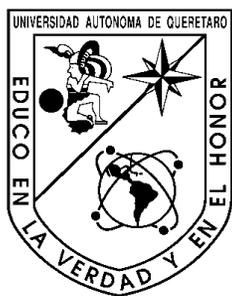


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO



FACULTAD DE QUÍMICA



Maestría en Ciencias Químico Biológicas

“EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE SEROTONINA (5-HT) Y MELATONINA (MLT) SOBRE LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

QFB. ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO

DIRIGIDA POR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO. OCTUBRE, 2014



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

"EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE SEROTONINA (5-HT) Y MELATONINA (MLT) SOBRE LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL"

Opción de titulación
Tesis

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

Presenta:

Q.F.B. ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO

Dirigido por:

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Presidente



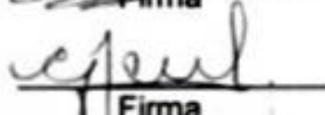
Firma

Dra. María Guadalupe García Alcocer
Secretario



Firma

Dra. Carmen Yolanda Aceves Velasco
Vocal



Firma

Dra. Rosa Elvira Núñez Anita
Suplente



Firma

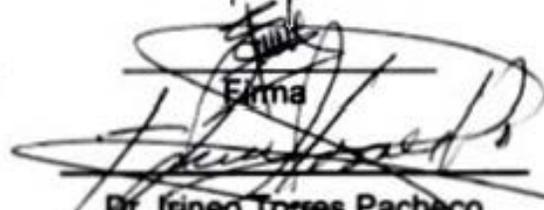
M. en C. Jesica Esther Escobar Cabrera
Suplente



Firma



M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad de Química



Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre, 2014

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la tutoría de la Dra. Laura Berumen Segura en el Unidad de investigación en Genética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Agradezco el apoyo técnico de QFB. Magdalena González Tello, QFB. Alfredo Rodríguez Cruz y Axel Guzman Solís.

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto: FOMIX-QRO-2012-C01-192-954) y por la UAQ (FOFI-UAQ2012/FCQ). El autor fue apoyado con una beca de Posgrado CONACYT (No. De beca: 353141).

DEDICATORIA

A mis padres por ser mi motor, inspiración y ejemplos de vida. A Mario por ser el soporte del que me aferro en los vendavales. A Raciél por el impulso todas las mañanas y el apoyo SIEMPRE. A Marco Antonio por cuidarme y el ánimo que irradas. A Maribel por confiar en mí y por tus ideas. A Pily porque no hay apoyo más desinteresado que el tuyo. A mis sobrinos Johann, Arath y Annette por la creatividad que me comparten y sus abrazos cálidos. A mis amigas de siempre Sonia, Emereli y Treicy por ser compañeras de vida. A las nuevas adquisiciones dentro de mi baúl de tesoros: Martín Muñoz y Alexis Vázquez.

A los amigos que se fueron durante este recorrido y que estoy segura que les hubiera encantado compartir conmigo, Lupita y Héctor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por su infinito apoyo, por el cariño, por disfrutar y sufrir conmigo todos los procesos, y siempre creer en mí. A todos ellos muchas gracias por el amor, por ser ejemplo de pasión y por su ayuda constante.

A mis sinodales Dra. Carmen Aceves, Dra. Elvira Núñez, Dra. Guadalupe García y Dra. Jessica escobar por su apoyo en el proyecto, por todas sus sugerencias y por su amistad.

Especialmente agradezco a la Dra. Laura Berumen por ser la guía de este trayecto por sus enseñanzas y sobre todo por su calidad humana.

A mis compañeras de la maestría: Karen, Norma, Abigail y Sarahí. Gracias por todo el aprendizaje mutuo.

A mis compañeros del laboratorio: Sarahi, Karla, Jesús, Alfredo, Jessi, Magdis, David y Edgardo por todos los momentos compartidos.

Índice General

Tabla de contenido

Índice General	i
Tabla de contenido	i
Índice de figuras.....	iii
Índice de tablas	v
Tabla de abreviaturas.....	vi
Resumen	vii
Abstract.....	viii
Introducción	- 9 -
Antecedentes.....	- 11 -
Sistema inmune.....	- 11 -
Sistema inmune antitumoral	- 14 -
Inmunoterapia.....	- 18 -
Neuroinmunomoduladores	- 20 -
Serotonina	- 21 -
Serotonina y sistema inmune.....	- 26 -
Melatonina	- 28 -
Melatonina y sistema inmune	- 38 -
Justificación	- 40 -
Pregunta de investigación	- 40 -
Hipótesis.....	- 40 -
Objetivos.....	- 41 -
Objetivo General	- 41 -
Objetivos Particulares.....	- 41 -
Metodología	- 42 -

Material biológico	- 42 -
Cultivo celular.....	- 42 -
Diseño experimental	- 42 -
Métodos de análisis	- 43 -
Ensayo de Proliferación celular (Azul tripano).....	- 43 -
Cuantificación de IL- 2 e IL-4.....	- 44 -
Identificación de receptores 5-HT7 y MLT1.	- 44 -
Ensayo de Capacidad Antioxidante Total (Método FRAP).....	- 45 -
Ensayo de Capacidad Antioxidante Total (Método ABTS+).....	- 45 -
Análisis estadístico	- 46 -
Resultados	- 46 -
Proliferación por método azul tripano en tratamientos sin SFB	- 46 -
Proliferación por método azul tripano en tratamientos con SFB	- 48 -
Cuantificación de interleucina 2 (IL-2) y de IL-4 en células Jurkat	- 50 -
Identificación de receptores a 5-HT y MLT en células Jurkat.....	- 53 -
Actividad Antioxidante de 5-HT y MLT por método FRAP	- 54 -
Actividad Antioxidante de 5-HT y MLT por método ABTS	- 54 -
Actividad Antioxidante de 5-HT y MLT por método ABTS en leucocitos circulantes	- 55 -
Actividad Antioxidante de 5-HT y MLT por método ABTS en células Jurkat	- 56 -
Discusión.....	- 56 -
Conclusiones	- 62 -
Perspectivas	- 62 -
Referencias.....	- 63 -

Índice de figuras

1. Esquema general de la respuesta inmune innata y adquirida. Las flechas moradas indican que las células efectoras provocan una respuesta inmunogénica. Las flechas negras, indican que las células efectoras provocan una respuesta citolítica. MHC: Molécula de Histocompatibilidad; Th: Linfocito T cooperador; TCR: Receptor de linfocitos T; CD: Cluster de diferenciación (Kindt *et al.*, 2007).
..... - 12 -
2. Reconocimiento de MHC por linfocitos T. a) Reconocimiento de MHC I por CTL citotóxico (CD8) y b) Reconocimiento de MHC II por CTL cooperador (CD4) (Ribas *et al.*, 2003). - 13 -
3. Reconocimiento de MHC por linfocitos T. a) Reconocimiento de MHC de clase I por el linfocito T citotóxico (CD8+) y b) Reconocimiento de MHC II por el linfocito T cooperador (CD4+) (Ribas *et al.*, 2003). - 17 -
4. Esquemas de la estructura química de serotonina. A) Fórmula estructural de 5-hidroxitriptamina, b) modelo de barras y esferas. - 21 -
5. Esquema de reacciones de la biosíntesis de serotonina. - 22 -
6. Sitios de secreción de serotonina. A) Sistema nervioso central B) Tracto gastrointestinal (Baganz y Blakely, 2013, Sodhi y Sanders-Bush, 2004).- 23 -
7. Diagrama de la sección transversal del receptor 5-HT₇ (receptor acoplado a proteína G) a través de la membrana plasmática. Muestra los sitios descritos en el texto (Vanhoenacker *et al.*, 2000). - 26 -
8. Esquemas de la estructura química de melatonina. A) Fórmula estructural de N-acetil -5-metoxitriptamina, B) modelo de barras y esferas. - 28 -
9. Esquema de reacciones de la biosíntesis de melatonina (Zlotos *et al.*, 2013).- 29 -
10. Esquema de la síntesis de melatonina en la glándula pineal (Reiter *et al.*, 2010).
..... - 30 -
11. Gráfico de la síntesis de melatonina. (Karasek y Winczyk, 2006) - 31 -
12. Representación en 2 dimensiones del sitio de unión de melatonina propuesto por A) Chugunov *et al.* y B) Farce *et al.* (Pala *et al.*, 2013). - 33 -
13. Diagrama de la sección transversal del receptor MT₁ a través de la membrana plasmática. Muestra los sitios descritos en el texto (Zlotos *et al.*, 2013, Barret *et al.*, 2003). - 34 -
14. Esquema de la vía de señalización clásica de MT₁ y MT₂ (Masana y Dubocovich, 2001). - 36 -
15. Estructuras de algunos agonistas sintéticos de MLT (Zlotos *et al.*, 2013).- 37 -
16. Esquema general que muestra los diferentes grupos experimentales utilizados.
..... - 43 -
17. Esquema de la reacción de síntesis del radical TPTZ. - 45 -

18. Esquema que muestra la reacción de síntesis del radical ABTS ⁺	- 46 -
19. Gráfico de tasa de proliferación 12 h de Jurkat con tratamientos de serotonina y melatonina sin SFB, n=5.....	- 47 -
20. Gráfico de tasa de proliferación 24 h de Jurkat con tratamientos de serotonina y melatonina sin SFB, n=5.....	- 47 -
21. Gráfico de tasa de proliferación 48 h de Jurkat con tratamientos de serotonina y melatonina sin SFB, n=5.....	- 48 -
22. Gráfico de tasa de proliferación 12 h de Jurkat con tratamientos de serotonina y melatonina con SFB, n=3.....	- 49 -
23. Gráfico de tasa de proliferación 24 h de Jurkat con tratamientos de serotonina y melatonina con SFB, n=3.....	- 49 -
24. Gráfico de tasa de proliferación 48 h de Jurkat con tratamientos de serotonina y melatonina con SFB, n=3.....	- 50 -
25. Curva estándar de Interleucina 2 humana.....	- 51 -
26. Cuantificación de IL-2 en células Jurkat, 24 y 48 h, n=3.	- 52 -
27. Curva estándar de Interleucina 4 humana.....	- 52 -
28. Cuantificación de IL-4 en células Jurkat, 24 y 48 h, n=3.	- 53 -
29. Identificación de receptores a serotonina y melatonina en células Jurkat. Receptores a serotonina 5HT5A y 5HT7 y a melatonina MLT1/2 y la proteína constitutiva como control positivo (β -actina).....	- 53 -
30. Gráfico de Capacidad Antioxidante Total de serotonina y melatonina por método FRAP, lectura a 540 nm, n=3.....	- 54 -
31. Gráfico de Capacidad Antioxidante Total de serotonina y melatonina por método ABTS, lectura a 405 nm, n=3.....	- 55 -
32. Gráfico de Capacidad Antioxidante Total de serotonina y melatonina en leucocitos circulantes por método ABTS, lectura a 405 nm, n=3.....	- 55 -
33. Gráfico de Capacidad Antioxidante Total de serotonina y melatonina en leucocitos circulantes por método ABTS, lectura a 405 nm, n=3 por triplicado.	- 56 -
34. Esquema de transducción de señales propuesto.....	- 59 -

Índice de tablas

Tabla 1. Inmunoterapias aprobadas para el tratamiento de cánceres humanos.....	- 19 -
Tabla 2. Compendio de las familias de receptores a 5-HT humanos.....	- 24 -
Tabla 3. Ligandos farmacológicos de receptores a serotonina.....	- 27 -
Tabla 4. Constantes de afinidad de los receptores a melatonina.....	- 34 -

Tabla de abreviaturas

Término	Abreviatura
Serotonina	5-HT
Melatonina	MLT
Complejo mayor de histocompatibilidad	MHC
Receptor de células (Linfocitos) B	BCR
Receptor de células (Linfocitos) T	TCR
Célula presentadora de antígenos	APC
Linfocito T citotóxico	CTL
Linfocito T cooperador	Th
Linfocito T regulador	Treg
Suero fetal bovino	SFB
Capacidad antioxidante total	CAT
Proteína verde fluorescente	GFP
Receptor a serotonina de tipo 7	5-HT7
Receptor a serotonina de tipo 5A	5-HT5A
Receptor a melatonina de tipo 1	MLT1
Buffer de fosfatos	PBS

Resumen

Diversos estudios han mostrado los efectos inmunomoduladores de serotonina y melatonina, sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en estos procesos no han sido analizados por completo. En este proyecto se evaluó la actividad de la respuesta inmune antitumoral, mediada por la capacidad antioxidante de serotonina y melatonina y por la unión de estas indolaminas a su receptor. Utilizando como modelo la línea celular de linfocitos T humanos (Jurkat) tratados con serotonina o melatonina, se determinó el porcentaje de proliferación celular (azul tripano) y la concentración de las citocinas IL-2 e IL-4 secretadas al medio de cultivo (ELISA). Se examinaron los receptores metabotrópicos MLT1/2 para melatonina y 5-HT5A, 5-HT7 para serotonina en las células Jurkat por *western blot* y se realizaron ensayos de capacidad antioxidante total (ABTS y FRAP). Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden en que la capacidad potenciadora de 5-HT y MLT sobre la respuesta inmune depende en gran medida de la estimulación antigénica. Los linfocitos T inactivos parecen ser más sensibles a los tratamientos de 1 mM de ambas indolaminas; este efecto inmunomodulador podría involucrar a los receptores 5-HT5A, 5-HT7 y MLT1/2. El mecanismo de la capacidad antioxidante total de serotonina es por transferencia de protones y transferencia de electrones, mientras que el mecanismo de capacidad antioxidante de melatonina es por transferencia de protones. Este trabajo presenta datos inéditos que indican que la serotonina y la melatonina participan en el sistema inmune antitumoral después de la activación antigénica.

(Palabras clave: Serotonina, Melatonina, Sistema Inmune, Cáncer)

Abstract

Previous studies have shown the immunomodulators effects of serotonin and melatonin, however molecular pathways involved have not been completely analyzed. This project was committed to evaluate the activity of antitumor immune response mediated by the antioxidant capacity and by the binding of these neurotransmitters to their receptors, using a human T lymphocyte cell line (Jurkat) as model treated with serotonin and melatonin. We measured the proliferation rate of lymphocytes (trypan blue) and the concentration of the cytokines IL-2 and IL-4 (ELISA). We seek for some of the receptors for melatonin and serotonin in Jurkat cell line by western blot and performed a total antioxidant capacity assays (ABTS and FRAP). Results in this work show that the enhancing capacity of 5-HT and MLT depends on the antigen stimulation. Naive T lymphocytes appear to be more sensitive to higher doses of the treatments (1 mM). Furthermore they express the 5-HT5A, 5-HT7 y MLT1/2 receptors. The Total Antioxidant Capacity of melatonin is mediated by proton transfer, and TAC of serotonin is through by proton transfer and electron transfer. This work presents data that indicate that melatonin and serotonin participate on the antitumor immune system after the antigen activation.

Introducción

El sistema inmune es un complejo de diversos órganos, tejidos, células y moléculas, cuya función principal es actuar como un conjunto eficaz supresor de antígenos, ya sean patógenos externos o propios.

La respuesta inmune ineficaz está estrechamente relacionada con un gran número de patologías, entre las que se encuentra el cáncer; en este proceso patológico el sistema inmune mediado por células juega un papel muy importante ya que la tumorigénesis está regulada principalmente por la interacción entre las células estromales e inmunes del huésped y las células tumorales.

Dicha interacción se encuentra regulada por varios tipos de moléculas como citocinas, quimiocinas y hormonas, entre las que se encuentran serotonina y melatonina, relacionadas estructuralmente entre sí gracias a su precursor común, el triptófano.

Existe numerosa evidencia de que tanto serotonina como melatonina realizan una función importante en la regulación del sistema inmune. En particular, se ha descrito la presencia de la enzima triptófano hidroxilasa (que interviene en la síntesis de ambas hormonas) en diversos tipos celulares como mastocitos, macrófagos y linfocitos T. Igualmente se ha definido la presencia de algunos receptores para serotonina y melatonina en casi todos los tipos celulares de respuesta inmune, aunado a esto, se ha descrito el efecto de serotonina y melatonina como estimuladores de la proliferación y la actividad de células de la propia respuesta inmune.

A pesar de ello existen pocos estudios que describan la capacidad de dichas hormonas para mediar la respuesta inmune antitumoral y no se conocen por completo los mecanismos moleculares que podrían estar involucrados en esta respuesta.

Es por ello que en este trabajo se estudió el efecto estimulador de serotonina y melatonina sobre la respuesta inmune antitumoral y posteriormente los posibles mecanismos involucrados. Para evaluar la respuesta inmune antitumoral se calculó la tasa de proliferación en presencia de los inmunomoduladores (serotonina y melatonina) con la técnica de cuantificación celular de azul tripano. Se midió también la concentración de IL-2 e IL-4 con un kit de ELISA para medir la capacidad secretora de las células Jurkat. Se identificó la presencia de los receptores metabotrópicos 5-HT₇ y MLT₁ con la técnica de *western blot* para analizar las posibles vías que participan en la regulación de la actividad inmune. Para estimar la respuesta inmune mediada por la capacidad

antioxidante se hicieron ensayos de capacidad antioxidante total (ABTS y FRAP).

Antecedentes

Sistema inmune

El sistema inmune es un complejo de diversos tipos celulares y de moléculas cuya función principal es actuar como un conjunto eficaz supresor de antígenos, ya sean patógenos externos o propios, en ocasiones este sistema resulta incompetente y permite la proliferación de los mismos. La supervivencia de las especies depende de estas medidas defensivas, debido a ello el sistema inmune ha evolucionado como resultado de las interacciones entre los agentes patógenos y sus huéspedes dando lugar a un sistema altamente especializado (Ploegh, 2013, Rich *et al.*, 2013, Kindt *et al.*, 2007).

La defensa en contra de los diferentes antígenos está mediada, a grandes rasgos, por los mecanismos de la respuesta inmune innata y adaptativa (Figura 1), que actúan a nivel periférico y de sistema nervioso central. Dentro de los primeros minutos en los que el antígeno atraviesa la defensa primaria (piel y mucosa) e irrumpe en el huésped, se produce una respuesta inflamatoria aguda desencadenada por el sistema inmune innato. Esta respuesta consiste en cambios en la permeabilidad vascular, migración de las células del sistema inmune y el aumento de moléculas pro inflamatorias en el sitio de daño/infección (Baganz y Blakely, 2013, Dranoff, 2004).

Esta primera respuesta involucra a macrófagos, mastocitos y células dendríticas, que actúan en el área de daño/infección identificando y posteriormente destruyendo a los patógenos. La identificación de los patógenos se da a través del reconocimiento de patrones moleculares específicos (péptidoglicanos, lipopolisacáridos, etc.) presentes en los antígenos por medio de los receptores de tipo *Toll* que se encuentran presentes en las células presentadoras de antígenos (Baganz y Blakely, 2013).

Posterior a la identificación de los antígenos, las células presentadoras de antígenos (APCs; células dendríticas, macrófagos) se encargan de fagocitar a los patógenos y desplegar diferentes respuestas como la secreción de citocinas, prostaglandinas e histamina o la activación del sistema de complemento para promover la lisis celular, incrementar la permeabilidad vascular y la quimiotaxis. Esta respuesta no es específica y en ocasiones se puede destruir el tejido propio junto con el antígeno, sin embargo es un sistema de defensa que favorece la erradicación de los patógenos de forma rápida o inmediata (Baganz y Blakely, 2013).

Por otro lado, el sistema inmune adaptativo ocurre horas o días después del daño/infección primaria. Éste se activa después de la fagocitosis del antígeno por las APCs a partir de lo cual se generan fragmentos proteicos que se acoplan

al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y a continuación son presentados en la superficie celular de las APCs, junto con esto, se exponen en la membrana las moléculas coestimuladoras B7.1 y B7.2. Estas dos señales juntas, son reconocidas por los linfocitos T circulantes a través de los receptores TCR (T cell receptor). Este mecanismo permite al sistema inmune diferenciar los procesos intracelulares anormales del funcionamiento normal en las células que expresan proteínas propias (Goldszmid y Trinchieri, 2012, Dranoff, 2004, Ribas *et al.*, 2003).

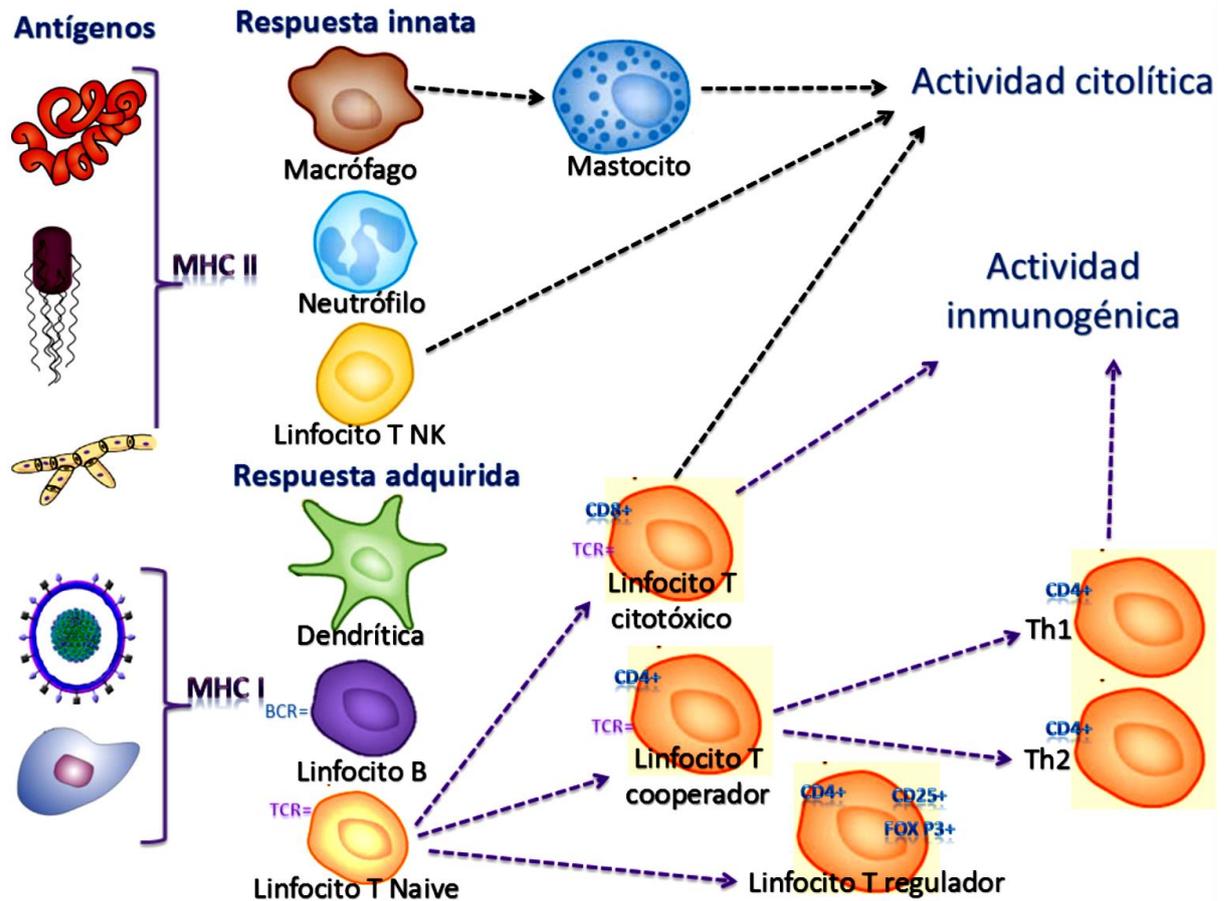


Figura 1. Esquema general de la respuesta inmune innata y adquirida. Las flechas moradas indican que las células efectoras provocan una respuesta inmunogénica. Las flechas negras, indican que las células efectoras provocan una respuesta citolítica. MHC: Molécula de Histocompatibilidad; Th: Linfocito T cooperador; TCR: Receptor de linfocitos T; CD: Cluster de diferenciación (Kindt *et al.*, 2007).

