

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DE LA DIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA DE  
CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA PULMONAR SOBRE LA  
ACTIVIDAD DE CÉLULAS CITOTÓXICAS DE RATÓN”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**RICARDO FOSADO RODRÍGUEZ**

DIRIGIDA POR

**Dra. ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2022.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DE LA DIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA DE  
CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA PULMONAR SOBRE LA  
ACTIVIDAD DE CÉLULAS CITOTÓXICAS DE RATÓN”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**RICARDO FOSADO RODRÍGUEZ**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO**

**SINODALES**

**Dra. ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO**

**DIRECTORA**

**Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA**

**ASESORA INTERNA**

**Dr. JORGE NOEL GRACIDA RODRÍGUEZ**

**SINODAL**

**M. en C. JAZMÍN ESMERALDA SOTO HERNÁNDEZ**

**SINODAL**

*A María Elena Macedo, mi abuela, sobreviviente de la lucha contra el cáncer*

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Irasema Mendieta por brindarme su apoyo, por su orientación, su tiempo, sus conocimientos, su paciencia y por depositar su confianza en mí para la realización de este proyecto.

A la Dra. Laura Berumen por haberme brindado un espacio en su laboratorio, por su tiempo, sus conocimientos, su apoyo y por haberme confiado la realización de este proyecto.

Al Dr. Jorge Gracida por compartirme sus conocimientos, por guiarme, por su tiempo y por su interés en mi desarrollo profesional.

A la M. en C. Jazmín Soto, por haberme entrenado, apoyado y asesorado durante toda la realización de este trabajo, por su tiempo, por su paciencia y por su amistad.

A la Dra. Carmen Aceves por haberme brindado un espacio en su laboratorio y por contribuir con recursos importantes para la realización del proyecto.

A las Dras. Alejandra Castilla y María Carbajo por su asistencia técnica en el manejo de los animales de laboratorio.

A la Dra. Elvira Núñez por brindarme un espacio en su laboratorio.

A CONACYT por el financiamiento de este trabajo a través del proyecto CB2017-2018-A1-S-25275.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, que a través del Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER) proporcionó recursos esenciales para este trabajo con el proyecto FOPER-2021-FQU02413.

A todos los docentes involucrados en mi formación.

A Jazmín Pichardo, porque sin ella no habría formado parte de este proyecto.

A Dulce, Ana Laura, Paco, Sara, Miriam, Marian, Rebeca, Odalis y a todos mis compañeros del laboratorio por su amistad y su apoyo.

A Aline Vargas por haberme compartido su amor por la ciencia y por permitirme descubrir el mío.

A Benjamín, Xitlali y al LIALT por contribuir a mi formación, por su comprensión y por su flexibilidad.

A Luz Núñez por su amistad y sus consejos.

A Dylan por su amistad y por su apoyo.

A Pablo, Samuel, Alejandro, Santiago, Ricardo y Adrián por su amistad, por todos los momentos, por siempre estar ahí y por entender mi ausencia derivada de este proyecto.

A Xime por su apoyo incondicional, por su compañía, por su amor, por siempre encontrar la forma de motivarme y por su capacidad para compartirme su alegría.

A toda mi familia por el apoyo incondicional.

A mi abuela, María Elena, por ser la inspiración de este trabajo.

A mis hermanos, José Antonio, Gerardo y Marco por siempre estar ahí.

A mis papás, José Antonio y Mónica, por todo su interés, esfuerzo, dedicación, confianza, motivación y principalmente, por todo su amor.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	vi
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Cáncer	1
1.2 Cáncer de pulmón	1
1.3 Cáncer neuroendocrino	3
1.4 Respuesta inmunitaria innata frente al cáncer	10
1.5 Respuesta inmunitaria adaptativa frente al cáncer	12
1.6 Respuesta inmunitaria citotóxica	14
1.7 Relación entre NED y el sistema inmunitario	19
2. HIPÓTESIS	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo general	23
3.2 Objetivos específicos	23
4. METODOLOGÍA	24
4.1 Materiales	24
4.2 Métodos	27
4.2.1 Diferenciación neuroendocrina de células A549	27
4.2.2 Estandarización del número de células neuroendocrinas obtenidas	27
4.2.3 Identificación de proyecciones tipo neurita	28
4.2.4 Identificación de marcadores neuroendocrinos	28
4.2.5 Obtención de sangre periférica de ratones BALB/c	29
4.2.6 Aislamiento y cultivo de células mononucleares de ratón BALB/c	29
4.2.7 Cocultivo de PBMCs con células A549 <sub>CTRL</sub> o A549 <sub>NED</sub>	30
4.2.8 Ensayos de viabilidad celular	30

4.2.9 Inmunización de ratones BALB/c	31
4.2.10 Obtención del suero de los ratones BALB/c	32
4.2.11 Análisis del perfil de poblaciones celulares de los ratones	32
4.2.12 Análisis del suero de los ratones	33
4.2.13 Análisis estadístico	34
5. RESULTADOS	35
5.1 Transdiferenciación neuroendocrina de células A549	35
5.2 Cambios en las poblaciones celulares de los ratones inmunizados	38
5.3 Cambios en el perfil de citocinas de los ratones inmunizados	46
5.4 Cocultivo de células mononucleares con células A549 <sub>CTRL</sub> o A549 <sub>NED</sub>	51
6. DISCUSIÓN	55
6.1 Diferenciación neuroendocrina de células A549	55
6.2 Monocitos	58
6.3 Linfocitos T doble positivos (CD4+/CD8+)	64
6.4 Linfocitos T CD4+	66
6.5 Linfocitos T CD8+	70
6.6 Células NK	73
6.7 Citocinas	77
6.8 Cocultivos entre A549 y PBMCs	80
7. CONCLUSIONES	89
8. REFERENCIAS	90

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Factores neuroendocrinos eutópicos y ectópicos del tejido pulmonar	4
2. Factores neuroendocrinos y su actividad carcinogénica	5
3. Identificación de marcadores neuroendocrinos	7
4. Oligonucleótidos empleados para cuantificar los marcadores neuroendocrinos	25
5. Grupos de ratones inmunizados	32



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Gráfico de mortalidad por cáncer a nivel mundial en 2020	2
2. Vía de señalización del AMPc	9
3. Cambios morfológicos en células A549 tratadas con FSK e IBMX	35
4. Análisis de las proyecciones tipo neurita	36
5. Amplificación de SYN, CgA y GAPDH	36
6. Cambios en la expresión relativa de los marcadores neuroendocrinos	37
7. Amplificación de NEUROD1	38
8. Supervivencia de las células A549 después del tratamiento	38
9. Cambios en el porcentaje de monocitos en células mononucleares de ratón	39
10. Análisis del porcentaje de PBMCs CD68+ en los ratones inmunizados	40
11. Cambios en el porcentaje de linfocitos doble positivos CD4+/CD8a+	40
12. Cambio en el porcentaje de linfocitos positivos a CD4 y CD8a	41
13. Cambios en el porcentaje de linfocitos CD4+	41
14. Cambio en el porcentaje de linfocitos T CD4+ en los ratones inmunizados	42
15. Cambios en el porcentaje de linfocitos CD8a+	42
16. Cambios en el porcentaje de linfocitos T CD8a+ en los ratones inmunizados	43
17. Cambios en el porcentaje de células NK	44
18. Cambios en el porcentaje de células CD335+ en los ratones inmunizados	45
19. Peso promedio de los ratones a través del experimento	45
20. Niveles de IL-2 en la vasculatura de los ratones inmunizados	47
21. Curva estándar para IL-2 generada en el ensayo ELISA.	47
22. Niveles de IFN- $\gamma$ en la vasculatura de los ratones inmunizados	48
23. Curva estándar para IFN- $\gamma$ generada en el ensayo ELISA	49
24. Niveles de IL-10 en la vasculatura de los ratones inmunizados	50
25. Curva estándar para IL-10 generada en el ensayo ELISA	50
26. Viabilidad de células A549 después del cocultivo con PBMCs	52
27. Viabilidad de PBMCs después del cocultivo con A549 <sub>CTRL</sub>	53
28. Viabilidad de PBMCs después del cocultivo con A549 <sub>NED</sub>	54

29. Expresión de marcadores neuroendocrinos mediada por AMPc e IL-6	58
30. Poblaciones de monocitos elevados en los ratones inmunizados	61
31. Evasión de la fagocitosis mediada por CD47	62
32. Polarización a linfocitos Th2 mediada por células doble positivas	66
33. Poblaciones de linfocitos T CD4+ elevadas en los ratones inmunizados	69
34. Expansión y contracción de linfocitos T CD8+	71
35. Generación de linfocitos T CD8+ exhaustos	72
36. Desarrollo de la respuesta de células NK dependiente de citocinas	76
37. Resumen de la acción de las citocinas evaluadas	79
38. Mecanismos celulares involucrados en los cocultivos	83
39. Efecto de la serotonina sobre las células del sistema inmunitario	86
40. Efecto de la dopamina sobre las células del sistema inmunitario	88

## RESUMEN

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer con mayor mortalidad; durante su desarrollo, las células pueden adquirir propiedades neurales y endocrinas que afectan el microambiente tumoral al liberar factores específicos, algunos con actividad inmunomoduladora. Puesto que este fenotipo se correlaciona con mayor capacidad invasiva, metástasis y menor tasa de supervivencia, su estudio es necesario para entender la enfermedad. Este trabajo evaluó el efecto de la diferenciación neuroendocrina del adenocarcinoma sobre las células mononucleares de sangre periférica de ratón (PBMCs). El fenotipo neuroendocrino se indujo en células A549 tratándolas con FSK e IBMX (0.5 mM) por 96 horas. Para evaluar efectos sistémicos, se determinaron cambios en el perfil de células inmunitarias y de citocinas en la circulación de ratones BALB/c inmunizados con PBS, células A549<sub>CTRL</sub> no diferenciadas o células A549<sub>NED</sub> diferenciadas. La inmunización con células A549<sub>CTRL</sub> aumentó el porcentaje de monocitos en circulación, mientras que las células transdiferenciadas (A549<sub>NED</sub>) mantuvieron los niveles de monocitos en un estado basal, similar al grupo control. Las citocinas IL-2 e IL-10 aumentaron solo en los ratones inmunizados con células A549 no tratadas, sugiriendo que el sistema inmunitario genera una respuesta regulada contra las células de adenocarcinoma, lo cual no se observó con células A549<sub>NED</sub>. Los cocultivos demostraron la capacidad citotóxica de las PBMCs al enfrentarse con células A549<sub>CTRL</sub>, mientras que en presencia de células A549<sub>NED</sub> no solo fueron incapaces de mostrar actividad citolítica, sino que perdieron viabilidad. La diferenciación neuroendocrina en células de cáncer parece impedir parcialmente la activación del sistema inmunológico, lo cual puede contribuir al mal pronóstico de los pacientes afectados por esta patología.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento descontrolado y autónomo de células que han adquirido características específicas a través de mutaciones en genes involucrados en el funcionamiento del ciclo celular. Este proceso puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo humano, el cual se compone por millones de células. A medida que las células continúan dividiéndose de manera anormal, comienzan a formar masas celulares conocidas como tumores; éstos pueden ser malignos, es decir, que tienen la capacidad de invadir tejidos cercanos y dispersarse a diversos órganos del cuerpo, o pueden ser benignos, con menor tasa de proliferación e incapaces de invadir tejidos y formar metástasis (Weinberg, 2014; NCI, 2021a).

Las células cancerosas tienen la capacidad de influenciar a las diferentes células normales que las rodean, zona que se conoce como microambiente tumoral; esto les permite, entre otras cosas, promover la formación de nuevos vasos sanguíneos para obtener nutrientes, oxígeno y deshacerse de compuestos tóxicos; además, las interacciones en el microambiente y la presencia de diversas moléculas derivadas de las células –tanto cancerosas como no cancerosas– pueden permitir que el tumor evada al sistema inmunitario, favoreciendo su progresión (NCIb, 2021b).

Existen diferentes tipos de cáncer, clasificados generalmente de acuerdo con el tipo de órgano o tejido a partir del cual se originan. Los carcinomas son los tipos de cáncer más comunes, y éstos se componen por células epiteliales, las cuales recubren las superficies y cavidades del cuerpo (Weinberg, 2014).

### 1.2 Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer con mayor tasa de mortalidad en el mundo, afectando tanto a hombres como mujeres (Figura 1), y también se trata del segundo tipo de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial. En México, el cáncer de pulmón ocupa el segundo lugar de mortalidad en hombres, por debajo únicamente del de

próstata; asimismo, este tipo de cáncer se encuentra en el séptimo lugar de incidencia para ambos sexos (GCO, 2021).

El cáncer de pulmón con origen epitelial se puede clasificar de manera general en dos tipos: carcinomas de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés) y carcinomas de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés) (Roviello, 2015). Dentro de los NSCLC se encuentra el adenocarcinoma, el cual surge de las células epiteliales que producen fluidos o mucosidad, y se trata del subtipo de cáncer de pulmón más común, representando cerca del 40 % de todos los casos (Sardenberg y col., 2014; Singh y Raina, 2015; Myers y Wallen, 2021).

**Número estimado de muertes por cáncer en 2020, todo el mundo, ambos sexos, todas las edades**

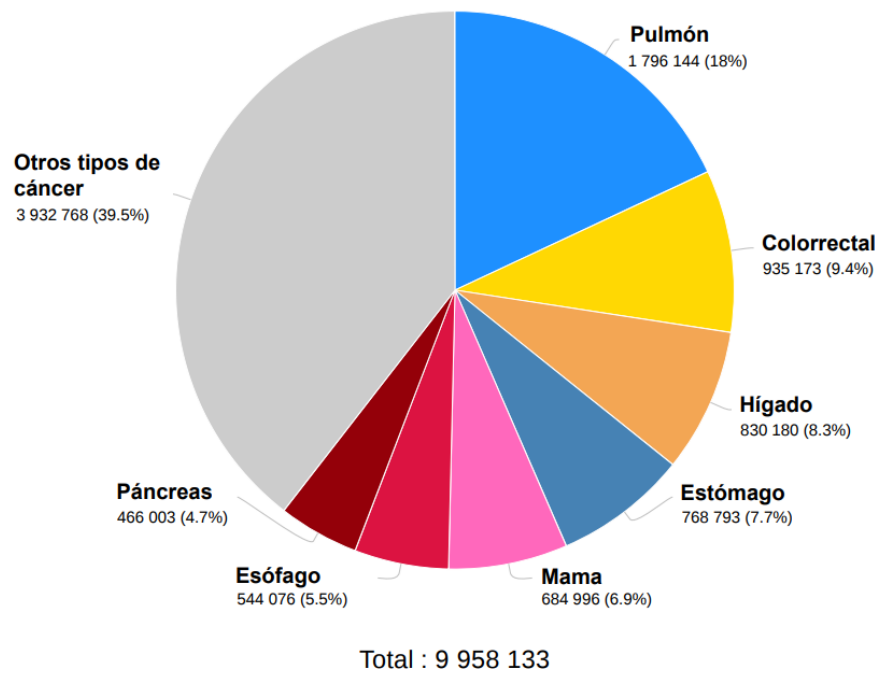


Figura 1. Gráfico de mortalidad por cáncer a nivel mundial en 2020. Modificado de GLOBOCAN, 2021 (GCO, 2021).

El adenocarcinoma, a su vez, puede subclasificarse de acuerdo con el tipo de célula a partir de la cual se genera: acinar, papilar, bronquioalveolar y de células secretoras de mucosa (Myers y Wallen, 2021).

El mayor factor de riesgo para todos los tipos de cáncer de pulmón es el consumo de tabaco, y se estima que entre el 75-80 % de las muertes por este tipo de cáncer

se deben al hábito de fumar. El adenocarcinoma ocurre principalmente en personas que fuman o que solían hacerlo, sin embargo, se trata también del cáncer de pulmón más común en no fumadores y suele presentarse en pacientes más jóvenes (Cersosimo, 2002; ACS, 2019).

A pesar de la implementación de nuevos tratamientos, la tasa de supervivencia a cinco años para este cáncer sigue siendo menor al 15 % dentro de países desarrollados, valor que se reduce hasta el 5 % en el caso de los países en vías de desarrollo (Singh y Raina, 2015; Myers y Wallen, 2021).

### 1.3 Cáncer neuroendocrino

El epitelio pulmonar normal cuenta con células neuroendocrinas dispersadas aleatoriamente que forman parte del sistema neuroendocrino difuso, así como grupos de células conocidos como cuerpos neuroendocrinos, que combinan características epiteliales, neurales y endocrinas, y a pesar de constituir menos del 1 % del total de las células epiteliales, participan en el desarrollo y funcionamiento normal de los pulmones al liberar los diversos componentes que contienen en sus gránulos secretores, entre los que se encuentran la serotonina, el péptido liberador de gastrina (GRP) y la calcitonina, que son factores neuroendocrinos eutópicos del tejido pulmonar, es decir, que se encuentran ahí en condiciones no patológicas (Cuadro 1) (Linnoila y col., 1988).

Los tumores neuroendocrinos *de novo* que surgen a partir de una de estas células y se componen exclusivamente por células neuroendocrinas, son muy raros. Sin embargo, durante el progreso tumoral, algunas células pueden pasar por un proceso de transdiferenciación neuroendocrina, conocido como NED por sus siglas en inglés. Hasta el 50 % de los casos de NSCLC pueden contener un gran número de subpoblaciones focalizadas de células que han sufrido el proceso de NED, siendo más abundantes en los tumores de mayor grado, y aunque estas células prevalecen entre una población predominante de células de adenocarcinoma no transdiferenciadas, tienen un gran efecto sobre el microambiente tumoral y la progresión del cáncer. Las células cancerosas que han adquirido el fenotipo difieren

de aquellas células neuroendocrinas del tejido normal, por ejemplo, además de producir los factores mencionados (eutópicos), en el caso de los carcinomas pulmonares se ha visto la expresión de otros factores –denominados ectópicos– como la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la vasopresina y la neurotensina (Cuadro 1) (Linnoila y col., 1988; Sun y col., 2009; Li y col., 2016).

Cuadro 1. Factores neuroendocrinos eutópicos y ectópicos del tejido pulmonar (Linnoila y col., 1988).

Factores neuroendocrinos eutópicos del tejido pulmonar	Factores neuroendocrinos ectópicos del tejido pulmonar
Serotonina	ACTH
GRP	Vasopresina
Calcitonina	Neurotensina

La producción de los factores neuroendocrinos favorece el crecimiento continuo de los tumores a través de la estimulación paracrina de las células que las rodean, pues se ha demostrado la actividad oncogénica y mitogénica de muchos de los productos secretados por las células neuroendocrinas, atribuible a los que son generados de forma ectópica o a cambios en las concentraciones de los factores eutópicos (Linnoila y col., 1988; Nelson y col., 2007).

El GRP es un neuropéptido con una potente actividad mitogénica derivada de su capacidad para inducir la activación Elk-1 y por lo tanto expresar a c-fos y c-myc, alterando el ciclo celular, además, puede estimular la vía angiogénica dependiente del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. La neurotensina es un neuropéptido mitogénico cuya capacidad para estimular el crecimiento tumoral ha sido demostrada, principalmente a través de la vía de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK, por sus siglas en inglés) y del aumento de calcio intracelular mediado por la fosfolipasa C, que conlleva a la activación de Akt y c-fos (Nelson y col., 2007).

La serotonina –un neurotransmisor– también es conocida por su asociación con la transformación maligna, y aunque las vías de señalización a través de las cuales actúa son complejas por su habilidad para activar diversos receptores, se ha

demostrado la relación con la oncoproteína Ras, corriente abajo de ciertos receptores de factores de crecimiento (Cuadro 2). Al activar diferentes receptores acoplados a proteína G, estos neuropéptidos también pueden promover la actividad de metaloproteasas de matriz extracelular necesarias para el proceso invasivo del cáncer, así como la actividad de Src, cinasa citosólica que induce la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés), involucrado en la angiogénesis, activación de la ciclina D y c-myc, involucrados en la regulación del ciclo celular (Nelson y col., 2007; Sun y col., 2009; Hu y col., 2015).

Cuadro 2. Factores neuroendocrinos y su actividad carcinogénica (Nelson y col., 2007; Sun y col., 2009; Hu y col., 2015).

Factor neuroendocrino	Actividad	Factor de transcripción o vía de señalización activada
GRP	Mitogénica	Elk-1, c-fos, c-myc
GRP	Angiogénica	NF-κB/IL-6/VEGF
Neurotensina	Mitogénica	PKC/MAPK, c-fos, Akt
Serotonina	Mitogénica	MAPK

Estos factores, por lo tanto, tienen la capacidad de alterar el ciclo celular y de promover la angiogénesis, dos características fundamentales del proceso carcinogénico; de hecho, la transdiferenciación se ha correlacionado con mayores niveles de neovascularización, siendo el número de células con fenotipo neuroendocrino dentro del tumor el único predictor de este proceso en carcinomas prostáticos (Grobholz y col., 2000). Por otra parte, las células epiteliales del tumor que rodean a aquellas con NED suelen tener mayores niveles de la proteína Bcl-2, indicando que el microambiente que generan los factores secretados induce mayor supervivencia celular. Además, las células neuroendocrinas producen citocinas como la IL-8, que es un factor mitogénico y angiogénico para diversos tumores, y en células de cáncer de próstata se ha visto la sobreexpresión del receptor de IL-8 (CXCR1), por lo que su acción paracrina es mediada también por este tipo de



moléculas; incluso, las propias células neuroendocrinas sobreexpresan a CXCR2, otro receptor de IL-8, sugiriendo que también refuerzan el proceso de transdiferenciación mediante un mecanismo autocrino (Sun y col., 2009). Así, las células cancerosas tienen la capacidad de apropiarse de las características de las células neuroendocrinas y logran aprovecharlas para favorecer su crecimiento.

Existen múltiples biomarcadores para detectar la presencia de células neuroendocrinas, principalmente mediante inmunohistoquímica; entre éstos se encuentran la cromogranina A (CgA), la enolasa específica de neuronas (NSE), la sinaptofisina (SYN) y la molécula de adhesión celular neural (NCAM o CD56); también es común el análisis microscópico de las células, pues éstas aumentan su tamaño y desarrollan proyecciones de tipo neurita al pasar por la diferenciación neuroendocrina (Cuadro 3). La CgA ha sido considerada como el marcador más sensible para la detección de NED, ya sea a nivel de tejido o en la circulación; incluso, en pacientes con cáncer de próstata, niveles elevados de CgA han sido correlacionados con una peor prognosis para los pacientes (Li y col., 2016; Oronsky y col., 2017).

El factor de transcripción neuronal de diferenciación neurogénica 1 (NEUROD1) es una proteína que se sobreexpresa en diversos carcinomas neurales/neuroendocrinos agresivos. En condiciones fisiológicas este factor es necesario para la función y el desarrollo de los tejidos neurales, así como la diferenciación de neuronas en los sistemas nerviosos central y periférico. Ahora se sabe que la regulación a la baja de NEUROD1 disminuye la supervivencia, invasión y metástasis de diversas líneas celulares de cáncer de pulmón neuroendocrino, dando cuenta de su importancia en el desarrollo de características agresivas. Se teoriza que la sobreexpresión de NEUROD1 contribuye a la transformación de las células epiteliales hacia células de tipo neuronal; incluso se ha observado que el silenciamiento de esta proteína causa una reversión de las características neuroendocrinas en las células (Osborne y col., 2013). Además, se ha encontrado que la expresión de NEUROD1 es más frecuente en cáncer de próstata

neuroendocrino en comparación con CgA, correlacionándose también con un aumento en los indicadores de malignidad del tumor (Cindolo y col., 2007).

Cuadro 3. Identificación de marcadores neuroendocrinos (Osborne y col., 2013; Ito y col., 2016; Li y col., 2016; Oronsky y col., 2017; Mendieta y col., 2018).

Marcador neuroendocrino	Detección	Técnica empleada
Morfología celular	Presencia de proyecciones tipo neurita	Microscopía
CgA, SYN, NSE, CD56, NEUROD1	Aumento de expresión	PCR o citometría de flujo

La complejidad del proceso de NED ha dificultado su asociación con una prognosis determinada para los pacientes, sin embargo, la presencia de sus marcadores en carcinomas prostáticos ha sido ampliamente correlacionada con un aumento en la metástasis, con el progreso patológico y con menor supervivencia de los pacientes (Nelson y col., 2007; Komiya y col., 2009; Terry y Beltran, 2014).

En el caso del cáncer pulmonar es común la determinación de los niveles séricos de GRP como marcador de la presencia de células neuroendocrinas, y se ha demostrado que los carcinomas con NED son clínicamente más agresivos que los carcinomas clásicos, causando que la supervivencia de los pacientes sea significativamente menor; esto es especialmente cierto cuando el 10 % o más de las células que forman parte del tumor exhiben marcadores neuroendocrinos (Travis, 1991; Hiroshima y col., 2002). Para el cáncer de próstata, se ha demostrado peor prognosis desde porcentajes tan bajos como el 1 % de las células tumorales con este fenotipo, resaltando la relevancia del proceso de transdiferenciación neuroendocrina y el impacto que ésta tiene sobre la esperanza de vida de los pacientes (Hiroshima y col., 2002). Asimismo, se sabe que, en líneas celulares de cáncer de pulmón, la adquisición de características neuroendocrinas se traduce en mayor supervivencia celular, mayor capacidad de invasión y metástasis, en concordancia con la asociación general en la clínica del cáncer neuroendocrino con diseminación temprana y metástasis frecuente (Osborne y col., 2013).

La transdiferenciación neuroendocrina de las células se puede inducir *in vitro*. Una de las estrategias consiste en utilizar agentes que aumentan los niveles intracelulares de AMP cíclico (AMPc). La activación constitutiva de la cinasa dependiente de AMPc, PKA, resulta en la adquisición del fenotipo neuroendocrino, mediado principalmente a través del factor de transcripción CREB (Figura 2); incluso, la expresión de una versión de la proteína CREB activa constitutivamente es suficiente para inducir el proceso de NED (Hu y col., 2015). En cáncer de próstata se ha demostrado que CREB induce la expresión de diversas proteínas que contribuyen a este proceso; por ejemplo, GRK3, que es una enzima que se encarga de regular algunos receptores acoplados a proteína G, y aunque su participación en el proceso de diferenciación neuroendocrina no ha sido elucidado, se sabe que esta proteína tiene la capacidad de inhibir la acción de supresores tumorales como TSP1 y PAI2, contribuyendo al progreso de la enfermedad (Sang y col., 2016). También se ha demostrado que la activación de CREB aumenta la expresión de EZH2, una enzima encargada de regular a la baja a otras proteínas a través de modificaciones epigenéticas (trimetilación de la lisina 27 en la histona H3); incluso, la sobreexpresión de EZH2 es suficiente para inducir la expresión de marcadores neuroendocrinos en cáncer de próstata, además de que promueve la activación de factores involucrados en el proceso angiogénico que acompaña a la NED (Zhang y col., 2018). La acción de CREB para inducir la expresión de este tipo de proteínas suele ser de manera directa, actuando como un factor de transcripción clásico que se une a los promotores de sus genes, activando entonces su producción. Tal es el caso de EZH2 y GRK3, genes en los que se ha demostrado la capacidad de unión de CREB a su promotor (Sang y col., 2016; Ashok y col., 2020).

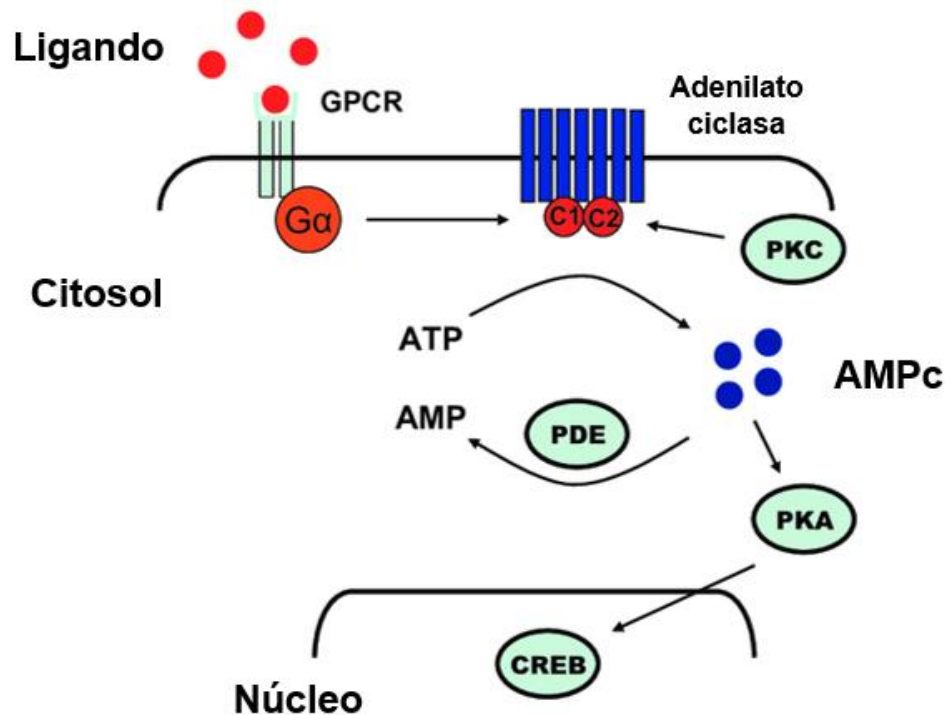


Figura 2. Vía de señalización del AMPc. Modificado de Mattila, 2009.

Otra vía para inducir la transdiferenciación neuroendocrina es mediante la acción de citocinas, entre las que se encuentran la IL-6, IL-1 e IFN- $\gamma$  (Sun y col., 2009); no obstante, la NED inducida por IL-6 es diferente a aquella inducida por agentes que causan un aumento en el nivel intracelular de AMPc, la cual puede ser reversible, pues esta citocina genera un proceso que toma más tiempo y es permanente, mediado por la vía de la enzima fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) a través de Etk/Bmx. Además, otras vías de señalización contribuyen a la adquisición del fenotipo neuroendocrino en las células cancerosas, incluyendo la del transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT-3), la vía de las MAPK y la de PI3K a través de AKT y mTOR (Komiya y col., 2009; Sun y col., 2009; Li y col., 2016).

Un punto importante para considerar sobre las células cancerosas con fenotipo neuroendocrino es que éstas se encuentran en un estado diferenciado post-mitótico o no proliferativo y, además, la transdiferenciación a un fenotipo neuroendocrino puede ser completa, parcial, e incluso reversible, lo cual da cuenta de su plasticidad (Sun y col., 2009; Hu y col., 2015). La baja capacidad proliferativa de las células neuroendocrinas tiene un gran impacto sobre el progreso tumoral, especialmente en

la respuesta a la quimioterapia, que tiene como diana a aquellas células que se multiplican de manera rápida y descontrolada, haciendo quimiorresistentes a las células que adquieren este fenotipo. Las células neuroendocrinas también expresan altos niveles de moléculas con un papel antiapoptótico como la survivina y proteínas de la familia Bcl-2, por lo que parece que la NED provee resistencia al proceso de muerte celular programada (Terry y Beltran, 2014).

Cabe destacar que la transdiferenciación ha sido reconocida como un mecanismo de adaptación a diversos tipos de agentes terapéuticos, es decir, una respuesta que se produce como consecuencia de la presión selectiva ejercida por los tratamientos, dando como resultado un aumento en el número de células con propiedades antiapoptóticas y de resistencia a tratamientos (Terry y Beltran, 2014) ; sin embargo, la presencia de células con el fenotipo neuroendocrino también suele ser identificada desde el momento en el que se hace el diagnóstico. Además, se ha observado que la homeostasis del calcio se ve alterada en estas células, otorgándoles la capacidad de responder y resistir a las diferentes terapias. La reversibilidad del proceso de NED también representa un reto para los pacientes, pues si las células con fenotipo neuroendocrino sobreviven a los agentes anticancerígenos, pueden entonces reanudar con la proliferación y así causar la recurrencia de los tumores; esto, aunado al hecho de que son capaces de estimular el crecimiento aberrante de las otras células epiteliales, contribuye al progreso de la enfermedad (Hu y col., 2015).

