

Tesis Doctoral

# Modificación de perfiles de expresión en el sistema nervioso central, en respuesta a enfermedades en la periferia

Salibe, Mariano César

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Salibe, Mariano César. (2010). Modificación de perfiles de expresión en el sistema nervioso central, en respuesta a enfermedades en la periferia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Salibe, Mariano César. "Modificación de perfiles de expresión en el sistema nervioso central, en respuesta a enfermedades en la periferia". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Modificación de perfiles de expresión en el sistema nervioso central, en respuesta a enfermedades en la periferia**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**Mariano César Salibe**

Directores de tesis: Dr. Osvaldo L. Podhajcer  
Dr. Fernando J. Pitossi

Consejero de Estudios: Dr. Omar Coso

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir

Buenos Aires, 2010

## **Modificación de perfiles de expresión en el sistema nervioso central, en respuesta a enfermedades en la periferia**

### **Resumen**

Una de las principales funciones del sistema nervioso es el mantenimiento de la homeostasis, detectando y reaccionando frente a señales que superan un determinado umbral. El cerebro es capaz de detectar eventos inmunes en la periferia ya sea a través de compuestos solubles o a través del nervio vago y de reaccionar mediante la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, modulando la respuesta inmune.

La progresión tumoral se caracteriza por una interacción con el sistema inmune y por poseer una alta tasa de mutaciones. El período comprendido entre el inicio y de un tumor, y la detección clínica, puede ser de entre 10 y 15 años. Durante este tiempo cada una de las mutaciones podría convertirse en una señal de alarma. En la actualidad ha sido demostrado que la presencia de un tumor en la periferia induce cambios en el metabolismo de neurotransmisores en el cerebro, sin embargo se desconoce si a su vez existen cambios a nivel transcripcional. En esta Tesis se demostró mediante la utilización de la tecnología de microarreglos en tres modelos tumorales, que la presencia de células tumorales en crecimiento en la periferia induce cambios en los niveles de expresión de determinados grupos de genes en el cerebro, pero no en un órgano periférico como el hígado. A su vez se demostró la existencia de cambios en niveles de expresión en el cerebro como consecuencia del desarrollo de artritis reumatoide. Estos cambios fueron específicos para cada tipo de tumor y para cada enfermedad. Estos resultados demuestran que señales periféricas

derivadas del desarrollo de un tumor o de una enfermedad como artritis son capaces de inducir cambios en el perfil de expresión del cerebro.

## **Central nervous system expression profiles changes promoted by peripheral diseases**

### **Abstract**

The main function of the nervous system is to maintain homeostasis by sensing and reacting to signals that reach a certain threshold. For example, the brain can sense immune peripheral events through soluble compounds or the vagus nerve and can react through activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, resulting in the modulation of an ongoing immune response. Cancer progression is characterized by interaction with the immune system and by high mutation rates, with each mutation potentially promoting alarm signals during the 10 to 15 years of cancer development before clinical detection. A peripheral tumor is able to alter the metabolism rate of certain neurotransmitters; however, it is not known whether this can also promote changes in the central nervous system transcriptome. Using genome-wide expression analysis in three mouse tumour models, we showed that a tumor growing at the periphery can indeed promote changes in the expression levels of defined sets of genes in the brain, but not in the liver. An other peripheral disease such as Arthritis also promoted transcriptional changes in the brain. These changes were cancer type and disease type specific, and involved specific signalling pathways. These findings prove that cancer and arthritis-derived signals are effective in eliciting specific changes in gene expression in discrete brain regions.

## **Trabajos publicados durante la realización de esta Tesis**

-MODEL BASED ANALYSIS OF REAL -TIME PCR DATA FROM DNA BINDING DYE PROTOCOLS

Mariano J. Alvarez, Guillermo Vila-Ortiz, Mariano C. Salibe, Osvaldo L. Podhajcer, and Fernando Pitossi. BMC Bioinformatics 2007 8:85

-DISTAL TUMORS ELICIT DISTINCTIVE GENE EXPRESSION CHANGES IN MOUSE BRAIN, DIFFERENT FROM THOSE INDUCED BY ARTHRITIS

Mariano J. Alvarez<sup>&</sup>, Mariano C. Salibe<sup>&</sup>, Gustavo Stolovitzky, Marcelo Rubinstein, Fernando J. Pitossi, Osvaldo L. Podhajcer. The Open Journal of Neuroscience 2009 3.

&: Ambos autores deben ser considerados como primeros autores

## **Agradecimientos**

A Osvaldo y a Fernando por haberme abierto las puertas de sus laboratorios, éstas sirvieron para abrir otras muchas puertas. Por haber confiado en mí para iniciar el proyecto Gentron. Por el apoyo y el respaldo total que siempre me brindaron, especialmente en los momentos laborales más difíciles. Por todas las enseñanzas durante estos años y por último, por la paciencia.

A la Fundación Instituto Leloir por la total disponibilidad brindada sin ningún tipo de restricción para el uso de sus equipamientos, y de la gran cantidad de facilidades con las que ésta cuenta. A Luis Ielpi por su constante apoyo para la realización de esta Tesis.

A Mariano Alvarez, por los buenos momentos mientras fuimos compañeros de laboratorio, y porque su trabajo fue fundamental para poder llevar adelante esta tesis.

A Jorgelina Cassalá por ser una gran compañera de trabajo. Siempre con una actitud positiva y absolutamente dispuesta a ayudar en todo momento. A Ariel Chernomoretz por su gran ayuda en cuestiones estadísticas, y por las correcciones en esta Tesis.

A los 106 y 107 especialmente a Fede Prada, Mariana Berenstein, Amaicha, Andrea, Karina, Helga, Romina, Clarita, Rodolfo, Dieguito, Edgardo, Vero Lopez, Daniela, Cecilia, Cintia, Vero Murta, Mariela, Lorena, Caffé, Santiago, Mariana, Ana, Isabel, Vale y Luciana, porque siempre que lo necesité recibí ayuda en forma incondicional y por haberme brindado un trato que me hizo sentir uno más de sus laboratorios.



A Fabio Fraga por su gran apoyo desde el bioterio, y por sus enseñanzas sobre la pesca.

Al gran grupo de amigos formado durante este tiempo, Leo, Fede, Lachi, Andrés, Cristian y el Cordobés, porque hicieron y hacen que venir a trabajar siempre sea un placer. Por los grandes momentos vividos en el instituto, en las largas noches de cervezas artesanales y en las inolvidables excursiones de pesca.

A todo el personal de mantenimiento y administrativo de la FIL, por prestarme y enseñarme a usar las herramientas, a Walter y a Cristian por la ayuda con la que conté y contaré mientras esté en FIL y a “todos biblioteca” porque han logrado que trabajar en ese lugar sea un lujo.

A Fer, Claudio, Marie y Any grandes amigos de la vida

A toda mi familia. A mis viejos, porque gracias al esfuerzo de toda su vida me dieron la posibilidad de elegir “que” ser. A mis hermanos Damián, Leandro y Pato, a mis cuñaditas, la rusa Iana, Nuria y Vale, y a Galito, porque “siempre están”. A Alma, porque a los noventa y cinco sigue siendo ejemplo de optimismo y fortaleza. A mi familia por elección, Juanita, Edgardo, Leandro (el “chiqui”) y Estela, por haberme adoptado como uno más.

A Julieta, Tomás, Guido y...¿Bruno o Lola?. Después de mucho pensar me da cuenta que no tengo la capacidad de poner en palabras todo lo que significan para mí.