Existen 2 tipos de moléculas MHC que son reconocidas por el sistema inmune, MHC tipo I y MHC tipo II (Figura 2). Estas moléculas son glicoproteínas transmembranales, con la función de adquirir antígenos peptídicos intracelulares y exponerlos en la superficie celular. Dichas moléculas tienen 4 dominios, un dominio de unión peptídica, un dominio de tipo inmunoglobulina, una región transmembranal y una cola citoplasmática. Las MHC tipo I presentan de 8 a 11 aminoácidos derivados de proteínas intracelulares, que se exponen en la

superficie celular de la mayoría de las células y son reconocidas por linfocitos T CD8+, este tipo de moléculas se exhibe en la membrana celular como respuesta a los procesos anormales intracelulares como cáncer o infecciones víricas. Las MHC tipo II tienen una distribución restringida y se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos (linfocitos B, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas). Los péptidos presentados por las MHC II son de 10-34 aminoácidos y se derivan de proteínas exógenas endocitadas y posteriormente digeridas por lisosomas, este tipo de moléculas se exhibe en la membrana celular como respuesta de infecciones producidas por microorganismos (Goldszmid y Trinchieri, 2012, Ribas *et al.*, 2003).

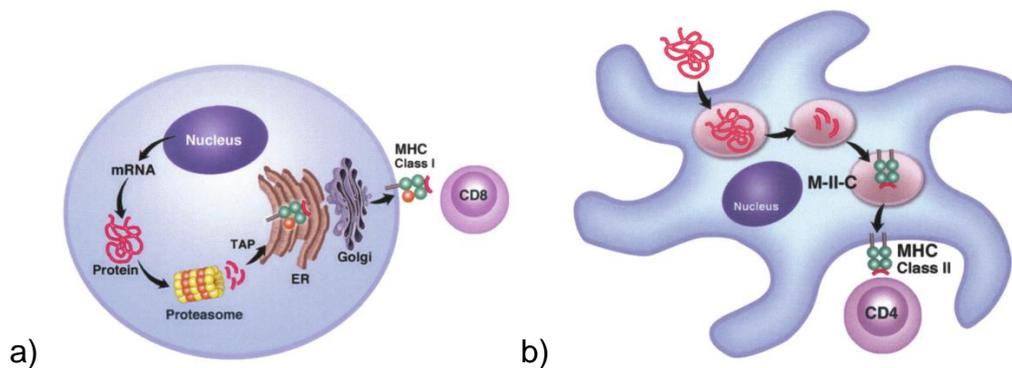


Figura 2 Reconocimiento de MHC por linfocitos T. a) Reconocimiento de MHC I por CTL citotóxico (CD8) y b) Reconocimiento de MHC II por CTL cooperador (CD4) (Ribas *et al.*, 2003).

En la respuesta inmune adaptativa, se pueden activar y diferenciar 2 linajes celulares, los linfocitos B y los linfocitos T. Los linfocitos B vírgenes expresan en su membrana celular al receptor BCR y al marcador CD19+, estos tienen la capacidad de reconocer tanto a moléculas de histocompatibilidad como a regiones antigénicas libres, una vez que reconocen alguna de éstas se genera el estímulo para que la célula se divida rápidamente; su progenie se diferencia en células efectoras llamadas células plasmáticas y linfocitos B de memoria. Estos últimos tienen un lapso de vida mayor que los linfocitos B vírgenes, y expresan el mismo anticuerpo unido a membrana que su célula B progenitora. Las células plasmáticas, por otro lado, producen el anticuerpo en una forma que puede ser secretada y poseen poco o nada de anticuerpo unido a membrana. Estas células son células diferenciadas en sentido terminal y no se dividen. Los linfocitos T por su parte sólo reconocen moléculas de histocompatibilidad que intervienen en la “presentación del antígeno”, es decir, no reconocen fragmentos antigénicos solubles. Cuando un linfocito T reconoce a un antígeno, por medio de una molécula MHC localizada sobre una célula; en las circunstancias apropiadas el linfocito prolifera y adquiere la capacidad de diferenciarse a linfocitos T cooperadores (Linfocitos CD4+) de tipo Th1 o tipo Th2; o linfocitos T reguladores (Linfocitos T CD4+ CD25+) o linfocitos T citotóxicos (Linfocitos

CD8+) (Figura 1). Los linfocitos Th1 producen principalmente IL-2 e interferón (IFN γ), así como Factor de necrosis tumoral (TNF- α), exacerbando la respuesta celular y la citotoxicidad. Los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10 promoviendo una respuesta humoral o mediada por anticuerpos; los linfocitos T citotóxicos tienen el papel vital de vigilar las células del cuerpo y eliminar a cualquiera que exhiba antígenos propios con las MHC de clase I por medio de moléculas como perforina y granzima. Por otro lado, los linfocitos T reguladores suprimen inmunorreacciones, es decir, son reguladores negativos del sistema inmunitario (Goldszmid y Trinchieri, 2012, Kindt *et al.*, 2007, Ribas *et al.*, 2003).

De manera general, en la inmunidad innata se reconoce a los antígenos no propios, por medio de moléculas de histocompatibilidad de tipo II y receptores de tipo *Toll* y se activa a especies celulares como macrófagos, neutrófilos y *Natural Killer* causando como respuesta la activación de vías citolíticas e inmunogenicidad. Por otra parte, en la inmunidad adaptativa se reconocen a MHC de tipo I y II (es decir, propias y no propias), cuando se reconocen la MHC de tipo II (no propias) por medio de la activación de los BCR los linfocitos B se convierten en células plasmáticas con la función de generar anticuerpos de memoria. Cuando se reconocen MHC de tipo I (propias) por medio de los TCR los linfocitos T se diferencian en: **A)** cooperadores (tipo Th1 y Th2) que activan respuestas inmunogénicas; **B)** citotóxicos (CTLs) que activan cascadas de señalización que generan apoptosis en las células blanco o **C)** reguladores (Tregs) que suprimen la actividad del sistema inmune. La respuesta inmune adaptativa se distingue de la respuesta inmune innata por su capacidad de identificar, recordar y eliminar patógenos que han sido designados como “no propios”. La respuesta de ambos tipos de inmunidad se complementa y proveen defensas celulares, moleculares y químicas en contra de sustancias potencialmente dañinas, microorganismos y células propias comprometidas (Baganz y Blakely, 2013, Rich *et al.*, 2013).

Sistema inmune antitumoral

En 1971, Gershon y Kondo utilizaron por primera vez el término “células supresoras” para describir células del sistema inmune con actividad antigénica específica, sin embargo hasta 1980 se retomó este concepto y se identificaron a los linfocitos T como las células responsables de suprimir las células tumorales (Beyer y Schultze, 2006, Gershon y K, 1971). Se ha descrito ampliamente a los linfocitos T, *Natural Killer*, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos como efectores potenciales de la inmunidad antitumoral (Mitra *et al.*, 2004). En el 2003, Mitra *et al.* puntualizaron los mecanismos de inmunidad antitumoral:

1) Destrucción de los tumores por necrosis mediada por leucocitos polimorfonucleares.

2) Inhibición indirecta de la angiogénesis por IFN γ y TNF α .

3) Activación de subconjuntos de leucocitos capaces de producir citocinas proinflamatorias, linfocitos T maduros y anticuerpos antitumorales.

4) Apoptosis de las células neoplásicas mediada por linfocitos T citotóxicos y *Natural Killer* (Mitra *et al.*, 2004, Federica Cavallo, 1999).

La regulación de la proliferación de las células del sistema inmune está mediada parcialmente por el tipo de citocinas que produce. En el caso de los linfocitos T, el mecanismo que promueve su proliferación involucra a la activación de sus clones (Th, Treg o CTL) y la secreción de diferentes interleucinas (IL) por ejemplo IL-2, IL-4 e IL-6 que son la señal para su expansión clonal y diferenciación (Punt, 2013, Kindt *et al.*, 2007).

Como se mencionó anteriormente, la respuesta inmune antitumoral exige una actividad citotóxica intensa y los “asesinos” más potentes dentro de la respuesta inmune mediada por células, son los linfocitos T citotóxicos (CTL) y las células naturales asesinas (NK), que una vez activados, promueven la apoptosis de las células tumorales por medio de diversos mecanismos.

La fase efectora de los CTL incluye una secuencia sincronizada de fenómenos que se inicia con la unión de la célula blanco a la célula de ataque. El proceso comienza cuando el receptor de membrana TCR de un CTL reconoce un antígeno vinculado con moléculas MHC clase I en una célula blanco; después de este reconocimiento específico se da la activación de CTL mediada por antígeno. Por medio de microscopía electrónica se ha observado la presencia de gránulos de almacenamiento intracelulares electrodensos en los CTL activos mientras que los inactivos carecen de estos gránulos. El análisis del contenido mostró monómeros de 65 kDa de una proteína que forma poros llamada perforina y varias proteasas de serina denominadas granzimas (o fragmentinas). Inmediatamente después de la formación de un conjugado de CTL y célula blanco, el aparato de golgi congrega y almacena los gránulos reorientados dentro del citoplasma del CTL para concentrarlos cerca de la unión con la célula blanco, a continuación se liberan monómeros de perforina y proteasas granzima de los gránulos por exocitosis hacia el espacio de unión entre las dos células (Figura 3) (Kindt *et al.*, 2007).

A medida que los monómeros de perforina entran en contacto con la membrana de la célula blanco, experimentan un cambio conformacional que expone un dominio anfipático y se insertan en la membrana de la célula blanco; luego se polimerizan los monómeros (en presencia de Ca²⁺) para formar poros

cilíndricos con diámetro interno de 5 a 20 nm., dando como resultado la formación de un gran número de poros con conjugados de perforinas en la membrana de la célula blanco (Figura 3). Los canales de perforina permiten la entrada de otras sustancias del granulosoma como las granzimas (granzimas), que de manera indirecta inducen la fragmentación del DNA en oligómeros de 200 pb, cinco minutos después del contacto con CTL (Kindt *et al.*, 2007).

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

Las células *Natural Killer* (NK) son una población pequeña de linfocitos granulares grandes que constituyen 5 a 10% de los linfocitos en sangre periférica humana y forman parte del sistema inmune innato. Las células NK son células linfoideas derivadas de la médula ósea que comparten un progenitor temprano común con los linfocitos T, aunque la mayoría no expresa receptores de célula T o inmunoglobulinas incorporadas en sus membranas plasmáticas; estos linfocitos cuentan con la capacidad de reconocer células tumorales a pesar de que carecen de receptores específicos de antígeno. Las células NK llevan FasL en su superficie e inducen con facilidad la muerte en células blanco que poseen Fas. El citoplasma de células NK contiene múltiples gránulos que incluyen perforina y granzimas. A diferencia de los CTL, que requieren activarse antes de la aparición de gránulos, las células NK son citotóxicas de manera constitutiva y siempre tienen gránulos grandes en su citoplasma. Después de adherirse las células NK a una célula blanco tiene lugar la desgranulación junto con liberación de perforina y granzimas en la unión entre las células interactuantes (Figura 3). Se piensa que la perforina y granzima tienen las mismas funciones en la muerte de células blanco por apoptosis mediada por NK que en el proceso de citólisis mediado por los linfocitos T citotóxicos (Kindt *et al.*, 2007).

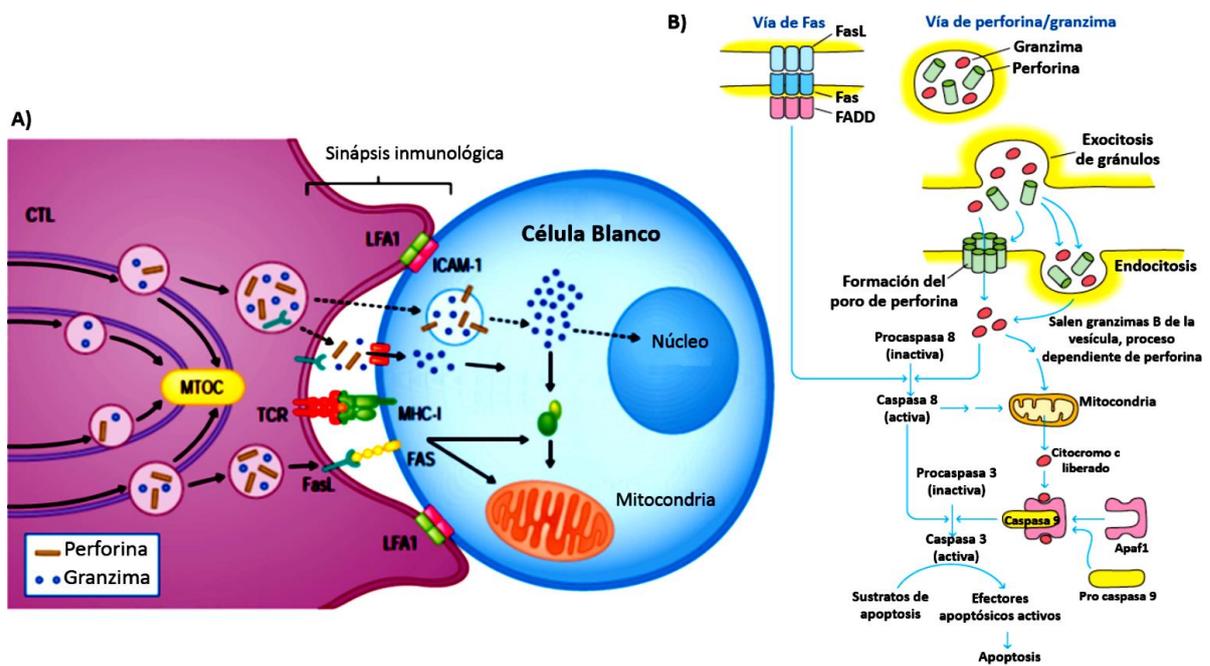


Figura 3. Reconocimiento de MHC por linfocitos T. a) Reconocimiento de MHC de clase I por el linfocito T citotóxico (CD8+) y b) Reconocimiento de MHC II por el linfocito T cooperador (CD4+) (Ribas *et al.*, 2003).

Los mecanismos anteriores por medio de los cuales se expone el papel fundamental del sistema inmune en el desarrollo del cáncer son conocidos como la inmunovigilancia del cáncer y la idea original fue propuesta en 1957 por Sir Macfarlane Burnet and Lewis Thomas, quienes señalaron que “sería factible que pequeñas acumulaciones de células neoplásicas puedan desarrollarse y que debido a su posesión de nuevos potenciales antigénicos provoquen una reacción inmunológica eficaz con la regresión del tumor y ningún indicio clínico de su existencia”, sin embargo este concepto fue ampliamente debatido debido a la alta tasa de incidencia de neoplasias, la explicación a ese debate serían los mecanismos de evasión tumoral que se explican a continuación (Dunn *et al.*, 2002).

Desde una perspectiva inmunológica, las células neoplásicas son consideradas como células propias alteradas que han modificado los mecanismos normales de regulación del crecimiento; éste tipo de células posee además una maquinaria de defensa que las hace pasar desapercibidas para el sistema inmune del huésped. Los mecanismos de evasión al sistema inmune consisten en diversos procesos que disminuyen la actividad de inmunovigilancia (Tyler, 2013, Prendergast y Jaffee, 2011, Kindt *et al.*, 2007).

Uno de estos mecanismos es la modulación antigénica, consiste en la aparición o estimulación de anticuerpos en el tumor que pueden modular a los antígenos tumorales, de esta manera actúan como factor bloqueador de la

respuesta inmune. Es posible que el propio anticuerpo antitumoral se fije a antígenos específicos del tumor y los oculte para que no los adviertan las células T citotóxicas. En muchos casos, los factores bloqueadores no son sólo anticuerpos, sino complejos integrados con antígenos tumorales. Además, se ha reconocido que ciertos antígenos específicos del tumor desaparecen de la superficie de las células tumorales en presencia de anticuerpo sérico, y que reaparecen una vez que el anticuerpo deja de estar presente. Siempre que se encuentre el anticuerpo estas células tumorales no exhiben el antígeno, y por ello no pueden ser eliminadas (Kindt *et al.*, 2007).

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

Además las células tumorales también tienen la capacidad de emitir señales coestimuladoras deficientes. La activación de la célula T requiere una señal activadora emitida por el reconocimiento de un complejo péptido-molécula MHC por la célula T receptora, junto con una señal coestimuladora transmitida por la interacción de B7 en células presentadoras de antígeno con CD28 en células T. Se necesitan ambas señales para inducir la producción de IL-2 y la proliferación de células T. La inmunogenicidad deficiente de muchas células tumorales se debe, en gran medida, a la falta de moléculas coestimuladoras. Sin números suficientes de células presentadoras de antígeno en la proximidad inmediata de un tumor, las células T reciben sólo una señal activadora parcial, lo que puede tener como efecto anergia clonal (Kindt *et al.*, 2007).

Inmunoterapia

El concepto de inmunoterapia surgió hace más de un siglo, cuando se encontró evidencia del rechazo de trasplantes provenientes de otro paciente en ratones. La idea de obtener una inmunidad antitumoral comenzó a ser realista con experimentos en ratones a los que se les indujo tumores por fármacos, virus y luz UV en huéspedes inmunizados singénicamente, sin embargo estos experimentos no fueron viables debido a que no existió ningún cambio en ratones con neoplasias espontáneas (Zöller y Matzku, 1999).

Actualmente la inmunoterapia ha surgido como una aproximación viable y transformativa como tratamiento contra el cáncer, basados en la habilidad de prolongar la sobrevivencia de los pacientes. La inmunoterapia del cáncer asume

varias formas, el tratamiento puede consistir en un refuerzo general del sistema inmunitario a través del uso de un coadyuvante o una citocina, o bien en un procedimiento más específico, como el uso de un anticuerpo monoclonal dirigido contra un tipo de tumor dado (Dranoff, 2012, Kindt *et al.*, 2007).

Tabla 1. Inmunoterapias aprobadas para el tratamiento de cánceres humanos

Nombre	Aplicación	Año de aprobación
Rituximab	Linfoma no Hodgkin	1997
Trastuzumab	Cáncer mamario	1998
Gemtuzumab ozogamicina*	Leucemia mielógena aguda (AML)	2000
Alemtuzumab	Leucemia linfocítica crónica (CLL)	2001
Ibritumomab tiuxetan*	Linfoma no Hodgkin	2002
Tositumomab*	Linfoma no Hodgkin	2003
Cetuximab	Cáncer colorrectal, Cánceres de cabeza y cuello	2004 2006
Bevacizumab	Cáncer colorrectal	2004

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

Guilliand y Croce demostraron que los anticuerpos podrían ser utilizados terapéuticamente marcando el comienzo de la inmunoterapia en enfermedades infecciosas y cáncer. Además el aislamiento y la clonación de diversos genes de citocinas han facilitado su producción a gran escala, con ellas se han desarrollado diversas técnicas experimentales y clínicas para emplear citocinas recombinantes, ya sea de forma aislada o combinadas, con el fin de aumentar la inmunorreactión contra el cáncer. Entre las citocinas que se han valorado en la inmunoterapia del cáncer se encuentran IFN- α , IFN- β e IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-12, GM-CSF y TNF- α (Ver tabla 1). La inmunoterapia que consiste en la transferencia de células NK activadas con la citocina IL-2 a pacientes con melanoma y otros tumores fue inicialmente prometedora pero se encontró ineficaz en ensayos clínicos; no obstante tuvo un renacimiento con el ajuste del tratamiento de leucemias debido a que su uso permite la disminución del agente quimioterapéutico de elección. Los anticuerpos monoclonales Anti-CD20 (Rituximab) fueron aprobados por la FDA para el tratamiento de las células B de linfoma no Hodgkin, la adición de rituximab a los fármacos ciclofosfamida

estándar, adriamicina (vincristina) y prednisona proporcionó la primera mejora en la supervivencia en 2002. Más recientemente, estudios pioneros de transferencia adoptiva de células T modificadas genéticamente tuvieron un éxito demostrable con la eliminación de los tumores grandes, de crecimiento progresivo cuando se combina con una depleción de linfocitos por radiación. De igual forma las terapias con células dendríticas han sido asociadas con respuestas específicas en pacientes con linfoma y el melanoma. Existen reportes, de la aprobación de 2 fármacos inmunoterapéuticos, sipuleucel T de la marca Dendreon como una vacuna celular para el cáncer de próstata y además ipilimumab de Bristol-Myers Squibb, un anticuerpo específico inhibidor del antígeno CTLA4, utilizado en melanoma avanzado (Rich *et al.*, 2013, Dranoff, 2012, Kindt *et al.*, 2007).

Neuroinmunomoduladores

Dado que se ha definido a la tumorigénesis como un proceso progresivo que transforma a las células normales en células altamente invasivas, algunos autores se han enfocado a los eventos moleculares e intracelulares que inducen dicha transformación, sin embargo se han explorado muy poco los factores fisiológicos que regulan el microambiente tisular donde se desarrolla el tumor, como en el microambiente inmune antitumoral (Hanahan y Weinberg, 2011, Pai *et al.*, 2009, Becker, 2006).

Está bien establecido que el sistema nervioso central regula al sistema inmune a través de diferentes mecanismos. Es por ello que se ha señalado una conexión entre el sistema nervioso, endócrino e inmune por la cual se describe que se encuentran estrechamente relacionados, tanto anatómicamente como funcionalmente. Del mismo modo, estos sistemas expresan y responden a un gran número de moléculas reguladoras comunes que incluyen esteroides, neuropéptidos, citocinas y neurotransmisores. Dichas moléculas en conjunto coordinan funciones neuroinmunoendócrinas para mantener la homeostasis bajo estímulos de estrés, inflamación e infecciones (Chesnokova y Melmed, 2002, Guerrero y Reiter, 2002).

El microambiente inmune está controlado por mediadores fisiológicos como catecolaminas, glucocorticoides, serotonina (5-HT) y melatonina (MLT). Es importante destacar la relación entre las dos moléculas que provienen de la biotransformación del triptófano, y aunque en la mayoría de los estudios se han examinado por separado ambas comparten la capacidad de regular ciertas funciones como la respuesta inmune (Hardeland *et al.*, 2011, Konturek *et al.*, 2007).

