una de las once alteraciones esenciales que caracterizan a las células tumorales; este proceso ha sido definido como inmunoedición/ inmunoselección, propone que las poblaciones de células tumorales que son reconocidas por el sistema inmune, son reemplazadas por células con variaciones genéticas que presentan una disminución en sus marcadores de diferenciación y son inmunoevasivas (Hannah y Weinberg, 2011; Pavon *et al.*, 2016). La inmunovigilancia es la habilidad del huésped para reconocer células transformadas, fue descrita por Burnet y Thomas, y postula que la respuesta inmunológica adaptativa es responsable de prevenir el desarrollo del cáncer en individuos inmunocompetentes; posteriormente Gershon y Kondo retomaron el concepto y acuñaron el término de “células supresoras” para describir a las células del sistema inmune con actividad antigénica específica. Sin embargo, hasta 1980 se identificaron a los linfocitos T como las células responsables de suprimir las células tumorales. Se ha descrito a los macrófagos, neutrófilos, linfocitos T, células asesinas naturales (NK) y dendríticas como los principales efectores de la inmunidad antitumoral (Mitra *et al.*, 2003; Pavon *et al.*, 2016).

La regulación de la proliferación de las células del sistema inmune está mediada parcialmente por el tipo de citocinas que produce. En el caso de los linfocitos T, el mecanismo que promueve su proliferación involucra a la activación de sus clones

(Th, Treg o CTL) y la secreción de diferentes interleucinas (IL) por ejemplo IL-2, IL-4 e IL-6 que son la señal para su expansión clonal y diferenciación (Kindt *et al.*, 2007; Punt, 2013)

La respuesta inmune antitumoral exige una actividad citotóxica intensa mediada por los linfocitos T citotóxicos (CTL) y las células asesinas naturales, que una vez activados, promueven la apoptosis de las células tumorales por medio de diversos mecanismos.

La fase efectora de los CTL incluye una secuencia sincronizada de fenómenos que se inicia con la unión de la célula blanco a la célula de ataque. El proceso comienza cuando el receptor de membrana TCR de un CTL reconoce una fracción proteica de una célula tumoral ensamblada a una MHC de clase I expuesta en la membrana de la célula blanco junto con el acoplamiento de las moléculas coestimuladoras CD8, CD28-B.7 y CD40L-CD40; después de este reconocimiento específico se da la activación de CTL mediada por antígeno. Por medio de microscopía electrónica se observó la presencia de gránulos de almacenamiento intracelulares electrodensos en los CTL activos, que los CTL inactivos no contienen. El análisis del contenido mostró monómeros de 65kDa de una proteína que forma poros llamada perforina y varias serinproteasas denominadas granzimas (o fragmentinas). Inmediatamente después de la formación de un conjugado de CTL y célula blanco, el aparato de golgi congrega y almacena los gránulos reorientados dentro del citoplasma del CTL para concentrarlos cerca de la unión con la célula blanco, a continuación se liberan monómeros de perforina y proteasas granzima de los gránulos por exocitosis hacia el espacio de unión entre las dos células (Kindt *et al.*, 2007).

Después de que los monómeros de perforina entran en contacto con la membrana de la célula blanco, experimentan un cambio conformacional que expone un dominio anfipático y se insertan en la membrana de la célula blanco; luego se polimerizan los monómeros (en presencia de Ca^{2+}) para formar poros cilíndricos con diámetro interno de 5 a 20 nm., dando como resultado la formación de un gran número de poros con conjugados de perforinas en la membrana de la célula blanco. Los canales de perforina permiten la entrada de otras sustancias del granulosoma, como

las granzimas que de manera indirecta inducen la fragmentación del DNA en oligómeros de 200 pb, cinco minutos después del contacto con CTL (Kindt *et al.*, 2007).

Las granzimas introducidas, al igual que la activación de FAS por el ligando de Fas (FasL) en el CTL originan la activación de la vía de las caspasas en la célula blanco. El complejo Fas-FasL activa a la proteína FADD (*Fas-associated protein with death domain*), que a su vez convierte a la procaspasa de caspasa 8 e inicia la vía apoptótica de las caspasas. El resultado final de las vías de perforina/granzima y la mediada por Fas es la activación de vías de apoptosis y necrosis que se encuentran en la célula blanco. Las vesículas del CTL pueden también contener TNF- α y TNF- β , que junto con el IFN- γ producido por linfocitos cooperadores o por otras células, desencadena efectos citotóxicos que tardan más tiempo (>3 horas) que los anteriores (Kindt *et al.*, 2007).

Las células asesinas naturales (NK) son una población pequeña de linfocitos granulares grandes que constituyen 5 a 10% de los linfocitos en sangre periférica humana y forman parte del sistema inmune innato. Las células NK son células linfoides derivadas de la médula ósea que comparten un progenitor temprano común con los linfocitos T, aunque la mayoría no expresa receptores de célula T o inmunoglobulinas incorporadas en sus membranas plasmáticas; estos linfocitos cuentan con la capacidad de reconocer células tumorales por medio de receptores de tipo KIR. Las células NK llevan FasL en su superficie e inducen con facilidad la muerte en células blanco que poseen Fas. El citoplasma de células NK contiene múltiples gránulos que incluyen perforina y granzimas. A diferencia de los CTL, que requieren activarse antes de la aparición de gránulos, las células NK son citotóxicas de manera constitutiva y siempre tienen gránulos grandes en su citoplasma. Después de adherirse las células NK a una célula blanco tiene lugar la desgranulación junto con liberación de perforina y granzimas en la unión entre las células interactuantes. Se piensa que la perforina y granzima tienen las mismas funciones en la muerte de células blanco por apoptosis mediada por NK que en el proceso de citólisis mediado por los linfocitos T citotóxicos (Kindt *et al.*, 2007).

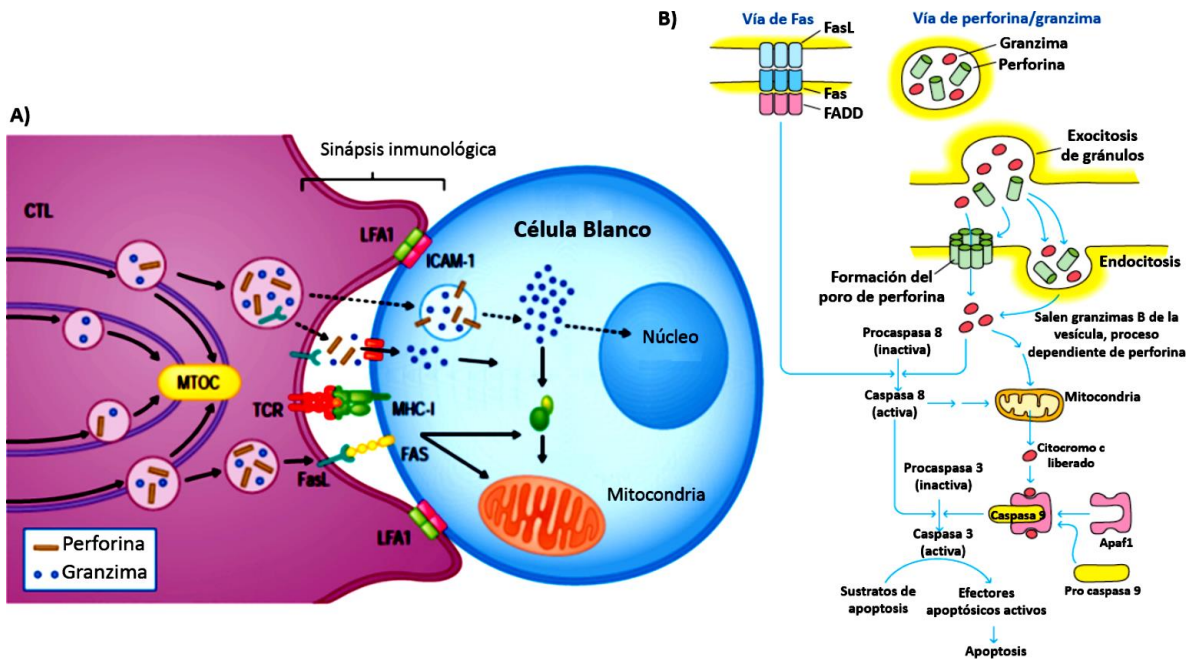


Figura 5. Sinápsis inmunológica y cascadas de señalización de citotoxicidad. A) Formación de poros membranales en célula blanca por liberación de vesículas de perforina y granzima B) Vías de señalización apoptóticas de perforina y granzima. Modificado de Kindt et al (Kindt et al., 2007).

Los mecanismos anteriores, por medio de los cuales se expone el papel fundamental del sistema inmune en el desarrollo del cáncer son conocidos como la inmunovigilancia del cáncer y la idea original fue propuesta en 1957 por Sir Macfarlane Burnet and Lewis Thomas, quienes señalaron que “sería factible que pequeñas acumulaciones de células neoplásicas puedan desarrollarse y que debido a su posesión de nuevos potenciales antigénicos provoquen una reacción inmunológica eficaz con la regresión del tumor y ningún indicio clínico de su existencia”. Sin embargo, este concepto fue ampliamente debatido debido a la alta tasa de incidencia de neoplasias, y una explicación a ese debate serían los mecanismos de evasión tumorales que se explican a continuación (Dunn et al., 2006; Dunn et al., 2004).

Evasión de la respuesta inmune antitumoral

Desde una perspectiva inmunológica, las células neoplásicas son consideradas como células propias alteradas las cuales han modificado los mecanismos normales

de regulación del crecimiento; este tipo de células posee además una maquinaria de defensa que las hace pasar desapercibidas para el sistema inmune del huésped. Los mecanismos de evasión al sistema inmune consisten en diversos procesos que disminuyen la actividad de inmunovigilancia (Kindt *et al.*, 2007; Prendergast *et al.*, 2014).

Uno de estos mecanismos es la modulación antigénica, que consiste en la aparición o estimulación de anticuerpos en el tumor que pueden modular a los antígenos tumorales, y de esta manera actúan como factor bloqueador de la respuesta inmune. Es posible que el propio anticuerpo antitumoral se fije a antígenos específicos del tumor y los oculte para que no los adviertan las células T citotóxicas. En muchos casos, los factores bloqueadores no son sólo anticuerpos, sino complejos integrados con antígenos tumorales. Además, se ha reconocido que ciertos antígenos específicos del tumor desaparecen de la superficie de las células tumorales en presencia de anticuerpo sérico, y que reaparecen una vez que el anticuerpo deja de estar presente. Siempre que se encuentre el anticuerpo estas células tumorales no exhiben el antígeno, y por ello no pueden ser eliminadas (Kindt *et al.*, 2007; Pavon *et al.*, 2016).

Otro mecanismo de evasión tumoral es la expresión de concentraciones bajas (o incluso pérdida completa) de las moléculas de histocompatibilidad de tipo I; el resultado de esta alteración es la selección de células tumorales con menor expresión de MHC clase I al eliminar de manera preferente aquellas con expresión normal de MHC. La menor expresión de las MHC de clase I se puede acompañar de crecimiento tumoral progresivo, y por lo tanto su ausencia en un tumor es un indicio de un peor pronóstico (Kindt *et al.*, 2007).

Además, las células tumorales también tienen la capacidad de emitir señales coestimuladoras deficientes. La activación de la célula T requiere una señal activadora emitida por el reconocimiento de un complejo péptido-molécula MHC por la célula T receptora, junto con una señal coestimuladora transmitida por la interacción de B7 en células presentadoras de antígeno con CD28 en células T. Se necesitan ambas señales para inducir la producción de IL-2 y la proliferación de células T. La inmunogenicidad deficiente de muchas células tumorales se debe, en

gran medida, a la falta de moléculas coestimuladoras. Sin números suficientes de células presentadoras de antígeno en la proximidad inmediata de un tumor, las células T reciben sólo una señal activadora parcial, lo que puede tener como efecto anergia clonal (Kindt *et al.*, 2007; Pavon *et al.*, 2016).

Sistema Neuro-inmuno-endócrino

A lo largo de los años, numerosos investigadores se han enfocado en analizar como la concentración y distribución de los péptidos, hormonas y neurotransmisores en los tumores de fenotipo neuroendócrino podrían estar asociadas con enfermedades y otras condiciones patológicas, sin embargo, la mayoría de las conexiones funcionales permanece sin explicación.

Durante décadas el sistema nervioso, el sistema endócrino y el sistema inmune habían sido considerados y caracterizados como sistemas separados. Actualmente se considera a estos sistemas como componentes de una unidad, para la cual es importante considerar sus interacciones, tanto entre sistemas como al interior de cada sistema (Mravec *et al.*, 2008; Wrona, 2006).

Entre sistema nervioso central, sistema inmunológico, y el sistema endocrino se establece una red de intercambio de información multidireccional, y responden a los estímulos de una manera coordinada. Estos sistemas como un conjunto fueron descritos por primera vez en la década de 1970, por Besedovsky y colaboradores, quienes encontraron que durante la respuesta inmune, la concentración de glucocorticoides se elevaba con la finalidad de provocar una respuesta inhibitoria; estas primeras observaciones experimentales sugerían que el sistema inmune actúa conjuntamente con el sistema nervioso y endócrino para constituir una red interactiva y comunicativa. Posteriormente, se observó una relación entre la innervación directa (timo y médula ósea) e indirecta (bazo y nódulos linfáticos) de órganos del sistema inmune y endócrino, como la innervación del timo que regula el desarrollo de linfocitos T y la barrera hematoencefálica que regula el desarrollo de linfocitos B (Mravec *et al.*, 2008).

Algunas de las regiones del cerebro que podrían modular estos cambios están en

el hipotálamo, por su habilidad para modular la secreción hormonal de la hipófisis y del sistema nervioso simpático, como el núcleo del tracto solitario (NTS) que transmite la información visceral y recibe señales pro inflamatorias de tumores periféricos a través del nervio vago; el núcleo paraventricular, que es el centro que coordina los sistemas autonómico, endócrino e inmune y, el núcleo supraquiasmático, que es el principal regulador del ciclo circadiano, también podría estar asociados (Pittman, 2011).

Diversos estudios han demostrado que citocinas, péptidos, hormonas, neurotransmisores y sus receptores se expresan y se sintetizan en tejidos del sistema nervioso, endócrino e inmune. Se sabe que las células de los tres sistemas comparten receptores para mediadores que son típicos de otros sistemas (por ejemplo receptor β_2 para catecolaminas). Debido a ésto, los mediadores neuroendocrinos afectan a la función inmunitaria, y las citocinas modifican funciones nerviosas y/o endocrinas (Sternberg, 2006).

Esta evidencia muestra una conexión entre los 3 sistemas (nervioso, endócrino e inmune) por la cual se describe que su relación es anatómica y funcional. Gracias a que estos sistemas comparten ligandos y receptores, se ha considerado que el sistema inmune podría servir como “sexto sentido” para detectar las señales que el cuerpo no puede escuchar, ver, oler, tocar o probar. El sistema inmune tiene la capacidad de detectar patógenos, alérgenos y células tumorales con gran sensibilidad y especificidad (Blalock y Smith, 2007; Mravec *et al.*, 2008).

Está bien establecido que el sistema nervioso central regula al sistema inmune a través de diferentes mecanismos. Los desórdenes unipolares y de ansiedad parecen estar relacionados con una pérdida de la homeostasis del sistema neuro-inmuno- endócrino.

Además, se ha observado un alto porcentaje de comorbilidad de varios desórdenes psiquiátricos como depresión con enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, inflamatorias intestinales como: enfermedad de Chron, colitis; también psoriasis, artritis reumatoide, lupus, VIH, desórdenes neurodegenerativos y cáncer. Existe una relación con una pérdida de la homeostasis del sistema neuro-inmuno-endócrino al verse caracterizados por alteraciones funcionales y

neuronales, como manifestaciones de un estado crónico hiponoradrenérgico e hiposerotoninérgico que modifican el balance entre la respuesta inducida por Th1 y Th2 (Elenkov, 2008; Webster *et al.*, 2002).

Por otro lado, varios estudios epidemiológicos indican que el estrés, la depresión crónica y la falta de apoyo social actúan como factores de riesgo para el desarrollo de cáncer y su progresión (Melmed, 2001).

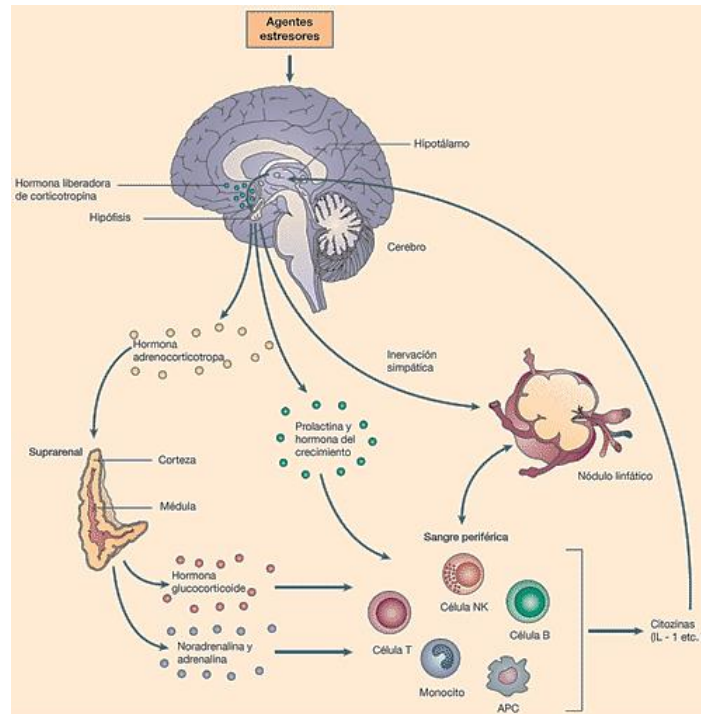


Figura 6. Mecanismos de comunicación entre el sistema inmune y el cerebro. Modificado de Mravec y col. 2006, Chambers y Schaustein, 2000 (Chambers y Schauenstein, 2000; Mravec *et al.*, 2006).

Se ha observado que algunos pacientes con cáncer (pulmón) muestran una pérdida del ritmo circadiano de todas las subpoblaciones de linfocitos excepto los linfocitos T cooperadores (CD4+); este fenómeno podría disminuir la respuesta inmune debido a cambios en los niveles séricos de hormonas, cambios en la ritmicidad del ciclo circadiano y puede causar la pérdida de la ventana fisiológica de interacción entre las estructuras neurales, endócrinas y los efectores inmunes (Gustafsson *et al.*, 2008; Modlin *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2012a; Stovold *et al.*, 2013).

Inmunomoduladores

El estudio de la interacción entre el sistema nervioso central (SNC) y el sistema inmune a través de factores neuroendócrinos se ha retomado. El SNC proporciona una coordinación precisa de las acciones neuroendócrinas y el metabolismo del huésped. El sistema inmune se comunica con el cerebro, recibiendo señales del sistema nervioso autónomo como: esteroides, neuropéptidos, citocinas y neurotransmisores, posteriormente, regresa información al cerebro a través de citocinas. De esta manera, el SNC regula indirectamente al sistema inmune a través del sistema neuroendocrino (eje HPA) y la secreción hormonal de péptidos (Webster *et al.*, 2002).

Algunos de los componentes moleculares identificados en este tipo de respuesta que han sido previamente caracterizados como supresores de la respuesta inmune, son las catecolaminas, los glucocorticoides, adenosina, prostaglandina E2. De manera contraria se ha encontrado que otros neurotransmisores y neuropéptidos como dopamina, glutamato, serotonina, melatonina, somatostatina y NPY tienen la capacidad de potenciar la eficacia de la respuesta inmune (Armaiz-Peña *et al.*, 2009).

