



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
FACULTAD DE MEDICINA.
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO.**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN.
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA.**

**“EXPRESIÓN DE PROLACTINA EN MODELOS
EXPERIMENTALES Y EN NEOPLASIAS MALIGNAS, DE
ORIGEN PULMONAR”**

TESIS DE POSGRADO QUE PRESENTA EL:
DR. GABRIEL QUINTERO BUSTOS.

PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO ESPECIALISTA EN:
ANATOMÍA PATOLÓGICA.

ASESOR DE TESIS: DR. BRAULIO MARTÍNEZ BENÍTEZ.
ASESOR TÉCNICO: DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX; OCTUBRE DE 2021.

Facultad de Medicina





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS:

- A mis padres Lucy, Gabriel y a mi hermano Ángel, quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias porque desde el inicio de mi vida me han educado con su gran ejemplo de humildad, sentido social, esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades y de nunca darme por vencido. Gracias, por tanto, a ustedes les debo todo lo que soy y lo que tengo, dedicaré cada día de mi vida a amarlos, cuidarlos y hacerlos sentir orgullosos.

- A mi novia Larissa, por su amor, cariño y apoyo incondicional durante todo este proceso, por estar conmigo en cada momento, gracias, porque con tu amor, hermosa amistad, consejos e inteligencia hiciste de mí una mejor persona, siempre estaré agradecido de estar al lado de un ser humano tan íntegro, bondadoso y talentoso como tú.

- Finalmente quiero dedicar esta tesis a todos mis amigos, por apoyarme cuando más los necesité, por extender su mano en momentos difíciles y por el apoyo brindado cada día.

AGRADECIMIENTOS:

- A ti, Braulio, porque durante estos 3 años de residencia fuiste mucho más que un pilar invaluable de mi formación, te convertiste en un amigo invaluable, gracias por todo tu apoyo, orientación, comprensión, consejos y buenos momentos que pasamos.
- Al Dr. Hernández Pando, ya que usted fue mi primer maestro, quien me inculcó el amor por las ciencias básicas, me acogió en su laboratorio y me instruyó tanto en técnicas como en creatividad de pensamiento, siendo así el origen de esta tesis.
- A la Dra. Jazmín de Anda, quien desde la primera semana de mi residencia fue un elemento crucial en mi desarrollo y aprendizaje de la patología, además de una excelente maestra es usted un gran ser humano. Sin su apoyo y disposición este protocolo no hubiese culminado.
- A mis profesores de anatomía patológica, al Dr. Montante, el Dr. Ángeles y el Dr. Reyes, quienes brindaron su amistad, esencial apoyo y conocimientos, que además moldearon mi forma de pensar y trabajar como patólogo.
- Agradezco enormemente al equipo de la unidad de patología experimental, en particular a la Dra. Dulce, la Dra. Brenda, al Dr. Barrios, a Marco Peralta y a León Islas, sin su enorme conocimiento y amable guía los presentes experimentos no se hubiesen llevado a cabo.
- Al equipo técnico que me apoyó e instruyó en la estandarización y procesamiento de tantas reacciones de inmunohistoquímica, mil gracias Gaby y Bere.
- Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, así como a su departamento de patología, sin duda alguna nave insignia de la medicina mexicana, mi segunda casa, donde aprendí que la ética, la ciencia y el humanismo siempre van de la mano con un único fin: buscar el bienestar tanto del paciente como de la sociedad.

ÍNDICE

1) MARCO TEÓRICO.....	1
2) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
3) JUSTIFICACIÓN.....	9
4) PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	10
5) OBJETIVOS.....	10
6) HIPÓTESIS.....	11
7) MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
• 7.1. Modelo celular.	
• 7.2. Modelo murino.	
• 7.3. Biopsias de humanos.	
8) RESULTADOS.....	19
• 8.1. Modelo celular.	
• 8.2. Modelo murino.	
• 8.3. Biopsias de humanos.	
9) DISCUSIÓN.....	34
10) CONCLUSIONES.....	37
11) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

“EXPRESIÓN DE PROLACTINA EN MODELOS EXPERIMENTALES Y EN NEOPLASIAS MALIGNAS DE ORIGEN PULMONAR”

Quintero Bustos Gabriel, De Anda González María Guadalupe Jazmín, Hernández Pando Rogelio, Mata Espinoza Dulce, Marquina Castillo Brenda, Barrios Payán Jorge, Martínez Benítez Braulio.

1. MARCO TEÓRICO:

CÁNCER PULMONAR:

Actualmente, el cáncer pulmonar ocupa el tercer lugar mundial en incidencia dentro del grupo de neoplasias malignas, sin embargo, representa 1/5 muertes relacionadas a cáncer tanto en hombres como en mujeres, la organización mundial de la salud estima que, para el 2030, los nuevos casos de cáncer pulmonar aumenten un 38%¹. En México el panorama es menos alentador, ubicándose tanto en el primer lugar de incidencia como en decesos por dicha entidad². En el periodo de 2006 a 2017 se registraron 35 650 casos nuevos de tumores malignos de tráquea, bronquios y pulmón tan solo entre los derechohabientes del IMSS de 20 años o más. El número de defunciones por cáncer de pulmón en los hombres pasó de 2101 en 2006 a 1948 en 2016, sin embargo, en las mujeres se mantuvo en un rango de 878 a 1057 por año en el mismo periodo. El número de casos nuevos y defunciones muestra un incremento conforme la edad, tanto en hombres como en mujeres, de forma significativa, lo que representa un crecimiento acelerado a partir de los 55 años. El costo total del tratamiento del cáncer de pulmón, para los 2539 pacientes de 2017, fue 42 millones de dólares, con un costo promedio ponderado por paciente de 16537 dólares².

Lo anterior demuestra el enorme impacto del cáncer de pulmón, tanto en cada paciente como en la salud pública y las finanzas nacionales, lo que constituye un área de oportunidad relevante para la innovación en técnicas de abordaje tanto terapéutico como diagnóstico.

Histológicamente, y de acuerdo a la OMS, las neoplasias malignas pulmonares de origen epitelial se dividen en tres grupos principales: los adenocarcinomas (lepídico, acinar, papilar, micropapilar sólido, mucinoso invasor, etc), los epidermoides (queratinizante, no

queratinizante, basaloide e in situ) y los neuroendócrinos (células pequeñas, células grandes y carcinoides) .³

Molecularmente, los adenocarcinomas pulmonares, en lo general, se han asociado a las siguientes alteraciones: TP53 (46%), KRAS (33%), KEAP1 (17%), STK11 (17%), EGFR (14%), NF1 (11%), BRAF (10%), SETD2 (9 %), RBM10 (8%), MGA (8%), MET (7%), ARID1A (7%), PIK3CA (7%), SMARCA4 (6%), RB1 (4%), CDKN 2A (4%), U2AF1 (3%), y RIT1 (2%). Mientras que el carcinoma epidermoide a TP53 (90%), CDKN2A, PTEN, PIK3CA, KEAP1, MLL2, HLA-A, NFE2L2, NOTCH1, RB1, BRAF V600E y PDYN; Por su parte las neoplasias neuroendócrinas se asocian a alteraciones en SOX2, TP53, TP73, NOTCH, RFL-MYCL1, CREBBP, EP300 y MLL.⁴

Hoy en día, la terapéutica establecida se basa en el estadio clínico con el que el paciente se presenta, que incluye desde resecciones quirúrgicas amplias, tratamiento quimioterapéutico, radioterapia y avanzados esquemas contra blancos moleculares específicos, como PD1 y PDL1, siempre teniendo en cuenta las características moleculares propias de cada tumor, entre las que se incluyen alteraciones de ALK, NTRKs, ROS-1, CTLA-4 y EGFR.⁴

FUNDAMENTOS CLÍNICOS Y MOLECULARES DE LA PROLACTINA EN RELACIÓN AL CÁNCER:

La prolactina (PRL) es una hormona principalmente secretada por el lóbulo anterior de la glándula pituitaria, sin embargo, estudios recientes han demostrado que también es producida por diversas células extrahipofisarias como neumocitos tipo II, linfocitos, fibroblastos, tejido adiposo, etc^{5,6}. Posee al menos 300 funciones fisiológicas en el cuerpo humano, más que todas las otras hormonas de la pituitaria en conjunto. Su función más conocida es la lactogénesis y galactopoyesis, aun cuando induce una gran variedad de actividades biológicas, como la osmoregulación, metabolismo, respuesta inmune, inflamación e incluso funcionamiento y reparación del sistema nervioso central.⁷

La expresión de PRL es inicialmente controlada por dos regiones promotoras independientes, que son reguladas por distintas vías de acuerdo a la célula en cuestión⁷. Las diversas variantes moleculares de la hormona son generadas por modificaciones

postraduccionales, cabiendo destacar que un mismo fragmento puede actuar de manera diferente dependiendo del receptor al que se acople⁵, el cual posteriormente activa una, de muchas posibles, rutas de señalización como por ejemplo JAK2/STAT, MAPK, c-src, la cascada de cinasa Fyn, entre otras. La síntesis de PRL es principalmente regulada por la influencia inhibitoria de la dopamina, a nivel hipofisiario, sin embargo, sistémicamente es estimulada por diversos factores inmunoendócrinos, como el péptido inductor de prolactina.^{8,9,10}

Continuando con el precedente de que la PRL posee una vital cantidad de efectos pleiotrópicos tisulares, su papel específico en la complejidad del sistema inmunológico sigue sin esclarecerse por completo, sin embargo, en cuanto dicho logro se alcance, este podría dirigirnos a nuevos e importantes enfoques terapéuticos, para entidades infecciosas, autoinmunes y neoplásicas.

Diferentes estudios, a lo largo de la última década, han establecido una remarcable correlación entre dicha hormona y diversos tipos de neoplasias malignas, entre los cuales los más estudiados son los de mama y próstata^{10,11}, sin embargo, su implicación fisiopatológica en otras neoplasias aún no ha sido explorada completamente. Entre las teorías sobre su rol en los tumores malignos, destaca aquella que hace referencia a su gran similitud con la hormona de crecimiento, no solo estructuralmente, sino también en cuanto a complementariedad hacia sus receptores, dando pie a la activación de vías proliferativas, de diferenciación, senescencia y migración, como JAK2/STAT5^{10,11,12}. Se ha demostrado que niveles anormalmente altos de prolactina (ya sea de origen pituitaria o periférica), en la matriz extracelular de neoplasias in situ, activa de forma aberrante al receptor de la misma hormona, lo que conlleva a un alto riesgo de inducir invasión debido a la activación de la vía de señalización Ras-MAPK/ERK y un incremento de metaloproteinasa-2, que en conjunto con JAK/STAT, aumenta la posibilidad de metástasis; lo anterior ha sido observado tanto en carcinomas de mama como de hígado.¹³

A nivel clínico, e incluso histopatológico, existen pocos estudios que aborden lo antes referido, sin embargo, de la bibliografía internacional se pueden destacar los estudios realizados por Dati, et al, en 1983, en los cuales demuestran elevación de prolactina sérica en pacientes con carcinomas pulmonares, excluyendo los carcinomas de células pequeñas (figura 1)¹⁴

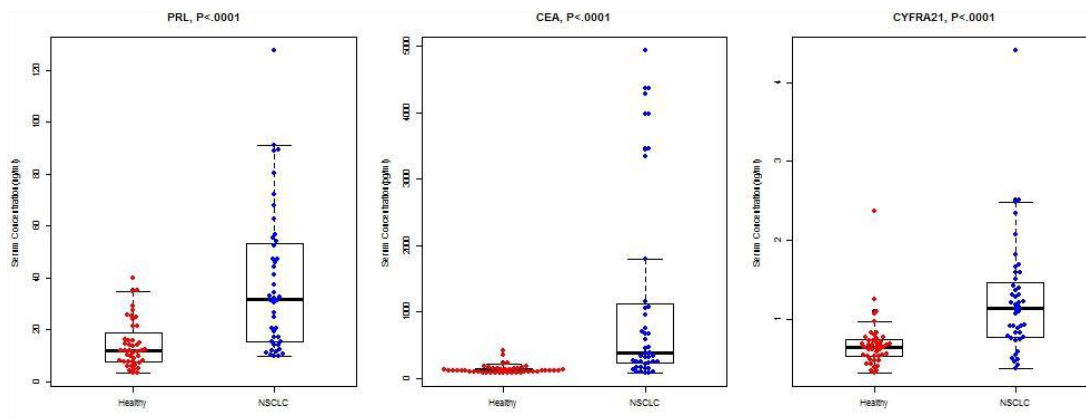


Figura 1. En el gráfico de la izquierda destaca la elevada presencia de prolactina sérica en pacientes con carcinomas de origen pulmonar, exceptuando al de células pequeñas¹⁴.

Otros autores, como Kochbin, et al¹⁵, desde 1983, han posicionado los niveles de prolactina como una molécula que consistentemente se eleva en neoplasias malignas pulmonares. Mientras que otros investigadores, como Deng, et al, la relacionan con la agresividad de dichas lesiones.¹⁶ Mientras tanto, en los estudios de Duritskiy, et al, mencionan que el incremento en progresión y agresividad del tumor, en los grupos con prolactinemia elevada, es 3.5 mayor en hombres y 5.7 veces en mujeres, que en aquellos con niveles séricos dentro del rango considerado normal (Figura 2)¹⁷

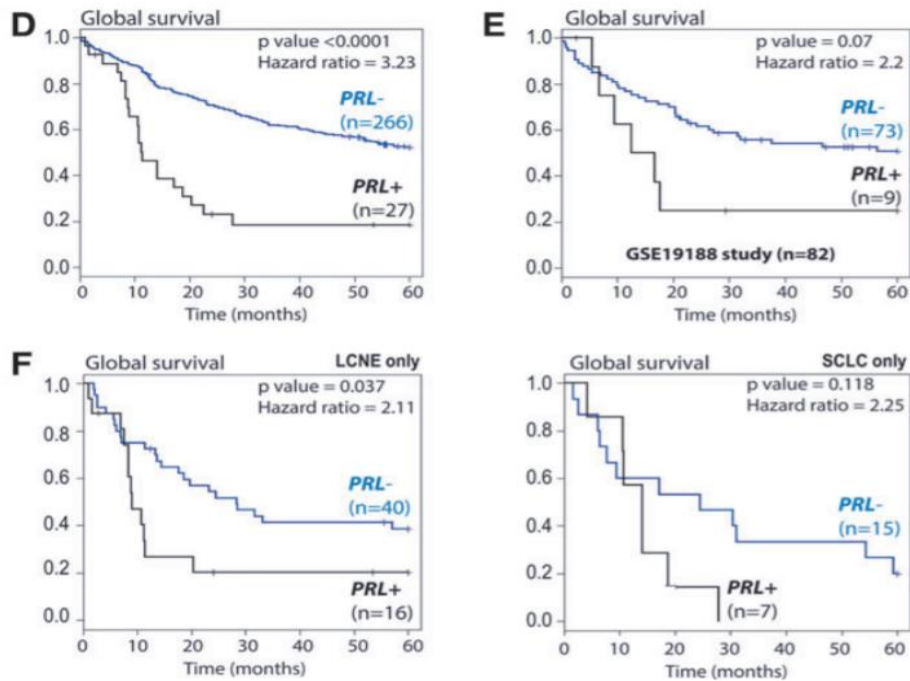


Figura 2. Gráficas de supervivencia, en cáncer pulmonar, respecto a la presencia periférica de PRL, en dichos pacientes. Se observa que de manera global los niveles elevados corresponden con mayor agresividad y se traducen en mortalidad precoz, respecto a niveles bajos de la hormona.¹⁷