## **Indice**

<b>Introducción</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>1. Homeostasis y comunicación entre los sistema nervioso, inmune y endocrino.</b> .....	<b>- 2 -</b>
1.1 Evidencias de comunicación entre el sistema nervioso central y el sistema inmune. ....	- 3 -
1.2 Comunicación desde el sistema nervioso hacia la periferia: .....	- 5 -
1.2.1 Vías de comunicación .....	- 5 -
Sistema nervioso autónomo: .....	- 6 -
Sistema neuroendócrino: .....	- 8 -
1.3 Comunicación desde la periferia hacia el sistema nervioso central: .....	- 9 -
1.3.1 Citoquinas como mensajeras desde la periferia hacia el sistema nervioso central. ....	- 10 -
Efectos de las citoquinas sobre el sistema nervioso. ....	- 11 -
1.3.2 Vías de comunicación desde el sistema inmune hacia el sistema nervioso central. ....	- 12 -
<b>2. Estrés</b> .....	<b>- 16 -</b>
2.1 Factores psicológicos y ambientales .....	- 17 -
2.1.1 Estrés psicosocial: .....	- 17 -
Efectos sobre el organismo .....	- 17 -
2.2 Estímulos internos: .....	- 18 -
2.2.1 El cáncer como estímulo interno de estrés: .....	- 18 -
<b>3 Relación cáncer-sistema inmune-sistema nervioso central:</b> .....	<b>- 19 -</b>
3.1. Relación cáncer - sistema inmune: .....	- 19 -
3.2 Relación cáncer- sistema nervioso central: .....	- 21 -
<b>Objetivo general</b> .....	<b>- 27 -</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>- 30 -</b>
<b>1.Líneas celulares:</b> .....	<b>- 31 -</b>
<b>2. Estudios <i>in vivo</i>:</b> .....	<b>- 31 -</b>
2.1 Modelos tumorales: .....	- 31 -
2.2 Modelos de artritis reumatoide: .....	- 32 -
<b>3. Determinación de niveles de neurotransmisores mediante HPLC ...</b> - 32 -	
3.1 Procesamiento de las muestras para HPLC .....	- 32 -
3.2 Análisis por HPLC .....	- 33 -
<b>4. Extracción de ARN:</b> .....	<b>- 33 -</b>
4.1 Extracción de ARN de muestras de cerebro .....	- 33 -
<b>5. Ensayos de microarreglos de ADN</b> .....	<b>- 34 -</b>
5.1 Obtención de sondas de c-DNA fluorescentes .....	- 34 -
5.2 Fabricación de los microarreglos .....	- 35 -
5.3 Pre-hibridación, hibridación y lavado de los microarreglos: .....	- 36 -
<b>6. Análisis de datos:</b> .....	<b>- 37 -</b>
6.1 Adquisición de datos y procesamiento de las imágenes .....	- 37 -
6.2 Filtrado y normalización de los datos: .....	- 37 -
6.3 Análisis de réplicas biológicas .....	- 38 -
6.4 Integración de datos entre réplicas de microarreglos, y generación de una matriz de expresión .....	- 39 -
6.5 Método de análisis jerárquico .....	- 39 -
6.6 Validación cruzada por el método de "Leave-one-out" (LOO) y análisis multivariado ("ROC-score" análisis) .....	- 39 -
6.7 Análisis funcional .....	- 41 -
6.7.1 Análisis funcional de los genes líderes (leading edge genes) .....	- 42 -

<b>7. Experimentos conductuales:</b> .....	<b>- 43 -</b>
7.1 <i>Ensayo de desplazamiento de leca</i> .....	- 43 -
7.2 <i>Ensayos de nado forzado (forced swimming test)</i> .....	- 43 -
<b>Capítulo 1</b> .....	<b>- 44 -</b>
<b>1.1 Objetivos específicos</b> .....	<b>- 45 -</b>
<b>1.2 Resultados</b> .....	<b>- 45 -</b>
1.2.1 <b>Establecimiento de cambios a nivel de neurotransmisores.</b> .....	- 45 -
1.2.2 <b>Estudios transcripcionales mediante el uso de microarreglos</b> .....	- 48 -
1.2.2.a <b>Diseño experimental.</b> .....	- 48 -
1.2.2.b. <b>Identificación de genes diferenciales.</b> .....	- 54 -
1.2.3 <b>Correlación entre los diferentes modelos tumorales</b> .....	- 57 -
1.2.4 <b>Estudios en el tiempo</b> .....	- 58 -
1.2.5 <b>Corrección por comparaciones múltiples</b> .....	- 61 -
1.2.6 <b>Validación por PCR en tiempo real</b> .....	- 63 -
1.2.7 <b>Análisis funcional de los genes validados</b> .....	- 65 -
1.2.8 <b>Estudios en un órgano periférico.</b> .....	- 66 -
<b>1.3 Conclusiones</b> .....	<b>- 68 -</b>
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>- 70 -</b>
<b>2.1 Microarreglos: Métodos locales y globales.</b> .....	<b>- 71 -</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>- 72 -</b>
<b>2.3 Resultados</b> .....	<b>- 72 -</b>
2.3.1 <b>Estudios funcionales</b> .....	- 72 -
2.3.2 <b>Análisis de la expresión de genes no presentes en el microarreglo relacionados con comportamiento de respuesta a la enfermedad.</b> .....	- 87 -
2.3.3 <b>Estudios de comportamiento</b> .....	- 99 -
2.3.4. <b>Identificación de firmas moleculares específicas para cada modelo tumoral.</b> .....	- 100 -
<b>Concepto de firma molecular.</b> .....	- 100 -
<b>Utilización de las firmas moleculares.</b> .....	- 101 -
<b>Determinación de existencia de firmas moleculares.</b> .....	- 104 -
<b>2.4 Conclusiones:</b> .....	<b>- 107 -</b>
<b>Capítulo 3</b> .....	<b>- 109 -</b>
<b>3.1 Objetivos específicos</b> .....	<b>- 110 -</b>
<b>3.2 Estudios con modelos animales de artritis reumatoide:</b> .....	<b>- 110 -</b>
<b>Artritis reumatoide.</b> .....	- 110 -
<b>3.3.1 Diseño experimental:</b> .....	- 111 -
<b>3.3.2 Resultados:</b> .....	- 112 -
<b>3.3.2.a Detección de genes diferenciales.</b> .....	- 112 -
<b>3.3.2.b. Estudios funcionales.</b> .....	- 113 -
<b>3.3.2.c. Estudios de agrupamiento.</b> .....	- 116 -
<b>3.3 Conclusiones:</b> .....	<b>- 121 -</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>- 122 -</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>- 136 -</b>



*A Tomás, Guido y Julieta*

# **Introducción**

## **1. Homeostasis y comunicación entre los sistema nervioso, inmune y endocrino.**

La homeostasis en los animales superiores esta regulada por tres sistemas interrelacionados, el sistema nervioso, el sistema inmune y el sistema endocrino. En la actualidad es aceptado que la comunicación existente entre estos tres sistemas permite que el sistema nervioso central reciba información de la periferia y frente a estímulos que superan un determinado umbral reaccione para mantener la homeostasis del organismo. Durante las últimas décadas se han acumulado evidencias mostrando que alteraciones en la interacción entre estos tres sistemas podría ser la base que involucra al sistema nervioso central con la etiología de enfermedades tales como artritis, diabetes mellitus, etc.(Razavi, Chan et al. 2006; Tracey 2007).

El concepto de la comunicación entre el sistema nervioso y la periferia tiene antecedentes muy remotos. En occidente, en el siglo II Galeno notó que el cáncer parecía ocurrir con más frecuencia en mujeres “*melancólicas*” (deprimidas) que en mujeres “*sanguíneas*” (con espíritu alegre). En el mundo oriental, cuerpo y mente han sido considerados casi indivisibles por siglos, hasta la actualidad. Comparado con esto se puede considerar que el interés del ámbito científico por la conexión entre cuerpo y mente es reciente. (Besedovsky and Rey 2007)

Si bien el sistema inmune fue durante mucho tiempo considerado como un sistema autónomo, durante los últimos 35 años ha surgido dentro de la investigación un campo denominado “*Psiconeuroinmunología*” que produjo un cambio notable en esta visión. El término Psiconeuroinmunología fue introducido por Robert Ader en el año 1980 durante la reunión de la Asociación



Psicosomática Americana (American Psychosomatic Society), definiendo un área de la ciencia dedicada al estudio de la comunicación entre el sistema nervioso y el sistema inmune. En este período de tiempo, los trabajos en esta área han revelado la existencia de una red de comunicación entre los sistemas nervioso, inmune y endócrino. Esta red permite que los procesos inmunes estén regulados por los sistemas nervioso y endocrino, y en forma recíproca, el sistema endocrino y el nervioso sean influenciados por el sistema inmune (Daruna 2004).