Los glucocorticoides proveen una importante función reguladora al suprimir la generación de citocinas pro inflamatorias por las células del sistema inmune. La secreción de glucocorticoides está regulada por el eje Hipotálamo-Hipófisis-Glándula adrenal (HPA) y las moléculas del sistema inmune actúan en varios sitios a través de este eje. Las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo secretan la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y son activadas inicialmente por prostaglandinas y posteriormente por citocinas que prolongan la respuesta HPA. La hormona neurohipofisial, vasopresina se secreta al cerebro y a la circulación para contrarrestar algunos procesos inflamatorios. Sin embargo, la contribución de la vasopresina circulante sobre el control de la respuesta inmune no es tan clara como la de los glucocorticoides. Por otro lado, la secreción de oxitocina también ocurre durante la inflamación y se sabe que promueve la secreción de insulina y glucagón con lo que regula el metabolismo durante una infección (Pittman, 2011; Webster *et al.*, 2002).

En 2012, Martino y colaboradores, hicieron una revisión sobre el efecto de varios neurotransmisores en la secreción de citocinas de linfocitos T cooperadores (Th1 y Th2). Describieron que la presencia de diferentes neurotransmisores afecta en el balance y diferenciación de linfocitos T cooperadores, y que concentraciones elevadas de adrenalina, noradrenalina, dopamina, histamina y glucocorticoides favorecen la respuesta inmune humoral inducida por Th2. Por otro lado, elevadas concentraciones de serotonina, melatonina y acetilcolina favorecen la respuesta inmune celular inducida por Th1. Este balance también se ve afectado por el uso de fármacos psicotrópicos (Martino *et al.*, 2012).

La respuesta inmune antitumoral es un proceso que también puede verse afectado por la interacción y comunicación existente dentro del microambiente tumoral, generado por las poblaciones celulares existentes y por la composición de los mediadores fisiológicos neurotransmisores, hormonas y citocinas. Recientemente, se ha señalado la importancia de la interacción entre diferentes tipos celulares pulmonares con las células del sistema inmune; el grupo de Almatrodi y colaboradores demostró que los NSCLC tienen la habilidad de alterar el fenotipo de macrófagos asociados al tumor (TAM) M1 y M2 dentro del microambiente tumoral, solo el carcinoma de células grandes tiene la capacidad de modular el fenotipo de TAM en el flujo sanguíneo (suero). Los hallazgos del grupo de Branchfield y colaboradores en un modelo murino de hernia diafragmática congénita sugieren que las PNECs actúan como reóstatos traduciendo señales ambientales en respuestas inmunes y la remodelación de tejidos pulmonares. Este modelo presenta una falla en la capacidad de agrupación de las PNECs que favorece la producción de neuropéptidos y promueve un aumento en la infiltración celular y remodelación, ya que se sobreexpresan los genes que codifican para citocinas, quimiocinas y se aumenta el número de neutrófilos, eosinófilos y linfocitos T de las vías aéreas (Almatroodi *et al.*, 2016; Bordon, 2016; Branchfield, 2015). Es necesario evaluar el papel de las PNECs, NEBs y la adquisición del fenotipo neuroendócrino en otras poblaciones celulares del sistema inmune, así como probar diferentes tipos de interacción fisiológicas y patológicas, como la respuesta inmune antitumoral.

El enfoque de estos sistemas (nervioso, inmune y endócrino) como una unidad

permite e invita a analizar la expresión, respuesta y funcionalidad de un gran número de moléculas comunes. Dichas moléculas en conjunto coordinan funciones neuro-inmuno-endócrinas para mantener la homeostasis bajo estímulos de estrés, inflamación, infecciones y desórdenes metabólicos. Varias de esas interacciones y funciones aún no han sido del todo analizadas y descritas.

A lo largo de los años, numerosos investigadores se han enfocado en analizar cómo la composición, concentración y distribución de los péptidos, hormonas y neurotransmisores, en los tumores de fenotipo neuroendócrino podrían estar asociadas con la iniciación, promoción y progresión del cáncer, sin embargo, la mayoría de las conexiones funcionales permanece sin explicación, debido a la diversidad de efectos que podrían generar los factores secretados (Linnoila, 2006; Song *et al.*, 2012a).

Dopamina y sistema inmune

La 3 hidroxitiramina o dopamina (DA) es una monoamina de 153.18 g/mol, sintetizada por primera vez en 1910, es mejor conocida por su función como neurotransmisor, sin embargo, sus efectos no se limitan sólo al sistema nervioso central (Arreola *et al.*, 2016).

Las alteraciones en el sistema dopaminérgico han sido asociadas a diversos problemas de salud como hipertensión, desórdenes psiquiátricos como esquizofrenia y enfermedades neurodegenerativas como parkinson (Arreola *et al.*, 2016).

Tabla 1. Compendio de las familias de receptores a DA humanos (Arreola *et al.*, 2016).

Familia	Miembros	Acoplamiento	Efecto intracelular
Tipo DA1	DA1, DA5	$G\alpha_s$	Activación de AC
Tipo DA2	DA2, DA3, DA4	$G\alpha_{i/o}$	Inhibición de AC
Heterómero	DA1 y DA2	$G\alpha_{q/11}$	Activación de PLC

La dopamina es una molécula neuroreguladora e inmunomoduladora; se sabe que la dopamina es capaz de modular la producción y secreción de diferentes interleucinas y anticuerpos, dependiendo del receptor que se encuentre involucrado (**Tabla 1**. Compendio de las familias de receptores a DA humanos (Arreola *et al.*, 2016).

Por otro lado, se sabe que la dopamina puede ser sintetizada, liberada, recapturada y metabolizada por los leucocitos. En los linfocitos T reguladores la dopamina ejerce actividad autócrina (Arreola *et al.*, 2016).

Además, se sabe que la dopamina también participa en la activación, adhesión celular, proliferación, quimiotaxis, apoptosis, citotoxicidad y estallido respiratorio y que además esta actividad está ligada a la concentración intracelular de cAMP, por medio de la activación de segundos mensajeros y factores de transcripción en respuesta a la unión a alguno de los diversos receptores dopaminérgicos (Arreola *et al.*, 2016).

Serotonina y sistema inmune

La 5-hidroxitriptamina (5-HT) es una amina de 176.21 g/mol, con propiedades hidrofílicas, que contiene un grupo hidroxilo en la posición 5 del núcleo indol y una amina primaria que actúa como aceptor de protones (Arreola *et al.*, 2015; Berumen *et al.*, 2012).

La 5-HT es una amina biogénica que se desempeña como hormona, factor de crecimiento y neurotransmisor con una gran variedad de funciones en el cuerpo humano que proviene del aminoácido triptófano. La gran variedad de efectos de serotonina está mediada a través de sus receptores. Se han identificado y descrito 14 subtipos distintos de receptores a serotonina, clasificados en 7 familias (**Tabla 2**) (Arreola *et al.*, 2015; Berumen *et al.*, 2012).

Tabla 2. Compendio de las familias de receptores a 5-HT humanos (Berumen *et al.*, 2012).

Familia	Miembros	Isoformas*	Acoplamiento	Efecto intracelular
5-HT1	1A, 1B, 1D, 1E, 1F	No se conocen	G $\alpha_{i/o}$	Inhibición de AC
5-HT2	2A, 2B, 2C	Si	G $\alpha_{q/11}$	Activación de PLC
5-HT3	3A, 3B, 3C	Si	Na ⁺ /K ⁺ /Ca ²⁺	Despolarización
5-HT4		4(a)-4(h)	G α_s	Activación de AC
5-HT5	5A, 5B	No se conocen	G $\alpha_{i/o}$	Inhibición de AC
5-HT6		No se conocen	G α_s	Activación de AC
5-HT7		7(a), 7(b), 7(d)	G α_s	Activación de AC

*Producidas por “splicing alternativo”.

Existen numerosas evidencias sobre el efecto estimulador de serotonina observados en modelos celulares de la respuesta inmune. Una fuente de serotonina para el tejido linfático son los nervios simpáticos que lo inervan y que permiten la co-liberación de noradrenalina y serotonina, estos tejidos pueden alcanzar concentraciones de hasta 1 μ M. Esta hormona ha sido detectada en el tejido linfático incluido el bazo, timo, nódulos linfáticos y fluido linfático. De manera particular, las plaquetas que almacenan serotonina proveniente de las células enterocromafines, representan la mayor fuente de serotonina circulante (Arreola *et al.*, 2015).

La liberación de la 5-HT almacenada en plaquetas puede ser inducida por el factor de activación de plaquetas, trombina, fragmentos de complemento C3a y C5a, o inmunoglobulina E; por lo tanto, en los sitios de la inflamación en donde se da la activación de las plaquetas, las concentraciones locales de 5-HT son significativamente mayores a las cantidades relativamente bajas que se encuentran libres en el suero. A su vez, la presencia de células enterocromafines en contacto, o muy cerca de los linfocitos CD3+ y CD20+ y la síntesis de 5-HT por monocitos,

mastocitos y linfocitos T, son un indicio de la importancia de 5-HT como un factor estimulante de la respuesta inmune (Ahern, 2011; Baganz y Blakely, 2013).

Algunas células del sistema inmune tienen la capacidad de sintetizar serotonina ya que expresan a la triptófano hidroxilasa (TPH) que es la enzima limitante de la síntesis; esta enzima se ha encontrado en monocitos y esplenocitos de ratón. Además se ha encontrado la presencia del transportador de serotonina (SERT) en células dendríticas y células presentadoras de antígenos en murinos. Se ha descrito también la expresión del mRNA de 5-HT1B, 5-HT2A y 5-HT7; así como la síntesis de proteína de 5-HT1B y 5-HT7 en esplenocitos de ratón (Arreola *et al.*, 2015).

Se han hecho estudios en ratones parcialmente inmunosuprimidos evaluando el efecto de la administración crónica de Fluoxetina (inhibe la recaptura de 5-HT) en una patología neoplásica de linfocitos T (linfoma) en donde se observó que el tratamiento con Fluoxetina inhibe el crecimiento tumoral, retrasa su aparición y promueve la sobrevivencia del ratón. Pai y colaboradores describieron una relación directa entre la serotonina (síntesis y expresión de su receptor) y la proliferación de líneas celulares de cáncer mamario humano de diferentes estadios (Pai *et al.*, 2009). En estudios previos de nuestro laboratorio, se observó la presencia de los receptores a serotonina 5-HT5A y 5-HT7. Y se observó un discreto efecto inhibitor de estas hormonas sobre la proliferación de un modelo *in vitro* de linfocitos T humanos, la línea celular Jurkat (Arreola *et al.*, 2015).

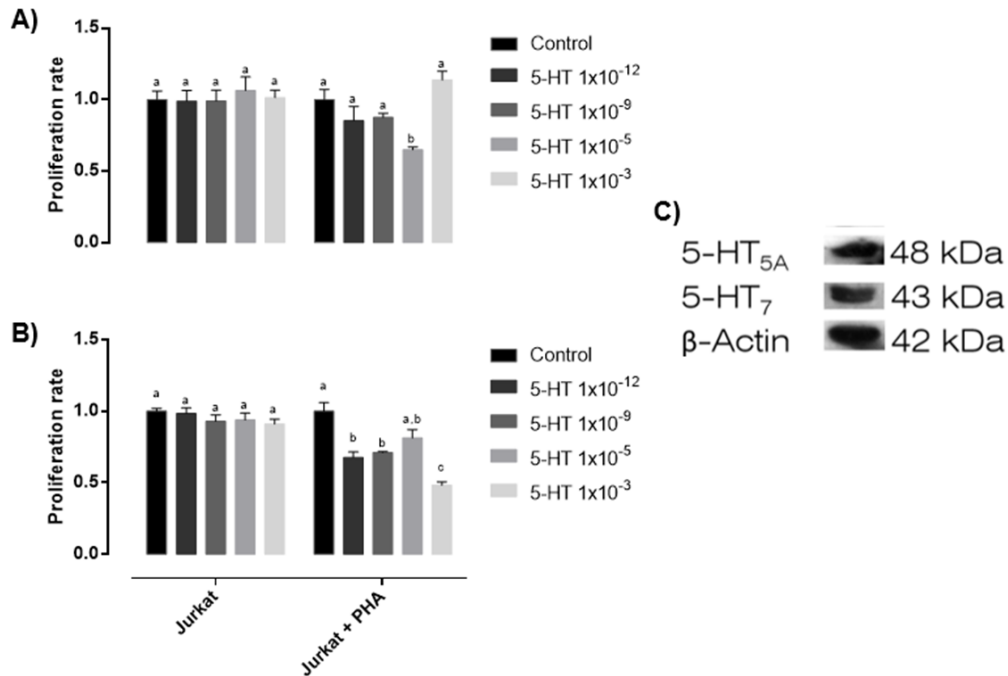


Figura 7. Efecto de Serotonina en proliferación y viabilidad e identificación de receptores a serotonina en células Jurkat. Modificado de Mendieta y colaboradores, 2018 (Mendieta *et al.*, 2018).

Inmunoterapia

Guilliand y Croce demostraron que los anticuerpos podrían ser utilizados terapéuticamente, con ello marcaron el comienzo de la inmunoterapia en enfermedades infecciosas y cáncer. Actualmente existen 4 tipos de fármacos inmunoterapéuticos aprobados por la FDA para el tratamiento de cáncer: vacunas para estimular el sistema inmune del paciente contra antígenos tumorales, anticuerpos monoclonales, inhibidores de puntos de control del sistema inmune y citocinas. Además, el aislamiento y la clonación de diversos genes de citocinas han facilitado su producción a gran escala; con ellas se han desarrollado diversas técnicas experimentales y clínicas para emplear citocinas recombinantes, ya sea de forma aislada o combinadas, con el fin de aumentar la inmunorreacción contra el cáncer.

Algunas de las citocinas que se han valorado en la inmunoterapia del cáncer se encuentran IFN- α , IFN- β e IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-12, GM-CSF y TNF- α (Ver

tabla 1). La transferencia de células NK activadas con la citocina IL-2 a pacientes con melanoma y otros tumores fue inicialmente prometedora pero se encontró ineficaz en ensayos clínicos; no obstante, tuvo un renacimiento con el ajuste del tratamiento de leucemias debido a que su uso permite la disminución del agente quimioterapéutico de elección. Los anticuerpos monoclonales Anti-CD20 (Rituximab) fueron aprobados por la FDA para el tratamiento de las células B de linfoma no Hodgkin, la adición de rituximab a los fármacos ciclofosfamida estándar, adriamicina (vincristina) y prednisona proporcionó la primera mejora en la supervivencia en 2002.

Estudios pioneros en inmunoterapia activa realizaron la transferencia adoptiva de linfocitos T modificados genéticamente en combinación con una depleción de linfocitos por radiación, teniendo éxito con la eliminación de los tumores grandes, de crecimiento progresivo. De igual forma las terapias con células dendríticas han sido asociadas con respuestas específicas en pacientes con linfoma y el melanoma. La FDA en 2010 aprobó el uso de 2 fármacos inmunoterapéuticos: Sipuleucel T (Provenge) de la marca Dendreon como una vacuna celular compuesta de un antígeno recombinante que se debe incubar con las APCs del paciente *ex vivo* para estimular de la actividad de linfocitos T contra la fosfatasa ácida alcalina, un antígeno altamente expresado en el cáncer de próstata. También Ipilimumab (Yervoy) de Bristol-Myers Squibb que es el primer fármaco inhibidor de puntos de control del sistema inmune aprobado en 2011; es un anticuerpo específico inhibidor del antígeno CTLA4, utilizado como tratamiento de melanoma avanzado y cáncer de pulmón. Recientemente, se describió al marcador de células neuroendócrinas CD56 como un blanco molecular para N901 un anticuerpo monoclonal anti-CD56 que aumenta la respuesta inmune en cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) (Dranoff, 2002; Kindt *et al.*, 2007)

Tabla 3. Inmunoterapias aprobadas para el tratamiento de cánceres humanos

Nombre	Aplicación	Año de aprobación
Rituximab	Linfoma no Hodgkin	1997
Trastuzumab	Cáncer mamario	1998
Gemtuzumab ozogamicina*	Leucemia mieloide aguda (AML)	2000
Alemtuzumab	Leucemia linfocítica crónica (CLL)	2001
Ibritumomab tiuxetan*	Linfoma no Hodgkin	2002
Tositumomab*	Linfoma no Hodgkin	2003
Cetuximab	Cáncer colorrectal, Cáncer de cabeza y cuello	2004 2006
Bevacizumab	Cáncer colorrectal	2004
Sipileucel	Cáncer de próstata	2011
Ipilimumab	Melanoma avanzado Cáncer de pulmón	2013

*Anticuerpos monoclonales conjugados. Los nombres genéricos de los fármacos indican el tipo de anticuerpo; por ejemplo, el sufijo “-umab” denota un anticuerpo monoclonal humano, mientras que “-ximab” denota un anticuerpo quimérico, con secuencias de ser humano y de otras especies.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón es un problema de salud mundial, en 2018 se estima que será el cáncer con mayor incidencia y mortalidad en ambos sexos a nivel mundial. Además, se prevé que la incidencia del cáncer aumente un 70% en los próximos 20 años, por lo cual es necesario el estudio del microambiente tumoral, así como los mecanismos de defensa involucrados.

De manera particular, las células neoplásicas de fenotipo neuroendócrino presentes algunos tipos cáncer como intestino, próstata y pulmón, son más agresivas. Los

pacientes que presentan neoplasias con tumores neuroendócrinos tienen un pronóstico desfavorable. A lo largo de los años, numerosos investigadores se han enfocado en analizar cómo la composición, concentración y distribución de los péptidos, hormonas y neurotransmisores en los tumores de fenotipo neuroendócrino podrían estar asociadas con la iniciación, promoción y progresión del cáncer, sin embargo, la mayoría de las conexiones funcionales permanece sin explicación, debido a la diversidad de efectos que podrían generar los factores secretados.

El estudio del tratamiento del cáncer con agentes quimioterapéuticos enfocados a la inhibición de la proliferación de las células tumorales ha sido muy estudiado, sin embargo, el papel de los factores neuroendócrinos que participan en la generación del ambiente tumoral ha sido menos estudiado (Alonso-Gordoa *et al.*, 2015). El estudio de esta patología como un biosistema, podría generar soluciones alternativas para el tratamiento de la enfermedad, a través de su uso como adyuvantes de la terapia antitumoral, biomarcadores o incluso como elemento para enriquecer la inmunoterapia activa.

La propuesta de este proyecto es que los analitos biológicamente activos que producen las células transdiferenciadas podría afectar al microambiente tumoral, y se requiere información que fundamente la conexión entre las células que adquieren la capacidad de manipular la secreción de factores neuroendócrinos y la mejora de su habilidad para escapar del sistema inmune o la posible disminución de la actividad del mismo. El objetivo de este trabajo fue identificar el efecto inhibitorio de los factores neuroendócrinos secretados por la línea celular A549_{NED} sobre las células inmunes citotóxicas *in vitro*. Para ello nos planteamos un modelo que nos permitiera evaluar el efecto de la adquisición del fenotipo neuroendócrino de las células A549 sobre las células inmunes citotóxicas *in vitro*, en las líneas celulares comerciales Jurkat.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Cuál es el efecto de los factores neuroendócrinos de A549_{NED} sobre la actividad antineoplásica de un modelo de células inmunes citotóxicas *in vitro* (Jurkat)?

HIPÓTESIS

Los factores neuroendócrinos de A549_{NED} inhiben la actividad antineoplásica de las células inmunes citotóxicas *in vitro* (Jurkat).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de factores neuroendócrinos de A549_{NED} sobre la actividad antineoplásica de un modelo de células inmunes citotóxicas *in vitro* (Jurkat).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener una línea de fenotipo neuroendócrino (A549_{NED}) a partir de la línea celular de cáncer de pulmón humano A549.
- Determinar la presencia de algunos de los factores neuroendócrinos (aminas biógenas: adrenalina, noradrenalina, dopamina y serotonina) que secreta A549_{NED}.
- Evaluar el efecto de los factores neuroendócrinos que secreta A549_{NED} sobre la respuesta citolítica de la línea celular Jurkat.
- Determinar el efecto de los factores neuroendócrinos que secreta A549_{NED} sobre la proliferación y secreción de citocinas de la línea celular Jurkat.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Cultivo celular: Se utilizó una línea celular linfoide comercial de Linfocitos T humanos (JURKAT, ATCC no. TIB-152). Adicionalmente se utilizó una línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano con una transfección estable de GFP en citoplasma (A549/GFP, Cell biolabs AKR-209). Todas las células proliferaron en condiciones de cultivo, en medio RPMI (linfoides) o DMEM (A549, GIBCO) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (medio basal). Los cultivos se mantuvieron dentro de una incubadora a 37°C, en alta humedad y una atmósfera de 5% de CO₂ en aire. El medio se renovó según lo requirió el crecimiento de las células. Cuando el cultivo se encontró al 80% de confluencia, las células se disgregaron para su propagación o adicionalmente se contaron para posterior experimentación.