Serotonina

La 5-hidroxitriptamina es una monoamina de 176.21 g/mol, con propiedades hidrofílicas debido a que contiene un grupo hidroxilo en la posición 5 del núcleo indol y una amina primaria que actúa como aceptor de protones (Figura 4). A finales de 1930 Vittorio Ersparmer e identificaron una sustancia a partir del extracto de células enterocromafines capaz de contraer el músculo liso del útero de rata y le denominaron enteramina. Posteriormente Rapport y Page nombraron serotonina a la sustancia vasoconstrictora que aislaron del suero y también elucidaron su estructura al año siguiente (Figura 4); años más tarde encontraron que se trataba del mismo compuesto. Este nombre refleja las sustancias en las que fue identificada, proviene de los vocablos “*serum*” por el lugar en que fue aislada y “*tonin*” por su efecto vasoconstrictor. Esta hormona cobró mayor importancia en 1953, cuando Betty Twarog descubrió su función como neurotransmisor en el cerebro humano (Berumen *et al.*, 2012, Nichols y Nichols, 2008, Ersparmer y Asero, 1952).

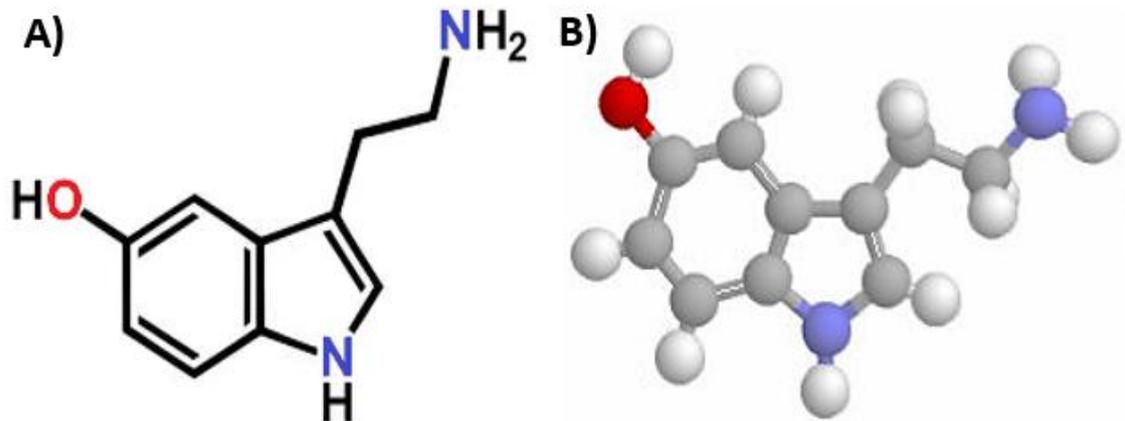


Figura 4. Esquemas de la estructura química de serotonina. A) Fórmula estructural de 5-hidroxitriptamina, b) modelo de barras y esferas.

Además de su importancia en el sistema nervioso central, se ha postulado que la serotonina es una molécula esencial de los sistemas vivos, pues se cree que el anillo indol pudo haber participado de manera importante en el comienzo de la vida aerobia en la tierra como antioxidante de las primeras especies reactivas de oxígeno. De este modo la serotonina se encuentra en una gran variedad de especies, todos los mamíferos, vegetales, hongos, y la mayoría de los organismos unicelulares. Los niveles de esta hormona en plantas son aproximadamente 100 veces mayores que en el cerebro animal. En mamíferos el 5% de la serotonina fisiológica se produce en el sistema nervioso central; la mayor producción de serotonina periférica (90%) se da gracias a las células enterocromafines del tracto gastrointestinal (principalmente en el duodeno), mientras que otro porcentaje menor se produce por las neuronas mientéricas; también se han detectado bajos niveles de la síntesis de serotonina en tejido

inmunológico (Baganz y Blakely, 2013, Berumen *et al.*, 2012, Nichols y Nichols, 2008, Azmitia, 2007).

La 5-HT es una amina biogénica que se desempeña como hormona, factor de crecimiento y neurotransmisor con una gran variedad de funciones en el cuerpo humano. El aminoácido triptófano es el precursor de la serotonina que es hidroxilado en C5 por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH). Por medio de técnicas de secuenciación se han identificado 2 isoformas, TPH1 que se expresa en las células enterocromafines del epitelio de las criptas del intestino delgado, mientras que TPH2 se encuentra en neuronas. Después la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AAAD) la convierte en 5-hidroxitriptamina (5-HT; serotonina) (Figura 5), esta enzima (AAAD) está presente no sólo en las neuronas serotoninérgicas, sino también en las neuronas catecolaminérgicas, donde convierte 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) a dopamina. La síntesis de serotonina depende ampliamente de la hidroxilación del triptófano y también del Ca^{+2} extracelular. Una vez formada la 5-HT, es almacenada en vesículas hasta que llega el momento de ser liberada (Beattie y Smith, 2008).

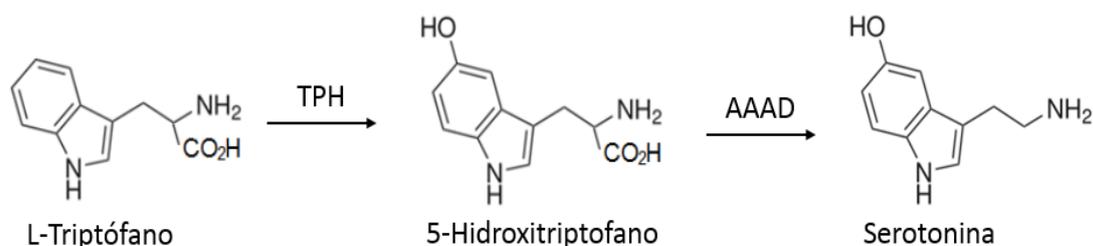


Figura 5. Esquema de reacciones de la biosíntesis de serotonina.

Cuando la serotonina se libera al espacio sináptico se une a sus sitios de interacción, ya sean receptores o el transportador serotoninérgico (SERT) que se encarga de transportarla dentro de la célula y donde posteriormente puede ser inactivada por la Monoamino oxidasa (MAO) que la convierte en su principal metabolito inactivo, el ácido hidroxindolacético. Esta biotransformación puede ocurrir tanto a nivel intracelular como en la hendidura sináptica. Otros metabolitos de importancia son el ácido 5-OH-3-metilindol, producto de la metilación del ácido 5-hidroxi-indolacético y las kinuraminas estos metabolitos son excretados a través de la orina (Chojnacki *et al.*, 2012).

La síntesis de serotonina en el Sistema Nervioso Central se concentra principalmente en las neuronas serotoninérgicas, en donde actúa como neurotransmisor (Figura 6). Específicamente en mamíferos estas neuronas se originan dentro del núcleo del rafe, pero el extenso sistema de proyección axonal que surge de estas neuronas posee un gran número de ramas colaterales con las que inerva densamente casi todas las regiones del sistema nervioso central,

y aunque la proporción de neuronas 5-HT respecto al resto de neuronas del SNC es muy baja (1/200,000), su capacidad de invasión de estructuras anteriores, como la corteza cerebral o el hipocampo, es muy alta, estimándose de 3 a 6 millones el número de varicosidades por mm³. Las proyecciones de las neuronas serotoninérgicas constituyen uno de los sistemas anatómicos y funcionales más complejos y extensos del cerebro (Berger *et al.*, 2009, Sodhi y Sanders-Bush, 2004).

Por otro lado en el tracto gastrointestinal, que es la mayor fuente de serotonina circulante (Figura 6), se libera como neurotransmisor desde las neuronas del plexo mientérico y se secreta como un mensajero parácrino de las células enterocromafines del epitelio intestinal. Pasa a la luz del intestino cuando se eleva la presión intraluminal por estrés mecánico que es causado por la presencia de los alimentos. Una vez liberada la serotonina, entra a la circulación sanguínea donde es almacenada por las plaquetas por medio del transportador de serotonina (SERT). El aumento de la secreción de serotonina está dado por cambios en el pH, cambios en la osmolaridad intestinal, toxinas, fármacos y estimulación muscarínica y β -adrenérgica (Chojnacki *et al.*, 2012, Beattie y Smith, 2008).

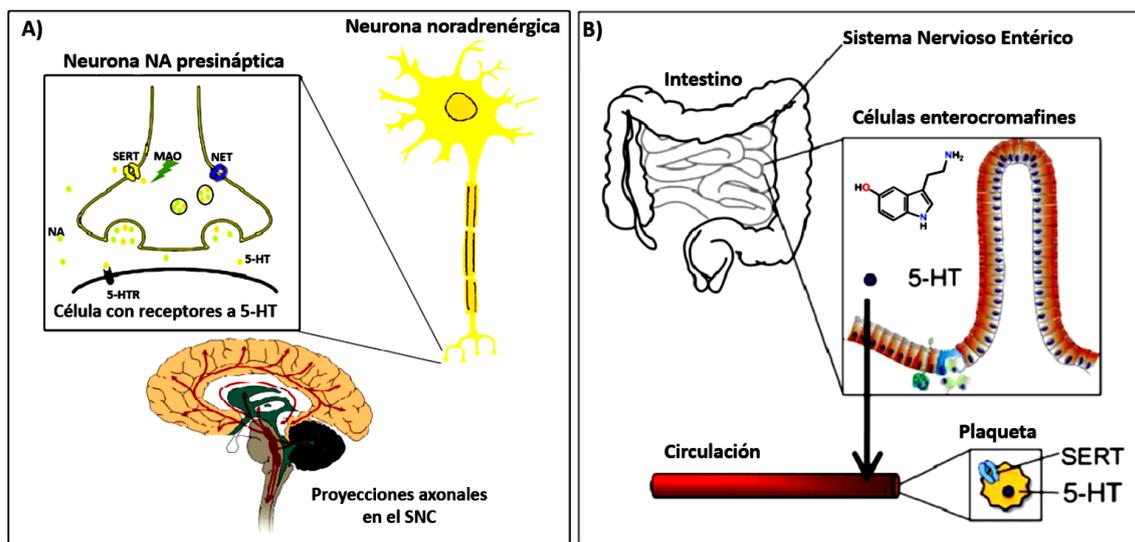


Figura 6. Sitios de secreción de serotonina. A) Sistema nervioso central B) Tracto gastrointestinal (Baganz y Blakely, 2013, Sodhi y Sanders-Bush, 2004).

La serotonina se ha descrito como reguladora de funciones, tanto fisiológicas como patológicas. Fuera del SNC la 5-HT está involucrada en la contracción del músculo liso, motilidad gastrointestinal, mecanismos secretores periféricos y proliferación celular. A nivel circulatorio está implicada en la agregación de plaquetas y puede actuar como un vasodilatador o vasoconstrictor, según la zona de circulación o el estado de la misma. En el SNC, la 5-HT está involucrada en numerosas funciones fisiológicas como la regulación del dolor, termorregulación,

apetito, control del vómito, regulación neuroendocrina, actividad motora, control de la función cardiovascular, contracción muscular, regulación de la actividad sexual, procesos de memoria y aprendizaje, ciclo de sueño-vigilia y estados de ánimo. También participa en procesos de plasticidad neuronal e interacción con neuronas sensoriales. En la respuesta inmune tiene efecto modulador potenciándola o disminuyéndola dependiendo del proceso donde participe (Berger *et al.*, 2009, Sodhi y Sanders-Bush, 2004).

La pérdida de la homeostasis en la concentración fisiológica de serotonina ha sido asociada a la patogénesis de varios desórdenes como ansiedad, depresión, esquizofrenia, trastornos obsesivo-compulsivos, anorexia/bulimia, síndrome Down y en la conducta agresiva. Además, está involucrada en la sintomatología de algunas enfermedades neurodegenerativas tales como el Parkinson, Alzheimer o Huntington. También está implicada en algunos trastornos neurológicos como la migraña y la epilepsia. También se ha visto implicada en el aumento de patologías infecciosas en pacientes con depresión severa (Ahern, 2011, Berger *et al.*, 2009, Magrini *et al.*, 2011, Sodhi y Sanders-Bush, 2004, Hannon y Hoyer, 2008).

La gran variedad de efectos de serotonina está mediada a través de sus receptores. Se han identificado y descrito 14 subtipos distintos de receptores a serotonina, caracterizados inicialmente empleando herramientas farmacológicas; más adelante las técnicas de biología molecular permitieron la clonación y la secuenciación de estos receptores codificados por genes diferentes. De este modo gracias al Comité de Nomenclatura del Club de Receptores a Serotonina (SCRNC, por sus siglas en inglés) se lograron clasificar en 7 familias, basados en criterios operacionales (agonistas, antagonistas y afinidades de unión al ligando), estructurales (estructura molecular) y transduccionales (mecanismos de transducción de señal). La mayoría de estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, excepto el receptor 5-HT₃ que es un canal iónico (Tabla 2). Las familias más grandes 5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₃ comparten una homología del 25%, lo cual sugiere que la divergencia de este receptor ocurrió al menos hace 700 millones de años (Berumen *et al.*, 2012, Nichols y Nichols, 2008, Hannon y Hoyer, 2008, Hoyer *et al.*, 2002, Barnes y Sharp, 1999).

Tabla 2. Compendio de las familias de receptores a 5-HT humanos.

Familia	Miembros	Isoformas*	Acoplamiento	Efecto intracelular
5-HT ₁	1A, 1B, 1D, 1E, 1F	No se conocen	G $\alpha_{i/o}$	Inhibición de AC

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

*Producidas por “*splicing alternativo*”.

El receptor 5-HT3 pertenece a la familia de receptores colinérgicos nicotínicos y posee una arquitectura básica de heteropentámero, este receptor produce una rápida despolarización por la apertura inmediata de un canal iónico no selectivo permitiendo la entrada de Na⁺ y Ca²⁺ y la salida de K⁺. Los receptores a serotonina que se encuentran acoplados a las proteínas G pertenecen a la familia de receptores de tipo rodopsina (tipo A), cuentan en su estructura básica con 7 α -hélices transmembranales (TM) que atraviesan la membrana lipídica, se encuentran conectados por 3 loops intracelulares (ICL) y 3 loops extracelulares (ECL). El dominio amino terminal se encuentra orientado hacia la parte extracelular, mientras que la parte carboxi terminal se encuentra orientada hacia el citosol. Además el dominio extracelular posee dominios glicosilados de cisteína, el dominio intracelular posee dominios de fosforilación en serina y treonina, así como los sitios de interacción con proteínas G (Figura 7). La mayoría de estos receptores no contienen isoformas debidas a eliminación de intrones (*splicing alternativo*), sin embargo los receptores 5-HT4 y 5-HT7 tienen 10 y 3 isoformas respectivamente. Por otra parte, el RNA mensajero del receptor 5-HT2C sufre edición (modificación enzimática de adenosina a inosina) por lo que también da lugar a algunas isoformas funcionales de este receptor. Al igual que otros receptores acoplados a proteínas G, estos receptores tienen la capacidad de formar dímeros influenciando diferentes cascadas de transducción de señal (Berumen *et al.*, 2012, Nichols y Nichols, 2008, Hannon y Hoyer, 2008, Hoyer *et al.*, 2002, Barnes y Sharp, 1999).

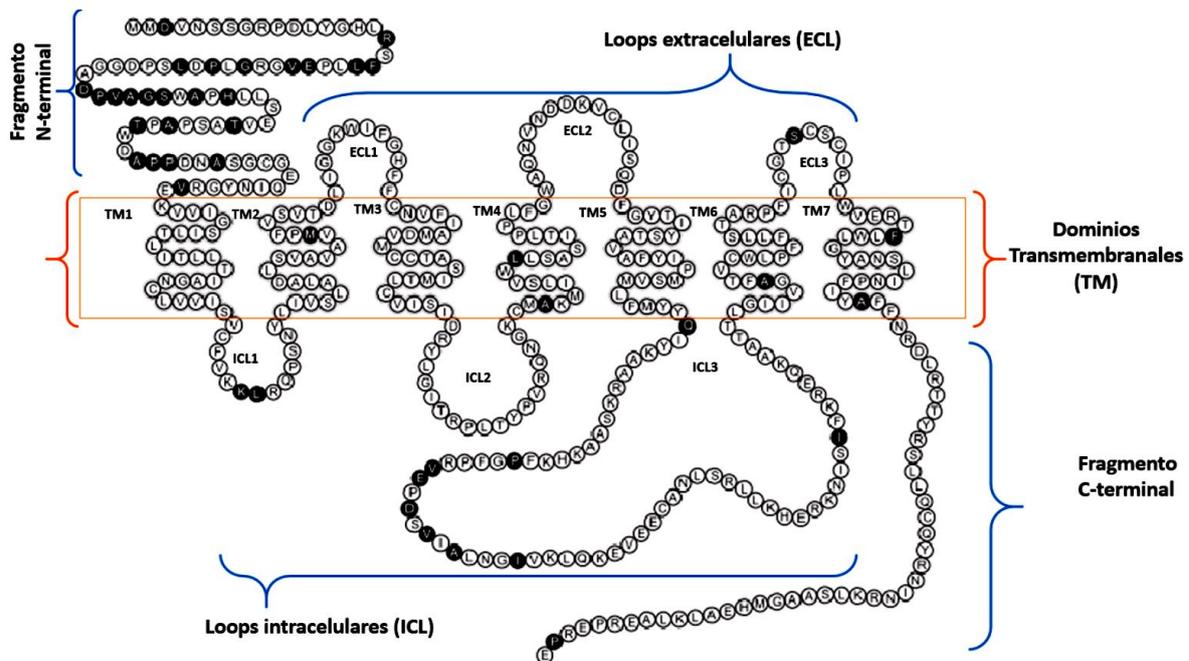


Figura 7. Diagrama de la sección transversal del receptor 5-HT7 (receptor acoplado a proteína G) a través de la membrana plasmática. Muestra los sitios descritos en el texto (Vanhoenacker *et al.*, 2000).

En las últimas décadas, la aplicación de las técnicas de fijación de radioligandos, el desarrollo de diversos estudios bioquímicos y funcionales, y los estudios de clonación molecular permitieron identificar a los receptores, aunque aún no se ha caracterizado completamente el perfil farmacológico y funcional de todos ellos. Esta caracterización de los diversos miembros de los receptores 5-HT se complementa, en la mayoría de los casos, con la identificación de fármacos agonistas y antagonistas selectivos para cada uno de los subtipos. La tabla 3 muestra algunos ejemplos de los ligandos farmacológicos de los receptores de serotonina (Beattie y Smith, 2008, Hoyer *et al.*, 2002).

Serotonina y sistema inmune

Existen evidencias sobre el efecto estimulador de serotonina sobre grupos celulares de la respuesta inmune. Una fuente de serotonina para el tejido linfático son los nervios simpáticos que lo inervan y que permiten la coliberación de noradrenalina y serotonina, estos tejidos pueden alcanzar concentraciones de hasta 1 μM . Esta hormona ha sido detectada en el tejido linfático incluido el bazo, timo, nódulos linfáticos y fluido linfático. De manera particular, las plaquetas que almacenan serotonina proveniente de las células enterocromafines, representan la mayor fuente de serotonina circulante.

Tabla 3. Ligandos farmacológicos de receptores a serotonina.

Familia	Subtipo	Agonistas selectivos	Antagonistas selectivos
5-HT1	5-HT1A	8-OH DPAT, BP554, azaspirodecadiona, buspirona	(S)WAY100135, NAN-190
	5-HT1B	L694247, CP94253, sumatriptán	SB236057, SB224289
	5-HT1D	PNU10929, L694247, sumatriptán	BRL15572
	5-HT1E	--	--
	5-HT1F	LY334370, LY334864	--
5-HT2	5-HT2A	TCB-2, α -4-metil-5-HT	R-96544, MDL100907, ketanserina
	5-HT2B	BW723C86, α -4-metil-5-HT	RS127445, ketanserina
	5-HT2C	Ro600175, WAY629, α -4-metil-5-HT	SB242084, RS102221, ketanserina
5-HT3	5-HT3A/B	2-Metil-5-HT, SR57227	ondansetrona, granisterona, alosetrona
5-HT4		ML10302, TD-5108, Benzamidas	GR113808, piboserod
5-HT5	5-HT5A	--	--
	5-HT5B	--	--
5-HT6		EMD386088	SB271046, SB357134
5-HT7		LP44, AS19	SB656104, SB269970

La liberación de la 5-HT almacenada en plaquetas puede ser inducida por el factor de activación de plaquetas, trombina, fragmentos de complemento C3a y C5a, o inmunoglobulina E; por lo tanto en los sitios de la inflamación en donde se da la activación de las plaquetas, las concentraciones locales de 5-HT son significativamente mayores a las cantidades relativamente bajas que se encuentran libres en el suero. A su vez la presencia de células enterocromafines en contacto, o muy cerca de los linfocitos CD3+ y CD20+ y la síntesis de 5-HT por monocitos, mastocitos y linfocitos T, son un indicio de la importancia de 5-HT como un factor estimulante de la respuesta inmune (Baganz y Blakely, 2013, Ahern, 2011).

Se sabe que algunas células del sistema inmune tiene la capacidad de sintetizar a serotonina ya que expresan a la triptófano hidroxilasa (TPH) que es la enzima limitante de la síntesis esta enzima se ha encontrado en monocitos y

esplenocitos de ratón. Además se ha encontrado la presencia del transportador de serotonina (SERT) en células dendríticas y células presentadoras de antígenos en murinos. Se ha descrito también la expresión del mRNA de 5-HT1B, 5-HT2A y 5-HT7; así como la síntesis de proteína de 5-HT1B y 5-HT7 en esplenocitos de ratón. (Magrini *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2011, León-Ponte *et al.*, 2007).

Se han hecho estudios en ratones parcialmente inmunosuprimidos evaluando el efecto de la administración crónica de Fluoxetina (inhibe la recaptura de 5-HT) en una patología neoplásica de linfocitos T (linfoma) en donde se observó que el tratamiento con Fluoxetina inhibe el crecimiento tumoral, retrasa su aparición y promueve la supervivencia del ratón (Frick *et al.*, 2008). Pai *et al.* describieron una relación directa entre la serotonina (síntesis y expresión de su receptor) y la proliferación de líneas celulares de cáncer mamario humano de diferentes estadios (Pai *et al.*, 2009).

Melatonina

La melatonina es una hormona ubicua descubierta en el año de 1956 por Dr. Aaron Lerner. Es una indolamina liposoluble con un peso molecular de 232.28 g/mol (Figura 8). Los primeros antecedentes de la melatonina corresponden a 1917 por McCord & Allen, quienes demostraron que los extractos de glándula pineal producían la agregación de gránulos de melanina en melanocitos de *Xenopus laevis* y con ello provocaban aclaramiento de la piel de rana. Fue hasta 1958 cuando el grupo de Lerner logró purificar esta molécula a partir de la glándula pineal bovina al año siguiente este mismo grupo de trabajo elucidó la estructura. En 1960, se identificó la biosíntesis a partir del aminoácido triptófano proveniente de la dieta. Posteriormente cobró importancia en la década de los 90 al encontrarse su papel como regulador del ciclo circadiano (Zlotos *et al.*, 2013, Reiter *et al.*, 2010).