#### 1.4 Respuesta inmunitaria innata frente al cáncer

El sistema inmunológico, mediante un proceso denominado inmunovigilancia, monitorea constantemente los diferentes tejidos del cuerpo buscando eliminar células aberrantes, ya sea que se encuentren infectadas por un patógeno o que estén sufriendo un proceso de transformación maligna, evitando que estas últimas lleguen a convertirse en un tumor (Weinberg, 2014).

Diversos tipos celulares juegan un papel en la respuesta inmunitaria que se desencadena frente al desarrollo tumoral. La respuesta inmunitaria innata, desencadenada a partir del reconocimiento de patrones moleculares específicos, se

trata de la primera línea de defensa del cuerpo. La respuesta inmunitaria innata, en general, se compone por las barreras epiteliales, fagocitos como monocitos/macrófagos y células dendríticas, células NK, granulocitos y el sistema del complemento (Abbas y col., 2018)

Los macrófagos son células que forman parte del sistema inmunológico innato y son clave en la homeostasis tisular; estas células derivan de los monocitos, que se encuentran en circulación y se establecen como en los tejidos como macrófagos (Abbas y col., 2018). Los macrófagos tienen la capacidad de reconocer a las células transformadas a través de múltiples receptores de superficie; así, al inicio de la carcinogénesis, los macrófagos se polarizan a un fenotipo proinflamatorio conocido como M1, permitiendo la eliminación de las células más tumorigénicas. Sin embargo, a medida que progresa el tumor, el microambiente puede polarizar a los macrófagos hacia un fenotipo antiinflamatorio M2 que actúa de manera pro-tumorigénica al secretar citocinas como IL-10 y TGF- $\beta$  que normalmente inducen inmunosupresión, alterando la actividad de otras células como los linfocitos T efectoras e impidiendo la maduración de células dendríticas (Adam y col., 2003; Gonzalez y col., 2018).

Los neutrófilos son células del sistema inmunitario innato involucradas en los procesos inflamatorios y se tratan de las primeras células en ser reclutadas al tejido dañado, donde ejercen su función mediante diversos mecanismos; parecido al fenotipo M1/M2 de los macrófagos, se ha propuesto la existencia de subpoblaciones distintas de neutrófilos denominadas como N1 y N2, las cuales tienen papeles anti-tumorigénicos y pro-tumorigénicos, respectivamente. La acción antitumoral de los neutrófilos parece estar mediada principalmente por la producción de defensinas, proteínas que tienen la capacidad de activar a otras células del sistema inmunitario adaptativo, especialmente los linfocitos T citotóxicos. Sin embargo, la respuesta de los neutrófilos en el desarrollo tumoral depende del contexto específico y de la comunicación con otras células del sistema inmunitario, y niveles altos de neutrófilos asociados al tumor suelen relacionarse con una peor prognosis, pues contribuyen a la generación constante de inflamación (Adam y col., 2003; Gonzalez y col., 2018).

Las células NK también forman parte del sistema inmunitario innato y como se describirá más adelante, éstas tienen la capacidad de detectar a las células transformadas o infectadas para luego matarlas, por lo que su papel anti-tumorigénico es sumamente importante en el mantenimiento de la salud, y la infiltración de este tipo de célula en los tumores se correlaciona con una prognosis favorable, resaltando su importancia en el control de la progresión del cáncer (Gonzalez y col., 2018).

Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos especializadas que permiten la comunicación entre la respuesta inmunitaria innata y la adaptativa, adquiriendo esta última tras la exposición a un antígeno específico. Durante la tumorigénesis, las células dendríticas tienen la capacidad de reconocer a las células transformadas, fagocitarlas, viajar a los nódulos linfáticos y activar a los linfocitos T mediante la presentación de un antígeno tumoral, lo que resulta en una respuesta efectora (Adam y col., 2003; Gonzalez y col., 2018). Otras células también pueden actuar como células presentadoras, exponiendo antígenos tumorales como los macrófagos, los linfocitos B o las propias células tumorales (Abbas y col., 2018).

### 1.5 Respuesta inmunitaria adaptativa frente al cáncer

Las células que se encargan de dirigir las respuestas adaptativas del sistema inmunitario son los linfocitos T. Durante las primeras etapas del desarrollo tumoral, estas células son activadas dentro de los nódulos linfáticos por acción de las células presentadoras de antígenos (que suelen ser células dendríticas, y en menor medida, linfocitos B); esta presentación depende de la interacción entre el receptor de las células T (TCR) y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que contiene el péptido procesado por la célula presentadora. La activación de los linfocitos es seguida por su expansión clonal (proliferación) y la subsecuente migración (quimiotaxis) hacia el microambiente tumoral, donde montan una respuesta protectora que favorece la eliminación directa (citólisis/sinapsis inmunológica) e indirecta (citocinas) de las células cancerígenas. Al igual que en el caso de las células

NK, un alto nivel de infiltración de linfocitos T en los tumores se relaciona con prognosis favorables (Adam y col., 2003; Gonzalez y col., 2018).

Los dos tipos principales de linfocitos T involucrados en la respuesta antitumoral son los CD8+ citotóxicos y los CD4+ cooperadores (Th1); estos últimos organizan una respuesta anticancerígena a través de la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , que son moléculas peptídicas responsables de la comunicación intercelular, mediando las interacciones entre los leucocitos y los tejidos. El aumento de las citocinas proinflamatorias promueve la activación de los linfocitos T, la actividad efectora de éstos, aumenta la acción antitumoral de los macrófagos y las células NK, y finalmente incrementa la presentación de antígenos derivados del tumor (Corthay y col., 2005; Munhoz y Postow, 2016).

Los linfocitos Th1 son el componente primario, iniciador y organizador de la respuesta inmunitaria que se genera ante el tumor emergente, siendo reclutados los linfocitos citotóxicos de manera secundaria para completar el proceso de rechazo. Concentraciones elevadas de las citocinas derivadas de las células Th1 (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12) se relacionan con mayor actividad citotóxica, mayor infiltración de linfocitos CD8+ y, por lo tanto, con un mejor pronóstico para el paciente. Incluso, se ha reportado que las células Th1 pueden rechazar la formación de tumores en ausencia de células citotóxicas CD8+, principalmente mediante la activación y el reclutamiento de macrófagos, quienes a su vez crean un ciclo de retroalimentación positiva al presentar antígenos tumorales a los linfocitos, reforzando su activación y aumentando la producción de las citocinas proinflamatorias ya mencionadas (Adam y col., 2003; Corthay y col., 2005; Blank y col., 2016; Munhoz y Postow, 2016).

La efectividad de la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T depende en gran medida de la inmunogenicidad de los antígenos tumorales, es decir, de su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria, así como de la de ausencia de señales que alteren la función de estas células efectoras. Uno de los mecanismos aprovechados por las células cancerosas para esquivar la actividad del sistema inmunitario es el reclutamiento de linfocitos T reguladores (Tregs) y de linfocitos Th2, los cuales tienen



la capacidad de suprimir la activación y la actividad de células como los linfocitos T cooperadores de tipo Th1 (CD4+) y T citotóxicos (CD8+), macrófagos M1, células NK y neutrófilos N1 (Ward-Hartstonge y Kemp, 2017; Gonzalez y col., 2018).

La inmunosupresión mediada por las células Tregs involucra mecanismos tanto dependientes como independientes del contacto célula-célula, siendo estos últimos muy importantes al secuestrar la IL-2 –citocina esencial para la proliferación de células efectoras como los linfocitos T y NK– y al producir moléculas que disminuyen la actividad del sistema inmunitario como TGF- $\beta$ , prostaglandina E2, adenosina, entre otras (Ward-Hartstonge y Kemp, 2017; Gonzalez y col., 2018).

La comunicación e interacciones entre las diferentes células del sistema inmunológico presentes en el microambiente tumoral moldean la respuesta que hace frente a las células transformadas, actuando en conjunto para promover o evitar la formación del tumor. Las células NK, que cuentan con una gran capacidad para atacar a las células tumorales, promueven el reclutamiento de células dendríticas, lo que implica un incremento en la activación de diferentes linfocitos T y por lo tanto resulta en la estimulación de la respuesta efectora. Asimismo, la interacción entre las células NK, los linfocitos T y los macrófagos antitumorales mediante la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en el microambiente tumoral favorece la actividad citotóxica de las células NK y la diferenciación de los linfocitos CD8+ al fenotipo citotóxico, aumenta la capacidad fagocítica de los macrófagos e incrementa el reclutamiento de neutrófilos antitumorogénicos. Cuando los tumores logran escapar de la respuesta antitumoral inicial utilizan diversos mecanismos para inducir tolerancia inmunitaria, secretando moléculas inmunosupresoras y evitando la producción de citocinas estimuladoras necesarias para montar una respuesta por parte de las células NK y de los linfocitos T efectores (Gonzalez y col., 2018).

#### 1.6 Respuesta inmunitaria citotóxica

Tanto el sistema inmunitario innato como el adaptativo son indispensables para mantener bajo control a aquellas células que hayan sufrido un proceso de transformación y amenacen con la formación de un tumor. El mecanismo efector

principal para la eliminación de estas células es el de citotoxicidad, ejecutado por las células NK del sistema innato y por los linfocitos T CD8+ del sistema adaptativo, lo cual depende de la comunicación con los otros tipos de células ya descritas. A pesar de tener mecanismos de reconocimiento muy distintos, el objetivo para estos dos tipos de células es el mismo: matar a las células cancerosas (Weinberg, 2014).

Los linfocitos T CD8+ reconocen a las células transformadas gracias a la presentación de antígenos, donde el TCR interactúa con el complejo formado entre el péptido que se reconoce como extraño, presentado en los nódulos linfáticos por una célula especializada, y el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I). Además, otros ligandos como CD80 que se encuentran en la célula presentadora co-estimulan la activación del linfocito, al igual que las citocinas secretadas por los linfocitos Th1 y la comunicación con las células NK, siendo el correceptor CD3 asociado con el TCR el que permite desencadenar la cascada de señalización necesaria para activar la respuesta efectora una vez que se cuenta con todas las señales apropiadas (Farhood y col., 2019).

Los linfocitos T CD8+, una vez activados, comienzan a multiplicarse y se diferencian en linfocitos T citotóxicos (CTLs) que tienen la capacidad efectora para matar a las células cancerosas, por lo que migran hacia el microambiente tumoral para ejecutar su respuesta. Estos CTLs cuentan con dos mecanismos principales para inducir la citólisis tumoral: exocitosis de gránulos e inducción de apoptosis mediada por el ligando de Fas (FasL). La vía dependiente de exocitosis involucra la producción y el empaquetamiento de la enzima perforina, la cual tiene la capacidad de degradar la membrana plasmática de la célula diana, creando poros en ésta que permiten la entrada de las otras moléculas efectoras empaquetadas, denominadas granzimas. La granzima más importante es la B, una serina proteasa capaz de activar a la caspasa-3, que es una proteína efectora en la ejecución del proceso de muerte celular programada que escinde y activa ADNasas específicas; la granzima B también puede escindir a la proteína Bid, liberando a las proteínas Bax y Bak de sus inhibidores respectivos antiapoptóticos de la familia Bcl-2, permitiendo un cambio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial seguido por la liberación del citocromo

c al citoplasma, conduciendo a la activación de la caspasa-9 vía apoptosoma; estos procesos dentro de la célula cancerosa conducen eventualmente a su muerte (Lieberman, 2010; Farhood y col., 2019).

La segunda vía de acción citolítica implica la expresión de FasL por parte del linfocito, mismo que interacciona con el receptor Fas en la célula cancerosa, conduciendo al ensamblaje del complejo de señalización inductor de muerte que activa a la caspasa-8, que actúa de la misma forma que la granzima B, escindiendo a Bid y procesando la caspasa-3, conduciendo a la muerte celular. Finalmente, los CTLs producen IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , que inducen directamente una respuesta citotóxica mediante receptores de muerte y estimulando al mismo tiempo a otras células del sistema inmunológico (Lieberman, 2010; Farhood y col., 2019; Rosenberg y Huang, 2018). Puesto que los linfocitos T forman parte del sistema inmunitario adaptativo, una vez que el cuerpo se libera de las amenazas, se produce una contracción de las células CD8+ efectoras, dejando únicamente a una pequeña subpoblación de linfocitos de memoria antígeno-específicos que tienen la capacidad de generar una respuesta más rápida y potente ante el antígeno en caso de volverlo a reconocer (Halle y col., 2017).

Las células NK comparten muchas características con los linfocitos T CD8+, empezando por su desarrollo; aunque inicialmente se pensaba que las NK maduraban únicamente en la médula ósea, ahora se sabe que también lo hacen en órganos linfoides secundarios, como los nódulos linfáticos (Abel y col., 2018). Sin embargo, en su caso no dependen de la presentación de antígenos por parte de otras células especializadas, además no existe un solo receptor que domine en el reconocimiento de las células transformadas –como el TCR de los linfocitos– sino que las células NK cuentan con una serie de receptores tanto estimuladores como inhibidores que les permite percibir y responder al ambiente específico, reconociendo directamente los marcadores de transformación presentes sobre la superficie de las células cancerosas. El balance entre la activación de receptores estimuladores e inhibidores, así como la integración de estas señales, es lo que determina el resultado final y la actividad de las células. El modelo de activación de las células NK más caracterizado es aquel denominado como “*missing-self*”, el cual describe que

las células NK se inactivan cuando reconocen al MHC-I; puesto que muchas células que atraviesan un proceso de transformación disminuyen o pierden la expresión del MHC-I, que es el complejo necesario para activar a los linfocitos T citotóxicos, las células NK tienen la capacidad de reconocer esta ausencia, conduciendo a la activación de la respuesta citotóxica. Sin embargo, se sabe que la mera ausencia del MHC-I no es suficiente para activar a las células NK, sino que requieren de señales adicionales a través de sus receptores de activación para poder generar una respuesta adecuada, mismas que usualmente son proporcionadas por moléculas cuya expresión se induce por estrés celular, modelo denominado como “*altered-self*” o “*induced-self*” (Rosenberg y Huang, 2018; Huntington y col., 2020).

La activación de las células NK también puede ser dependiente de anticuerpos, pues cuentan con un receptor para la fracción cristalizable (Fc) de éstos, cuyo reconocimiento conlleva a la muerte de la célula marcada, sin embargo, este mecanismo sigue siendo poco entendido en el caso del cáncer pues, aunque se sabe que los linfocitos B participan en la respuesta generada ante la presencia de una neoplasia, éstos han sido asociados generalmente con un papel pro-tumoral (Gonzalez y col., 2018; Rosenberg y Huang, 2018).

Resaltando la importancia de la comunicación que se desarrolla dentro del microambiente tumoral entre las diferentes células del sistema inmunitario, se sabe que la presencia de ciertas citocinas es suficiente para activar la respuesta efectora de las células NK, aunque se ha propuesto también que este mecanismo funciona en conjunto con el reconocimiento directo de las células transformadas mediado por receptores. Estas células, al igual que las CTLs tienen la capacidad de inducir citólisis directamente al exocitar los gránulos que contienen las enzimas perforinas y granzimas, que actúan mediante los mecanismos descritos anteriormente. Las células NK expresan de manera constitutiva y abundante a los componentes de estos gránulos, lo que permite producir una respuesta eficaz y veloz tan pronto se reconoce a la célula transformada; además, producen quimiocinas como la IL-8 que atraen linfocitos efectores, citocinas efectoras tipo Th1 (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) que fortalecen la respuesta inmunitaria antitumoral, así como algunas directamente involucradas en la

inducción de la muerte celular, como la proteína TRAIL, que al ser reconocida por los receptores de muerte celular desencadena un proceso apoptótico coordinado por el complejo de señalización inductor de muerte, que como se describió en el caso de los CTLs, conduce a la activación de la caspasa-8 y conlleva a la apoptosis (Lieberman, 2010; Abel y col., 2018; Huntington y col., 2020).

Generalmente estos dos mecanismos ocurren simultáneamente, permitiendo que las células NK causen la muerte de un número reducido de células mediante contacto directo por la acción de los gránulos, formando una sinapsis inmunológica y al mismo tiempo amplificando drásticamente la citólisis al secretar los ligandos de muerte celular; sin embargo, la secreción de altos niveles de moléculas inductoras de apoptosis puede ser dañina para el tejido sano en cuestión, mientras que el contacto sináptico que se forma entre las células citotóxicas y las células cancerosas permite una acción dirigida y específica en contra de ellas, tanto en el caso de los CTLs como de las NK (Uzhachenko y Shanker, 2019).

Las células NK son sumamente importantes para el establecimiento de una respuesta temprana frente a las células transformadas, y a pesar de la respuesta rápida que las caracteriza y de su común clasificación como parte del sistema inmunitario innato, se sabe que también poseen ciertas cualidades del sistema adaptativo, teniendo la capacidad de generar una respuesta más robusta ante la segunda exposición al mismo antígeno, lo que representa un tipo de memoria específica de antígeno (Rosenberg y Huang, 2018).

La cooperación entre las células NK y los CTLs es necesaria para deshacerse adecuadamente del tumor en desarrollo, evitando la formación de células cancerosas que puedan escapar del sistema inmunitario. Se sabe que la actividad antitumoral de ambas células incrementa cuando una está en presencia de la otra, y esto se puede explicar por la producción de citocinas estimuladoras (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) que activan a otras células del sistema, y debido a que la acción de ambas células es complementaria, siendo las NK responsables de inducir la muerte de las células deficientes de antígenos, y los CTLs encargadas de lisar a las células que expresan

antígenos tumorales específicos reconocibles por el TCR, colaborando para que un tipo de célula citotóxica elimine a aquellas que surgen por la presión selectiva de la otra (Uzhachenko y Shanker, 2019).

Tanto los linfocitos T como las células NK forman parte de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés), que constan de un grupo de células con un único núcleo redondo, incluyendo también a los monocitos y a los macrófagos, siendo estas las principales células involucradas en la inmunidad del cuerpo (Pourahmad y Salimi, 2015).

### 1.7 Relación entre NED y el sistema inmunitario

Múltiples factores secretados por las células neuroendocrinas tienen la capacidad de actuar como inmunomoduladores, sustancias que alteran las funciones del sistema inmunológico –estimulándolo o suprimiéndolo (NCI, 2021a). Se conoce el efecto inmunomodulador de moléculas como hormonas y neurotransmisores, algunas contribuyendo a la desregulación de la respuesta inmunitaria y a la progresión de diversas patologías (Pavón y col., 2015).

La habilidad de la serotonina (5-HT) –una molécula secretada ubicuamente por las células neuroendocrinas– para estimular o inhibir la inflamación se conoce desde hace décadas. Diferentes células del sistema inmunitario expresan componentes serotoninérgicos que les permiten responder a la estimulación por 5-HT; esta respuesta depende del tipo de célula, de su función, y de su estado de activación, por lo que este neurotransmisor puede regular un gran número de procesos inmunomoduladores. En el caso de los monocitos, se ha reportado que la estimulación con serotonina a través de los receptores 5HT<sub>4</sub> y 5HT<sub>7</sub> puede causar que disminuya la secreción de TNF- $\alpha$ , citocina involucrada en la activación de otras células inmunitarias; y se ha visto que la estimulación con serotonina por el receptor 5HT<sub>2</sub> en macrófagos murinos limita su activación en respuesta a IFN- $\gamma$  *in vitro*, mientras que en el caso de los macrófagos humanos, la señalización por 5-HT resulta en una disminución de la producción de TNF- $\alpha$ , IL-12, y en un aumento de IL-10 y prostaglandina E<sub>2</sub>, en conjunto suprimiendo la respuesta inmunitaria. También se

sabe que el sistema serotoninérgico modula la diferenciación, proliferación y respuesta de los linfocitos T, y se ha reportado que la estimulación con este neurotransmisor puede inhibir la proliferación de los linfocitos mediada por la reducción del receptor de IL-2; además, en ratones se ha observado que la estimulación con 5-HT aumenta la proliferación de las células T, pero reduce la activación de los linfocitos CD4+ y CD8+. Por el contrario, en el caso de las células NK se ha observado que la serotonina puede reducir su inhibición por otras células del sistema inmunitario y evitar la apoptosis; estas respuestas diferenciales pueden explicarse porque son dependientes del contexto celular y de los diferentes receptores que las diversas células expresen (Arreola y col., 2015).

La dopamina (DA) es un neurotransmisor involucrado en diversos procesos fisiológicos que también tiene propiedades inmunomoduladoras. Las células del sistema inmunitario tienen múltiples receptores para esta molécula, que al igual que en el caso de la serotonina, la estimulación diferencial de estas conlleva a respuestas variadas. Se ha observado que en linfocitos T, la DA puede aumentar la producción de IL-10 y disminuir la de IL-12; asimismo, inhibe la liberación de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  al activar los receptores D2 y D3; la activación de los receptores tipo D1 ha demostrado inhibir la proliferación y la citotoxicidad de los linfocitos CD4+ y CD8+ *in vitro*, y se ha demostrado que también puede regular a la baja a las células que producen IFN- $\gamma$ , resultados que apuntan a un papel inmunosupresor de la DA. Por otro lado, la dopamina parece aumentar la capacidad citotóxica de las células NK, especialmente cuando esta actúa a través de los receptores tipo D1, receptores cuya estimulación disminuye la capacidad citotóxica de los linfocitos T, resultados que sugieren inmunoestimulación en el caso de las células NK por parte de la DA (Zhao y col., 2013).

Los reportes mencionados dan cuenta de la complejidad implicada en la inmunomodulación mediada por ciertos factores neuroendocrinos, cuya acción es totalmente dependiente del contexto específico de las células y puede variar de acuerdo con los diferentes receptores que estas expresen.

Recientemente, utilizando una línea celular de adenocarcinoma pulmonar (A549), se demostró *in vitro* que la capacidad citolítica de un modelo de linfocitos T (células Jurkat) disminuye sustancialmente cuando se enfrentan a células cancerosas previamente transdiferenciadas a un fenotipo neuroendocrino; incluso, someter a los linfocitos al medio de cultivo recolectado de las células tipo neuroendocrinas alteró la viabilidad y la proliferación de los CTLs, sugiriendo que la inmunomodulación se llevaba a cabo a través de los múltiples factores secretados por las células cuando adquieren el fenotipo neuroendocrino. Asimismo, se observó que los niveles de serotonina producidos por las células con NED aumentaron, mientras que los niveles de dopamina disminuyeron (Mendieta y col., 2018). El aumento en la serotonina, de acuerdo con lo mencionado, podría favorecer la supresión de la actividad de los linfocitos T, mientras que la disminución de la dopamina actuaría en favor de inhibir la actividad citotóxica de las células NK, sin mencionar los otros múltiples factores que pueden secretar las células con un fenotipo neuroendocrino.

Así, la literatura sugiere que los diferentes factores secretados por las células con un fenotipo neuroendocrino que forman parte de un tumor tienen la capacidad de alterar la respuesta que el sistema inmunitario genera en contra de este, contribuyendo, junto con las propiedades no proliferativas de las células con NED que las hacen resistentes a múltiples terapias, al progreso de la enfermedad, a la generación de tumores más agresivos, y, por lo tanto, a una peor prognosis para el paciente.

En este proyecto se utilizaron ratones BALB/c como modelo de estudio para elucidar el efecto de la diferenciación neuroendocrina de las células de adenocarcinoma pulmonar sobre la actividad de las células citotóxicas. Esta cepa de ratón es una de las más utilizadas para investigación de las respuestas inmunitarias. Diversos estudios han demostrado la robustez de las respuestas desencadenadas por este tipo de ratón, incluso siendo más elevadas que en otras cepas de ratones como los C57BL/6, tanto a nivel de producción de citocinas como de maduración y proliferación de células inmunitarias (Trunova y col., 2011; Han y col., 2012; Bleul y col., 2021).



## 2. HIPÓTESIS

La diferenciación neuroendocrina de células de adenocarcinoma pulmonar humano (A549) disminuirá la actividad citotóxica de las células mononucleares de sangre periférica de ratón.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la diferenciación neuroendocrina de las células de adenocarcinoma pulmonar A549 sobre la actividad citotóxica y la proliferación de células mononucleares periféricas de ratón.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Transdiferenciar las células A549 a un fenotipo neuroendocrino A549<sub>NED</sub> con 3-isobutil-1-metilxantina y forskolina (IBMX+FSK).
- Evaluar el efecto de la diferenciación neuroendocrina de células A549 sobre la actividad citotóxica *ex vivo* de células mononucleares de sangre periférica de ratones BALB/c.
- Determinar el efecto de la diferenciación neuroendocrina sobre el perfil de las poblaciones de células inmunológicas [linfocitos T CD4+ y CD8+, células NK (CD335+) y monocitos (CD68+)] en la sangre de los ratones inmunizados.
- Determinar el efecto de la diferenciación neuroendocrina sobre el perfil de citocinas (IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ ) en el suero de los ratones inmunizados.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales

Se emplearon células de adenocarcinoma pulmonar A549/GFP (Cell Biolabs AKR-209), las cuales se cultivaron en medio DMEM (Gibco 11995-065) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biowest S1820) y una solución 1 % de penicilina-estreptomicina (Gibco 15140). Los cultivos se realizaron en placas de cultivo (NEST 703001, 712001) y al alcanzar 80 % de confluencia se realizaron subcultivos empleando una solución de tripsina-EDTA al 0.25 % (Gibco 25200072).

Para la diferenciación, las células fueron tratadas con forskolina (MedChem HY-15371) y 3-isobutil-1-metilxantina (Sigma 28822-58-4).

La extracción de ARN y síntesis de ADN complementario posterior a los tratamientos se realizaron empleando kits específicos para cada paso (Zymo Research R2050 y ThermoFisher K1621).

Los cambios en la expresión de los marcadores se analizaron por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando oligonucleótidos específicos para cada gen (Cuadro 4), los cuales se sintetizaron con el servicio de Invitrogen Custom Primers. El tamaño de los amplicones se comparó con la escalera de peso molecular BenchTop 100bp DNA Ladder (Promega G8291). La CgA se amplificó empleando los primers reportados por Balboa y col. en 2018, mientras que el resto de los oligonucleótidos fueron de diseño propio.

Cuadro 4. Oligonucleótidos empleados para cuantificar los marcadores neuroendocrinos.

Gen	Secuencia (5' -> 3')	Tm (°C)	Producto (nt)
SYN	Fwd: AGACAGGGGAACACATGCAAG	58.10	123
	Rev: TCTCCTTAAACACGAACCACAG	58.28	
NSE	Fwd: TTGGGGGAACGATGTGTCTG	59.96	137
	Rev: CGCAGGCTTCAGTGAGTACA	60.04	
CgA	Fwd: AACCGCAGACCAGAGGACCA	63.30	102
	Rev: GTCTCAGCCCCGCCGTAGT	63.95	
NEUROD1	Fwd: GCTGCGAGATCCCCATAGAC	60.04	120
	Rev: AAATGGTGAAACTGGCGTGC	59.97	
GAPDH	Fwd: TTGCCCTCAACGACCACTTT	60.11	120
	Rev: TGGTCCAGGGGTCTTACTCC	60.25	

Los ensayos *in vivo* se realizaron empleando un total de 20 ratones BALB/c machos de 10-12 semanas de edad, pesando  $35 \pm 5$  g, los cuales se obtuvieron del bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Estos ratones se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h/12 h, alimentados *ad libitum* con una dieta estándar a base de purina y acceso libre a agua. Fueron confinados en jaulas para ratón de polipropileno con dimensiones de 44x28x15 cm, alojando máximo 5 ratones por jaula (200 cm<sup>2</sup>/ratón) con una humedad relativa de  $55 \pm 5$  % a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C, sin control de ruido. La identificación de los ratones se realizó empleando aretes metálicos, realizando una perforación en la oreja de cada ratón con un horador de metal estéril. El cambio de cama se realizó dos veces por semana, mientras que el cambio de agua se realizó 4 veces por semana. Los ratones se mantuvieron durante todo el experimento dentro del bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. En ningún momento del trabajo de investigación se restringió el movimiento, ni se aisló a los animales, ni fueron privados de alimento. El grado de molestia causado a los animales de investigación entra en las categorías D y E, correspondiente a procedimientos quirúrgicos y a la

administración de agentes peligrosos (células de adenocarcinoma pulmonar A549), respectivamente. La eutanasia se llevó a cabo introduciendo a los ratones a una cámara con dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Los residuos correspondientes al cadáver de los ratones fueron desechados en bolsas específicas para Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI), mismas que son recolectadas bimestralmente a través de la empresa ECOLSERVI Industrial, S. de R.L. de C.V.. Todo el manejo, cuidado y uso de los animales para este protocolo de investigación se ajustaron a las pautas establecidas por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, así como a la Ley Federal de Sanidad Animal (LFSA) y las Guías para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de referencia internacional como aquella proporcionada por el *Institute of Laboratory Animal Resources Council of the National Research Council* de los Estados Unidos de América. Este procedimiento fue aprobado por el comité de Bioética de la Facultad de Química, UAQ (Oficio No. CBQ21/125).

Para extraer las células mononucleares, se empleó el reactivo Histopaque 1083 (Sigma 10831) para la generación de un gradiente de densidad. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante (BD 368171); para las muestras de suero, la sangre se recolectó en microtubos Axygen de 600µL. Una vez separadas, las células mononucleares fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (ThermoFisher 11875093).

Para la citometría de flujo se emplearon anticuerpos anti-CD68 de ratón acoplado a PE-Vio615 (Miltenyi, 130-112-674), anti-CD4 de ratón acoplado a FITC (Miltenyi, 130-120-750), anti-CD8a de ratón acoplado a PerCP-Vio700 (Miltenyi, 130-120-756) y anti-CD335 acoplado a PE (Miltenyi, 130-112-201). Para fijar y permeabilizar las células se utilizó el kit BD Cytotfix/Cytoperm™ *Fixation/Permeabilization Solution Kit* (BD 554714). Los lavados y la resuspensión para el análisis se realizaron en buffer Attune™ NxT Focusing Fluid Filter compuesto por PBS, EDTA y SFB.

Para los ensayos ELISA se utilizaron kits específicos para las citocinas de interés IL-2 (PeproTech 900-TM108), IL-10 (PeproTech 900-TM53) e IFN-γ (PeproTech 900-TM98).

Para la determinación de la viabilidad celular se utilizó bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (ThermoFisher M6494) e isopropanol (JT Baker 9095.2500) o se realizaron conteos manuales de las células con una solución de azul de tripano al 0.4 % (Sigma-Aldrich T8154).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Diferenciación neuroendocrina de células de adenocarcinoma pulmonar

Las células de adenocarcinoma pulmonar (A549) se sembraron a una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células/mL ( $1.5 \times 10^6$  células en 6 mL) en medio DMEM completo (con 10 % suero fetal bovino y antibióticos) dentro de placas de cultivo de 10 mL (p100), donde fueron incubadas durante 24 horas (h) a una temperatura de 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de la incubación se lavó cada placa dos veces con 1500 µL del tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés). Un grupo control de células fue tratado con medio basal DMEM deprivado (sin suplementar suero fetal bovino), mientras que el grupo experimental se trató con medio DMEM deprivado suplementado con los fármacos forskolina (FSK) y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), ambos fármacos a una concentración de 0.5 mM. Los dos grupos fueron tratados por 96 h.

### 4.2.2 Estandarización del número de células neuroendocrinas obtenidas

Terminadas las 96 h del tratamiento, el número de células transdiferenciadas se determinó mediante conteo celular directo empleando solución de azul de tripano al 0.4 % en una cámara de Neubauer. Para esto, se absorbió el medio de transdiferenciación, se lavó dos veces cada placa con 1500 µL de PBS y a continuación se despegaron las células de la placa incubándolas con 2 mL de una solución de tripsina-EDTA al 0.25 % por 5 minutos (min) a 37 °C; terminados los 5 min, se agregó un volumen igual de medio de cultivo completo (2 mL) para desactivar la actividad enzimática de la tripsina. Se tomó una alícuota de la suspensión celular de 100 µL, se le agregó un volumen de 300 µL de azul de tripano (dilución 1:4) y se colocaron 10 µL de esta dilución en la cámara de Neubauer para proceder con el conteo de las células en un microscopio óptico.