Reactivos: En este proyecto se utilizaron los siguientes reactivos comerciales forskolina (Sigma, No. Cat. F6886), 3-Isobutil-1-metilxantina (Sigma, No. Cat. F), MTT (Sigma, No. Cat. M5655), Azul tripano (Sigma, No. Cat.), FACS FLOW (BD biosciences No. Cat. 342003).

Anticuerpos utilizados CgA-PE (BD biosciences No. Cat. 564563), HLA- B8PerCP-Vio700 (Miltenyi No. Cat. 13-099-600), CD8-PE (BD biosciences No. Cat. 557750), CD56-PE (Miltenyi No. Cat. 130-098-137).

Los reactivos restantes utilizados fueron de la mayor pureza posible.

Diseño experimental

El diseño experimental se muestra en tres etapas (**Figura 8**), a) la evaluación del efecto de la transdiferenciación de las células al fenotipo neuroendócrino, b) la evaluación de del cocultivo de células blanco (A549_{CTRL} y A549_{NED}) versus células citotóxicas (Jurkat), y c) la evaluación de los factores neuroendócrinos de A549_{NED} sobre la actividad citotóxica de células inmunes.

Inicialmente se obtuvo una línea celular de cáncer con fenotipo neuroendócrino

A549_{NED} a partir de la línea de adenocarcinoma humano A549 (sección a), por medio de la transdiferenciación celular por 72 horas con fármacos que incrementaron la concentración de AMP cíclico intracelular en una solución de DMEM deprivado (sin SFB).

Para corroborar la diferenciación se identificaron los biomarcadores característicos de este fenotipo, se evaluaron cambios morfológicos, y se cuantificó la proliferación, el número y tamaño de las proyecciones de tipo neurita, se determinaron los factores neuroendócrinos (NE) que secretan (sección a), terminado el tiempo de diferenciación, se agregó medio DMEM fresco y completo, se recolectó 48 horas después para utilizarlo como medio condicionado (CM) de células con fenotipo neuroendócrino (**Figura 8**, sección a).

La respuesta inmune antitumoral se evaluó por medio de dos modelos de estudio *in vitro* de células linfoides citotóxicas en suspensión: las células Jurkat como modelo de linfocitos T. Se realizaron cocultivos de células blanco con las células citotóxicas; Se sembraron las células blanco (A549, A549_{NED}) en cajas adherentes, a las 24 horas, se agregaron las células citotóxicas (Jurkat, 1:2), se dejaron en competencia por las siguientes 12 horas y se evaluó la citólisis de manera directa (liberación de fluorescencia) e indirecta (activación de células citotóxicas), se recuperará el sobrenadante para el análisis de inmunogenicidad y el botón de células para el análisis de proliferación, viabilidad y molecular (**Figura 8**, sección b).

Para el análisis del efecto de los factores neuroendócrinos sobre de la actividad de células citotóxicas se evaluó la proliferación y viabilidad en presencia de medio condicionado de células neuroendócrinas a 24, 48 y 72 horas (**Figura 8**, sección c). Todos los ensayos se realizaron en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad de 2.5×10^5 células blanco y 5×10^5 células citotóxicas en 500 μ L de medio de cultivo RPMI. Se realizaron 3 repeticiones de cada experimento con 4 réplicas por grupo.

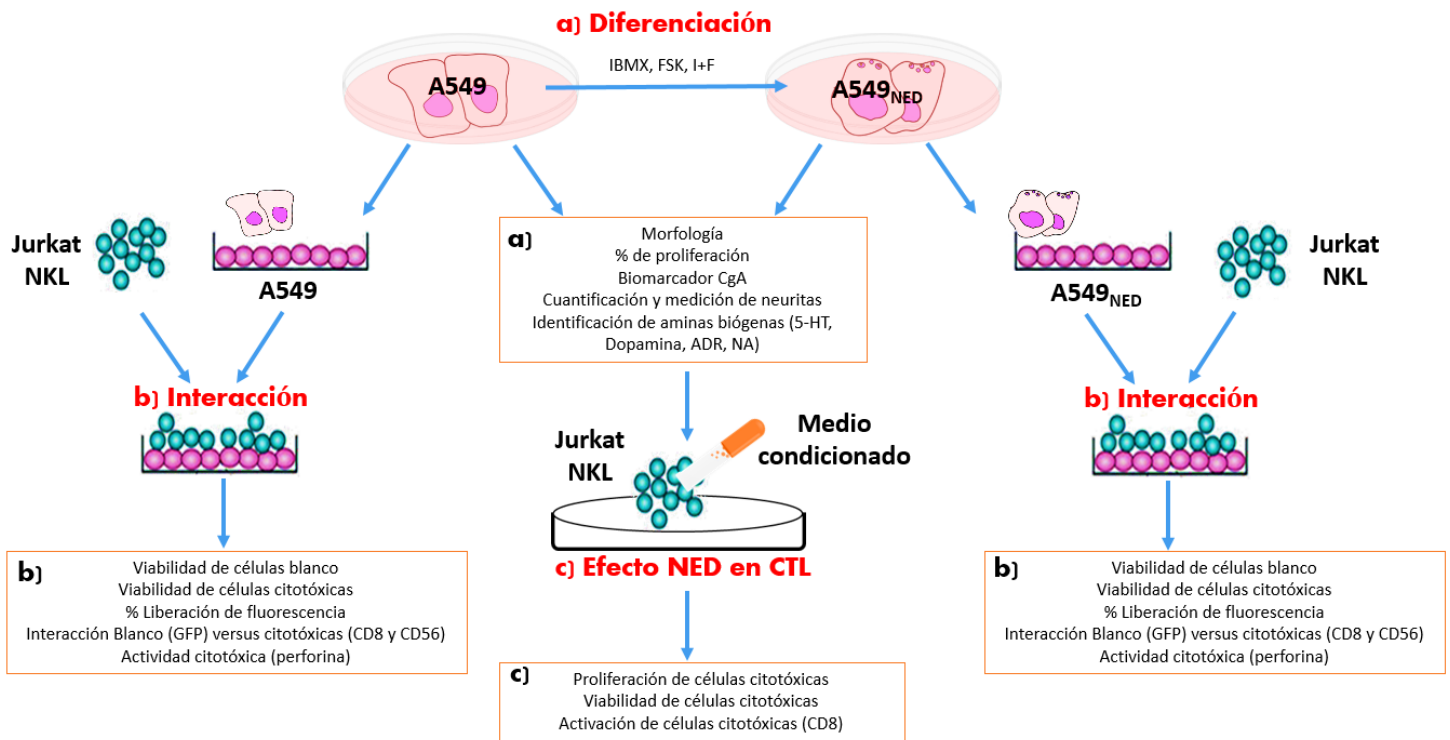


Figura 8. Esquema del diseño experimental del proyecto.

Métodología

Transdiferenciación de células de adenocarcinoma de pulmón al fenotipo neuroendócrino.

Se sembraron 2.5×10^5 células en placas de cultivo de 24 pozos en 500 μL de medio DMEM completo, se incubaron por 24 horas en condiciones ideales (37°C y 5% CO_2) para su adaptación. Posterior a la incubación, se generaron 4 grupos: Control (Sólo DMEM deprivado), Forskolina (FSK, 0.5 mM), 3-Isobutil-1-metilxantina (0.5 mM) e I+F (IBMX 0.5 mM + FSK 0.5 mM). Se realizaron 2 lavados con 300 μL de PBS 1X y se agregó DMEM deprivado (sin SFB) suplementado con fármacos que incrementan la concentración de cAMP intracelular en las concentraciones anteriormente descritas.

Se evaluaron cambios morfológicos en las células en diferentes tiempos de

incubación 12, 24, 48 72, 96, 120 y 144 horas, así como concentraciones menores de tratamientos (0.125 y 0.25 mM para cada grupo).

Posterior a la determinación de los cambios morfológicos, se lavaron las células y se determinó el efecto de la retirada de los tratamientos de diferenciación en las células previamente diferenciadas por medio de la conservación de los cambios morfológicos en las células diferenciadas por 72 y 120 horas. Se determinó si los cambios se preservaron por 24 y/o 48 horas.

Se realizaron cinco experimentos independientes por cuadruplicado, las células se lavaron para la obtención de medio condicionado y se obtuvieron los botones de células para el posterior análisis molecular.

Cocultivo de células blanco con células citotóxicas.

Después de los tratamientos de 72 horas para la diferenciación de las células blanco al fenotipo neuroendócrino (CTRL, NED FSK, NED IBMX, NED I+F), se lavaron 2 veces las células con 300 μ L de PBS 1X, posteriormente sobre ellas se sembraron las células citotóxicas (Jurkat) en 500 μ L de medio de cultivo RPMI completo.

Se realizaron curvas para valorar la efectividad de los cocultivos, en ellas se evaluaron diferentes tiempos de cocultivo (6, 12, y 24 horas); así como diferentes proporciones de células citotóxicas (B:C, 1:2, 1:5, 1:10), para obtener la sinapsis inmunológica y una diferencia significativa en la liberación de fluorescencia.

Como control negativo del cocultivo se usaron las células A549 solas (sin cocultivo) que se sembraron en medio DMEM sin SFB desde el inicio de tratamiento para diferenciación neuroendócrina, se agregó también un control de número de células que se sembró 24 horas antes del término de la diferenciación neuroendócrina.

Se realizaron tres experimentos independientes por cuadruplicado, se obtuvo el sobrenadante para la cuantificación de fluorescencia o se procedió a realizar el marcaje para la determinación de marcadores por citometría de flujo.

Determinación del porcentaje de proliferación.

Los ensayos con azul tripano se realizaron como un análisis posterior a los tratamientos de transdiferenciación y de estimulación con medio condicionado, se colectaron las células totales (A549 o Jurkat, según fué el caso) de cada pozo para hacer una “solución madre” a partir de la cual se realizó una dilución 1:5 en PBS de la que se tomaron 10 μ L que se resuspendieron con 10 μ L de una solución 0.4% de azul tripano, para realizar una tinción selectiva de las células viables. El azul tripano es un colorante que se incorpora, se difunde al citoplasma de las células no viables y las tiñe, mientras que la membrana íntegra de las células viables impide su difusión por lo que no se tiñen. Por último, se colocó una muestra de 10 μ L de la solución resuspendida (dilución 1:5 + solución de azul tripano) en una cámara de Neubauer y se contó el número total de células sin teñir (5 campos y 6 repeticiones). El número total de células en la solución madre se obtiene con la suma del promedio de células de las 6 repeticiones, y la siguiente ecuación:

$$\# \text{ células totales} = 10,000 * \text{vol. soln. madre} * (\text{vol. dilución} * \# \text{ de cel. contadas}) / \text{no. de campos}$$

Se realizaron dos experimentos independientes por cuadruplicado, se realizó un análisis de varianza ANOVA de dos vías y un análisis *post hoc* Dunnet.

Determinación del porcentaje de viabilidad

Los ensayos MTT se realizaron después del cocultivo de células blanco *versus* citotóxicas, o posterior al tratamiento con medio condicionado. Se cuantificó la viabilidad celular midiendo la actividad enzimática de la enzima reductasa con la transformación de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) de color azul en una especie reducida de MTT de color amarillo. Después de la experimentación en cocultivo o con el medio condicionado, se removió el medio de cultivo con tratamiento y se realizó el ensayo de MTT. Se añadieron 10 microlitros de solución MTT (5mg/ml) alicuotada y preservada a -20° centígrados. Posteriormente se incubó por 45 minutos a 37 °C, protegiendo la placa de la luz.

Después, se solubilizaron los cristales de formazán producidos en la placa por incubación de 1 minuto a 37°C con 100 µL de una mezcla de solubilizadora que contiene 10% Triton-X 100 en Isopropanol ácido (0.1N HCl). Para finalizar, se agitó la placa de 96 pozos por 30 segundos a temperatura ambiente, protegida de la luz y se midió la absorbancia en un lector de ELISA (Bio-Rad 680) a longitud de onda 655 nM y se comparó con el control de agua.

Se realizaron dos experimentos independientes por cuadruplicado, se realizó un análisis de varianza ANOVA de dos vías y un análisis *post hoc* Tukey.

Cuantificación y medición de las proyecciones de tipo neurita en células transdiferenciadas.

Se sembraron 2.5×10^6 células en placas de cultivo de 24 pozos, 24 horas después se lavaron las células y se inició el tratamiento de transdiferenciación (FSK, IBMX, I+F en DMEM deprivado por 72 horas). Después de la transdiferenciación se lavaron las células 2 veces con 300 µL de PBS 1X y se procedió a tomar microfotografías a 25 y 40 aumentos en el microscopio invertido AXIOVERT 200M (Carl Zeiss), acoplado a la cámara AxioCam MRm (Carl Zeiss) con el software KS 300 (Carl Zeiss). Las microfotografías tomadas se procesaron en el software Image J versión 1.49V (NIH) para realizar el conteo de número de células con neuritas, número de neuritas por célula y el tamaño de neuritas.

Adicionalmente, se agregó un control de número de células que se sembró 24 horas antes del término de la diferenciación neuroendócrina para observar las proyecciones de tipo neurita en un mismo número de células, de manera aleatoria se contaron 100 células por campo, se leyeron 2 campos por microfotografía.

Se tomaron 2 microfotografías por muestra, se evaluaron 3 experimentos independientes por triplicado, se realizó un análisis de varianza ANOVA de dos vías y un análisis *post hoc* Tukey.

Determinación del marcadores celulares membranales e intracelulares por citometría de flujo.

La técnica de citometría de flujo fue utilizada para cuantificar marcadores intracelulares (CgA), membranales (HLA, CD8 y CD56), así como para la caracterización de la interacción del cocultivo.

Para la cuantificación de anticuerpos intracelulares se realizó lo siguiente:

Se retiró el medio completo se lavaron las células con 500 μ L de PBS 1X y se agregó 500 μ L de tripsina sobre las células adherentes, se incubó por 5 minutos a 37°C, se revisó la efectividad en microscopio, se agregaron 500 μ L de medio completo, y se disgregaron las células. Posteriormente, se retiró el volumen completo 1 mL y se agregó a un tubo cónico para centrífuga de 2 mL y se centrifugó por 5 minutos a 2000 rpm, se descartó el sobrenadante, el pellet de células se resuspendió en 500 μ L de PBS 1X seguido de centrifugación por 5 minutos a 2000 rpm, posteriormente se agregaron 500 μ L de paraformaldehído 4% y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente para fijar a las células. A continuación, se lavaron las células 2 veces con 500 μ L de PBS 1X seguido de centrifugación por 5 minutos a 2000 rpm. El pellet se resuspendió en 100 μ L de FACS FLOW y se agregaron 5 μ L del anticuerpo monoclonal Anti-Cromogranina A acoplado a ficoeritrina (CgA-PE BD biosciences No. Cat. 564563, HLA-B8PerCP-Vio700 Miltenyi No. Cat. 13-099), se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad.

Para finalizar, se lavaron las células 2 veces con 500 μ L de FACS FLOW seguido de centrifugación por 5 minutos a 2000 rpm. Se realizaron tres experimentos independientes por cuadruplicado, se leyeron 10,000 eventos por cada muestra en el citómetro FACS VERSE de BD biosciences.

Para la cuantificación de anticuerpos membranales en células en suspensión se realizó lo siguiente:

Se disgregaron las células y se retiró el volumen completo 1 mL, y se agregó a un tubo cónico para centrífuga de 2 mL y se centrifugó por 5 minutos a 2000 rpm, se descartó el sobrenadante, el pellet de células se lavó 2 veces con 500 μ L de PBS

1X seguido de centrifugación por 5 minutos a 2000 rpm. El pellet se resuspendió en 100 μ L de FACS FLOW y se agregaron 5 μ L del anticuerpo monoclonal Anti-CD8 acoplado a ficoeritrina (CD8-PeCy7 BD biosciences No. Cat. 557750, CD56-PE Miltenyi No. Cat. 130-098-137), seguido de incubación a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad.

Para finalizar, se lavaron las células 2 veces con 500 μ L de FACS FLOW seguido de centrifugación por 5 minutos a 2000 rpm. Se realizaron tres experimentos independientes por cuadruplicado, se leyeron 10,000 eventos por cada muestra en el citómetro FACS VERSE de BD biosciences.

Para la caracterización de la interacción del cocultivo de células blanco (A549_{CTRL} y A549_{NED}) *versus* células citotóxicas (Jurkat) se realizó lo siguiente:

Posterior al tiempo de incubación de ambas líneas celulares en cocultivo, se procedió a retirar a las células en suspensión (citotóxicas), pipeteando el medio de cultivo para eliminar la mayor parte de células en suspensión, se transfirió el volumen (500 μ L) a un tubo cónico para centrífuga, se repitió este procedimiento con 500 μ L de PBS 1X adicionales y se agregaron al tubo cónico para centrífuga nuevamente. Este tubo se llevó a centrifugación por 5 minutos a 2000 rpm.

Las células adherentes (blanco, A549_{CTRL} y A549_{NED}) con una transfección estable de GFP en citoplasma, se retiraron de la placa de cultivo con el método previamente descrito, se llevaron a un nuevo tubo y se centrifugaron por 5 minutos a 2000 rpm. Con el tubo cónico de células en suspensión se continuó el procedimiento anteriormente descrito para la cuantificación de anticuerpos membranales (CD8 o CD56). Al finalizar los lavados posteriores a la incubación con el anticuerpo, se transfirió el volumen total (500 μ L) al tubo que contiene las células adherentes, se resuspendieron, y se centrifugaron por 5 minutos a 2000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 μ L de FACS FLOW. Se realizaron tres experimentos independientes por cuadruplicado, se leyeron 10,000 eventos por cada muestra en el citómetro FACS VERSE de BD biosciences. Se discriminaron las poblaciones celulares por tamaño (FCS), complejidad (SSC), presencia de GFP

(células blanco) y presencia de anticuerpos de membrana (CD8 o CD56, en células citotóxicas).

Determinación de la liberación de fluorescencia en cocultivo de células blanco versus citotóxicas.

Posterior al tiempo de incubación de ambas líneas celulares en cocultivo, se retiraron las células en suspensión (citotóxicas) del cocultivo pipeteando el medio de cultivo para eliminar la mayor parte de células en suspensión, se transfirió el volumen (500 μ L) a un tubo cónico para centrifuga, se repitió este procedimiento dos veces con 500 μ L de PBS 1X adicionales y se agregaron al tubo cónico para centrifuga nuevamente. Este tubo se llevó a centrifugación por 5 minutos a 2000 rpm.

Se descartó el pellet de células y se utilizó el sobrenadante para hacer la lectura en el fluorómetro VARIOSKAN, con una longitud de onda de excitación de 410 nm y de 520 nm.

Como control negativo de la liberación espontánea de fluorescencia, se tomó el sobrenadante de células A549 solas (sin cocultivo), como control positivo de liberación de fluorescencia se realizó la incubación por 5 minutos de células A549 solas con solución de permeabilización con 10% triton-X 100 en isopropanol ácido (0.1N HCl).

Se realizaron dos experimentos independientes por cuadruplicado, se realizó un análisis de varianza ANOVA de dos vías y un análisis *post hoc* Tukey.