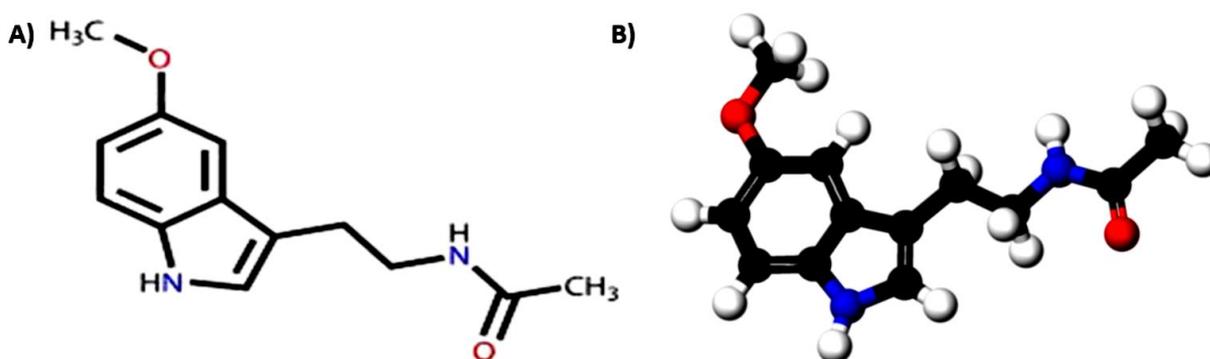


Figura 8. Esquemas de la estructura química de melatonina. A) Fórmula estructural de N-acetil -5-metoxitriptamina, B) modelo de barras y esferas.

A esta molécula se le denominó melatonina por los vocablos “*Mela*” por sus efectos sobre melanina, y “*tonina*” por su precursor endógeno, serotonina. La mayor tasa de síntesis de melatonina se realiza en la glándula pineal y se puede encontrar en todos los tejidos debido al transporte aferente que se realiza además de la síntesis extrapineal en un gran número de tejidos. Su versatilidad funcional se refleja en la amplia distribución filogenética, desde arqueas hasta mamíferos (Reiter *et al.*, 2010, Carrillo-Vico *et al.*, 2005).

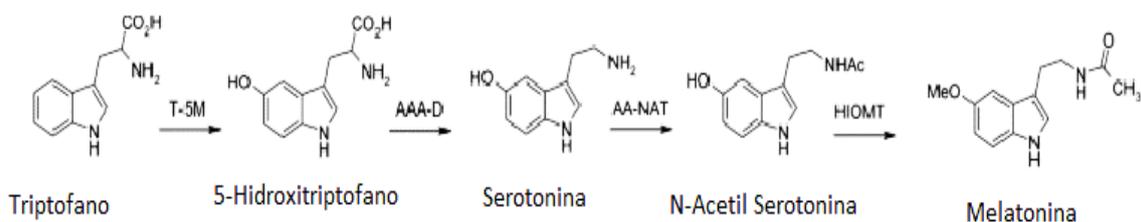


Figura 9. Esquema de reacciones de la biosíntesis de melatonina (Zlotos *et al.*, 2013).

La biosíntesis de melatonina inicia con el aminoácido triptófano obtenido de circulación sanguínea, al cual la 5-triptófano hidroxilasa (5-THP) le provoca una hidroxilación en C5, posteriormente sufre una descarboxilación en etilamino por la enzima L-amino descarboxilasa (LAD); este paso genera a la 5-Hidroxitriptamina (5-HT; Serotonina), que a su vez sufre una acetilación por N-Acetil transferasa (ANAT); por último, la hidroxiindol-O-metil transferasa (HIOMT) provoca una O-metilación en C5. El paso limitante de esta reacción es la formación de N-acetil serotonina y no está limitado por su precursor (serotonina), sino por la enzima responsable de transformarla N-acetil serotonina. La síntesis de ANAT está controlada por la liberación de noradrenalina como lo veremos más adelante (Figura 9) (Zlotos *et al.*, 2013).

Las principales reacciones de biotransformación de la melatonina son la hidroxilación, sulfatación y glucuronidación que generalmente ocurren en hepatocitos, además, de las reacciones propias de la neutralización de radicales libres. Los principales metabolitos que se generan de estas reacciones de biotransformación son la N-acetil-N-formil-N-metoxikinuramina (AFMK) y la N-acetil-metoxikinuramina (AMK), estos metabolitos conservan algunas propiedades fisicoquímicas de la melatonina y son excretados por la orina. El tiempo de vida media de la melatonina varía según las técnicas usadas para delimitarlo y se encuentra entre 10 -40 min (Zlotos *et al.*, 2013, Pandi-Perumal *et al.*, 2006, Karasek y Winczyk, 2006).

Como se mencionó anteriormente, la síntesis más significativa de melatonina ocurre en la glándula pineal y la concentración en la circulación sanguínea depende prácticamente de su síntesis en esta estructura, pues se ha demostrado que la pinealectomía suprime casi por completo la concentración de melatonina

en suero. Esta hormona se transporta en su mayoría unida a la albúmina (70%) y se encuentran bajas concentraciones de melatonina libre en plasma (30%). En humanos, la glándula pineal está localizada anatómicamente en la comisura anterior de la fosa pineal, en el techo del tercer ventrículo. Es una estructura lobulada que pesa aproximadamente 100-200 mg y mide 8 mm, con ligeras variaciones ligadas a la edad y al sexo. El parénquima de esta glándula está conformado por células neuroepiteliales llamadas pinealocitos (80% del total) y su estroma está formado por neuroglía y astrocitos (20%) (Claustrat *et al.*, 2005, Macchi y Bruce, 2004).

La mayor producción de melatonina ocurre durante la noche, en este momento las neuronas del ganglio cervical superior secretan noradrenalina, que activa a los receptores adrenérgicos β_1 de los pinealocitos. Estos receptores, que se encuentran acoplados a una proteína G están asociados a la subunidad alfa estimuladora (α_s), y ésta desencadena el aumento de la concentración de cAMP y la activación de PKA, que fosforila al factor de transcripción CREB, el cual favorece la síntesis de N acetil transferasa. CREB aumenta la expresión de mRNA de ANAT (enzima limitante de la biosíntesis). La melatonina sintetizada dentro de los pinealocitos, atraviesa por difusión al sistema circulatorio y se secreta al fluido cerebro espinal del tercer ventrículo, donde es captada por el Núcleo Supraquiasmático (NSQ) en el que melatonina ejerce su función como agente cronobiótico (Figura 10) (Reiter *et al.*, 2010, Claustrat *et al.*, 2005, Macchi y Bruce, 2004).

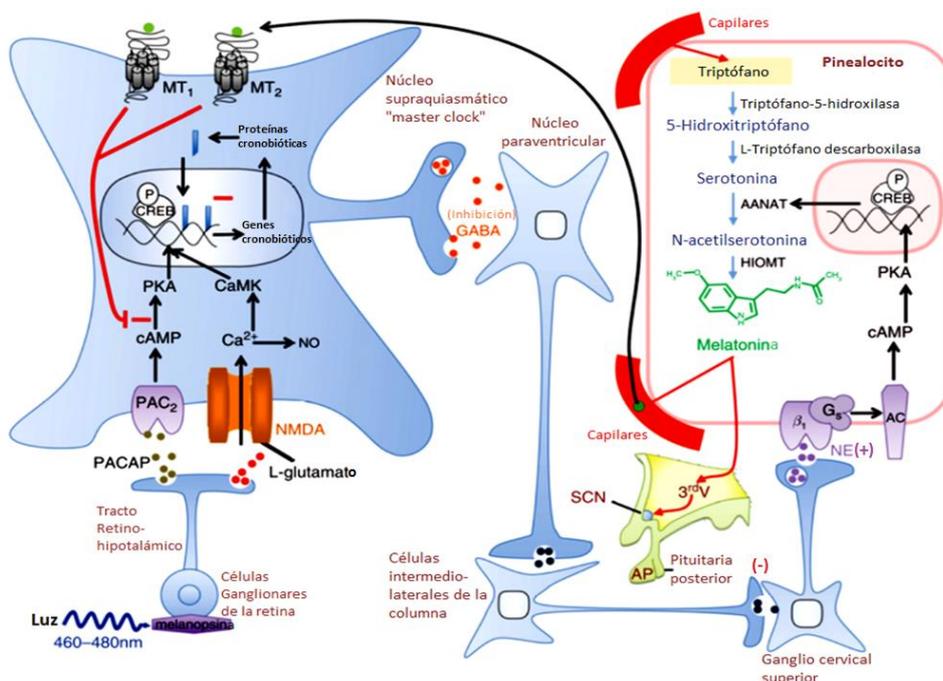


Figura 10. Esquema de la síntesis de melatonina en la glándula pineal (Reiter *et al.*, 2010).

La síntesis de melatonina en la glándula pineal se encuentra regulada por un complejo mecanismo de transducción de señales, que comienzan los melanocitos de la retina que tienen la función de impedir la producción de la hormona durante el día. Estas células altamente especializadas (1-2% del total de células de la retina) contienen un fotopigmento (melanopsina) que detecta una longitud de onda muy específica de la luz de día (460-480 nm.) y transducen la señal a través del tracto retinohipotalámico que se encarga de secretar a los neurotransmisores excitatorios (PACAP y glutamato) hacia el núcleo supraquiasmático. Los axones del núcleo supraquiasmático que inervan al núcleo paraventricular, secretan GABA que desencadena una cascada inhibitoria en las células intermediolaterales de la columna y posteriormente en las neuronas del ganglio cervical superior, en donde se inhibe la secreción de noradrenalina hacia los pinealocitos (Figura 10) (Reiter *et al.*, 2010).

De manera concisa, durante la noche se sintetiza la mayor concentración de melatonina en la glándula pineal y ésta se inhibe cuando los fotorreceptores en los melanocitos detectan la luz de día. El pico máximo de síntesis de melatonina se da entre las 2 y 4 am. Las concentraciones en suero de esta hormona durante el día oscilan alrededor 10-20 pg/ml y durante la noche aumentan considerablemente pinealocitos (Figura 11) (Reiter *et al.*, 2010).

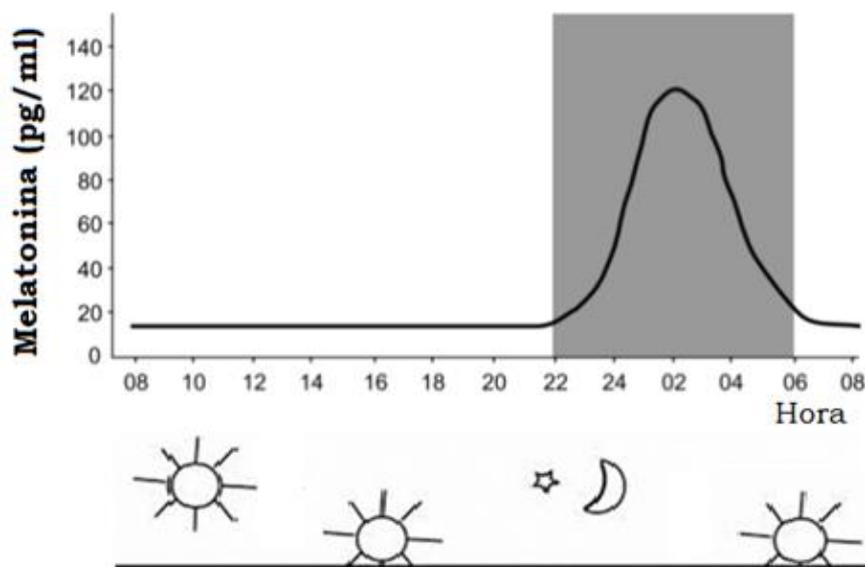


Figura 11. Gráfico de la síntesis de melatonina. (Karasek y Winczyk, 2006).

Se sabe que gracias a estas fluctuaciones de su síntesis, la melatonina es considerada uno de los principales agentes cronobióticos pues es secretada por la glándula pineal en respuesta a los ciclos ambientales de luz y oscuridad, estos cambios son detectados por el núcleo supraquiasmático, que es el principal regulador del ciclo circadiano y controla la temporalidad de diversos factores del metabolismo, reproducción y comportamiento. Además se le ha relacionado con

otras funciones fisiológicas importantes como la termorregulación, la maduración sexual y el control vasomotor. En la actualidad se ha encontrado evidencia que la describe como un importante regulador de la homeostasis mitocondrial, potenciador de la respuesta inmune, factor antiinflamatorio y factor oncostático (Hardeland *et al.*, 2011, Reiter *et al.*, 2010, Konturek *et al.*, 2007).

La gran diversidad de funciones de la melatonina se debe en gran parte a que es considerada un neurotransmisor ubicuo y factor neuroendócrino, y aunque la síntesis principal en la glándula pineal provee la mayor concentración de melatonina a la circulación, existen otros órganos y tejidos con la capacidad de producirla como el páncreas, adipocitos, córnea, médula ósea, plaquetas, hígado, pulmones, glándula pituitaria, piel, intestino, bazo, cerebelo, hígado, pulmones, tiroides, retina, riñones, glándula mamaria, ovarios, testículos, endotelio vascular, bazo, timo y las células del sistema inmune (Hardeland *et al.*, 2011, Galano *et al.*, 2011, Claustrat *et al.*, 2005).

Es bien sabido que el efecto pleiotrópico de la melatonina está mediado a través de diversos mecanismos, como los mediados por receptores (membranales y nucleares; homoméricos y diméricos) e independientes de ellos (unión a proteínas citoplasmáticas, neutralización de radicales libres) (Zlotos *et al.*, 2013, Reiter *et al.*, 2010, Pandi-Perumal *et al.*, 2006, Carrillo-Vico *et al.*, 2005).

Hasta el momento, se conocen 3 tipos de receptores membranales MT1, MT2 y MT3. Los receptores MT1 y MT2 (anteriormente denominados MT1a y MT1b, respectivamente) se expresan en todos los vertebrados estudiados. Estos receptores fueron clonados por primera vez en 1994 por Reppert a partir de melanocitos de *Xenopus laevis* y se encontró que MT1 y MT2 comparten un 55-69% de homología en los fragmentos transmembranales, cuentan con 350 y 362 aminoácidos, respectivamente y además pertenecen a los receptores acoplados a proteínas G de la clase A (Figura 12), que tienen su sitio de unión del ligando natural rodeado de hélices transmembranales (Zlotos *et al.*, 2013, Hardeland *et al.*, 2011).

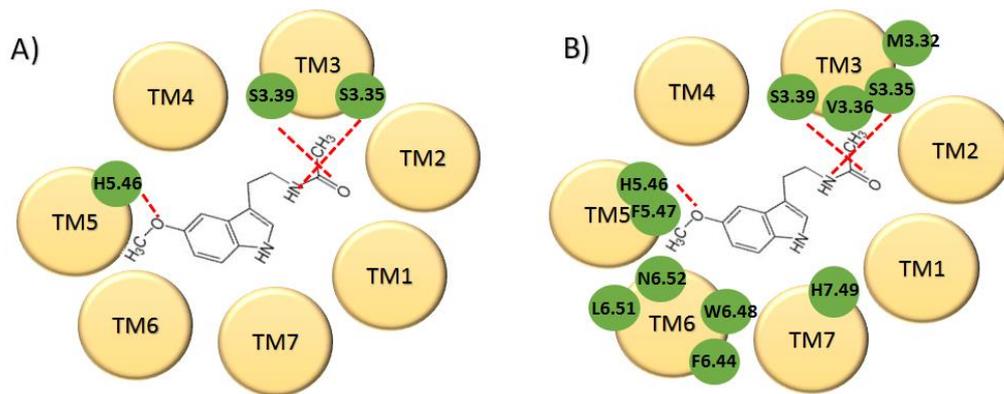


Figura 12. Representación en 2 dimensiones del sitio de unión de melatonina propuesto por A) Chugunov *et al.* y B) Farce *et al.* (Pala *et al.*, 2013)

En humanos el gen que codifica para MT1 se encuentra localizado en el cromosoma 4q35.1 mientras que el gen que codifica para MT2 se encuentra en 11q21-22. Cuentan con 7 α -hélices transmembranales (TM) que atraviesan la membrana lipídica, se encuentran conectados por 3 loops intracelulares (ICL) y 3 loops extracelulares (ECL). También poseen un puente disulfuro (S-S) que conecta 2 cisteínas entre el TM3 y ECL2 con la función de estabilizar la porción extracelular del receptor. Debido a que contiene regiones (*motifs*) conservadas de clase A (como ϵ DRY en el extremo C-terminal de TM3 que en MT1 y MT2 se transformó a NRY) se cree que éstos receptores han sufrido muy poca evolución. Además, en ambos receptores se forma interacción iónica entre el residuo de arginina con los aminoácidos ácidos de TM6 y forman la estructura que se conoce como “*ionic lock*” que le permite al receptor adoptar su conformación inactiva (Figura 13) (Zlotos *et al.*, 2013, Pandi-Perumal *et al.*, 2008, Karasek y Winczyk, 2006).

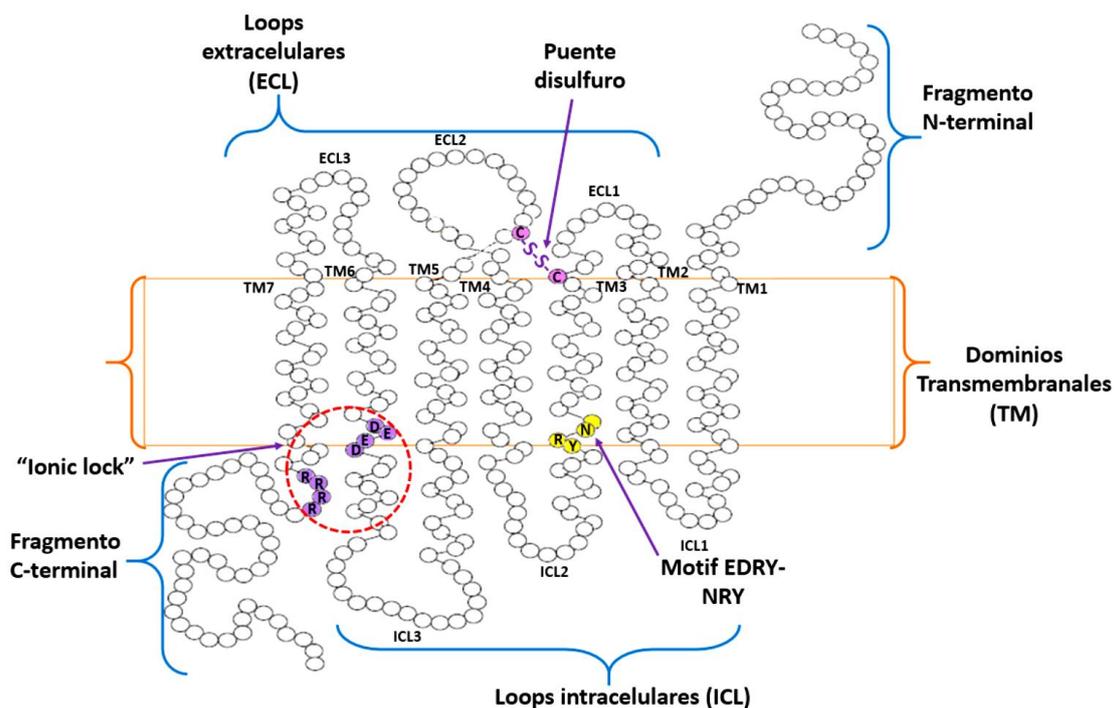


Figura 13. Diagrama de la sección transversal del receptor MT1 a través de la membrana plasmática. Muestra los sitios descritos en el texto (Zlotos *et al.*, 2013, Barret *et al.*, 2003).

MT1 y MT2 se consideran receptores de alta afinidad, sin embargo, MT1 tiene una constante de afinidad (K_d) y una constante de inhibición (K_i) menor que MT2. La alta afinidad de melatonina a los receptores MT1 y MT2 es debida a la suma de interacciones hidrofóbicas y débiles, dificultando su reproducción en modelos estructurales. MT3 es homólogo en un 95% a la enzima quinona reductasa 2, esta enzima pertenece a un grupo de reductasas que participan en la protección contra el estrés oxidativo evitando las reacciones de transferencia de electrones de quinona. Este receptor se considera de baja afinidad y además se expresa en pocas de las especies estudiadas hasta el momento (Tabla 4) (Zlotos *et al.*, 2013).

Tabla 4. Constantes de afinidad de los receptores a melatonina.

Receptor	Constante de Afinidad (K_d)	Constante de inhibición (K_i)
MT1	20-40 pmol/l	80.7 pM
MT2	160 pmol/l	383 pM
MT3	1-10 nM	-

Los mecanismos de acción de melatonina se han estudiado desde su purificación, por medio de sus agonistas, sin embargo al ser una molécula ubicua y pleiotrópica los mecanismos son dependientes de los tejidos y tipos celulares en los que se encuentra. De esta manera, se observó que la vía clásica de los receptores de membrana MT1 y MT2 que están acoplados a proteínas G con una subunidad G inhibidora y ejercen su acción mediante la inhibición de adenilato ciclasa (AC), que conlleva a una disminución de adenosinmonofosfato cíclico (AMPC) intracelular, luego a la disminución de la proteína cinasa A y la fosforilación de CREB (Figura 14). Sin embargo, también se ha reportado que estos receptores están asociados a otras subunidades y provocan diferentes efectos como en las líneas celulares COS-7 y SH-SY5Y que fueron transfectadas con los receptores MT1 clonados, y en donde la melatonina causó la estimulación de AMPC. Aunque aún no se ha elucidado el mecanismo de esta estimulación, se asoció tentativamente a la vía de calcio-calmodulina o a la activación de la cinasa terminal c-JUN (Hardeland *et al.*, 2011, Fuentes-Broto, 2008, Pandi-Perumal *et al.*, 2008, Masana y Dubocovich, 2001).

El primer ligando específico de los receptores a melatonina fue la [³H]melatonina, sin embargo esta molécula fue usada en un limitado número de estudios debido a su baja afinidad, con este ligando se encontró una constante de afinidad (Kd) de orden nanomolar, que es mucho mayor al encontrado posteriormente con 2-[¹²⁵I]melatonina y que es de orden subnanomolar. Este radioligando específico (2-[¹²⁵I]MLT) ha sido utilizado para realizar ensayos de unión al ligando en células o membranas y autorradiografías. Los sitios de unión de 2-[¹²⁵I]MLT en el rango subnanomolar corroboran la información obtenida con los receptores MT1 y MT2 clonados. La mayor densidad de estos sitios de unión (60 fmol/mg) se encontró en la *pars tuberalis* de la glándula pituitaria y en la retina. El receptor MT1 se caracteriza por presentar mayor afinidad a 2-[¹²⁵I]MLT que a melatonina y menos afinidad a 6-cloromelatonina; mientras que, MT2 está caracterizado por tener una afinidad similar a 2-[¹²⁵I]MLT que a MLT y a 6-cloromelatonina (Zlotos *et al.*, 2013, Masana y Dubocovich, 2001).