En lo que respecta a ciencias básicas, en las neoplasias malignas de pulmón, no existen estudios que se enfoque directamente a explorar el rol de la prolactina, dentro de las complejas redes fisiopatológicas que lo promueven y favorecen su progresión, sin embargo, los ensayos genéticos de estas lesiones han generado importantes bibliotecas de niveles de expresión de mRNA's, entre las cuales destaca la prolactina debido a elevada síntesis de mensajeros en dichas neoplasias (Figura 3)¹⁸

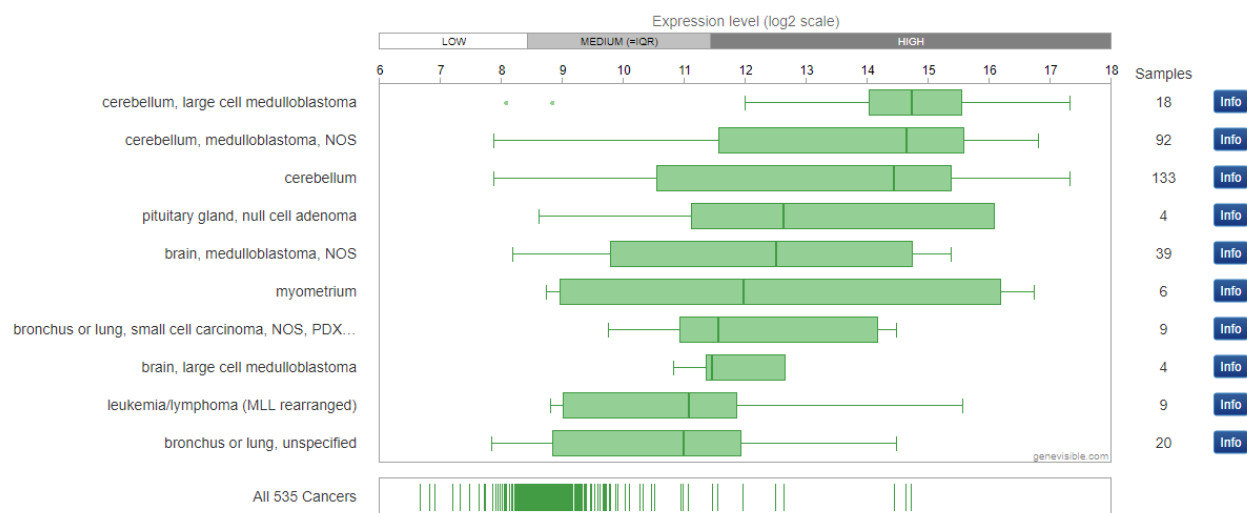


Figura 3. Principales neoplasias que expresan ARNs mensajeros para PRL, en la cual se muestra a las de pulmón en tercer lugar, después de tumores del sistema nervioso central y miometrio.¹⁸

Utilizando softwares predictivos de comportamiento bioquímico, como String-DB (Figura 4), se ha identificado que la prolactina posee importante afinidad por los receptores de proopiomelanocortina, los receptores de interleucinas 2, 4, 5, 6, 7, 11, 22, 23, 27, somatostatina, rGM-CSF, rIFN- α , rIFN- β , rIFN- γ , etc. De igual forma el receptor de prolactina puede ser activado por la hormona de crecimiento, eritropoyetina, oncostatina, leptina, GM-CSF, IL-2, IL-6, LIF, etc. En ambos casos, podemos especular que ambas moléculas (PRL y RPRL) tienen relevante participación en la fisiopatología oncológica; si bien no podemos afirmar (debido a falta de experimentos) que la afinidad entre ellas signifique activación e interacción que derive en respuestas celulares o moleculares, las predicciones de los modelos biológicos digitales plantean la oportunidad de que esto sea posible y definitivamente debería ser explorado. De verificarse esta información, se abre una enorme gama de posibilidades a explorar, ya que la presencia de estas moléculas podría permitir el establecimiento de nuevos factores pronósticos, elementos diagnósticos e incluso estrategias terapéuticas coadyuvantes, como las que actualmente se usan en cáncer de mama, por ejemplo, al administrar anticuerpos bloqueantes del receptor de prolactina

como inmunoterapia, la cual ha demostrado ser eficaz tanto para la reducción del tamaño de la neoplasia como para disminuir el riesgo de metástasis.

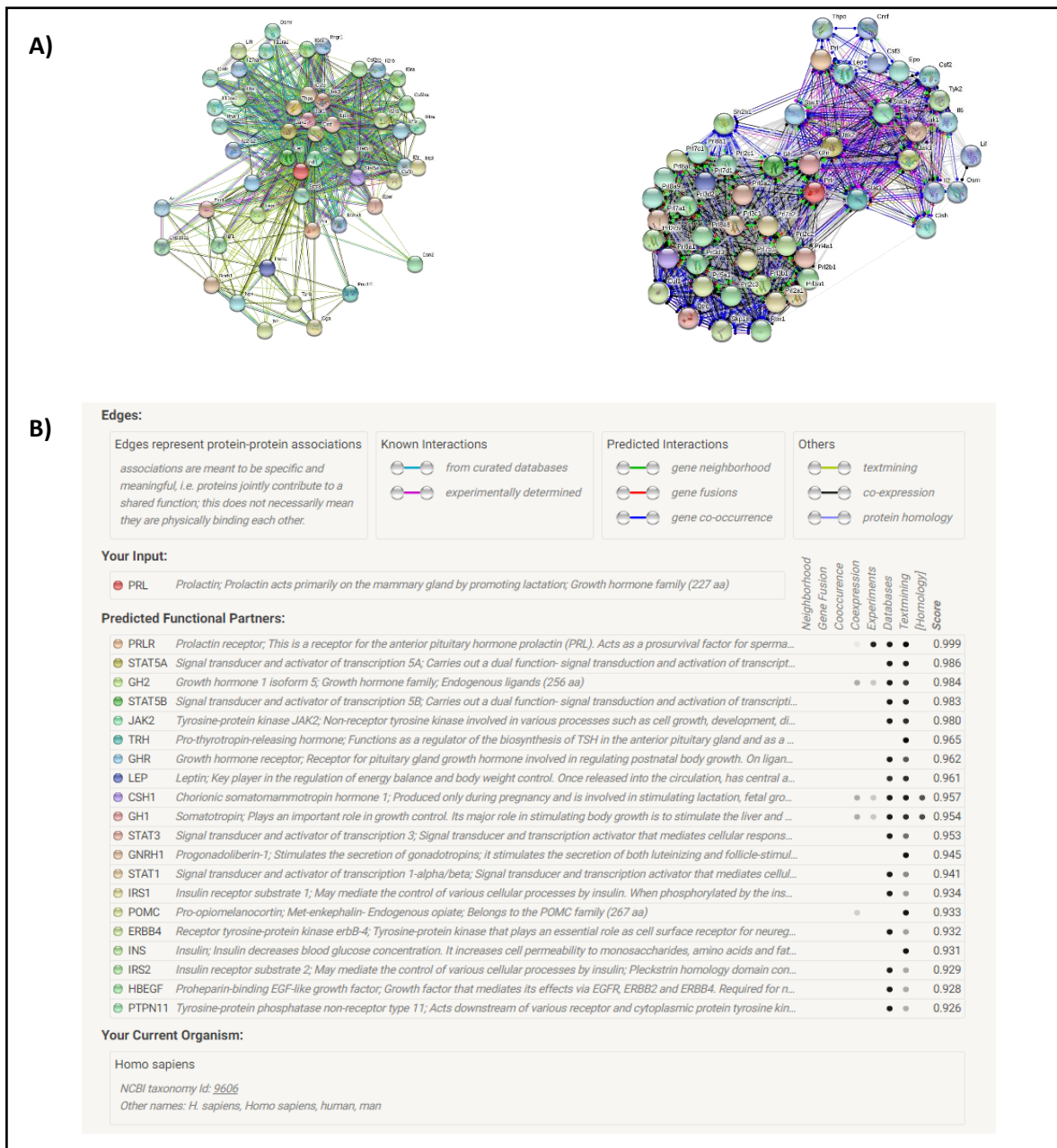


Figura 4. A) Clusters de interacción biológica, generados por software predictor de afinidad¹², de prolactina (izquierda) y su receptor (derecha). **B)** Resumen de la evidencia de interacción biológica entre la prolactina y diversas moléculas no clásicamente asociadas a ella, entre las cuales destaca el fuerte vínculo entre la PRL, JAK2 y STAT5, en niveles similares a las del receptor de PRL.¹⁹

Debido a la escasa información experimental, utilizamos el mismo software para objetivamente proponer y evidenciar las interacciones comentadas previamente, con un elevado nivel de evidencia y certeza biológica. Gracias a esto es posible predecir y determinar la acción biológica que la prolactina tiene sobre otras moléculas y receptores, basándose en experimentos previos y en macro bases de datos que permiten extrapolar la información necesaria (Figura 5). Es interesante como las diversas vías de señalización, resaltadas por los softwares, se encuentran involucradas con vías carcinogénicas y de regulación del sistema inmune, previamente descritas en diversas neoplasias.

Biological Process (GO)			
GO-term	description	count in gene set	false discovery rate
GO:0007259	receptor signaling pathway via JAK-STAT	12 of 41	1.97e-23
GO:0060397	growth hormone receptor signaling pathway via JAK-STAT	10 of 13	9.90e-23
GO:0043434	response to peptide hormone	16 of 362	1.42e-21
GO:0032870	cellular response to hormone stimulus	17 of 585	1.84e-20
GO:0071375	cellular response to peptide hormone stimulus	14 of 245	5.35e-20
			(more...)

INTERPRO Protein Domains and Features			
domain	description	count in gene set	false discovery rate
IPRO36860	SH2 domain superfamily	6 of 113	1.80e-08
IPRO36535	STAT transcription factor, N-terminal domain superfamily	4 of 7	1.80e-08
IPRO15988	STAT transcription factor, coiled coil	4 of 7	1.80e-08
IPRO13801	STAT transcription factor, DNA-binding	4 of 7	1.80e-08
IPRO13800	STAT transcription factor, all-alpha domain	4 of 7	1.80e-08

Reactome Pathways			
pathway	description	count in gene set	false discovery rate
HSA-282772	Growth hormone receptor signaling	12 of 22	5.66e-27
HSA-1170546	Prolactin receptor signaling	9 of 13	1.46e-20
HSA-2586552	Signaling by Leptin	8 of 9	7.18e-19
HSA-1280215	Cytokine Signaling in Immune system	14 of 654	1.38e-14
HSA-8854691	Interleukin-20 family signaling	6 of 25	2.36e-11
			(more...)

SMART Protein Domains			
domain	description	count in gene set	false discovery rate
SM00964	STAT protein, protein interaction domain	4 of 7	4.17e-09
SM00252	Src homology 2 domains	6 of 112	1.38e-08
SM00310	Phosphotyrosine-binding domain (IRS1-like)	2 of 11	0.00037
SM01244	Phosphotyrosine-binding domain	2 of 14	0.00042
SM00219	Tyrosine kinase, catalytic domain	2 of 88	0.0108
SM00060	Fibronectin type 3 domain	2 of 189	0.0381

Figura 5. Resúmenes, extrapolados de diversas macro bases de datos de funciones e interacciones biológicas de prolactina, en las que destaca su pleiotropismo, en especial en vías de señalización para interleucina 20, leptina, hormona de crecimiento, vía JAK-STAT, IRS1 y fibronectina, todas ellas asociadas a carcinogénesis en neoplasias malignas pulmonares.¹⁹

CÉLULAS A549:

Se trata una línea de células immortalizadas desarrollada por el Dr. Giard en 1979, originalmente extraídas de biopsias pulmonares de un hombre caucásico de 58 años que padecía de un adenocarcinoma lepidico; cabe destacar que durante décadas ha fungido como un excelente modelo de estudio de neumocitos tipo II, primordialmente en estudios dirigidos a metabolismo de fármacos, toxicología, infecciones como tuberculosis y caracterización de vías de señalización en el contexto de cáncer de pulmón e inmunología en general.²⁰

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

A nivel mundial, el cáncer de pulmón es la 5ª causa de muerte entre la población, y entre todas las neoplasias ocupa el primer lugar de mortalidad, superando al cáncer de mama y al cervicouterino; En México, las cifras son más alarmantes, ocupando un tercer lugar en esta escala. Al encontrarnos con dicha problemática, es evidente que se requieren mayores esfuerzos y nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de estas neoplasias y plantea otros tratamientos endocrinos e inmunomodulares como nuevos pilares en el abordaje integral de estos pacientes; La escasa información presente, en la literatura mundial, impone una gran barrera para explotar nuevos enfoques terapéuticos y pronósticos para beneficio de la población antes mencionada.

3. JUSTIFICACIÓN:

La frecuencia mundial (y mexicana), así como la morbimortalidad, correspondiente al cáncer pulmonar, se encuentra entre las más elevadas de todas las enfermedades que aquejan a la humanidad, no solamente de las entidades neoplásicas, esto pese a los importantes avances implementados en diagnóstico oportuno, tratamiento y salud pública, dado lo anterior es de suma relevancia encontrar nuevos enfoques para tratamientos coadyuvantes que mejoren la esperanza, calidad de vida y potencial curativo de estos pacientes. En las últimas décadas, se ha establecido la relevancia de la prolactina y su receptor en la fisiopatología de enfermedades neoplásicas, especialmente en aquellas con características endócrinas, derivando en tratamientos inmunoendocrinológicos de alta efectividad para disminuir la proliferación neoplásica. Hoy en día es reconocida su importante elevación sérica en el contexto de neoplasias malignas pulmonares, derivando incluso en síndromes paraneoplásicos caracterizados por ginecomastia y galactorrea; Teniendo en consideración lo anterior y a que se ha demostrado la producción basal, de dichas moléculas, en pulmón tanto en condiciones normales, así como ante estímulos nocivos, es factible considerar la posibilidad de su participación en el cáncer del mismo y por tanto un nuevo potencial blanco terapéutico, en especial cuando en el mercado existen

fármacos accesibles y ampliamente difundidos (cabergolina y bromocriptina) que pudiesen tener efectos terapéuticos significativos. Sin embargo, la ausencia de estudios sobre la producción de PRL, por los tumores pulmonares, es limitada a reportes de caso y extrapolaciones de bases de datos genómicas, lo que representa una importante área de oportunidad para el estudio, en un inicio en ensayos histopatológicos, que pretendemos explotar, en mira de generar información tanto de ciencia básica, como clínica, que impacte en el conocimiento general y en la utilización del mismo; Si bien encontrar dichas proteínas por inmunohistoquímica no necesariamente implica causalidad, si pudiera ser un primer paso para dilucidar el efecto de las mismas en el desarrollo de estos tumores y quizás, a largo plazo, ayudar a identificar blancos terapéuticos potenciales.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN:

¿Existe producción de PRL y/o respuesta a la misma por las células epiteliales pulmonares? En caso de ser así...

¿Qué características inmunohistoquímicas de expresión de prolactina se presentan en las biopsias de neoplasias pulmonares malignas?

5. OBJETIVOS:

- Objetivo principal:

1) Identificar la expresión de PRL en células epiteliales de origen pulmonar, tanto en un modelo murino sano como en biopsias de neoplasias pulmonares malignas de origen humano.