En la actualidad está claro que la base de esta comunicación está en el lenguaje común existente entre los sistemas. Las evidencias experimentales acumuladas hasta la actualidad, indican que, a) las células del sistema inmune, endócrino y nervioso central, expresan receptores para citoquinas, hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos; b) Productos de origen inmune o neuroendócrino, coexisten en tejidos linfoides, endócrinos y neurales; c) mediadores endócrinos y neurales pueden afectar el sistema inmune y d) mediadores inmunes puede afectar al sistema endócrino y al sistema nervioso (Besedovsky and del Rey 1996)

### **1.1 Evidencias de comunicación entre el sistema nervioso central y el sistema inmune.**

A fines de los años 50, Szentivanyi en estudios de lesiones o estimulaciones hipotalámicas y respuesta anafiláctica, demostró que las lesiones hipotalámicas podían prevenir el shock anafiláctico (Szentivanyi and Filipp 1958; Szentivanyi and Szekely 1958). Otro de los pioneros en el área fue Fred Rasmussen, quién llevó a cabo estudios tendientes a demostrar la influencia del estrés emocional en el desarrollo y progresión de enfermedades infecciosas

(Rasmussen, Marsh et al. 1957). En el año 1970 John Hadden y colaboradores proveen fuertes evidencias acerca de la relación entre el sistema nervioso autónomo y el sistema inmune, al demostrar que en linfocitos, la estimulación adrenérgica alfa potenciaba y la beta disminuía, la respuesta linfoproliferativa a un mitógeno (Hadden, Hadden et al. 1970). Finalmente en el año 1975 Robert Ader y Nicholas Cohen proponen la hipótesis de la existencia de la comunicación entre el sistema nervioso central y el sistema inmune a partir de los resultados obtenidos en estudios donde observaron inmunosupresión en un modelo de comportamiento condicionado. En estos estudios, se condicionaron animales dándoles de beber agua con sacarina (estímulo condicionante), e inyectándoles luego un agente inmunosupresor (estímulo no condicionante). Días más tarde se les dio de beber, ya sea agua con sacarina o agua sola, y se los inyectó con un antígeno. Los animales que habían tomado agua con sacarina previo a la inyección tenían menor cantidad de anticuerpos contra el antígeno que los animales que habían consumido agua sola. De esta forma demostraron como el sistema nervioso central podía influir sobre el sistema inmune (Ader and Cohen 1975).

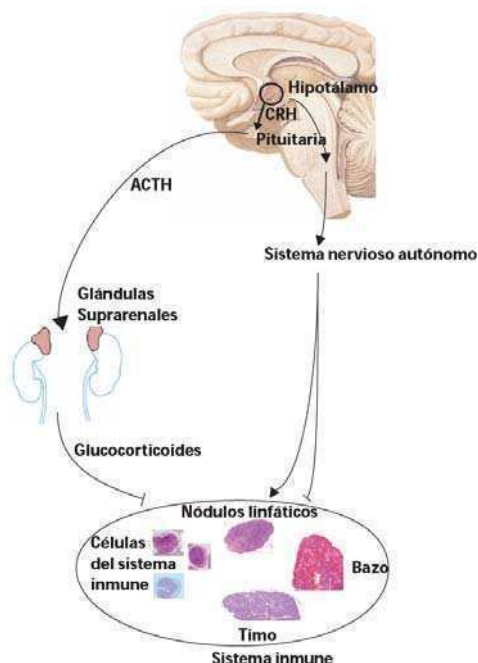
Tradicionalmente, los estudios arriba mencionados habían estado centrados en la influencia del sistema nervioso sobre el sistema inmune. En los años '70 y '80, los trabajos pioneros de Hugo Besedovsky y colaboradores completaron el circuito de comunicación, al centrarse en estudios de la influencia del sistema inmune sobre el sistema nervioso central y cómo el cerebro, a través del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (eje HPA), modulaba al sistema inmune. Estos trabajos dejaron en claro que los procesos inmunes evocaban una activación del sistema endocrino. Esta conexión estaba mediada por el sistema nervioso central y tanto las hormonas clásicas como algunas

citoquinas estaban involucradas en la comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso central (Besedovsky, Sorkin et al. 1975; Besedovsky and Sorkin 1977; Besedovsky, del Rey et al. 1979; Besedovsky, del Rey et al. 1986). En definitiva, estos trabajos demostraron que la información en el organismo podía fluir desde la periferia hacia el sistema nervioso central y que la misma era integrada en el cerebro, lo que resultaba en la modulación de la respuesta inmune a través del sistema endocrino (Besedovsky and Rey 2007)

## 1.2 Comunicación desde el sistema nervioso hacia la periferia:

### 1.2.1 Vías de comunicación

Al menos dos vías comunican al sistema nervioso central con el sistema inmune, el sistema nervioso autónomo y el sistema neuroendocrino (Figura 1). El sistema nervioso autónomo, ejerce una influencia regional sobre el sistema inmune a través de la inervación de órganos linfáticos, mientras que el sistema neuroendocrino ejerce una influencia sistémica sobre el sistema inmune a través de la liberación de glucocorticoides por las glándulas adrenales (Elenkov, Wilder et al. 2000).



**Figura 1: Esquema de las conexiones entre cerebro y sistema inmune.** Se detalla el sistema neuroendócrino, mediante el eje H-P-A (hipotálamo pituitaria adrenal), el sistema nervioso autónomo (SNA) y la vía eferente del nervio vago (NV)

**Sistema nervioso autónomo:**

El sistema nervioso autónomo inerva toda la vasculatura, glándulas, y todos los órganos del cuerpo. Está formado por tres divisiones principales, el simpático, el parasimpático y el sistema nervioso entérico.

Varios órganos del cuerpo reciben inervación tanto simpática como parasimpática, pero es común que en un determinado órgano un tipo de inervación prevalezca sobre la otra. Los órganos linfáticos, así como los vasos sanguíneos reciben predominantemente inervación simpática noradrenérgica y a través del Neuropeptido Y (Elenkov, Wilder et al. 2000).

Una de las funciones principales del sistema nervioso simpático es la de preparar al cuerpo para la acción a través de la respuesta simpático-adrenal o respuesta de pelea o escape (fight or flight response). Frente a un estímulo generador de estrés este sistema aumenta la frecuencia cardíaca, aumenta la liberación de adrenalina, dilata los bronquios, etc (Elenkov, Wilder et al. 2000).

Este sistema influye sobre el sistema inmune en forma regional inervando órganos linfáticos primarios y secundarios. El neurotransmisor principal es la noradrenalina, la cual se une a receptores  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgicos en células del sistema inmune (Elenkov, Wilder et al. 2000).

En células del sistema inmune adaptativo, los efectos de la noradrenalina son mediados por el receptor adrenérgico del tipo  $\beta_2$  (Kohm and Sanders 2001). La estimulación de este receptor está relacionada con la regulación de la hematopoyesis y la maduración de la función inmune (Sanders, Kasprovicz et al. 2003). Como ejemplos, se pueden mencionar la modulación por parte de la NE de la respuesta humoral dependiente de células T (Kruszewska, Felten et al. 1995; Alaniz, Thomas et al. 1999) (Kohm and Sanders

1999) así como la inducción de aumento en la inmunidad de las células Th1 (Alaniz, Thomas et al. 1999).

En cuanto a las células del sistema inmune innato, *in vitro* la noradrenalina induce en células dendríticas y monocitos una disminución en la producción de citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF), y las interleuquinas 1, 6 y 12 (IL-1, IL-6, IL-12) y un aumento en citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 (van der Poll, Jansen et al. 1994; Maestroni and Mazzola 2003). Asimismo, la NE aumenta la migración de las células NK, monocitos y macrófagos, mientras que inhibe la de células dendríticas (Straub, Mayer et al. 2000; Lang, Drell et al. 2003; Maestroni and Mazzola 2003). *In vivo*, si bien es clara la influencia del sistema nervioso simpático sobre el sistema inmune, los datos disponibles en la bibliografía muestran que el sistema nervioso simpático puede tener efectos tanto estimulatorios como inhibitorios sobre el sistema inmune (Sternberg 2006)

En contraposición al sistema simpático, una de las principales funciones del sistema parasimpático es la de mantener al cuerpo en una situación de descanso o relajación, como por ejemplo la disminución de ritmo cardíaco. Los núcleos donde se encuentran los cuerpos neuronales de las fibras preganglionares de este sistema nacen en el encéfalo y en el plexo sacro de la médula espinal. Estas fibras se ramifican en el nervio facial, el nervio vago, y los nervios pélvicos del plexo sacro, siendo el principal neurotransmisor, la acetilcolina. A través del nervio vago, el sistema parasimpático inerva a los aparatos circulatorio, digestivo y génitourinario, además de otros órganos tales como, hígado, riñón, páncreas y tiroides. A través de este nervio el sistema parasimpático influye sobre el sistema inmune (Borovikova, Ivanova et al. 2000). Uno de los avances para la comprensión de los efectos moduladores del

sistema parasimpático sobre el sistema inmune fue la descripción de la llamada “Vía colinérgica antiinflamatoria” (Borovikova, Ivanova et al. 2000). Este trabajo describió por primera vez que la liberación de citoquinas pro inflamatorias en macrófagos, inducida por endotoxinas (Lipopolisacáridos de bacterias gram -), era inhibida por la exposición de los macrófagos a la acetilcolina.