Identificación de aminas biógenas en las células de adenocarcinoma de pulmón humano A549_{CTRL} y A549_{NED} por HPLC.

Se sembraron 5×10^6 células en placas de cultivo de 100 mm, se incubó en medio completo hasta alcanzar el 80% de confluencia, se lavaron las células 2 veces con 2 mL de PBS 1X y posteriormente se inició el tratamiento de transdiferenciación (FSK, IBMX, I+F en DMEM deprivado por 72 horas). Después de la

transdiferenciación se lavaron las células 2 veces con 300 μ L de PBS 1X, se agregó 1 mL de tripsina y se incubó por 5 minutos a 37°C, se agregó 1 mL de DMEM completo para inactivar. Se disgregaron las células y se transfirieron a un tubo cónico para centrifuga de 2 mL, se centrifugaron las células a 2000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se congelaron las células en nitrógeno.

Se determinó la presencia y la concentración de aminas biógenas noradrenalina (NA), adrenalina (AD), dopamina (DA) y serotonina (5-HT) por medio de un análisis cromatografía de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC). Se extrajeron las aminas biógenas utilizando 400 μ L de un buffer de extracción con 5% de ácido ascórbico, 200 mM de fosfato de sodio, 2.5 mM de L-cisteína y 2.5 mM de EDTA. La proteína se precipitó agregando 100 μ L de ácido perclórico 0.4 M y se incubó a 2°C por 20 minutos. Los sobrenadantes se colectaron después de la centrifugación a 12,000 rpm por 10 min a 4°C y antes de la inyección se filtraron con membranas celulosa con poros de 0.22 μ M.

Las concentraciones de NA, AD, DA y 5-HT se determinaron utilizando RP-HPLC en un sistema integrado con una bomba PU-2089 plus (Jasco, Inc., Tokio, Japón), un automuestreador AS-2057plus (Jasco, Inc., Tokio, Japón) y un detector de fluorescencia X-LC™3120FP (Jasco, Inc., Tokio, Japón). Los instrumentos se controlaron con el software ChromeNAV (Jasco, Inc., Tokio, Japón). Los ensayos cromatográficos se realizaron utilizando una columna Júpiter C18 (300 A, 5 μ , 4.6 \times 250 mm.; Phenomenex, Torrance, CA, USA) a 30°C. La columna se equilibró con fase A (Ácido trifluoroacético 0.1% en H₂O MilliQ). Posteriormente, se realizó un gradiente con la fase móvil B (Ácido trifluoroacético 0.1% en acetonitrilo), hasta alcanzar un gradiente lineal de 20% de fase móvil B con un flujo de 0.8 mL/min. Las condiciones del detector de fluorescencia fueron las siguientes: Ganancia: 1000, Atenuación: 32, Tiempo de Respuesta: 20 segundos, Excitación 280 nm y Emisión: 315 nm., el volumen de inyección de muestra fue de 50 μ L y los tiempos de retención de las aminas biógenas y sus metabolitos eluidos en el cromatograma fueron 5.5 minutos para noradrenalina, 7 minutos para adrenalina, 11.2 minutos para dopamina y 16.1 minutos para 5-HT.

Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado, se realizó un análisis

de varianza ANOVA de una vía y un análisis *post hoc* Tukey.

Análisis estadístico

Los datos están expresados como la media \pm el error estándar (SE). Para los gráficos de proliferación se realizaron los análisis estadísticos descritos en cada técnica, seguidos del análisis *post hoc* Dunnett, que compara las medias con el control, o Tukey que compara todas las muestras entre sí. En todos los casos, las diferencias con una $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas. Todos los análisis fueron realizados con la ayuda del paquete estadístico Graph Pad Prism.

RESULTADOS

Efectos de la transdiferenciación al fenotipo neuroendócrino

Efecto de los fármacos FSK, IBMX e I+F en la morfología celular de A549

Estudios previos reportaron que los fármacos que aumentan la concentración intracelular de [cAMP] inducen diferenciación neuroendócrina (NED) en células de NSCLC, en este trabajo se indujeron cambios morfológicos consistentes con diferenciación neuroendócrina en células A549 de adenocarcinoma de pulmón, a través de la estimulación con IBMX, FSK e I+F. Los cambios morfológicos inducidos con los fármacos que aumentan la concentración intracelular de [cAMP] se observaron a través de microscopía de luz a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas. La **Figura 9** muestra que el tratamiento con IBMX (0.5 mM) o FSK (0.5 mM) promovió un incremento del tamaño celular, así como la formación de proyecciones de tipo neurita después de 72 horas. Mientras que, el tratamiento combinado de I+F promovió cambios en la morfología después de 24 horas, incluyendo redondeamiento del cuerpo celular y extensión de procesos de tipo neurita.

A concentraciones más bajas (0.25 y 0.125 mM), no se promovieron cambios

morfológicos.

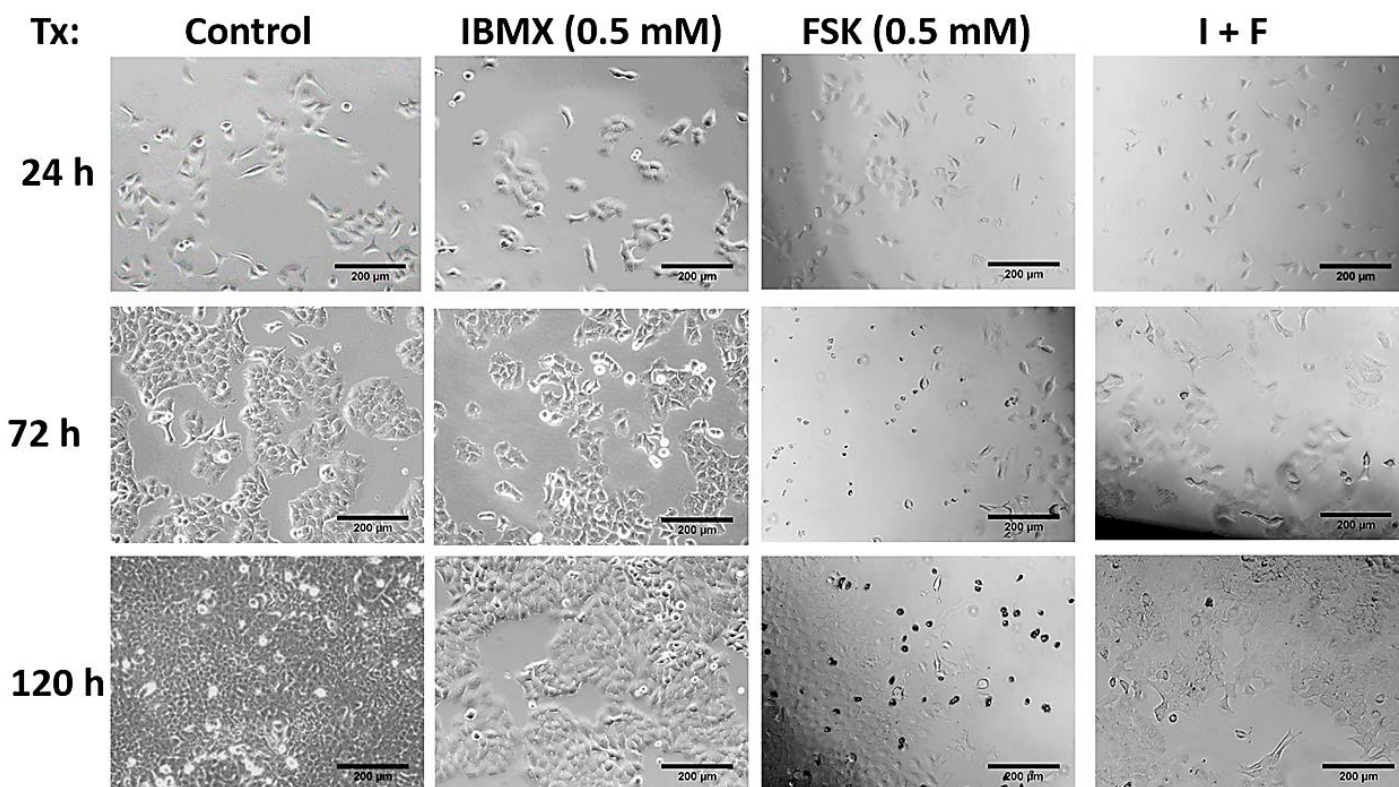


Figura 9. Efecto de fármacos que incrementan la concentración celular de [cAMP] sobre la morfología de las células A549. Las células fueron tratadas por 24, 72 y 120 h con IBMX (0.5 mM), FSK (0.5 mM) o I+F. La barra en las micrografías corresponde a 200 μm . Figuras representativas de 3 experimentos independientes por triplicado. Figura modificada Mendieta et al. 2018 (Mendieta et al., 2018).

Efecto de los fármacos FSK, IBMX e I+F en la proliferación de A549

Como se muestra en la **Figura 10**, el tratamiento de las células con FSK e I+F inhibió la proliferación después de 48 horas significativamente con respecto al control, mientras que el tratamiento con IBMX inhibió la proliferación sólo después de 72 horas de manera significativa.

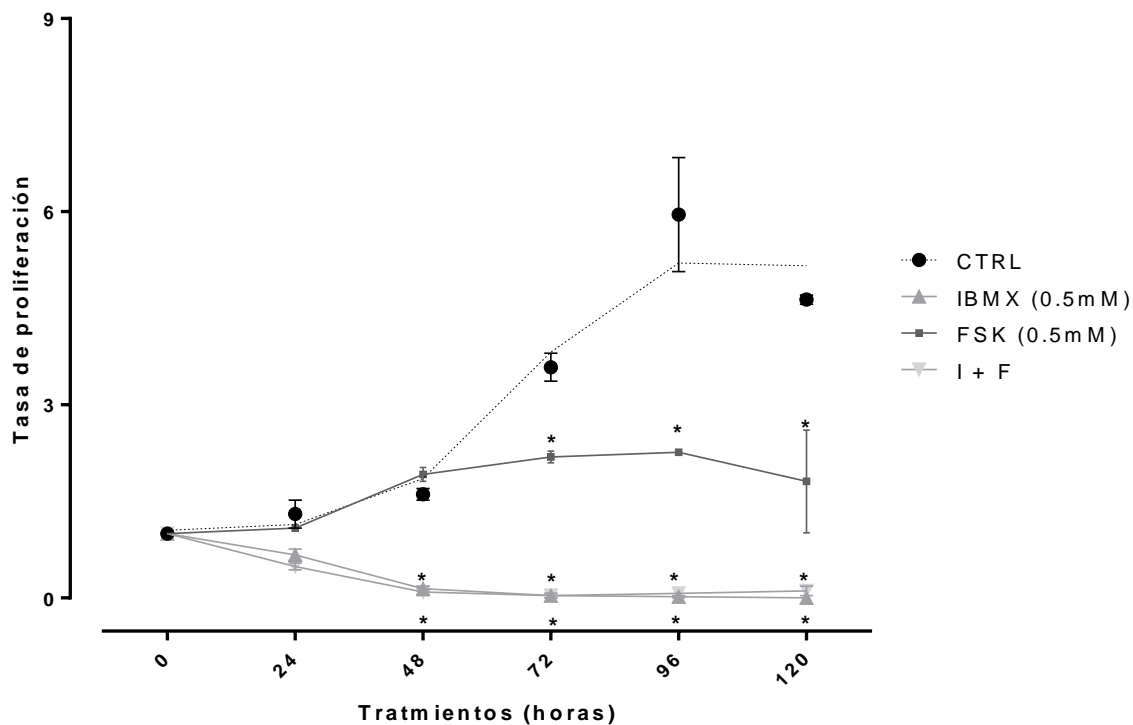


Figura 10. Efecto de fármacos que incrementan la concentración celular de [cAMP] sobre la tasa de proliferación de las células A549. Las células fueron tratadas por 24, 72 y 120 h con IBMX (0.5 mM), FSK (0.5 mM) o I+F. n=3 por triplicado. ANOVA de dos vías, análisis post hoc Dunnet (* $p < 0.01$ comparado con las células A549 control). Figura modificada Mendieta *et al.* 2018 (Mendieta *et al.*, 2018).

Efecto de los fármacos FSK, IBMX e I+F la formación de proyecciones de tipo neurita en las células A549.

El tratamiento con los fármacos que aumentan la concentración intracelular de [cAMP] provocó diversos cambios morfológicos en las células A549, uno de los cambios más significativos fue la formación de las proyecciones de tipo neurita, estas proyecciones fueron cuantificadas y medidas.

Los resultados muestran que los tratamientos con los fármacos FSK e I+F aumentaron el porcentaje de células con proyecciones de tipo neurita, así como el número de neuritas por célula, como se observa en la **Figura 11**.

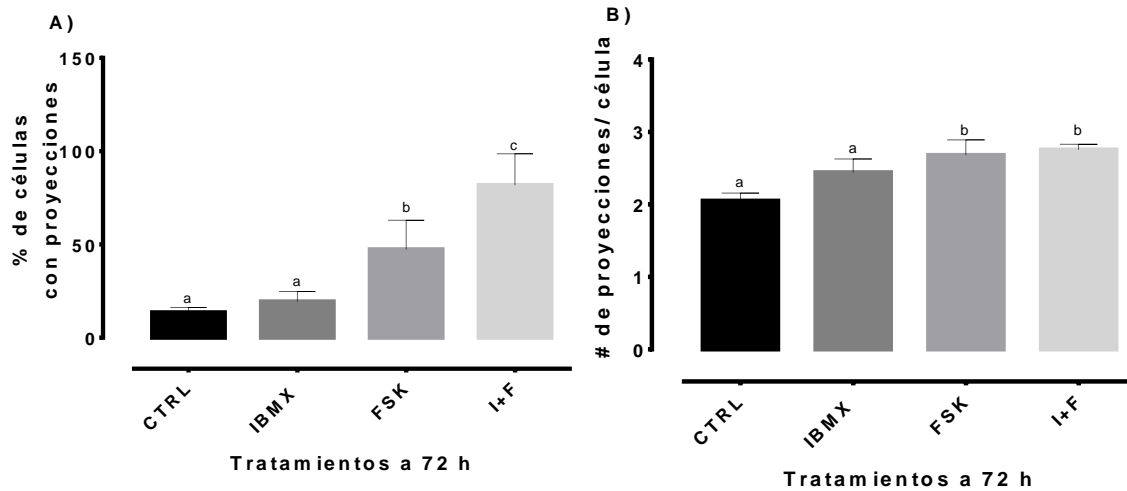


Figura 11. Efecto de fármacos que incrementan la concentración celular de [cAMP] sobre el porcentaje de proyecciones de tipo neurita en las células A549. Las células fueron tratadas por 120 h con IBMX (0.5 mM), FSK (0.5 mM) o I+F, se cuantificó A) el número de células con proyecciones de tipo neurita, B) el número de proyecciones por célula. n=3 por triplicado. ANOVA de una vía, análisis post hoc Tukey (letras distintas $p < 0.01$). Figura modificada Mendieta *et al.* 2018 (Mendieta *et al.*, 2018).

Por otro lado, el análisis del tamaño de las proyecciones arrojó, dos tendencias en el tamaño de las proyecciones celulares, por lo que se decidió separarlas y cuantificar ambos tipos de proyecciones en los tratamientos y cuantificar el tamaño de los mismos.

Como se observa en la **Figura 12**, los grupos control e IBMX presentan proyecciones de tipo secundario (menores a 30 U.A.), mientras que los grupos tratados con FSK e I+F presentan un mayor porcentaje de proyecciones de tipo

primario (arriba de 31 U.A.).

De manera interesante, el grupo de I+F presenta proyecciones de tipo primario significativamente de mayor longitud con respecto a los demás grupos; en cuanto a las proyecciones del tipo secundario el grupo tratado con FSK presenta proyecciones de mayor longitud con respecto a los demás grupos, como se observa en la **Figura 12**.

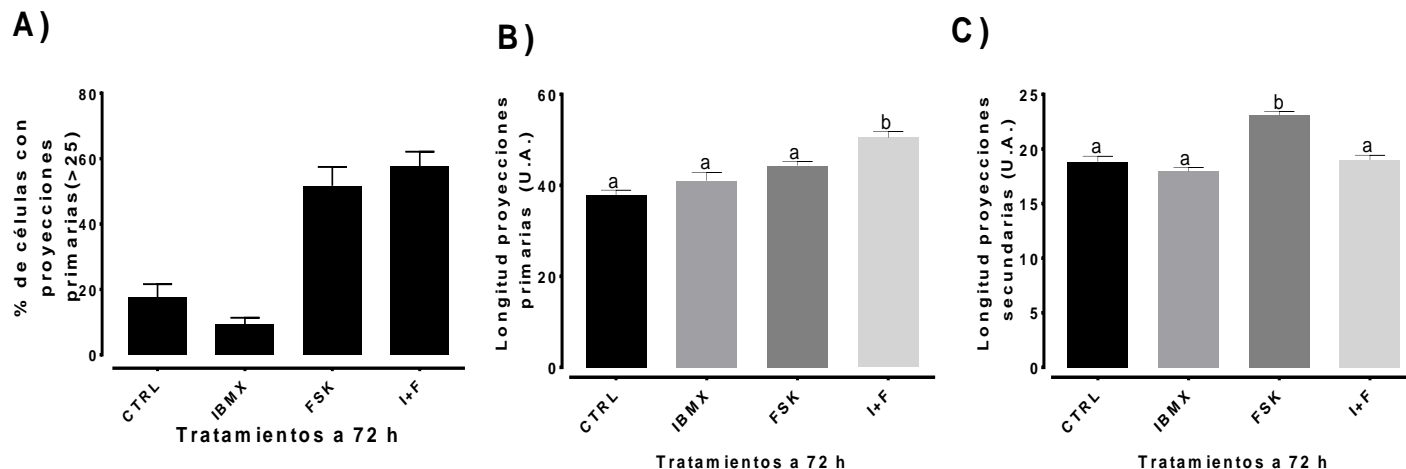


Figura 12. Efecto de fármacos que incrementan la concentración celular de [cAMP] sobre la formación de proyecciones de tipo neurita en las células A549. Las células fueron tratadas por 120 h con IBMX (0.5 mM), FSK (0.5 mM) o I+F, se realizó A) una tabla de análisis de datos y posteriormente se graficó B) el porcentaje de células con proyecciones primarias y secundarias, C) el tamaño de proyecciones primarias y C) el tamaño de proyecciones secundarias. n=3 por triplicado. ANOVA de una vía, análisis post hoc Tukey (letras diferentes $p < 0.01$).

Efecto de los fármacos FSK, IBMX e I+F sobre los marcadores de fenotipo neuroendócrino en las células A549.

Para determinar si los cambios morfológicos y de proliferación fueron debidos a la diferenciación neuroendócrina, se cuantificó al marcador neuroendócrino,

Cromogranina A (CgA), en las células A549 tratadas con los fármacos que elevan la concentración intracelular de [cAMP].

Los grupos tratados con FSK e I+F mostraron una sobreexpresión de CgA como se observa en la **Figura 13**. En su revisión Day y Salzet propusieron los principales aspectos de la diferenciación neuroendócrina (NED) y resaltaron la importancia de la formación de gránulos neurosecretores que expresan cromograninas, nuestros resultados favorecen esta propuesta y corroboran la adquisición del fenotipo neuroendócrino en las células A549 que desde este momento serán llamadas A549_{NED} y se agregará como subíndice el tipo de fármaco utilizado para su diferenciación FSK, IBMX, I+F (Robert Day y Michel Salzet, 2002).