#### 4.2.3 Identificación de proyecciones tipo neurita

Para confirmar la diferenciación neuroendocrina de las células A549, éstas fueron analizadas en un microscopio invertido empleando un objetivo de 10x. Se analizó la presencia de proyecciones tipo neurita en las células, lo cual es un indicador del proceso de diferenciación neuroendocrina. Para esto se siguió el procedimiento ya descrito para la transdiferenciación y se tomaron fotos de las células antes (0 h) y después (24, 48, 72 y 96 h) del tratamiento. Las proyecciones tipo neurita fueron cuantificadas con el software Fiji de ImageJ, utilizando el plugin NeuronJ, realizando el trazo de todas las neuritas presentes en 10 células de cada imagen.

#### 4.2.4 Identificación de marcadores neuroendocrinos

La identificación de los marcadores neuroendocrinos NSE, CgA, NEUROD1 y SYN se realizó por medio de la técnica RT-PCR. Para esto, se realizó la extracción del ARN total de las células A549<sub>CTRL</sub> y A549<sub>NED</sub> empleando el kit Direct-zol™ RNA Miniprep de Zymo Research siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sintetizó ADN complementario (ADNc) utilizando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis de Thermo Scientific empleando una combinación de hexámeros aleatorios y oligo (dT)<sub>18</sub> como cebadores. Una vez sintetizado el ADNc, se cuantificó la concentración de ácidos nucleicos y se determinó la calidad de éste en un espectrofotómetro (NanoDrop); después se realizó la amplificación por PCR de los genes CgA, SYN, NEUROD1 y NSE, así como del gen de expresión constitutiva GAPDH como referencia, empleando cebadores específicos para cada gen.

La PCR se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante del reactivo principal, GoTaq Green Master Mix; para cada reacción se emplearon 12.5 µL de Master Mix y se agregó 1 µL de cada primer a una concentración de 10 mM; en cuanto al ADNc, se agregó 1 µL de las muestras que fueron sintetizadas a partir de un total de 500 ng de RNA y finalmente se ajustó el volumen de la reacción con agua libre de nucleasas hasta un total de 25 µL. La reacción consistió en una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguida por 30 repeticiones del ciclo

desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 55 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 60 segundos.

Los productos de la reacción y la escalera de peso molecular se cargaron en un gel de agarosa al 2%, el cual se corrió en una cámara de electroforesis durante 45 minutos con un voltaje de 80 V. Finalmente, el gel se tiñó incubándose en una solución de bromuro de etidio y se reveló en un fotodocumentador con luz UV. Se tomaron fotografías de los geles, mismas que fueron analizadas por densitometría utilizando Image Lab de Bio-Rad.

#### 4.2.5 Obtención de sangre periférica de ratones BALB/c

Para la extracción de células mononucleares, los ratones BALB/c fueron sacrificados por el método de inhalación de dióxido de carbono. Inmediatamente después de la muerte de los ratones, se extrajo la sangre de estos empleando la técnica de la punción cardíaca y la sangre fue recuperada en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante. Como se describió en la sección de Materiales, el manejo, uso y eutanasia de los animales para este procedimiento se ajustan a las pautas establecidas por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, así como a la Ley Federal de Sanidad Animal (LFSA) y las Guías para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de referencia internacional.

#### 4.2.6 Aislamiento y cultivo de células mononucleares de ratón BALB/c

La sangre periférica obtenida de los ratones fue sometida a un gradiente de densidad Ficoll-Paque de 1.083 g/mL, lo que permitió aislar únicamente las células de interés. Para esto, se añadieron 3 mL del reactivo HISTOPAQUE 1083 a un tubo con fondo cónico de 15 mL; después se añadió cuidadosamente un volumen igual de sangre periférica diluida 1:1 en PBS sobre la capa de HISTOPAQUE 1083. El tubo fue centrifugado a 400 x *g* por 30 min a temperatura ambiente en una centrífuga con un rotor de tipo *swing out* o basculante. Al terminar la centrifugación, la capa superior que consistía en el plasma se recolectó para análisis posteriores, mientras que la capa de células formada en la interfase fue aspirada con ayuda de una micropipeta de 1000 µL; esta es la capa que contiene las células mononucleares. Las células



tomadas de la interfase fueron transferidas a otro tubo cónico de 15 mL limpio; se añadieron 5 mL de PBS y el tubo se agitó gentilmente por inversión. Después, se centrifugaron las células por 10 min a 250 x g, aspirando y desechando el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en 0.5 mL de PBS, se añadieron 2 mL extra de PBS y se centrifugó por 10 min a 250 x g; este paso de lavado se repitió dos veces, realizando la última centrifugación a 200 x g buscando eliminar plaquetas de la suspensión. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 500 µL de medio RPMI-1640 completo (con SFB 10%) para su mantenimiento o para su tinción en citometría.

#### 4.2.7 Cocultivo de PBMCs con células A549<sub>CTRL</sub> o A549<sub>NED</sub>

Para los cocultivos, las células A549 se sembraron a una densidad de  $1.5 \times 10^5$  células/mL en medio DMEM completo dentro de placas de 12 pozos, 24 h después comenzó el tratamiento para la diferenciación a células A549<sub>NED</sub> en un grupo, mientras que el segundo grupo fue tratado únicamente con medio DMEM deprivado, como anteriormente se describió. Pasadas 96 h, las células de adenocarcinoma fueron lavadas con PBS y las células citotóxicas se sembraron de tal forma que se obtuvo una relación 1:2 con respecto a las células A549. Para el caso de las PBMCs pre-activadas, previo al cocultivo, las células mononucleares se incubaron durante 24 horas con PHA-M al 1.5% en RPMI 1640. Todos los cocultivos se mantuvieron durante 24 h en medio RPMI 1640 completo.

#### 4.2.8 Ensayos de viabilidad celular

Al finalizar los cocultivos, se evaluó la viabilidad de las células mononucleares y de las células diana (A549<sub>CTRL</sub> o A549<sub>NED</sub>) de forma independiente mediante un ensayo colorimétrico y mediante conteo celular directo con azul de tripano. Para ésto, se separaron las células A549 de las células citotóxicas absorbiendo el medio (pues las mononucleares no son adherentes), se realizaron dos lavados con PBS y se agregó el reactivo MTT a una concentración de 1 mg/mL dentro de los pozos con las células A549. Las placas se incubaron por 2 h a 37 °C y después los cristales formados se solubilizaron agregando isopropanol; se agitaron las placas durante 30 minutos para

permitir la solubilización total de los cristales formados y se midió la absorbancia de las muestras por espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm.

Para la determinación de la viabilidad de las células mononucleares de ratón, una vez terminado el tiempo de incubación de los cocultivos, las células en suspensión se retiraron pipeteando el medio de cultivo, y una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  se diluyó 1:2 en una solución de azul de tripano y se realizó un conteo celular directo, como se describió anteriormente.

#### 4.2.9 Inmunización de ratones BALB/C

Un total de 12 ratones formaron 3 grupos ( $n=4$ ) (Cuadro 4). El primer grupo fue un control, donde los ratones recibieron una inyección de 100  $\mu\text{L}$  de PBS (vehículo). El segundo grupo correspondió al de los ratones inmunizados con células A549; en este grupo, los ratones recibieron una inyección de  $5 \times 10^5$  células totales en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  de PBS. Finalmente, el tercer grupo correspondió a los ratones inmunizados con células transdiferenciadas a un fenotipo neuroendocrino (A549<sub>NED</sub>); los ratones de este grupo recibieron una inyección de  $5 \times 10^5$  células en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  de PBS. Todas las inyecciones se realizaron por vía intraperitoneal. Las células se prepararon para la inyección de acuerdo con el protocolo descrito por Reuter (2011). Esta inmunización se realizó 2 veces, con una semana entre cada inyección. 7 días después de la segunda inmunización se obtuvo una muestra de sangre a través de la vena de la cola de los ratones para análisis posteriores. Los ratones fueron sacrificados 21 días después de la primera inmunización (14 días después de la segunda inmunización), recuperando la sangre en tubos con anticoagulante y realizando la extracción de células mononucleares descrita anteriormente, conservando la fracción plasmática para la determinación de citocinas en circulación.

Cuadro 5. Grupos de ratones inmunizados.

Grupo	n	Inmunización
1	4	Vehículo (PBS)
2	4	Células A549 <sub>CTRL</sub>
3	4	Células A549 <sub>NED</sub>

#### 4.2.10 Obtención del suero de los ratones BALB/c

Para aislar el suero, se agregaron 200  $\mu$ L de PBS a las muestras de sangre obtenidas después de la segunda inmunización. Estas muestras fueron centrifugadas a 1000 x *g* durante 15 min, recuperando únicamente la fracción sérica (la fracción superior), misma que fue almacenada a -70 °C hasta el momento de los análisis.

#### 4.2.11 Análisis del perfil de poblaciones celulares de los ratones

El análisis del perfil de poblaciones celulares en sangre periférica del ratón se realizó mediante la técnica de citometría de flujo. Las células mononucleares resuspendidas en RPMI se dividieron en dos partes (dos tubos por cada ratón).

Para los antígenos de superficie, las células se agregaron a un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL y se centrifugó el contenido durante 10 min a 300 x *g*, se descartó el sobrenadante y el pellet de células fue resuspendido en 1 mL de buffer para su lavado, volviendo a centrifugar la muestra por 10 min a 300 x *g*. Después, el pellet celular fue resuspendido en 94  $\mu$ L de buffer y se agregaron 2  $\mu$ L de cada anticuerpo (anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD335), diluyendo los anticuerpos en una relación de 1:50 y obteniendo un volumen total de 100  $\mu$ L. Se mezclaron los volúmenes y las muestras se incubaron en oscuridad dentro de un refrigerador (2 a 8°C) durante 10 minutos. Una vez terminado el tiempo de incubación, se lavaron las células agregando 1 mL de buffer y se centrifugaron a 300 x *g* por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 250  $\mu$ L de buffer; posteriormente, se agregaron 250  $\mu$ L de la solución Cytotfix/Cytoperm, incubando a 4°C durante 20 minutos en oscuridad, fijando las células. Terminado el tiempo de incubación, se centrifugaron las células por 5 minutos a 300 x *g* y se realizó un lavado

con 1 mL de buffer. Finalmente, se resuspendieron las células en 500  $\mu$ L de buffer y fueron almacenadas en un refrigerador (2 a 8 °C) hasta el momento de su análisis en el citómetro.

Para el antígeno CD68 intracelular, las células se agregaron a un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL y se centrifugó el contenido durante 10 min a 300 x *g*, se descartó el sobrenadante y el pellet de células fue resuspendido en 1 mL de buffer para su lavado, volviendo a centrifugar la muestra por 10 min a 300 x *g*. Las células se resuspendieron en 250  $\mu$ L de buffer y posteriormente se agregaron 250  $\mu$ L de la solución Cytofix/Cytoperm, incubando a 4°C durante 20 minutos en oscuridad para fijar las células. Terminado el tiempo de incubación, se centrifugaron las células a 300 x *g* por 5 minutos y posteriormente se lavaron dos veces con 1 mL de buffer Perm/Wash™, permeabilizando las membranas. Estas células fijadas y permeabilizadas se resuspendieron en 100  $\mu$ L de buffer Perm/Wash™ adicionado con el anticuerpo anti-CD68 (2  $\mu$ L de anticuerpo en 98  $\mu$ L de buffer) diluido 1:50. Se mezcló y se incubaron las células en un refrigerador (2 a 8°C) durante 10 minutos en oscuridad. Terminando la incubación, se lavaron las células agregando 1 mL de buffer Perm/Wash™ y fueron centrifugadas a 300 x *g* por 5 minutos. El sobrenadante se decantó cuidadosamente. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en 500  $\mu$ L de buffer y se almacenaron en refrigeración y oscuridad hasta su análisis.

Finalmente, se registraron 10,000 eventos por cada muestra en 50  $\mu$ L de volumen por lectura a una velocidad de 100  $\mu$ L/min, empleando el citómetro de flujo Attune NxT de Invitrogen™ (ThermoFisher), excitando los fluoróforos con un láser azul que tiene una longitud de onda de 488 nm. Los datos correspondientes se analizaron y las gráficas se generaron en el software Flow Jo.

#### 4.2.12 Análisis del suero de los ratones

El análisis del perfil de citocinas en suero del ratón se realizó mediante ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), de acuerdo con el protocolo estándar de la técnica en su modalidad conocida como sándwich. Los experimentos se hicieron de la misma forma para cada citocina evaluada, que fueron IL-2, IL-10 e IFN- $\gamma$ .

Para preparar las placas, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo de captura (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a cada pozo en placas de 96 pozos, luego se sellaron y se incubaron 12 h a temperatura ambiente. Terminado este tiempo se removió el anticuerpo por decantación y se lavaron las placas 3 veces utilizando 300  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado (0.05 % Tween-20) por cada pozo. Una vez lavada la placa, se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de buffer de bloqueo (1 % albúmina de suero bovina) a cada pozo y se incubaron las placas durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se lavaron 3 veces utilizando el buffer correspondiente.

Para el ensayo ELISA, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de estándar o de muestra a cada pozo y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 2 h. Al terminar la incubación se lavaron las placas y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo de detección (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), incubando las placas 2 h a temperatura ambiente. Terminando la incubación las placas se lavaron y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de una solución de estreptavidina-HRP (0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), incubando las placas a temperatura ambiente por 30 minutos. Las placas se lavaron y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  del sustrato TMB a cada pozo, incubándolas 20 minutos a temperatura ambiente, permitiendo la formación de una solución de color azul. Finalmente, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de HCl 1M a cada pozo, deteniendo la reacción enzimática y cambiando la solución a un color amarillo. Se analizó la absorbancia en un lector de microplatos a una longitud de onda de 450 nm.

#### 4.2.13 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, reportando los resultados como la media  $\pm$  el error estándar. En los experimentos donde se evaluaron dos grupos se realizó una comparación de medias por la prueba *t* de Student, mientras que en los experimentos donde se compararon tres grupos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido por la prueba de Tukey para la comparación múltiple de medias. Las diferencias con valores de  $p < 0.05$  fueron consideradas como significativas; únicamente en los análisis de citometría se consideraron diferencias con valores de  $p < 0.1$  como significativas por el tamaño reducido de la *n* y la complejidad del modelo. Los análisis se realizaron en Prism 8.0.1 de GraphPad.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Transdiferenciación neuroendocrina de células A549

Las células A549 tratadas con FSK e IBMX 0.5 mM presentaron proyecciones tipo neurita, a diferencia de las células A549 control (Figura 3).

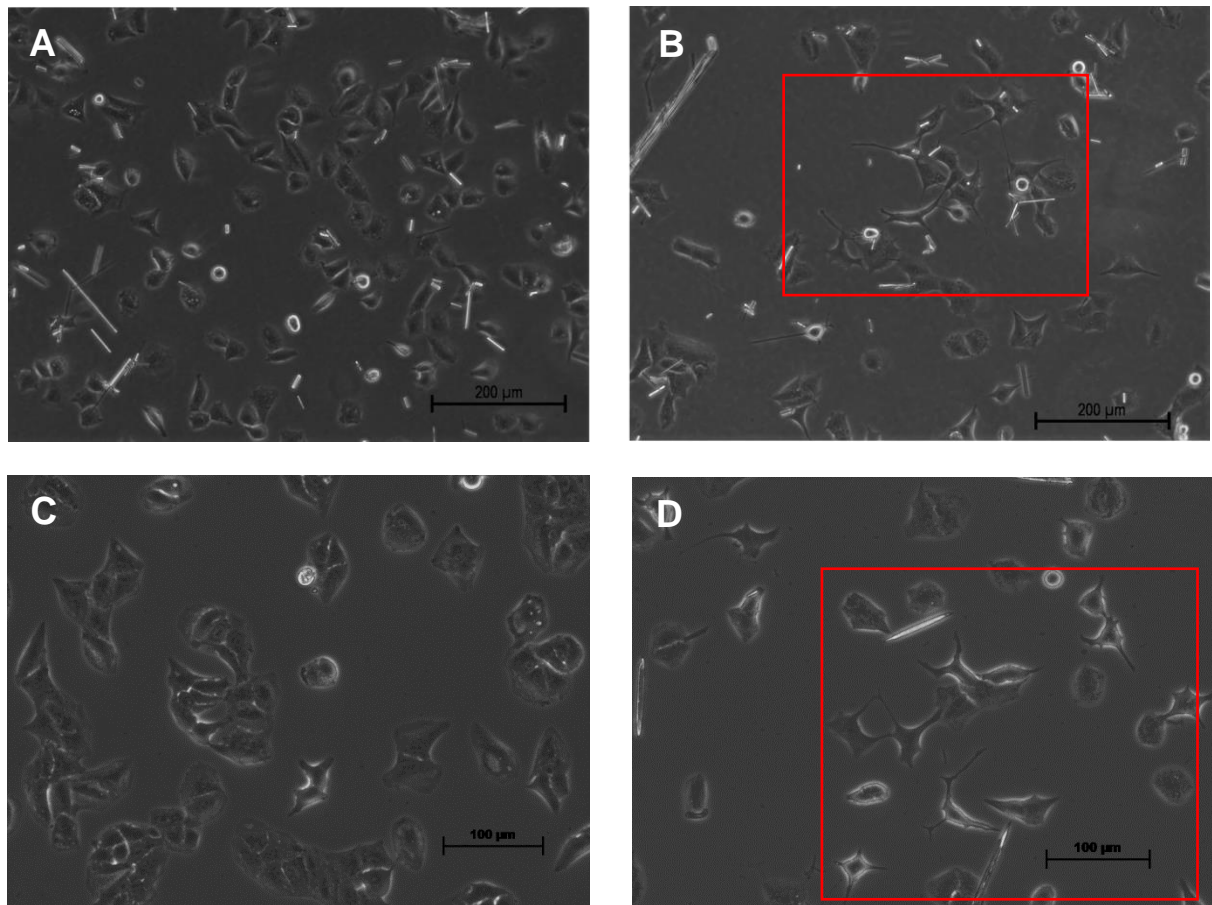


Figura 3. Cambios morfológicos en células A549 tratadas con FSK e IBMX. Células A549<sub>CTRL</sub> sin tratamiento, con morfología epitelial normal (A, C) y células A549<sub>NED</sub> después de 24 (B) y 48 (D) horas de tratamiento con FSK e IBMX, presentando proyecciones tipo neurita. Paneles A y B con aumento 10X; C y D con 20X.

Después de cuantificar el tamaño de las proyecciones tipo neurita en las células A549<sub>NED</sub> y compararlas con aquellas presentes en células sin tratamiento, se encontró que existe una diferencia significativa ( $p=0.0004$ ) entre el tamaño de las proyecciones entre ambos grupos, siendo significativamente más largas las

presentes en las células A549<sub>NED</sub> que aquellas presentes en las células del grupo control (Figura 4).

En promedio, las proyecciones presentes en las células del grupo control fueron de  $14.7 \pm 1.36 \mu\text{m}$ , mientras que en el grupo de células tratadas se encontró que las proyecciones alcanzaron un promedio de  $47.02 \pm 6.15 \mu\text{m}$ .

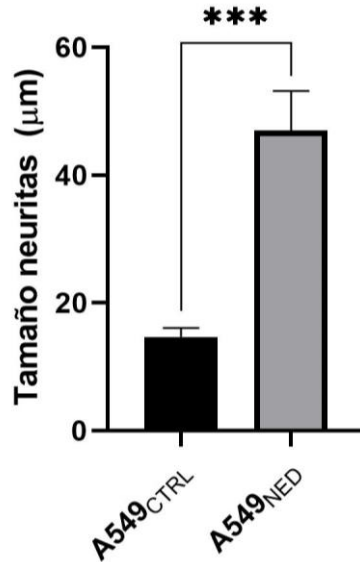


Figura 4. Análisis de las proyecciones tipo neurita. Tamaño de las proyecciones presentes en las células A549<sub>CTRL</sub> y en las células A549<sub>NED</sub> (n=3; \*\*\* p<0.001).

En cuanto a los marcadores de diferenciación neuroendocrina, se realizó un análisis semicuantitativo de la expresión de CgA y SYN. Como se puede observar en la Figura 5, los productos de reacción corresponden a los pesos esperados, en pares de bases (bp, por sus siglas en inglés), para cada gen (SYN, 123 bp; CgA, 102 bp; GAPDH, 120 bp).

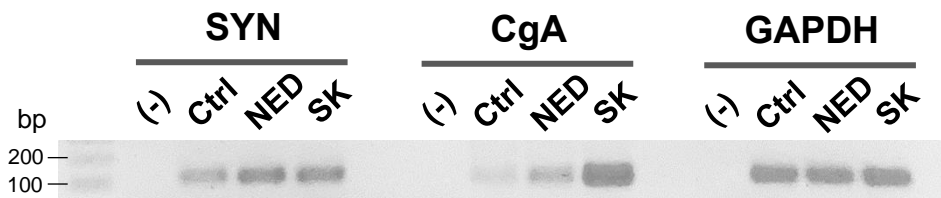


Figura 5. Amplificación de SYN, CgA y GAPDH. Productos obtenidos por RT-PCR a partir del cDNA de células A549 sin tratamiento (Ctrl), A549 tratadas (NED) y el control positivo SK-N-AS de neuroblastoma (SK).

Se realizó la normalización de la expresión de los genes con respecto a la expresión de GAPDH, que es una enzima de expresión constitutiva utilizada como gen de referencia. Posteriormente, se normalizaron los valores de expresión del gen de interés en el grupo NED con respecto al valor de expresión del mismo gen en el grupo control, permitiendo obtener el cambio en la expresión relativa del gen. De esta forma, como se observa en la Figura 6, se encontró que tanto la expresión de SYN como de CgA tuvo un aumento significativo en el grupo de células A549<sub>NED</sub> ( $p=0.0356$  y  $p=0.0467$ , respectivamente).

En promedio, SYN se expresó 1.491 veces más en el grupo de células A549<sub>NED</sub> (Figura 6A), mientras que la CgA se expresó 2.051 veces más en el grupo tratado en comparación con el grupo control (Figura 6B).

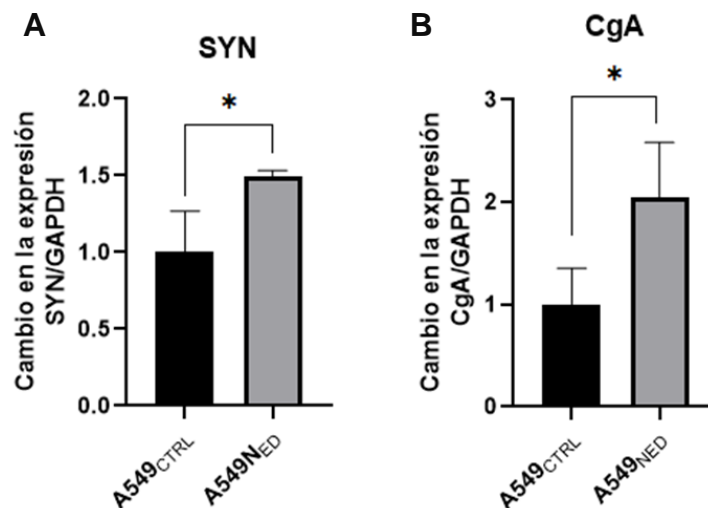


Figura 6. Cambios en la expresión relativa de los marcadores neuroendocrinos. Análisis de los genes de interés SYN (A) y CgA (B) en células A549 sin tratamiento (A549<sub>CTRL</sub>) y A549 tratadas (A549<sub>NED</sub>) (n=3; \*  $p < 0.05$ ).

También se analizó la expresión de NEUROD1, sin embargo, ésta no fue detectada ni en las células A549<sub>CTRL</sub> ni en las células A549<sub>NED</sub>, logrando únicamente su detección en el material genético del control positivo para la identificación de los marcadores, que eran las células SK-N-AS de neuroblastoma (Figura 7).



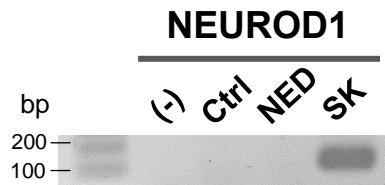


Figura 7. Amplificación de NEUROD1. Productos obtenidos a partir del cDNA de células A549 sin tratamiento (Ctrl), A549 tratadas (NED) y el control positivo SK-N-AS de neuroblastoma (SK).

Se estandarizó el número de células A549<sub>NED</sub> que sobreviven al tratamiento con los fármacos para la transdiferenciación (FSK e IBMX 0.5 mM). Tras haber sembrado 100,000 células, después de 96 horas de tratamiento, sobrevivieron 38,500 células en promedio, es decir, el 38.5% de la población (Figura 8).

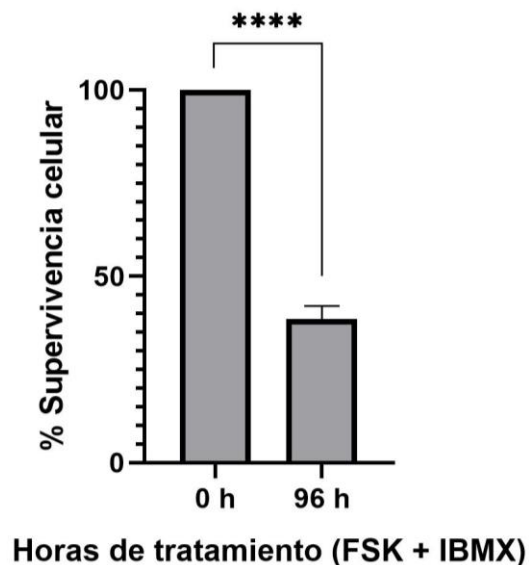


Figura 8. Supervivencia de las células A549 después del tratamiento. Viabilidad celular tras 96 horas de tratamiento con los fármacos FSK (0.5 mM) e IBMX (0.5 mM) (n=3, \*\*\*\* p<0.0001).

## 5.2. Cambios en las poblaciones celulares de los ratones inmunizados

El análisis de las poblaciones celulares del sistema inmunológico de los ratones se realizó por la técnica de citometría de flujo, empleando diferentes anticuerpos para la identificación de fenotipos específicos.

El anticuerpo anti-CD68 permitió identificar a los monocitos, células que después de circular a través de la vasculatura se establecen en los tejidos como macrófagos. El análisis mostró que en los ratones que fueron inmunizados con células A549<sub>CTRL</sub>, el porcentaje de monocitos en circulación aumentó en comparación con el grupo control, mientras que los monocitos en circulación del grupo inmunizado con células A549<sub>NED</sub> se mantuvieron en un estado basal, igual al del grupo control (Figura 9).

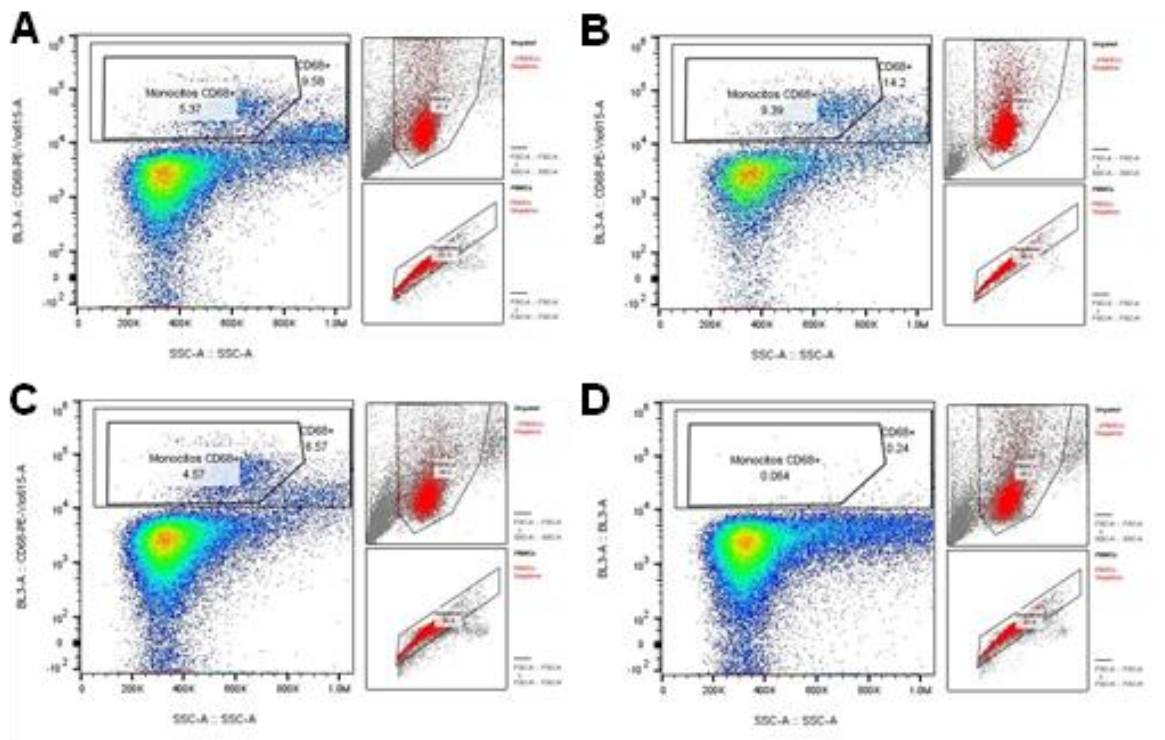


Figura 9. Cambios en el porcentaje de monocitos en células mononucleares de ratón. Se presenta una muestra de ratón inmunizado con PBS (A), una muestra de ratón inmunizado con células A549<sub>CTRL</sub> (B), una muestra de un ratón inmunizado con células A549<sub>NED</sub> (C) y el control negativo (D).

El análisis estadístico demostró que la diferencia entre el grupo inmunizado con células A549<sub>CTRL</sub> y los otros dos grupos es significativa ( $p=0.0045$ ) (Figura 10). En promedio, el porcentaje de monocitos en PBMCs fue de  $4.7 \pm 0.63$  % para el grupo PBS,  $4.8 \pm 0.31$  % para el grupo A549<sub>NED</sub> y  $7.8 \pm 1.76$  % para el grupo A549<sub>CTRL</sub>. Asimismo, el análisis indicó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos inmunizados con PBS y células A549<sub>NED</sub>.

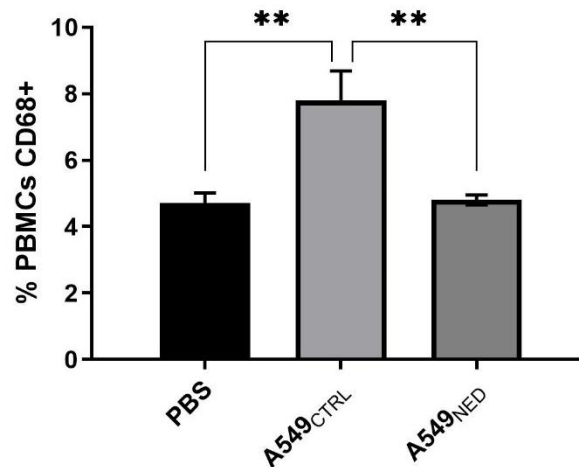


Figura 10. Análisis del porcentaje de PBMCs CD68+ en los ratones inmunizados (n=4; \*\* p<0.01).

Los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8a se emplearon para diferenciar de manera general las poblaciones de linfocitos T entre cooperadores y citotóxicos, respectivamente. Los datos sugieren que en los ratones que fueron inmunizados con células A549\_CTRL y A549\_NED el porcentaje de linfocitos T doble positivos CD4+/CD8a+ aumentó en comparación con el grupo control (PBS) (Figura 11).