- Objetivos específicos:

1) Evaluar la expresión (localización e intensidad) de prolactina por inmunohistoquímica en biopsias de neoplasias pulmonares malignas en humanos y en pulmones de ratones sanos.

2) Identificar la asociación entre expresión de prolactina con los subtipos histopatológicos de las neoplasias pulmonares malignas.

3) Caracterizar la respuesta biológica que la prolactina induce en un modelo celular de adenocarcinoma pulmonar humano.

6. HIPÓTESIS:

- Las células del epitelio respiratorio pulmonar, así como los linfocitos asociados, son productores tanto de prolactina como de su receptor, y además sensibles al estímulo inducido por dicha hormona.

- Existe expresión diferencial de inmunotinción anti-PRL entre tejidos neoplásicos de origen epitelial pulmonar y no neoplásicos, teniendo estos últimos menor intensidad que los primeros, pero con tendencia a incrementar conforme existe un estímulo nocivo.

- La expresión de PRL, por inmunohistoquímica, es inversamente proporcional al grado histológico y al comportamiento agresivo de las neoplasias.

7. MATERIAL Y MÉTODOS:

-Diseño del estudio: el análisis de muestras humanas se trata de un estudio retrospectivo, observacional y comparativo. Los estudios realizados en cultivos celulares y en el modelo murino son tanto observacionales como experimentales.

-Autorización por comités de ética: registro y aprobación en CONBIOÉTICA-09-CEI-011-20160627 referencia 3029 (INCMNSZ), CINVA PAT-1915-18-20-1 (INCMNSZ) y R-2020-785-172 (Comité Nacional de Investigación Científica - IMSS).

-Lugares en donde se realizó el protocolo: Departamento de patología Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y en la unidad de patología experimental

del mismo instituto, así como en el departamento de patología del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

-Duración del estudio: dos años.

-Fuentes de información y muestras biológicas: archivos de bloques y laminillas del departamento de patología del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XX y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, así como los archivos clínicos digitales de los casos correspondientes a estudiar.

7.1 MODELO CELULAR:

Con la intención de identificar si la prolactina es biológicamente activa en el epitelio pulmonar se diseñó el siguiente experimento, en el que cultivos de células A549 fueron expuestas a PRL recombinante, posteriormente se midió por RT-PCR la producción de proteínas clásicamente asociadas a los neumocitos tipo II, como la proteína surfactante A, la proteína surfactante D, la catelicidina LL 37 y la proteína inducida por prolactina (PIP), que además se han asociado como factores de progresión tumoral.^{21,22,23,24,25}

- *Cultivos celulares:* Se sembraron células A549 (ATCC® CCL-185™) en placas de 12 pocillos (1 x 10⁵ células por pocillo) en medio RPMI (Caisson Labs, EE. UU., Cat. RPL03) suplementado con suero fetal bovino al 5% (Gibco, Estados Unidos), hasta el punto de confluencia óptima. En este experimento, por triplicado, se incluyeron 2 grupos A549 y A549 + PRL, en dos tiempos de evaluación (1 y 18 horas), 1 grupo por tiempo fue estimulado con prolactina recombinante (1445-PL-050, R&D Systems), usando una dosis de 8 µg / mL, posterior a que se completaran las horas de incubación se lisaron con SDS al 1%, esperando durante 10 min, ulteriormente se añadió albúmina de suero bovino (BSA) al 20% para detener la reacción (*Figura 6*). Las células fueron homogenizadas en tampón RLT-βME con el fin de aislar el ARN total para la determinación de la expresión de los genes péptido inductor de prolactina, catelicidina LL 37, proteína surfactante A y proteína surfactante D, mediante RT-PCR como se describirá a continuación.

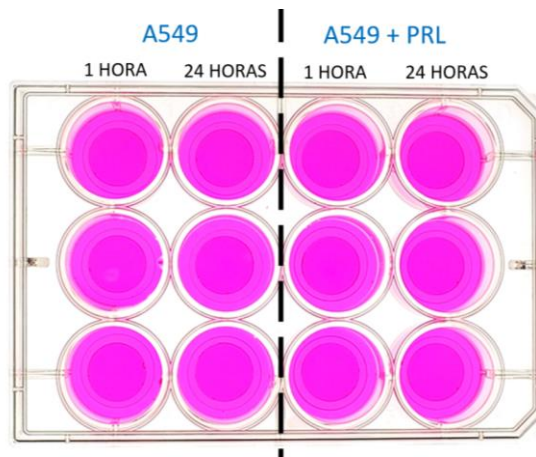


Figura 6. Diseño experimental utilizado en el ensayo para la determinación de acción biológica de prolactina recombinante en cultivos celulares de la línea A549.

De las muestras obtenidas del paso anterior se purificó el ARN total de las células con ayuda del RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, México). La calidad y cantidad de RNA fue evaluada mediante espectrofotometría (260/280) por Nanodrop (Thermo Scientific) y mediante un gel de agarosa. Se realizó la retrotranscripción del ARNm utilizando 5 ug de RNA, oligo -dT y Omniscript Kit (Qiagen, México). La PCR en Tiempo Real se realizó empleando el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) y se cuantificó utilizando Quantitech Sybr Green Master Mix (Qiagen), utilizando el método de curva estándar (1×10^9 hasta 1×10^2) para cuantificar el número de copias. Se diseñaron primers específicos (Tabla 1) utilizando el programa Primers Express (Applied Biosystem) para la PRL de 23.5 kDa, mientras que para el resto de los genes de interés se consultó la bibliografía internacional²⁶. La reacción fue realizada las siguientes condiciones: desnaturalización 95°C por 15 min, 40 ciclos a 95°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos, 72°C por 34 segundos. El número de copias de cada proteína se normalizó a un millón de copias de ARNm de gen constitutivo (RPLP0).

GEN DE INTERÉS	PRIMER (FORWARD)	PRIMER (REVERSE)
Proteína inducida por PRL	TGGCTCCTGTGCCTGCTGATG	CAGCCATCCTGGGACGACATAG
Catelicidina LL 37	CCAGGACGACACAGCAGTCA	CTTCACCAGCCCCTCTTC
SURFACTANTE A	TTTCTTGGAGCCTGAAAAGA	GGAGGCCGAAGGCCAGAGAGCGT
SURFACTANTE D	TTTGCCAGGAGCTGCAGGGCAA	AAGTGCTCGCAGACCACAAGACG
PROLACTINA	CCCAGAAAGCAGGGGACTC	CAGTCACCAGCGGAACAGAT

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados en experimentos del modelo celular y murino.

7.2 MODELO ANIMAL:

Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad y 22 g de peso proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del INCMNSZ, dichos animales fueron conservados en condiciones de estricto aislamiento microbiano en un laboratorio de bioseguridad animal nivel 3, en el cual se les alimento y mantuvo en forma consistente hasta su sacrificio, siendo particularmente cautos en minimizar el estrés, proporcionándoles cama, refugio y horas de luz adecuadas, lo anterior con la finalidad de no alterar el frágil ciclo circadiano e inmunoendocrinológico que regula la producción de PRL. Grupos de 3 ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico vía intraperitoneal a una dosis de 210 mg/kg y sacrificados por exanguinación (recolectando la sangre) a los 6:00 am de los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 posterior a recibirlos en el bioterio. Los pulmones izquierdos fueron conservados en nitrógeno líquidos y los derechos en etanol absoluto, con mira de preservarlos adecuadamente para los estudios moleculares. Todo el material, así como los productos de desecho generados por el sacrificio de los animales será considerado RPBI y serán desinfectados con Clidox™ 1:1:18 partes de agua/15min.

- *ELISA*: Para la presente técnica se utilizaron las muestras de suero recuperadas por exanguinación de cada uno de los ratones sacrificados y fueron analizadas con el Kit de ELISA en placa de 96 pozos (AB-100736 de ABCAM), con los reactivos proporcionados y estrictamente bajo la metodología especificada en el inserto.

- *RT-PCR*: los pulmones izquierdos fueron homogenizados con perlas de sílice y zirconio, usando el sistema MP FastPrep24; se extrae el RNA con ayuda del RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, México). Posteriormente se realizaron las pruebas de acuerdo al protocolo referido en el apartado previo.

- *Western Blot*: los pulmones correspondientes, previamente homogenizados para PCR, fueron expuestos al buffer de muestra Laemmli BioRad con β -mercapto en una proporción 1:1, posteriormente se calentaron a 80°C durante 5 minutos, al finalizar se dejaron enfriando en hielo, hasta que fueron cargados en los carriles del gel concentrador, el cual

se permitió correr a 75V por 25 minutos hasta la alineación en el límite con el gel separador, para posteriormente subir el voltaje a 100V durante 1.5 minutos. Para continuar, se realizó la transferencia a una membrana de PVDF. Para corroborar la transferencia teñimos las membranas con Ponceau-S, sumergiendo las membranas 20 segundos en metanol e incubando con el colorante por 2 minutos. Se procedió a realizar bloqueo con solución Blotto agitando a 120 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: Prolactin E-9, sc-48383 de Santa Cruz Biothecnology Inc y Prolactin Receptor D4A9 #13552 de Cell Signaling Technology, que se añadieron de acuerdo a las titulaciones previamente estandarizadas para verificar la mejor concentración. Posteriormente se añadió el anticuerpo secundario y el revelado se realizó con los reactivos ECL Immobilon Western (millipore). Finalizando el proceso mediante la tinción de membranas con azul de Coomasie y su ulterior revelado. Como control de calidad de integridad de las proteínas se realizó el mismo procedimiento, pero contra β -actina.

- *Inmunohistoquímica*: se realizaron cortes histológicos, en micrótomo a 2.5 micras, que se colocaron en laminillas cargadas, posteriormente se hidrataron los tejidos, para lograr esto se incubaron por 30 segundos en cada una de las siguientes soluciones (bajo estricto orden): en xilol 1, xilol 2, alcohol-xilol (1:1), etanol absoluto, etanol al 96% y agua destilada; para continuar con recuperación antigénica en buffer de citratos con pH 9, a temperatura alta en olla de presión, la peroxidasa endógena se bloqueó con H₂O₂-MeOH (9:1)/20 minutos, al finalizar fue lavada con PBS Tween 20 (0.05%) este último lavado se realizaron entre cada uno de los pasos que se describen a continuación. El bloqueo de inespecificidad se realizó con HCN durante 20 minutos, el anticuerpo primario para prolactina (Prolactin E-9, sc-48383 de Santa Cruz Biothecnology Inc) fue utilizado a una dilución 1:100 por laminilla; dejando en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a incubar el anticuerpo secundario por 30 minutos, y después se empleó HRP acoplada a estreptavidina que se dejó actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente; como siguiente paso se agregó diaminobencidina disuelta en buffer DAB (1 gota en 1 mL de buffer), vigilando el viraje de coloración (traslucido a café) y realizando el lavado para detener la reacción, posteriormente se realizó una contratinción con hematoxilina, para

finalizar, cada laminilla fue montada con resina y analizada con microscopia de luz simple, describiendo a grandes rasgos los tipos celulares inmunomarcados, así como las características e intensidad del mismo. Como controles positivos de la reacción fueron cortes histológicos de hipófisis. Como controles negativos se utilizaron duplicados de las muestras, en los cuales únicamente no se adicionó el anticuerpo primario durante el procesamiento de las mismas.

7.3 BIOPSIAS DE HUMANOS:

-Cálculo de tamaño de muestra: Tamaño de muestra ideal, considerando a la cantidad de pacientes con cáncer de pulmón, diagnosticados anualmente en el Instituto Mexicano del Seguro Social¹¹:

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 Npq}{e^2(N-1) + Z_{\alpha}^2 pq}$$

$$N = 35650^{11}$$

$$Z_{\alpha} = 1.65$$

$$p = 0.5$$

$$q = 0.5$$

$$e = 1\%$$

$$\text{Numerador: } 29198.24$$

$$\text{Denominador: } 356.49 + 0.8190 = 357.30$$

$$\mathbf{n = 81.71}$$

-Criterios de inclusión, exclusión, eliminación:

- a) Criterios de inclusión: Pacientes con diagnóstico histopatológico de cáncer pulmonar.
- b) Criterios de exclusión: ausencia de información clínica completa, falta de bloques de parafina para complementar el estudio de inmunohistoquímica o escaso tejido restante en los mismos.

c) Criterios de eliminación: Identificación de neoplasia de hipófisis productora de prolactina, al revisar antecedentes clínicos.

- *Inmunohistoquímica*: con previa autorización de los comités de ética correspondientes, se seleccionaron los bloques de parafina pertenecientes a pacientes, del INCMNSZ y del CMNSXXI, que hayan sido diagnosticados con alguna neoplasia maligna pulmonar, con especial interés en los adenocarcinomas, de igual forma se utilizaron muestras de pulmones sin neoplasias y con enfermedades inflamatorias o infecciosas, lo anterior en mira de poder tener un punto de partida sobre normalidad y patologías ajenas al cáncer. Dichas muestras fueron procesadas para realizar inmunohistoquímicas dirigidas a la isoforma prototipo de la prolactina, cuidando siempre la preservación del tejido. La técnica utilizada fue la misma que se describió previamente con el modelo murino, sin embargo, en este caso se utilizó otro anticuerpo primario contra prolactina (ab64377, ABCAM), en dilución 1:200, que fue seleccionado con la intención de utilizar el anticuerpo adecuado que presente el mejor rendimiento en muestras de origen humano. Cabe destacar que el anticuerpo primario utilizado detecta todas las isoformas de prolactina y su receptor, lo anterior debido a que dichas variantes son modificaciones postraduccionales de las proteínas que no intervienen con la inmunotinción de las mismas, además de que no se han desarrollado anticuerpos específicos contra dichas variantes.

Como casos “no carcinomas” se incluyeron 10 cortes de pulmón con: COVID-19, mieloma múltiple, granulomatosis con poliangeítis, neumoconiosis, infecciones y daño alveolar difuso.

- *Interpretación de los resultados*: de manera semicuantitativa, se gradificó el nivel de inmunomarcaje (nuclear y citoplásmico) tanto en células neoplásicas como no neoplásicas (linfocitos, células plasmáticas y epiteliales), utilizando la siguiente escala: tinción negativa (0), leve (1) e intensa (2). Lo anterior fue realizado por dos observadores que evaluaron dichos parámetros de manera independiente y posteriormente en conjunto.

Las variables se analizaron mediante prueba de ji al cuadrado. En este análisis fue utilizado el paquete estadístico SPSS versión 28.0.

ASPECTOS ÉTICOS:

El presente estudio y los procedimientos empleados se apegan al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, así como con la declaración de Helsinki y sus enmiendas de acuerdo con los siguientes apartados:

-Procedimientos: Dado que es un estudio retrospectivo, no se realizaron maniobras ni intervenciones a los pacientes. Las muestras, se tomaron de los bloques de parafina, que se encuentran en el archivo de anatomía patológica de ambas instituciones, en su momento dichas biopsias fueron realizadas por los equipos quirúrgicos y para el abordaje de la enfermedad, previo consentimiento informado del paciente y/o responsable. Para el presente protocolo no se tomó ninguna muestra nueva ni se realizará maniobra alguna sobre los individuos en cuestión.

-Recopilación de información: de cada biopsia estudiada, se obtuvieron datos relevantes de los informes histopatológicos, así como también se volvieron a revisar las laminillas correspondientes a cada caso, con la finalidad de verificar y reevaluar cada diagnóstico. La información recabada de los expedientes clínicos fue manejada con estricta confidencialidad y únicamente para los fines estadísticos antes mencionados. Los investigadores del presente protocolo declaramos que no tenemos conflictos de interés alguno.