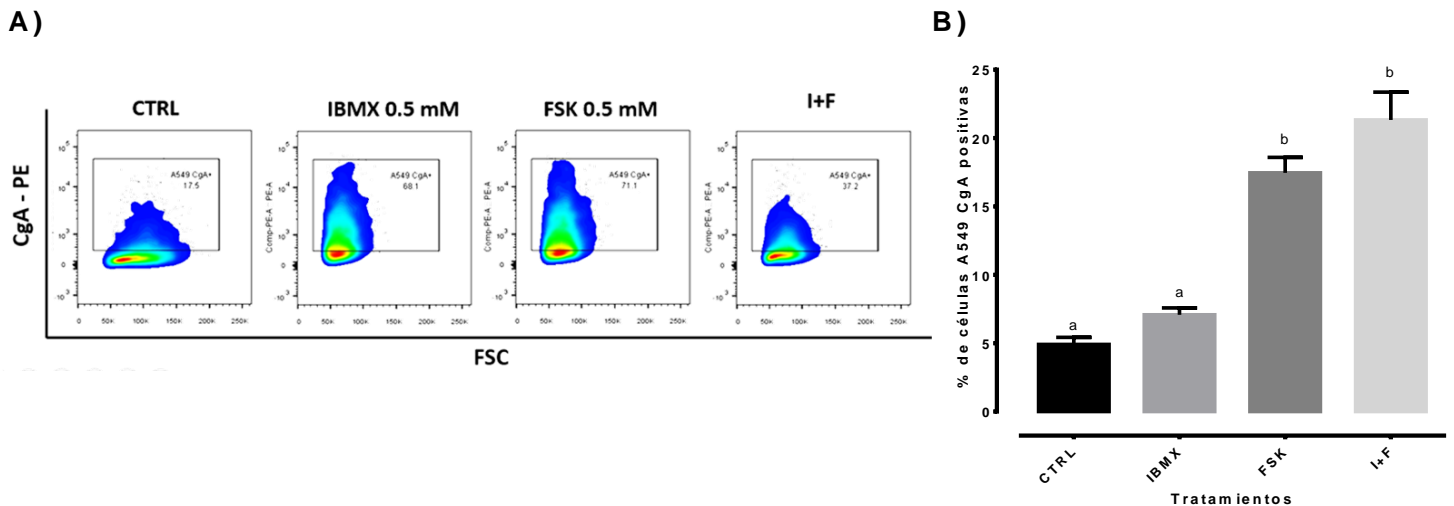


Figura 13. Efecto de fármacos que incrementan la concentración celular de [cAMP] sobre los marcadores de fenotipo neuroendócrino en las células A549. Las células fueron tratadas por 24, 72 y 120 h con IBMX (0.5 mM), FSK (0.5 mM) o I+F. Se evaluó el % de células positivas a cromogranina A (CgA) por citometría de flujo, los gráficos muestran A) la distribución de la densidad de población, B) el porcentaje de células CgA+. n=3 por triplicado. ANOVA de una vía, análisis post hoc Tukey (*p<0.01 comparado con las células A549_{CTRL}). Figura modificada Mendieta *et al.* 2018.

Efecto de la retirada de los fármacos FSK, IBMX e I+F en la morfología de A549.

Estudios previos sobre diferenciación neuroendócrina reportaron la habilidad de algunas células de revertir su fenotipo neuroendócrino al fenotipo de origen; se considera así la transdiferenciación reversible y la terminal. Para evaluar la actividad citolítica de CTL sobre las células A549 después de la adquisición de NED, se monitoreó si los agentes que elevan la concentración de cAMP inducen la conversión permanente de una morfología epitelial a neuroendócrina.

Los cambios morfológicos en las micrografías (**Figura 14**) muestran que el fenotipo obtenido a las 72 horas se mantiene por 24 horas, mientras que, los cambios morfológicos con 120 horas de tratamiento se conservan por 48 horas. Estos resultados sugieren la generación de un fenotipo neuroendócrino terminal después de 120 horas de tratamiento.

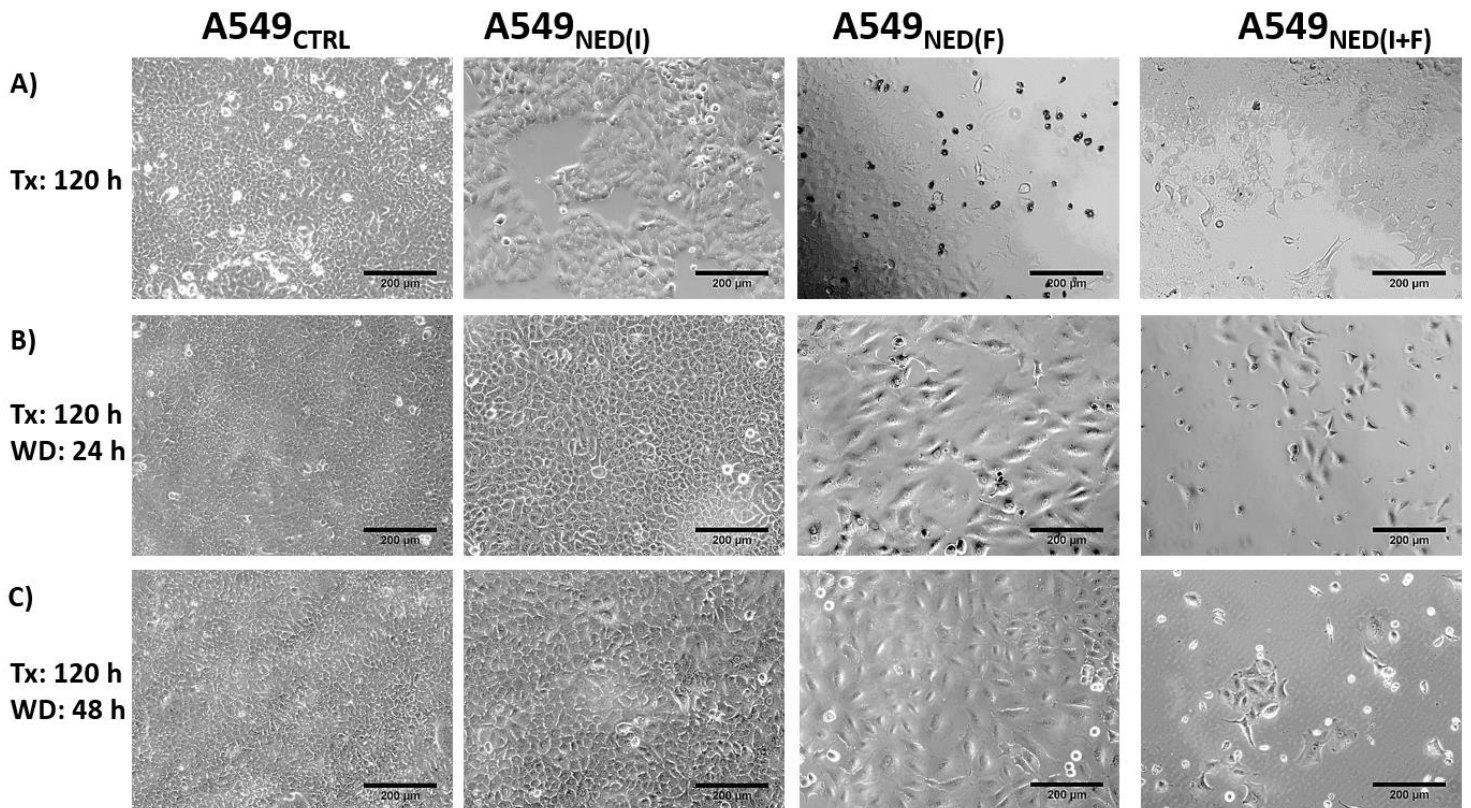


Figura 14. Efecto de la retirada de fármacos que incrementan la concentración celular de [cAMP] sobre la morfología de las células A549. Las células se trataron por 120 h con IBMX (0.5 mM), FSK (0.5 mM) o I+F, posteriormente se retiraron el tratamiento con los fármacos (WD) y se observaron los cambios en la morfología por 24 y 48 h. La barra en las micrografías corresponde a 200 μm . Figuras representativas de 3 experimentos independientes por triplicado. Figura modificada Mendieta *et al.* 2018 (Mendieta *et al.*, 2018).

Efecto de los fármacos FSK, IBMX e I+F la producción y secreción de aminas biógenas (noradrenalina, adrenalina, dopamina, serotonina)

Para evaluar los cambios en la producción y secreción de hormonas o neurotransmisores, se evaluaron las células A549CTRL y A549NED por medio de HPLC para identificar la presencia de aminas biógenas (**Figura 15**). Los resultados mostraron que A549CTRL produce adrenalina (AD) y dopamina (DA), pero no noradrenalina (NA), ni serotonina (5-HT). De manera interesante, la adquisición de NED en los tres grupos con tratamientos (IBMX, FSK e I+F) cambió el patrón de producción de aminas biógenas, mostrando una reducción significativa de la producción de DA y un incremento significativo en la producción de 5-HT.

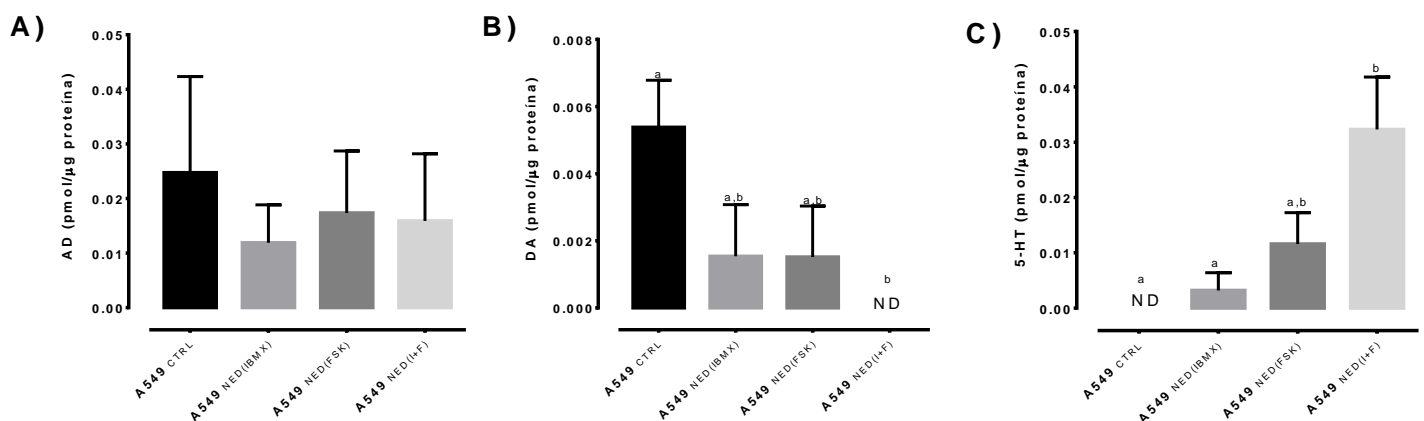


Figura 15. Efecto de la diferenciación neuroendócrina de A549 sobre la secreción de aminas biógenas. Las células A549 fueron tratadas por 120 h con agentes que aumentan la concentración de [cAMP] para transdiferenciarse,

posteriormente se identificaron los neurotransmisores por HPLC, las muestras se compararon con la mezcla de los estándares de noradrenalina (NA), A) adrenalina (AD), B) dopamina (DA) y C) serotonina (5-HT). n=3 por triplicado, ANOVA de una vía y análisis *post hoc* Tukey (letras diferentes corresponden a $p < 0.1$). Figura modificada Mendieta *et al.* 2018 (Mendieta *et al.*, 2018).

Efectos de la interacción del cocultivo de células blanco (A549_{CTRL} y A549_{NED}) versus células citotóxicas (Jurkat).

Efectos de la interacción del cocultivo de células blanco (A549_{CTRL} y A549_{NED}) versus células citotóxicas (Jurkat) en la viabilidad de A549 y Jurkat.

Para determinar la actividad citolítica de las células citotóxicas, se realizaron cocultivos con las células blanco (A549_{CTRL} y A549_{NED}) *versus* linfocitos T (Jurkat), en dos condiciones: naïve y previamente activados con fitohaemaglutinina (PHA).

Se cuantificó la viabilidad de las células blanco y de las células citotóxicas, después del cocultivo como se muestra en la **Figura 16**. Para las células blanco, el cocultivo de A549_{CTRL} *versus* Jurkat pre-activadas con PHA, generó una disminución del 54.02% de viabilidad comparada con las células A549 solas (sin cocultivo). En contraste, la adquisición previa de NED en todos los grupos inhibió la disminución de viabilidad de las células blanco en los cocultivos de 6 horas (A549_{CTRL} 54.02% vs. A549_{NED(I+F)} 96.14%), como se muestra en la **Figura 16**.

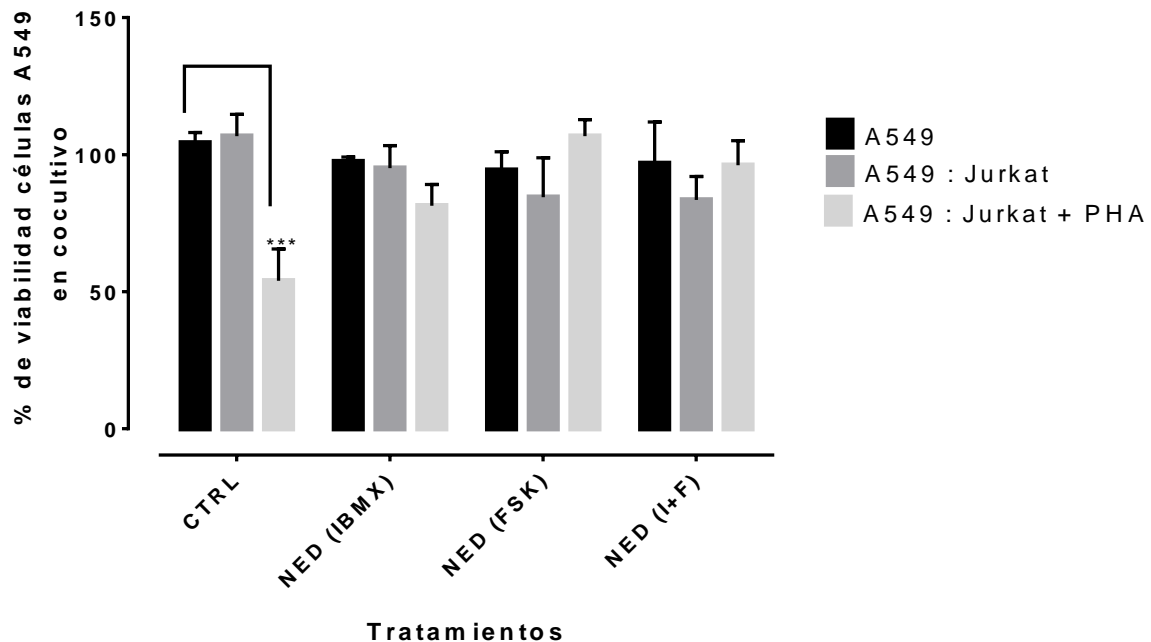


Figura 16. Efecto de la interacción del cocultivo de células blanco:citotóxicas (B:C) sobre la viabilidad de las células blanco. Se cocultivaron células citotóxicas (Jurkat y Jurkat pre-activadas con PHA) vs células blanco (A549 CTRL y A549NED) por 6 horas y se evaluó el porcentaje de viabilidad por separado con MTT. ANOVA de una vía, análisis post hoc Dunnet ($*p < 0.01$ comparado con las células A549 solas). N=3 por triplicado. Figura modificada Mendieta y colaboradores (Mendieta *et al.*, 2018).

Un análisis posterior sobre las células citotóxicas de los cocultivos mostró que la diferenciación de células A549NED con todos los tratamientos (FSK, IBMX, F+I) disminuye la viabilidad de las células Jurkat pre-activadas con fitohaemaglutinina, como se observa en la **Figura 17**.

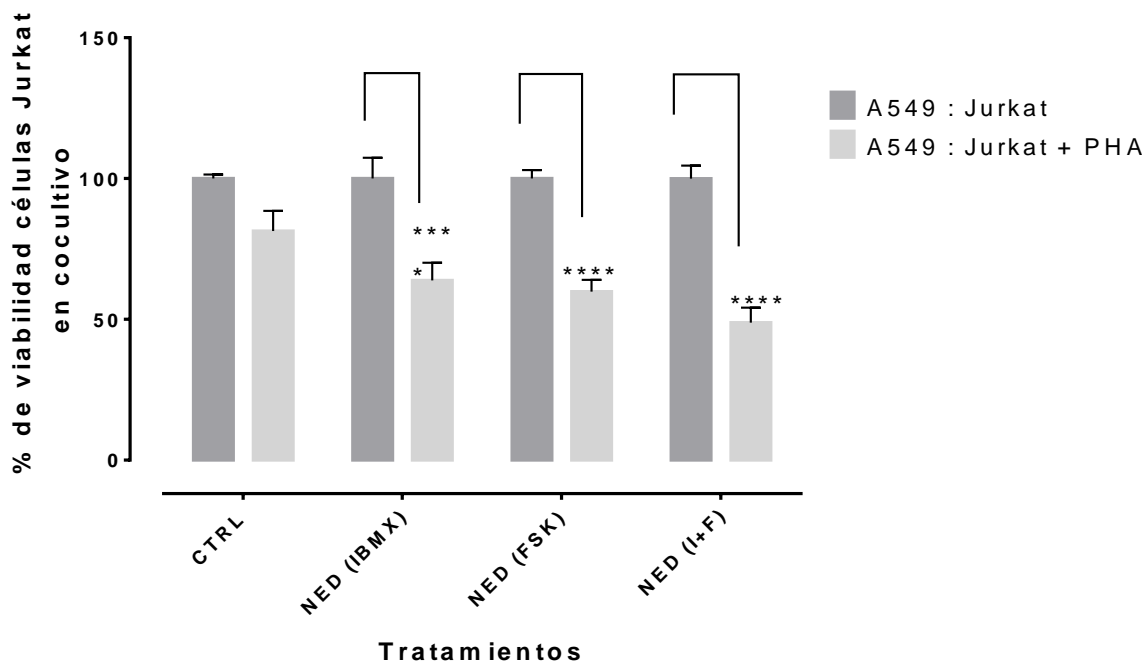


Figura 17. Efecto de la interacción del cocultivo de células blanco versus citotóxicas (B:C) sobre la viabilidad de las células citotóxicas. Se cocultivaron células citotóxicas (Jurkat y Jurkat pre-activadas con PHA) vs células blanco (A549_{CTRL} y A549_{NED}) por 6 horas y se evaluó el porcentaje de viabilidad por separado con MTT. ANOVA de una vía, análisis *post hoc* Dunnet (*p<0.01 comparado con las células A549 solas). N=3 por triplicado. Figura modificada Mendieta *et al.* 2018 (Mendieta *et al.*, 2018).

Efectos de la interacción del cocultivo de células blanco (A549_{CTRL} y A549_{NED}) versus células citotóxicas (Jurkat) en la liberación de fluorescencia

Para corroborar los resultados de viabilidad se cuantificó la liberación de fluorescencia de las células blanco (A549_{CTRL} y A549_{NED}) que expresan a GFP de manera constitutiva en citoplasma después del cocultivo con las células citotóxicas (Jurkat).

Se estandarizó este procedimiento por medio de un cocultivo previo de células control, evaluando diferentes proporciones de cocultivo de células Blanco:Citotóxicas (1:1, 1:2, 1:5) y en diferentes tiempos de determinación de

fluorescencia (4, 8 y 24 horas). Como se observa en la **Figura 18**, las células citotóxicas generaron un incremento significativo de la liberación de fluorescencia correlacionado con el incremento con la proporción de células Blanco *versus* Citotóxicas con respecto al control de células A549 solas (sin cocultivo). Es decir, el aumento de células efectoras en el cocultivo, generó el aumento significativo de la liberación de fluorescencia, de manera que el porcentaje de citólisis estaría directamente relacionado con la liberación de fluorescencia. De manera interesante, el tiempo de exposición en cocultivo no generó un aumento de GFP cuantificada en los sobrenadantes de los cocultivos.