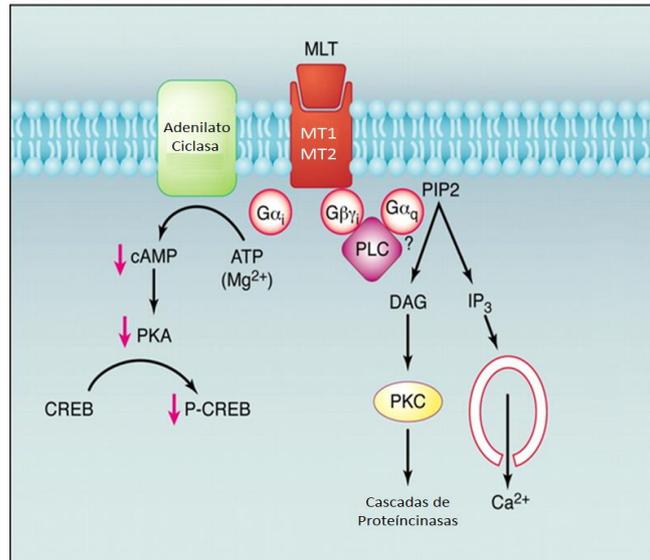


Figura 14. Esquema de la vía de señalización clásica de MT1 y MT2 (Masana y Dubocovich, 2001).

La melatonina es ampliamente reconocida como una sustancia no tóxica y segura que puede ser administrada de forma oral, popular en el tratamiento de problemas del sueño relacionados con la alteración del ciclo circadiano como el jet lag, el síndrome de fase de sueño retrasada y los trabajos por turnos. Sin embargo existen ciertos obstáculos para el uso clínico de esta sustancia, debidos a su perfil farmacocinético desfavorable; la melatonina tiene una vida media de entre 10 -40 min y varía según la técnica usadas para delimitarla, una alta tasa de eliminación y la falta de selectividad para los diferentes blancos biológicos incluidos los receptores MT1 y MT2. Nuevos avances en la química medicinal llevaron al descubrimiento de moléculas novedosas con diferentes estructuras y afinidad a los receptores que se determinó por medio de ensayos de competencia con 2-[¹²⁵I]MLT. Gracias a estos estudios, posteriormente se logró elucidar el farmacóforo para ambos receptores, que incluye un grupo metoxi y una cadena lateral amida que son esenciales para exacerbar la afinidad al receptor, así como su actividad intrínseca. Para la síntesis de nuevas moléculas agonistas (Figura 15), se buscó disminuir la polaridad de éstas moléculas (por medio de metilaciones) para aumentar la vida media. El primer agente sintético melatoninérgico en el mercado fue el agonista no selectivo (MT1/MT2) de alta afinidad RAMELTEON (Rozerem, Takeda Pharmaceuticals) aprobado para el tratamiento del insomnio y con una vida media de 0.83 -1.93h. Otro agonista no selectivo (MT1/MT2) es la AGOMELATINA (Valdoxan, Servier) que se aprobó en Europa para el tratamiento de la depresión mayor ya que además es antagonista de los receptores a serotonina 5-HT_{2C}. TASIMELTEON (Heltioz, Vanda Pharmaceuticals Inc.) es otro agonista no selectivo (MT1/MT2) que aprobado el 31 de enero de 2014 por la FDA para el tratamiento de desórdenes del sueño ya que ha demostrado mejorar la latencia y eficiencia del sueño y además mejora

el periodo de latencia posterior a despertar y también como agente inmuno estimulante (Zlotos *et al.*, 2013, Maestroni, 1993).

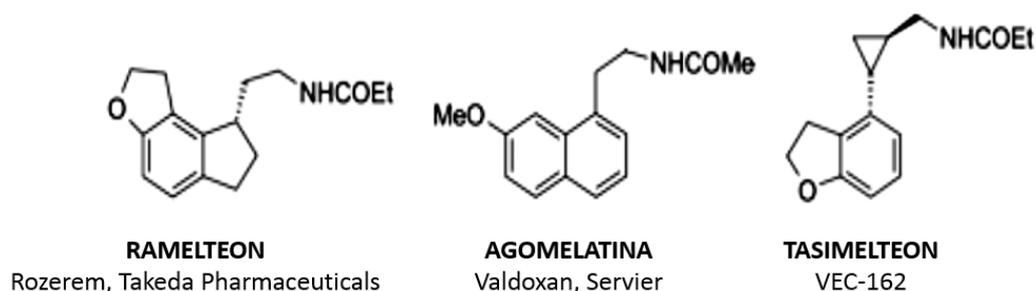


Figura 15. Estructuras de algunos agonistas sintéticos de MLT (Zlotos *et al.*, 2013).

Se sabe que el cerebro es un tejido muy susceptible al daño por radicales libres debido a que utiliza altas concentraciones de oxígeno y que contiene grandes cantidades de ácidos grasos oxidables y se ha demostrado que melatonina tiene una relevancia como antioxidante debido a que es generada *in situ* (glándula pineal), es secretada al fluido cerebroespinal y además es liposoluble. Varios estudios han documentado el poder neuroprotector de melatonina contra desórdenes por estrés oxidativo como parkinson, alzheimer o isquemia y además ha demostrado ser más eficiente en estas patologías que otros antioxidantes como vitamina E, vitamina C y deprenil. Incluso, basados en la habilidad de esta hormona para neutralizar una amplia variedad de ROS y RNS se ha planteado que su función primaria en seres vivos fuera la de protegerlos contra el estrés oxidativo, lo cual es una hipótesis poco ordinaria debido a su importancia como regulador del ciclo circadiano. El papel de la melatonina dentro de la inhibición de la peroxidación de los lípidos ha sido bien establecida. La cantidad de datos que respaldan la acción protectora de melatonina contra el estrés oxidativo es impresionante (Galano *et al.*, 2011, Hardeland *et al.*, 2011).

A pesar de los numerosos reportes de la actividad antioxidante de melatonina y sus metabolitos, la información del mecanismo o mecanismos que determinan esta actividad no está bien definida. Basados en lo que se sabe de otros antioxidantes se ha especulado que los posibles mecanismos son: Formación de aductos, transferencia electrónica y transferencia de protones. Sin embargo, elucidar el mecanismo de acción predominante requiere de gran esfuerzo pues esto implica contemplar el gran número de reacciones que ocurren simultáneamente, así como la reactividad de las especies reactivas del entorno, además de considerar los posibles mecanismos de reacción en cadena. Debido a lo anterior, al momento de distinguir es necesario evaluar de manera teórica y

práctica para obtener más aproximaciones al respecto (Galano *et al.*, 2011, Marshall *et al.*, 1996).

Melatonina y sistema inmune

El concepto de que la glándula pineal está asociada al sistema inmune, fue propuesto inicialmente en 1926 por Berman y colaboradores quienes alimentaron por 2 años cachorros de gato con extractos de la glándula pineal de toros jóvenes. El grupo alimentado con la glándula pineal mostró una resistencia a infecciones significativamente mayor al grupo control. Este concepto se retomó posteriormente causando gran controversia ya que existían datos que argumentaban que la glándula pineal estimulaba la respuesta inmune y datos que expresaban lo contrario, sin embargo por la década de los 70s, Reiter y colaboradores, mostraron el efecto de la pinealectomía (Carrillo-Vico *et al.*, 2013, Carrillo-Vico *et al.*, 2005).

Fue hasta 1981 que Georges Maestroni y colaboradores demostraron que la inhibición funcional (ratones mantenidos sin fase de oscuridad) y farmacológica (administración de antagonista de receptores adrenérgicos β , propranolol; e inhibidor de la síntesis de serotonina p-clorofenilalanina) de la síntesis de melatonina disminuía la capacidad de ejecutar una respuesta primaria con anticuerpos. Además disminuyó el número de células de timo y bazo, así como el peso total del tejido/órgano. En el caso del bloqueo farmacológico, sólo se disminuye esta respuesta primaria con administración de los inhibidores por la noche (Maestroni, 1993).

Estudios posteriores mostraron el efecto inmuno potenciador de melatonina sobre la respuesta inmune primaria y secundaria contra eritrocitos de oveja y en la respuesta secundaria de los linfocitos T citotóxicos contra inóculos del virus *Vaccinia*. Además se demostró que la suplementación nocturna de melatonina revierte la depresión de la respuesta inmune inducida por fármacos como ciclofosfamida y corticosteroides. Este efecto se confirmó por Caroleo y colaboradores en un modelo de envejecimiento en ratones en donde se observó que restaura la actividad de las células T cooperadoras y la producción de IL-2 e IFN- γ (Maestroni, 1993).

El efecto potenciador de esta hormona en inmunidad innata se observó principalmente en la estimulación de síntesis de IL-2 y el anticuerpo IgA de saliva, el aumento de la toxicidad celular dependiente de anticuerpos, en el incremento en la blastogénesis de linfocitos y la tasa de linfocitos cooperadores/supresores. Sin embargo sobre la actividad de *Natural Killer* se han reportado estudios que señalan tanto la estimulación como la disminución (Maestroni, 1993).

Gracias al descubrimiento de que la IL-2 puede potenciar y generar células LAK a partir de Linfocitos T y NK se propuso esta citocina como terapia para el tratamiento del cáncer, desafortunadamente su efecto a altas concentraciones genera toxicidad severa además de otros efectos secundarios. Sin embargo los experimentos para evaluar el efecto combinado de melatonina + IL2 en el tratamiento de pacientes con metástasis en pulmón, muestran que melatonina potencia el efecto de IL2, mejora el pronóstico y la calidad de vida del paciente ya que permite que se disminuya la dosis de interleucina (Maestroni, 1993).

Se ha demostrado la diversidad de funciones de inmuno regulación que están mediadas por MLT y se ha evidenciado la síntesis de MLT en varios leucocitos (como monocitos, eosinófilos, mastocitos, linfocitos T, *Natural Killer*, células de médula ósea, timocitos y células epiteliales, entre otras) (Hardeland *et al.*, 2011).

Existen numerosos reportes que describen la unión específica de ¹²⁵I - melatonina en la membrana de bazo de pichones, pollo, ratones y cuyos, además de la expresión y biosíntesis de receptores a MLT de tipo 1 (MLT1) en linfocitos T (Hardeland *et al.*, 2011, Fildes *et al.*, 2009, Konturek *et al.*, 2007, Lardone *et al.*, 2010, Miller *et al.*, 2006).

Además Lardone y colaboradores mostraron en 2010 que la inhibición del RNA mensajero del receptor de melatonina disminuye la expresión y la síntesis de la IL-2, una importante molécula señalizadora que promueve la proliferación de células de sistema inmune. Por otro lado, en 1993 la melatonina se describió como una molécula capaz de retrasar o disminuir la oxidación de otras moléculas, es decir una molécula antioxidante (Pinchuk *et al.*, 2012, Lardone *et al.*, 2010).

Justificación

La actividad de 5-HT y MLT como moduladores de la respuesta inmune ya ha sido explorada, pero hay pocos estudios de la relación de estos inmunomoduladores con la respuesta antitumoral y los mecanismos por los cuales se promueven o estimulan estas respuestas tampoco han sido analizados por completo. Es por ello que en este trabajo se pretende la actividad de melatonina y serotonina sobre la estimulación de la actividad inmune de linfocitos T citotóxicos *in vitro*, así como los mecanismos involucrados.

Pregunta de investigación

¿Qué influencia tiene la unión de serotonina y melatonina a sus receptores metabotrópicos (5-HTR7 y MLTR1) sobre la respuesta inmune antitumoral de linfocitos T?

Hipótesis

La unión de 5HT y MLT a sus receptores metabotrópicos (5-HTR7 y MLTR1) incrementa la respuesta inmune antitumoral de linfocitos T.

Objetivos

Objetivo General

Determinar el efecto de la unión 5-HT y MLT a sus receptores (5-HTR7 y MLTR1) sobre la actividad inmune antitumoral de linfocitos T.

Objetivos Particulares

- Determinar el efecto de los tratamientos con diferentes concentraciones de 5-HT y MLT en proliferación y secreción de IL-2 e IL-4.
- Identificar a los receptores metabotrópicos de 5-HT y MLT presentes en linfocitos T.
- Determinar el efecto antioxidante de los tratamientos con diferentes concentraciones de 5-HT y MLT en linfocitos T.

Metodología

Material biológico

Cultivo celular

Se utilizaron leucocitos circulantes a partir de sangre completa y una línea celular de Linfocitos T humanos (JURKAT, ATCC no. TIB-152). Las células se crecieron en condiciones de cultivo, en medio RPMI (GIBCO) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (medio basal). Los cultivos se mantuvieron dentro de una incubadora a 37°C, en alta humedad y una atmósfera de 5% de CO₂ en aire. El medio se renovó según lo requirió el crecimiento de las células. Cuando el cultivo se encontró al 80% de confluencia, las células se disgregaron por pipeteo para su propagación o adicionalmente se contaron para posterior experimentación.

Diseño experimental

Para todos los ensayos se sembraron cajas de cultivo de 12 pozos a una densidad 2.5×10^5 células Jurkat en 1 ml de medio de cultivo RPMI. Se hicieron 3 repeticiones de cada experimento con 3 réplicas por grupo. Se generaron 10 grupos experimentales en 2 condiciones, con suero fetal bovino y deprivados de SFB; debido a que el SFB contiene factores de crecimiento y hormonas como 5-HT y MLT, fue necesario retirar el SFB para observar el efecto directo sobre las células. Por otro lado cuando estas células se deprivan de SFB se disminuye viabilidad celular por lo que se dejó evaluó también el efecto de los tratamientos con SFB. (Figura 16). Los siguientes grupos experimentales crecieron en medio de cultivo RPMI con diferentes concentraciones de los neurotransmisores, desde 1×10^{-12} hasta 1×10^{-3} , los tratamientos con serotonina se muestran en tonos verdes, los tratamientos con melatonina se muestran en tonos morados y el control en amarillo (Frick *et al.*, 2008).

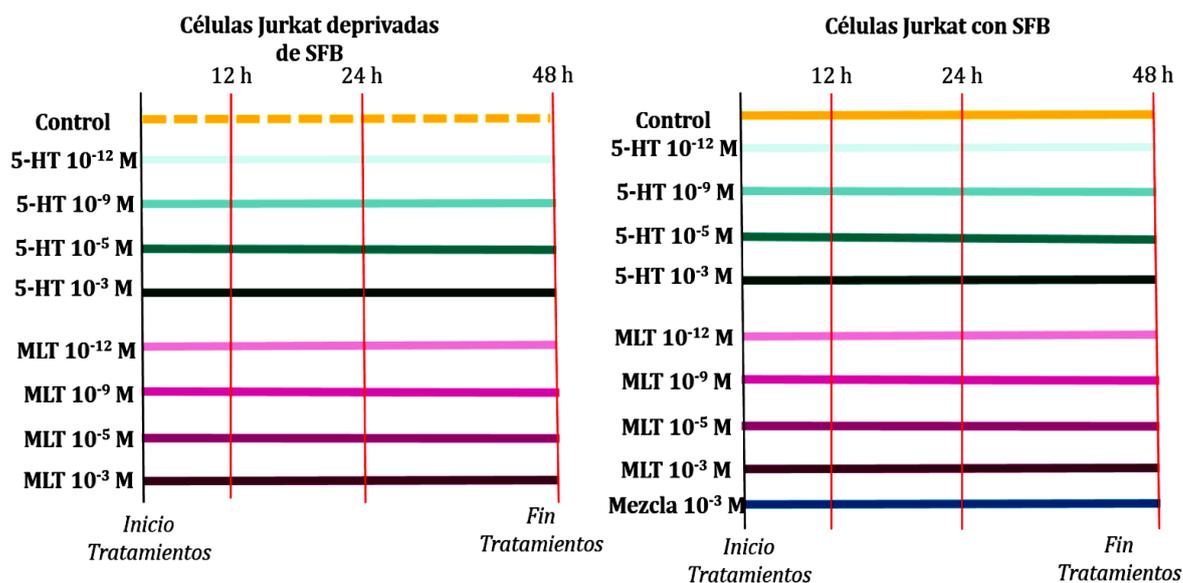


Figura 16. Esquema general que muestra los diferentes grupos experimentales utilizados.

Los tratamientos se prepararon disolviendo 10 mg las hormonas en 10 mL de medio RPMI-1640 (1 mg/mL) y posteriormente disponiendo las diluciones. Una vez que se contaron y sembraron las células Jurkat, se administró el tratamiento en las cajas, según las concentraciones descritas en la figura 16. A las 24 horas se agregaron 0.5 mL más de medio con la misma concentración de los tratamientos. Transcurrido el tiempo indicado de incubación (12, 24 o 48 horas) con el tratamiento, se colectaron las células para su análisis posterior.

Métodos de análisis

Ensayo de Proliferación celular (Azul tripano)

Los ensayos con azul tripano se realizaron como análisis posterior a los tratamientos que se muestran en la figura 16, se colectaron y resuspendieron las células Jurkat de cada pozo para hacer una “solución madre” a partir de la cual se hizo una dilución 1:5 en PBS de la que se tomaron 100 µl que se resuspendieron con 100 µl de una solución 0.04% de azul tripano, para realizar una tinción selectiva de las células viables. El azul tripano es un colorante que se incorpora y se difunde al citoplasma de las células no viables y las tiñe de azul, mientras que la membrana íntegra de las células viables impide su difusión por lo que no se tiñen. Por último se colocó una muestra de 10 µl de la solución resuspendida (dilución 1:5 + solución de azul tripano) en una cámara de Neubauer y se contó el número total de células sin teñir (5 campos y 6 repeticiones). El número total de células en la solución madre se obtuvo con la suma del promedio de células de las 6 repeticiones, y la siguiente ecuación:

#células total = 10,000* vol. soln. madre* (vol. dilución/ no. de campos)

Cuantificación de IL- 2 e IL-4

Una vez terminados los tratamientos de las células se colectó el volumen total de las células en suspensión con los tratamientos y se centrifugaron por 6 min a 1500 rpm, después se recolectó el sobrenadante en tubos epperdorff. Se utilizó un kit de ELISA (Human IL-4, Mini ELISA Development Kit, PEPROTECH) para la determinación de IL-2 e IL-4 por medio de un ensayo de "doble anticuerpo" o "sándwich", el protocolo se describe a continuación.

Los pozos de la microplaca del kit se incubaron previamente con un exceso del anticuerpo monoclonal específico contra IL-2 e IL-4 (anticuerpo de captura) para pegar el anticuerpo de captura a la superficie de los pozos de la placa. Y posteriormente se realizó un bloqueo de inespecífico con BSA 1% en PBS. Después, las muestras (sobrenadante de tratamientos o la curva de calibración con estándar de ILs), se incubaron en la microplaca a temperatura ambiente por 2 h para lograr la unión de IL-2 e IL-4 de la muestra al anticuerpo de captura. Tras lavado de la placa, se incubó por 2h a temperatura ambiente con un segundo anticuerpo IL-2 / IL-4 con la proteína biotina (anticuerpo de detección). Después se agregó el conjugado Avidina-Peroxidasa y se incubó por 30 min. Por último, se adicionó el sustrato cromogénico de la enzima HRP, la solución de ABTS con incubación a temperatura ambiente por 60 min, se realizaron lecturas cada 5 min con el lector de placas para su cuantificación colorimétrica. La cantidad de color unido al pozo es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra, se utilizaron los tiempos en donde la lectura de densidad óptica del punto máximo de la curva estándar fue menor o igual a 400 nm y el punto mínimo mayor o igual a 0.020 nm.

Identificación de receptores 5-HT7 y MLT1.

Se obtuvo un pellet de células Jurkat sin tratamientos y se realizó la extracción de proteínas totales y se cuantificó por el método de Bradford. La expresión de los receptores 5-HT7 y MLT1 en la línea celular Jurkat se comprobó mediante *western blot* utilizando los anticuerpos policlonales 5-HT7 (M-15, Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:500), MEL-1A/B (H-120, Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:500. Brevemente, 2.8 µg de proteína se resolvieron en un gel de acrilamida al 12%. Las proteínas así separadas se transfirieron a una membrana Hybond ECL (Amersham) de nitrocelulosa. La membrana se incubó con un anticuerpo policlonal contra los receptores antes mencionados a dilución de 1:500, y con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. La reactividad del antígeno se demostró con el sistema ECL de quimioluminiscencia no comercial, preparado por Rodríguez y colaboradores para nuestro laboratorio (Rodríguez-Cruz, 2013). Como control se utilizó un

anticuerpo policlonal contra la proteína β -Actina (H-120, Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:500.

Ensayo de Capacidad Antioxidante Total (Método FRAP)

El poder reductor de los tratamientos con 5-HT y MLT se determinó aplicando un método colorimétrico basado en la técnica descrita por Benzie y Strain (Pinchuk *et al.* 2012). A bajo pH y en presencia de antioxidantes (reductores), la forma férrica del complejo hierro-tripiridiltriazina (Fe^{III} -TPTZ) se reduce a su forma ferrosa (Fe^{II} -TPTZ) (Figura 17). El complejo reducido posee una coloración azul intensa que presenta su máxima absorción a 593 nm. La aparición del color indicó la capacidad reductora de la muestra. El reactivo de trabajo FRAP se preparó en el momento de su utilización mezclando 25 mL de buffer de acetato de concentración 300 mM (pH 3.6), 2.5 mL de solución 10 mM de TPTZ en HCl 40 mM y 2.5 mL de una solución 20 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. El ensayo se realizó del siguiente modo sobre tratamientos de serotonina y melatonina: Se tomó una lectura de blanco a 593 nm con 300 μL de reactivo FRAP a 37°C, a los que continuación se añadieron 10 μL del sobrenadante y 30 μL de agua. Tras incubar la mezcla de reacción a 37°C durante 60 minutos, se midió de nuevo la absorbancia a 593 nm.

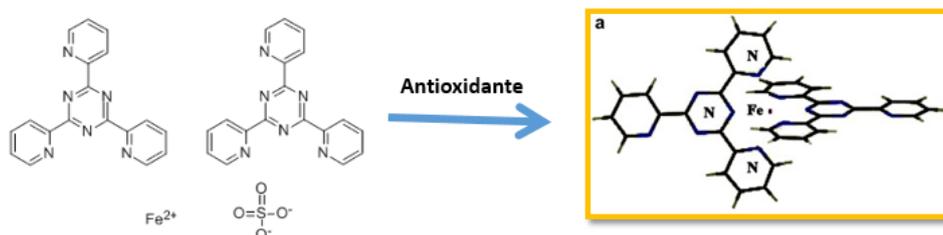


Figura 17. Esquema de la reacción de síntesis del radical TPTZ.