-Riesgo de la investigación: De acuerdo con la Ley General de Salud, es un estudio sin riesgo. A todos los pacientes se les solicitó la firma de consentimiento informado para toma de biopsia o procedimiento quirúrgico.

-Posibles beneficios: El paciente que ingrese al protocolo de estudio no recibió ningún beneficio directo de su participación, sin embargo, los resultados del proyecto permitirán

un aporte al conocimiento de la enfermedad para mejorar las estrategias en su comprensión y potencial tratamiento.

Debido a ello y a que se seguirán los protocolos que actualmente se llevan a cabo en la Institución, el balance se inclina al beneficio.

-Confidencialidad. Los investigadores nos comprometemos a resguardar los datos obtenidos de los sujetos de investigación (datos clínicos y demográficos, resultados de estudios de imagen y patología) y que todos serán anónimos; para ello las hojas de recolección de datos fueron identificadas con un folio numérico consecutivo que corresponde con los datos que puedan identificar al paciente en el estudio y solo los investigadores tienen acceso a los mismos.

-Conflictos de interés: No hay conflictos de interés por parte de ninguno de los miembros del equipo de investigación en este proyecto.

-Recursos, financiamiento y factibilidad: todos los estudios realizados, y gastos correspondientes, fueron cubiertos por el departamento de patología y la unidad de patología experimental del INCMNSZ.

-Aspectos de bioseguridad: Se siguieron los lineamientos de la Ley General de Salud, en materia de Investigación para la Salud y el Manual de Bioseguridad en el laboratorio de la Organización Mundial de la Salud, así como el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y materiales que constituyan un riesgo biológico.

8. RESULTADOS:

8.1 MODELO CELULAR:

Los experimentos realizados en los cultivos A549 demuestran patrones de expresión molecular particularmente interesantes, si bien la meta inicial era determinar si la PRL induce actividad biológica en células de origen pulmonar, no solo confirmamos dicha

aseveración sino que también observamos la inducción de producción de transcritos que culminan en productos con propiedades oncogénicas (LL 37, SP-D), la supresión de una proteína protectora de progresión neoplásicas (SP-A), así como también del PIP, lo que demuestra la regulación por retroalimentación autócrina de la prolactina (Figura 7)

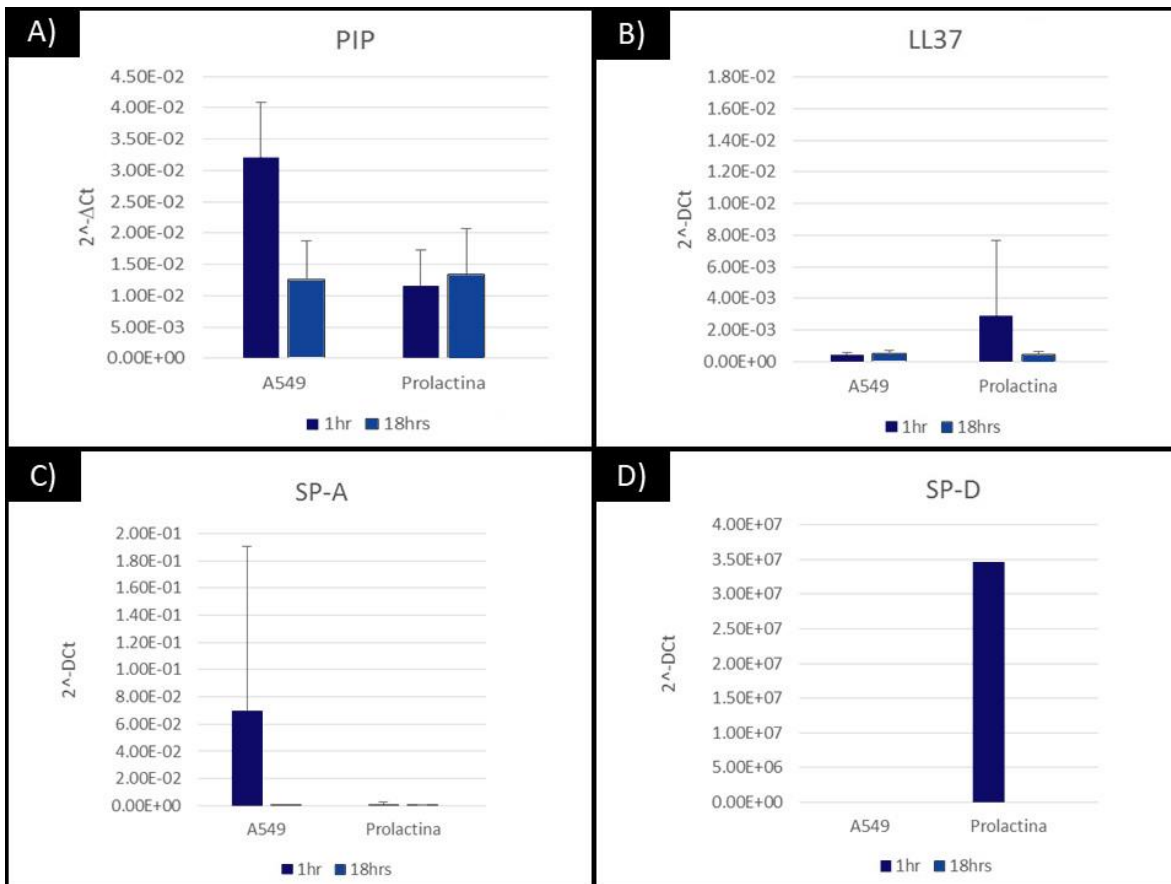


Figura 7. Representación gráfica de la cuantificación obtenida por RT-PCR para proteína inducida por prolactina (A), catelicidina LL 37 (B), proteína surfactante A (C) y proteína surfactante D (D), a las 1 y 18 horas de exposición de células A549 y a sus contrapartes expuestas a PRL recombinante.

8.2 MODELO MURINO:

En el análisis de los resultados obtenidos en los ensayos ELISA (Figura 8) para la cuantificación de PRL circulante en los ratones BALB/c podemos identificar como los niveles de la misma presentan diferentes concentraciones séricas a lo largo del tiempo, con picos y

descensos acentuados, lo anterior es característico del modelo ya que el ciclo circadiano de la prolactina no es solamente horario, sino que también presenta variaciones semanales. Y si bien pueden existir alteraciones debido a una gran cantidad de factores, como el estrés o la enfermedad, todos los animales se mantuvieron en ambientes controlados, con los mismos parámetros de luz, ventilación, cuidados, alimentación y recreación, así como de igual forma cada animal de cada grupo fue sacrificado en el mismo horario, con el fin de minimizar el ruido que esto pudiese generar en los resultados.

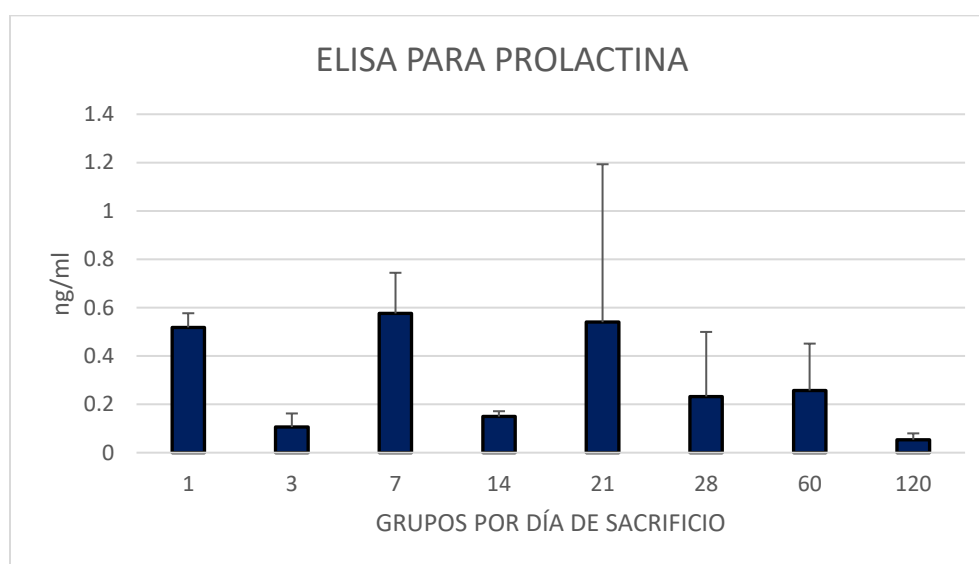


Figura 8. Cuantificación de PRL por ELISA en suero de ratones BALB/c sanos.

La medición del número de transcritos de prolactina, mediante PCR en tiempo real (Figura 9), realizada en los pulmones de los mismos grupos de ratones evidencia como si bien la producción basal de dicha hormona es baja, respecto al gen constitutivo, esta es constante en sus niveles a lo largo del tiempo, oscilando entre las 322 y las 358 copias por reacción, lo cual pone en tela de juicio si la producción de PRL a nivel tisular pulmonar es llevada a cabo por mecanismos independientes a la regulación de la concentración periférica de la misma.

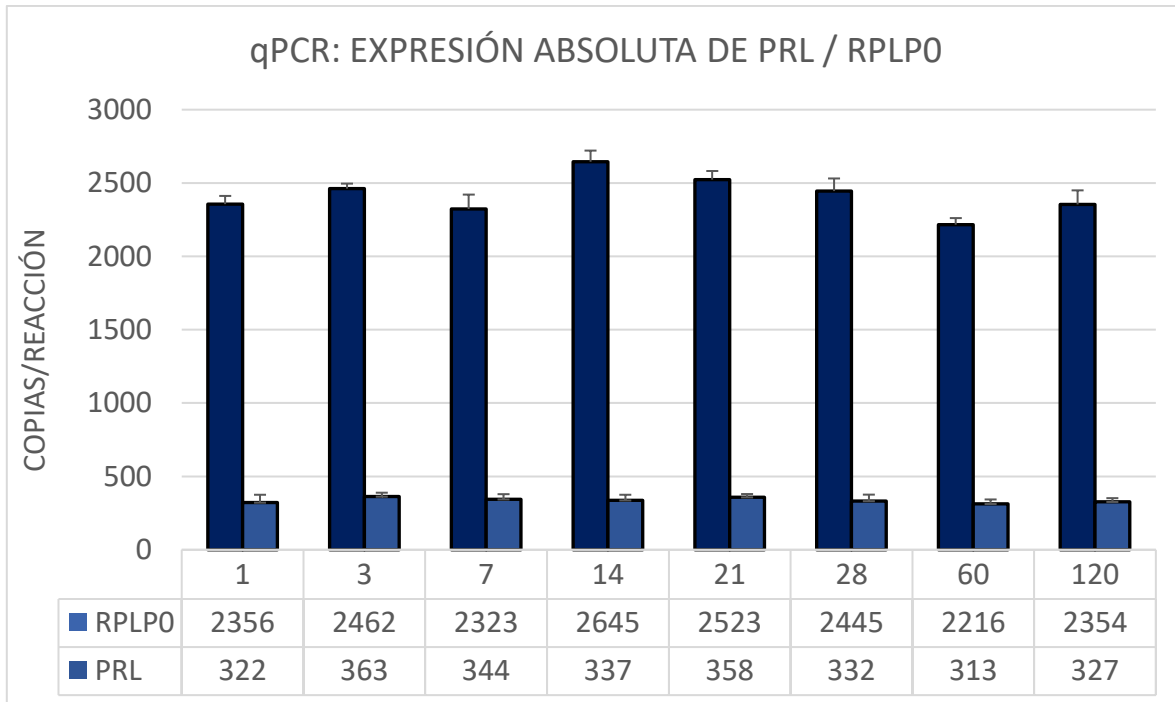


Figura 9. RT-PCR de prolactina en pulmones de ratones BALB/c sanos y su comparación con un gen constitutivo (RPLPO).

Los estudios de Western-Blot efectuados en muestras de los mismos pulmones (Figura 10) revelan que en el caso de la prolactina se identifican dos isoformas predominantes, la de 23.5 kDa correspondiente a la PRL “clásica” conocida por ser el producto prototipo de traducción en la hipófisis y que constituye la variante predominante a nivel circulatorio, así como una de aproximadamente 30 kDa que usualmente no es identificada a nivel sérico, y cuya función tisular aún se desconoce. Por su parte, en la búsqueda del receptor de prolactina se logra documentar la presencia de las isoformas caracterizadas en los ratones, las llamadas grande y pequeña. Los controles internos de β -actina son adecuados para cada grupo analizado.

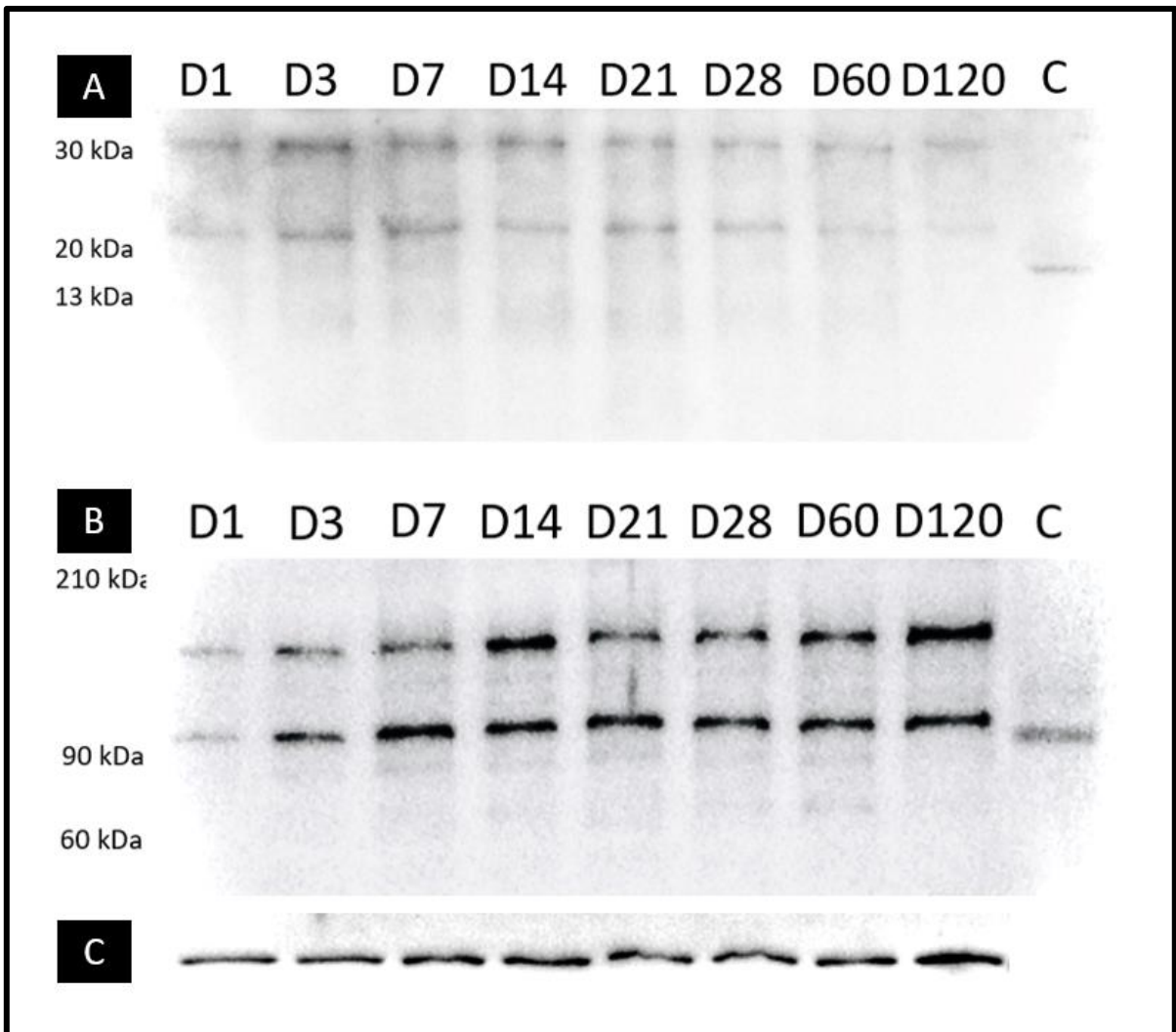


Figura 10. Western-Blot dirigido contra prolactina (A), su receptor (B) y β -actina como control interno, en pulmones de ratones BALB/c sanos. Las letras "C" en los últimos carriles de los primeros dos paneles corresponden a las proteínas recombinantes utilizadas como control externo de la prueba.