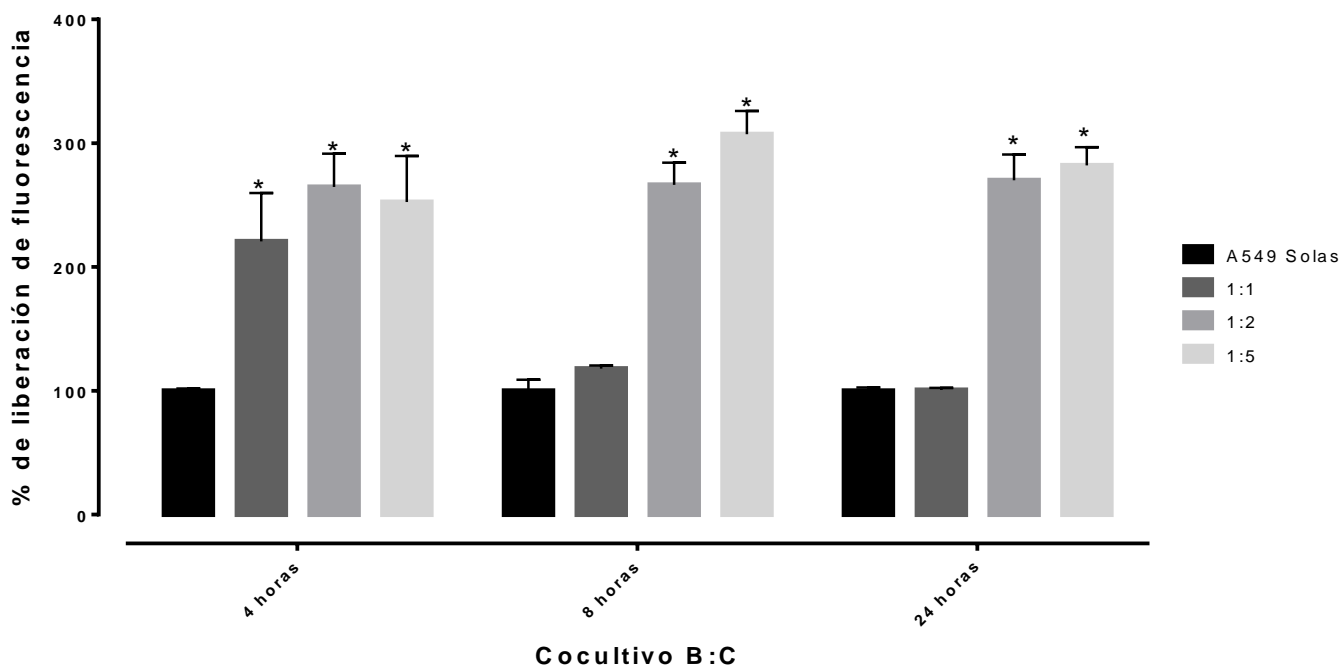


Figura 18. Citólisis directa en cocultivos de células blanco vs citotóxicas (B:C). Se cultivaron células citotóxicas (Jurkat) vs células blanco (A549_{CTRL}). El porcentaje de citólisis directa se evaluó con la liberación de fluorescencia en un cocultivo con diferentes proporciones de células blanco y citotóxicas (1:1, 1:2 y 1:5) a diferentes tiempos de incubación (4, 8 y 24 horas). n=3 por triplicado, ANOVA de una vía, análisis *post hoc* Dunnet (*p<0.01 comparado con las células A549 solas). Figura modificada Mendieta *et al.* 2018 (Mendieta *et al.*, 2018).

Posteriormente, se realizó la evaluación de la liberación de fluorescencia a las 24 horas del cocultivo de células blanco (A549_{CTRL} y A549_{NED}) *versus* células citotóxicas (Jurkat), como se muestra en la **Figura 19**, la adquisición de NED favorece la disminución significativa de la liberación de fluorescencia de las células A549_{CTRL} a 24 horas (85.98% ± 6.3% A549_{NED REVERSIBLE} vs. 83.72% ± 6.3% A549_{NED TERMINAL} vs. 105.7% ± 9.6% A549_{CTRL}).

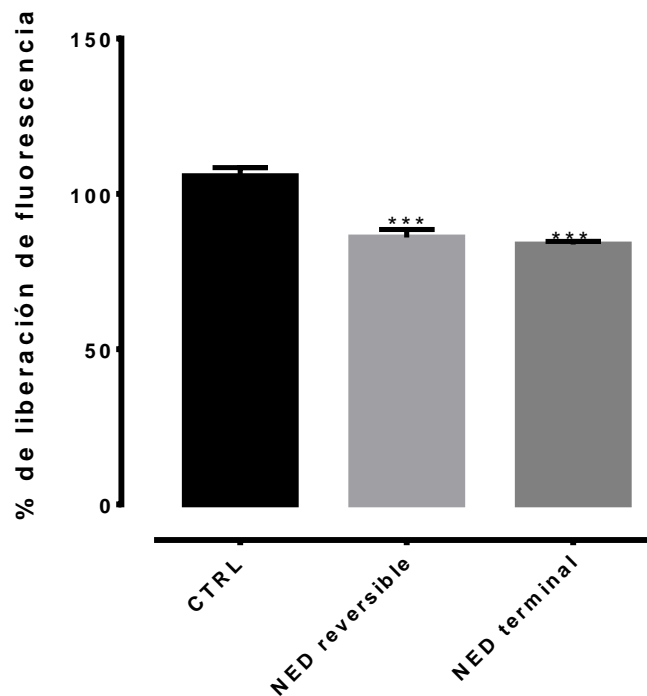


Figura 19. Efecto de la diferenciación neuroendócrina sobre la citólisis directa en cocultivos de células blanco vs citotóxicas (B:C). Se cultivaron células citotóxicas (Jurkat) vs células blanco (A549). El porcentaje de citólisis directa se evaluó con la liberación de fluorescencia en células A549_{CTRL} y A549_{NED reversible} y terminal. n=3 por triplicado, ANOVA de una vía, análisis *post hoc* Dunnet (*p<0.01 comparado con las células A549_{CTRL}). Figura modificada Mendieta *et al.* 2018(Mendieta *et al.*, 2018).

Efecto de los factores neuroendócrinos sobre la actividad de células citotóxicas.

Efecto del medio condicionado en la proliferación y viabilidad de células Jurkat.

Adicionalmente, para identificar claramente si los efectos en la disminución de la proliferación (**Figura 20**) y la viabilidad (**Figura 21**) de las células Jurkat y de la liberación de fluorescencia de A549 estaba relacionada con los productos solubles generados por el fenotipo neuroendócrino, se evaluó la secreción de las células A549_{NED}, se colectó el medio condicionado (CM) por 48 horas de las células A549_{CTRL} y A549_{NED} para evaluar el efecto de la secreción sobre la viabilidad (MTT) y la proliferación (azul tripano) de las células Jurkat a 24 y 48 horas. Los resultados mostraron que el CM de las células A549_{NED} disminuyó la proliferación y viabilidad de las células Jurkat naïve desde las 24 horas, de manera significativa en los tratamientos con FSK e I+F. Los tratamientos por 48 horas con medio condicionado disminuyeron significativamente la proliferación y viabilidad de las células Jurkat, esta disminución se conservó por 72 horas en el caso de la viabilidad.

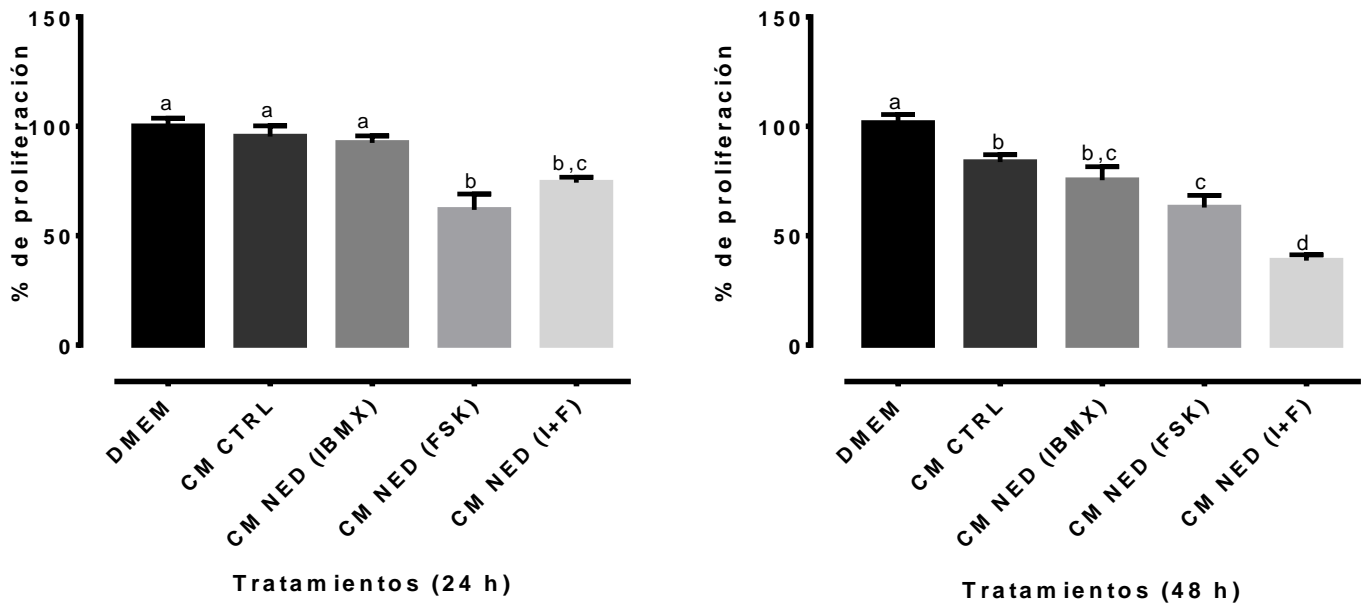


Figura 20. Efecto de los factores NE de A549_{NED} sobre la proliferación de las células Jurkat. Se cuantificó la tasa de proliferación de las células Jurkat tratadas con medio condicionado de las células A549_{CTRL} y A549_{NED} a 24 y- 48h con azul tripano. n=3 por cuadruplicado, ANOVA de una vía, análisis *post hoc* Tukey (letras distintas muestran una p<0.01). Figura modificada Mendieta *et al.* 2018.

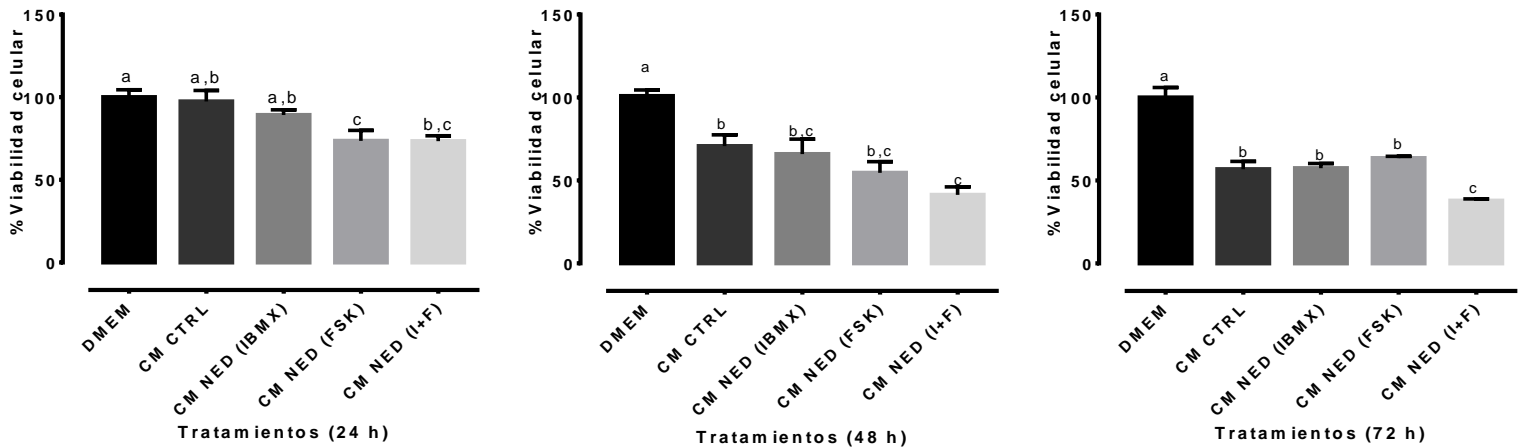


Figura 21. Efecto de los factores NE de A549_{NED} sobre la viabilidad de las células Jurkat. Se cuantificó la tasa de proliferación de las células Jurkat tratadas con medio condicionado de las células A549_{CTRL} y A549_{NED} a 24, 48 y 72 h con MTT. n=3 por cuadruplicado, ANOVA de una vía, análisis *post hoc* Tukey (letras distintas muestran una p<0.01). Figura modificada Mendieta *et al.* 2018 (Mendieta *et al.*, 2018).

DISCUSIÓN

Este proyecto fue diseñado para determinar los efectos de los factores secretados por una línea celular adenocarcinoma pulmonar con fenotipo neuroendócrino A549_{NED}, en la actividad citotóxica de las células Jurkat *in vitro*.

El objetivo inicial de este proyecto fue obtener una línea celular con fenotipo neuroendócrino a partir de células de adenocarcinoma humano (A549). El origen de las células neuroendócrinas en los tumores y los mecanismos moleculares relacionados aún son controversiales. Sin embargo, estudios previos han reportado

que el incremento de la concentración intracelular de cAMP, generado por análogos de cAMP (8-Br-cAMP), análogos de adenilato ciclasa (FSK) o los inhibidores de la fosfodiesterasa como (IBMX), pueden promover la adquisición de las características neuroendócrinas a través de dos mecanismos principales (**Figura 22**).

El mecanismo clásico que involucra la liberación de la subunidad catalítica de PKA y el mecanismo alternativo que promueve la activación de las proteínas EPAC (Cox *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2006).

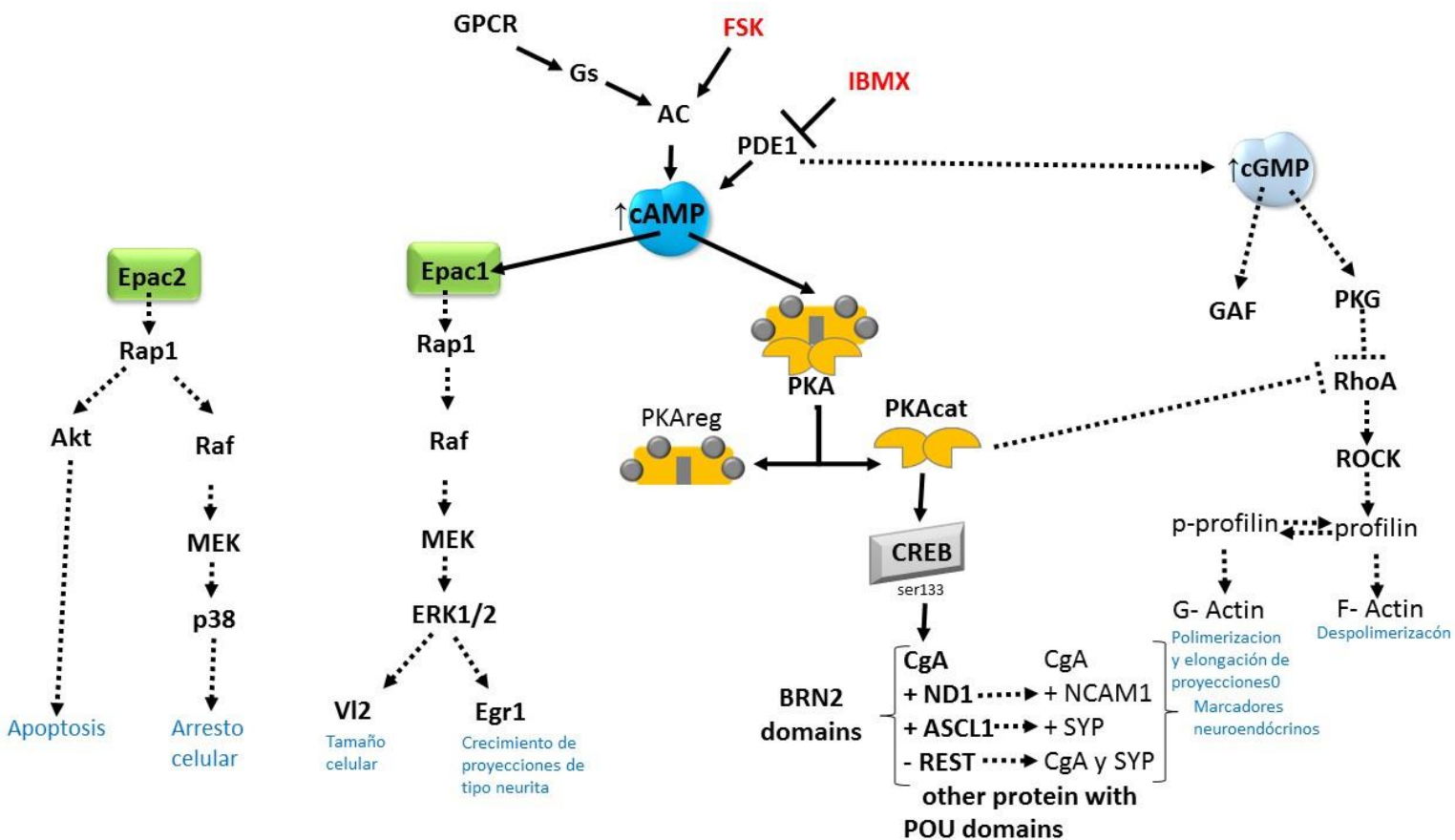


Figura 22. Diagrama del mecanismo propuesto para la diferenciación neuroendócrina. Las líneas sólidas indican los mecanismos previamente reportados en tejidos de pulmón, las líneas punteadas indican los mecanismos reportados en otros tipos de tejido. Figura modificada Mendieta *et al.* 2018 (Mendieta *et al.*, 2018).

Como se muestra en la **Figura 22**, la activación de PKA promueve la fosforilación de la serina 133 del elemento de respuesta a cAMP (CREB). Esta fosforilación estimula la translocación de los factores de transcripción bHLH como ND1, ASCL1 y TTF1 que sobre estimulan la expresión de moléculas funcionales como NCAM1 y SYP, respectivamente. CREB promueve también la disminución del factor de transcripción de silenciamiento de RE1 (REST) que contribuye en la sobreexpresión de SYP y la expresión de moléculas funcionales neuroendócrinos con dominios RE1 como CgA (Bos, 2003; Cerasuolo *et al.*, 2015; Cox *et al.*, 1999; Jones y Palmer, 2012; Walker *et al.*, 2006).

El mecanismo alternativo de NED descrito en las células PC12 y LNCaP, menciona que la elevación intracelular de cAMP, promueve simultáneamente la unión de cAMP al factor de intercambiador de nucleótidos de guanina (Epac1) que activa a la GTPasa específica Rap1. Esto causa un cambio conformacional que genera un incremento en el intercambio de la actividad hacia Rap1, localizado en la membrana intracelular. La unión de GTP a Rap1 estimula la activación del efector B-RAf para activar la vía de las proteína MAP quinasas, MEK y Erk1/2, para sobre estimular la transcripción de dos genes, Egr1 y Vilina2, que promueven el crecimiento de proyecciones de tipo neurita y el incremento del tamaño celular, como se muestra en la **Figura 22** (Bos, 2003; Emery *et al.*, 2014; Ravni *et al.*, 2008).

En este trabajo, se observaron y cuantificaron los cambios morfológicos de los grupos tratados después de 72 horas; en concordancia con resultados previos obtenidos en las líneas celulares NCI-H157 y Lu-CSF1 de cáncer pulmonar (Walker *et al.*, 2006) y LNCaP estos cambios pueden ser atribuidos a la sobre estimulación de Egr1 y Vilina2 (Zhu *et al.*, 2014).