Ensayo de Capacidad Antioxidante Total (Método ABTS+)

Para poder evaluar distintos mecanismos de capacidad antioxidante de serotonina y melatonina se utilizó también el ensayo de CAT por el método de ABTS, técnica descrita por Roberta Re y col. (Pinchuk *et al.*, 2012, Re *et al.*, 1999). Se basa en la decoloración del radical ABTS^+ (Figura 18) previamente preparado por la adición de persulfato de sodio y que tiene un tiempo de vida media de aproximadamente 2 días, es de color verde y puede medirse a absorbancia de 415 nm. Los antioxidantes impiden esta reacción por transferencia electrónica e impiden la formación del radical de color verde, la concentración del antioxidante en la muestra es inversamente proporcional a la formación del radical a una absorbancia de 415 nm. El ensayo se realizó como a continuación se describe sobre tratamientos de serotonina y melatonina, en la línea celular Jurkat y en los linfocitos circulantes. Primero se realiza la solución

de radical $ABTS^+$, con persulfato potásico 2.45 mM y ABTS 7 mM. Se afora a 10 ml con H_2O_{dd} y se incuba por 16 h a temperatura ambiente. Posteriormente se mide la absorbancia del radical a 754nm y se diluye con H_2O_{dd} hasta absorbancia igual a 0.7nm. En la placa se agregan las muestras (células tratadas, sobrenadante o curva de calibración con TROLOX) y posteriormente 10 μ L de la solución de ABTS se mide la absorbancia a 415 nm y después de 30 min de agregar el reactivo.

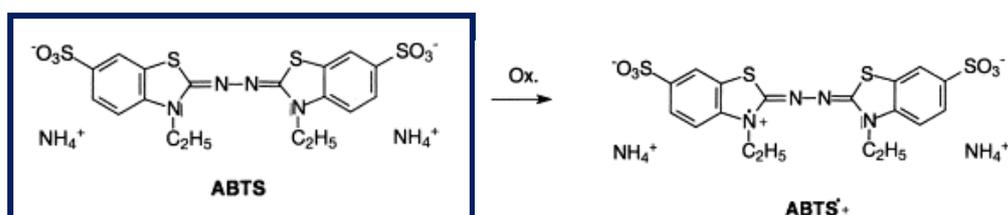


Figura 18. Esquema que muestra la reacción de síntesis del radical $ABTS^+$.

Análisis estadístico

Los datos están expresados como la media \pm la desviación estándar (DE). Para los gráficos de proliferación se realizó el análisis estadístico por medio de ANOVA de una vía, seguido del análisis *post hoc* Dunnett, que compara las medias con el control. En todos los casos, las diferencias con una $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas. Todos los análisis fueron realizados con la ayuda del paquete estadístico Graph Pad Prism.

Resultados

Proliferación por método azul tripano en tratamientos sin SFB

El primer objetivo de este trabajo consistió determinar el efecto de los tratamientos de diferentes concentraciones de 5-HT y MLT en la proliferación de linfocitos T (células Jurkat) *in vitro*, esta cuantificación se realizó mediante el método de azul tripano a 12, 24 y 48 horas. En las gráficas se muestran en tonos de verde los resultados de serotonina y en tonos morado los de melatonina, tanto en gráficas de barra como en las curvas de respuesta.

En la figura 19 se muestra la tasa de proliferación de las células Jurkat en medio RPMI-1640 sin Suero Fetal Bovino posterior a tratamientos de 12 h con las diferentes concentraciones de los neuroinmunomoduladores. Como se puede apreciar en la imagen, no existe una diferencia significativa entre ninguno de los tratamientos de serotonina ni de melatonina con respecto al control, la tasa de

proliferación con el tratamiento de 1×10^{-12} M de serotonina y también de melatonina, una media mayor aunque con una variabilidad mayor (1.73 ± 0.92 y 1.46 ± 1.2 , 5-HT y MLT respectivamente vs 1 ± 0.2 del control)

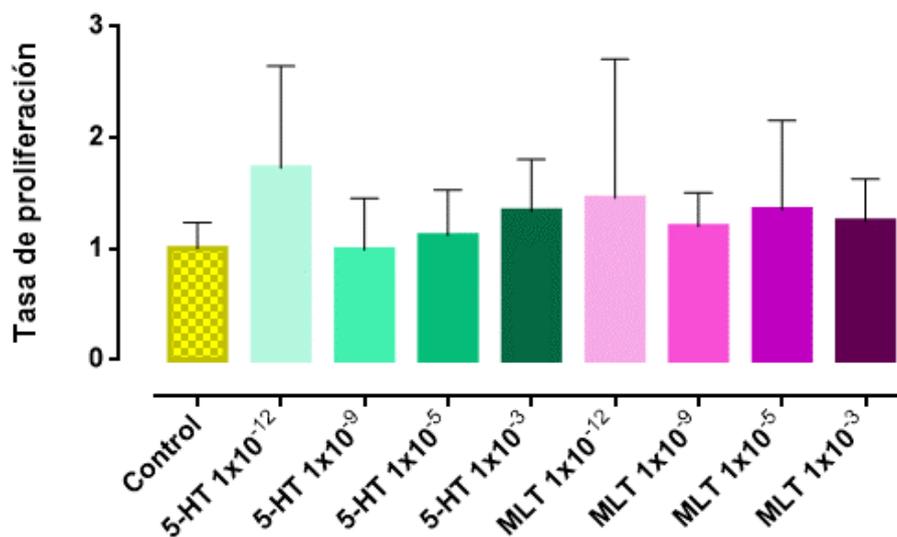


Figura 19. Gráfico de tasa de proliferación 12 h de Jurkat con tratamientos de serotonina y melatonina sin SFB, n=5. En tonos de verde se muestran los resultados de serotonina, en tonos de morado los de melatonina y en amarillo el control. ANOVA de una vía con análisis *post hoc* Dunnett. La diferencia con $p < 0.05$ es significativa.

En la figura 20 se muestra la tasa de proliferación de las células Jurkat 24 horas después de agregar los tratamientos de serotonina y melatonina al medio RPMI-1640 sin Suero Fetal Bovino, en este ensayo no hay diferencia significativa entre los grupos con tratamientos con respecto al control, la tendencia de aumento en la tasa de proliferación con el tratamiento de serotonina se conserva y es menor para melatonina.

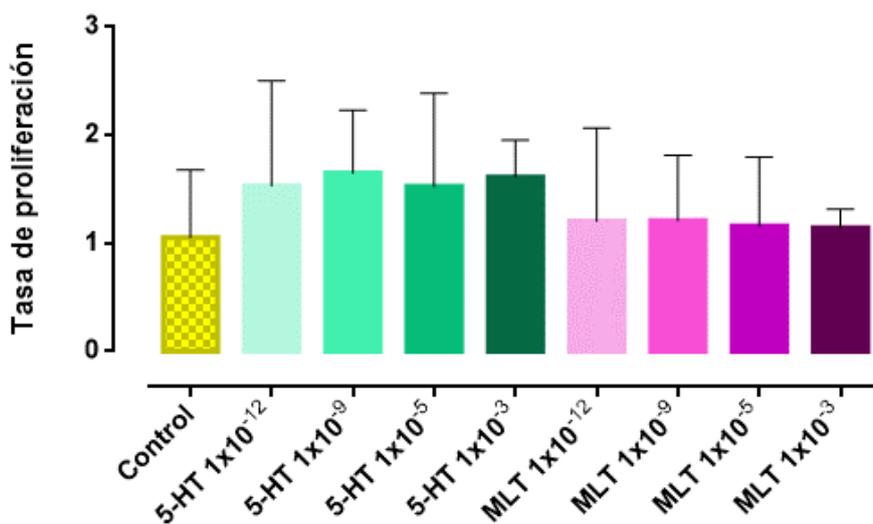


Figura 20. Gráfico de tasa de proliferación 24 h de Jurkat con tratamientos de serotonina y melatonina sin SFB, n=5. En tonos de verde se muestran los resultados de

serotonina, en tonos de morado los de melatonina y en amarillo el control. ANOVA de una vía con análisis *post hoc* Dunnett. La diferencia con $p < 0.05$ es significativa.

La tasa de proliferación de las células Jurkat con tratamientos a las 48 horas se observa en la figura 21, el gráfico no muestra diferencias significativas entre los grupos con tratamientos en medio RPMI-1640 sin Suero Fetal Bovino con respecto al control, la tendencia de aumento en la tasa de proliferación con el tratamiento de 1×10^{-12} M de serotonina se conserva al igual que en los tratamientos de 12 y 24 horas sin llegar a tener una diferencia significativa, de manera inversa los tratamientos 1×10^{-3} M de serotonina, 1×10^{-12} M y 1×10^{-3} M de melatonina muestran una tendencia de la tasa de proliferación disminuida con respecto al control.

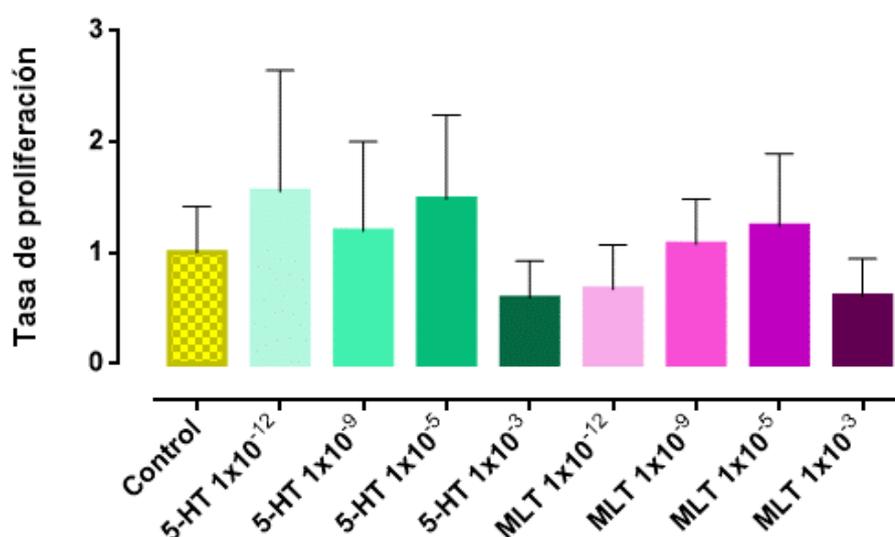


Figura 21. Gráfico de tasa de proliferación 48 h de Jurkat con tratamientos de serotonina y melatonina sin SFB, $n=5$. En tonos de verde se muestran los resultados de serotonina, en tonos de morado los de melatonina y en amarillo el control. ANOVA de una vía con análisis *post hoc* Dunnett. La diferencia con $p < 0.05$ es significativa.

Proliferación por método azul tripano en tratamientos con SFB

Como parte del primer objetivo también se cuantificó la tasa de proliferación de las células Jurkat en el medio RPMI-1640 con Suero Fetal Bovino suplementado con diferentes concentraciones de 5-HT y MLT, por el método de azul tripano a 12, 24 y 48 horas. En estos ensayos se agregó el grupo experimental de mezcla de serotonina y melatonina a la concentración de 1×10^{-3} M de cada uno. En la figura 22, se observa el comportamiento a las 12 horas de las células Jurkat control y los grupos tratados éstos no muestran diferencias significativas con respecto a su control en cuanto a la tasa de proliferación.

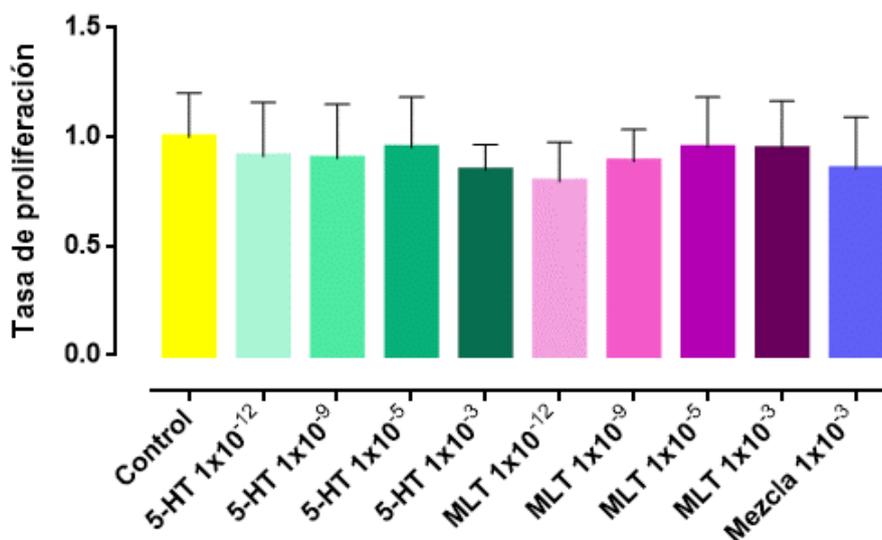


Figura 22. Gráfico de tasa de proliferación 12 h de Jurkat con tratamientos de serotonina y melatonina con SFB, n=3. En tonos de verde se muestran los resultados de serotonina, en tonos de morado los de melatonina y en amarillo el control. ANOVA de una vía con análisis *post hoc* Dunnett. La diferencia con $p < 0.05$ es significativa.

En la figura 23 se muestra la tasa de proliferación de las células Jurkat en medio RPMI-1640 con Suero Fetal Bovino posterior a tratamientos de 24 h con las diferentes concentraciones de 5-HT y MLT, como se observa en la imagen no existe una diferencia significativa entre ninguno de los tratamientos de serotonina ni de melatonina con respecto al control.

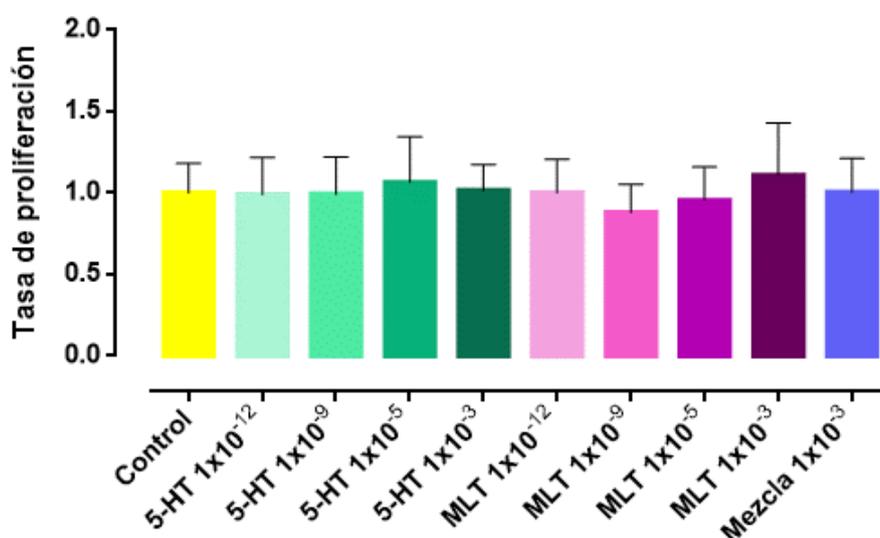


Figura 23. Gráfico de tasa de proliferación 24 h de Jurkat con tratamientos de serotonina y melatonina con SFB, n=3. En tonos de verde se muestran los resultados de serotonina, en tonos de morado los de melatonina y en amarillo el control. ANOVA de una vía con análisis *post hoc* Dunnett. La diferencia con $p < 0.05$ es significativa.

En la figura 24, se muestra la tasa de proliferación de las células Jurkat 48 horas después de agregar los tratamientos de serotonina y melatonina al medio RPMI-1640 con Suero Fetal Bovino en este ensayo se muestra la disminución significativa de la tasa de proliferación del grupo 1×10^{-3} M de melatonina y el grupo tratado con una mezcla de serotonina y melatonina a la concentración de 1×10^{-3} M con respecto al control, el grupo con el tratamiento de 1×10^{-3} de serotonina también muestra una disminución discreta de la tasa de proliferación sin llegar a ser significativa.

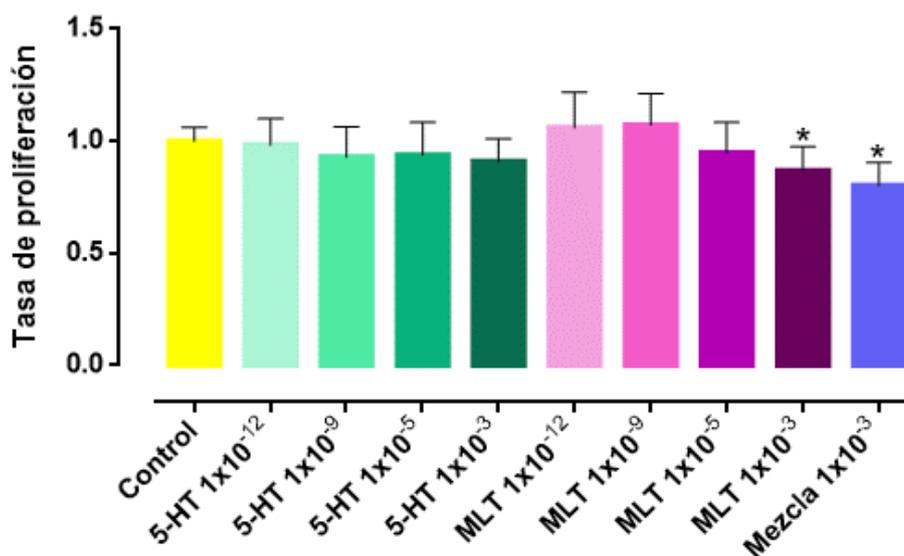


Figura 24. Gráfico de tasa de proliferación 48 h de Jurkat con tratamientos de serotonina y melatonina con SFB, n=3. En tonos de verde se muestran los resultados de serotonina, en tonos de morado los de melatonina y en amarillo el control. ANOVA de una vía con análisis *post hoc* Dunnett. El asterisco “*” indica una diferencia significativa con respecto al control con $p < 0.05$.

Cuantificación de interleucina 2 (IL-2) y de IL-4 en células

Jurkat

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre la actividad inmune de las células Jurkat, se cuantificó la secreción de las citocinas IL-2 e IL-4 en el sobrenadante de los cultivos tratados de linfocitos T (Jurkat) en RPMI-1640 con SFB, por medio de un ensayo de ELISA a 24 y 48 horas. Para este ensayo, se utilizó la curva de interleucina 2 que se muestra en la figura 25 para obtener los datos interpolados de la figura 26.

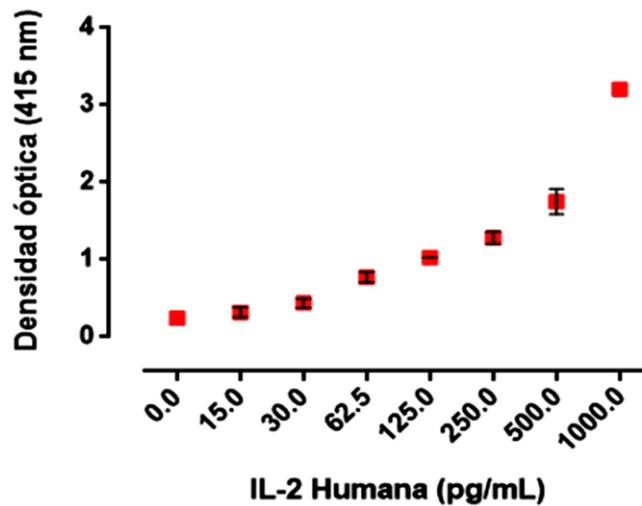


Figura 25. Curva estándar de Interleucina 2 humana.

En la figura 26, se muestra la concentración de Interleucina 2 secretada por las células Jurkat (control y tratadas) a las 24 y 48 horas. En el gráfico se observa que hay un aumento significativamente mayor en la concentración de IL-2 del grupo control a las 48 horas comparado con el grupo control a 24 horas. En el caso de los tratamientos a 24 horas, no se observan diferencias con respecto a su control; mientras que, en los tratamientos a 48 horas, se ve una disminución significativa de todos los grupos tratados con respecto al control de 48 horas, a excepción del grupo tratado con la mezcla de serotonina y melatonina (concentración de $1 \times 10^{-3} M$ de cada uno) en donde no hay diferencia en la concentración de IL-2 con respecto a su control.

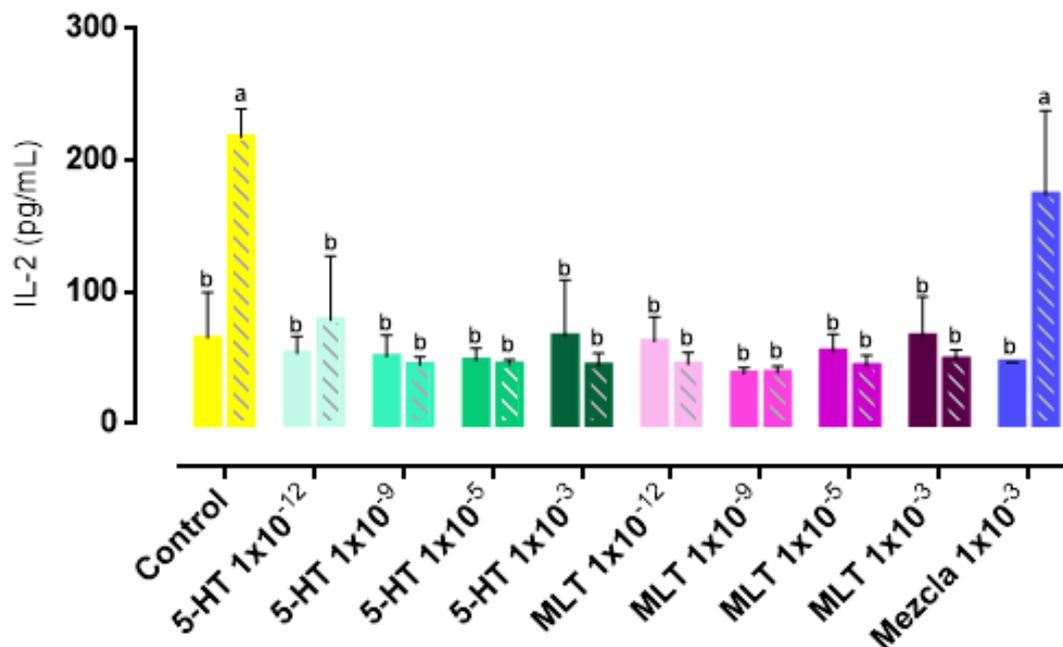


Figura 26. Cuantificación de IL-2 en células Jurkat, 24 y 48 h, n=3. En tonos de verde se muestran los resultados de serotonina, en tonos de morado los de melatonina y en amarillo el control. Las barras con líneas en tono gris corresponden al análisis de 48 h. ANOVA de dos vías con análisis *post hoc* Dunnett. Las letras diferentes indican una diferencia significativa con respecto a su control con $p < 0.05$.

Para cuantificar la secreción de las Interleucina 4 en el sobrenadante de los cultivos tratados de linfocitos T (Jurkat), se realizó una curva estándar de IL-4 (Figura 27) los valores de la figura 28 corresponden a los datos interpolados de la curva de interleucina 4.

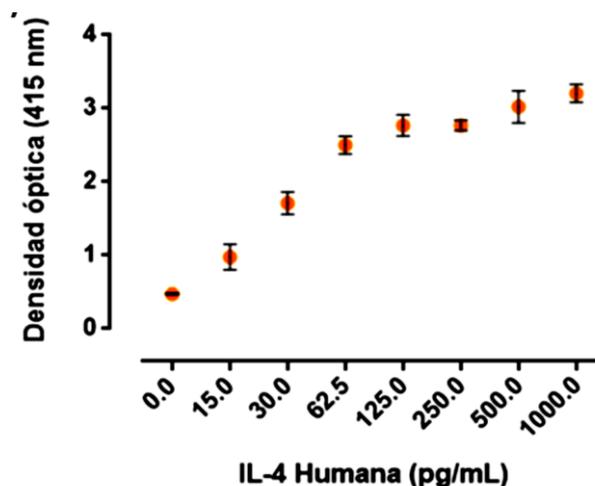


Figura 27. Curva estándar de Interleucina 4 humana.