El efecto antiinflamatorio es dependiente de la activación de las vías eferentes del nervio vago. La estimulación tanto eléctrica (Borovikova, Ivanova et al. 2000) como farmacológica (Bernik, Friedman et al. 2002) del nervio vago inhibe la síntesis del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en el hígado, bazo y corazón, y atenúa los efectos de la endotoxemia. Así mismo la vagotomía, (eliminación de la inervación vagal) exagera la respuesta del TNF a la inflamación y deja a los animales mas sensibles a los efectos letales de las endotoxinas (Tracey 2002).

La acetilcolina se une a dos sub-tipos de receptores, los muscarínicos y los nicotínicos. Ambos tipos de receptores son expresados en las células del sistema inmune, pero los efectos antiinflamatorios son dependientes de los receptores muscarínicos  $\alpha$ -7, sub-tipo de receptor mayormente expresado en macrófagos (Wang, Yu et al. 2003).

En resumen, el sistema nervioso autónomo a través de los sistemas simpático y parasimpático, ejerce un control sobre el sistema inmune, el cual es necesario para el mantenimiento de la homeostasis del organismo.

### **Sistema neuroendócrino:**

Este sistema esta formado principalmente por el hipotálamo y la glándula pituitaria. El sistema neuroendocrino, ejerce a través de la pituitaria también una modulación sobre el sistema inmune. Esta modulación es posible debido a

que las células del sistema inmune expresan receptores para hormonas y neuropéptidos (Besedovsky and del Rey 1996).

Una de las principales vías de control neuroendócrino es a través del eje eje HPA. Como consecuencia de un estímulo, ya sea de origen fisiológico (citoquinas), o psicológico, la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) es secretada del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo. Esta a su vez estimula a la pituitaria anterior a secretar a la circulación la hormona adénocorticotrofina (ACTH), la cual estimula a las glándulas suprarrenales a sintetizar y secretar glucocorticoides. Los glucocorticoides que en concentraciones fisiológicas cumplen funciones inmunomoduladoras, pasan a tener un efecto inmunosupresor si su concentración se eleva, por ejemplo debido a estrés (Besedovsky and del Rey 1996).

### **1.3 Comunicación desde la periferia hacia el sistema nervioso central:**

Los datos previos dejan en claro la comunicación existente desde el sistema nervioso central hacia la periferia y la influencia que el sistema nervioso central ejerce especialmente sobre el sistema inmune. De estos datos se podría inferir la existencia de un flujo de información desde la periferia hacia el sistema nervioso central, informando de posibles amenazas a la homeostasis cerrando de esta forma el circuito de comunicación.

A mediados de los años '70 Besedovsky y colaboradores describen por primera vez que la inyección de antígenos evocaba un aumento en los niveles de corticosterona en sangre de animales (Besedovsky, Sorkin et al. 1975). En 1977 Besedovsky y Sorkin aportan la primera evidencia que relaciona al cerebro con la respuesta inmune al demostrar que la inyección de antígenos en la periferia

altera la tasa de disparos en neuronas del núcleo ventromedial del hipotálamo (Besedovsky, Sorkin et al. 1977). En ese mismo año estos autores proponen la hipótesis de la existencia de mecanismos de regulación del sistema inmune por parte de estructuras neuroendocrinas, las cuales a su vez responderían a información generada por células inmunes activadas (Besedovsky and Sorkin 1977). A partir de entonces esta hipótesis comienza a ser validada por trabajos donde se describen aumentos en los niveles de ACTH y corticosterona en la sangre (Besedovsky, del Rey et al. 1981; Besedovsky, Del Rey et al. 1985) y disminución de los niveles de noradrenalina en el hipotálamo (Besedovsky, del Rey et al. 1983) como consecuencia de la inyección de medios condicionados provenientes de linfocitos activados. Estos trabajos sentaron las bases sobre las cuales se apoya el gran conocimiento existente en la actualidad con respecto tanto a las moléculas encargadas de señalar hacia el cerebro, como a los circuitos de comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso central.

### **1.3.1 Citoquinas como mensajeras desde la periferia hacia el sistema nervioso central.**

Las citoquinas son un grupo diverso de polipéptidos que están asociados a la inflamación, activación inmunológica, diferenciación y/o muerte celular. Este grupo incluye interleuquinas (IL), interferones (IFN), factores de necrosis tumoral (TNF), quemoquinas y factores de crecimiento. Tienen diferentes acciones y son rápidamente inducidas en respuesta a daños o infecciones. Han sido clasificadas en pro-inflamatorias o anti-inflamatorias dependiendo del balance de su efecto sobre el sistema inmune (Hopkins and Rothwell 1995; Rothwell and Hopkins 1995; Szelenyi 2001).



Al momento del descubrimiento de que los sobrenadantes de células inmunes evocaban un aumento de ACTH en la sangre, no se sabía exactamente cuales eran los factores presentes en ese sobrenadante responsables de tal efecto, por lo que fueron denominados genéricamente GIF por “Glucorticoid inducing factors” (Besedovsky, Del Rey et al. 1985).

El primer factor identificado con actividad neuroendócrina fue una citoquina, mas precisamente la interleuquina 1 (IL-1). Durante estudios de los efectos neuroendócrinos luego de la inyección en ratones tanto del virus responsable de la enfermedad de New Castle (New Castle disease virus, NDV) propiamente dicho, como de sobrenadantes derivados de co-cultivos de células con el virus, Besedovsky y colaboradores observaron notables incrementos en los niveles de ACTH y corticosterona en la sangre, los cuales eran bloqueados por anticuerpos anti IL-1 (Besedovsky, del Rey et al. 1986). A partir de entonces otras citoquinas, como la interleuquina 6 (IL-6), el TNF- $\alpha$  y el interferón gama (IFN- $\gamma$ ) fueron descriptas como encargadas de llevar información al cerebro sobre eventos inmunes en la periferia (Holsboer, Stalla et al. 1988; Naitoh, Fukata et al. 1988; Sharp, Matta et al. 1989) .

### **Efectos de las citoquinas sobre el sistema nervioso.**

Los efectos neuroendócrinos de las citoquinas sobre el sistema nervioso central, se dan a diversos niveles. A nivel neuronal han sido descriptos efectos tales como la modulación de los niveles de factores de liberación hipotalámicos, como por ejemplo la estimulación de la producción de la CRH (Berkenbosch, van Oers et al. 1987). También se han reportado efectos sobre los niveles de neurotransmisores en tipos específicos de neuronas, sobre el crecimiento y diferenciación neuronal, como así también sobre la estimulación del

crecimiento de neuritas (Besedovsky and del Rey 1996). Los nervios periféricos también se han visto afectados por los aumentos de citoquinas en la sangre. La inyección periférica de IFN- $\alpha$  o IL-1 $\beta$  produce un incremento en la actividad simpática del nervio esplénico y un aumento en el metabolismo de la norepinefrina en el baso (Katafuchi, Hori et al. 1991). A nivel de mecanismos más complejos han sido descritos efectos sobre el comportamiento, la ingesta de alimentos y la regulación de la temperatura del organismo (Besedovsky and del Rey 1996), lo que fue denominado como comportamiento de respuesta a la enfermedad o “cytokine-induced sickness behaviour” (Konsman, Parnet et al. 2002). Por lo tanto, estos datos muestran como los efectos de las citoquinas sobre el sistema nervioso central evocan cambios tanto en el eje HPA, como en el sistema nervioso autónomo.