El tratamiento combinado produjo cambios morfológicos más rápido que los fármacos individuales, sugiriendo un efecto aditivo debido al mecanismo de la elevación intracelular de cAMP. Mientras FSK es más específica al activar sólo a la adenilato ciclasa, IBMX podría promover la activación de diferentes vías a través de la inhibición de la fosfodiesterasa. Aunque cAMP y cGMP son sintetizadas por diferentes enzimas, ambas son degradadas por la amplia familia de fosfodiesterasas promoviendo un aumento en la concentración intracelular de cAMP

y cGMP, así como, la posterior activación de PKA y PKG (Corradini *et al.*, 2015; Lugnier, 2006).

Jones y Palmer demostraron previamente la habilidad de FSK para inducir cambios tempranos en la morfología de las células LNCaP a través de la fosforilación de RhoA, lo que favorece la estimulación de la polimerización de actina (Jones y Palmer, 2012); debido a esto, el tratamiento combinado de F+I podría favorecer este mecanismo a través de la activación de PKG. Se ha reportado que ambas proteínas quinasas (PKA y PKG) fosforilan al hexámero proteico RhoA y promueven su translocación al citosol, que impide la activación del efector la quinasa de Rho (ROCK), que es bien conocido por su papel en la modificación del citoesqueleto de actina a través de la despolimerización de actina (Luykenaar y Welsh, 2007).

Los resultados de nuestro estudio, sugieren la generación de un fenotipo terminal después de 120 horas de tratamiento con agentes que incrementan la concentración intracelular de cAMP. Nuestro hallazgo del fenotipo terminal es consistente con los resultados de Wang y colaboradores quienes describieron un fenotipo no-reversible (terminal) por 14 días en células de pulmón después de 120 horas de tratamiento con una mezcla de KGF, IBMX, 8-Br-cAMP y dexametasona (Bang *et al.*, 1994; Cox *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2007).

De manera similar, el hallazgo de la disminución en la tasa de proliferación, coincide con los resultados de Cox y colaboradores (Cox *et al.*, 2000; Cox *et al.*, 1999) quienes reportaron una inhibición similar de la incorporación de timidina después de la exposición de las células a agentes que aumentan la concentración intracelular de cAMP (db-cAMP, IBMX y FSK) en células de adenocarcinoma de próstata (LNCaP y C4-2). De acuerdo a los resultados obtenidos por el grupo de Pernicová y colaboradores (Pernicová *et al.*, 2014) en las líneas celulares de próstata (LNCaP y LAPC-4), la disminución en la tasa de proliferación podría ser debida al arresto de celular en la fase G0 como resultado de la diferenciación neuroendócrina.

Estudios previos, sugieren que la estimulación del factor intercambiador de nucleótidos de guanina que activa a la familia de GTPasas, Epac2, en células bronqueo-alveolares (Oldenburger *et al.*, 2012) está asociado con el arresto del ciclo celular por la fosforilación de p38 (Emery *et al.*, 2017), así como, con apoptosis por

la activación de Akt (Park y Juhn, 2017). Estos datos sugieren la necesidad de mayor evidencia para entender el papel de estos mecanismos en nuestros resultados.

La sobreexpresión del marcador neuroendócrino CgA en nuestro estudio fue consistente con los resultados reportados por Chang y col. (Chang *et al.*, 2013) en la línea celular A549, así como, por los resultados descritos por Pernicová y colaboradores, en células LNCaP (Pernicová *et al.*, 2014). Estudios previos, en cáncer de pulmón han demostrado que REST1 es altamente expresada en células de NSCLC pero reprimida en SCLC. Es bien sabido, que la inactivación de REST1 a través de la metilación está directamente relacionada con la sobreexpresión de marcadores neuroendócrinos como SYN y CgA (Yazawa, 2015). De acuerdo, con Day y Salzet (R. Day y M. Salzet, 2002), la expresión de cromogranina no implica únicamente que las células provienen de un origen neuroendócrino sino que han adquirido un fenotipo neuroendócrino. En este sentido, nuestros resultados proveen una gran evidencia de que las células adquirieron características neuroendócrinas como resultado de un cambio genético que induce la expresión o inhibe a los represores que impiden la expresión de marcadores neuroendócrinos (R. Day y M. Salzet, 2002).

De acuerdo a Cerasuolo (Cerasuolo *et al.*, 2015), la habilidad de las células neuroendócrinas para inducir el “inicio temprano de un estado hormono-refractario” es intrigante y clínicamente relevante. Por lo tanto, los datos de la producción de un patrón diferencial en la producción de neurotransmisores, reafirma la idea de que tanto las hormonas peptídicas, como las aminas biógenas pueden ser liberadas al torrente sanguíneo o actuar de manera local, para promover la interacción parácrina dentro del microambiente tumoral, dando como resultado pronósticos más desalentadores para los pacientes como lo confirman los datos estadísticos (Zandee *et al.*, 2017). En este trabajo, se observó que las células A549_{NED} mostraron un patrón diferencial de la secreción de aminas biógenas comparado con las células control (A549_{CTRL}), revelando la exacerbación de la concentración de 5-HT y una disminución de la concentración de DA, así como cambios en el patrón de otros componentes no identificados (Cerasuolo *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2007).

El decremento observado en los niveles de dopamina en las células A549_{NED}, es consistente con los datos generados en las células PC12 donde los cambios inducidos por forskolina mostraron estar asociados con el crecimiento de neuritas y el decremento intracelular de los niveles intracelulares de dopamina inducidos por la disminución en la fosforilación de tirosina hidroxilasa (TH) (Park *et al.*, 2012).

El mecanismo del incremento en los niveles de 5-HT no está claro, sin embargo, este fenómeno ha sido observado previamente en las células neuronales 1C11 por Mouillet-Richards (Mouillet-Richards *et al.*, 2000). El mecanismo posible es que las células dopaminérgicas y serotoninérgicas provienen de un progenitor común con un destino de producción aminas biogénicas dual (Mouillet-Richards *et al.*, 2000), esto podría explicar los reportes clínicos de tumores neuroendócrinos con síndromes serotoninérgicos (Zandee *et al.*, 2017).

Los cocultivos de las células blanco *versus* células citotóxicas se utilizaron para obtener información sobre los efectos inmunomoduladores de los factores solubles producidos por las células A549_{NED} (SUN *ET AL.*, 2012; WANG *ET AL.*, 2010). Los resultados de viabilidad y liberación de fluorescencia sugieren el decremento de la citólisis producido por adquisición del fenotipo neuroendócrino en las células A549_{NED} comparado con las células A549_{CTRL}, sugiriendo que la adquisición de NED podría actuar a través de los factores solubles secretados posiblemente a través de la activación de vías parácrinas y autócrinas en el microambiente tumoral, por medio de la adaptación de la secreción de aminas biógenas para la posterior inhibición de la respuesta citotóxica de las células inmunes. Esta proposición sería ratificada con los datos obtenidos al evaluar el medio condicionado de las células A549_{CTRL} y A549_{NED} sobre la proliferación y viabilidad de las células Jurkat, que muestra una disminución en ambos valores generada por la adquisición de NED desde 24 horas. Estos datos coinciden con resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio que mostraron la inhibición de la proliferación de células Jurkat pre-activadas con fitohaemaglutinina al ser tratadas con diferentes concentraciones de 5-HT, del mismo modo se reportó la evidencia de la expresión de los receptores 5-HT_{5A} y 5-HT₇ en las células Jurkat; estos receptores se suman a los encontrados previamente en esta misma línea celular por otros grupos de investigación que

habían descrito la presencia de los receptores 5-HT1A (Aune *et al.*, 1993), 5-HT1B, 5-HT2B, 5-HT2C, 5-HT2D (Yin *et al.*, 2006) y 5-HT3 (Vega Lde *et al.*, 2005). Estudios previos indican que la activación selectiva de los receptores de 5-HT podría inhibir la proliferación de linfocitos mediada por PHA, posiblemente a través de la disminución de la expresión y distribución de receptores de IL-2 (Arreola *et al.*, 2015; Berumen *et al.*, 2012).

Por lo tanto, estos resultados sugieren que la producción diferencial de aminas biogénicas en la línea celular A549_{NED}, puede ser utilizada como mecanismo de defensa contra la actividad citotóxica de células inmunes (Zhao *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

1. Se generó una línea de adenocarcinoma pulmonar humano con fenotipo neuroendócrino A549_{NED} a partir de 72 h con tratamientos de FSK (0.5 mM), IBMX (0.5 mM) e I+F (0.5 mM) con sobreexpresión del biomarcador cromogranina A.
2. El tratamiento continuo durante 72 h con FSK, IBMX e I+F genera un fenotipo neuroendócrino reversible, estable por 24 horas después de retirado el estímulo.
3. El tratamiento continuo durante 120 h con FSK, IBMX e I+F genera un fenotipo neuroendócrino terminal, estable hasta por 48 horas después de retirado el estímulo.
4. La línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano transdiferenciada (A549_{NED}) adquirió un patrón diferencial de producción de aminas biógenas comparado con las células A549_{CTRL}, con la producción de menos dopamina y más serotonina.
5. En cocultivo, la adquisición de características neuroendócrinas se correlaciona con la disminución de la citólisis.
6. De manera independiente, el medio condicionado de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano transdiferenciada (A549_{NED}), disminuye la viabilidad y proliferación de las células Jurkat.

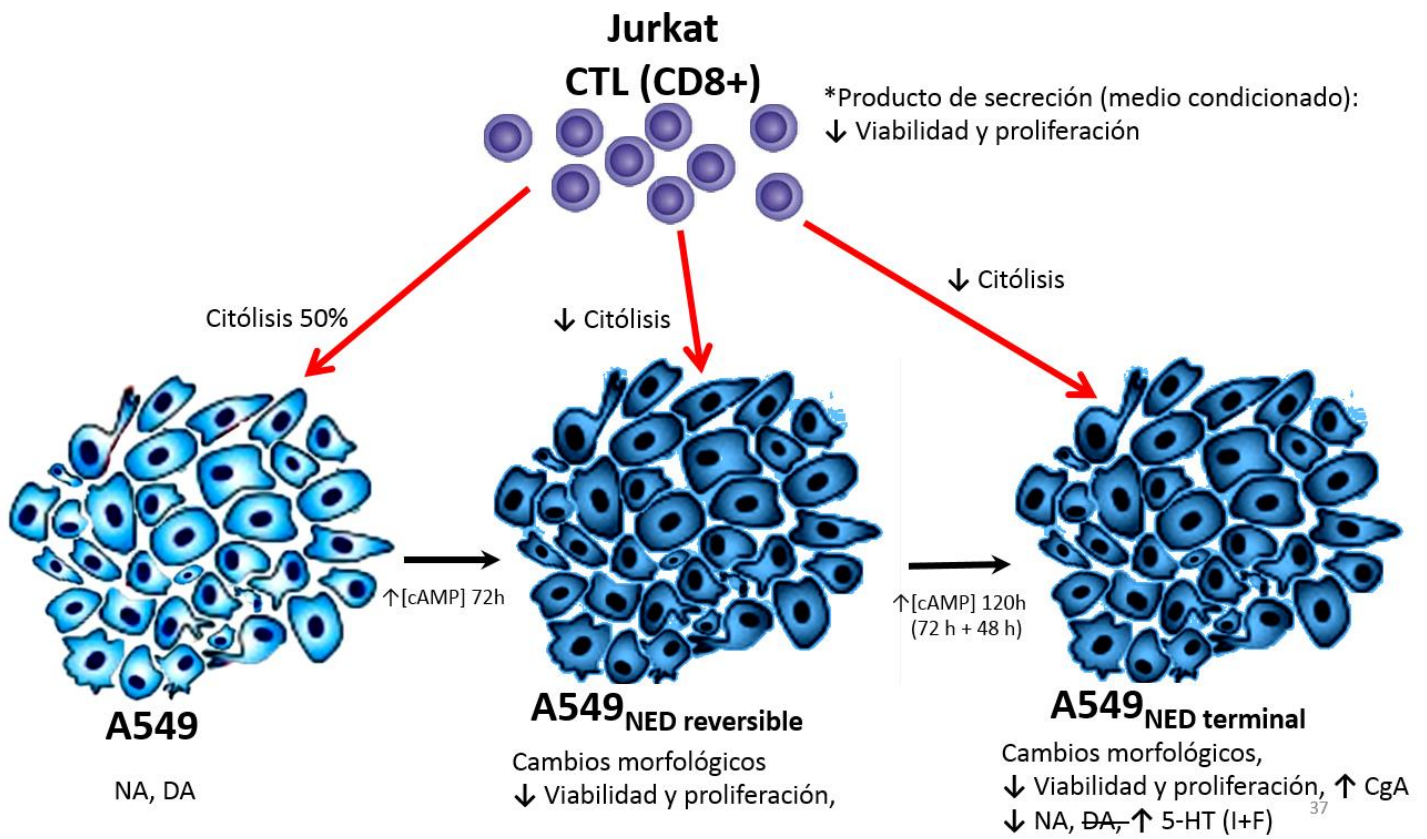


Figura 23. Efecto de la diferenciación neuroendócrina de A549 sobre la actividad citotóxica de Jurkat.

REFERENCIAS

1. ABATE-SHEN, C. & SHEN, M. M. 2000. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Development*, 14, 2410-2434.
2. AHERN, G. P. 2011. 5-HT and the immune system. *Current Opinion in Pharmacology*, 11, 29-33.
3. ALMATROODI, S. A., MCDONALD, C. F., DARBY, I. A. & POUNIOTIS, D. S. 2016. Characterization of M1/M2 Tumour-Associated Macrophages (TAMs) and Th1/Th2 Cytokine Profiles in Patients with NSCLC. *Cancer Microenviron*, 9, 1-11.
4. ALONSO-GORDOA, T., CAPDEVILA, J. & GRANDE, E. 2015. Biotherapy for neuroendocrine tumors. *European Journal of Endocrinology*, 172, R31-R46.
5. ARMAIZ-PEÑA, G. N., LUTGENDORF, S. K., COLE, S. W. & SOOD, A. K. 2009. Neuroendocrine modulation of cancer progression. *Brain Behav Immun*, 23, 10-15.
6. ARREOLA, R., ALVAREZ-HERRERA, S., PEREZ-SANCHEZ, G., BECERRIL-VILLANUEVA, E., CRUZ-FUENTES, C., FLORES-GUTIERREZ, E. O., GARCES-ALVAREZ, M. E., DE LA CRUZ-AGUILERA, D. L., MEDINA-RIVERO, E., HURTADO-ALVARADO, G., QUINTERO-FABIAN, S. & PAVON, L. 2016. Immunomodulatory Effects Mediated by Dopamine. *J Immunol Res*, 2016, 3160486.
7. ARREOLA, R., BECERRIL-VILLANUEVA, E., CRUZ-FUENTES, C., VELASCO-VELAZQUEZ, M. A., GARCES-ALVAREZ, M. E., HURTADO-ALVARADO, G., QUINTERO-FABIAN, S. & PAVON, L. 2015. Immunomodulatory effects mediated by serotonin. *Journal of Immunology Research*, 2015, 354957.
8. ASAMURA, H., KAMEYA, T., MATSUNO, Y., NOGUCHI, M., TADA, H., ISHIKAWA, Y., YOKOSE, T., JIANG, S. X., INOUE, T., NAKAGAWA, K., TAJIMA, K. & NAGAI, K. 2006. Neuroendocrine neoplasms of the lung: a prognostic spectrum. *J Clin Oncol*, 24, 70-6.
9. AUNE, T. M., MCGRATH, K. M., SARR, T., BOMBARA, M. P. & KELLEY, K. A. 1993. Expression of 5HT1A receptors on activated Human T cells. *The Journal of Immunology*, 151, 1175-1183.
10. BAGANZ, N. L. & BLAKELY, R. D. 2013. A dialog between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chem Neurosci*, 4, 48-63.
11. BANG, Y. J., PIRNIA, F., FANG, W. G., KANG, W. K., SARTOR, O., WHITESELL, L., HA, M. J., TSOKOS, M., SHEAHAN, M. D., NGUYEN, P., NIKLINSKI, W. T., MYERS, C. E. & TREPEL, J. B. 1994. Terminal NE differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cAMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 5530-5534.
12. BERUMEN, L. C., RODRIGUEZ, A., MILEDI, R. & GARCIA-ALCOCER, G. 2012. Serotonin receptors in hippocampus. *Scientific World Journal*, 2012, 823493.
13. BHATTACHARJEE, A., RICHARDS, W. G., STAUNTON, J., LI, C., MONTI, S., VASA, P., LADD, C., BEHESHTI, J., BUENO, R., GILLETTE, M., LODA, M., WEBER, G., MARK, E. J., LANDER, E. S., WONG, W., JOHNSON, B. E.,

- GOLUB, T. R., SUGARBAKER, D. J. & MEYERSON, M. 2001. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 13790-5.
14. BLALOCK, J. E. & SMITH, E. M. 2007. Conceptual development of the immune system as a sixth sense. *Brain Behav Immun*, 21, 23-33.
 15. BLANPAIN, C. 2013. Tracing the cellular origin of cancer. *Nat Cell Biol*, 15, 126-34.
 16. BORDON, Y. 2016. Neuroendocrine cells regulate lung inflammation. . *Nature Reviews of Immunology*.
 17. BOS, J. 2003. EPAC: A new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 4, 733-738.
 18. BRANCHFIELD, K., NANTIE, L., VERHEYDEN, J. M., SUI, P., WIENHOLD, M. D., & SUN, X 2015. Pulmonary neuroendocrine cells function as airway sensors to control lung immune response. . *Science*, 351, 707-710.
 19. BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A., & JEMAL, A 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians.*, 00, 1-31.
 20. CERASUOLO, M., PARIS, D., IANNOTTI, F. A., MELCK, D., VERDE, R., MAZZARELLA, E., MOTTA, A. & LIGRESTI, A. 2015. Neuroendocrine Transdifferentiation in Human Prostate Cancer Cells: An Integrated Approach. *Cancer Research*, 75, 2975-86.
 21. CINDOLO, L., CANTILE, M., VACHEROT, F., TERRY, S. & DE LA TAILLE, A. 2007. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: from lab to bedside. *Urologia Internationals*, 79, 287-96.
 22. CONTEDEUCA, V., AIETA, M., AMADORI, D. & DE GIORGI, U. 2014. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: current and emerging therapy strategies. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 92, 11-24.
 23. CORRADINI, E., MARTIN, N. & SCHOLTEN, A. 2015. Charting the interactome of PDE3A in human cells using an IBMX based chemical proteomics approach. *Molecular Biosystems*, 11, 2786-2797.
 24. COX, M. E., DEEBLE, P. D., BISSONETTE, E. A. & PARSONS, S. J. 2000. Activated 3',5'-Cyclic AMP-dependent Protein Kinase Is Sufficient to Induce Neuroendocrine-like Differentiation of the LNCaP Prostate Tumor Cell Line. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 13812-13818.
 25. COX, M. E., DEEBLE, P. D., LAKHANI, S. & PARSONS, S. J. 1999. Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: Implications for prostate cancer progression. *Cancer Research*, 59, 3821-3830.
 26. CHAMBERS, D. A. & SCHAUENSTEIN, K. 2000. Mindful immunology: Neuroimmunomodulation. *Trends Immunology Today*, 21, 168-170.
 27. CHANG, M. M.-J., SHIH, L. & WU, R. 2008. Pulmonary Epithelium: Cell types and functions. The pulmonary epithelium in health and disease.
 28. CHANG, Y., KIM, S. Y., CHOI, Y. J., SO, K. S., RHO, J. K., KIM, W. S., LEE, J. C., CHUNG, J. H. & CHOI, C. M. 2013. Neuroendocrine differentiation in acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Tuberculosis and Respiratory Disease (Seoul)*, 75, 95-103.