En la figura 28, se observa el comportamiento de las células Jurkat control y los grupos tratados a las 24 y 48 horas, respectivamente. En la imagen se observa que no existe diferencia en la concentración de IL-4 secretada a 24 comparada con la IL-4 secretada a 48 horas en los controles. En el caso de los tratamientos a 24 horas, no se observan diferencias con respecto a su control; mientras que, en los tratamientos a 48 horas, se ve una disminución significativa de los grupos tratados con 1×10^{-12} M y 1×10^{-5} M de MLT con respecto a su control.

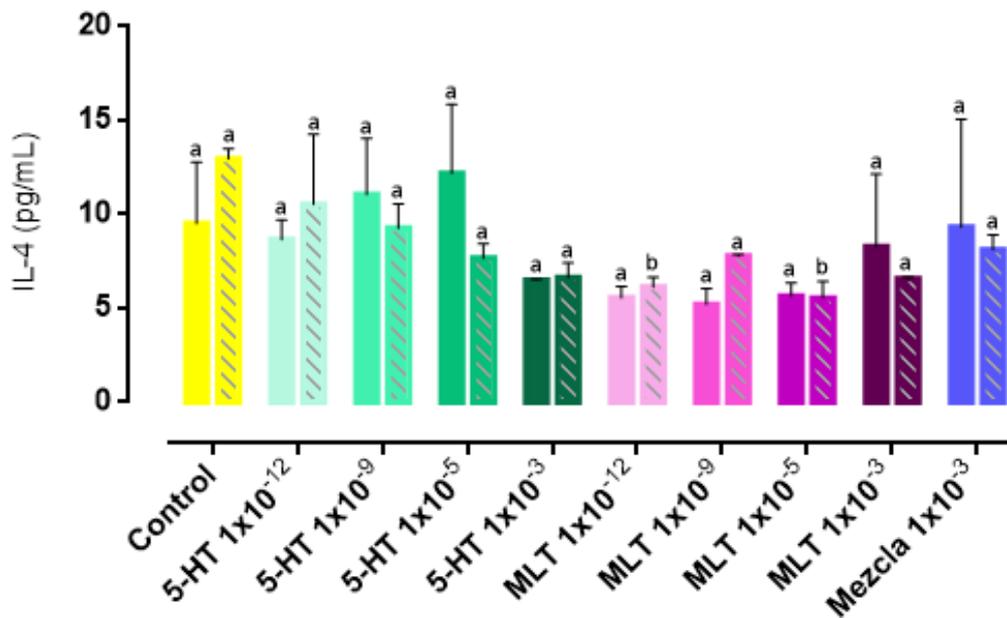


Figura 28. Cuantificación de IL-4 en células Jurkat, 24 y 48 h, n=3. En tonos de verde se muestran los resultados de serotonina, en tonos de morado los de melatonina y en amarillo el control. Las barras con líneas en tono gris corresponden al análisis de 48 h. ANOVA de dos vías con análisis *post hoc* Dunnett. Las letras diferentes indican una diferencia significativa con respecto a su control con $p < 0.05$.

Identificación de receptores a 5-HT y MLT en células Jurkat

Se realizó la identificación de algunos receptores metabotrópicos de serotonina y melatonina en las células Jurkat sin ningún tratamiento, en la figura 29 se observa el reconocimiento de diferentes receptores a serotonina (5-HT5A de 48 kDa y 5-HT7 de 43 kDa) y melatonina (MLT1A/1B de 56 kDa) detectados con anticuerpos policlonales en 2 muestras independientes de la misma línea celular y utilizando a la proteína constitutiva β -actina como control.

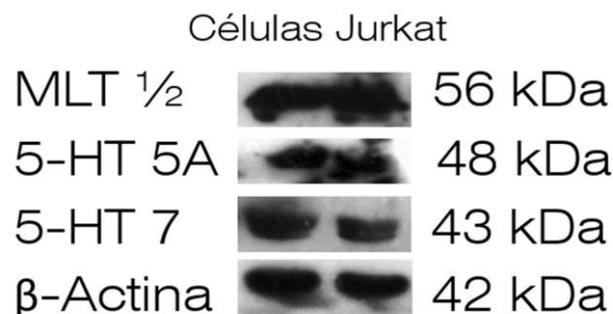


Figura 29. Identificación de receptores a serotonina y melatonina en células Jurkat. Receptores a serotonina 5HT5A y 5HT7 y a melatonina MLT1/2 y la proteína constitutiva como control positivo (β -actina), por medio de la técnica de western blot.

Actividad Antioxidante de 5-HT y MLT por método FRAP

Para abordar el objetivo final, se determinó la actividad antioxidante total de diferentes concentraciones de serotonina y melatonina en agua, en leucocitos circulantes y en el cultivo celular de las células Jurkat por diferentes métodos. Uno de ellos fue el método de “Poder antioxidante de reducción del hierro” (FRAP, por sus siglas en inglés) que se realizó a partir de diferentes concentraciones de serotonina y melatonina en agua mediante este método colorimétrico y se interpolaron con la capacidad antioxidante de TROLOX. La concentración efectiva 50 (EC50) para serotonina fue de 0.052 mM, mientras que melatonina no presenta actividad antioxidante por este método, en la figura 30 se observan las concentraciones utilizadas (en el eje X) y la absorbencia de cada muestra en el eje Y.

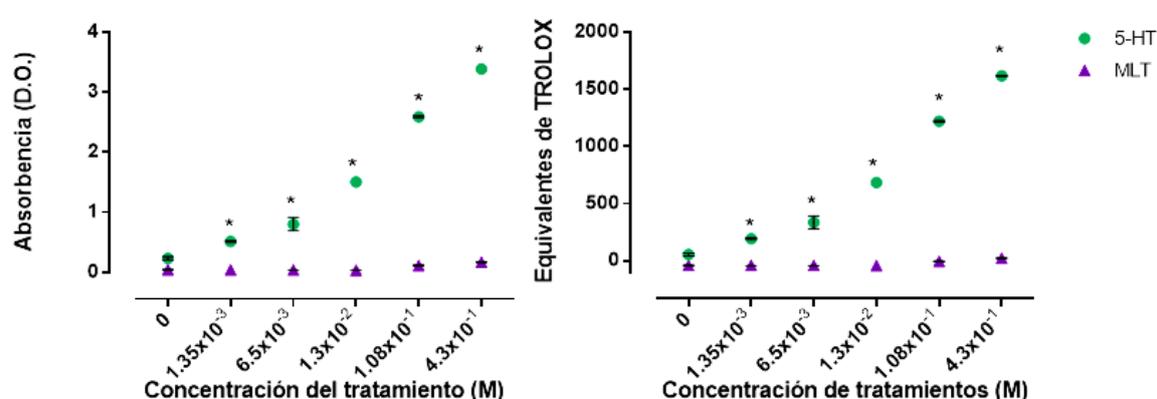


Figura 30. Gráfico de Capacidad Antioxidante Total de serotonina y melatonina por método FRAP, lectura a 540 nm, n=3. En tono verde se muestran los resultados de serotonina en tono morado los de melatonina. El asterisco “*” indica diferencia significativa con respecto al control con p<0.05.

Actividad Antioxidante de 5-HT y MLT por método ABTS

El análisis de actividad antioxidante de diferentes concentraciones de serotonina y melatonina en agua mediante el método colorimétrico ABTS se muestra en la figura 31. Para obtener los datos en equivalentes de TROLOX se interpolaron los datos de la capacidad antioxidante de los tratamientos en una curva de calibración de TROLOX. La concentración efectiva 50 (EC50) para serotonina fue de 0.02674 mM, mientras que para melatonina fue de 0.02087 mM.

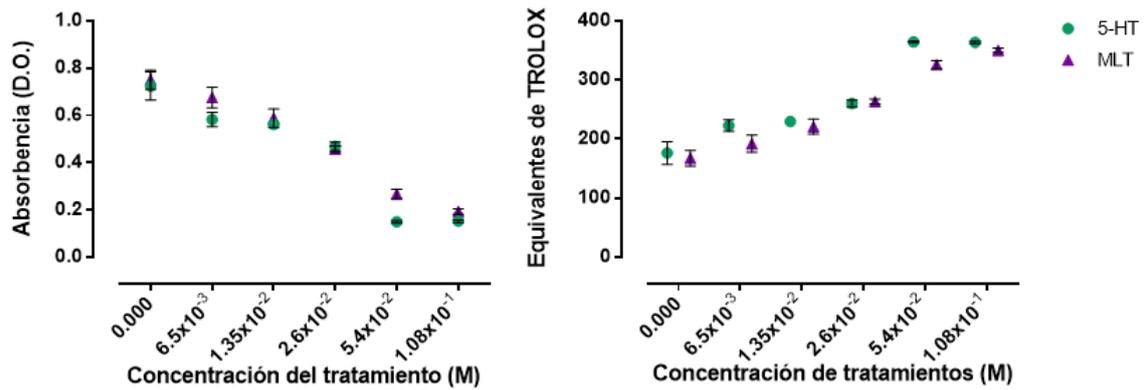


Figura 31. Gráfico de Capacidad Antioxidante Total de serotonina y melatonina por método ABTS, lectura a 405 nm, n=3. En tono verde se muestran los resultados de serotonina en tono morado los de melatonina. El asterisco “*” indica diferencia significativa con respecto al control con p<0.05.

Actividad Antioxidante de 5-HT y MLT por método ABTS en leucocitos circulantes

También se determinó actividad antioxidante de diferentes concentraciones de serotonina y melatonina en linfocitos circulantes mediante el método colorimétrico ABTS, como se muestra en la figura 32. La concentración efectiva 50 (EC50) para serotonina fue de 0.01355 mM, mientras que para melatonina fue de 0.01345 mM.

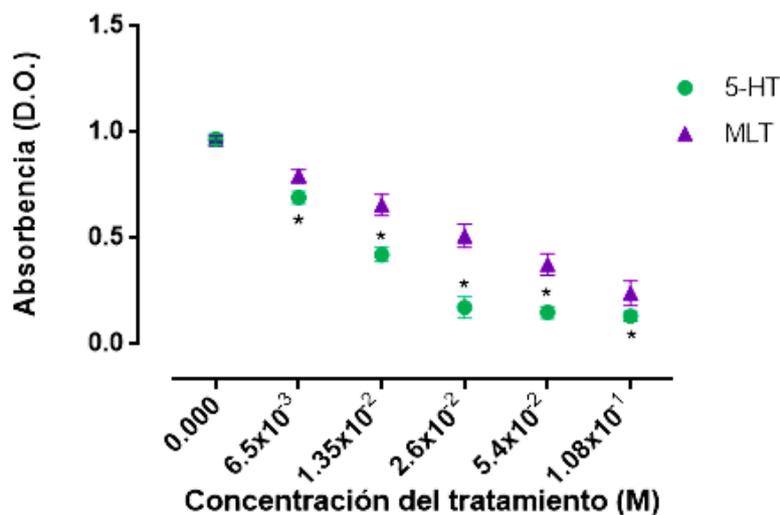


Figura 32. Gráfico de Capacidad Antioxidante Total de serotonina y melatonina en leucocitos circulantes por método ABTS, lectura a 405 nm, n=3. En tono verde se muestran los resultados de serotonina en tono morado los de melatonina. El asterisco “*” indica diferencia significativa con respecto al control con p<0.05.

Actividad Antioxidante de 5-HT y MLT por método ABTS en células Jurkat

Además se realizó la cuantificación de actividad antioxidante de diferentes concentraciones de serotonina y melatonina en cultivos de células Jurkat en medio RPMI-1640 con Suero Fetal Bovino y sin el indicador rojo fenol comparados con los mismos tratamientos en el mismo medio sin células, por medio del método colorimétrico ABTS, con tratamientos de 24 y 48 horas los datos están dados en absorbencia y de acuerdo al fundamento de la técnica el resultado, la densidad óptica obtenida, es inversamente proporcional al poder antioxidante. Como se observa en la figura 33, el poder antioxidante de serotonina y melatonina en medio solo es menor al poder antioxidante de serotonina y melatonina en cultivo tanto a 24 como a 48 horas. Entre serotonina y melatonina no se observa diferencia.

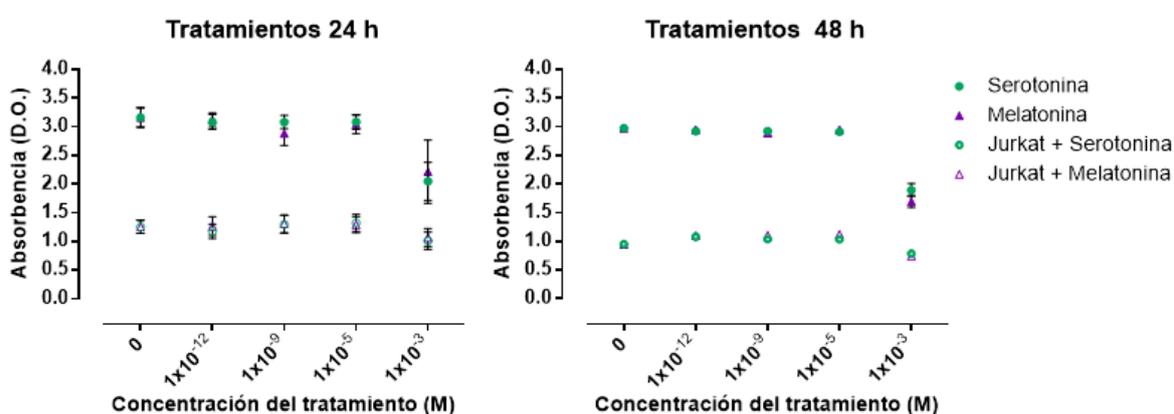


Figura 33. Gráfico de Capacidad Antioxidante Total de serotonina y melatonina en leucocitos circulantes por método ABTS, lectura a 405 nm, n=3 por triplicado. En tono verde se muestran los resultados de serotonina en tono morado los de melatonina. El asterisco “*” indica diferencia significativa con respecto al control con $p < 0.05$.

Discusión

Gran parte de la información obtenida sobre la transducción de señales posterior a un tratamiento farmacológico, ha sido a través de sistemas con modelos celulares *in vitro*. Uno de los más utilizados y ampliamente estudiados en cuanto a los modelos de linfocitos T ha sido la línea celular Jurkat immortalizada a partir de una leucemia de linfocitos T varios estudios han mostrado que las células Jurkat se comportan de manera similar a los linfocitos T normales, debido a ello se consideró esta línea celular como modelo de estudio para la respuesta inmune, específicamente como modelo de linfocitos T inactivos (Parra y Gutierrez, 2013).

En esta tesis se analizó la capacidad inmunoestimuladora de serotonina y melatonina, por medio del análisis de la proliferación y secreción de citocinas en una línea celular de linfocitos T inmaduros en dos condiciones, sin estímulos de crecimiento (deprivadas de suero fetal bovino) y con estímulo de crecimiento (con suero fetal bovino), a diferentes concentraciones de ambas hormonas (1×10^{-12} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-3} M y la mezcla de ambas en concentración de 1×10^{-3} M).

Los resultados no muestran un efecto potenciador de serotonina y/o melatonina sobre la tasa de proliferación de los cultivos de linfocitos T inmaduros, en ninguna de las condiciones (deprivadas de SFB y con SFB) y ninguna de las concentraciones probadas; estos datos concuerdan con reportes previos de otros investigadores en donde justifican la ausencia del efecto de serotonina y melatonina debido a que ésta podría depender del estado inmunológico de activación y parecieran sólo ser efectivos durante el curso de la respuesta inmune por sí mismo, en estos casos la administración de los inmunomoduladores antes de la inoculación del antígeno no influye en la respuesta de los linfocitos T. Estos reportes, puntualizan que en sus modelos no encontraron ningún efecto inmunológico en ausencia de la estimulación antigénica, y aunque en otros trabajos se muestra el efecto *in vitro* sin el estímulo antigénico, una gran variedad de discrepancias en las técnicas utilizadas (como concentraciones de las hormonas o los blancos utilizados) podrían ser la razón de esta diferencia. Una observación especialmente relevante fue la disminución significativa de la tasa de proliferación de los grupos con los tratamientos de 1×10^{-3} de melatonina, y la mezcla de 5-HT y MLT a la misma concentración, así como la disminución discreta con el tratamiento de 1×10^{-3} de serotonina, estos resultados en un principio contradictorios, coinciden con los datos obtenidos por otros grupos de trabajo, que utilizando fármacos inhibidores de la recaptura de serotonina (fluoxetina y paroxetina) a concentraciones desde $1 \mu\text{M}$ por 48 horas, observaron la inhibición de la proliferación celular y la secreción de TNF- α en linfocitos T humanos tratados *ex vivo* y linfocitos T de ratón, mostrando una IC₅₀ de $10 \mu\text{M}$ sobre linfocitos activados con el mitógeno fitohemaglutinina. Nuestros resultados sugieren que los linfocitos T inactivos responden de la misma manera a concentraciones similares de melatonina pero con mayor sensibilidad. Como se menciona en estos trabajos, este efecto dual de ambas hormonas (serotonina y melatonina) sobre la proliferación de los linfocitos T pareciera estar relacionado con la inhibición de la respuesta inflamatoria (Gobin *et al.*, 2013, Frick *et al.*, 2008, Taler *et al.*, 2007, Maestroni, 1993).

Es bien sabido que las citocinas regulan tanto la proliferación, como la sobrevivencia y diferenciación de las células de la respuesta inmune, es por ello que en esta tesis se determinó el estado funcional de los linfocitos T inmaduros por medio de la secreción de las interleucinas 2 y 4. Estudios previos describen a la interleucina 2, como un importante factor de crecimiento de los linfocitos T,

también señalan que aumenta la actividad citolítica de las células NK y promueve la producción de inmunoglobulinas en los linfocitos B. Además contribuye al desarrollo de los linfocitos T reguladores y de la tolerancia de los linfocitos T periféricos, de manera adicional regula la expansión y apoptosis de los linfocitos T activos. Se cree que la IL-2 es la citocina de secreción inicial en los linfocitos T, posterior a la estimulación del receptor TCR, sin embargo estudios recientes señalan que lo más significativo de esta citocina es que juega un papel multifacético dentro de la respuesta inmune debido a su efecto complejo sobre la proliferación y muerte celular de los linfocitos T. Nuestros resultados muestran un aumento significativo en la concentración de IL-2 a las 48 horas (217.8 ± 21.35 pg/mL) comparada la secreción de IL-2 a 24 horas (65.07 ± 34.8 pg/mL) en los grupos sin tratamiento. En la mayoría de los grupos tratados a 48 horas, se observa una disminución significativa de la IL-2, el grupo tratado por 48 horas con la mezcla de serotonina y melatonina (concentración de 1×10^{-3} M de cada uno) se comporta igual que el control de 48 hrs. Este resultado no compromete la funcionalidad de los linfocitos T en la respuesta inmune como lo confirmaron D'Souza y colaboradores en el año 2003, ya que la fase proliferación temprana de los linfocitos T activos (fase inmediata a la estímulo antigénico) es independiente de la IL-2, sin embargo la secreción de esta citocina es fundamental para la fase de expansión clonal de este linaje celular. En los tratamientos a 24 horas, no hay diferencias en la secreción con respecto a su control (Rosenberg, 2014, Rochman *et al.*, 2009, D'Souza y Lefrancois, 2003).

Por otro lado, la interleucina 4 es una citocina de tipo γ , ampliamente conocida por su función como factor promotor de la diferenciación de las células T cooperadoras de tipo 2 (Th2), sin embargo recientemente se ha descrito que también influye en la maduración de los linfocitos T citotóxicos (CD8+), trabajos recientes sugieren que la IL-4 promueve efectos antitumorales de los linfocitos T CD8+ que infiltran los tumores y que a su vez promueve la persistencia de los linfocitos contra el antígeno, en trabajos recientes se ha demostrado que la IL-4 y el estímulo del receptor TCR (activación) ejercen un efecto sinérgico que promueve la expresión de IFN γ en los linfocitos T citotóxicos (CD8+). Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que no existe diferencia significativa en la secreción de IL-4 de los cultivos de linfocitos T inactivos con los tratamientos a 24 y 48 horas comparados contra su control. Tampoco hay diferencia en la secreción de IL-4 en los grupos sin tratamientos comparando los dos horarios analizados (9.5 ± 3.3 vs 13 ± 0.55 pg/mL, 24 y 48 h respectivamente). En los grupos tratado por 48 horas con melatonina a las concentraciones de 1×10^{-12} M y 1×10^{-9} M hay una disminución significativa de secreción de IL-4 comparados con su control de 48 hrs. Esto podría sugerir un estado de activación inmunológica latente y que no cambia o se inhibe con los tratamientos utilizados (Carty *et al.*, 2014, Rochman *et al.*, 2009).

En la búsqueda de los mecanismos involucrados en el efecto inmunomodulador, en el presente trabajo identificamos algunos receptores metabotrópicos de serotonina y melatonina presentes en los linfocitos T inmaduros, así como el efecto antioxidante de los tratamientos de estas hormonas. La propuesta inicial era que los receptores 5-HT7 de serotonina y MLT1 de melatonina, estarían mediando la activación de la respuesta inmune a través de la vía de MAPK activadas por una GTPasa pequeña (ver imagen 33), de acuerdo a lo señalado por León-Ponte y colaboradores en cuanto a serotonina y Lardone y colaboradores en cuanto a melatonina. Hasta el momento, con los datos obtenidos en este trabajo, no podemos descartar ni tampoco afirmar la utilización de esta vía, sin embargo se confirmó la presencia del receptor a 5-HT7 en esta línea celular lo que coincide con lo que encontró el grupo de trabajo de Ahern en 2007 en esplenocitos de ratón y con Rodríguez-Cruz en el 2013 sobre leucocitos circulantes cabe destacar que a diferencia del resultado de León-Ponte, también se encontró la expresión del receptor a serotonina 5-HT5A homologando los datos de Rodríguez-Cruz. Por otro lado la expresión del receptor a melatonina MLT1 se confirma por medio de la identificación de los receptores MLT 1A/B por medio de la técnica de western blot y utilizando anticuerpos policlonales, esta información confirma los datos descritos por Sanchez-Hidalgo en 2012 y Lardone, 2010 en las células Jurkat (Kim *et al.*, 2013, Rodríguez-Cruz, 2013, Sanchez-Hidalgo *et al.*, 2012, Lardone *et al.*, 2010, León-Ponte *et al.*, 2007, O'Connell *et al.*, 2006).