Respecto a las reacciones de inmunohistoquímica efectuadas en los pulmones preservados para dicho fin (Figura 11), pero correspondientes a los mismos ratones de los estudios previos, demostraron consistentemente positividad focal y citoplasmática en las células epiteliales alveolares, en cada sujeto experimental de cada grupo de sacrificio. Es importante resaltar que no se observó inmunomarcaje evidente en ningún otro tipo celular.

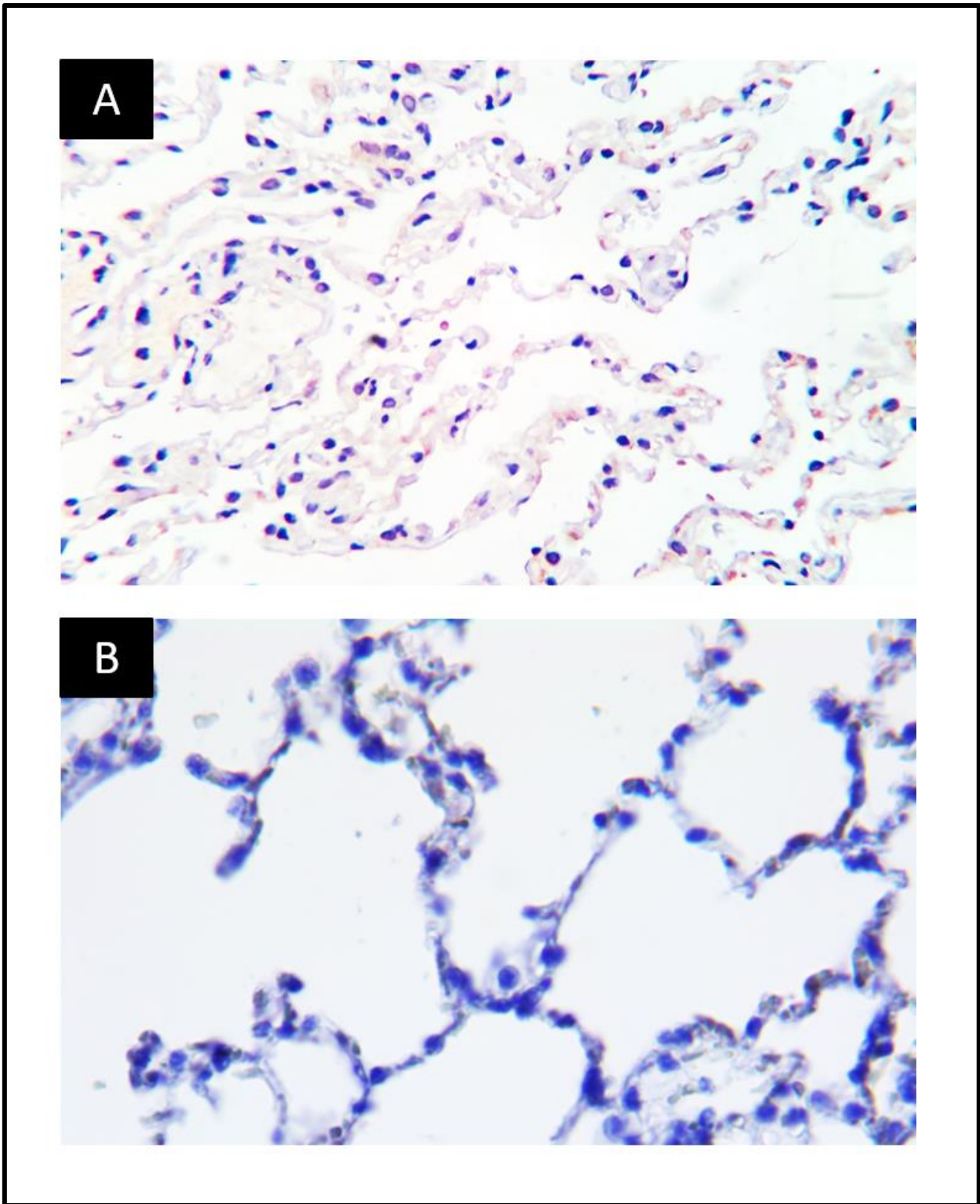


Figura 11. A) Reacción de inmunohistoquímica contra prolactina en corte histológico de pulmón de ratón BALB/c. B) Inmunotinción contra receptor de prolactina en mismo grupo.

8.3: BIOPSIAS DE HUMANOS:

En los estudios de inmunohistoquímica realizados en las biopsias de los pacientes, destaca el amplio espectro de inmunotinción en ellas, teniendo desde casos con marca intensa y difusa, hasta casos indudablemente negativos (dentro de los mismos subtipos histológicos).

Es interesante que el marcaje no se limita al citoplasma de las células neoplásicas, ya que en algunos casos también es observada a nivel nuclear, lo que en estudios previos ha sido descrito como traslocación nuclear de prolactina, traducándose en la actividad de dicha proteína como factor de transcripción; también es importante destacar la positividad citoplásmica en epitelio respiratorio no neoplásico, células endoteliales y linfocitos (Figura 12), lo que correlaciona perfectamente con el amplio grupo de tejidos en los que se ha descrito la producción de una u otra isoforma de la PRL, y que se ve importantemente incrementada en condiciones reactivas y patológicas. En las fotomicrografías expuestas en las figuras 13-18 se ejemplifican los hallazgos microscópicos más relevantes.

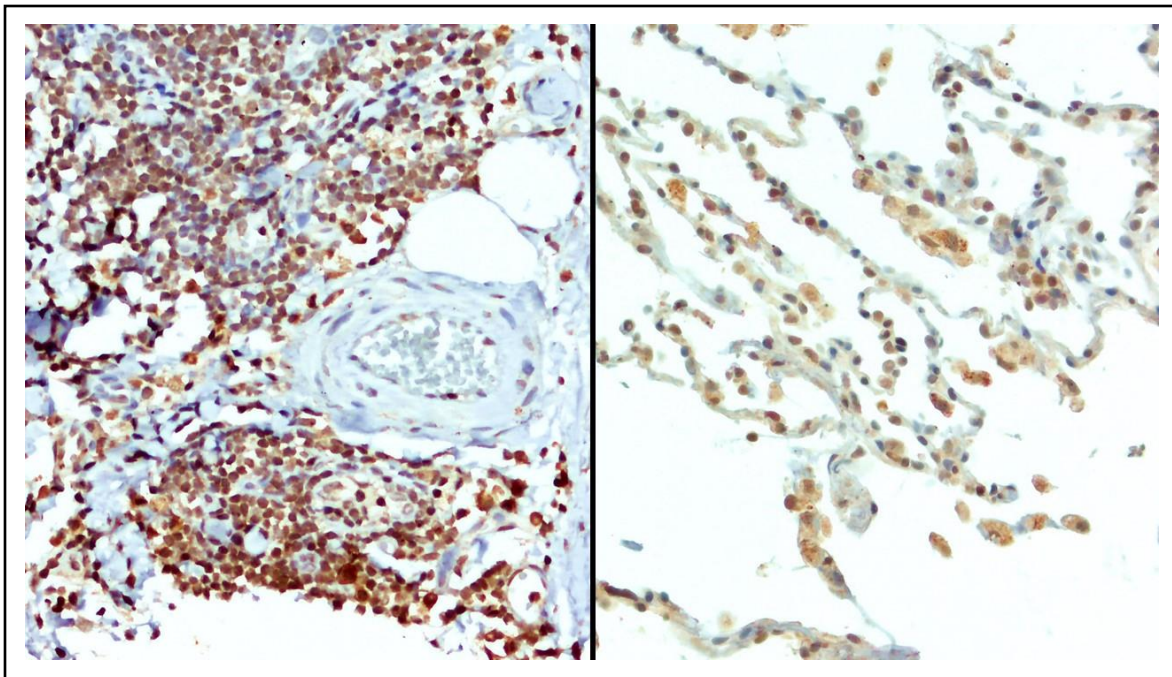


Figura 12. Reacción de inmunohistoquímica (40X) contra PRL en tejido pulmonar no neoplásico, adyacente a un adenocarcinoma lepidico. En el panel de la izquierda se identifican agregados linfoides con intensa marca nuclear, así como endotelio positivo en su citoplasma, en el panel de la derecha observamos neumocitos tanto tipo I como II con marca positiva en su citoplasma.

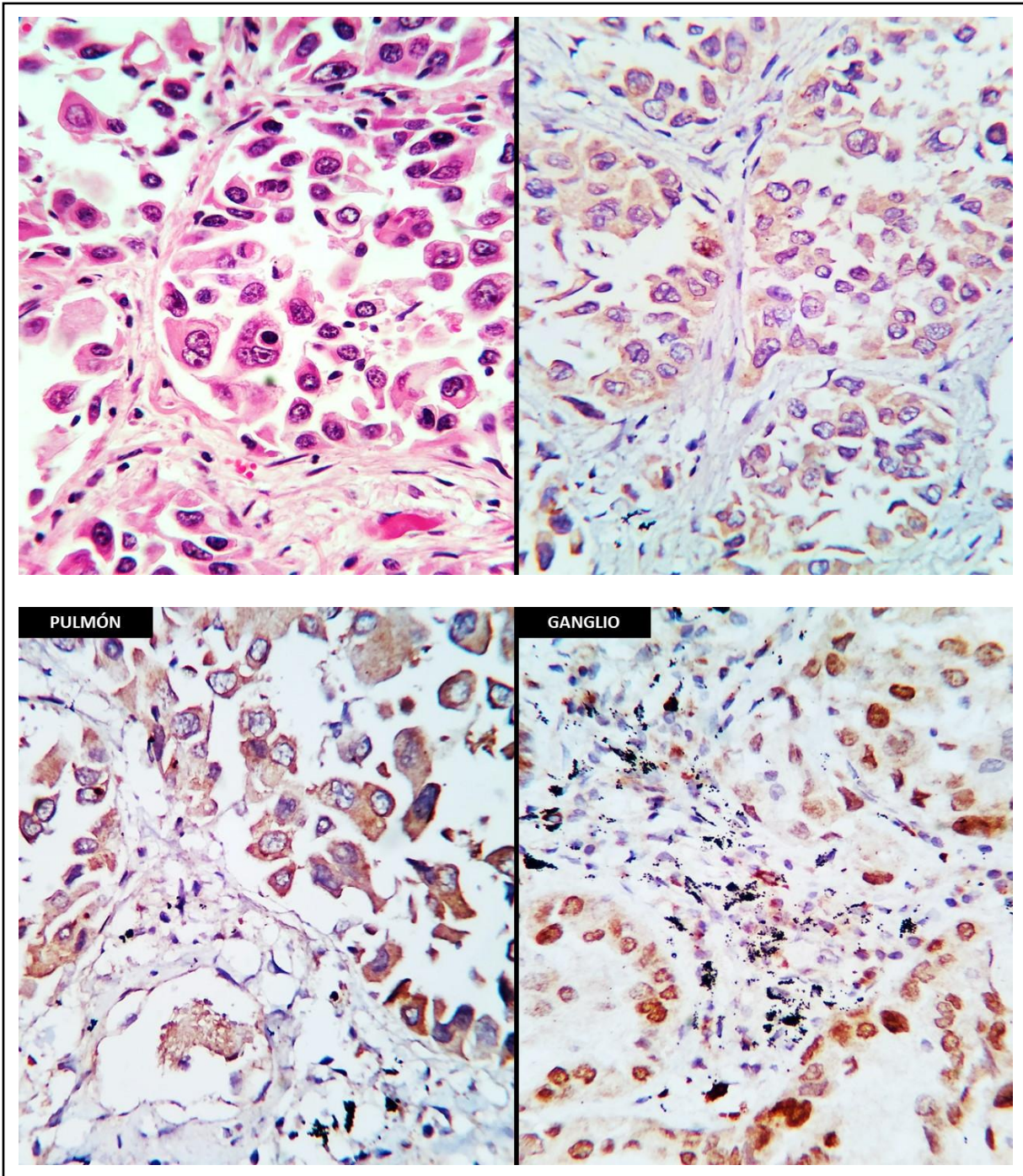


Figura 13. Corte histológico teñido con H&E y reacciones de inmunohistoquímica contra PRL (40X), correspondientes a un adenocarcinoma lepidico, en el que identificamos positividad citoplásmica y difusa en las células neoplásicas presentes en pulmón, mientras que en la metástasis ganglionar la marca es intensa a nivel nuclear y tenue en el citoplasma.

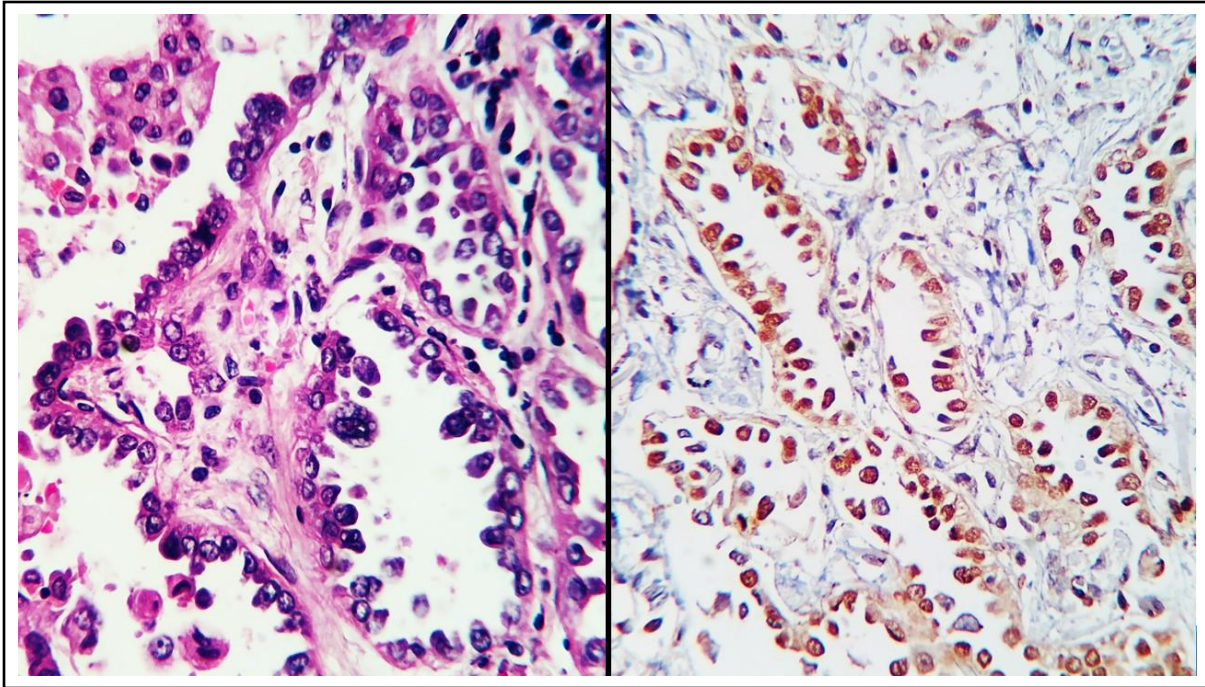


Figura 14. Fotomicrografía de corte histológico teñido con H&E e inmunorreacción contra prolactina en un adenocarcinoma lepidico localizado en pulmón, a diferencia de la figura 13, este presenta intensa marca nucleary mínima citoplasmática en su localización primaria.