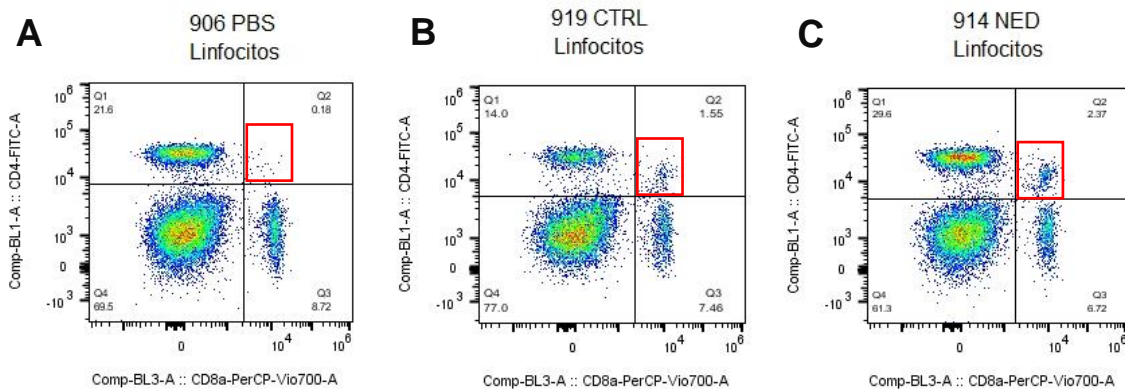


Figura 11. Cambios en el porcentaje de linfocitos doble positivos CD4+/CD8a+. Se presenta una muestra en ratones inmunizados con PBS (A), A549\_CTRL (B) y A549\_NED (C).

El análisis estadístico indicó que la diferencia entre los ratones inmunizados con células A549\_NED y el grupo control era significativa ( $p=0.0988$ ) (Figura 12). El valor promedio de células doble positivas fue de  $0.24 \pm 0.11$  % para el control,  $0.89 \pm 0.47$  % para el grupo A549\_CTRL y  $1.04 \pm 0.54$  % para el grupo A549\_NED.

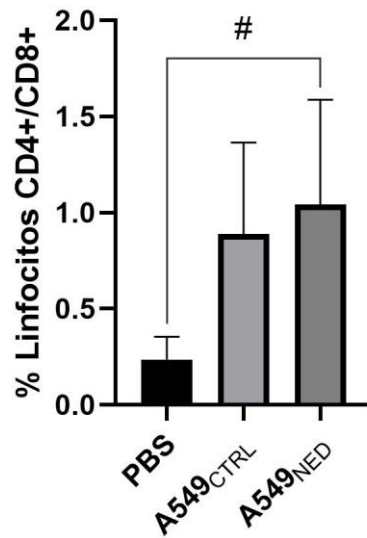


Figura 12. Cambio en el porcentaje de linfocitos doble positivos a CD4 y CD8a (n=4; # p<0.1).

De la misma manera, se realizó un análisis para determinar el cambio en el porcentaje de linfocitos CD4+. Las gráficas generadas sugieren que en los ratones que fueron inmunizados con células A549<sub>CTRL</sub> el porcentaje de linfocitos T CD4+ disminuyó en comparación con el grupo control (PBS) y A549<sub>NED</sub> (Figura 13).

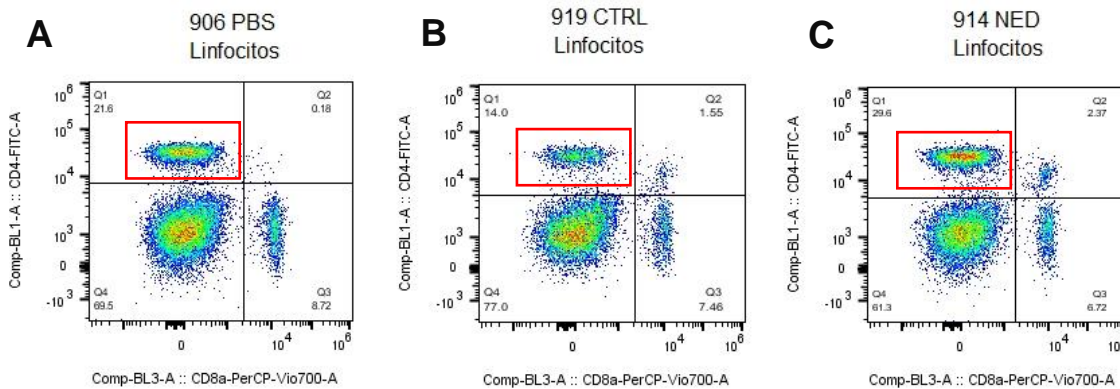


Figura 13. Cambios en el porcentaje de linfocitos CD4+. Se presenta una muestra en ratones inmunizados con PBS (A), A549<sub>CTRL</sub> (B) y A549<sub>NED</sub> (C).

El análisis estadístico mostró que existió una diferencia significativa entre los ratones inmunizados con células A549<sub>CTRL</sub> y los ratones inmunizados con células A549<sub>NED</sub> (Figura 14). El grupo inmunizado con PBS tuvo un promedio de  $18.63 \pm 4.38$  % linfocitos CD4 positivos, mientras que el grupo inmunizado con A549<sub>CTRL</sub> tuvo un promedio de  $11.64 \pm 1.22$  % y finalmente,  $22.2 \pm 3.23$  % para el grupo A549<sub>NED</sub>.

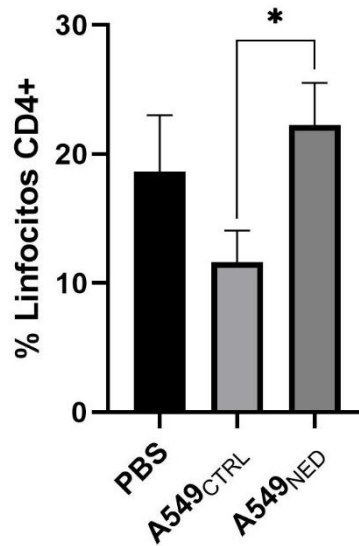


Figura 14. Cambio en el porcentaje de linfocitos T CD4+ en los ratones inmunizados (n=4; \* p<0.05).

A continuación, se realizó un análisis para determinar el cambio en el porcentaje de linfocitos CD8a+ (Figura 15).

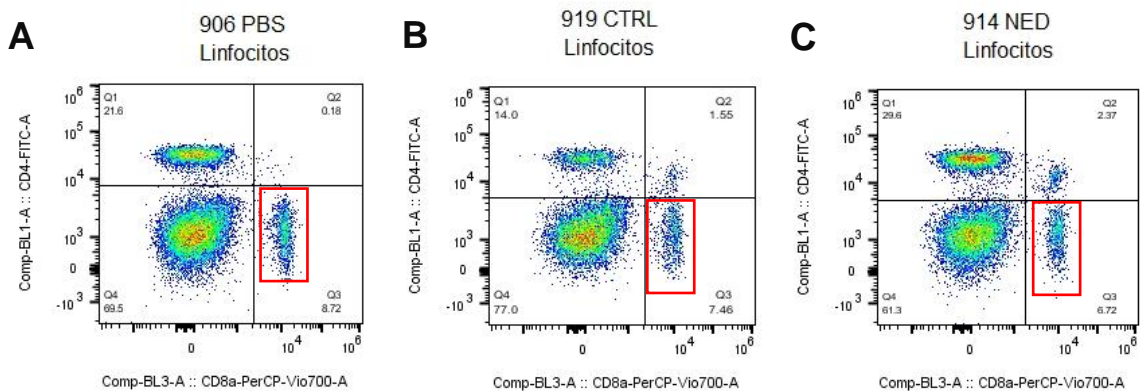


Figura 15. Cambios en el porcentaje de linfocitos CD8a+. Se presenta una muestra en ratones inmunizados con PBS (A), A549\_CTRL (B) y A549\_NED (C).

El análisis estadístico indicó que no existieron diferencias significativas entre las medias de los porcentajes de linfocitos positivos a CD8a (Figura 16). En este caso no se aprecia alguna tendencia en los datos, siendo el promedio del porcentaje de células CD8+ de  $8.49 \pm 1.32$  % para el grupo PBS,  $7.73 \pm 0.77$  % para el grupo A549\_CTRL y  $8.49 \pm 0.64$  % para el grupo A549\_NED.

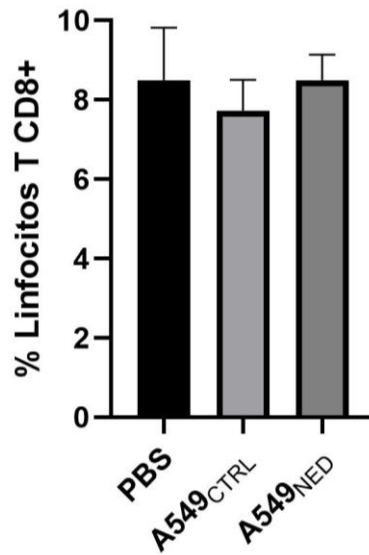


Figura 16. Cambio en el porcentaje de linfocitos T CD8a+ en los ratones inmunizados (n=4).

Finalmente, empleando un anticuerpo anti-CD335, fue posible determinar el porcentaje de células NK presente en las células mononucleares de los ratones. Los datos obtenidos muestran que en los ratones que fueron inmunizados con células A549\_CTRL y A549\_NED el porcentaje de células NK aumenta en comparación con el grupo control inmunizado con PBS (Figura 17).

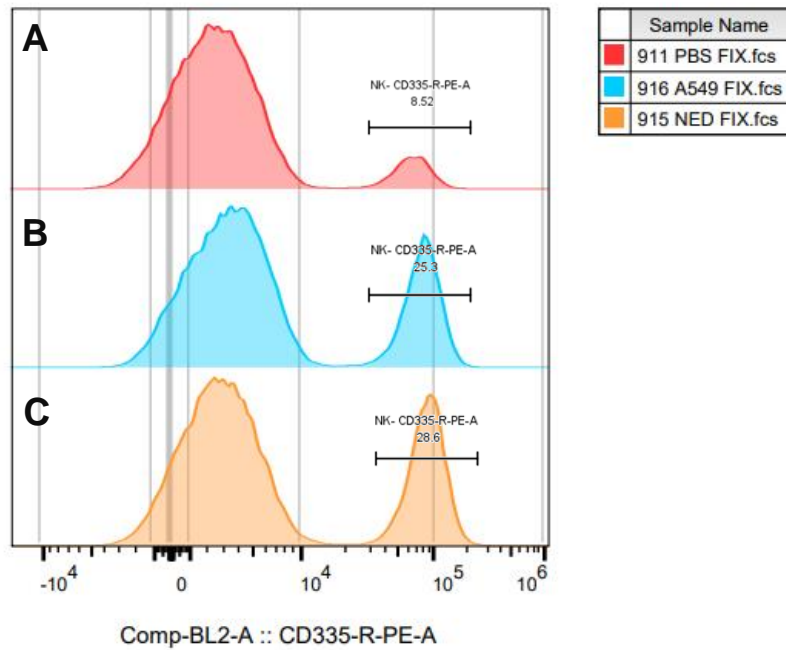


Figura 17. Cambios en el porcentaje de células NK. Se presenta una muestra de ratón inmunizado con PBS (A), una muestra de ratón inmunizado con células A549<sub>CTRL</sub> (B) y una muestra de un ratón inmunizado con células A549<sub>NED</sub> (C).

El análisis estadístico indicó que las diferencias entre ambos grupos inmunizados con células y el grupo control eran significativas (Figura 18). El porcentaje de células positivas a CD335 aumentó en los grupos inmunizados con células A549 independientemente de su diferenciación, siendo el promedio de  $13.12 \pm 2.42$  % para el grupo PBS,  $20.82 \pm 4.01$  % para el grupo A549<sub>CTRL</sub> y  $22.27 \pm 4.25$  % para el grupo A549<sub>NED</sub>, representando en este último grupo un mínimo aumento en comparación con el de las células A549<sub>CTRL</sub>.

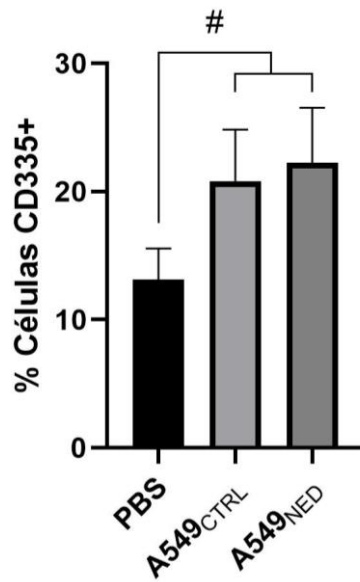


Figura 18. Cambio en el porcentaje de células CD335+ en los ratones inmunizados (n=4; # p<0.1).

Para monitorear el estado de salud de los ratones, se registró su peso durante diversos momentos a través del experimento después de la primera inmunización (Figura 19).

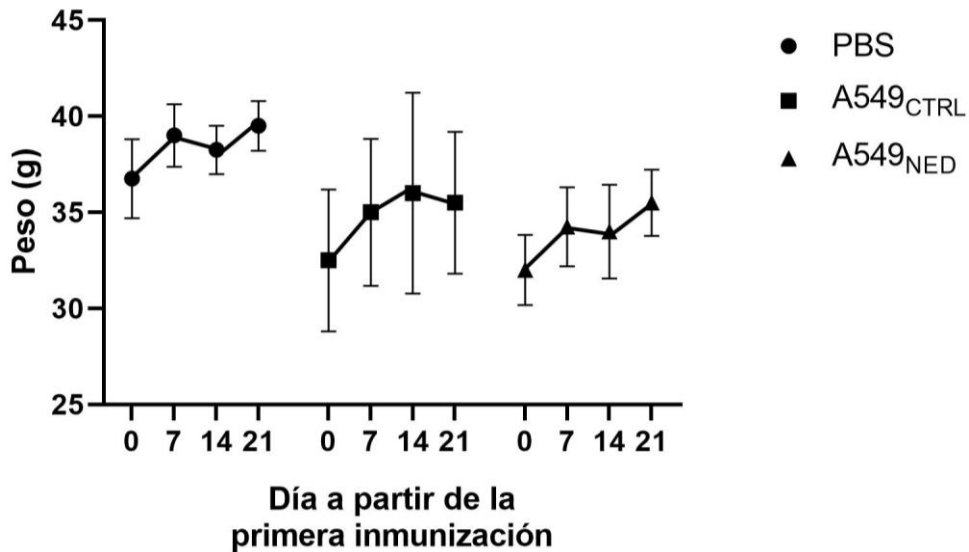


Figura 19. Peso promedio de los ratones a través del experimento (n=4).



No se registraron cambios anormales en el peso de los ratones a través de los días. Después de un análisis estadístico, se encontró que no existieron diferencias significativas en el aumento o pérdida de peso entre los diferentes grupos en ningún punto del experimento.

### 5.3. Cambios en el perfil de citocinas de los ratones inmunizados

El análisis del perfil de citocinas en suero y plasma de los ratones se realizó por la técnica de ELISA tipo sándwich.

Para la identificación de un perfil proinflamatorio se midieron las citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$ , mientras que para la determinación de actividad antiinflamatoria se midieron los niveles de la citocina IL-10.

En el caso de la IL-2, 14 días después de la primera inmunización se puede observar un aumento de la citocina en los grupos inmunizados, con un promedio de 77.51 pg/mL para el grupo control (PBS), 117.48 pg/mL para el grupo inmunizado con células A549<sub>CTRL</sub> y 103.67 pg/mL para el grupo inmunizado con células A549<sub>NED</sub> (Figura 20A). 21 días después de la primera inmunización, existió una diferencia significativa ( $p=0.0165$ ) entre la concentración de IL-2 en el grupo inmunizado con PBS (106.66 pg/mL) y el grupo inmunizado con células A549<sub>CTRL</sub> (260.07 pg/mL); a pesar de que también se presentó un aumento en el grupo inmunizado con células A549<sub>NED</sub> (169.95 pg/mL), el análisis estadístico indicó que este valor no era significativamente diferente del control (Figura 20B).

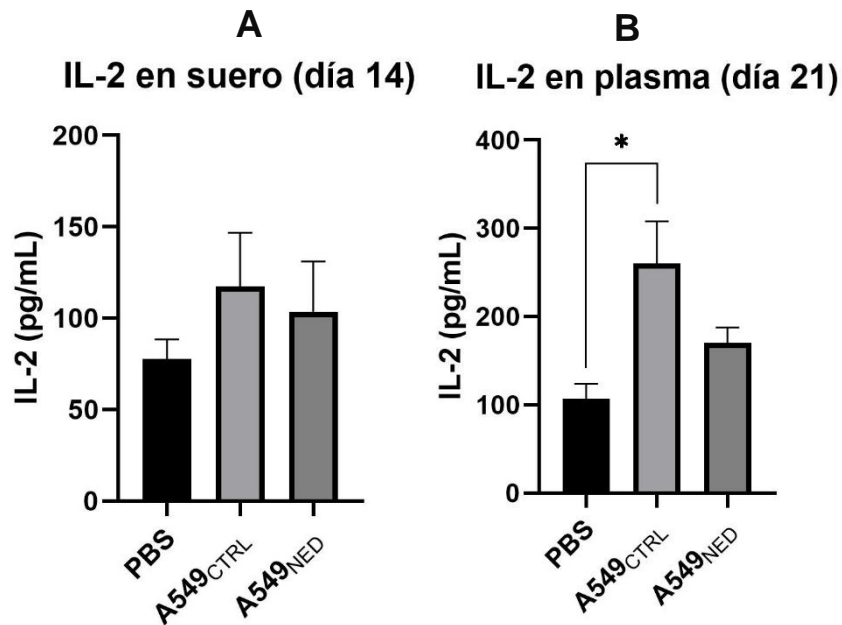


Figura 20. Niveles de IL-2 en la vasculatura de los ratones inmunizados. Se muestran los valores en pg/mL a los 14 (A) y 21 (B) días después de la primera inmunización (n=4, \* p<0.05).

En la Figura 21 se muestra la curva estándar generada para el cálculo de las concentraciones de IL-2 en las muestras analizadas.

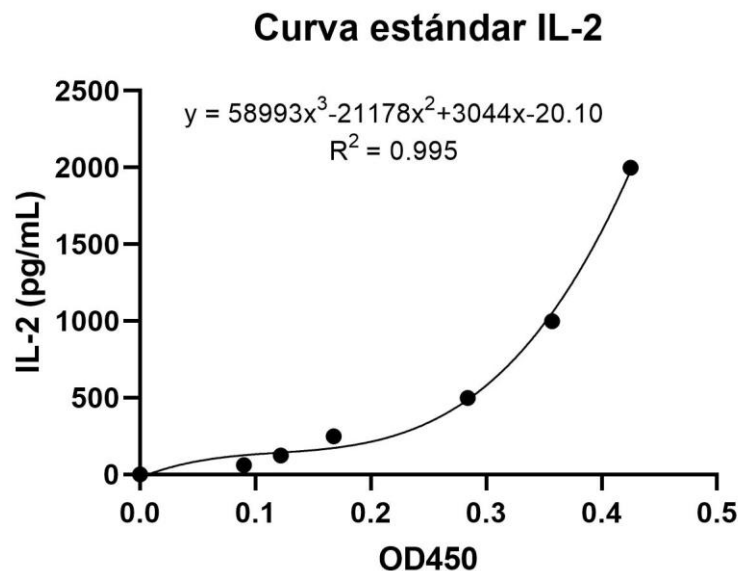


Figura 21. Curva estándar para IL-2 generada en el ensayo ELISA. Se muestra la ecuación de la línea y el valor de  $R^2$  de la regresión. Se graficó la concentración de IL-2 en pg/mL en el eje de las ordenadas (y) contra el valor de la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm (OD450) en el eje de las abscisas (x).

En el caso del IFN- $\gamma$ , 14 días después de la primera inmunización se puede observar que no hay diferencias notorias entre los diferentes grupos de ratones, con un promedio de 895.07 pg/mL para el grupo control (PBS), 848.23 pg/mL para el grupo inmunizado con células A549<sub>CTRL</sub> y 832.59 pg/mL para el grupo inmunizado con células A549<sub>NED</sub> (Figura 22A). Finalmente, 21 días después de la primera inmunización se presentó un ligero aumento en la concentración de IFN- $\gamma$  en los ratones inmunizados con células A549<sub>CTRL</sub>, con un promedio de 1041.02 pg/mL, en comparación con el grupo control (PBS) que tuvo un promedio de 916.52 pg/mL; en el caso del grupo inmunizado con células A549<sub>NED</sub> también se pudo observar un pequeño aumento en la concentración de proteína con respecto al control, con 1056.38 pg/mL (Figura 22B).

El análisis estadístico para esta citocina indicó que las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas.

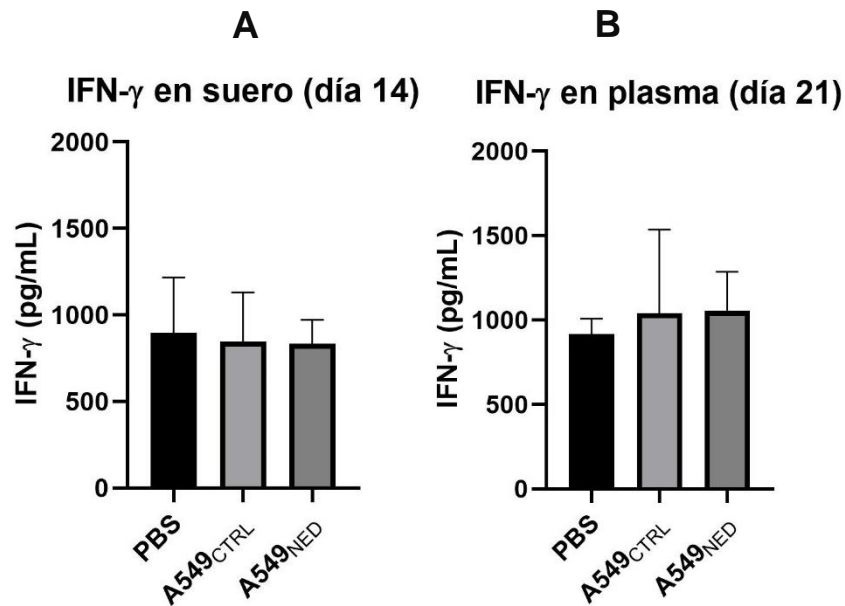


Figura 22. Niveles de IFN- $\gamma$  en la vasculatura de los ratones inmunizados. Se muestran los valores en pg/mL a los 14 (A) y 21 (B) días después de la primera inmunización (n=4).

En la Figura 23 se muestra la curva estándar generada para el cálculo de las concentraciones de IFN- $\gamma$  en las muestras analizadas.

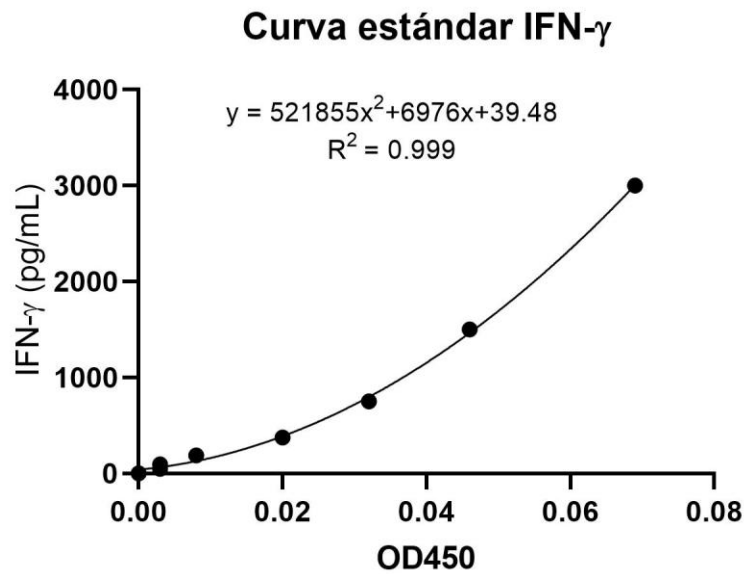


Figura 23. Curva estándar para IFN- $\gamma$  generada en el ensayo ELISA. Se muestra la ecuación de la línea y el valor de  $R^2$  de la regresión.

Para la citocina IL-10, 14 días después de la primera inmunización se puede observar un aumento en el grupo de ratones inmunizados con células A549<sub>CTRL</sub>, con una media de 32.55 pg/mL, en contraste con los grupos control e inmunizados con A549<sub>NED</sub>, que tuvieron medias de 21.20 y 20.12 pg/mL, respectivamente (Figura 24A). A pesar de estas observaciones, el análisis de los datos indicó que no había significancia estadística entre las diferencias. A los 21 días se presentó una disminución en la concentración de IL-10 en el grupo inmunizado con células A549<sub>NED</sub>, que fue de 9.223 pg/mL, en comparación con el grupo control y con el grupo inmunizado con A549<sub>CTRL</sub>, con concentraciones promedio de 22.61 y 32.35 pg/mL, respectivamente; el análisis matemático indicó que las diferencias observadas fueron significativas estadísticamente (Figura 24B).

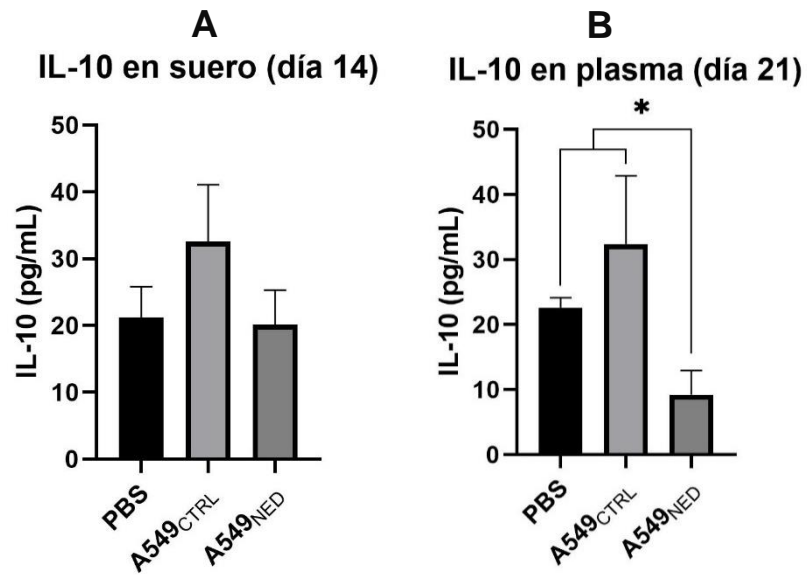


Figura 24. Niveles de IL-10 en la vasculatura de los ratones inmunizados. Se muestran los valores en pg/mL a los 14 (A) y 21 (B) días después de la primera inmunización (n=4, \* p<0.05).

En la Figura 25 se muestra la curva estándar generada para el cálculo de las concentraciones de IL-10 en las muestras analizadas.

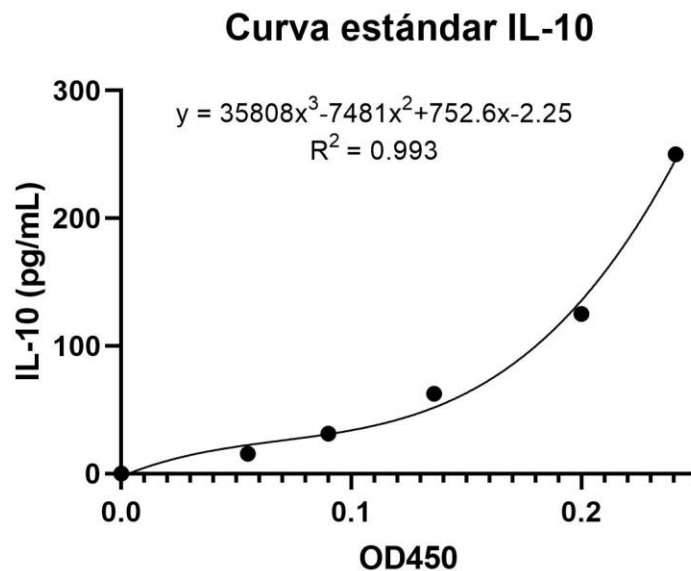


Figura 25. Curva estándar para IL-10 generada en el ensayo ELISA. Se muestra la ecuación de la línea y el valor de  $R^2$  de la regresión.

#### 5.4. Cocultivo de células mononucleares con células A549<sub>CTRL</sub> o A549<sub>NED</sub>

Al someter las células A549<sub>CTRL</sub> a un cocultivo con células mononucleares de sangre periférica de ratón pre-activadas con fitohemaglutinina (PHA) en una relación 1:2 (A549:PBMC), la viabilidad celular de las células A549 disminuyó 21.2% en comparación con el control negativo sin cocultivo (Figura 26A). El análisis de los datos mostró que esta diferencia fue significativa estadísticamente ( $p=0.028$ ).

Por otro lado, también se evaluó el cocultivo de células A549<sub>CTRL</sub> con PBMCs sin pre-activar en una relación 1:2, sin embargo, en este caso la viabilidad celular se mantuvo como la del control sin cocultivo (Figura 26A).

En contraste con lo observado en el grupo de células A549<sub>CTRL</sub>, al someter las células A549<sub>NED</sub> a un cocultivo con células mononucleares de sangre periférica de ratón pre-activadas con fitohemaglutinina (PHA) en una relación 1:2 (A549:PBMC), la viabilidad celular de las células A549 no disminuyó en comparación con el control sin cocultivo; incluso, se puede apreciar que las células tuvieron 10.16 % más viabilidad que las células control (Figura 26B). Esto indicó que las PBMC no tuvieron la capacidad de inducir la muerte de las células de adenocarcinoma con un fenotipo neuroendocrino, en comparación con aquellas en su estado no diferenciado. Además, la interacción entre los diferentes tipos de células en el cocultivo de alguna forma promovió la proliferación de aquellas células que permanecieron sin diferenciación terminal.

Finalmente, también se evaluó el cocultivo de células A549<sub>NED</sub> con PBMCs sin pre-activar en una relación 1:2, y en este caso, la viabilidad celular también se mantuvo similar a la del control sin cocultivo, únicamente observando una disminución mínima en la viabilidad con respecto al control, sin diferencia significativa (Figura 26B).

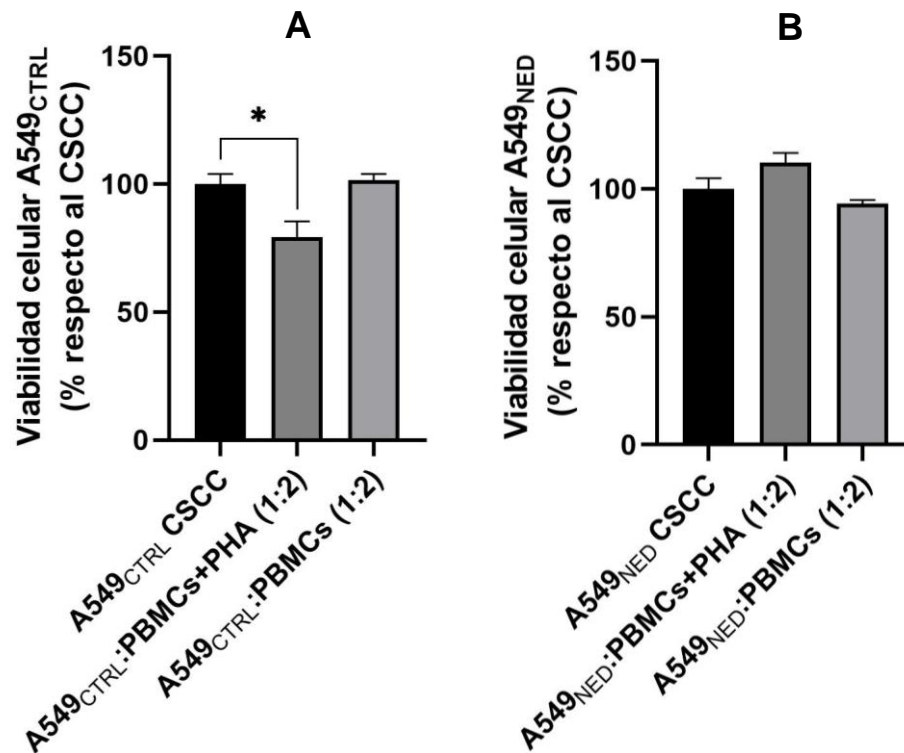


Figura 26. Viabilidad de células A549 después del cocultivo con PBMCs. Se muestra la viabilidad de las células A549<sub>CTRL</sub> (A) y A549<sub>NED</sub> (B) después expresada como el porcentaje con respecto al control (CSCC, control sin cocultivo; PHA, fitohemaglutinina) (n=3, \* p<0.05).