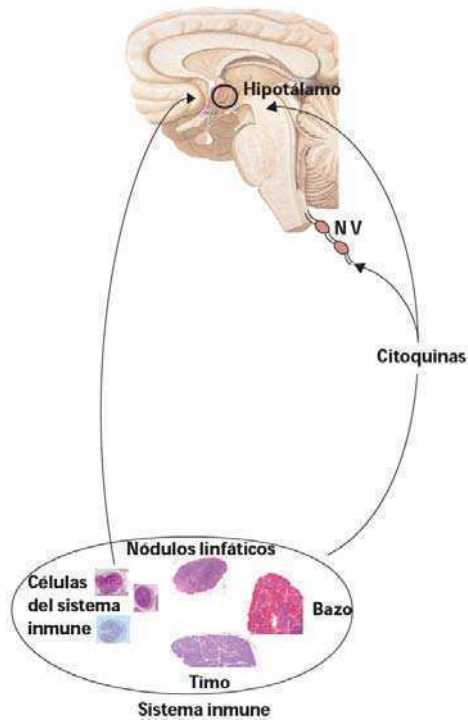
### **1.3.2 Vías de comunicación desde el sistema inmune hacia el sistema nervioso central.**

La comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso central puede ser establecida por vía humoral, por vía nerviosa y por vía celular (figura 2).

En cuanto a la vía humoral, si bien es sabido que las citoquinas pueden viajar por sangre hasta el cerebro dado que son proteínas hidrofílicas, es muy baja la posibilidad de que atraviesen la barrera hematoencefálica. En función de esto se han propuesto una serie de mecanismos por los cuales las citoquinas presentes en sangre podrían señalizar hacia el sistema nervioso central. Los mecanismos propuestos incluyen el pasaje a través de transportadores específicos y saturables (Banks and Kastin 1991), la entrada directa a nivel de los órganos circunventriculares, donde la barrera hematoencefálica es más débil

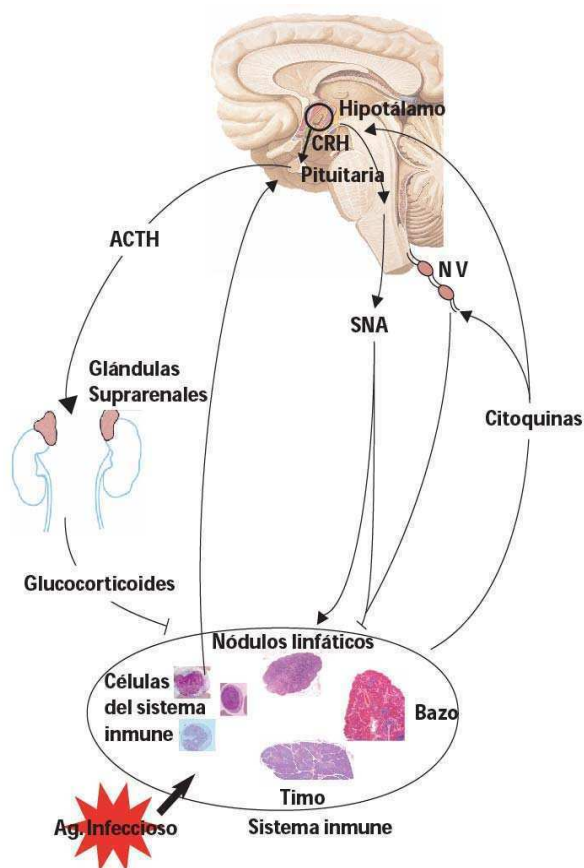
(Saper and Breder 1994) y la unión de las citoquinas a receptores en las células endoteliales de los vasos cerebrales, los cuales transducirían la señal hacia el cerebro (Van Dam, Brouns et al. 1993).

Por vía nerviosa, uno de los principales candidatos para mediar la comunicación de las citoquinas al sistema nervioso central es el nervio vago, a través de su vía aferente. Este nervio inerva tejidos que participan en funciones inmunes o contienen elementos del sistema inmune, como el timo, el hígado, el tracto gastro intestinal, etc. La comunicación se inicia por la acción parácrina de las citoquinas, dado que las ramas de este nervio están asociadas a zonas de drenaje linfático donde ocurren las reacciones inmunes. Esta acción de las citoquinas en la periferia activa las fibras vagales aferentes con terminales en el núcleo del tracto solitario (NTS) del tallo cerebral (Wan, Wetmore et al. 1994). A su vez el NTS proyecta hacia neuronas del PVN del hipotálamo, encargadas de la síntesis y secreción de CRH. Además del nervio vago también ha sido descrito que la inyección sub-cutánea de IL-1 activa los nervios cutáneos (Fukuoka, Kawatani et al. 1994). Finalmente otra vía de comunicación esta dada por el ingreso de células del sistema inmune al cerebro (vía celular)



**Figura 2: Esquema de las conexiones entre sistema inmune y cerebro.** Las células del sistema inmune pueden ingresar al cerebro, mientras que las citoquinas pueden señalar desde la sangre, o a través de la vía aferente del nervio vago (NV).

En su conjunto, toda la información hasta aquí descrita puede ser integrada de manera de obtener un circuito inmune-neuro-endocrino o circuito largo de interacción (Besedovsky and del Rey 1996) (Figura 3). La función de este circuito es la de sentir situaciones de estrés y activarse de manera de mantener o reestablecer la homeostasis del organismo. Un ejemplo de mantenimiento de la homeostasis, se da frente a una situación de estrés, como puede ser el ingreso al organismo de un agente infeccioso. Frente a la presencia de un agente extraño en el organismo, el sistema inmune lo detecta y monta una respuesta inflamatoria, para eliminar la amenaza que ese agente representa. La magnitud de esta respuesta es fundamental en el resultado. Una respuesta débil e insuficiente puede terminar en una infección. Una respuesta excesiva puede desarrollar enfermedades de tipo autoinmune o provocar la muerte, como por ejemplo en un shock séptico.



**Figura 3: Esquema completo del circuito de comunicación entre los sistemas nervioso, endocrino e inmune.** La entrada de un agente infeccioso activa el sistema inmune. Las citoquinas señalizan al sistema nervioso central, el cual integra la información y regula al sistema sistema inmune a través de eje H-P-A.

Por lo tanto, para mantener la homeostasis, el sistema nervioso central recibe información por parte del sistema inmune que detecta el estímulo periférico. Esta información es integrada, y en función de la magnitud del estímulo, modula la respuesta inflamatoria montando una respuesta antiinflamatoria por ejemplo a través del eje HPA, o de la vía colinérgica antiinflamatoria (Tracey 2002).

Para poder restaurar la homeostasis esta respuesta debe ser rápida, reversible, localizada y adaptable a los cambios en el estímulo que la generó. La modulación de la respuesta del sistema nervioso, generada por la activación del sistema inmune se inicia con la liberación de CRH por parte del hipotálamo. Esta hormona a su vez induce un aumento de la liberación de ACTH a la sangre por parte de la glándula pituitaria. El aumento de los niveles de ACTH en sangre

produce liberación de glucocorticoides por parte de las glándulas suprenales. Finalmente las elevadas concentraciones de glucocorticoides en circulación tienen un efecto antiinflamatorio (figura 3).

En el contexto de este circuito emerge inmediatamente una de las principales funciones del sistema nervioso central, el mantenimiento de la homeostasis del organismo. El sistema nervioso central a través de los sistemas sensoriales y de los mecanismos de comunicación con el sistema inmune, recibe información del medio interno. Esta información es integrada, y a través de las vías eferentes nerviosas y de los ejes neuroendocrinos, envía señales al organismo. De esta forma el sistema nervioso central provee una coordinación de todas las funciones del organismo, recibiendo información del entorno, procesándola y actuando en consecuencia (Ader, Cohen et al. 1995; Besedovsky and del Rey 1996; Tracey 2002; Steinman 2004; Blalock 2005). Esta coordinación tiene características tales que recientemente ha sido propuesto que el control de la inflamación, por parte del sistema nervioso central podría ser considerado como un reflejo (Tracey 2002). En cuanto al sistema inmune, en el contexto de este circuito, tiene un rol fundamental como sensor de la presencia de situaciones de estrés. Este sistema, de ser considerado como aislado hace 35 años atrás, ha llegado a ser propuesto en la actualidad como un órgano sensorial mas (Blalock 1984; Blalock 2005).