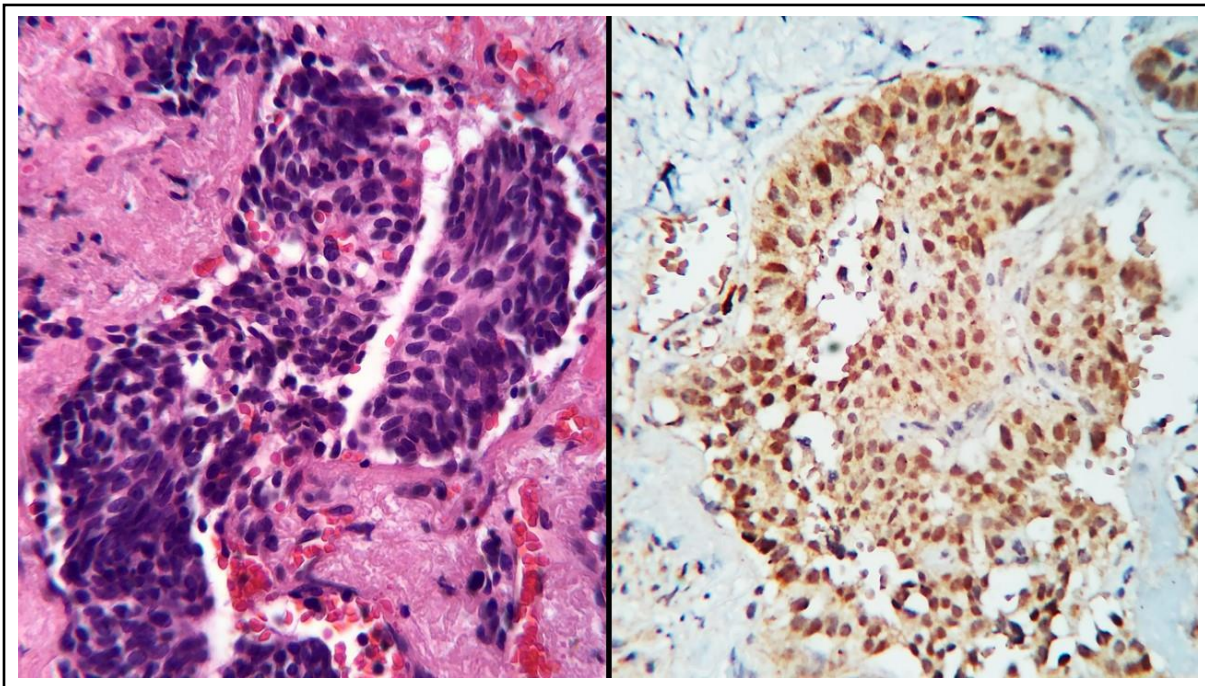


Figura 15. Corte histológico teñido con H&E e inmunohistoquímica contra PRL (40X) de un carcinoidetípico, en el que destaca intensa positividad tanto citoplasmática como nuclear.

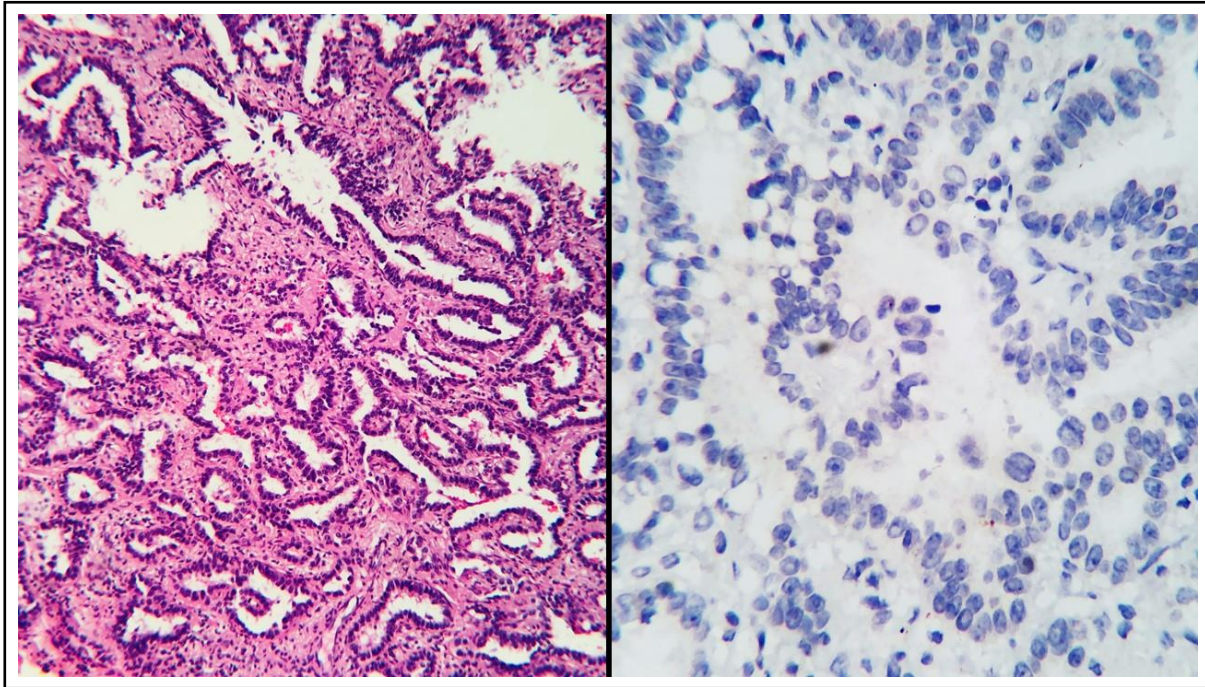


Figura 16. Corte histológico teñido con H&E y su correspondiente reacción e inmunohistoquímica contra prolactina (40X) en un adenocarcinoma acinar pulmonar, en el que destaca la franca negatividad del mismo.

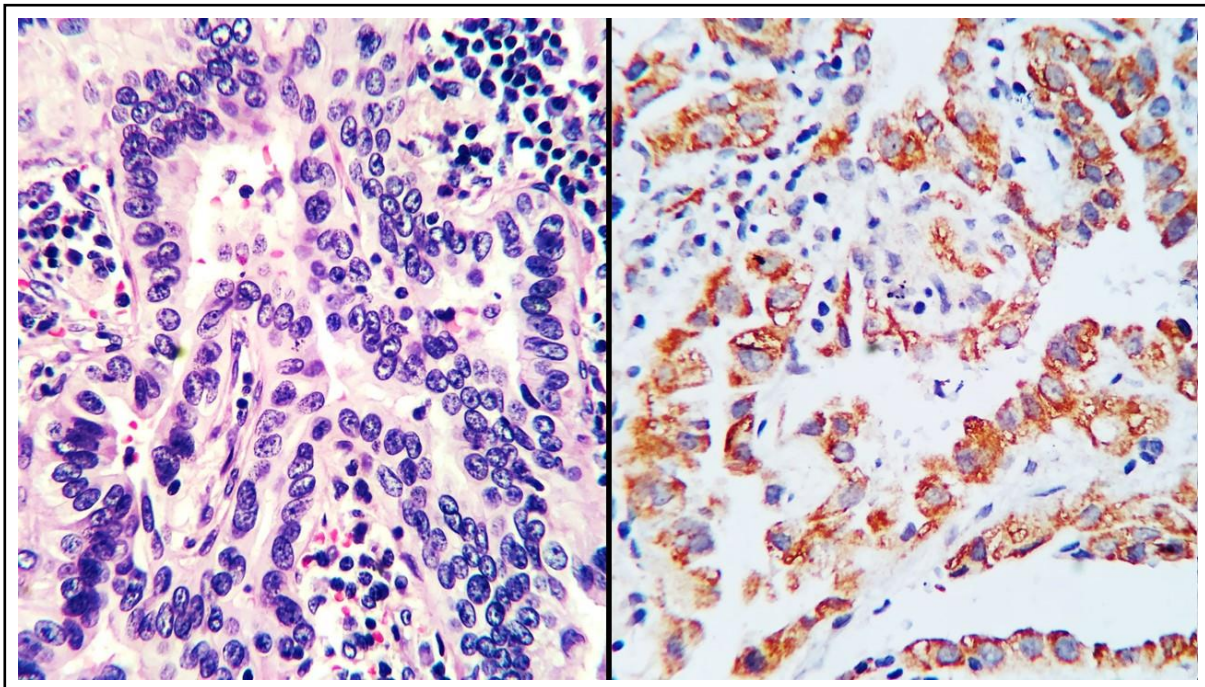


Figura 17. Adenocarcinoma acinar pulmonar, en el que a diferencia de su contraparte descrita en la figura 16, este presenta intensa y difusa positividad citoplásmica.

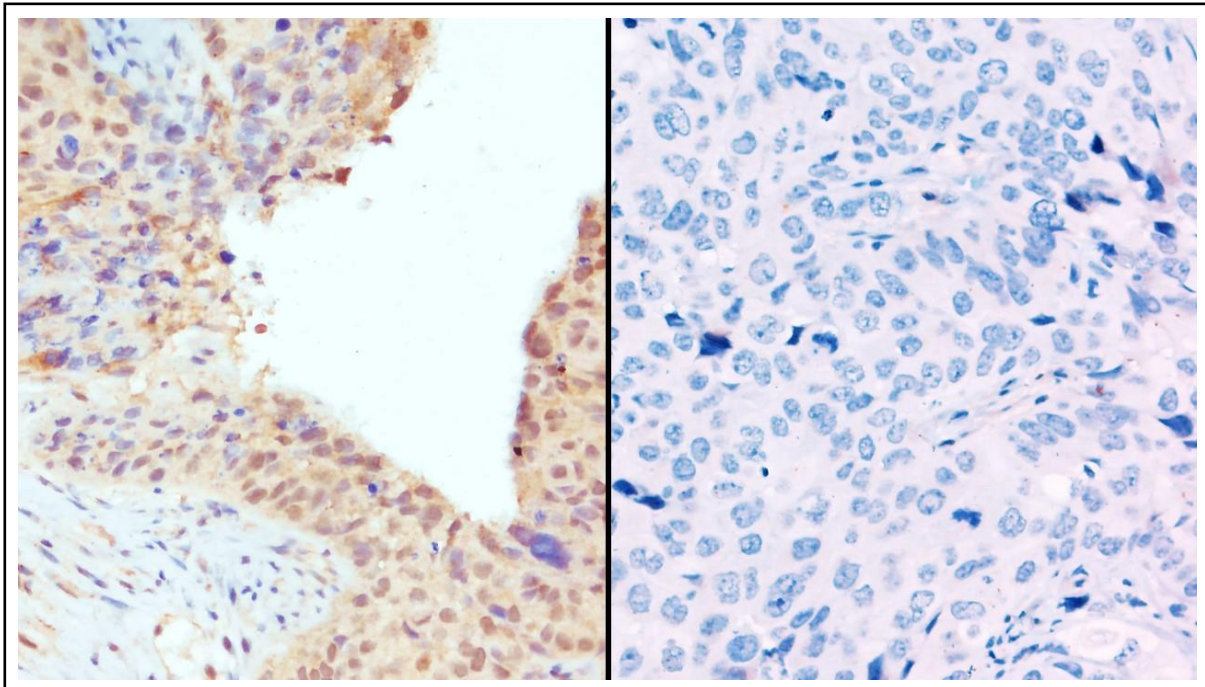


Figura 18. Reacciones de IHQ contra PRL (40X), en el panel de la izquierda corresponde a un carcinoma neuroendócrino de células pequeñas, variante células grandes, en el que resalta la negatividad de aquellas con mayor atipia y pleomorfismo, mientras que en el resto del tumor el marcaje es similar al de los carcinoides típicos. En el panel de la derecha se ejemplifica la recurrente negatividad que demuestran las metástasis de los carcinomas epidermoides primarios de pulmón.

Posterior al análisis microscópico se procedió a la evaluación estadística de los resultados obtenidos, encontrando que existe significancia estadística en escenarios particulares, como al evaluar la expresión nuclear de PRL tanto en epitelio pulmonar de casos sin neoplasia como en aquellos con tumor, la cual se encuentra aumentada con mayor frecuencia en la periferia del componente tumoral ($p=0.016$), no siendo así en cuanto al marcaje citoplásmico ($p=0.601$). Respecto al resto del microambiente, cabe destacar el caso de los linfocitos, en quienes inicialmente consideramos encontraríamos expresión diferencial entre los grupos, sin embargo esto no es así, si bien a mayor infiltrado inflamatorio es más evidente la marca, esta no constituye un factor estadísticamente relevante en el análisis, ya que la inmunotinción es constante a lo largo de los diferentes tipos de tumores involucrados en el protocolo, así como en las entidades no neoplásicas y en el parénquima sano (Figura 19). Identificamos otros tipos celulares productores de

prolactina, como el endotelio, el mesotelio, el componente cartilaginoso y los fibroblastos activados, sin embargo, debido a que estos se encuentran de manera esporádica, no fueron incluidos en el estudio estadístico.