Se determinó la viabilidad de las células mononucleares de ratón después del cocultivo con las células A549. Al someter a las PBMCs a un cocultivo con células A549<sub>CTRL</sub> se pudo observar un aumento de  $36.34 \pm 23.4$  % en el número de PBMCs con respecto al control sin cocultivo (Figura 27A). A pesar del cambio en el porcentaje entre estos dos grupos, el análisis estadístico indicó que las diferencias no fueron significativas.

Al someter a las PBMCs que fueron pre-activadas con PHA a un cocultivo con células A549<sub>CTRL</sub> se pudo observar un aumento de  $111.96 \pm 19.31$  % en el número de PBMCs con respecto al control sin cocultivo, es decir, la población de PBMCs pre-activadas se duplicó en presencia de las células A549<sub>CTRL</sub> (Figura 27B). En este caso, el análisis de los datos indicó que las diferencias sí eran estadísticamente significativas (p=0.0006).

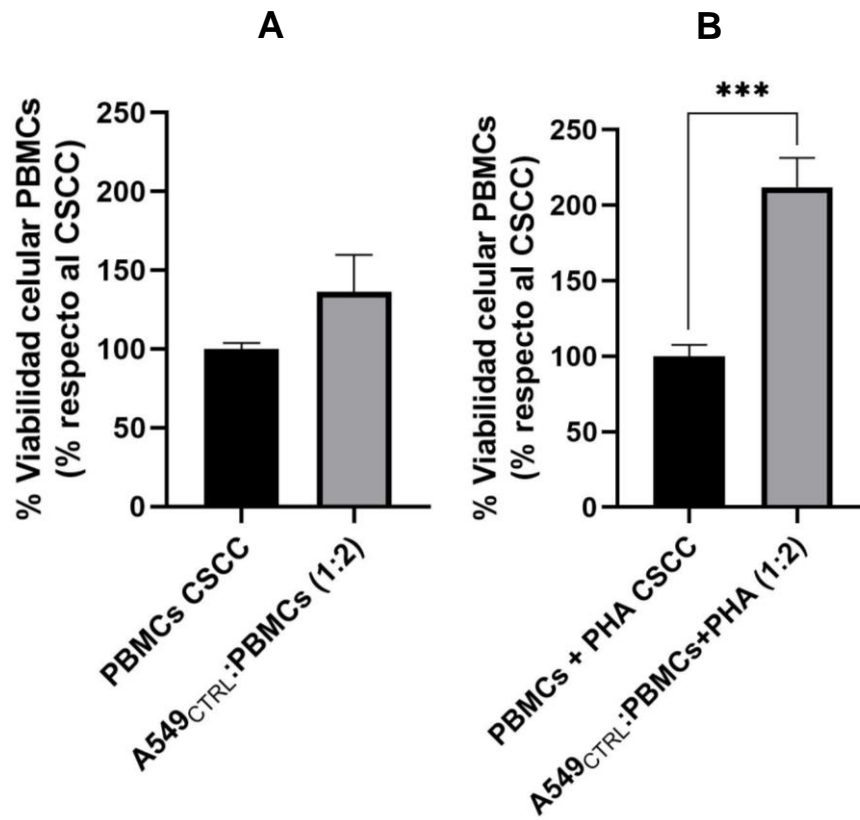


Figura 27. Viabilidad de PBMCs después del cocultivo con A549<sub>CTRL</sub>. Se muestra la viabilidad de PBMCs no tratadas (A) o pre-activadas con PHA (B) después del cocultivo con células A549<sub>CTRL</sub>, expresada como el porcentaje con respecto al control (CSCC, control sin cocultivo; PHA, fitohemaglutinina) (n=3, \*\*\* p<0.001).

En contraste con lo observado en los grupos anteriores, al someter a las PBMCs a un cocultivo con células A549<sub>NED</sub> se pudo observar una disminución del  $15.51 \pm 6.99$  % en el número de PBMCs con respecto al control sin cocultivo, es decir, la población de PBMCs disminuyó en presencia de las células neuroendocrinas (Figura 28A). El análisis estadístico indicó que las diferencias sí fueron significativas (p=0.0329).

Finalmente, al someter a las PBMCs pre-activadas con PHA a un cocultivo con células A549<sub>NED</sub> únicamente se pudo observar una pequeña disminución de la viabilidad, que fue de  $96.11 \pm 12.26$  % con respecto al control sin cocultivo, es decir, la población de PBMCs también disminuyó en presencia de las células A549<sub>NED</sub> (Figura 28B). Sin embargo, en este caso el análisis estadístico indicó que las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas.



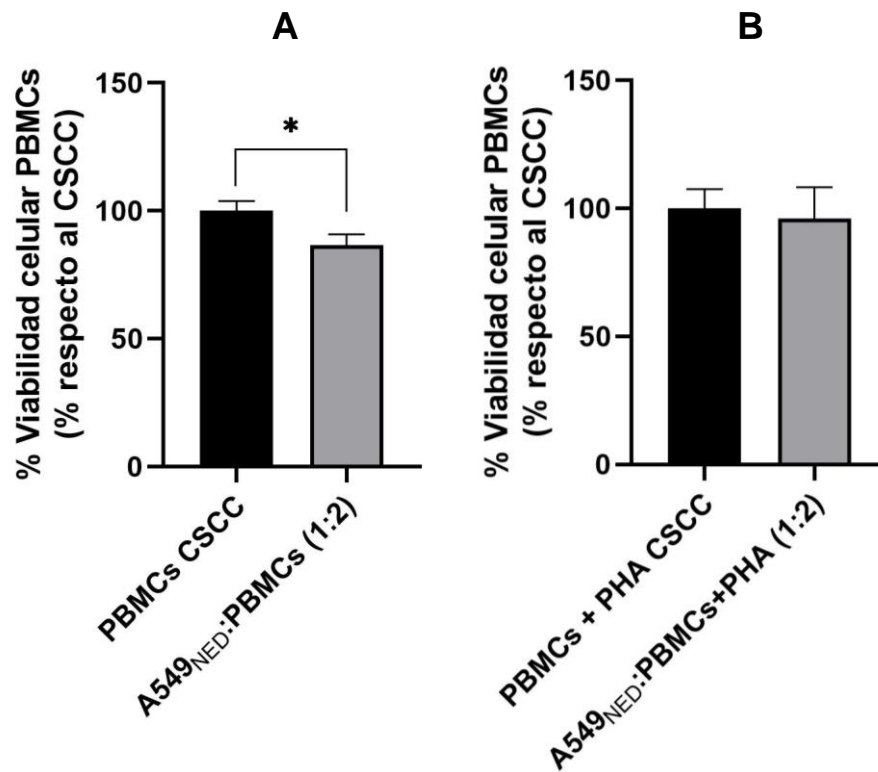


Figura 28. Viabilidad de PBMCs después del cocultivo con A549<sub>NED</sub>. Se muestra la viabilidad de PBMCs no tratadas (A) o pre-activadas con PHA (B) después del cocultivo con células A549<sub>NED</sub>, expresada como el porcentaje con respecto al control (CSCC, control sin cocultivo; PHA, fitohemaglutinina) (n=3, \* p<0.05).

## 6. DISCUSIÓN

El presente trabajo buscó elucidar el efecto de la diferenciación neuroendocrina de células de adenocarcinoma pulmonar sobre la actividad del sistema inmunológico en un modelo de ratón inmunocompetente.

### 6.1. Diferenciación neuroendocrina de células A549

Existen diversas formas de lograr la inducción de un fenotipo neuroendocrino en células epiteliales. En 1994, Bang y col. demostraron en diferentes líneas celulares de cáncer de próstata que la señalización mediada por AMPc causa la diferenciación neuroendocrina de las células. Luego, en el año 2000, Cox y col. evidenciaron que la diferenciación era inducida a través de la activación de PKA, una enzima cuya actividad está regulada directamente por el AMPc. (Cox y col., 2000) Así, los agentes que elevan la concentración de AMPc en las células como la epinefrina, la forskolina, el IBMX, el isoproterenol o el dibutilil AMPc han sido ampliamente utilizados para la inducción de un fenotipo neuroendocrino tanto *in vitro* como *in vivo* en diferentes tipos de líneas celulares (Cox y col., 1999; Deeble y col., 2001; Mariot y col., 2002).

A pesar de que la mayoría de los estudios iniciales para inducir la diferenciación neuroendocrina se basaron en el cáncer de próstata, la identificación de este fenotipo en cáncer de pulmón data de la década de los 80 (Mulshine y col., 1987), y sus implicaciones en la prognosis de los pacientes se ha estudiado desde hace años (Carles y col., 1993; Pelosi y col., 2003).

Asimismo, se ha demostrado que el uso de los agentes que elevan la concentración intracelular de AMPc también induce la diferenciación neuroendocrina en líneas celulares de cáncer de pulmón, tanto de NSCLC como de SCLC (Walker y col., 2006). En este trabajo, se utilizó la forskolina, un agente estimulador de la adenilato ciclasa (la enzima que sintetiza el AMPc), y el IBMX, un agente inhibidor de fosfodiesterasas (enzimas que degradan el AMPc), para inducir la diferenciación neuroendocrina de células A549. Ambos fármacos se emplearon a una concentración de 0.5 mM, basado en la estandarización y optimización realizada por Mendieta y col. en 2018.

Normalmente el fenotipo neuroendocrino en las células se identifica con marcadores como NSE, CgA, SYN y CD56, así como con la formación de proyecciones largas de tipo neurita (Cox y col., 1999; Li y col., 2016). En este estudio se determinó la longitud de las proyecciones tipo neurita y se evaluaron los marcadores CgA, SYN y NEUROD1 para confirmar la adquisición del fenotipo neuroendocrino en las células.

Encontramos que existieron diferencias en el tamaño de las proyecciones entre las células A549<sub>CTRL</sub> y las células A549<sub>NED</sub>, siendo las de éstas últimas significativamente más largas, lo cual coincide con lo que se reporta en la literatura, en donde las proyecciones de células de cáncer tratadas con FSK presentan proyecciones con más del doble del tamaño de aquellas en las células control, alcanzando longitudes de hasta 80  $\mu\text{m}$  (Cox y col., 1999).

Determinamos que las células A549<sub>NED</sub> tienen mayor expresión de CgA y de SYN en comparación con las células no diferenciadas A549<sub>CTRL</sub>, lo cual concuerda con la literatura, en donde se ha reportado el aumento en la expresión de estos marcadores en células A549 con diferenciación neuroendocrina (Chang y col., 2013; Mendieta y col., 2018; Dong y col., 2020). Este resultado también coincide con reportes clínicos, en donde se han identificado muestras de NSCLC con fenotipo neuroendocrino que co-expresan estos dos marcadores (El-Sabah y Hassan, 2021).

Por otro lado, no se detectó la expresión de NEUROD1 en las células A549, independientemente de su fenotipo. Este resultado podría sugerir que no se trata de un factor esencial para el proceso de diferenciación neuroendocrina, sin embargo, se ha demostrado que juega un papel importante en la transformación de células epiteliales a células tipo neuronales, y ha sido propuesto como un marcador más sensible que la CgA para la detección de cáncer de próstata neuroendocrino (Cindolo y col., 2007). Además, se ha identificado la sobreexpresión de NEUROD1 en pacientes con cáncer de pulmón neuroendocrino con alto grado de agresividad y se ha demostrado su capacidad para promover supervivencia celular y metástasis (Osborne y col., 2013).

Además, se ha demostrado que NEUROD1 regula la expresión de NCAM (CD56), otro marcador utilizado ampliamente para identificar la diferenciación neuroendocrina (Kashiwagi y col., 2012), por lo que tampoco se esperaría que esta molécula se exprese en nuestro modelo. La falta de expresión de NEUROD1 puede indicar que la inducción del fenotipo neuroendocrino mediada únicamente por la vía de AMPc/PKA/CREB no logra representar todas las características de este tipo de cáncer. Incluso, existen reportes que demuestran la sobreexpresión de NEUROD1 tras el tratamiento con IL-6, así como la regulación de este gen a través de la vía de señalización JAK2/STAT3, misma que es activada por esta citocina (Kong y col., 2019; Bobbo y col., 2021). Puesto que otra forma de inducir la diferenciación neuroendocrina en las células es mediante el tratamiento con IL-6, y se sabe que la estimulación simultánea con agentes elevadores de AMPc tiene un efecto sinérgico en la diferenciación neuroendocrina al actuar sobre diferentes vías de señalización (Deeble y col., 2001), podría evaluarse en un futuro si esta combinación induce en nuestro modelo la expresión de NEUROD1, así como de otros marcadores relacionados (NCAM, TrkB, etc.), buscando replicar adecuadamente los procesos que suceden *in vivo*.

En la Figura 29 se resumen las cascadas de señalización involucradas en la expresión de los marcadores neuroendocrinos, proponiendo a la IL-6 como un factor esencial para la síntesis de NEUROD1, mismo que regula a otros marcadores neuroendocrinos como NCAM.

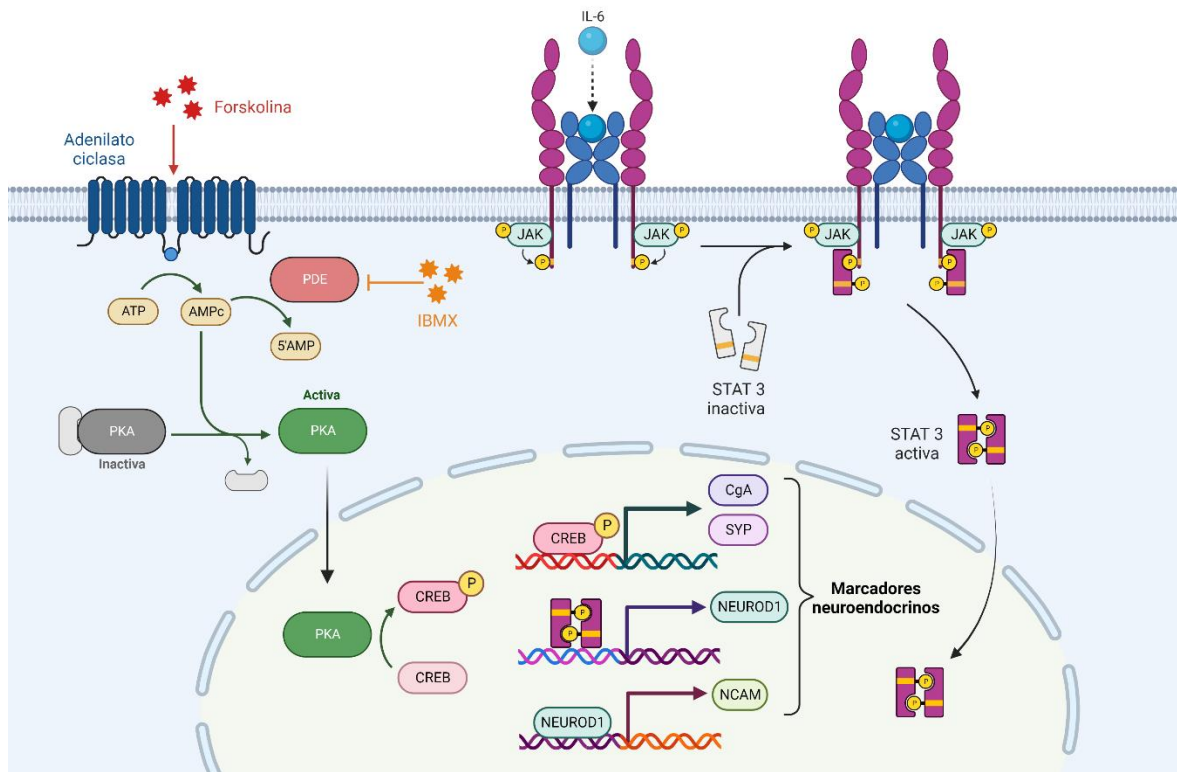


Figura 29. Expresión de marcadores neuroendocrinos mediada por AMPc e IL-6. Se ilustran las vías de señalización activadas durante el tratamiento de las células con FSK e IBMX; se propone la vía a través de la cual IL-6 induce la expresión de NEUROD1 y NCAM (Cox y col., 1999; Deeble y col., 2001; Mariot y col., 2002; Kong y col., 2019; Bobbo y col., 2021). Imagen creada en BioRender.com, con derechos y licencia de publicación bajo el acuerdo NH248MOW8E.

## 6.2. Monocitos

El análisis de las poblaciones celulares en las PBMCs de los ratones se realizó empleando marcadores de interés presentes en tipos celulares específicos. El CD68 de ratón, también conocido como macrosialina, es una proteína altamente glicosilada que se expresa en monocitos y macrófagos. Esta proteína forma parte de la familia de proteínas LAMP (proteína de membrana asociada a lisosoma, por sus siglas en inglés), que se encuentran principalmente en los compartimentos endosomales/lisosomales, con capacidad de translocarse a membrana celular (Chistiakov y col., 2017).

De acuerdo con la literatura, el porcentaje de monocitos en sangre periférica de ratones puede variar entre el 1 y el 5 % en condiciones normales (Kiss y col., 2020;

Bio-Rad, 2022), lo cual concuerda con lo observado para el grupo control inmunizado con PBS, que presentó un promedio de 4.7 % de monocitos en PBMCs. Nuestros resultados mostraron que los ratones inmunizados con células A549<sub>CTRL</sub> presentaron mayores niveles de monocitos en circulación en comparación con los ratones control y los inmunizados con células A549<sub>NED</sub>, alcanzando un promedio de 7.8 %, lo cual también representa un nivel elevado con respecto a los valores de referencia.

De manera general, los monocitos son fagocitos que tienen como función principal la extravasación y diferenciación a macrófagos para restablecer la homeostasis de tejidos dañados. Estas células forman parte del sistema inmunitario innato, pero actúan también como un mediador de la respuesta inmunitaria adquirida a través de la producción de citocinas y de factores específicos. Se sabe que los monocitos tienen una gran influencia sobre la progresión del cáncer, participando en la respuesta inmunitaria antitumoral y afectando procesos como la angiogénesis y la metástasis (Kiss y col., 2020). Conteos monocíticos elevados se han reportado ampliamente en pacientes con cáncer, así como en modelos de ratones; el incremento en los niveles de monocitos ha sido relacionado con tumores más agresivos y menor supervivencia de pacientes con múltiples tipos de cáncer, principalmente de páncreas, de próstata, cervical y gástrico (Sanford y col., 2013; Shigeta y col., 2016; Feng y col., 2018; Kiss y col., 2020). Esto podría implicar que las células A549<sub>CTRL</sub> tienen características más agresivas que las células A549<sub>NED</sub>, pues solo en el primer grupo se presentó la elevación de monocitos.

Sin embargo, se sabe que los monocitos comprenden poblaciones heterogéneas de células que responden de forma específica dependiendo del estímulo: tipo de cáncer, microambiente tumoral y estadio del tumor. Se han identificado 3 subtipos generales de monocitos: clásicos, no clásicos e intermedios. Estas poblaciones pueden presentar funciones opuestas en relación con el desarrollo tumoral, con respuestas tanto proinflamatorias como inmunosupresoras. Entre las funciones proinflamatorias, los monocitos pueden presentar actividad fagocítica, secretar factores tumoricidas y reclutar linfocitos al tumor; por otro lado, entre sus actividades protumorigénicas pueden encontrarse la estimulación de la angiogénesis y la remodelación de la matriz

extracelular, ambas características necesarias para la invasión y metástasis (Olingy y col., 2019). Además, los cambios en la expresión génica de los monocitos, que determinan el fenotipo y la respuesta generada, han demostrado ser totalmente diferentes entre distintos tipos de cáncer, generando por ejemplo una huella transcriptómica en cáncer de colon que no se identifica en cáncer gástrico o cáncer pancreático (Kiss y col., 2020), dando cuenta de la complejidad de este tipo de células y evidenciando la necesidad de analizarlas de acuerdo con el ambiente específico.

Los estudios que relacionan el aumento de monocitos con peor prognosis para los pacientes han correlacionado también este aumento con mayores niveles de macrófagos asociados a tumor (TAMs, por sus siglas en inglés) (Kiss y col., 2020). Los TAMs son conocidos principalmente por su actividad protumorigénica, favoreciendo el crecimiento de los tumores y la adquisición de características agresivas e inmunosupresoras. Sin embargo, se cree que la reprogramación de los monocitos que da lugar a estos TAMs sucede dentro del microambiente tumoral, pues se ha demostrado que los monocitos que se encuentran en circulación – principalmente los no clásicos– tienen la capacidad de producir factores tumoricidas y matar a las células de cáncer directamente, presentar antígenos, reclutar células NK y producir citocinas proinflamatorias (Hanna y col., 2015; Mukherjee y col., 2015; Hamm y col., 2016; Olingy y col., 2019). Puesto que en nuestro modelo experimental no se estableció un tumor que pudiera reprogramar los monocitos a un fenotipo protumorigénico, podemos pensar que se trataban de monocitos con actividad antitumoral respondiendo a las células en cuestión, sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar que este es el caso, pues también existe la posibilidad de que las células de cáncer induzcan esta reprogramación sin necesidad de organizarse en un tumor.

En la Figura 30 se resume la propuesta de las poblaciones de monocitos que se elevaron en presencia de las células A549<sub>CTRL</sub>, así como su función.

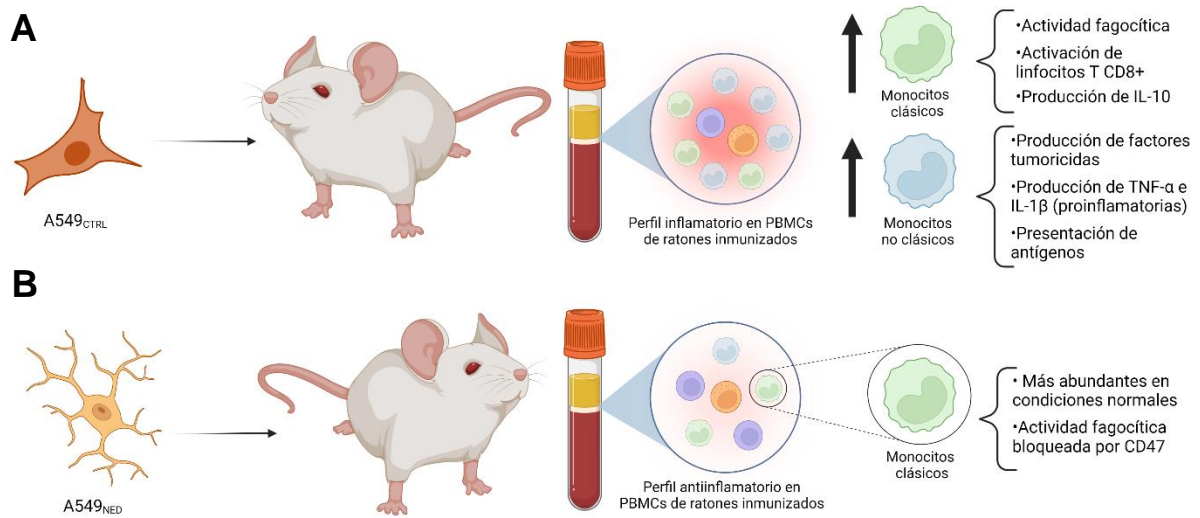


Figura 30. Poblaciones de monocitos elevadas en los ratones inmunizados. Teorizamos que en los ratones inmunizados con células A549<sub>CTRL</sub> se elevan los niveles de monocitos clásicos y no clásicos, ambos contribuyendo al perfil inflamatorio (A); también se muestra el caso de los ratones inmunizados con células A549<sub>NED</sub>, en los cuales no se presentó ninguna elevación de poblaciones monocíticas con respecto al control (B) (Hanna y col., 2015; Mukherjee y col., 2015; Hamm y col., 2016; Olingy y col., 2019). Imagen creada en BioRender.com, con derechos y licencia de publicación bajo el acuerdo FM248MTC6X.

Cabe destacar que existen estudios que han identificado que TAMs con expresión elevada de CD68+ (el mismo marcador que utilizamos para la identificación del linaje de monocitos/macrófagos) se correlacionan con una mejor prognosis para pacientes de NSCLC, independientemente de la etapa del cáncer (Giatromanolaki y col., 2022), así que suponiendo que los monocitos que identificamos mantengan la expresión de CD68 durante su transformación, su presencia sugeriría una mayor actividad antitumoral.

Otra posibilidad para explicar los resultados involucra al marcador de superficie CD47. Esta molécula se trata de una proteína de membrana cuya presencia es reconocida por los monocitos, la cual es interpretada como una señal para no fagocitar a las células, por lo que niveles elevados de esta molécula han sido correlacionados con peor prognosis para los pacientes de diferentes tipos de cáncer, entre ellos el NSCLC (Zhao y col., 2016; Liu y col., 2017; Giatromanolaki y col., 2022). Se ha identificado la sobreexpresión de CD47 en tumores neuroendocrinos



pancreáticos y de pulmón (Imam y col., 2021; Orozco-Morales y col., 2021). Esto podría sugerir que la diferenciación neuroendocrina de las células A549 causa la sobreexpresión de CD47, enmascarándolas del reconocimiento por parte de los monocitos, así evitando el aumento de estas células observado en el grupo control (Figura 31). Además, se ha demostrado que el tratamiento de células A549 con IFN- $\gamma$  induce la sobreexpresión de CD47 (Qu y col., 2022), lo que podría explicar que los niveles de esta citocina se hayan mantenido a un nivel basal en el grupo de ratones inmunizados con A549<sub>CTRL</sub>, en donde se hubiera esperado un aumento importante de IFN- $\gamma$ , pues nuestros resultados sugieren mayor actividad antitumoral en este grupo, la cual es mediada en gran medida por esta citocina.

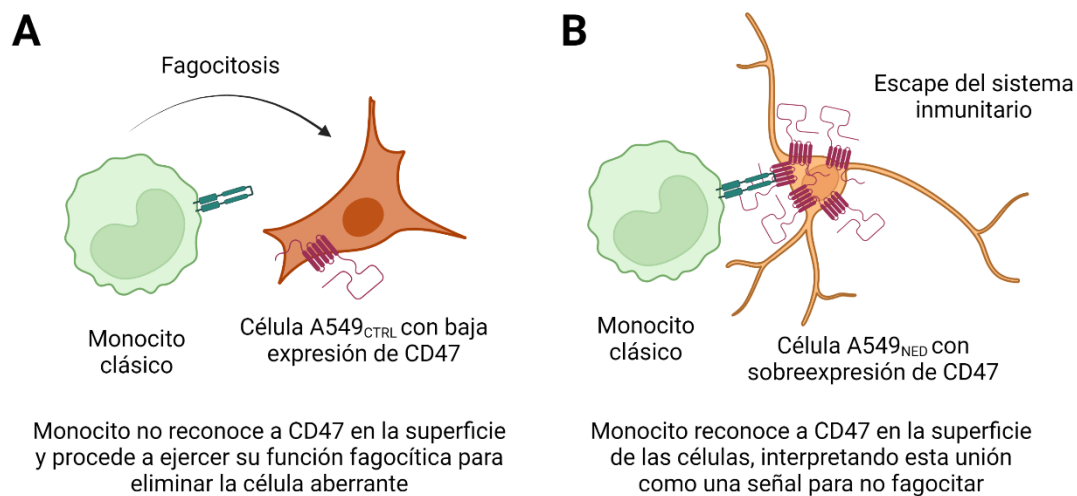


Figura 31. Evasión de la fagocitosis mediada por CD47. Se ilustra el proceso de reconocimiento de las células tumorales por SIRP $\alpha$  que concluye en la fagocitosis de las células (A), así como el escape del sistema inmunitario propuesto para las células A549<sub>NED</sub> mediado por la sobreexpresión de la proteína de membrana CD47 (B) (Zhao y col., 2016; Liu y col., 2017; Imam y col., 2021; Orozco-Morales y col., 2021; Giatromanolaki y col., 2022). Imagen creada en BioRender.com, con derechos y licencia de publicación bajo el acuerdo XK248MQFGB.

En el mismo sentido, se sabe que el IFN- $\gamma$  aumenta la expresión de genes proinflamatorios y promueve la función citotóxica de los macrófagos, sin embargo, también se ha demostrado que esta citocina reduce la motilidad de los monocitos, así como su sensibilidad a las señales quimiotácticas (Dallagi y col., 2015). Esta podría ser otra razón que haya contribuido al mantenimiento de los niveles basales

de IFN- $\gamma$  en el grupo A549<sub>CTRL</sub>, en donde la respuesta inmunitaria parece haber sido encabezada por los monocitos circulantes, que como se describirá más adelante, ejercen su función efectora en presencia de otras interleucinas proinflamatorias como IL-2.

Con respecto a los niveles de IL-10, existen reportes que indican que monocitos CD169<sup>+</sup> son monocitos clásicos y no clásicos activados que tienen una mayor capacidad para estimular la actividad citotóxica en linfocitos T CD8<sup>+</sup>, y se ha visto que el nivel de estos monocitos se eleva en la circulación de pacientes con ciertos tipos de cáncer, produciendo altos niveles de IL-10 (Affandi y col., 2021). Además, los monocitos clásicos e intermedios activados son de los productores más importantes de IL-10 en contextos inflamatorios (Mukherjee y col., 2015). Esta información concuerda con lo que observamos en los resultados, pues en el grupo A549<sub>CTRL</sub> se presentó una elevación conjunta de IL-10 y monocitos, y aunque no se determinó la subpoblación celular específica, podemos inferir una relación entre estos dos factores, tomando en cuenta que los monocitos son una de las mayores fuentes de citocinas en la sangre (O'Connell y col., 2015).

En cuanto a la IL-2, desde hace décadas se conoce que esta interleucina tiene un gran efecto activador de los monocitos, conduciéndolos a la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-6 –una de las más potentes con dicha actividad–, así como diversos factores de crecimiento (Espinoza-Delgado y col., 1995). Incluso la exposición de monocitos a IL-2 es suficiente para que éstos presenten actividad microbicida y tumoricida (Bosco y col., 2000). Esta información apoya nuestra teoría que supone que el incremento de monocitos observados en los ratones inmunizados con células A549<sub>CTRL</sub> es de células efectoras con actividad proinflamatoria y anticancerígena, pues en este mismo grupo se presentó una elevación significativa de los niveles de IL-2 en circulación.

Es necesario realizar análisis más profundos para lograr la identificación apropiada de los subtipos de monocitos que se elevan en presencia de las células A549<sub>CTRL</sub> para asociarlos con una función y posiblemente una prognosis específica, para lo

cual se requiere medir marcadores como CD169, Ly6C, CD43, CX3CR1 y MHC-II (Olingy y col., 2019). Sin embargo, con base en los resultados de la citometría, los niveles de IL-2 y la citotoxicidad en los cocultivos, podemos suponer que los monocitos fueron un mediador importante de la actividad antitumoral observada en contra de las células A549<sub>CTRL</sub>.

### 6.3. Linfocitos T doble positivos (CD4+/CD8+)

La identificación de los linfocitos T se realizó empleando los marcadores de superficie CD4 y CD8; el CD4 se expresa en los linfocitos T cooperadores, mientras que el CD8 se expresa en linfocitos T citotóxicos. Ambas moléculas son glicoproteínas de membrana que forman parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas y funcionan como correceptores del TCR. Estas proteínas favorecen la interacción entre los linfocitos y las células presentadoras de antígeno, pues tienen la capacidad de unirse a moléculas del MHC –CD8 a las de clase I y CD4 a las de clase II–, permitiendo desencadenar las cascadas de señalización necesarias para la activación de los linfocitos (Abbas y col., 2018).

Durante el desarrollo de los linfocitos T dentro del timo, estos co-expresan el CD4 y el CD8, comprometiéndose hacia un solo linaje al alcanzar la madurez. Sin embargo, ahora se sabe que existen pequeñas poblaciones de células doble positivas encontradas en la sangre periférica y tejidos linfoides de individuos sanos, y se ha descrito el aumento en el número de éstas en diversos contextos patológicos, entre ellos el del cáncer (Parel y Chizzolini, 2004; Clénet y col., 2017). El origen de este tipo de células sigue siendo debatido, pues solía creerse que eran el resultado de una liberación prematura de células inmaduras desde el timo, pero se ha demostrado que células maduras comprometidas a un linaje tienen la capacidad de volver a expresar CD4 o CD8 en presencia de diferentes factores (Waschbisch y col., 2014; Gonzalez-Mancera y col., 2019).