## **2. Estrés**

El concepto de estrés fue introducido por W.B. Cannon y H. Seyle en los años '30, y planteaba que influencias ambientales agresivas resultaban en un redireccionamiento del metabolismo hacia el sentido del catabolismo (Daruna 2004). El estrés también fue definido como un estado no armónico, o una

amenaza a la homeostasis producida por factores ambientales, psicológicos, y fisiológicos, junto con las respuestas a estos factores que perturban la estructura y funcionalidad de un individuo. El estrés también puede ser visto como una adaptación al cambio. De acuerdo al tipo de estímulo y respuesta al estímulo, Seyle clasificó al stress como, *eustress*, cuando la adaptación al cambio era positiva, y *distress* cuando la adaptación al cambio era negativa (Daruna 2004).

## **2.1 Factores psicológicos y ambientales**

### **2.1.1 Estrés psicosocial:**

Este concepto se refiere a los cambios que ocurren en el contexto social de un individuo, y cómo estos cambios inducen estrés. Los eventos sociales ocurren como consecuencia natural del transcurso de la vida. El grado de estrés generado por un evento no depende solo del evento en sí mismo sino también de las características psicológicas del individuo, y de cómo éste interprete y procese dicho evento. Por lo tanto, una de las posturas con respecto al concepto de estrés es que todos y cada uno de los cambios son iniciadores de estrés, lo cual no necesariamente implica que tengan un efecto negativo. Solo cuando el organismo no es capaz de adaptarse al cambio, es entonces cuando pueden ocurrir los efectos adversos. En función de esto, en el año 1967 Holmes y Rahe confeccionaron un listado de eventos sociales, tanto positivos como negativos, ordenado de acuerdo al esfuerzo necesario para adaptarse a la nueva situación (Holmes and Rahe 1967). Dentro los eventos del listado, la muerte de un cónyuge, y el divorcio fueron considerados por la personas entrevistadas, como los más difíciles de adaptarse.

### **Efectos sobre el organismo**

Existe en la actualidad numerosas evidencias del estrés psicológico con sobre el organismo. Los efectos han sido descriptos a nivel del sistema nervioso, tanto central como periférico y en la actividad del sistema nervioso autónomo.

Una de las características que definen al estrés, es la activación del eje HPA. Numerosas evidencias indican que diferentes eventos generadores de estrés están asociados con un aumento en la liberación de ACTH, y con aumento de los niveles de cortisol en circulación, demostrando de qué modo el estrés también tiene efectos a nivel endócrino y neurondócrino (Daruna 2004). El hecho de que todos estos sistemas se vean afectados, sugiere que el sistema inmune también podría estarlo. Existen numerosas evidencias de los efectos generados por el estrés psicosocial sobre el sistema inmune tanto innato como adaptativo. En cuanto al sistema inmune innato, la mayor parte de los estudios han mostrado una baja en la citotoxicidad de las células NK (Zorrilla, Luborsky et al. 2001). Sobre el sistema inmune adaptativo, uno de los efectos mas notorios es la disminución en la proliferación de linfocitos (Zorrilla, Luborsky et al. 2001).

## **2.2 Estímulos internos:**

Tanto el estrés psicosocial como un agente infeccioso, podrían considerarse como estímulos generados por factores externos, que activan el sistema de estrés del organismo. Pero también existen factores que podrían generar estímulos internos, como por ejemplo una enfermedad como el cáncer.

### **2.2.1 El cáncer como estímulo interno de estrés:**

El cáncer es una enfermedad crónica que afecta a unas 15 millones de personas alrededor del mundo. Esta enfermedad se desarrolla en múltiples etapas: a) unas o más células sufren una transformación neoplásica, b) se produce la



formación del tumor primario, c) el tumor se vuelve maligno, d) ocurre el proceso denominado metástasis, caracterizado por la invasión de tejido adyacente normal por parte de las células malignas, escape a la acción del sistema inmune, y la diseminación de las células malignas a lugares distantes.

La progresión de una lesión pre-neoplásica a un cáncer maligno y a la metástasis, es acompañada por cambios genéticos que llevan a cambios histopatológicos. Cada cambio genético genera un nuevo clon que será seleccionado para proliferar. Cada nuevo clon podría ser una señal de alarma para reclutar y activar respuestas inmunes locales tanto innatas como adaptativas (Dunn, Bruce et al. 2002; Khong and Restifo 2002). Un estudio ha estimado que durante esta transición podrían existir unas 10.000 señales de alarma (Stoler, Chen et al. 1999).

### **3 Relación cáncer-sistema inmune-sistema nervioso central:**

#### **3.1. Relación cáncer - sistema inmune:**

La relación entre el cáncer y el sistema inmune es conocida y discutida desde principios del siglo XX cuando Paul Erlich propuso la idea que el sistema inmune podría disminuir la frecuencia de aparición de carcinomas. En el año 1957 y 1960 Burnet y Thomas hicieron las primeras propuestas que finalmente en 1970 llevaron al concepto de la “inmuno-vigilancia del cáncer”. Si bien este concepto fue abandonado durante 20 años, a la luz de dos resultados claves, esta hipótesis recientemente tuvo un resurgimiento. El primero de estos resultados fue la demostración de que el interferón gama (IFN- $\gamma$ ) endógeno, protegía a los huéspedes tanto de tumores transplantados, como de tumores espontáneos o primarios inducidos por carcinógenos químicos (Dighe, Richards et al. 1994). El segundo resultado estuvo dado por la demostración del rol del

sistema inmune innato en la respuesta inmune antitumoral. La respuesta inmune adaptativa antitumoral es dependiente de la presencia de antígenos tumorales en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) I o II. Como consecuencia de la presión selectiva pueden surgir variantes tumorales que no expresen las moléculas del MHC I o II (Bernards, Schrier et al. 1983). Estas variantes tumorales pueden ser controladas por las células Natural Killer (NK) por un proceso dependiente de perforina (van den Broek, Kagi et al. 1995). Cuando se comparó la respuesta antitumoral entre animales knockout para el gen de la perforina (perforina <sup>-/-</sup>) y animales normales, se observó que los animales knockout eran más susceptibles a la formación de tumores por MCA, que los animales silvestres, demostrando la importancia del sistema inmune innato en el control tumoral. (van den Broek, Kagi et al. 1996; Street, Cretney et al. 2001).

Actualmente, si bien existen evidencias de la existencia de la inmunovigilancia, se ha demostrado que tumores crecidos en ausencia de un sistema inmune intacto son más inmunogénicos que tumores crecidos en condiciones normales (Shankaran, Ikeda et al. 2001). Estos datos muestran que los tumores están “modelados” por el entorno inmunológico en el cual crecen. Este modelado en ocasiones puede ser favorable a las células tumorales. La presión selectiva ejercida por un sistema inmune completamente funcional puede favorecer el surgimiento de tumores poco inmunogénicos lo que dificultaría la eliminación del tumor por parte del sistema inmune. En función de esto se ha propuesto un nuevo concepto para reemplazar al de inmunovigilancia, que es de “inmuno-edición de los tumores” (Dunn, Bruce et al. 2002). Este concepto agrega al de inmuno-vigilancia la noción de que el sistema inmune cumple no solo un rol protector frente a la generación de tumores, sino al mismo tiempo

puede modelar a las células transformadas, lo que les permite escapar del sistema inmune.