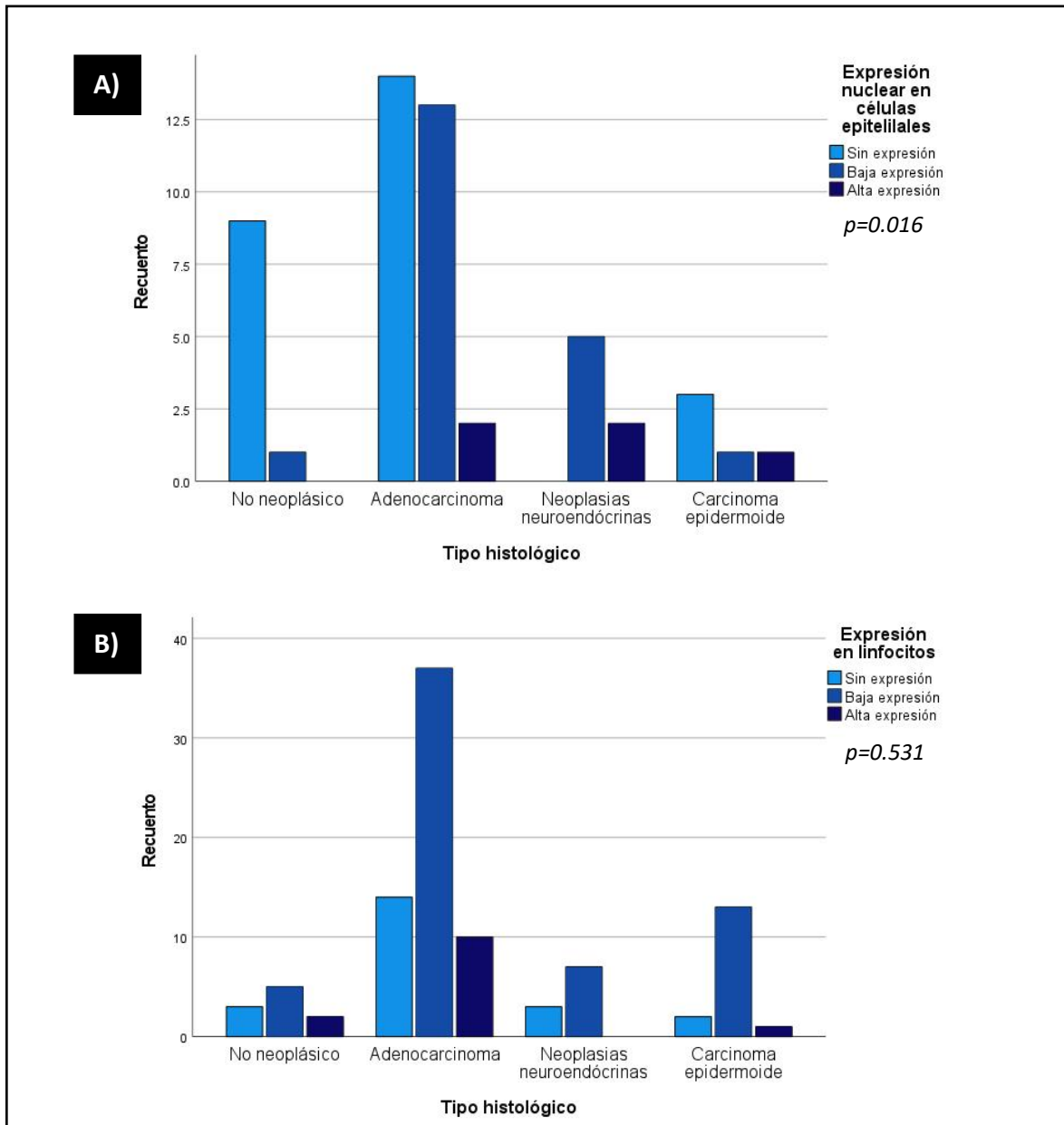


Figura 19. A) Análisis comparativo de la expresión de prolactina en los núcleos del epitelio respiratorio correspondiente a casos con tumor y sin tumor ($p=0.016$). **B)** Estudio de los linfocitos acompañantes en los mismos grupos de estudio ($p=0.531$).

Posteriormente, al realizar comparaciones internas entre el grupo de los adenocarcinomas (Figura 20) logramos demostrar que existe una por mucho mayor marca nuclear, de PRL, en las células neoplásicas del subgrupo correspondiente al Grado 2, al compararlas con aquellos casos de mejor diferenciación y mejor comportamiento biológico (Grado 1) que con su contraparte biológicamente más agresiva (Grado 3), con una $p=0.027$; de igual manera, se identifica el patrón similar al evaluar el inmunomarcaje citoplásmico ($p=0.076$).

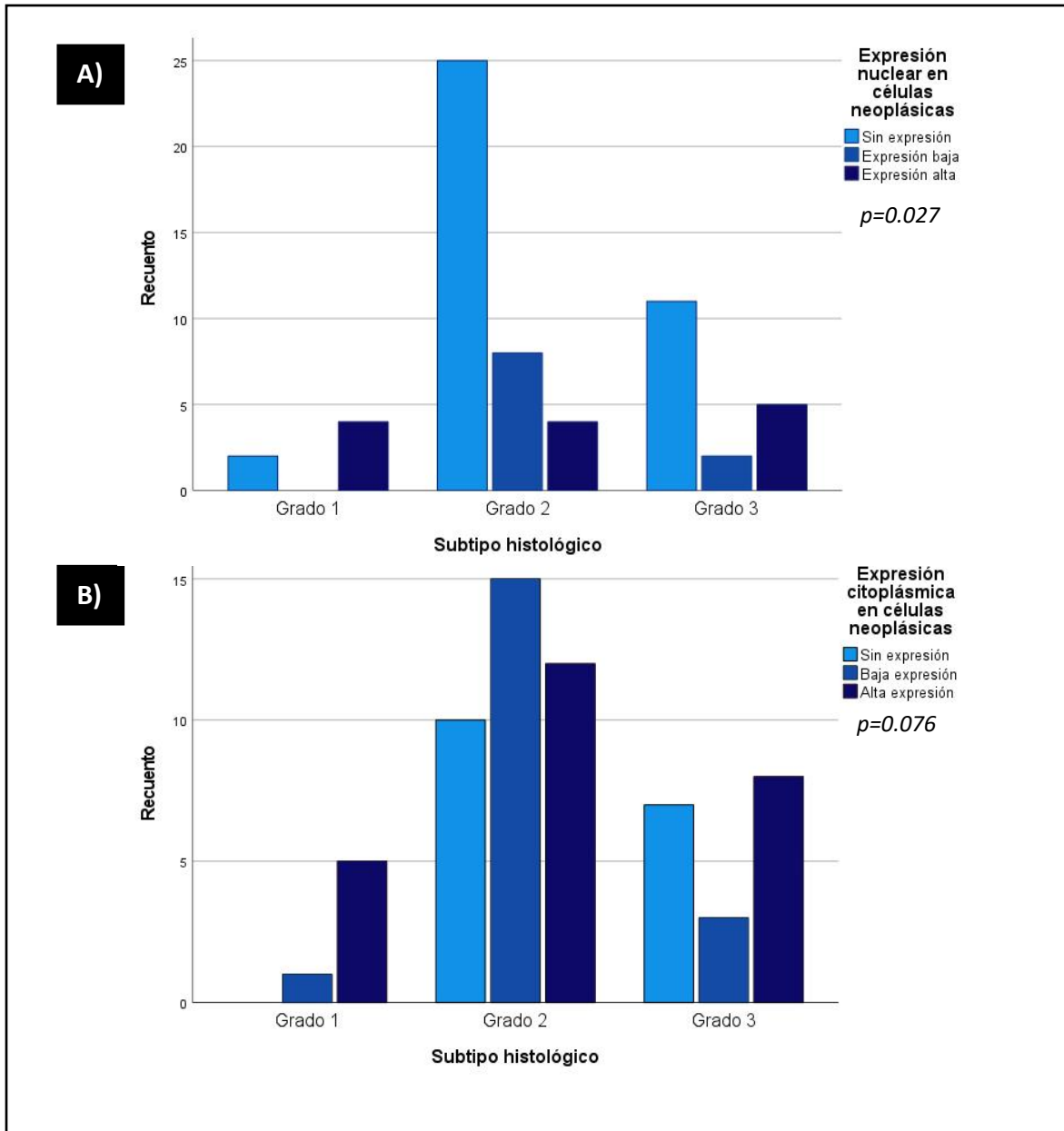


Figura 20. A) Expresión diferencial de marca nuclear de PRL entre los subgrupos histológicos del adenocarcinoma primario de pulmón. **B)** Expresión citoplásmica en la misma muestra.

Respecto a las metástasis (Figura 21), es sumamente interesante observar el importante grado de significancia estadística que existe entre la positividad citoplásmica de las células neoplásicas cuando estas se encuentran en su sitio primario a cuando ya han dado metástasis a ganglio o tejidos blandos ($p < 0.001$), siendo esta por mucho menor en los últimos casos, y presentando un comportamiento similar al momento de evaluar linfocitos ($p = 0.007$), en ambos escenarios biológicos.

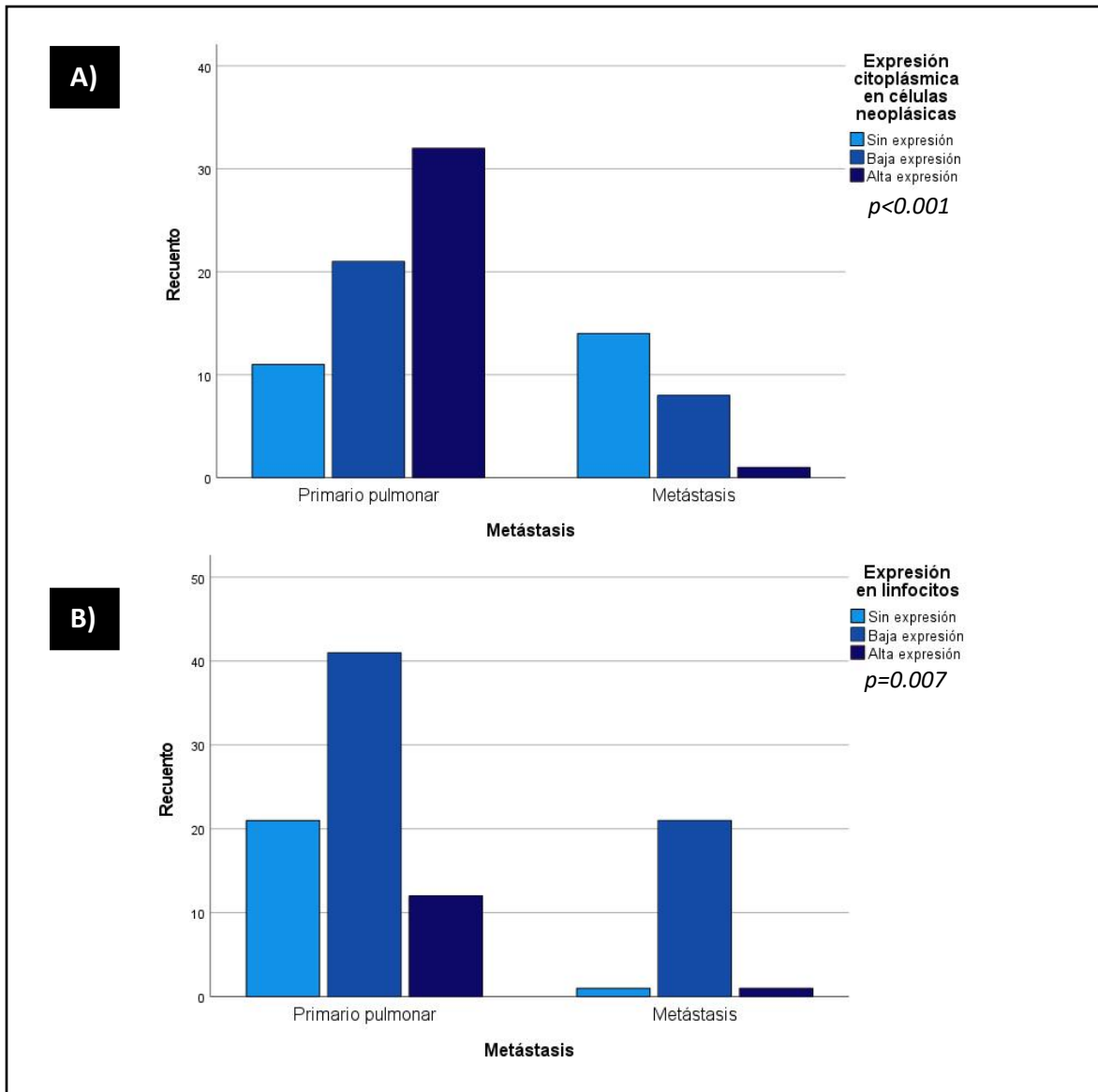


Figura 21. A) Comparación entre la positividad nuclear de PRL en las células neoplásicas ubicadas en pulmón vs en las metástasis. **B)** Evaluación del componente linfocitario en los mismos grupos de estudios y con la misma prueba.

Entre los hallazgos en los que no pudimos documentar significancia estadística se encuentra la comparación de marca entre los distintos tipos de neoplasias ($p=0.140$ en núcleo y $p=0.488$ en citoplasma), sin embargo, logramos corroborar la hipótesis inicial, en la cual aseveramos que existe producción de PRL en las células neoplásicas de origen epitelial, independientemente de la clasificación histológica a la que pertenecen (Figura 22).

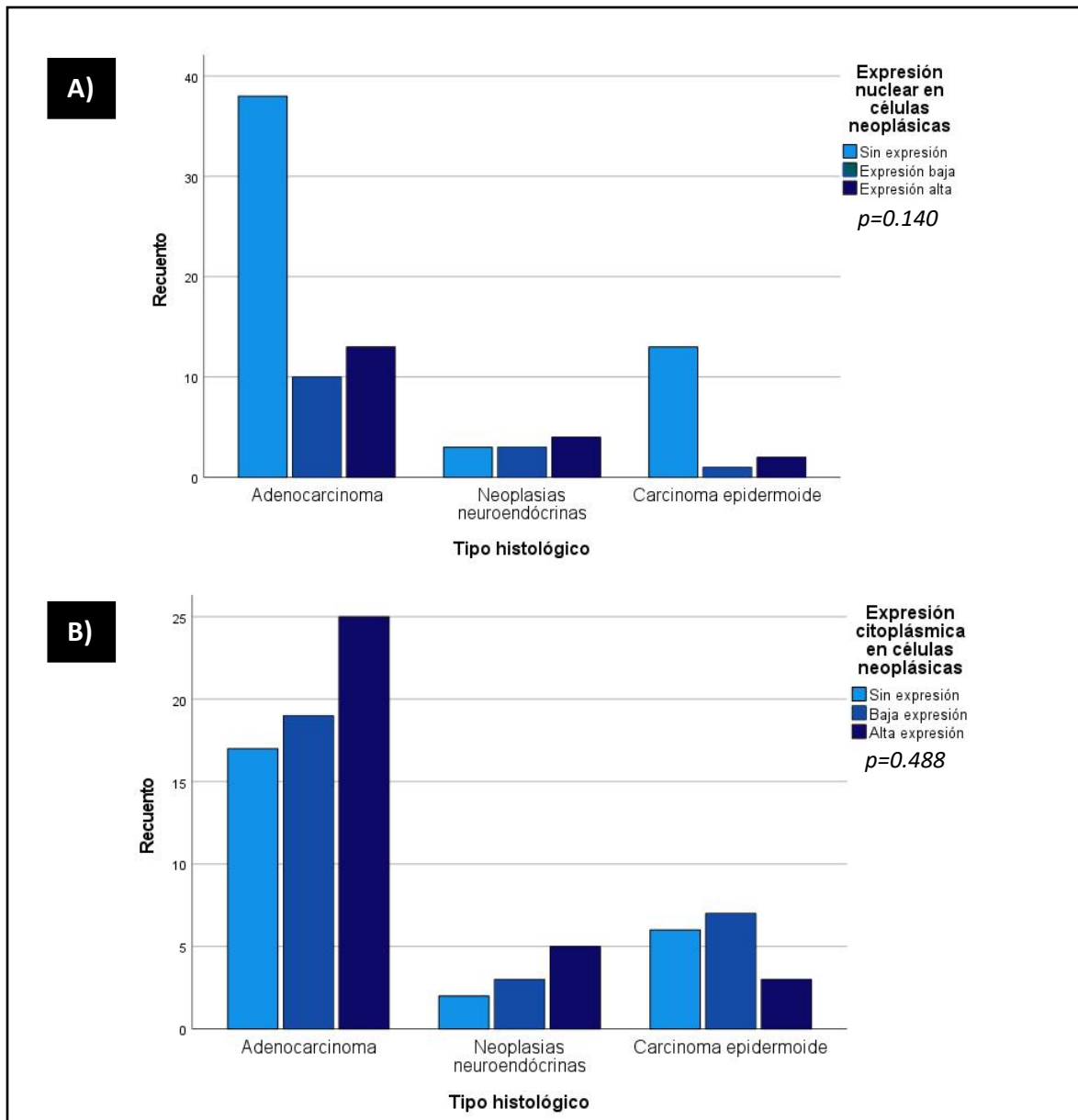


Figura 22. A y B) Expresión tanto nuclear como citoplásmica en los diferentes tipos histológicos de neoplasias primarias pulmonares.