Esta clase de linfocitos en circulación, tanto en humanos como en ratones, es relativamente rara, representando menos del 1-2 % del total de linfocitos en sangre (Clénet y col., 2017). Nuestros resultados encajan dentro de estos porcentajes, pues

el promedio del grupo control fue de ~ 0.3 %, aumentando hasta un ~ 1 % en los grupos inmunizados que, aunque se encuentra dentro de los valores considerados como normales para los roedores, el incremento es de más de 3 veces, e incluso fue significativamente mayor en los ratones que recibieron células A549<sub>NED</sub>, por lo que podría tener implicaciones importantes.

La función de los linfocitos T CD4+/CD8+ sigue siendo controversial, pues es posible encontrar reportes tanto de actividad antitumoral como de actividad inmunosupresora en cáncer, por lo que su acción parece depender del contexto específico (Overgaard y col., 2015). A pesar de estas controversias, se ha reportado que estas células suelen expresar citocinas como IL-4 e IL-5, ambas características de las respuestas Th2 (inmunosupresoras). Un estudio reciente reportó que pacientes con cáncer urológico presentaron niveles elevados de células CD4+/CD8+ en circulación y que estas promovieron la polarización de los linfocitos T cooperadores a un fenotipo Th2, el cual se asocia con peor prognosis para los pacientes por sus características inmunosupresoras (Bohner y col., 2019). Incluso, el cultivo de linfocitos T CD4+ en presencia de IL-4 es suficiente para inducir la expresión de CD8a (Parel y Chizzolini, 2004) y aunque no evaluamos esta citocina, podemos suponer su elevación por el perfil inmunosupresor observado, pero es necesaria la confirmación experimental. Con base en esta información, los resultados sugieren que el aumento significativo observado en células CD4+/CD8+ doble positivas en el grupo inmunizado con A549<sub>NED</sub> puede haber jugado un papel importante en la inmunosupresión observada.

Finalmente, estudios han reportado que las células CD4+/CD8+ tienen una mayor capacidad de producir IFN- $\gamma$ , incluso cuando éstas presentan propiedades inmunosupresoras (Overgaard y col., 2015; Clénet y col., 2017), lo cual podría explicar el aumento mínimo de esta citocina observado en el grupo A549<sub>NED</sub>.

Asimismo, como se discutirá más adelante, la IL-10 puede inhibir la polarización de las células a un fenotipo Th2 inmunosupresor (Wynn y col., 2015), y considerando que esta citocina se elevó en los ratones inmunizados con células A549<sub>CTRL</sub>, podemos suponer que este mecanismo contrarrestó la acción polarizadora de los

linfocitos T doble positivos, resaltando la importancia de este mecanismo solo en los ratones inmunizados con células A549<sub>NED</sub>.

En la Figura 32 se muestra el resumen gráfico de la asociación entre los linfocitos T CD4+/CD8+ doble positivos y la generación de linfocitos Th2.

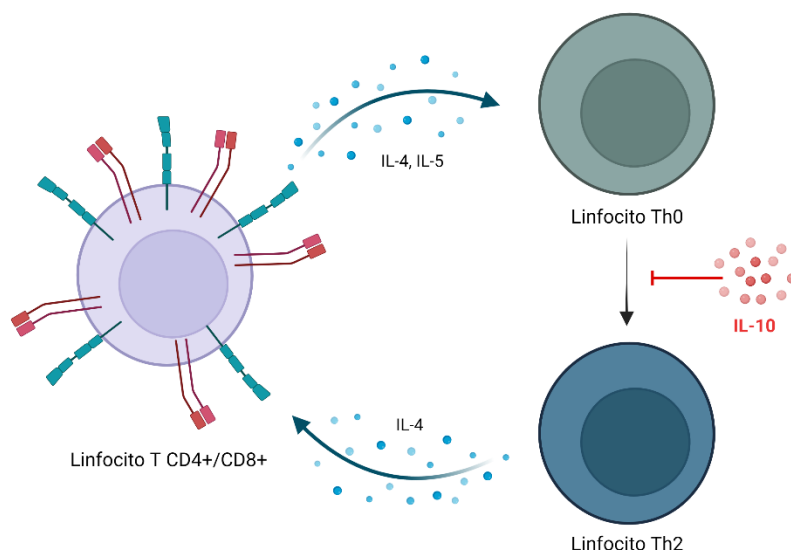


Figura 32. Polarización a linfocitos Th2 mediada por células doble positivas. La polarización a Th2 depende de IL-4 e IL-5, mientras que las células Th2, al producir más IL-4, inducen la expresión de CD8 en linfocitos T CD4+, creando células doble positivas y una retroalimentación positiva. La IL-10, a su vez, evita la polarización hacia Th2 (Parel y Chizzolini, 2004; Wynn y col., 2015; Bohner y col., 2019). Imagen creada en BioRender.com, con derechos y licencia de publicación bajo el acuerdo TM248N66Q0.

#### 6.4. Linfocitos T CD4+

En ratones, dependiendo de la edad y de la cepa, el porcentaje de linfocitos T positivos a CD4 puede variar entre el 15 y 30 % (Pinchuk y Filipov, 2008). Estos valores corresponden con los que nosotros obtuvimos, pues en el control se encontró que ~ 18.7 % de los linfocitos eran positivos a este marcador.

Nuestros resultados mostraron una diferencia significativa en los niveles de linfocitos T cooperadores CD4+ entre los grupos inmunizados con células A549<sub>CTRL</sub> y A549<sub>NED</sub>, presentando un mayor porcentaje en este último. Estas células tienen la capacidad

de diferenciarse en diferentes subtipos que juegan un papel muy importante en la organización de la respuesta inmunitaria a través de la secreción de diversas citocinas. Se conocen diversos subtipos de estas células: los previamente mencionados Th1 y Th2, así como Th9, Th17, Th22 y Tregs inducidas (Luckheeram y col., 2012). Debido a este amplio repertorio de subtipos a los que se pueden diferenciar los linfocitos T cooperadores, es necesario evaluar más marcadores de superficie y citocinas características para tener una respuesta definitiva sobre el tipo específico de células que se están elevando en nuestro modelo. Sin embargo, los resultados que tenemos apuntan a una respuesta inmunosupresora inducida por las células A549<sub>NED</sub>; por esto, podemos inferir que el aumento de células T CD4<sup>+</sup> en este grupo se da por la presencia elevada de linfocitos T cooperadores polarizados a un fenotipo Th2 y de Tregs inducidos.

Por muchos años, la polarización de los linfocitos T cooperadores a un fenotipo Th2 ha sido considerada como un factor promotor del desarrollo tumoral, pues mediante la secreción de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, estas células suprimen la capacidad de los linfocitos de polarizarse hacia un fenotipo Th1 con actividad inflamatoria antitumoral (Johansson y col., 2008; Wynn, 2015; Bohner y col., 2019).

Al mismo tiempo, las células Tregs, que también son positivas a CD4, tienen actividad inmunosupresora, inhibiendo la actividad de los CTLs a través de moléculas como el TGF- $\beta$ , y la prevalencia de este tipo de células se correlaciona con la progresión del cáncer. Incluso, la ausencia de Tregs se correlaciona con la polarización de los linfocitos cooperadores a un fenotipo Th1, indicando que regulan la inmunidad antitumoral en múltiples niveles de forma negativa (Johansson y col., 2008; Lee y col., 2019) De hecho, estudios han encontrado una correlación inversa entre la abundancia de linfocitos Tregs CD4<sup>+</sup> y la de monocitos inflamatorios (Ly6C<sup>high</sup>) en ratones (Pommier y col., 2013), que coincide con el aumento en el porcentaje de monocitos que observamos en el grupo A549<sub>CTRL</sub>, mismo en el que disminuyen los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Al mismo tiempo, esta información apoya la teoría del papel antitumoral de los monocitos que se elevaron en los ratones.

Por otro lado, teorizamos que las células CD4+ presentes en los ratones inmunizados con células A549<sub>CTRL</sub> se polarizaron hacia un fenotipo Th1, el cual se correlaciona con efectos inmunológicos favorables, causando un aumento en la respuesta citotóxica y por lo tanto con una mejor prognosis para los pacientes (Lee y col., 2019). Se sabe que los linfocitos Th1 son de las células con mayor capacidad de producir citocinas proinflamatorias como IL-2, favoreciendo la actividad citotóxica de las células efectoras del sistema inmunitario, como las NK y los CTLs (Johansson y col., 2008; Abel y col., 2018). Al mismo tiempo, la IL-2 favorece la polarización de los linfocitos T hacia un fenotipo Th1, creando un ciclo de retroalimentación positiva (Liao y col., 2013). Esta información concuerda con nuestros resultados, pues en el grupo inmunizado con A549<sub>CTRL</sub> se presentaron niveles significativamente elevados de IL-2, así como citotoxicidad de las células de cáncer en los cocultivos con PBMCs.

Cabe destacar, de los puntos mencionados anteriormente, que la IL-10 también está involucrada en la regulación de las células T cooperadoras. A pesar de que normalmente su rol se asocia con la regulación de la producción de moléculas proinflamatorias por parte de las células Th1, esta interleucina es un inhibidor importante de la producción de citocinas tipo 2, y se ha reportado que en conjunto con IL-12 evita la polarización de los linfocitos T a un fenotipo Th2 (Wynn y col., 2015). Entonces es coherente el resultado obtenido con respecto a esta citocina en el grupo de ratones inmunizados con células A549<sub>NED</sub>, donde los niveles de IL-10 disminuyeron significativamente. Puesto que la IL-10 antagoniza las respuestas generadas por las células Th2 –las cuales tienen un carácter protumorigénico–, regular a la baja a esta interleucina representa una ventaja para las células de cáncer, en favor de mantener al margen una respuesta en contra de ellas.

Finalmente, a pesar de que usualmente se le atribuyen las funciones citolíticas de los linfocitos T solo a los CD8+, ahora se conoce la existencia de linfocitos T CD4+ citotóxicos, los cuales expresan moléculas como perforinas y granzimas, haciéndolas capaces de matar células de cáncer de manera directa (Oh y Fong, 2021). Interesantemente, estas células pueden desarrollarse a partir de linfocitos T CD4+ no polarizados, así como a partir de linfocitos Th1, en ambos casos de manera

dependiente de IL-2 (Brown y col., 2009; Oh y Fong, 2021). Estos reportes también podrían ayudar a entender los resultados observados, pues a pesar de contar con un menor número de linfocitos T CD4+ en la circulación de los ratones inmunizados con células A549<sub>CTRL</sub>, se elevó la IL-2 y se presentaron efectos citotóxicos en los cocultivos, sugiriendo que este subtipo de células CD4+ puede haber contribuido a la respuesta generada.

En la Figura 33 se resume la propuesta de las poblaciones de linfocitos T CD4+ que se elevaron y polarizaron en presencia de las células A549<sub>CTRL</sub> y A549<sub>NED</sub>, así como su función en el contexto evaluado.

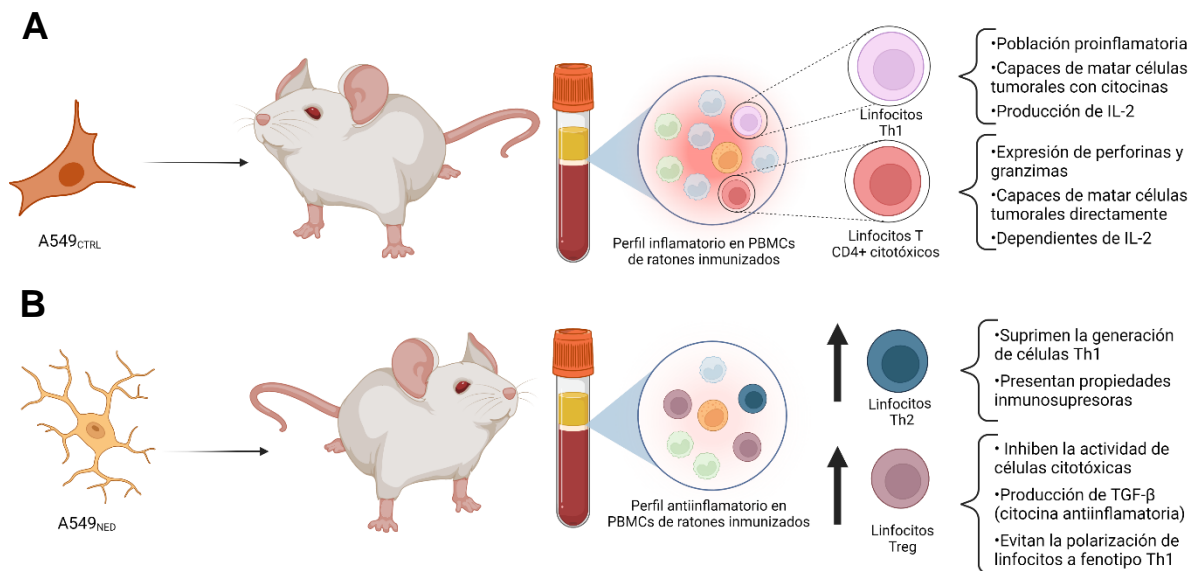


Figura 33. Poblaciones de linfocitos T CD4+ elevadas en los ratones inmunizados. Teorizamos que los ratones inmunizados con células A549<sub>CTRL</sub>, a pesar de contar con menos linfocitos T CD4+ totales, éstos se polarizaron a fenotipos Th1 y citotóxicos, contribuyendo al perfil inflamatorio (A); en los ratones inmunizados con células A549<sub>NED</sub>, en los que se elevaron los linfocitos T CD4+ totales, teorizamos que este aumento es de linfocitos con fenotipo Th2 y Treg (B) (Johansson y col., 2008; Brown y col., 2009; Wynn, 2015; Bohner y col., 2019; Lee y col., 2019; Oh y Fong, 2021). Imagen creada en BioRender.com, con derechos y licencia de publicación bajo el acuerdo ST248NGYOA.



## 6.5. Linfocitos T citotóxicos CD8+

Para identificar la presencia de CD8, los análisis de citometría tuvieron como diana a CD8a, que es la subunidad principal de este correceptor y está presente tanto en su forma homodimérica (a/a) como heterodimérica (a/b) (Abbas y col., 2018).

En cuanto al porcentaje de linfocitos T citotóxicos positivos a CD8, no se encontraron diferencias entre los grupos inmunizados y el grupo control. Normalmente, el porcentaje de linfocitos T CD8+ circulando en ratones es de entre el 7 y 10 % (Bio-Rad, 2022), valores que corresponden con nuestros resultados, pues en el grupo PBS se encontró un promedio de ~8.5 %.

La actividad citotóxica en contra de las células tumorales está mediada en gran parte por los CTLs, pues estos tienen la capacidad de reconocer directamente a las células de cáncer tras la presentación y de inducir su apoptosis a través de diferentes mecanismos (Farhood y col., 2019). Por lo tanto, se esperaría encontrar un aumento de esta población en el grupo inmunizado con células A549<sub>CTRL</sub>, ya que en éste se observó una mayor inducción de la respuesta inmunitaria. Sin embargo, esto no es lo que observamos, e incluso existió una disminución mínima en el porcentaje de linfocitos para este grupo.

Se sabe que una vez que el sistema inmunitario elimina las amenazas, se genera una contracción de las células CD8+ efectoras, dejando solo a una pequeña población de linfocitos de memoria específicos a antígeno, los cuales son capaces de inducir una respuesta más rápida y agresiva ante el antígeno en caso de reconocerlo de nuevo (Halle y col., 2017). Puesto que la citometría de flujo la realizamos solo en el punto final del experimento –14 días después de la segunda inmunización de los ratones– estipulamos que para este momento el sistema inmunitario se habría deshecho de las células de cáncer, contrayendo las poblaciones de linfocitos T CD8+ efectoras encargadas de la respuesta citotóxica, explicando los resultados observados.

En la Figura 34 se muestra la progresión de la respuesta efectuada por los linfocitos CD8+ citotóxicos.

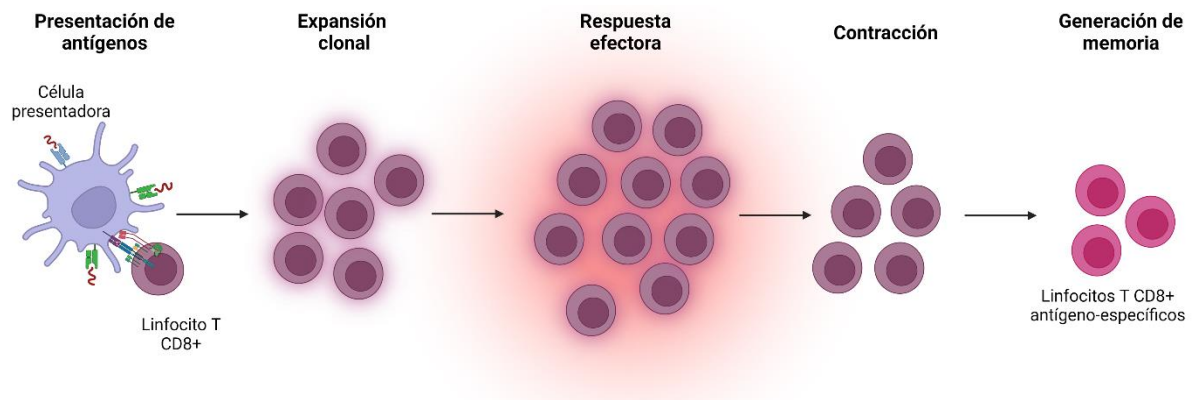


Figura 34. Expansión y contracción de linfocitos T CD8+. Se ilustra la progresión de los linfocitos T citotóxicos a través del tiempo, iniciando la respuesta con la presentación de antígenos, seguida por la expansión clonal y respuesta efectora, y concluida por la contracción y generación de linfocitos de memoria (Schluns y Lefrançois, 2003; Halle y col., 2017). Imagen creada en BioRender.com, con derechos y licencia de publicación bajo el acuerdo SM248RKML.

Otra explicación para los resultados observados en los linfocitos T CD8+ depende de la IL-2, interleucina proinflamatoria que se conoce por la regulación de aspectos básicos de la biología de los linfocitos T CD8+, entre los que se encuentran la supervivencia, la proliferación, diferenciación, actividad citotóxica y generación de células de memoria (Kalia y Sarkar, 2018). Sin embargo, desde hace décadas se conoce que puede tener un efecto dual, promoviendo un programa de muerte celular inducido tras la activación de los linfocitos (Cheng y col., 2002). Y ahora, estudios recientes han demostrado que la exposición continua de las células T CD8+ a niveles altos de IL-2 conlleva al agotamiento de los linfocitos. Estos linfocitos exhaustos, a medida que adquieren este fenotipo pierden la reactividad a las células de cáncer, y por lo tanto, son incapaces de ejercer su función citotóxica (Liu y col., 2021b). Finalmente, la pérdida gradual de la funcionalidad es seguida por la muerte celular de los linfocitos (Dolina y col., 2021; Rha y Shin, 2021).

En la Figura 35 se muestra un resumen gráfico de la generación de linfocitos T CD8+ exhaustos mediada por IL-2.

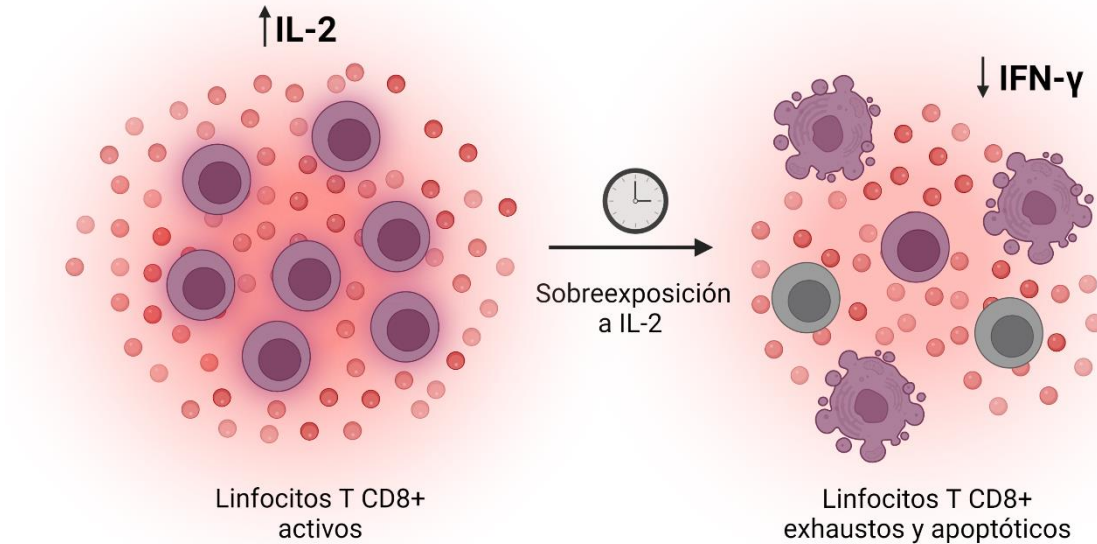


Figura 35. Generación de linfocitos T CD8+ exhaustos. Se ilustra como la exposición constante a niveles elevados de IL-2 puede causar que los linfocitos T CD8+ adquieran un fenotipo de agotamiento, perdiendo su acción efectora, dejando de producir citocinas y muriendo por apoptosis (Cheng y col., 2002; Dolina y col., 2021; Liu y col., 2021b; Rha y Shin, 2021). Imagen creada en BioRender.com, con derechos y licencia de publicación bajo el acuerdo LD248RPQAJ.

Lo anteriormente expuesto podría explicar nuestros resultados, pues en caso de que los CTLs hayan perdido su funcionalidad a lo largo del experimento por la exposición continua a IL-2 (pues se observó que el nivel de esta citocina se elevó en el grupo A549<sub>CTRL</sub> desde el día 14), al momento de analizar las poblaciones celulares estos linfocitos habrían muerto. Entonces, para confirmar esta teoría, sería necesario evaluar las poblaciones leucocíticas en diferentes puntos del experimento, buscando el momento en el que se da la expansión clonal de los mismos. Sin embargo, es necesario enfatizar en que el agotamiento de los linfocitos T mediado por IL-2 no contradice su papel sobre la actividad antitumoral, pues se sabe que esta citocina es indispensable para promover la activación y proliferación de los CTLs en las etapas iniciales del cáncer, además de que también está involucrada en la regulación de la actividad citotóxica de las células NK, como se describirá más adelante. Por lo tanto, no podemos descartar que la actividad citotóxica observada en los cocultivos sí sea mediada parcialmente por los linfocitos CD8+, pues el tiempo que se mantuvieron

esas células en presencia de las A549 fue menor, evitando la sobreexposición a IL-2 y, por lo tanto, el agotamiento de los CTLs.

Finalmente, se sabe que los linfocitos T CD8+ exhaustos dejan de producir IFN- $\gamma$  (Rha y Shin, 2021). Esta es otra posible explicación al resultado obtenido sobre los niveles de esta citocina en el grupo inmunizado con células A549<sub>CTRL</sub>.

El aumento de IL-10 en los ratones inmunizados con células A549<sub>CTRL</sub> y su disminución en el grupo que recibió células A549<sub>NED</sub> pueden explicarse en parte por la actividad que tiene esta citocina sobre los linfocitos T citotóxicos. A pesar de sus potentes funciones inmunosupresoras, la interleucina 10 tiene la capacidad de promover la maduración de los timocitos induciendo la expresión de CD8, y se ha reportado que inducen la proliferación de los linfocitos T CD8+ a través de la estimulación directa del TCR. Asimismo, la IL-10 promueve la actividad citotóxica de los linfocitos, e incluso, esta citocina puede reemplazar funcionalmente a la IL-2 para inducir la proliferación celular, aunque con menor potencia (Oft, 2014; Ouyang y O'Garra, 2019).

#### 6.6. Células NK

La identificación de las células NK se hizo empleando el marcador CD335, una glicoproteína de membrana que forma parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas y que actúa como receptor activador de NK, siendo utilizado normalmente como identificador de este tipo celular (Liu y col., 2021a).

El desarrollo de las células NK tiene lugar en la médula ósea y sus niveles comprenden entre el 5 y 15 % de los linfocitos en circulación (Liu y col., 2021a). Estos valores corresponden con los que obtuvimos para el grupo control (PBS), en donde el porcentaje de células NK tuvo un promedio de 13.12 %.

Las células NK juegan un papel fundamental en la primera línea de defensa ante las células que muestran características aberrantes propias del desarrollo cancerígeno, y su actividad es regulada por múltiples receptores membranales inhibidores y activadores (Hadad y col., 2015). En nuestros experimentos, los niveles de células

NK se elevaron en los dos grupos inmunizados con células A549 con respecto al control, teniendo un mayor aumento en el grupo A549<sub>NED</sub>. Cabe resaltar que las células en ambos grupos superaron el 20 % de los linfocitos en circulación, valores anormales y elevados con respecto a los de referencia.

Puesto que las células NK no necesitan de una activación previa para el reconocimiento de antígenos extraños y la inducción de una respuesta citolítica, son una población muy importante en la respuesta contra células cancerosas. Por lo tanto, podemos inferir que gran parte de los efectos citotóxicos observados en nuestros experimentos fueron mediados por células NK. En concordancia, se sabe que estas células necesitan de la IL-2 para expandirse e inducir una respuesta efectora (Spolski y col., 2018), y que el tratamiento de células NK con IL-2 conlleva a una mayor actividad citotóxica y antitumoral (Groth y col., 2011). Puesto que en nuestro grupo inmunizado con células A549<sub>CTRL</sub> esta citocina tuvo un aumento significativo, teorizamos que las células NK en estos ratones se encontraban en un estado activado, con capacidad de lisar a las células cancerosas.

Además, se ha reportado que las células NK activadas son capaces de secretar diferentes citocinas, como GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-5 e IL-13 (Paul y Lal, 2017). A pesar de que no detectamos mayores niveles de IFN- $\gamma$  en el grupo A549<sub>CTRL</sub>, se determinó un aumento significativo de IL-10, e incluso si esta citocina es producida por diferentes tipos celulares, las NK pudieron haber sido una fuente importante de la interleucina detectada. Aunque normalmente se considera como una citocina antiinflamatoria, IL-10 es un potente activador de la proliferación y función citotóxica de las células NK en presencia de IL-18, por lo que se crea un ciclo de retroalimentación positiva entre estos dos agentes de la inmunidad (Cai y col., 1999; Paul y Lal, 2017). La activación de las células NK mediada por la IL-10 podría ser otra de las razones por las que disminuyeron los niveles de esta citocina en el grupo de ratones que recibieron células A549<sub>NED</sub>, pues por su perfil inmunosupresor indica que se activaron mecanismos de regulación destinados a limitar la disponibilidad de moléculas promotoras de cualquier tipo de respuesta antitumoral.

A pesar de haber observado también un aumento de células NK en los ratones inmunizados células A549<sub>NED</sub>, en este grupo no se presentó una elevación de IL-2 ni de IL-10, en comparación con el grupo A549<sub>CTRL</sub>. Tanto la IL-10 como la IL-2 son proteínas importantes en la activación de la respuesta citotóxica de las células NK, y se ha observado que el desarrollo de estas células no depende de IL-2, pero sí su función efectora (Wu y col., 2017). Por lo tanto, proponemos que las células NK en los ratones inmunizados con A549<sub>NED</sub> no se encontraban en un estado de activación óptimo, a pesar de tener niveles comparables al grupo inmunizado con células control. Incluso, se ha reportado que limitando la disponibilidad de IL-2, las células Tregs regulan negativamente la actividad de las células NK (Spolski y col., 2018), lo cual concuerda con nuestra hipótesis de la polarización de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> hacia Th2 y Tregs en ese grupo de ratones (Figura 36).

Finalmente, estudios han reportado que en contextos cancerígenos las células NK pueden perder parcialmente su fenotipo y ser convertidas en células mieloides supresoras (MDSC), las cuales, como sugiere su nombre, contribuyen a la inmunosupresión, favoreciendo que las células cancerosas escapen del sistema inmunológico (Park y col., 2013). Esta situación podría explicar el aumento de células NK en el grupo A549<sub>NED</sub>, pues Park y col. determinaron que la expresión del mismo marcador que nosotros medimos (CD335<sup>+</sup> o NKp46) no se pierde en estas células; por lo tanto, esta molécula les permitió identificar a las MDSC resultantes de la transformación, pues se considera exclusiva de las NK. Para corroborar la presencia de este fenómeno en nuestro modelo es necesario evaluar marcadores propios de la línea mieloide y confirmar la co-expresión con CD335. Además, el mismo grupo reportó que la IL-2 era suficiente para evitar la conversión de NK a MDSC (Park y col., 2013), lo que significa que este proceso no pudo haber sucedido en el grupo de ratones inmunizados con células A549<sub>CTRL</sub>, en donde esta citocina se elevó considerablemente. Se ha reportado que las MDSC interfieren con la activación de los linfocitos T mediante la producción de óxido nítrico, que bloquea la señalización a través del receptor de IL-2 (Kiss y col., 2020). Por lo tanto, suponiendo la generación de MDSC en nuestro modelo de ratones inmunizados con A549<sub>NED</sub>,

podemos asumir que esta citocina, cuyos niveles se elevaron ligeramente con respecto al control (sin presentar diferencias significativas), no representó una señal adecuada de activación del sistema inmunitario, pues esta habría sido atenuada por el óxido nítrico.

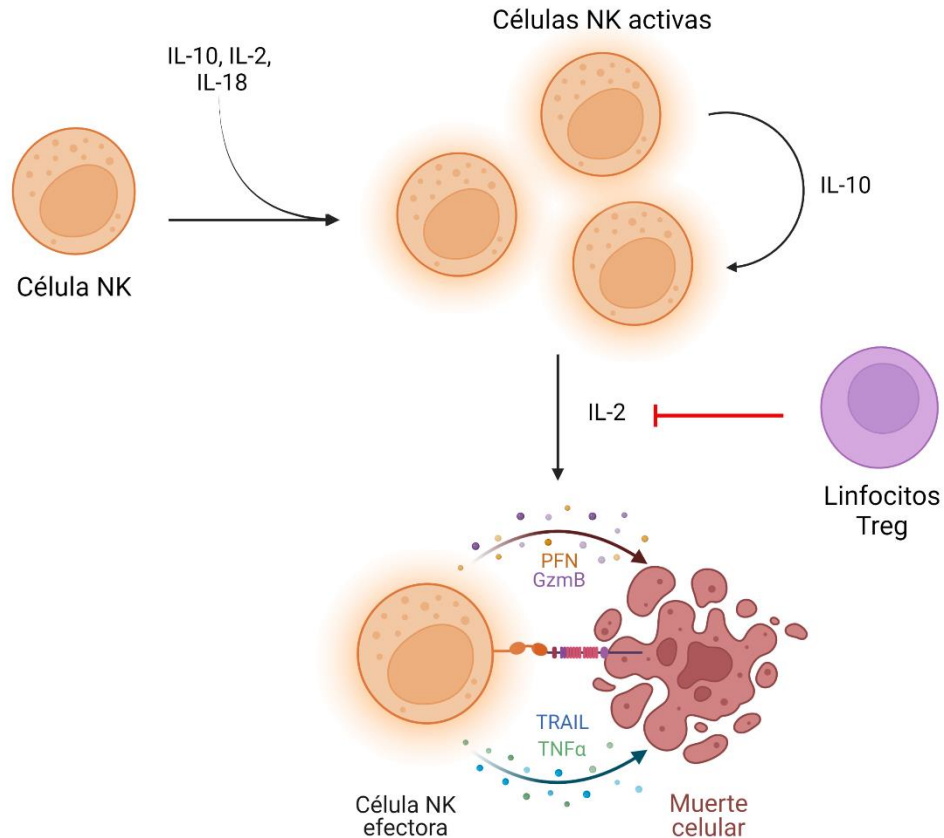


Figura 36. Desarrollo de la respuesta de células NK dependiente de citocinas. Se ilustra la activación y proliferación de las células NK mediada por citocinas, así como el ciclo de retroalimentación creado al producir IL-10. También se presenta el mecanismo de citotoxicidad mediado por las células NK, el cual depende de la IL-2, cuya disponibilidad puede limitarse por linfocitos Treg (Cai y col., 1999; Lieberman, 2010; Groth y col., 2011; Paul y Lal, 2017; Wu y col., 2017; Abel y col., 2018; Spolski y col., 2018; Huntington y col., 2020). Imagen creada en BioRender.com, con derechos y licencia de publicación bajo el acuerdo KO248V7WXZ.