29. DAY, R. & SALZET, M. 2002. The neuroendocrine phenotype, cellular plasticity and the search for genetic switches. Redefining the diffuse NE system. *Neuroendocrinology Letters*, 23, 447-451.
30. DAY, R. & SALZET, M. 2002. The neuroendocrine phenotype, cellular plasticity and the search for genetic switches: Redefining the diffuse neuroendocrine system. *Neuroendocrinology Letters*, 23, 447-451.
31. DE HERDER, W. W. 2007. Biochemistry of neuroendocrine tumours. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 21, 33-41.
32. DRANOFF, G. 2002. Tumour immunology. Immune recognition and tumor protection. *Current Opinion in Immunology*, 14, 161-164.
33. DUERR, E. M. & CHUNG, D. C. 2007. Molecular genetics of neuroendocrine tumors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 21, 1-14.
34. DUNN, G. P., KOEBEL, C. M. & SCHREIBER, R. D. 2006. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*, 6, 836-48.
35. DUNN, G. P., OLD, L. J. & SCHREIBER, R. D. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21, 137-48.
36. ELENKOV, I. J. 2008. Neurohormonal-cytokine interactions: implications for inflammation, common human diseases and well-being. *Neurochem Int*, 52, 40-51.
37. EMERY, A. C., EIDEN, M. V. & EIDEN, L. E. 2014. Separate cyclic AMP sensors for neuritogenesis, growth arrest, and survival of neuroendocrine cells. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 10126-39.
38. EMERY, A. C., XU, W., EIDEN, M. V. & EIDEN, L. E. 2017. Guanine nucleotide exchange factor Epac2-dependent activation of the GTP-binding protein Rap2A mediates cAMP-dependent growth arrest in neuroendocrine cells. *Journal of Biological Chemistry*, 292, 12220-12231.
39. ENTSCHLADEN, F., PALM, D., LANG, K., DRELL IV, T. L. & ZAENKER, K. S. 2006. Neurogenesis: Tumors may release of neurotrophic factors in analogy of lymphangiogenesis and neoangiogenesis. *Medical Hypotheses*, 67, 33-35.
40. FERLAY J, E. M., LAM F, COLOMBET M, MERY L, PIÑEROS M, ZNAOR A, SOERJOMATARAM I, BRAY F 2018. Cancer Today. *In: OBSERVATORY*., G. C. (ed.) 09/18 ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
41. FISSELER-ECKHOFF, A. & DEMES, M. 2012. Neuroendocrine tumors of the lung. *Cancers (Basel)*, 4, 777-98.
42. GINSBERG, M. S., GREWAL, R. K. & HEELAN, R. T. 2001. Lung Cancer. *Radiologic Clinics of North America*, 45, 21-43.
43. GUSTAFSSON, B. I., KIDD, M., CHAN, A., MALFERTHEINER, M. V. & MODLIN, I. M. 2008. Bronchopulmonary neuroendocrine tumors. *Cancer*, 113, 5-21.
44. HANAHAN, D. & WEINBERG, ROBERT A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144, 646-674.
45. HERNÁNDEZ-LÓPEZ, D., SALCEDO- SULK, I., AGUAYO-GONZÁLEZ, A. & SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A. 2015. Estudio observacional de tumores neuroendócrinos en una cohorte mexicana. *In: ONCOLOGÍA, S. M. D. (ed.) XXXIII Congreso de la Sociedad Mexicana de Oncología.* Cancún, Qroo.
46. HU, C. D., CHOO, R. & HUANG, J. 2015. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: a mechanism of radioresistance and treatment failure. *Front*

- Oncol*, 5, 90.
47. INEGI 2017. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero). Datos nacionales. *In:* (INEGI), I. N. D. E. Y. G. (ed.). Aguascalientes, Ags.: Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI).
 48. ISAKA, M., NAKAGAWA, K., OHDE, Y., OKUMURA, T., WATANABE, R., ITO, I., NAKAJIMA, T. & KONDO, H. 2012. A clinicopathological study of peripheral, small-sized high-grade neuroendocrine tumours of the lung: differences between small-cell lung carcinoma and large-cell neuroendocrine carcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg*, 41, 841-6.
 49. ISSSTE, C. D. S. G. I. E. 2009. Guía de referencia rápida: Para la detección, diagnóstico y tratamiento del Cáncer Pulmonar de células no pequeñas.
 50. IYODA, A., HIROSHIMA, K., NAKATANI, Y. & FUJISAWA, T. 2007. Pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma: its place in the spectrum of pulmonary carcinoma. *Ann Thorac Surg*, 84, 702-7.
 51. JONES, S. E. & PALMER, T. M. 2012. Protein kinase A-mediated phosphorylation of RhoA on serine 188 triggers the rapid induction of a neuroendocrine-like phenotype in prostate cancer epithelial cells. *Cellular Signaling*, 24, 1504-14.
 52. KARACHALIOU, N., PILOTTO, S., LAZZARI, C., BRIA, E., DE MARINIS, F. & ROSELL, R. 2016. Cellular and molecular biology of small cell lung cancer: an overview. *Transl Lung Cancer Res*, 5, 2-15.
 53. KIM, C. F., JACKSON, E. L., WOOLFENDEN, A. E., LAWRENCE, S., BABAR, I., VOGEL, S., CROWLEY, D., BRONSON, R. T. & JACKS, T. 2005. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*, 121, 823-35.
 54. KINDT, T. J., GOLDSBY, R. A., OSBORNE, B. A. & KUBY, J. 2007. *Inmunología de Kuby*.
 55. LAPUK, A. V., WU, C., WYATT, A. W., MCPHERSON, A., MCCONEGHY, B. J., BRAHMBHATT, S., MO, F., ZOUBEIDI, A., ANDERSON, S., BELL, R. H., HAEGERT, A., SHUKIN, R., WANG, Y., FAZLI, L., HURTADO-COLL, A., JONES, E. C., HACH, F., HORMOZDIARI, F., HAJIRASOULIHA, I., BOUTROS, P. C., BRISTOW, R. G., ZHAO, Y., MARRA, M. A., FANJUL, A., MAHER, C. A., CHINNAIYAN, A. M., RUBIN, M. A., BELTRAN, H., SAHINALP, S. C., GLEAVE, M. E., VOLIK, S. V. & COLLINS, C. C. 2012. From sequence to molecular pathology, and a mechanism driving the neuroendocrine phenotype in prostate cancer. *J Pathol*, 227, 286-97.
 56. LINNOILA, R. I. 2006. Functional facets of the pulmonary neuroendocrine system. *Lab Invest*, 86, 425-44.
 57. LUGNIER, C. 2006. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 109, 366-98.
 58. LUYKENAAR, K. D. & WELSH, D. G. 2007. Activators of the PKA and PKG pathways attenuate RhoA-mediated suppression of the KDR current in cerebral arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292, H2654-63.
 59. MAO, Y., YANG, D., HE, J. & KRASNA, M. J. 2016. Epidemiology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*, 25, 439-45.

60. MARTINO, M., ROCCHI, G., EXCELSIOR, A. & FORNARO, M. 2012. Immunomodulation mechanism of antidepressants. *Current Neuropharmacology*, 10, 97-123.
61. MAZZOCCOLI, G., VENDEMIALE, G., DE CATA, A., CARUGHI, S. & TARQUINI, R. 2010. Altered time structure of neuro-endocrine-immune system function in lung cancer patients. *BMC Cancer*, 10, 314.
62. MELMED, S. 2001. Series Introduction: The immuno-neuroendocrine interface. *Journal of Clinical Investigation*, 108, 1563-1566.
63. MENDIETA, I., NÚÑEZ-ANITA, R. E., PÉREZ SÁNCHEZ, G., PAVÓN, L., RODRÍGUEZ-CRUZ, A., GARCÍA-ALCOCER, G. & BERUMEN, L. C. 2018. Effect of A549 neuroendocrine differentiation on cytotoxic immune response. *Endocrine connections*, 7, 791-802.
64. MINNA, J. D., ROTH, J. A. & GAZDAR, A. F. 2002. Focus on Lung cancer *Cancer cell*, 1, 49-52.
65. MITRA, R., SINGH, S. & KHAR, A. 2003. Antitumour immune responses. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5, 1-19.
66. MODLIN, I. M., OBERG, K., TAYLOR, A., DROZDOV, I., BODEI, L. & KIDD, M. 2014. Neuroendocrine tumor biomarkers: current status and perspectives. *Neuroendocrinology*, 100, 265-77.
67. MOLLBERG, N., SURATI, M., DEMCHUK, C., FATHI, R., SALAMA, A. K., HUSAIN, A. N., HENSING, T. & SALGIA, R. 2011. Mind-mapping for lung cancer: towards a personalized therapeutics approach. *Adv Ther*, 28, 173-94.
68. MOUILLET-RICHARDS, S., MUTEL, V., LORIC, S., TOURNOIS, C., J.M., L. & KELLERMANN, O. 2000. Regulation by Neurotransmitter Receptors of Serotonergic or Catecholaminergic neuronal cell differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 9186-9192.
69. MRAVEC, B., GIDRON, Y. & HULIN, I. 2008. Neurobiology of cancer: Interactions between nervous, endocrine and immune systems as a base for monitoring and modulating the tumorigenesis by the brain. *Semin Cancer Biol*, 18, 150-63.
70. MRAVEC, B., GIDRON, Y., KUKANOVA, B., BIZIK, J., KISS, A. & HULIN, I. 2006. Neural-endocrine-immune complex in the central modulation of tumorigenesis: facts, assumptions, and hypotheses. *J Neuroimmunol*, 180, 104-16.
71. OBERG, K., MODLIN, I. M., DE HERDER, W., PAVEL, M., KLIMSTRA, D., FRILLING, A., METZ, D. C., HEANEY, A., KWEKKEBOOM, D., STROSBURG, J., MEYER, T., MOSS, S. F., WASHINGTON, K., WOLIN, E., LIU, E. & GOLDENRING, J. 2015. Consensus on biomarkers for neuroendocrine tumour disease. *The Lancet. Oncology*, 16, 435-446.
72. OLDENBURGER, A., MAARSINGH, H. & SCHMIDT, M. 2012. Multiple facets of cAMP signalling and physiological impact: cAMP compartmentalization in the lung. *Pharmaceuticals (Basel)*, 5, 1291-331.
73. OSER, M. G., NIEDERST, M. J., SEQUIST, L. V. & ENGELMAN, J. A. 2015. Transformation of non small cell lung cancer to small cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. *Lancet Oncology*, 16, e165-e172.
74. PAI, V. P., MARSHALL, A. M., HERNANDEZ, L. L., BUCKLEY, A. R. & HORSEMAN, N. D. 2009. Altered serotonin physiology in human breast

- cancers favors paradoxical growth and cell survival. *Breast Cancer Research*, 11.
75. PARK, J. Y. & JUHNN, Y. S. 2017. cAMP signaling increases histone deacetylase 8 expression via the Epac2-Rap1A-Akt pathway in H1299 lung cancer cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 49, e297.
 76. PARK, K. H., PARK, H. J., SHIN, K. S., CHOI, H. S., KAI, M. & LEE, M. K. 2012. Modulation of PC12 cell viability by forskolin-induced cyclic AMP levels through ERK and JNK pathways: an implication for L-DOPA-induced cytotoxicity in nigrostriatal dopamine neurons. *Toxicological Sciences*, 128, 247-57.
 77. PAVON, L., JIMÉNEZ, M. C. & GARCÉS, M. E. 2016. *Inmunología Molecular, Celular Y Traslacional*, Lippincott Williams & Wilkins.
 78. PERNICOVÁ, Z., SLABÁKOVÁ, E., FEDR, R., ŠIMEČKOVÁ, Š., JAROŠ, J., SUCHÁNKOVÁ, T., BOUCHAL, J., KHARAISHVILI, G., KRÁL, M., KOZUBÍK, A. & SOUČEK, K. 2014. The role of high cell density in the promotion of neuroendocrine transdifferentiation of prostate cancer cells. *Molecular Cancer*, 13, 113-129.
 79. PITTMAN, Q. J. 2011. A neuro endocrine immune symphony. *Journal of Neuroendocrinology*, 23, 1296-1297.
 80. PRENDERGAST, G. C., SMITH, C., THOMAS, S., MANDIK-NAYAK, L., LAURY-KLEINTOP, L., METZ, R. & MULLER, A. J. 2014. Indoleamine 2,3-dioxygenase pathways of pathogenic inflammation and immune escape in cancer. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 63, 721-735.
 81. PUNT, J. 2013. Adaptive Immunity. 41-53.
 82. RAMÍREZ-BALDERRAMA, L., LÓPEZ-BRIONES, S., DAZA-BENÍTEZ, L., MACÍAS, M. H., LÓPEZ-GAYTÁN, T. & PÉREZ-VÁZQUEZ, V. 2013. Diferenciación neuroendocrina en adenocarcinoma de próstata. *Gaceta médica de México*, 149, 639-645.
 83. RAVNI, A., VAUDRY, D., GERDIN, M. J., EIDEN, M. V., FALLUEL-MOREL, A., GONZALEZ, B. J., VAUDRY, H. & EIDEN, L. E. 2008. A cAMP-dependent, protein kinase A-independent signaling pathway mediating neurogenesis through Egr1 in PC12 cells. *Molecular Pharmacology*, 73, 1688-708.
 84. ROSS, M. H. & PAWLINA, W. 2007. *Histología. Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular.*, Ed. Médica Panamericana.
 85. RUDDON, R. W. 2007. *Cancer biology*, Oxford University Press.
 86. SANTONI, M., CONTI, A., BURATTINI, L., BERARDI, R., SCARPELLI, M., CHENG, L., LOPEZ-BELTRAN, A., CASCINU, S. & MONTIRONI, R. 2014. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: novel morphological insights and future therapeutic perspectives. *Biochim Biophys Acta*, 1846, 630-7.
 87. SEMENOVA, E. A., NAGEL, R. & BERNS, A. 2015. Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer. *Genes Development*, 29, 1447-1462.
 88. SONG, H., YAO, E., LIN, C., GACAYAN, R., CHEN, M. H. & CHUANG, P. T. 2012a. Functional characterization of pulmonary neuroendocrine cells in lung development, injury, and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 17531-6.

89. SONG, H., YAO, E., LIN, C., GACAYAN, R., CHEN, M. H. & CHUANG, P. T. 2012b. Functional characterization of pulmonary neuroendocrine cells in lung development, injury, and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 17531-6.
90. SORHAUG, S. 2007. *The Pulmonary Neuroendocrine System. Physiological, pathological and tumourigenic aspects*. degree of philosophiae doctor, Norwegian University of Science and Technology.
91. STERNBERG, E. M. 2006. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature Reviews of Immunology*, 6, 318-328.
92. STOVOLD, R., MEREDITH, S. L., BRYANT, J. L., BABUR, M., WILLIAMS, K. J., DEAN, E. J., DIVE, C., BLACKHALL, F. H. & WHITE, A. 2013. Neuroendocrine and epithelial phenotypes in small-cell lung cancer: implications for metastasis and survival in patients. *Br J Cancer*, 108, 1704-11.
93. SUN, S. Q., JIANG, C. G., LIN, Y., JIN, Y. L. & HUANG, P. L. 2012. Enhanced T Cell Immunity by B7-H Downregulation in Nonsmall-cell Lung Cancer Cell Lines. *The Journal of International Medical Research*, 40, 497-506.
94. TERRY, S. & BELTRAN, H. 2014. The many faces of neuroendocrine differentiation in prostate cancer progression. *Front Oncol*, 4, 60.
95. TRAVIS, W. D., BRAMBILLA, E., NOGUCHI, M., NICHOLSON, A. G., GEISINGER, K. R., YATABE, Y., BEER, D. G., POWELL, C. A., RIELY, G. J., VAN SCHIL, P. E., GARG, K., AUSTIN, J. H., ASAMURA, H., RUSCH, V. W., HIRSCH, F. R., SCAGLIOTTI, G., MITSUDOMI, T., HUBER, R. M., ISHIKAWA, Y., JETT, J., SANCHEZ-CESPEDES, M., SCULIER, J. P., TAKAHASHI, T., TSUBOI, M., VANSTEENKISTE, J., WISTUBA, I., YANG, P. C., ABERLE, D., BRAMBILLA, C., FLIEDER, D., FRANKLIN, W., GAZDAR, A., GOULD, M., HASLETON, P., HENDERSON, D., JOHNSON, B., JOHNSON, D., KERR, K., KURIYAMA, K., LEE, J. S., MILLER, V. A., PETERSEN, I., ROGGLI, V., ROSELL, R., SAIJO, N., THUNNISSEN, E., TSAO, M. & YANKELEWITZ, D. 2011. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 6, 244-85.
96. VEGA LDE, L., MUNOZ, E., CALZADO, M. A., LIEB, K., CANDELARIO-JALIL, E., GSCHADMEIR, H., FARBER, L., MUELLER, W., STRATZ, T. & FIEBICH, B. L. 2005. The 5-HT3 receptor antagonist tropisetron inhibits T cell activation by targeting the calcineurin pathway. *Biochemical Pharmacology*, 70, 369-80.
97. WALKER, G. E., ANTONIONO, R. J., ROSS, H. J., PAISLEY, T. E. & OH, Y. 2006. Neuroendocrine-like differentiation of non-small cell lung carcinoma cells: regulation by cAMP and the interaction of mac25/IGFBP-rP1 and 25.1. *Oncogene*, 25, 1943-1954.
98. WANG, H., ZHANG, G., DAI, J. & MIN, J. 2010. Immune evasion of human lung carcinoma cell A549 suppressed by human lymphoma cell Jurkat via Fas/FasL pathway. *Chinese Journal of Lung Cancer*, 13, 681-5.
99. WANG, J., EDEEN, K., MANZER, R., CHANG, Y., WANG, S., CHEN, X., FUNK, C. J., COSGROVE, G. P., FANG, X. & MASON, R. J. 2007. Differentiated

- human alveolar epithelial cells and reversibility of their phenotype in vitro. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 36, 661-668.
100. WEBSTER, J. I., TONELLI, L. & STERNBERG, E. M. 2002. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol*, 20, 125-63.
 101. WEST, J. B. 2012. *Respiratory physiology: the essentials*, Lippincott Williams & Wilkins.
 102. WRONA, D. 2006. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol*, 172, 38-58.
 103. YAZAWA, T. 2015. Recent advances in histogenesis research of lung neuroendocrine cancers: Evidence obtained from functional analyses of primitive neural/neuroendocrine cell-specific transcription factors. *Pathology International*, 65, 277-85.
 104. YIN, J., ALBERT, R. H., TRETIAKOVA, A. P. & JAMESON, B. A. 2006. 5-HT(1B) receptors play a prominent role in the proliferation of T-lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 181, 68-81.
 105. YUAN, T. C., VEERAMANI, S. & LIN, M. F. 2007. Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocrine-Related Cancer*, 14, 531-47.
 106. ZANDEE, W. T., KAMP, K., VAN ADRICHEM, R. C., FEELDERS, R. A. & DE HERDER, W. W. 2017. Effect of hormone secretory syndromes on neuroendocrine tumor prognosis. *Endocrine-Related Cancer*, 24, R261-R274.
 107. ZHAO, W., HUANG, Y., LIU, Z., CAO, B. B., PEONG, Y. P. & QIU, Y. H. 2013. Dopamine receptors modulate cytotoxicity of Natural killer cells via cAMP-PKA-CREB signaling pathway.
 108. ZHU, Y., LIU, C., CUI, Y., NADIMINTY, N., LOU, W. & GAO, A. C. 2014. Interleukin-6 induces neuroendocrine differentiation (NED) through suppression of RE-1 silencing transcription factor (REST). *Prostate*, 74, 1086-94.

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

- NED-** Diferenciación Neuroendócrina
- CM-** Medio Condicionado
- WD-** Retirada
- CTL-** Linfocitos T citotóxicos
- NK-** Células Naturales Asesinas
- 5-HT-** Serotonina
- NA-** Noradrenalina
- AD-** Adrenalina
- DA-** Dopamina
- NSCLC-** Cáncer de pulmón de células no pequeñas
- SCLC-** Cáncer de pulmón de células pequeñas
- FBS-** Suero fetal bovino
- DMEM-** Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's
- A549-** Línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano
- PBS-** Amortiguador de fosfatos
- BSA-** Albúmina de suero bovino