### **3.2 Relación cáncer- sistema nervioso central:**

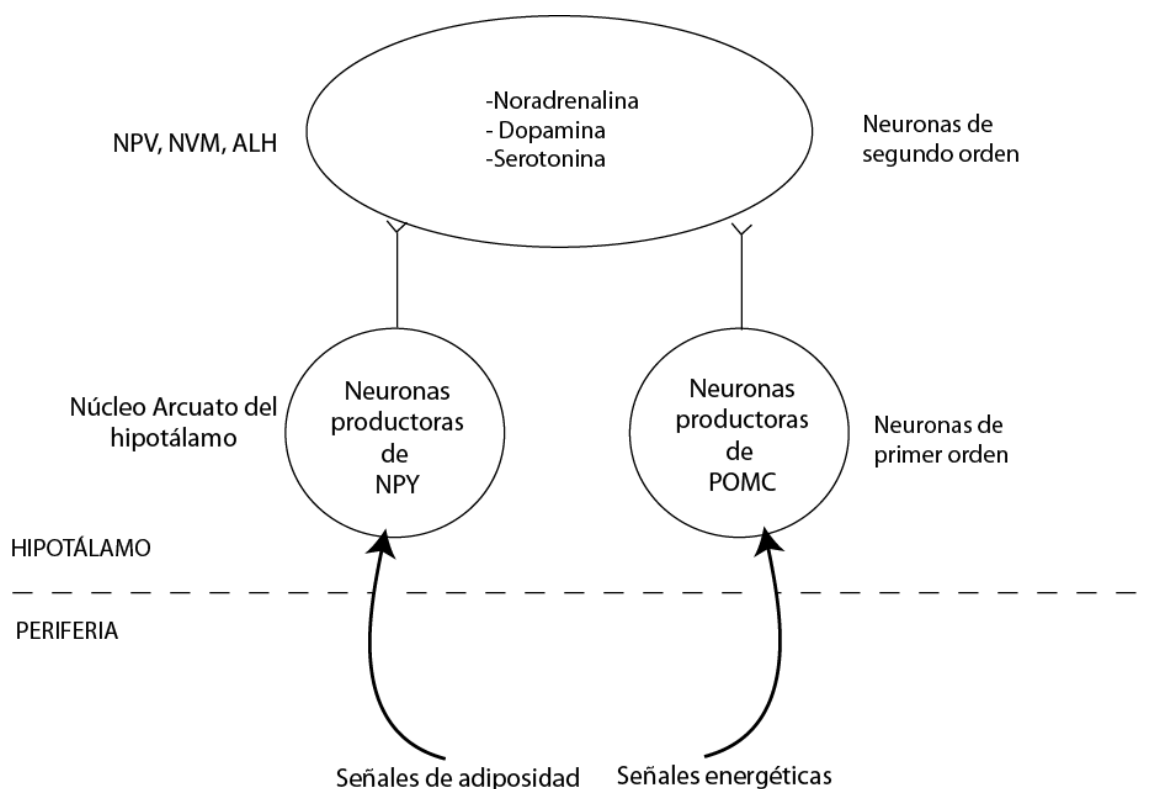
Uno de las primeras evidencias de la existencia de comunicación entre células tumorales en la periferia y el sistema nervioso central estuvo dada por la observación del aumento de glucocorticoides en circulación luego de la inyección de células tumorales en animales de laboratorio (Normann, Besedovsky et al. 1988; Besedovsky, del Rey et al. 1989). El aumento de glucocorticoides es consecuencia de la activación del eje HPA. La activación de este eje indicaba que la información acerca de la presencia de un tumor en la periferia estaba llegando al sistema nervioso central, probablemente por el reconocimiento de antígenos tumorales por parte de células del sistema inmune (Besedovsky, del Rey et al. 1989).

Otra de las manifestaciones de la influencia del cáncer sobre el sistema nervioso central, es el síndrome de caquexia-anorexia. Este síndrome tiene lugar bajo condiciones generadas por diversos procesos patológicos, como por ejemplo el cáncer (Plata-Salaman 2000). En el comportamiento de la ingesta de alimentos intervienen una serie de factores psicológicos, metabólicos y mecanismos humorales y neuronales (Plata-Salaman 1997). Si bien la modificación de cualquiera de los factores y mecanismos mencionados puede llevar a la anorexia; es interesante mencionar que en animales es posible inducir este síndrome mediante la inyección de células tumorales (Meguid, Sato et al. 2000).

En la actualidad existe consenso en cuanto a que el control del comportamiento de ingesta de alimentos reside principalmente en el

hipotálamo (Schwartz, Woods et al. 2000). Mediante un proceso conocido como homeostasis energética (Morton, Cummings et al. 2006), la ingesta de alimentos es ajustada en el tiempo de manera de llegar a una estabilidad en cuanto a la cantidad de energía que en forma de grasas es almacenada en el organismo. Dos tipos de señales llegan al hipotálamo desde la periferia. Señales de adiposidad por parte de la leptina y la insulina, y señales relacionadas a los nutrientes, principalmente los ácidos grasos libres, aportando información del status energético del organismo (Laviano, Russo et al. 2002). Las señales de adiposidad han sido las más estudiadas y desde hace más de 50 años se conoce un modelo de homeostasis energética conocido como “circuito de retroalimentación negativa dependiente de adiposidad” (Morton, Cummings et al. 2006). Los niveles de leptina en circulación son proporcionales al nivel de grasas en el cuerpo. Cuando los niveles de grasas se elevan, lo propio ocurre con los niveles de leptina, la cual ingresa al hipotálamo e induce un comportamiento de disminución de la ingesta de alimentos.

La integración de la información proveniente de la periferia tiene lugar cuando las señales periféricas interaccionan con dos poblaciones neuronales de primer orden en el núcleo arcuato del hipotálamo. En el caso de las señales de adiposidad, estas interaccionan con neuronas productoras del Neuropeptido Y (NPY), mientras que las señales relacionadas con el estado energético del organismo interaccionan con una población de neuronas productoras de pro-opiomelanocortina (POMC) (Schwartz, Woods et al. 2000). Estos grupos neuronales de primer orden, transducen esta información a grupos neuronales de segundo orden los cuales inducen respuestas a nivel del comportamiento de ingesta de alimento (Laviano, Russo et al. 2002) figura 4.



**Figura 4: Modelo aceptado de regulación de ingesta por parte del sistema nervioso central.** NPY: Neuropeptido Y, POMC: proopiomelanocortina. NPV: núcleo paraventricular, NVM; núcleo ventromedial, ALH: área lateral hipotalámica

En función de este modelo de regulación de ingesta de alimentos, se ha postulado que la anorexia asociada al cáncer sería un efecto secundario ya sea de defectos en las señales periféricas, o errores en la transducción de la información por parte de las neuronas de primer orden, o defectos en la actividad de las neuronas de segundo orden.

Con respecto a las señales periféricas, los datos experimentales obtenidos han sido contradictorios y no se ha podido establecer una relación causa consecuencia entre las señales y la anorexia (Chance, Balasubramaniam et al. 1995; Simons, Schols et al. 1997; Chance, Sheriff et al. 1998; Laviano, Russo et al. 2002). Un estudio mostró que los niveles de leptina circulantes estaban

disminuidos en pacientes anoréxicos con cáncer, con respecto a pacientes no enfermos de cáncer. Sin embargo la producción de leptina por parte de las células mononucleares periféricas era similar entre ambos grupos (Mantovani, Maccio et al. 2000). Estos datos sugieren que en pacientes con cáncer las causas de la anorexia no se deberían a defectos en las señales periféricas sino que se hallarían a nivel del hipotálamo.

En cuanto a los neuropéptidos de las neuronas de primer orden su relación con la regulación de la ingesta de alimentos es ampliamente conocida. Sin embargo los datos disponibles en cuanto a su relación con la anorexia asociada al cáncer no permiten establecer una relación entre la anorexia y los niveles de NPY y POMC (Laviano, Russo et al. 2002).

Por el contrario, con respecto a las neuronas de segundo orden, existe evidencia experimental correlacionando la anorexia en el cáncer con un incremento en la neurotransmisión serotoninérgica en el hipotálamo (Laviano, Meguid et al. 1996). A favor del rol clave de la neurotransmisión en el hipotálamo como mediador de la anorexia existen estudios que muestran que citoquinas, las cuales se sabe están involucradas con la anorexia asociada al cáncer (Plata-Salaman 1996) actúan en forma directa (Plata-Salaman, Oomura et al. 1988) o indirecta (Yang, Blaha et al. 1999) en el hipotálamo induciendo cambios en la liberación tanto de dopamina como serotonina. El sistema serotoninérgico hipotalámico contribuye con la anorexia asociada al cáncer (Krause, James et al. 1979; Rossi Fanelli, Cangiano et al. 1986). La serotonina es un factor de saciedad y al ser inyectada en el núcleo ventromedial del hipotálamo suprime la ingesta de alimentos (Leibowitz, Weiss et al. 1990). En esta región del hipotálamo ha sido descrito un rol crucial de la serotonina en la anorexia asociada al cáncer (Varma, Torelli et al. 1999). En cuanto a la

dopamina también se han observado cambios en situaciones de anorexia asociada al cáncer. En animales anoréxicos portadores de tumor se ha observado una baja en la concentración y un mayor metabolismo de la dopamina en el núcleo ventromedial del hipotálamo (Blaha, Yang et al. 1998). La anorexia asociada al cáncer es una muestra de la comunicación existente entre un tumor en la periferia y el sistema nervioso central. Una parte de esta comunicación esta mediada por citoquinas, las cuales a su vez influyen sobre los niveles de neurotransmisores en el hipotálamo.