## 6.7. Citocinas

Además de la información discutida anteriormente respecto a las citocinas y su relación con cada tipo de población celular evaluada, existen otros reportes que nos ayudan a explicar los resultados observados.

Con respecto a IL-10, ya se han mencionado algunas de sus características inmunogénicas, que explicarían parcialmente el aumento de esta interleucina en el grupo de los ratones inmunizados con A549<sub>CTRL</sub>, en donde se presentó mayor actividad por parte del sistema inmunitario. Sin embargo, no solo es importante la acción efectora, sino el control de la misma una vez que se elimina la amenaza. La inflamación crónica y la presencia constante de niveles elevados de citocinas proinflamatorias se correlacionan con mayor incidencia de cáncer, así como peor prognosis para los pacientes (Coussens y col., 2013).

En este sentido, es necesaria la acción de moléculas antiinflamatorias que regulen la inflamación sistémica; tal es el caso de la IL-10, una citocina necesaria para regular negativamente la acción de diversas poblaciones leucocitarias (Oft, 2014; Ouyang y O'Garra, 2019). Por ejemplo, se sabe que la IL-10 tiene la capacidad de detener la proliferación de los linfocitos T CD4+, así como de suprimir la secreción de citocinas por parte de las células Th1, como el IFN- $\gamma$  (Oft, 2014). La información anterior concuerda con nuestros resultados, en donde al final del experimento con los ratones se detectó un menor número de linfocitos T CD4+, mientras que el IFN- $\gamma$  no se elevó en los puntos analizados, posiblemente debido al control ejercido sobre esta proteína por su potente actividad proinflamatoria.

Por lo tanto, los niveles elevados de IL-10 en el grupo de ratones retados con células A549<sub>CTRL</sub> implican la presencia de un mecanismo fisiológico destinado a restaurar la homeostasis en los roedores, dentro de los cuales se presentaron eventos inflamatorios agresivos que pueden tener consecuencias adversas para la salud en caso de no controlarlos. Este resultado sugiere que la respuesta generada en contra de las células A549<sub>CTRL</sub> es regulada, actuando sobre los agentes patógenos y luego promoviendo el restablecimiento de las condiciones normales.



En cuanto al IFN- $\gamma$ , como ya se indicó, se hubiera esperado observar un aumento significativo de esta citocina en los ratones inmunizados con células A549<sub>CTRL</sub>, pues en estos se indujo mayor actividad antitumoral, y al mismo tiempo, en los cocultivos entre PBMCs y células A549<sub>CTRL</sub> los leucocitos lograron eliminar parte de las células cancerosas.

Por su parte, PD-1 es un receptor que se encuentra en la superficie de los linfocitos T citotóxicos, y genera señales que inducen la activación de la respuesta efectora en caso de no reconocer a su ligando, PD-L1, en la célula con la que está interactuando (Pistillo y col., 2020). Por lo tanto, las células cancerosas logran sobreexpresar PD-L1 mediante diferentes mecanismos, evitando que el sistema inmunológico las reconozca como células aberrantes, resultando en la evasión de la respuesta citotóxica. Sorprendentemente, durante los últimos años se ha elucidado un mecanismo de regulación involucrado en la sobreexpresión de este ligando evasor de la respuesta inmunitaria; el IFN- $\gamma$  regula positivamente a PD-L1 a través de la vía JAK/STAT, causando un aumento en la expresión de esta proteína de superficie membranal (Mimura y col., 2017; Pistillo y col., 2020; Breiteneker y col., 2021). Así, el IFN- $\gamma$  les otorga resistencia a las células tumorales, pues éstas logran aprovechar la citocina que es secretada por las diferentes células del sistema inmunitario a medida que responden a la amenaza en cuestión. Esta información es muy importante, pues nos permite teorizar que en el grupo inmunizado con células A549<sub>CTRL</sub> no detectamos la elevación de IFN- $\gamma$  porque el mantener niveles elevados de esta citocina podría causar que las células cancerosas sobreexpresen PD-L1, favoreciendo su escape del sistema inmunitario. Esta teoría al mismo tiempo resalta la importancia de los mecanismos de regulación y supresión de la respuesta inmunitaria, como el ya mencionado de la IL-10. Por consiguiente, ésta sería otra razón más por la cual el aumento de IFN- $\gamma$  – o al menos el aumento prolongado necesario para su detección en suero – no sería favorable en el contexto evaluado.

En la Figura 37 se resumen las posibles explicaciones para los diferentes perfiles de citocinas observados en los ratones inmunizados.

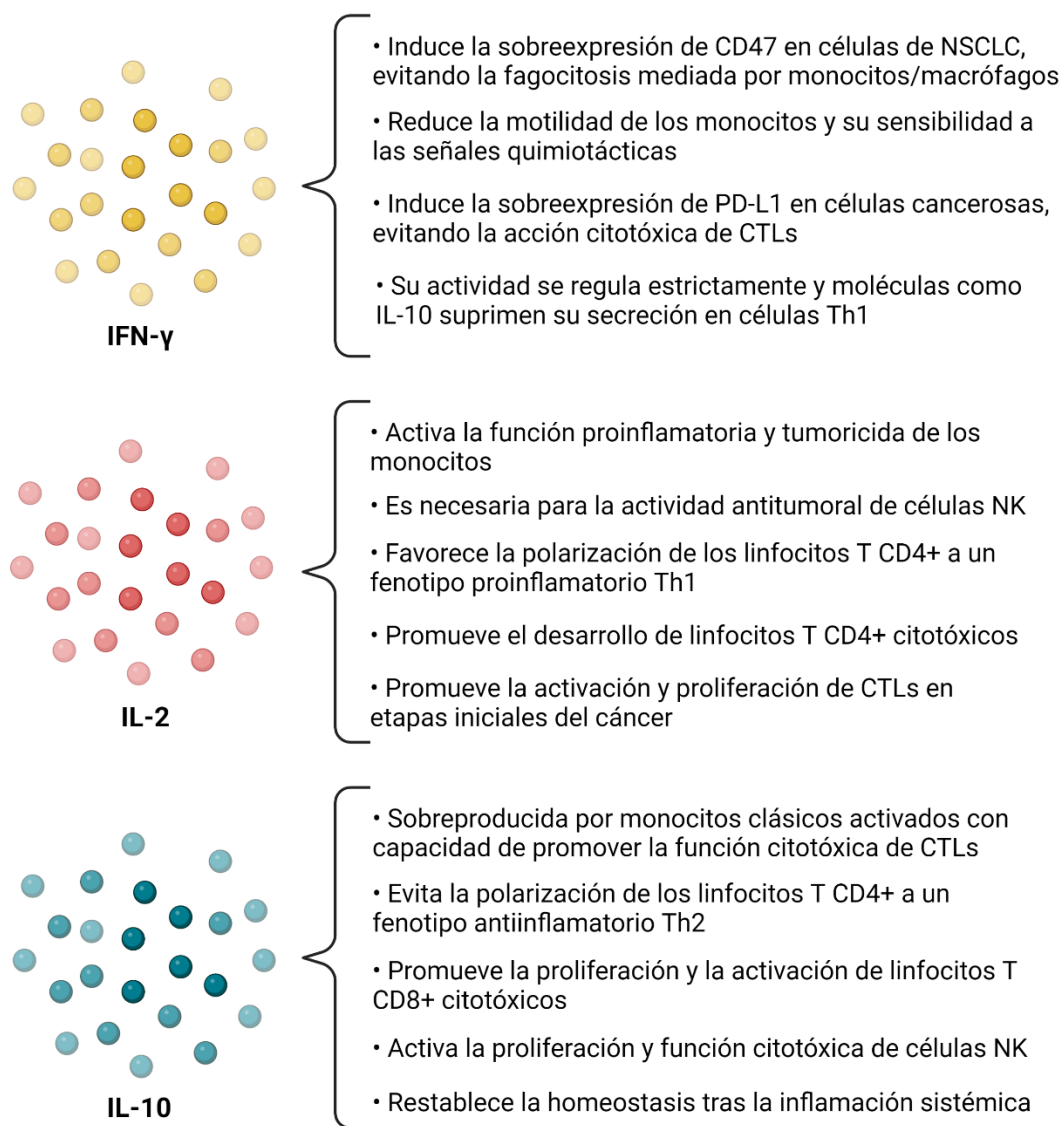


Figura 37. Resumen de la acción de las citocinas evaluadas. Se enlistan las posibles explicaciones para los niveles de citocinas observados en los ratones inmunizados, con aumento de la IL-2 y la IL-10 en el grupo A549<sub>CTRL</sub>, disminución de la IL-10 en el grupo A549<sub>NED</sub> y mantenimiento de los niveles basales de IFN- $\gamma$  en todos los grupos (Cai y col., 1999; Bosco y col., 2000; Groth y col., 2011; Liao y col., 2013; Oft, 2014; Dallagi y col., 2015; Wynn y col., 2015; Kalia y Sarkar, 2018; Ouyang y O'Garra, 2019; Pistillo y col., 2020; Affandi y col., 2021; Oh y Fong, 2021; Qu y col., 2022). Imagen creada en BioRender.com, con derechos y licencia de publicación bajo el acuerdo BD248VAF17.

## 6.8. Cocultivos entre A549 y PBMCs

Después de haber sometido las células A549<sub>CTRL</sub> y A549<sub>NED</sub> a cocultivos con PBMCs (pre-activadas con PHA o sin pre-activar), se determinó la viabilidad tanto de las células de cáncer como de los leucocitos murinos.

En el cocultivo entre células A549<sub>CTRL</sub> y PBMCs activados con PHA, se redujo significativamente la viabilidad de las células de cáncer, es decir, las mononucleares tuvieron la capacidad de ejercer su acción citotóxica sobre ellas. Esto tiene sentido considerando todos los resultados debido a que fue justo la inmunización con este tipo de células A549 la que generó una respuesta aparentemente antitumorígenica en los ratones. Como ya se discutió anteriormente, diversas células del sistema inmunitario tienen la capacidad de efectuar de manera directa la muerte de las células cancerosas, entre las que se encuentran los neutrófilos, los monocitos, los macrófagos, las células NK, las células dendríticas y los linfocitos T (Gun y col., 2019; Olingy y col., 2019). De todas las anteriores, solo los neutrófilos y los macrófagos no forman parte de las PBMCs, por lo que sería posible atribuir las propiedades citotóxicas observadas a cualquiera de las otras poblaciones.

Los monocitos forman parte de la respuesta inmunitaria innata, teniendo la capacidad de reconocer células aberrantes sin necesidad de una activación previa. Puesto que en nuestra investigación esta población celular presentó un aumento en los ratones que fueron inmunizados con células A549<sub>CTRL</sub>, suponemos que estos reconocieron a las células de cáncer, efectuando parcialmente la citotoxicidad observada, la cual es inducida por citocinas (TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$ ) y finalizada por fagocitosis (Olingy y col., 2019; Malireddi y col., 2021).

Por su parte, las células NK también son parte de la primera línea de defensa del sistema inmunitario, y son capaces de activarse mediante el reconocimiento de la ausencia o presencia de diferentes estímulos, como se describió en la introducción. Podemos atribuir parte de la citotoxicidad observada a estas células, pues son de las células del sistema inmunitario más agresivas y efectivas en contra de las células cancerosas (Wu y col., 2017).

En particular, los linfocitos T CD8+ y CD4+ citotóxicos también pudieron haber jugado un papel importante en la respuesta observada, pues la citotoxicidad se observó en los cocultivos con células que habían sido pre-activadas con PHA. La PHA es una lectina originalmente aislada de *Phaseolus vulgaris*, cuya actividad mitogénica y activadora en los linfocitos T se conoce desde hace décadas (Gibbs y col., 1982). Esta lectina tiene la capacidad de unirse a azúcares específicas en ciertas proteínas de membrana –entre ellos el TCR–, induciendo la expresión del factor nuclear de células T activadas (NFAT, por sus siglas en inglés), desencadenando una respuesta similar a aquellas generadas por las células presentadoras de antígenos (Macian, 2005).

Finalmente, activar a los linfocitos T previo a los cocultivos parece haber sido un factor clave para que las PBMCs demostraran actividad citotóxica, pues en los experimentos con células sin preactivación no se observó la misma respuesta. Esto es coherente considerando la capacidad de los linfocitos T activados tanto para organizar la respuesta inmunitaria – a través de la secreción de citocinas – como para ejercer funciones citotóxicas directas. Por ejemplo, está documentada la capacidad de los linfocitos T para secretar IL-2 en respuesta a PHA (Gerosa y col., 1986). Como ya se discutió, la IL-2 es una citocina proinflamatoria sumamente importante en la activación de la respuesta efectora de las diferentes células del sistema inmunitario, como los monocitos, las NK y los linfocitos T citotóxicos (Bosco y col., 2000; Kalia y Sarkar, 2018; Spolski y col., 2018). También sería posible que esta preactivación haya favorecido la expansión clonal de células antígeno-específicas, pues todos los elementos necesarios para este proceso estaban presentes, como las células presentadoras de antígeno, citocinas proinflamatorias como la IL-2 o la IL-12, exposición prolongada al antígeno y coestimulación (Sivanandham y col., 1991; Curtsinger y col., 2003; Kumar y col., 2018).

No descartamos la posibilidad de que, manteniendo los cocultivos durante más tiempo, los procesos naturales de las células del sistema inmunológico generen todos los elementos necesarios para ejercer su función citotóxica, produciendo

citocinas que permitan la acción efectora de los monocitos y NK, polarizando las células T a un fenotipo Th1 y generando linfocitos T citotóxicos antígeno-específicos.

Tal como se esperaba, se presentó una inhibición de la actividad citotóxica en los cocultivos con células A549<sub>NED</sub> por parte de las células mononucleares. Este resultado coincide con el perfil observado en los resultados de citometría de flujo y de citocinas, que sugerían que la respuesta inmunitaria generada estaba polarizada hacia funciones protumorigénicas. Cabe resaltar que, en presencia de las PBMCs pre-activadas con PHA, las células A549<sub>NED</sub> tuvieron la capacidad de proliferar, pues se observó un aumento en la viabilidad con respecto al control. Esto significa que, no solo las células mononucleares fueron incapaces de matar a las de cáncer con un fenotipo neuroendocrino, sino que estas últimas tuvieron la habilidad de aprovechar factores secretados por los leucocitos para promover su crecimiento, como suele verse en pacientes con cáncer. Esto es congruente bajo nuestra teoría de que los linfocitos T se polarizaron a fenotipos Th2 y Treg en presencia de las células A549<sub>NED</sub>, pues estas células tienen la capacidad de producir citocinas como IL-4 e IL-13 (Th2) y TGF- $\beta$  (Treg), cuya actividad promotora de la proliferación celular se ha documentado ampliamente (Futakuchi y col., 2019; Shi y col., 2021; Wu y col., 2021).

En la Figura 38 se resume la propuesta de los mecanismos involucrados en la respuesta observada en los cocultivos, en los que, las PBMCs pre-activadas con PHA fueron capaces de matar únicamente a las células A549<sub>CTRL</sub>, pero no a las A549<sub>NED</sub>, las cuales incluso tuvieron la capacidad de proliferar en presencia de las mononucleares.

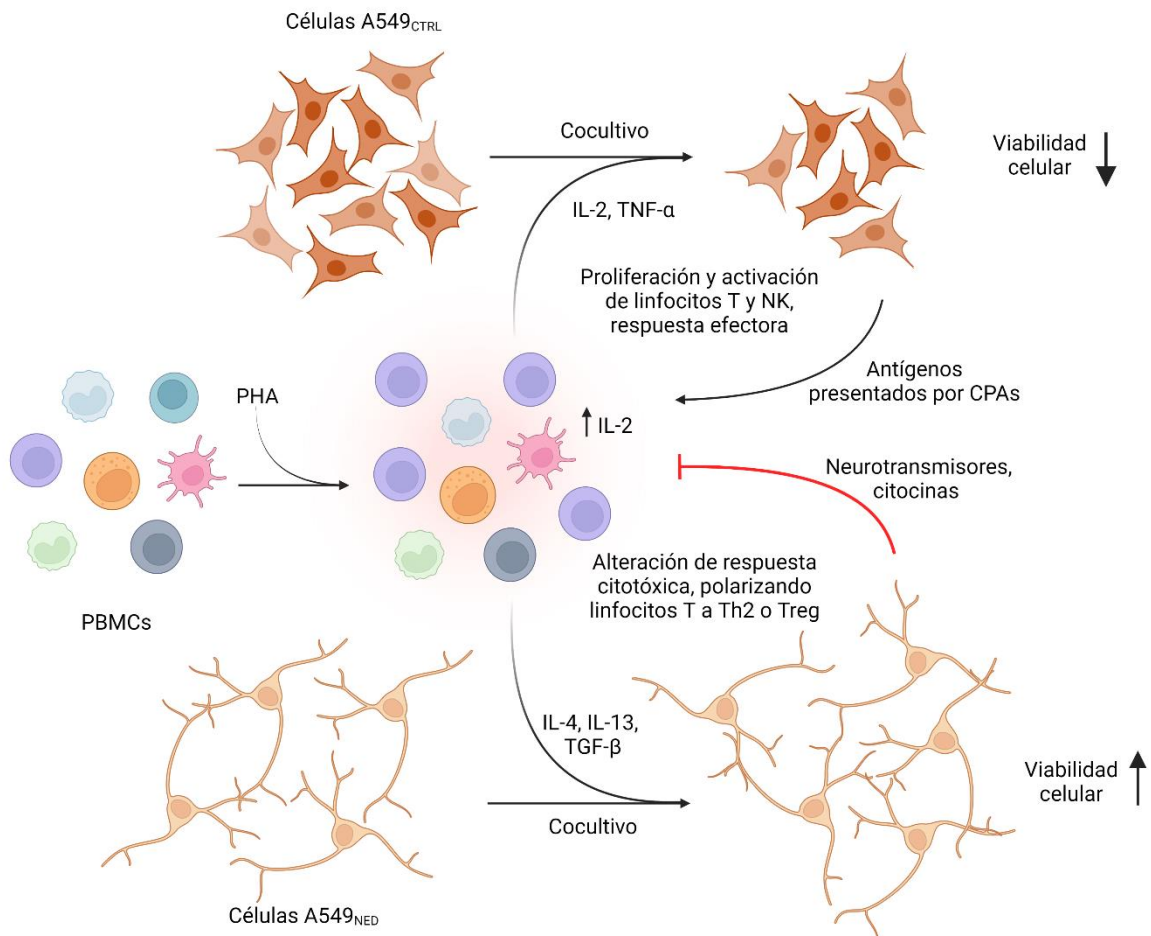


Figura 38. Mecanismos celulares involucrados en los cocultivos. Teorizamos que la preactivación de las PBMCs causó la producción de IL-2, activando células NK y monocitos, que ejercieron su función efectora sobre las células A549<sub>CTRL</sub>; esto favoreció la presentación de antígenos, permitiendo la activación y expansión de los linfocitos T. Las células A549<sub>NED</sub>, posiblemente a través de moléculas como la serotonina, la norepinefrina, y la IL-4, causaron la polarización de los linfocitos T hacia Th2 y Treg, inhibiendo la actividad citotóxica y secretando citocinas que favorecen la proliferación de las células cancerosas (Gerosa y col., 1986; Kumar y col., 2018; Futakuchi y col., 2019; Olingy y col., 2019; Malireddi y col., 2021; Shi y col., 2021; Wu y col., 2021). Imagen creada en BioRender.com, con derechos y licencia de publicación bajo el acuerdo QW24913ZV0.

Cuando las PBMCs pre-activadas con PHA se cocultivaron con células A549<sub>CTRL</sub>, las células mononucleares aumentaron en número de forma significativa con respecto al control, es decir, tuvieron la capacidad de proliferar. Estos resultados concuerdan con lo esperado considerando que la activación de las células del sistema inmunitario normalmente está asociada a la proliferación de las mismas, especialmente en el

caso de los linfocitos T (Shi y col., 2009). Sabemos que las células que proliferan en este contexto no son los monocitos, mismas que vimos aumentadas en la circulación de ratones, pues estas se desarrollan principalmente en la médula ósea y pierden su potencial proliferativo fuera de ella (Richards y col., 2013). Las células NK sí tienen la capacidad de proliferar *in vitro* tras su activación; incluso, este proceso se ha documentado al cocultivarlas en presencia de IL-2 –que sabemos que se eleva por el tipo de linfocitos estimulados (Perussia y col., 1987). Además, considerando que la diferencia significativa en la proliferación se vio en el grupo de PBMCs tratadas con PHA, un mitógeno específico para linfocitos T, es posible inferir que ésta fue la población principal que se dividió. Estos resultados también tienen un respaldo en la literatura, pues la proliferación de PBMCs en respuesta a PHA está bien documentada para diferentes especies (Deendayalan y col., 2013; Ciliberti y col., 2017).

Sin embargo, puesto que en el cocultivo entre PBMCs no pre-activadas y células A549<sub>CTRL</sub> también se observó proliferación de las células mononucleares, no podemos atribuir totalmente esta respuesta a la acción de la PHA. En este caso, se propone que la proliferación de las células mononucleares a la activación de los linfocitos T y células NK directamente por el reconocimiento de las células A549. Asimismo, teorizamos que de haber dejado los cocultivos por más tiempo, habríamos observado una mayor proliferación de las células mononucleares, a medida que se daba el proceso de expansión clonal acompañado por la producción de citocinas como IL-2.

Interesantemente, al cocultivar PBMCs con células A549<sub>NED</sub>, la viabilidad de las células mononucleares disminuyó significativamente con respecto al control; esto implica que las células de cáncer neuroendocrinas tuvieron la capacidad de inducir la muerte de algunas células del sistema inmunitario.

En conjunto, nuestros resultados concuerdan con los reportados por Mendieta y col. en 2018, pues en su modelo, cocultivos entre una línea celular de linfocitos T citotóxicos (Jurkat) y células A549 o A549<sub>NED</sub> también mostraron que la capacidad

citotóxica disminuye en presencia de células con fenotipo neuroendocrino, pero no en presencia de células cancerosas normales. Además, en este estudio la viabilidad de los linfocitos también disminuyó en presencia de las células A549<sub>NED</sub>, demostrando que los factores neuroendocrinos que secretan las células tienen la capacidad de inducir la muerte de células del sistema inmunitario (Mendieta y col., 2018).

Igualmente, en el modelo de Mendieta y col. se encontró que las células A549 con fenotipo neuroendocrino producen niveles elevados de serotonina, mientras que la producción de dopamina se reduce hasta niveles indetectables (Mendieta y col., 2018). Esto es importante, pues se sabe que todas las células del sistema inmunitario expresan componentes serotoninérgicos y dopaminérgicos, respondiendo de diferentes formas a este neurotransmisor.

Además, existe evidencia de que los monocitos pierden la capacidad de secretar citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en presencia de la serotonina, y que este neurotransmisor suprime la fagocitosis mediada por IFN- $\gamma$ , así como la capacidad de los macrófagos para presentar antígenos (Herr y col., 2017). En cuanto a las NK, existen reportes que indican que estas células tienen mayor capacidad citolítica y proliferativa en presencia de serotonina (Herr y col., 2017), mientras que otros estudios únicamente encontraron mayores capacidades migratorias y no mayor actividad citotóxica en respuesta al neurotransmisor (Zimmer y col., 2017), sin embargo, los mecanismos de respuesta no han sido estudiados.

En el caso de los linfocitos T también existen diversas respuestas a 5-HT en función del receptor que se esté activando; se ha reportado que la serotonina inhibe la proliferación de linfocitos T mediada por PHA (Arreola y col., 2015), lo cual concuerda con nuestros resultados, pues las células A549<sub>NED</sub> bloquearon por completo la capacidad proliferativa de las células mononucleares. Por otro lado, se ha visto que la serotonina en bajas concentraciones causa la proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+ murinos, pero reduce su capacidad de activación (Arreola y col., 2015). Además, está documentado que la serotonina induce la diferenciación de los



linfocitos T a un fenotipo Treg (Wan y col., 2020), apoyando nuestra teoría sobre la polarización de esta subpoblación. Además, existen estudios que demuestran el potencial apoptótico de la serotonina en linfocitos activados por mitógeno (Stefulj y col., 2002), lo cual podría explicar la disminución en la viabilidad de las PBMCs en presencia de células A549<sub>NED</sub>.

En la Figura 39 se resumen los efectos de la serotonina sobre las células del sistema inmunitario.

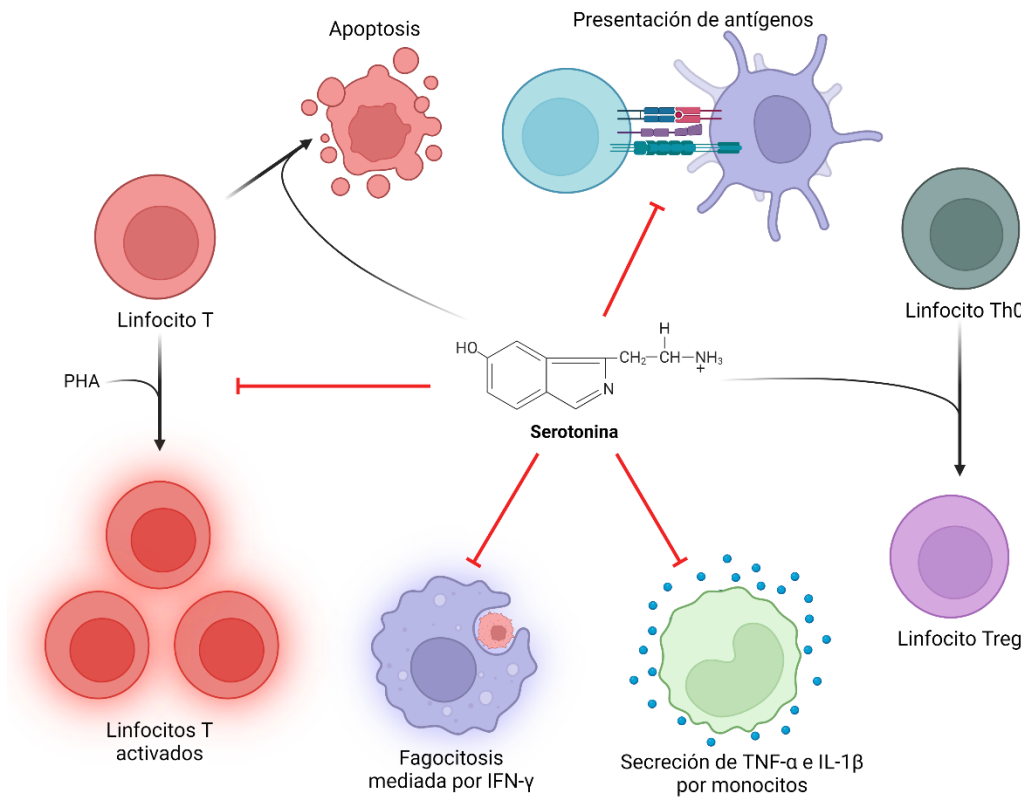


Figura 39. Efecto de la serotonina sobre las células del sistema inmunitario. Se ilustran los efectos que puede tener la serotonina sobre las células del sistema inmunitario, explicando porqué las células A549<sub>NED</sub> (que sobreproducen este neurotransmisor) causan un perfil inmunosupresor (Stefulj y col., 2002; Arreola y col., 2015; Herr y col., 2017; Wan y col., 2020). Imagen creada en BioRender.com, con derechos y licencia de publicación bajo el acuerdo LI2491L2S9.

La dopamina, dependiendo del receptor que active, también tiene diversos efectos sobre las células. Por ejemplo, se ha visto que este neurotransmisor, a través de receptores tipo D1, incrementa la migración y adhesión de monocitos en pacientes

con VIH (Coley y col., 2015). Por su parte, estudios en macrófagos han demostrado que la dopamina incrementa su capacidad fagocítica (Arreola y col., 2016). Además, se ha visto que la estimulación con dopamina aumenta la capacidad citotóxica de células NK en contra de líneas celulares de cáncer, también a través de receptores tipo D1 (Zhao y col., 2013; Capellino y col., 2020). Estos reportes darían cuenta de la importancia de que las células A549<sub>NED</sub> regulen a la baja la producción de dopamina. Por su parte, en los linfocitos T la dopamina parece tener efectos contradictorios, inhibiendo la apoptosis al actuar sobre receptores tipo D1, causando también la expresión de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-10 y favoreciendo la migración y extravasación de linfocitos T citotóxicos; sin embargo, también se ha reportado que este neurotransmisor afecta la proliferación y activación de los linfocitos, incluso causando apoptosis, todo esto a altas concentraciones (Arreola y col., 2016).

En la Figura 40 se resumen los efectos de la dopamina sobre las células del sistema inmunológico al estimular los receptores tipo D1.

Finalmente, existen reportes que indican que la norepinefrina, un neurotransmisor, puede inducir la polarización de las respuestas inmunitarias hacia un fenotipo Th2, además de que la estimulación de células de cáncer de próstata con esta hormona causa que éstas adquieran mayor potencial migratorio (Martino y col., 2012; Barbieri y col., 2015). Por lo tanto, sería necesario medir los niveles de este neurotransmisor en nuestro modelo de cáncer neuroendocrino, buscando determinar si se eleva su producción – lo cual también explicaría parcialmente la respuesta inmunoevasora observada.

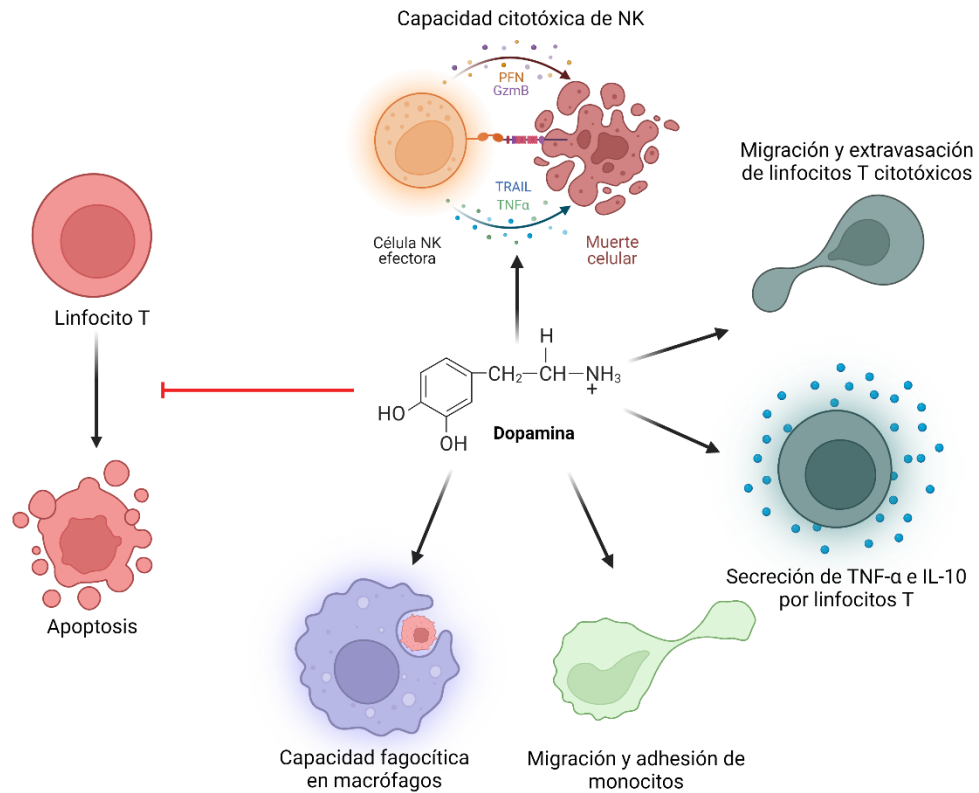


Figura 40. Efecto de la dopamina sobre las células del sistema inmunitario. Se ilustran los efectos que puede tener la dopamina al activar receptores tipo D1, explicando porqué las células A549<sub>NED</sub> eliminan la producción de esta molécula, causando un perfil inmunosupresor (Coley y col., 2015; Zhao y col., 2013; Arreola y col., 2016; Capellino y col., 2020). Imagen creada en BioRender.com, con derechos y licencia de publicación bajo el acuerdo WF2491RK4R.