9. DISCUSIÓN:

Los ensayos realizados en el modelo celular confirman la hipótesis inicial en la cual proponemos que el epitelio respiratorio es tan capaz de responder biológicamente a la interacción con la prolactina, y si bien no hemos caracterizado las vías de señalización por lo cual esto ocurre, si logramos identificar que la PRL es capaz de inducir eficientemente la producción de al menos algunas proteínas que en años recientes se han asociado a actividad pro oncogénica, como lo son la proteína surfactante D y la catelicidina LL 37; además paralelamente suprime la presencia de proteína surfactante A, que actualmente es considerada como un factor protector de la progresión tumoral. Si bien los estudios que realizamos, con los cultivos de la línea A549, son contundentes al demostrar lo dilucidado, se encuentran importantemente limitados debido al breve periodo de vida media de la prolactina, lo cual es evidente ya que en nuestros resultados se aprecia como la actividad biológica inducida es prominente al corto plazo, pero se ve completamente abolida en cuestión de horas, sin embargo otro obstáculo a vencer es el del preponderante pleiotropismo de la prolactina para diferentes receptores distintos al propio. Consideramos que el siguiente paso a realizar es el de establecer un modelo animal oncológico en el que en distintos grupos de estudio se pueda demostrar si la administración de PRL o la supresión de RPRL derivan en desenlaces clínicos distintos al de la historia natural de la enfermedad.

Los estudios de caracterización proteica empleados en el modelo animal implementado para el desarrollo del presente protocolo confirman que tanto la prolactina como su receptor se expresan en células del epitelio respiratorio y que interesantemente representa un proceso independiente al de la regulación de PRL sérica, ya que esta última varía en su concentración gracias al ciclo circadiano, mientras que en pulmón se caracteriza por ser producida a niveles bajos, constantes y con la misma concentración a lo largo del tiempo; pero no solamente eso, sino que a nivel pulmonar se genera una isoforma de aproximadamente 30 kDa que no había sido descrita dentro de las variantes estudiadas de la prolactina, planteando así nuevos cuestionamientos sobre la función que esta pueda desempeñar, ya que una estructura diferente pudiese corresponder a la interacción con

receptores aún no identificados en estos diversos procesos biológicos en los que la prolactina se encuentra inmersa.

Los resultados obtenidos mediante los estudios de inmunohistoquímica son sumamente interesantes, ya que no solo reafirman la presencia de PRL y su receptor en el citoplasma del epitelio alveolar sano, sino que también observamos como, en comparación, tanto la intensidad, como el porcentaje y la localización de la misma es sumamente divergente cuando analizamos dicha reacción en neoplasias malignas primarias del pulmón, siendo generalmente mucho mayor a la estandarizada como línea basal normal, entre los hallazgos destacables queremos resaltar que el marcaje del citoplasma es a creces superior independientemente del subtipo histológico analizado, en algunos casos los núcleos son positivos (reafirmando así la idea de que la PRL probablemente funge como factor de transcripción) y que los tejidos no neoplásicos presentan mayor intensidad de marca (respecto a los controles sanos), que seguramente corresponde a un efecto reactivo ante el daño nocivo al que están sometidos, hallazgo que se repite en aquellos casos estudiados que no corresponden a neoplasias, como por ejemplo COVID-19, neumoconiosis, granulomatosis con poliangitis, entre otros.

Es importante mencionar la heterogeneidad de estos resultados dentro de los mismos subtipos histológicos de las neoplasias, teniendo mayoritariamente casos con gran intensidad de marca, así como también algunos con baja o nula expresión, pero en los que invariablemente el tejido circundante al tumor es positivo para PRL.

Posteriormente, al realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos, el primer punto a establecer es si el microambiente juega un rol en la expresión de prolactina, los resultados demostraron fehacientemente que la positividad nuclear en el epitelio respiratorio se ve considerablemente aumentada cuando este se encuentra en relación a neoplasias, siendo los linfocitos el caso contrario, ya que su marca es consistente a lo largo de todos los casos estudiados. Esto puede deberse a la respuesta biológica ejercida por la prolactina en los neumocitos, como fue demostrado en el modelo celular, ya que está bien establecida la autorregulación tanto autócrina como parácrina de la prolactina en los

epitelios, generándose así un ciclo de retroalimentación positiva tumor-microambiente, con un desenlace o intención biológica que aún desconocemos pero que es relevante explorar, ya que dependiendo de que eje sea el dominante en dicho juego de estímulo-respuesta, se pueden desarrollar nuevos modelos de estudio para determinar si es conveniente disrumpir o sobre estimular el ciclo hormonal, en pro de reducir la progresión neoplásica.

Como fue comentado desde un inicio nuestro principal grupo de interés se centra en los adenocarcinomas pulmonares, es por ello que el análisis estadístico estuvo enfocado a determinar si existen diferencias de positividad inmunohistoquímica entre los distintos grados de agresividad en los que se clasifica este amplio grupo de tumores; Al momento de graficar y evaluar los resultados observamos como el grupo 2 (con moderada diferenciación y agresividad intermedia) es el que presenta mayor marca citoplásmica intensa y menor nuclear, lo cual es un hallazgo que suele ser consistente entre muchas de las moléculas estudiadas en las neoplasias, ya que al encontrarse en un punto medio de diferenciación es más probable que retenga vías biológicas no sobreexpresadas en neoplasias bien diferenciadas, ni perderlas como en aquellas que vagamente recuerdan su tejido de origen.

Unos de los resultados más interesantes que arrojó el presente protocolo es aquel correspondiente al análisis comparativo entre las metástasis y el primario pulmonar, particularmente al gradificar la inmunotinción citoplásmica de prolactina, ya que esta disminuye drásticamente al mover a la neoplasia de su sitio de origen, y aún teniendo en consideración que los linfocitos ganglionares han sido ampliamente caracterizados como mediadores inmunes que utilizan las vías de la PRL; lo anterior puede tener explicación al incluir a la fórmula el hecho de que, in vitro, hemos evidenciado que el epitelio respiratorio es un potente regulador de vías oncogénicas tumorales y a que in vivo demuestra una remarcable producción de prolactina citoplásmica, hecho que no ocurre con las células linfoides. Por tanto, la metástasis podría encontrarse parcialmente aislada del ciclo regulador parácrino de la prolactina al no encontrarse adyacente al microambiente que la produce y en consecuencia exhibir menor producción de la hormona en cuestión, lo cual merece determinar si representa un factor pronóstico de interés médico.

10. CONCLUSIONES:

Tanto la bibliografía, como los ensayos realizados en este protocolo nos confirman la hipótesis de la cual partimos, que la prolactina y su receptor, forman parte relevante en la fisiopatología de las neoplasias pulmonares malignas y poseen un potencial, aún a determinar diagnóstico, pronóstico y tratamiento de dichas enfermedades.

Una de los mayores factores que limitan el avance del conocimiento en este campo en particular es el pleiotropismo de la prolactina y la facilidad con la que otras moléculas se acoplan a su receptor, generando una cantidad, aún innumerable, de vías de señalización, rutas metabólicas y diversos efectos bioquímicos en múltiples sistemas, tejidos, células y por tanto... En procesos patológicos diversos, siendo las neoplasias aquellas con mayor complejidad biológica, esto propone un desafío importante para quienes estamos interesados en dilucidar si esta hormona juega un papel a favor, en contra o factor-dependiente, en la oncogénesis y progresión de los tumores malignos primarios de pulmón.

Pese a que los ensayos in vitro, animales y en humanos, descritos en las páginas previas, orientan a considerar a la prolactina como un factor oncogénico, es vital realizar más estudios que incluyan en su análisis estadístico las variables clínicas y patológicas de cada uno de los pacientes, así como otros factores involucrados que son de importancia para cada paciente, como tratamientos previos, la medición sérica de la PRL y la caracterización de las isoformas que interactúan en cada caso. Sin duda alguna se requiere una mayor cantidad de futuros estudios, que cada vez escalen en su complejidad, desde ensayos con tejido en fresco hasta modelos animales, y posteriormente humanos, en los que se bloqueen las vías de la PRL, o se administre en forma recombinante.

En la presente tesis no solo defendemos, caracterizamos y aseveramos un evento biológico sin descripción previa, sino que abrimos la puerta a una nueva área de estudio que continúa no solo con el objetivo de saciar la curiosidad científica, sino direccionado a buscar opciones que contribuyan a mejorar la calidad de vida de las personas y familiar aquejadas por el cáncer de pulmón, sin duda una entidad sofocante para el tejido social.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Diet, nutrition, physical activity and cancer: a global perspective. Continuous update project expert report. Recuperado el día 17 de octubre de 2021 en: dietandcancerreport.org
2. Rascón-Pacheco RA, González-León M, Arroyave-Loaiza MG, Borja-Aburto VH. Incidencia, mortalidad y costos de la atención por cáncer de pulmón en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud Publica Mex.* 2019;61:257-264. <https://doi.org/10.21149/9808>
3. Bironzo P, Di Maio M. A review of guidelines for lung cancer. *J Thorac Dis.* 2018;10(Suppl 13):S1556-S1563. doi:10.21037/jtd.2018.03.54
4. Inamura K. (2017). Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Frontiers in oncology*, 7, 193. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00193>
5. Ignacak, A., Kasztelnik, M., Sliwa, T., Korbut, R. A., Rajda, K., & Guzik, T. J. (2012). Prolactin--not only lactotrophin. A "new" view of the "old" hormone. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 63(5), 435–443.
6. Bernard, V., Young, J., Chanson, P., & Binart, N. (2015). New insights in prolactin: pathological implications. *Nature reviews. Endocrinology*, 11(5), 265–275. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.36>
7. Irun R. Cohen, N.S. Abel Lajtha, Rodolfo Paoletti, John D. Lambris. Recent Advances In Prolactin Research. *Advances In Experimental Medicine And Biology*. Volume 846, 2015.
8. Méndez Isabel, et al. La PRL en el Sistema Inmunológico: Aspectos de Síntesis y Efectos Biológicos. *Revista de Investigación Clínica – INCMNYS*, Vol 57, No.3. 2005.
9. Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological reviews*, 80(4), 1523–1631. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1523>
10. Pereira Suarez, A. L., López-Rincón, G., Martínez Neri, P. A., & Estrada-Chávez, C. (2015). Prolactin in inflammatory response. *Advances in experimental medicine and biology*, 846, 243–264. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12114-7_11

11. Brand, J. M., Frohn, C., Cziupka, K., Brockmann, C., Kirchner, H., & Luhm, J. (2004). Prolactin triggers pro-inflammatory immune responses in peripheral immune cells. *European cytokine network*, 15(2), 99–104.
12. Shemanko C. S. (2016). Prolactin receptor in breast cancer: marker for metastatic risk. *Journal of molecular endocrinology*, 57(4), R153–R165. <https://doi.org/10.1530/JME-16-0150>
13. Ali, S., & Ali, S. (1998). Prolactin receptor regulates Stat5 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation by two separate pathways. *The Journal of biological chemistry*, 273(13), 7709–7716. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.13.7709>
14. Sethi, B. K., Chanukya, G. V., & Nagesh, V. S. (2012). Prolactin and cancer: Has the orphan finally found a home?. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 16(Suppl 2), S195–S198. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.104038>
15. Recchione, C., Galante, E., Secreto, G., Cavalleri, A., & Dati, V. (1983). Abnormal serum hormone levels in lung cancer. *Tumori*, 69(4), 293–298.
16. Le Bescont, A., Vitte, A. L., Debernardi, A., Curtet, S., Buchou, T., Vayr, J., de Reyniès, A., Ito, A., Guardiola, P., Brambilla, C., Yoshida, M., Brambilla, E., Rousseaux, S., & Khochbin, S. (2015). Receptor-Independent Ectopic Activity of Prolactin Predicts Aggressive Lung Tumors and Indicates HDACi-Based Therapeutic Strategies. *Antioxidants & redox signaling*, 23(1), 1–14. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5581>
17. Fang, R., Zhu, Y., Khadka, V. S., Zhang, F., Jiang, B., & Deng, Y. (2018). The Evaluation of Serum Biomarkers for Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) Diagnosis. *Frontiers in physiology*, 9, 1710. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01710>
18. Genevisible. Prolactin in Top 10 Cancers. Recuperado el día 17 de octubre de 2021 en: <https://genevisible.com/cancers/HS/UniProt/P01236> (2019)
19. STRING Consortium: functional protein associations network. Recuperado el día 17 de octubre de 2021 en: <https://string-db.org/cgi/network?taskId=bfEnPyQzyGqO&sessionId=bDAmhIxM3rgw>
20. American Type Culture Collection (ATCC), A549 / CCL-185, 2021. Recuperado el día 17 de octubre de 2021 en: <https://www.atcc.org/products/ccl-185>
21. Urbaniak, A., Jablonska, K., Podhorska-Okolow, M., Ugorski, M., & Dziegiel, P. (2018). Prolactin-induced protein (PIP)-characterization and role in breast cancer progression. *American journal of cancer research*, 8(11), 2150–2164.

22. Mitsuhashi, A., Goto, H., Kuramoto, T., Tabata, S., Yukishige, S., Abe, S., Hanibuchi, M., Kakiuchi, S., Saijo, A., Aono, Y., Uehara, H., Yano, S., Ledford, J. G., Sone, S., & Nishioka, Y. (2013). Surfactant protein A suppresses lung cancer progression by regulating the polarization of tumor-associated macrophages. *The American journal of pathology*, 182(5), 1843–1853. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.030>
23. Hasegawa, Y., Takahashi, M., Ariki, S., Asakawa, D., Tajiri, M., Wada, Y., Yamaguchi, Y., Nishitani, C., Takamiya, R., Saito, A., Uehara, Y., Hashimoto, J., Kurimura, Y., Takahashi, H., & Kuroki, Y. (2015). Surfactant protein D suppresses lung cancer progression by downregulation of epidermal growth factor signaling. *Oncogene*, 34(7), 838–845. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.20>
24. Li, D., Beisswenger, C., Herr, C., Schmid, R. M., Gallo, R. L., Han, G., Zakharkina, T., & Bals, R. (2014). Expression of the antimicrobial peptide cathelicidin in myeloid cells is required for lung tumor growth. *Oncogene*, 33(21), 2709–2716. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.248>
25. Piktel, E., Niemirowicz, K., Wnorowska, U., Wątek, M., Wollny, T., Głuszek, K., Gózdź, S., Levental, I., & Bucki, R. (2016). The Role of Cathelicidin LL-37 in Cancer Development. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 64(1), 33–46. <https://doi.org/10.1007/s00005-015-0359-5>
26. Betz, C., Papadopoulos, T., Buchwald, J., Dämmrich, J., & Müller-Hermelink, H. K. (1995). Surfactant protein gene expression in metastatic and micrometastatic pulmonary adenocarcinomas and other non-small cell lung carcinomas: detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer research*, 55(19), 4283–4286.