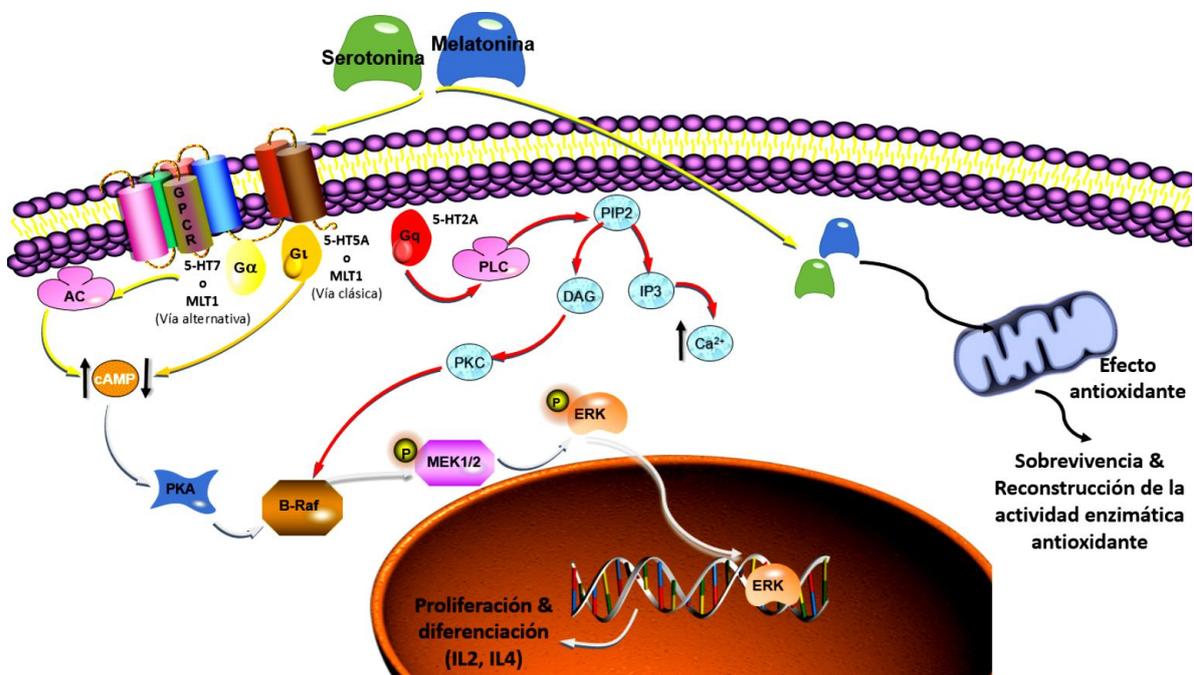


Figura 34. **Esquema de transducción de señales propuesto.** Ambas moléculas tienen la capacidad de ejercer su efecto estimulador a través de receptores metabotrópicos, en el caso de serotonina 5-HT7 y melatonina MLT1 se han descrito como posibles efectores. Estos receptores están acoplados a una subunidad alfa estimuladora que activa a adenilato ciclasa y aumenta la concentración de AMP cíclico

y posteriormente activa la vía de MAP cinasas con la cinasa efectora ERK 1/2 (c-JUN) que podrían estimular la proliferación y diferenciación por medio de IL-2, IL-10 e IL-4.

Además ambas moléculas tienen capacidad antioxidante que teóricamente podrían ejercer por medio de transferencia de electrones, formación de aductos y transferencia de protones con lo cual se podría estimular la sobrevivencia y la reconstitución de la actividad enzimática antioxidante.

Como parte del último objetivo de este trabajo se evaluó el efecto antioxidante de los tratamientos de serotonina y melatonina por dos metodologías que evalúan la capacidad antioxidante de los compuestos por diferentes mecanismos, el método FRAP y el ABTS. El método FRAP es un ensayo para cuantificar el efecto antioxidante dado por la reacción de transferencia de electrones está basado en la capacidad de los antioxidantes solubles en agua para reducir el complejo férrico tripiridil triazina y fue desarrollado por Benzie y col., en 1996 con la finalidad de cuantificar el poder reductor del plasma. En el ensayo no encontramos actividad antioxidante para melatonina a pesar de que se ha descrito que entre sus mecanismos de actividad antioxidante se puede contar el de transferencia de electrones, probablemente por el ambiente acuoso que es fundamento de la técnica. Desde una perspectiva teórica, se ha propuesto que es más fácil ocurra una reacción de transferencia de electrones considerando la estructura molecular de melatonina, debido a que no tiene hidrógenos fenólicos, pero tomando en cuenta que no todos los radicales libres tienen el suficiente carácter aceptor de electrones para participar en este mecanismo, entonces tendríamos que considerar que el tipo de radical libre que participe en la reacción también influye en la viabilidad de la reacción, como ejemplo los radicales haloperoxilos tienen la capacidad de actuar por medio de transferencia de electrones. En este caso la serotonina actúa como antioxidante por el método de transferencia de electrones mientras que la melatonina no. Sin embargo, la importancia de la melatonina en la protección de ambientes lipofílicos (como las membranas celulares, particularmente la mitocondrial) repercute en la versatilidad de esta molécula (Pinchuk *et al.*, 2012, Galano *et al.*, 2011, Benzie y Strain, 1996).

Otro método para cuantificar el efecto antioxidante, es el ensayo con ABTS que está basado en la capacidad de los antioxidantes de neutralizar al radical $ABTS^+$, las reacciones de transferencia de protones será cuantificada espectrofotométricamente al neutralizar al radical ABTS. Basados en lo que se sabe de melatonina, bajo condiciones fisiológicas predomina la forma neutra debido a su pKa, por lo cual parecería posible que realizar comenzar con cualquier mecanismo de transferencia de protones (deprotonación). Por otra parte, la estructura molecular de serotonina contiene H fenólicos por lo que también es posible actuar como antioxidante por el método de transferencia de

protones, en este ensayo los resultados muestran un poder antioxidante similar para serotonina y melatonina. A pesar de los resultados contundentes de estos ensayos, siempre se debe considerar que mientras un mecanismo es viable en solución acuosa, es altamente improbable una solución no polar (Pinchuk *et al.*, 2012, Galano *et al.*, 2011, Re *et al.*, 1999).

Cuando se evaluó la actividad antioxidante en los leucocitos circulantes y en la línea celular Jurkat, se observa un comportamiento similar de CAT con tratamientos de serotonina y melatonina. El presente estudio contempla varias de sus limitaciones, principalmente el hecho de ser un estudio *in vitro* y con ello no poder descartar variables como el contenido de especies antioxidantes endógenas (catalasa, glutatión, enzimas, etc.) o la interacción misma de las moléculas de estudio con otros compuestos provenientes del suero fetal bovino o el medio de cultivo, considerando que las mismas proteínas y otros componentes biológicos participan en este equilibrio de oxidación-reducción (redox). Como se mencionaba en la introducción, la determinación de los mecanismos de reacción de una especie antioxidante es una tarea monumental y requiere de análisis en conjunto tanto teóricos como prácticos. Además, la información obtenida en este trabajo cobra relevancia pues los radicales libres son especies que poseen uno o más electrones desapareados y esta característica los vuelve especies altamente reactivas que pueden ser dañinas o benéficas para los seres vivos, dependiendo de su concentración este delicado balance entre la producción y eliminación de los radicales libres garantiza mantenerlos en concentraciones moderadas-bajas. Bajo estas circunstancias los radicales libres tienen un efecto benéfico como la inducción de mitosis, maduración de organelos o fagocitosis. En contraste, altas concentraciones los radicales libres son dañinos para el organismo, mejor conocidos como estrés oxidativo, el papel del estrés oxidativo ha sido bien documentado en la iniciación y progresión de una amplia variedad de enfermedades crónicas y degenerativas como alzheimer, parkinson e incluso cáncer (Galano *et al.*, 2011).

Conclusiones

Los datos presentados en este trabajo muestran que

- I. La serotonina y melatonina no tienen un efecto directo sobre la proliferación de los linfocitos T inactivos (Jurkat).
- II. En presencia de SFB, la tasa de proliferación de los linfocitos T inactivos disminuye a 48 horas sólo con concentraciones de 1×10^{-3} de melatonina y la mezcla de 1×10^{-3} de serotonina + melatonina.
- III. En presencia de SFB a 48 horas, hay una disminución en la secreción de IL-2 con todos los tratamientos excepto con concentraciones de 1×10^{-3} de melatonina y la mezcla de 1×10^{-3} de serotonina + melatonina, comparados con el control.
- IV. Los linfocitos T humanos (Células Jurkat) expresan los receptores metabotrópicos: 5-HT_{5A}, 5-HT₇ y MLT_{1/2} para serotonina y melatonina.
- V. El mecanismo de la capacidad antioxidante total de serotonina ocurre por transferencia de protones y transferencia de electrones
- VI. El mecanismo de capacidad antioxidante de melatonina es principalmente por transferencia de protones.

Perspectivas

Este trabajo presenta una aproximación más para evaluar el efecto de los inmunomoduladores serotonina y melatonina sobre la respuesta inmune antitumoral, los resultados obtenidos en este trabajo establecen las bases para un sistema que permita evaluar la respuesta inmune. Esto abre las puertas para iniciar modelos de estudio efectivos para este propósito, como el cocultivo de linfocitos T activados con antígenos tumorales o la evaluación de la respuesta en modelos *in vivo*. También nos invita a tomar una perspectiva más específica de la respuesta inmune y buscar el efecto particular de los inmunomoduladores para cada linaje celular. Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten valorar y proponer vías de señalización, así como completar la evaluación de las mismas.

Referencias

- AHERN, G. P. 2011. 5-HT and the immune system. *Curr Opin Pharmacol*, 11, 29-33.
- AZMITIA, E. C. 2007. Serotonin and Brain: Evolution, Neuroplasticity, and Homeostasis. 77, 31-56.
- BAGANZ, N. L. & BLAKELY, R. D. 2013. A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chem Neurosci*, 4, 48-63.
- BARNES, N. M. & SHARP, T. 1999. A review of central 5 HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38, 1083-1152.
- BARRET, P., CONWAY, S. & MORGAN, P. J. 2003. Digging deep -structure- function relationships in the melatonin receptor family. *Journal of pineal Research*, 35, 221-230.
- BEATTIE, D. T. & SMITH, J. A. 2008. Serotonin pharmacology in the gastrointestinal tract: a review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 377, 181-203.
- BECKER, Y. 2006. Molecular immunological approaches to biotherapy of human cancers - A Review, Hypotesis and implications. *Anticancer Research*, 26, 1113-1134.
- BENZIE, I. F. & STRAIN, J. J. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant power". The Frap Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- BERGER, M., GRAY, J. A. & ROTH, B. L. 2009. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med*, 60, 355-66.
- BERUMEN, L. C., RODRIGUEZ, A., MILEDI, R. & GARCIA-ALCOCER, G. 2012. Serotonin receptors in hippocampus. *ScientificWorldJournal*, 2012, 823493.
- BEYER, M. & SCHULTZE, J. L. 2006. Regulatory T cells in cancer. *Blood*, 108, 804-11.
- CARRILLO-VICO, A., GUERRERO, J. M., LARDONE, P. J. & REITER, R. J. 2005. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*, 27, 189-200.
- CARRILLO-VICO, A., LARDONE, P. J., ALVAREZ-SANCHEZ, N., RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, A. & GUERRERO, J. M. 2013. Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci*, 14, 8638-83.
- CARTY, S. A., KORETZKY, G. A. & JORDAN, M. S. 2014. Interleukin-4 Regulates Eomesodermin in CD8+ T Cell Development and Differentiation. *PLoS One*, 9, e106659.
- CLAUSTRAT, B., BRUN, J. & CHAZOT, G. 2005. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*, 9, 11-24.
- CHESNOKOVA, V. & MELMED, S. 2002. Neuro-Immuno-Endocrine Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis by gp130 signaling molecules. *Endocrinology*, 143, 1571-1574.
- CHOJNACKI, C., WALECKA-KAPICA, E., KLUPIŃSKA, G., WACHOWSKA-KELLY, P., ŻYLIŃSKA, K., WINCZYK, K. & CHOJNACK, J. 2012. Serotonin and melatonin secretion and metabolism in patients with liver cirrhosis. *Medycyna Wewnętrzna. Polish Archives of Internal Medicine*, 122, 392-397.
- D'SOUZA, W. N. & LEFRANCOIS, L. 2003. IL-2 Is Not Required for the Initiation of CD8 T Cell Cycling but Sustains Expansion. *The Journal of Immunology*, 171, 5727-5735.
- DRANOFF, G. 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 4, 11-22.

- DRANOFF, G. 2012. Experimental mouse tumour models: what can be learnt about human cancer immunology? *Nat Rev Immunol*, 12, 61-6.
- DUNN, G. P., BRUCE, A. T., IKEDA, H., OLD, L. & SCHEREIBER, R. D. 2002. Cancer immunoediting. From immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*, 3, 991-998.
- ERSPARMER, V. & ASERO, B. 1952. Identification of enteramine the specific hormone of the enterochromafin cell system as 5HT. *Nature*, 169, 800-801.
- FEDERICA CAVALLO, E. D. C., MONIA BUTERA, ROBERTA VERRUA, MARIO P.COLON, PIERO MUSIANI AND GUIDO FORNI 1999. Immune events associated with the cure of established tumors and espontaneous metastases by local and systematic IL12. *Cancer Research*, 59, 414-421.
- FILDES, J. E., YONAN, N. & KEEVIL, B. G. 2009. Melatonin--a pleiotropic molecule involved in pathophysiological processes following organ transplantation. *Immunology*, 127, 443-9.
- FRICK, L. R., PALUMBO, M. L., ZAPPIA, M. P., BROCCO, M. A., CREMASCHI, G. A. & GENARO, A. M. 2008. Inhibitory effect of fluoxetine on lymphoma growth through the modulation of antitumor T-cell response by serotonin-dependent and independent mechanisms. *Biochem Pharmacol*, 75, 1817-26.
- FUENTES-BROTO, L. 2008. *Melatonina como protector frente a los radicales libres en la hepatotoxicidad por ácidos biliares*. PhD, Universidad de Zaragoza.
- GALANO, A., TAN, D. X. & REITER, R. J. 2011. Melatonin as a natural ally against oxidative stress. A physicochemical examination. *Journal of Pineal Research*, 51, 1-16.
- GERSHON, R. & K, K. 1971. Infectious Immunological Tolerance. *Immunology*, 21, 903-914.
- GOBIN, V., VAN STEENDAM, K., FEVERY, S., TILLEMANN, K., BILLIAU, A. D., DENYS, D. & DEFORCE, D. L. 2013. Fluoxetine reduces murine graft-versus-host disease by induction of T cell immunosuppression. *J Neuroimmune Pharmacol*, 8, 934-43.
- GOLDSZMID, R. S. & TRINCHIERI, G. 2012. The price of immunity. *Nat Immunol*, 13, 932-8.
- GUERRERO, J. M. & REITER, R. J. 2002. Melatonin-Immune System Relationships. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2, 167-169.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HANNON, J. & HOYER, D. 2008. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res*, 195, 198-213.
- HARDELAND, R., CARDINALI, D. P., SRINIVASAN, V., SPENCE, D. W., BROWN, G. M. & PANDI-PERUMAL, S. R. 2011. Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol*, 93, 350-84.
- HOYER, D., HANNON, J. & MARTIN, G. R. 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5HT receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71, 533-554.
- KARASEK, M. & WINCZYK, K. 2006. Melatonin in humans. *Journal of physiology and pharmacology*, 57, 19-39.
- KIM, J. J., BRIDLE, B. W., GHIA, J. E., WANG, H., SYED, S. N., MANOCHA, M. M., RENGASAMY, P., SHAJIB, M. S., WAN, Y., HEDLUND, P. B. & KHAN, W. I. 2013. Targeted inhibition of serotonin type 7 (5-HT7) receptor function modulates

- immune responses and reduces the severity of intestinal inflammation. *J Immunol*, 190, 4795-804.
- KINDT, T. J., GOLDSBY, R. A., OSBORNE, B. A. & MARTÍNEZ, R. P. 2007. *Inmunología de Kuby*, McGraw-Hill Interamericana de España S.L.
- KONTUREK, S., KONTUREK, P., BRZOZOWSKA, I., PAWLIK, M., SLIWOWSKIM, Z., CZESNIKIEWICZ-GUZIK, M., KWIECIEN, S., BROZOZOWSKI, T., BUBENIK, G. & PAWLIK, W. 2007. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *Journal of physiology and pharmacology*, 58, 381-405.
- LARDONE, P. J., RUBIO, A., CERILLO, I., GÓMEZ-CORVERA, A., CARRILLO-VICO, A., SÁNCHEZ-HIDALGO, M., GUERRERO, J. M., FERNANDEZ-RIEJOS, P., SANCHEZ-MARGALET, V. & MOLINERO, P. 2010. Blocking of melatonin synthesis and MT1 receptor impairs the activation of Jurkat T cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 3163-3172.
- LEÓN-PONTE, M., AHERN, G. P. & O'CONNELL, P. J. 2007. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor. *Blood*, 109, 3139-3146.
- LI, N., GHIA, J. E., WANG, H., MCCLEMENS, J., COTE, F., SUEHIRO, Y., MALLET, J. & KHAN, W. I. 2011. Serotonin activates dendritic cell function in the context of gut inflammation. *Am J Pathol*, 178, 662-71.
- MACCHI, M. M. & BRUCE, J. N. 2004. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*, 25, 177-95.
- MAESTRONI, G. J. 1993. The immunoendocrine role of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 14, 1-10.
- MAGRINI, E., SZABO, I., DONI, A., CIBELLA, J. & VIOLA, A. 2011. Serotonin mediated tuning of human helper T cell responsiveness to the chemokine CXCL12. 2011. *PLoS One*, 6.
- MARSHALL, K.-A., REITER, R. J., POEGLER, B., ARUOMA, O. I. & HALLIWELL, B. 1996. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radical Biology & Medicine*, 21, 307-315.
- MASANA, M. I. & DUBOCOVICH, M. L. 2001. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Sci STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2001, 1-5.
- MILLER, S. C., PERUMAL, S. R., ESQUIFINO, A. I., CARDINALI, D. P. & MAESTRONI, G. J. 2006. The role of melatonin in immune enhancement. potential application in cancer. *Int J Exp. Path.*, 87, 81-87.
- MITRA, R., SINGH, S. & KHAR, A. 2004. Antitumour immune responses. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5.
- NICHOLS, D. E. & NICHOLS, C. D. 2008. Serotonin Receptors.
- O'CONNELL, P. J., WANG, X., LEÓN-PONTE, M., GRIFFITHS, C., PINGLE, S. C. & AHERN, G. P. 2006. A novel form of immune signaling by transmission of the inflammatory mediator serotonin between dendritic and T cells. *Immunobiology*, 107, 1010-1017.
- PAI, V. P., MARSHALL, A. M., HERNANDEZ, L. L., BUCKLEY, A. R. & HORSEMAN, N. D. 2009. Altered serotonin physiology in human breast cancers favors paradoxical growth and cell survival. *Breast Cancer Res*, 11, R81.

- PALA, D., LODOLA, A., BEDINI, A., SPADONI, G. & RIVARA, S. 2013. Homology Models of Melatonin Receptors: Challenges and Recent Advances. *Int J Mol Sci*, 14, 8093-8121.
- PANDI-PERUMAL, S. R., SRINIVASAN, V., MAESTRONI, G. J., CARDINALI, D. P., POEGGELER, B. & HARDELAND, R. 2006. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*, 273, 2813-38.
- PANDI-PERUMAL, S. R., TRAKHT, I., SRINIVASAN, V., SPENCE, D. W., MAESTRONI, G. J., ZISAPEL, N. & CARDINALI, D. P. 2008. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol*, 85, 335-53.
- PARRA, E. & GUTIERREZ, L. 2013. Growth inhibition of Tax-activated human Jurkat leukemia T cells by all-trans retinoic acid requires JNK-1 inhibition. *Oncol Rep*, 29, 387-93.
- PINCHUK, I., SHOVAL, H., DOTAN, Y. & LICHTENBERG, D. 2012. Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165, 638-47.
- PLOEGH, H. L. 2013. Logic of the immune system. *Cancer Immunol Res*, 1, 5-10.
- PRENDERGAST, G. C. & JAFFEE, E. M. 2011. *Cancer Immunotherapy: Immune Suppression and Tumor Growth*, Elsevier Science.
- PUNT, J. 2013. Adaptive Immunity: T Cells and Cytokines. In: PRENDERGAST, G. C. & JAFFEE, E. M. (eds.) *Cancer immunotherapy*. 2nd ed.: ELSEVIER.
- RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGERENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. & RICE-EVANS, C. 1999. Antioxidant Activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
- REITER, R. J., TAN, D.-X. & FUENTES-BROTO, L. 2010. Melatonin: A Multitasking Molecule. 181, 127-151.
- RIBAS, A., BUTTERFIELD, L. H., GLASPY, J. A. & ECONOMOU, J. S. 2003. Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. *J Clin Oncol*, 21, 2415-32.
- RICH, R. R., FLEISHER, T. A., SHEARER, W. T., SCHROEDER, H. W., FREW, A. J. & WEYAND, C. M. 2013. *Clinical Immunology, Principles and Practice (Expert Consult - Online and Print)*, 4: *Clinical Immunology*, Elsevier.
- ROCHMAN, Y., SPOLSKI, R. & LEONARD, W. J. 2009. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol*, 9, 480-90.
- RODRÍGUEZ-CRUZ, A. 2013. *Estandarización de sustrato-ECL no comercial en análisis de expresión de receptores 5-HT5A y de melatonina en linfocitos por western blot*. Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad Autónoma de Querétaro.
- ROSENBERG, S. A. 2014. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol*, 192, 5451-8.
- SANCHEZ-HIDALGO, M., LEE, M., DE LA LASTRA, C. A., GUERRERO, J. M. & PACKHAM, G. 2012. Melatonin inhibits cell proliferation and inuces caspase activation in human malignant lymphoid cell lines. *Journal of Pineal Research*, 1-8.
- SODHI, M. S. & SANDERS-BUSH, E. 2004. Serotonin and brain development. *International Review of Neurobiology*, 59, 111-174.
- TALER, M., GIL-AD, I., LOMNITSKI, L., KOROV, I., BAHARAV, E., BAR, M., ZOLOKOV, A. & WEIZMAN, A. 2007. Immunomodulatory effect of selective serotonin reuptake

- inhibitors (SSRIs) on human T lymphocyte function and gene expression. *Eur Neuropsychopharmacol*, 17, 774-80.
- TYLER, J. C. 2013. *Cancer Immunotherapy. Paradigms, Practice and Promise*, Springer.
- VANHOENACKER, P., HAEGEMAN, G. & LEYSEN, J. E. 2000. 5-HT7 receptors. Current knowledge and future prospects. *TIPS*, 21, 70-77.
- ZLOTOS, D. P., JOCKERS, R., CECON, E., RIVARA, S. & WITT-ENDERBY, P. A. 2013. MT and MT Melatonin Receptors: Ligands, Models, Oligomers, and Therapeutic Potential. *J Med Chem*.
- ZÖLLER, M. & MATZKU, S. 1999. Cancer Therapy: New Concepts on Active Immunization. *Immunobiology*, 201, 1-21.