## 7. CONCLUSIONES

Este estudio proporciona evidencia que sugiere que la diferenciación neuroendocrina de células de adenocarcinoma pulmonar induce una respuesta inmunosupresora en células mononucleares de sangre periférica de ratón.

Demostramos que las células mononucleares de sangre periférica son capaces de inducir la muerte de células A549, pero pierden esta actividad citotóxica cuando se enfrentan a células de cáncer que adquirieron un fenotipo neuroendocrino.

Probamos que las células del sistema inmunitario sufren un proceso de muerte celular al enfrentarse a células A549 neuroendocrinas, mientras que en presencia de células A549 sin diferenciar, las células mononucleares proliferan y se activan.

En estudios *in vivo*, identificamos que existen diferencias significativas entre los perfiles de células inmunitarias y de citocinas que se generan al inmunizar ratones con células A549 sin diferenciación o con células A549 neuroendocrinas.

Es necesario realizar más estudios *in vivo* e *in vitro*, empleando diferentes marcadores de superficie que permitan identificar exactamente el tipo de subpoblación celular que sufre los cambios en presencia de las células de cáncer, así como las moléculas expresadas por las células A549<sub>NED</sub>.

## REFERENCIAS

**Abbas** A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. 9a edición. Barcelona: Elsevier España, **2018**:154-156.

**Abel** AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. *Frontiers in Immunology*. **2018**;9:1-23.

ACS. American Cancer Society. About lung cancer [monografía en internet]. California: American Cancer Society, 2019 [consultado 2020 diciembre 6]. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/about.html>.

**Adam** JK, Odhav B, Bhoola KD. Immune responses in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. **2003**;99:113-132.

**Affandi** A, Olesek K, Grabowska J, Nijen Twilhaar M, Rodríguez E, Saris A, den Haan J. CD169 defines activated CD14+ monocytes with enhanced CD8+ T cell activation capacity. *Frontiers in Immunology*. **2021**;12.

**Arreola** R, Alvarez-Herrera S, Pérez-Sánchez G, Becerril-Villanueva E, Cruz-Fuentes C, Flores-Gutierrez E, Pavón L. Immunomodulatory effects mediated by dopamine. *Journal of Immunology Research*. **2016**:1-32.

**Arreola** R, Becerril-Villanueva E, Cruz-Fuentes C, Velasco-Velázquez MA, Garcés-Alvarez ME, Hurtado-Alvarado G, Quintero-Fabian S, Pavón L. Immunomodulatory effects mediated by serotonin. *Journal of Immunology Research*. **2015**:1-21.

**Ashok** C, Selvam M, Ponne S, Parcha P, Raja K, Baluchamy S. CREB acts as a common transcription factor for major epigenetic repressors; DNMT3B, EZH2, CUL4B and E2F6. *Medical Oncology*. **2020**;37(8):68.

**Barbieri** A, Bimonte S, Palma G, Luciano A, Rea D, Giudice A, Scognamiglio G, La Mantia E, Franco R, Perdonà S, De Cobelli O, Ferro M, Zappavigna S, Stiuso P, Caraglia M, Arra C. The stress hormone norepinephrine increases migration of prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Oncology*. **2015**;47(2):527-534.

**Balboa** D, Saarimäki-Vire J, Borshagovski D, Survila M, Lindholm P, Galli E, Timo Otonkoski. Insulin mutations impair beta-cell development in a patient-derived iPSC model of neonatal diabetes. *eLife*. **2018**;7.

**Bang** Y, Pirnia F, Fang W, Kang W, Sartor O, Whitesell L, Trepel J. Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1994**;91(12):5330-5334.

Bio-Rad. Cell Frequencies in Common Samples [monografía en internet]. California: Bio-Rad Laboratories, Inc., 2022 [consultado 18 julio 2022]. Disponible en: <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-cell-frequency.html>.

**Blank** CU, Haanen JB, Ribas A, Schumacher TN. The “cancer immunogram”. *Science*. **2016**;352:658-660.

**Bleul** T, Zhuang X, Hildebrand A, Lange C, Böhringer D, Schlunck G, Reinhard T, Lapp T. Different Innate Immune Responses in BALB/c and C57BL/6 Strains following Corneal Transplantation. *Journal of Innate Immunity*. **2021**;13(1):49-59.

**Bobbo** V, Engel D, Jara C, Mendes N, Haddad-Tovolli R, Prado T, Araujo P. Interleukin-6 actions in the hypothalamus protects against obesity and is involved in the regulation of neurogenesis. *Journal of Neuroinflammation*. **2021**;18(1).

**Bohner** P, Chevalier M, Cesson V, Rodrigues-Dias S, Dartiguenave F, Burruni R, Derré L. Double Positive CD4+CD8+ T Cells Are Enriched in Urological Cancers and Favor T Helper-2 Polarization. *Frontiers in Immunology*. **2019**;10.

**Bosco** M, Curiel R, Zea A, Malabarba M, Ortaldo J, Espinoza-Delgado I. IL-2 signaling in human monocytes involves the phosphorylation and activation of p59hck1. *The Journal of Immunology*. **2000**;164:4575-4585.

**Breitenecker** K, Homolya M, Luca AC, Lang V, Trenk C, Petroczi G, Mohrherr J, Horvath J, Moritsch S, Haas L, Kurnaeva M, Eferl R, Stoiber D, Moriggl R, Bilban M, Obenauf AC, Ferran C, Dome B, Laszlo V, Moll HP. Down-regulation of A20 promotes

immune escape of lung adenocarcinomas. *Science Translational Medicine*. **2021**;13(601):1-16.

**Brown D**, Kamperschroer C, Dilzer A, Roberts D, Swain S. IL-2 and antigen dose differentially regulate perforin- and FasL-mediated cytolytic activity in antigen specific CD4+ T cells. *Cellular Immunology*. **2009**;257(1-2):69-79.

**Cai G**, Kastelein R, Hunter C. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18. *European Journal of Immunology*. **1999**;29(9):2658-2665.

**Capellino S**, Claus M, Watzl C. Regulation of natural killer cell activity by glucocorticoids, serotonin, dopamine, and epinephrine. *Cellular & Molecular Immunology*. **2020**;17(7):705-711.

**Carles J**, Rosell R, Ariza A, Pellicer I, Sanchez J, Fernandez-Vasalo G, Barnadas A. Neuroendocrine differentiation as a prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. **1993**;10(3-4):209-219.

**Cersosimo RJ**. Lung cancer: a review. *Am J Health-Syst Pharm*. **2002**;59:611-642.

**Chang Y**, Kim S, Choi Y, So K, Rho J, Kim W et al. Neuroendocrine differentiation in acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*. **2013**;75(3):95-103.

**Cheng L**, Öhlén C, Nelson B, Greenberg P. Enhanced signaling through the IL-2 receptor in CD8 + T cells regulated by antigen recognition results in preferential proliferation and expansion of responding CD8 + T cells rather than promotion of cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2002**;99(5):3001-3006.

**Chistiakov D**, Killingsworth M, Myasoedova V, Orekhov A, Bobryshev Y. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation*. **2017**;97(1):4-13.

**Ciliberti M**, Albenzio M, Inghese C, Santillo A, Marino R, Sevi A, Caroprese M. Peripheral blood mononuclear cell proliferation and cytokine production in sheep as

affected by cortisol level and duration of stress. *Journal of Dairy Science*. **2017**;100(1):750-756.

**Cindolo** L, Franco R, Cantile M, Schiavo G, Liguori G, Chiodini P, Salzano L, Autorino R, Di Blasi A, Falsaperla M, Feudale E, Botti G, Gallo A, Cillo C. NEUROD1 expression in human prostate cancer: can it contribute to neuroendocrine differentiation comprehension? *European Urology*. **2007**;52(5):1365-1373.

**Clénet** M, Gagnon F, Moratalla A, Viel E, Arbour N. Peripheral human CD4+CD8+ T lymphocytes exhibit a memory phenotype and enhanced responses to IL-2, IL-7 and IL-15. *Scientific Reports*. **2017**;7(1).

**Coley** J, Calderon T, Gaskill P, Eugenin E, Berman J. Dopamine increases CD14+CD16+ monocyte migration and adhesion in the context of substance abuse and HIV neuropathogenesis. *PLOS ONE*. **2015**;10(2):e0117450.

**Corthay** A, Skovseth DK, Lundin KU, Røsjø E, Omholt H, Hofgaard PO, Haraldsen G, Bogen B. Primary antitumor immune response mediated by CD4 + T cells. *Immunity*. **2005**;22:371-383.

**Coussens** L, Zitvogel L, Palucka A. Neutralizing Tumor-Promoting Chronic Inflammation: A Magic Bullet? *Science*. **2013**;339(6117):286-291.

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

**Cox** M, Deeble P, Bissonette E, Parsons S. Activated 3',5'-cyclic AMP-dependent protein kinase is sufficient to induce neuroendocrine-like differentiation of the LNCaP prostate tumor cell line. *Journal of Biological Chemistry*. **2000**;275(18):13812-13818.

**Curtsinger** J, Johnson C, Mescher M. CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. *The Journal of Immunology*. **2003**;171(10):5165-5171.



**Dallagi** A, Girouard J, Hamelin-Morrisette J, Dadzie R, Laurent L, Vaillancourt C, Reyes-Moreno C. The activating effect of IFN- $\gamma$  on monocytes/macrophages is regulated by the LIF–trophoblast–IL-10 axis via Stat1 inhibition and Stat3 activation. *Cellular & Molecular Immunology*. **2015**;12(3):326-341.

**Deeble** P, Murphy D, Parsons S, Cox M. Interleukin-6- and cyclic AMP-mediated signaling potentiates neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate tumor cells. *Molecular and Cellular Biology*. **2001**;21(24):8471-8482.

**Deenadayalan** A, Maddineni P, Raja A. Comparison of whole blood and PBMC assays for T-cell functional analysis. *BMC Research Notes*. **2013**;6:120.

**Dolina** J, Van Braeckel-Budimir N, Thomas G, Salek-Ardakani S. CD8+ T Cell Exhaustion in Cancer. *Frontiers in Immunology*. **2021**;12.

**Dong** Y, Li Y, Liu R, Li Y, Zhang H, Liu H et al. Secretagoin, a marker for neuroendocrine cells, is more sensitive and specific in large cell neuroendocrine carcinoma compared with the markers CD56, CgA, Syn and Napsin A. *Oncology Letters*. **2020**;19:2223-2230.

**Espinoza-Delgado** I, Bosco M, Musso T, Gusella G, Longo D, Varesio L. Interleukin-2 and human monocyte activation. *Journal of Leukocyte Biology*. **1995**;57(1):13-19.

**EI-Sabah** M, Hassan M. Neuroendocrine differentiation in non-small cell lung cancer and its relation to different pathologic features: An immunohistochemical study. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology*. **2021**;6(1):49-55.

**Farhood** B, Najafi M, Mortezaee K. CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: a review. *Journal of Cellular Physiology*. **2019**;234(6):8509-8521.

GCO. Global Cancer Observatory. Cancer today [monografía en internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2021 [consultado 2021 febrero 3]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars>.

**Feng F**, Zheng G, Wang Q, Liu S, Liu Z, Xu G, Zhang H. Low lymphocyte count and high monocyte count predicts poor prognosis of gastric cancer. *BMC Gastroenterology*. **2018**;18(1).

**Futakuchi M**, Lami K, Tachibana Y, Yamamoto Y, Furukawa M, Fukuoka J. The effects of TGF- $\beta$  signaling on cancer cells and cancer stem cells in the bone microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*. **2019**;20(20):5117.

**Gerosa F**, Mingari M, Moretta L. Interleukin-2 production in response to phytohemagglutinin is not necessarily dependent upon the T3-mediated pathway of T-cell activation. *Clinical Immunology and Immunopathology*. **1986**;40(3):525-531.

**Giatromanolaki A**, Mitrakas A, Anestopoulos I, Kontosis A, Koukourakis I, Pappa A, Koukourakis M. Expression of CD47 and SIRP $\alpha$  macrophage immune-checkpoint pathway in non-small-cell lung cancer. *Cancers*. **2022**;14(7):1801.

**Gibbs J**, Potts R, Brown R, Robertson A, Beck J. Mechanisms of phytohaemagglutinin (PHA) stimulation of normal human lymphocytes: 'trigger' 'push' or both? *Cell Tissue Kinet*. **1982**;15(2):131-137.

**Gonzalez H**, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes & Development*. **2018**;32:1267-1284.

**Gonzalez-Mancera M**, Bolaños N, Salamanca M, Orjuela G, Rodriguez A, Gonzalez J. Percentages of CD4+CD8+ double-positive T lymphocytes in the peripheral blood of adults from a blood bank in Bogotá, Colombia. *Turkish Journal of Hematology*. **2019**;37:36-41.

**Grobholz R**, Bohrer M, Siegsmond M, Jünemann KP, Bleyl U, Woenckhaus M. Correlation between neovascularisation and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Pathology, Research and Practice*. **2000**;196(5):277-284.

**Groth A**, Klöss S, Pogge von Strandmann E, Koehl U, Koch J. Mechanisms of tumor and viral immune escape from Natural Killer cell-mediated surveillance. **2011**;3:344-354.

**Gun S**, Lee S, Sieow J, Wong S. Targeting immune cells for cancer therapy. *Redox Biology*. **2019**;25:101174.

**Hadad U**, Thauland T, Martinez O, Butte M, Porgador A, Krams S. NKp46 clusters at the immune synapse and regulates NK cell polarization. **2015**;6.

**Halle S**, Halle O, Förster R. Mechanisms and dynamics of T cell-mediated cytotoxicity *in vivo*. *Trends in Immunology*. **2017**;38(6):432-443.

**Hamm A**, Prenen H, Van Delm W, Di Matteo M, Wenes M, Delamarre E, Mazzone M. Tumour-educated circulating monocytes are powerful candidate biomarkers for diagnosis and disease follow-up of colorectal cancer. *Gut*. **2015**;65(6):990-1000.

**Han D**, Xu H, Yan WQ. Cytotoxic activity of spleen lymphocytes in BALB/c mice immunized by HSP110-HER2/neu ICD. *Chinese Journal of Oncology*. **2012**;34(1):11-4.

**Hanna R**, Cekic C, Sag D, Tacke R, Thomas G, Nowyhed H, Hedrick C. Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science*. **2015**;350(6263):985-990.

**Herr N**, Bode C, Duerschmied D. The effects of serotonin in immune cells. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. **2017**;4:48

**Hiroshima K**, Iyoda A, Shibuya K, Toyozaki T. Prognostic significance of neuroendocrine differentiation in adenocarcinoma of the Lung. *The Annals of Thoracic Surgery*. **2002**;73:1732-1735.

**Hu CD**, Choo R, Huang J. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: a mechanism of radioresistance and treatment failure. *Frontiers in Oncology*. **2015**;5:1-10.

**Huntington ND**, Cursons J, Rautela J. The cancer–natural killer cell immunity cycle. *Nature Reviews Cancer*. **2020**;20(8):437-454.

**Imam R**, Chang Q, Black M, Yu C, Cao W. CD47 expression and CD163+ macrophages correlated with prognosis of pancreatic neuroendocrine tumor. *BMC Cancer*. **2021**;21.

**Ito T**, Matsubara D, Tanaka I, Makiya K, Tanei ZI, Kumagai Y, Shiu SJ, Nakaoka HJ, Ishikawa S, Isagawa T, Morikawa T, Shinozaki-Ushiku A, Goto Y, Nakano T, Tsuchiya T, Tsubochi H, Komura D, Aburatani H, Dobashi Y, Murakami, Y. Loss of YAP1 defines neuroendocrine differentiation of lung tumors. *Cancer Science*. **2016**;107(10):1527-1538.

**Johansson M**, Denardo DG, Coussens LM. Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunology Reviews*. **2008**;222:145-54.

**Kalia V**, Sarkar S. Regulation of effector and memory CD8 T cell differentiation by IL-2 – A balancing act. *Frontiers in Immunology*. **2018**;9.

**Kashiwagi K**, Ishii J, Sakaeda M, Arimasu Y, Shimoyamada H, Sato H, Yazawa T. Differences of molecular expression mechanisms among neural cell adhesion molecule 1, synaptophysin, and chromogranin A in lung cancer cells. *Pathology International*. **2012**;62(4):232-245.

**Kiss M**, Caro A, Raes G, Laoui D. Systemic reprogramming of monocytes in cancer. *Frontiers in Oncology*. **2020**;10.

**Komiya A**, Suzuki H, Imamoto T, Kamiya N, Nihei N, Naya Y. Neuroendocrine differentiation in the progression of prostate cancer. *International Journal of Urology*. **2009**;16:37-44.

**Kumar B**, Connors T, Farber D. Human T cell development, localization, and function throughout life. *Immunity*. **2018**;48(2):202-213.

**Kong X**, Gong Z, Zhang L, Sun X, Ou Z, Xu B, Xuan A. JAK2/STAT3 signaling mediates IL-6-inhibited neurogenesis of neural stem cells through DNA demethylation/methylation. *Brain, Behavior, and Immunity*. **2019**;79:159-173.

**Lee H**, Jang J, Lee S, Yoo S, Kwon J, Nam S et al. Inflammatory cytokines and change of Th1/Th2 balance as prognostic indicators for hepatocellular carcinoma in patients treated with transarterial chemoembolization. *Scientific Reports*. **2019**;9(1).

**LFSA**. Ley Federal de Sanidad Animal. Diario Oficial de la Federación. **2018**.

**Li Q**, Zhang CS, Zhang Y. Molecular aspects of prostate cancer with neuroendocrine differentiation. *Chinese Journal of Cancer Research*. **2016**;28(1):122-129.

**Liao W**, Lin J, Leonard W. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*. **2013**;38(1):13-25.

**Lieberman J**. Anatomy of a murder: how cytotoxic T cells and NK cells are activated, develop, and eliminate their targets. *Immunological Reviews*. **2010**;235(1):5-9.

**Linnoila RI**, Mulshine JL, Steinberg SM, Funa M, Matthews MJ, Cotelingam JD, Gazdar AF. Neuroendocrine differentiation in endocrine and nonendocrine lung carcinomas. *American Journal of Clinical Pathology*. **1988**:641-652.

**Liu L**, Zhang L, Yang L, Li H, Li R, Yu J, Ren X. Anti-CD47 antibody as a targeted therapeutic agent for human lung cancer and cancer stem cells. *Frontiers in Immunology*. **2017**;8.

**Liu S**, Galat V, Galat Y, Lee Y, Wainwright D, Wu J. NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development. *Journal of Hematology & Oncology*. **2021a**;14(1).

**Liu Y**, Zhou N, Zhou L, Wang J, Zhou Y, Zhang T, Huang B. IL-2 regulates tumor-reactive CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion by activating the aryl hydrocarbon receptor. *Nature Immunology*. **2021b**;22(3):358-369.

**Luckheeram R**, Zhou R, Verma A, Xia B. CD4<sup>+</sup>T Cells: Differentiation and functions. *Clinical and Developmental Immunology*. **2012**;2012:1-12.

**Macian F**. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature Reviews Immunology*. **2005**;5(6):472-484.

**Malireddi R**, Karki R, Sundaram B, Kancharana B, Lee S, Samir P et al. Inflammatory cell death, PANoptosis, mediated by cytokines in diverse cancer lineages inhibits tumor growth. *ImmunoHorizons*. **2021**;5(7):568-580.

**Mariot P**, Vanoverberghe K, Lalevée N, Rossier M, Prevarskaya N. Overexpression of an  $\alpha 1H$  (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of

human prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. **2002**;277(13):10824-10833.

**Martino** M, Rocchi G, Escelsior A, Fornaro M. Immunomodulation mechanism of antidepressants: Interactions between serotonin/norepinephrine balance and Th1/Th2 balance. *Current Neuropharmacology*. **2012**;10(2):97-123.

**Mattila** J. Regulation of growth by *Drosophila* FoxO transcription factor. Helsinki: Helsinki University Printing House, **2009**:7.

**Mendieta** I, Nuñez-Anita RE, Pérez-Sánchez G, Pavón L, Rodríguez-Cruz A, García-Alcocer G, Berumen LC. Effect of A549 neuroendocrine differentiation on cytotoxic immune response. *Endocrine Connections*. **2018**;7(5):791–802.

**Mimura** K, Teh J, Okayama H, Shiraishi K, Kua L, Koh V et al. PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer. *Cancer Science*. **2017**;109(1):43-53.

**Mukherjee** R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Scientific Reports*. **2015**;5(1).

**Mulshine** J, Ihde D, Linnoila R, Veach S, Steinberg S, Woods E, Phelps R, Minna J, Gazdar A. Preliminary report of a prospective trial of neuroendocrine (NE) marker analysis and in vitro drug sensitivity (IVDS) testing in patients (Pts) with non-small cell lung cancer. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*. **1987**; 713.

**Munhoz** RR, Postow MA. Recent advances in understanding antitumor immunity. *F1000Research*. **2016**;5:1-8.

Myers DJ, Wallen JM. Lung adenocarcinoma [monografía en internet]. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2021 [consultado 2021 julio 18]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519578/>.

**National Research Council (US).** Institute for Laboratory Animal Research. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington (DC): National Academies Press, **1996**.

NCI. National Cancer Institute. Immunomodulating agent [monografía en internet]. Bethesda: NCI Dictionary of Cancer Terms, 2021a [consultado 2021 julio 23]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/immunomodulating-agent>.

NCI. National Cancer Institute. What is cancer? [monografía en internet]. Bethesda: National Institutes of Health, 2021b [consultado 2021 mayo 14]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.

**Nelson** EC, Cambio AJ, Yang JC, Ok JH, Lara PN, Evans CP. Clinical implications of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. Prostate Cancer and Prostatic Diseases. **2007**;10:6-14.

**NOM-062-ZOO-1999.** Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación. **2001**:107-165.

**O'Connell** K, Mikkola A, Stepanek A, Vernet A, Hall C, Sun C, Yildirim E, Staropoli J, Lee J, Brown D. Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research. Comparative Medicine. **2015**;65(2):96-113.

**Oft** M. IL-10: Master Switch from Tumor-Promoting Inflammation to Antitumor Immunity. Cancer Immunology Research. **2014**;2(3):194-199.

**Oh** D, Fong L. Cytotoxic CD4+ T cells in cancer: Expanding the immune effector toolbox. Immunity. **2021**;54(12):2701-2711.

**Olingy** C, Dinh H, Hedrick C. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. Journal of Leukocyte Biology. **2019**;106(2):309-322.

**Oronsky** B, Ma PC, Morgensztern D, Carter CA. Nothing but NET: a review of neuroendocrine tumors and carcinomas. Neoplasia. **2017**;19(12):991-1002.

**Orozco-Morales** M, Avilés-Salas A, Hernández-Pedro N, Catalán R, Cruz-Rico G, Colín-González A, Arrieta O. Clinicopathological and prognostic significance of CD47 expression in lung neuroendocrine tumors. *Journal of Immunology Research*. **2021**; 6632249:1-9.

**Osborne** JK, Larsen JE, Shields MD, Gonzales JX, Shames DS, Sato M, Kulkarni A, Wistuba II, Girard L, Minna JD, Cobb MH. NEUROD1 regulates survival and migration of neuroendocrine lung carcinomas via signaling molecules TrkB and NCAM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2013**;110(16):6524-6529.

**Ouyang** W, O'Garra A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*. **2019**;50(4):871-891.

**Overgaard** N, Jung J, Steptoe R, Wells J. CD4+/CD8+double-positive T cells: more than just a developmental stage? *Journal of Leukocyte Biology*. **2015**;97(1):31-38.

**Parel** Y, Chizzolini C. CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmunity Reviews*. **2004**;3(3):215-220.

**Park** Y, Song B, Kim Y, Kim E, Lee J, Lee G et al. Tumor microenvironmental conversion of Natural Killer cells into Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Research*. **2013**;73(18):5669-5681.

**Paul** S, Lal G. The molecular mechanism of Natural Killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. **2017**;8.

**Pavón** L, Bottasso O, Besedosky H, Loria R, Velasco-Velázquez MA. Clinical and experimental immunomodulation 2014. *Journal of Immunology Research*. **2015**:2-4.

**Pelosi** G, Pasini F, Sonzogni A, Maffini F, Maisonneuve P, Iannucci A, Viale G. Prognostic implications of neuroendocrine differentiation and hormone production in patients with stage I nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. **2003**;97(10):2487-2497.

**Perussia** B, Ramoni C, Anegon I, Cuturi M, Faust J, Trinchieri G. Preferential proliferation of natural killer cells among peripheral blood mononuclear cells



cocultured with B lymphoblastoid cell lines. *Natural Immunity and Cell Growth Regulation*. **1987**;6(4):171-188.

**Pinchuk** L, Filipov N. Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice. *Immunity & Ageing*. **2008**;5(1).

**Pistillo** M, Carosio R, Banelli B, Morabito A, Mastracci L, Ferro P et al. IFN- $\gamma$  upregulates membranous and soluble PD-L1 in mesothelioma cells: potential implications for the clinical response to PD-1/PD-L1 blockade. *Cellular & Molecular Immunology*. **2020**;17(4):410-411.

**Pommier** A, Lucas B, Prévost-Blondel A. Crucial role of inflammatory monocytes in antitumor immunity. *Oncot Immunology*. **2013**;2(11).

**Pourahmad** J, Salimi A. Isolated human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a cost-effective tool for predicting immunosuppressive effects of drugs and xenobiotics. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2015;14(4):979.

**Qu** S, Jiao Z, Lu G, Xu J, Yao B, Wang T, Zen K. Human lung adenocarcinoma CD47 is upregulated by interferon- $\gamma$  and promotes tumor metastasis. *Molecular Therapy - Oncolytics*. **2022**;25:276-287.

**Reuter** J. Subcutaneous injection of tumor cells. *Bio-protocol*. **2011**;1(24):1-2.

**Rha** M, Shin E. Activation or exhaustion of CD8+ T cells in patients with COVID-19. *Cellular & Molecular Immunology*. **2021**;18(10):2325-2333.

**Richards** D, Hettinger J, Feuerer M. Monocytes and macrophages in cancer: Development and functions. *Cancer Microenvironment*. **2013**;6(2):179-191.

**Rosenberg** J, Huang J. CD8+ T cells and NK cells: parallel and complementary soldiers of immunotherapy. *Current Opinion in Chemical Engineering*. **2018**;19:9-20.

**Roviello** D. The distinctive nature of adenocarcinoma of the lung. *OncoTargets and Therapy*. **2015**;8:2399-2406.

**Sang M**, Hulsurkar M, Zhang X, Song H, Zheng D, Zhang Y, Li M, Xu J, Zhang S, Ittmann M, Li W. GRK3 is a direct target of CREB activation and regulates neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells. *Oncotarget*. **2016**;7(29):45171-45185.

**Sanford D**, Belt B, Panni R, Mayer A, Deshpande A, Carpenter D, Linehan. Inflammatory monocyte mobilization decreases patient survival in pancreatic cancer: A role for targeting the CCL2/CCR2 axis. *Clinical Cancer Research*. **2013**;19(13):3404-3415.

**Sardenberg RA**, Mello ES, Younes RN. The lung adenocarcinoma guidelines: what to be considered by surgeons. *Journal of Thoracic Disease*. **2014**;6:561-567.

**Schluns K**, Lefrançois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nature Reviews Immunology*. **2003**;3(4):269-279.

**Shi J**, Song X, Traub B, Luxenhofer M, Kornmann M. Involvement of IL-4, IL-13 and their receptors in pancreatic cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. **2021**;22(6):2998.

**Shi M**, Lin TH, Appell K, Berg LJ. Cell cycle progression following naive T cell activation is independent of Jak3/common gamma-chain cytokine signals. *The Journal of Immunology*. **2009**;183(7):4493-4501.

**Shigeta K**, Kosaka T, Kitano S, Yasumizu Y, Miyazaki Y, Mizuno R, Oya M. High absolute monocyte count predicts poor clinical outcome in patients with castration-resistant prostate cancer treated with docetaxel chemotherapy. *Annals of Surgical Oncology*. **2016**;23(12):4115-4122.

**Singh P**, Raina V. Lung cancer: prevalent trends & emerging concepts. *Indian J Med Res*. **2015**;1:5-7.

**Sivanandham M**, Chakraborty N, Robbins G, Mukherji B. Clonal expansion of T cells following in vitro stimulation with autologous melanoma cells and interleukin-2 studied by molecular analysis of a T cell receptor. *Immunology Letters*. **1991**;28(2):155-159.

**Spolski R, Li P, Leonard W.** Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. *Nature Reviews Immunology*. **2018**;18(10):648-659.

**Stefulj J, Jakopec S, Osmak M, Jernej B.** Serotonin and apoptosis: Studies on rat lymphocytes. *Neuroimmunomodulation*. **2002**;10(3):132-133.

**Sun Y, Niu J, Huang J.** Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *American Journal of Translational Research*. **2009**;1(2):148-162.

**Terry S, Beltran H.** The many faces of neuroendocrine differentiation in prostate cancer progression. *Frontiers in Oncology*. **2014**;4:1-9.

**Travis WD.** Lung tumors with neuroendocrine differentiation. *European Journal of Cancer*. **1991**;45,251-266.

**Trunova GV, Makarova OV, Diatropov ME, Bogdanova IM, Mikchailova LP, Abdulaeva SO.** Morphofunctional characteristic of the immune system in BALB/c and C57Bl/6 mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. **2011**;151(1):99–102.

**Uzhachenko RV, Shanker A.** CD8+ T lymphocyte and NK cell network: Circuitry in the cytotoxic domain of immunity. *Frontiers in Immunology*. **2019**;10:1-7.

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

**Wan M, Ding L, Wang D, Han J, Gao P.** Serotonin: A potent immune cell modulator in autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology*. **2020**;11:186.

**Ward-Hartstonge KA, Kemp RA.** Regulatory T-cell heterogeneity and the cancer immune response. *Clinical & Translational Immunology*. **2017**;6(9):e154.

**Waschbisch A, Sammet L, Schröder S, Lee D, Barrantes-Freer A, Stadelmann C, Linker R.** Analysis of CD4+ CD8+ double-positive T cells in blood, cerebrospinal fluid and multiple sclerosis lesions. *Clinical and Experimental Immunology*. **2014**;177(2):404-411.

**Weinberg** RA. The biology of cancer. 2a ed. Nueva York: Garland Science, **2014**:31-39.

**Wu** W, Wang S, Wu C, Su Y, Chiang C, Lai C et al. IL-4 and IL-13 promote proliferation of mammary epithelial cells through STAT6 and IRS-1. International Journal of Molecular Sciences. **2021**;22(21):12008.

**Wu** Y, Tian Z, Wei H. Developmental and functional control of Natural Killer cells by cytokines. Frontiers in Immunology. **2017**;8.

**Wynn** T. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. Nature Reviews Immunology. **2015**;15(5):271-282.

**Zhao** H, Wang J, Kong X, Li E, Liu Y, Du X, Wang Q. CD47 promotes tumor invasion and metastasis in non-small cell lung cancer. Scientific Reports. **2016**;6(1).

**Zhao** W, Huang Y, Liu Z, Cao B, Peng Y, Qiu Y. (2013). Dopamine receptors modulate cytotoxicity of Natural Killer cells via cAMP-PKA-CREB signaling pathway. PLOS ONE. **2013**;8(6).

**Zhang** Y, Zheng D, Zhou T, Song H, Hulsurkar M, Su N, Liu Y, Wang Z, Shao L, Ittmann M, Gleave M, Han H, Xu F, Liao W, Wang H, Li W. Androgen deprivation promotes neuroendocrine differentiation and angiogenesis through CREB-EZH2-TSP1 pathway in prostate cancers. Nature Communications. **2018**;9(1):1-17.

**Zimmer** P, Bloch W, Kieven M, Lövenich L, Lehmann J, Holthaus M, Theurich S, Schenk A. Serotonin shapes the migratory potential of NK cells – An *in vitro* approach. International Journal of Sports Medicine. **2017**;38(11):857-863.