Cambios en los niveles de neurotransmisores en el sistema nervioso central de animales portadores de un tumor, no solo han sido descriptos como asociados a la anorexia. Un día después de la inyección de la línea celular de linfoma AW5E en ratones singeneicos fue posible detectar cambios en el metabolismo de Norepinefrina (N.E.), serotonina y Dopamina (DA) en el hipotálamo, tiempo en el cuál no se desarrolla el síndrome de caquexia-anorexia asociado al cáncer (Chuluyan, Wolcott et al. 2000). Incluso a los 14 días luego de inyectadas las células se detectaron cambios en el metabolismo de los mismos neurotransmisores pero en regiones del cerebro no involucradas en la anorexia como el tallo cerebral y la corteza prefrontal (Chuluyan, Wolcott et al. 2000).

La comunicación entre un proceso neoplásico periférico, y el sistema nervioso central es bidireccional. Por un lado la presencia de un tumor en la periferia induce cambios en el metabolismo y liberación de neurotransmisores a nivel del sistema nervioso central. Por otro lado es posible modificar el desarrollo y crecimiento de un tumor modificando los niveles de neurotransmisores en el cerebro. El L-Deprenyl es un inhibidor de la monoamino oxidasa-B (MAO-B), que aumenta la síntesis y liberación de N.E y

D.A. en el hipotálamo (ThyagaRajan and Quadri 1999). El tratamiento de animales con L-Deprenyl disminuye el crecimiento y desarrollo de tumores en un modelo animal de tumor de mama inducido por carcinógenos, (ThyagaRajan, Felten et al. 1998; ThyagaRajan and Quadri 1999), como así también en animales con tumores espontáneos (Thyagarajan, Madden et al. 1999). Así como el aumento de los niveles de DA disminuye el desarrollo tumoral, la disminución en los niveles de este neurotransmisor, por ejemplo por un daño irreversible del sistema dopaminérgico central, puede inducir un incremento significativo en el crecimiento tumoral (Basu, Dasgupta et al. 1995).

En función de estos estudios, en la actualidad esta claro que un tumor en la periferia es capaz de inducir cambios a nivel de liberación y metabolismo de neurotransmisores en el sistema nervioso central.

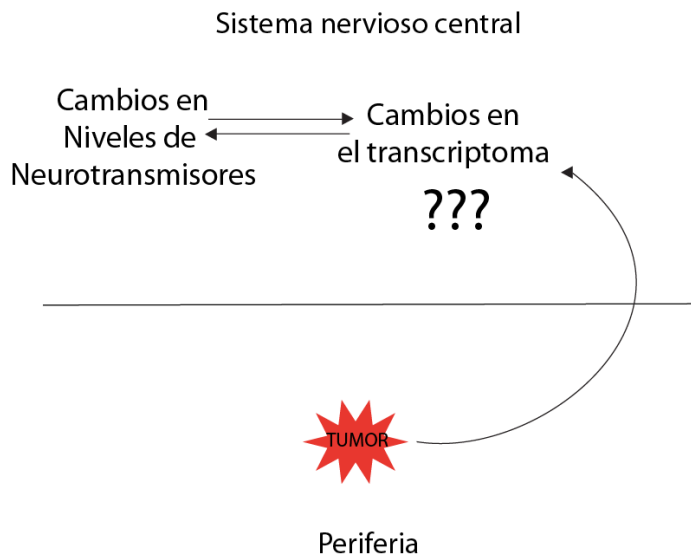


### **Objetivo general**

Una de las funciones del sistema nervioso es el mantenimiento de la homeostasis del organismo detectando y reaccionando frente a estímulos que superen un determinado umbral. Esta función puede cumplirla en gran medida gracias a los circuitos inmuno-neuroendocrinos, en los cuales el sistema nervioso central ocupa un lugar central como integrador de la información proveniente del organismo.

El sistema nervioso central y el sistema inmune son dos sistemas adaptativos extremadamente complejos. La comunicación existente entre ambos permite que frente a un cambio en la homeostasis, ambos sistemas actúen coordinadamente para adaptar al organismo a las nuevas condiciones.

En la actualidad está demostrado que frente a un cambio en la homeostasis por un agente interno, como un tumor en crecimiento, se producen cambios a nivel del sistema nervioso central en el metabolismo y la liberación de neurotransmisores (Chuluyan, Wolcott et al. 2000) y activación del eje HPA (Besedovsky, del Rey et al. 1989). A pesar de esto, no existen aún evidencias, ni reportes que indiquen que la existencia de cambios a nivel transcripcional en sistema nervioso central, como consecuencia de la presencia de un tumor en crecimiento en la periferia (Figura 5).



**Figura 5.** Un tumor en crecimiento en la periferia induce cambios a nivel de neurotransmisores en el hipotálamo, la corteza prefrontal, y el tallo cerebral, pero en la actualidad se desconoce si también ocurren cambios a nivel transcripcional.

En función de toda la información anteriormente descrita, se puede proponer la hipótesis de que como consecuencia del surgimiento y desarrollo de enfermedades en la periferia, ocurren cambios a nivel transcripcional en el sistema nervioso central y que estos cambios pueden ser monitoreados utilizando herramientas de alto rendimiento.

El **objetivo general** de esta tesis es evaluar la capacidad del cerebro para detectar el surgimiento de enfermedades crónicas en la periferia como el cáncer y la artritis reumatoide, que involucren la activación del sistema inmune, estudiando los cambios en el transcriptoma de diferentes regiones cerebrales utilizando como herramienta microarreglos de ADN.

Para desarrollar este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos

1) Definir si distintos tipos de tumor (colon, mama, y pulmón) inducen cambios en el transcriptoma del cerebro, e identificar cuales son las regiones del cerebro donde estos cambios ocurren (capítulo I)

2) Correlacionar los cambios a nivel transcripcional con cambios a nivel de las funciones biológicas de las células del sistema nervioso central, (capítulo II)

3) Definir la existencia de firmas moleculares en el cerebro, capaces de discriminar entre los tres tipos de tumores (capítulo II)

4) Estudiar si otra enfermedad periférica como la artritis reumatoide, podría también inducir cambios en el transcriptoma del sistema nervioso central y si estos cambios podrían ser distinguibles de los inducidos por las células tumorales (capítulo III)

## **Materiales y métodos**

### **1. Líneas celulares:**

La línea celular CT26.wt (carcinoma de colon murino), fue crecida en el medio DMEM, baja glucosa y 10% de suero fetal bovino. La línea celular LL2 (LLC1) (ATCC, Manassas, VA), (carcinoma de pulmón murino) fue crecida en medio DMEM, alta glucosa, y 10% de suero fetal bovino. La línea celular 4T-1 (ATCC, Manassas, VA) (carcinoma de mama, murino) fue crecida en medio RPMI, con alta glucosa y 10% de suero fetal bovino. Todos los cultivos fueron mantenidos a 37 °C, en atmósfera saturada de agua y 5 % CO<sub>2</sub>.

### **2. Estudios *in vivo*:**

#### *2.1 Modelos tumorales:*

Se utilizaron ratones machos de la cepa C57/Bl y, ratones machos y hembras de la cepa Balb/c. Los animales se recibieron a las 6 semanas de vida y se les dio un periodo de adaptación de dos semanas. Entre la octava y novena semana de vida fueron inyectados con las células tumorales singeneicas correspondientes. Los animales de la cepa C57/Bl fueron inyectados con  $1 \times 10^6$  células de la línea LL2(LLC1), en 300 ul de PBS, en forma subcutánea en el flanco. Los animales machos de la cepa Balb/c fueron inyectados con la  $1 \times 10^6$  células de la línea tumoral CT-26 en 300 ul de PBS, en forma subcutánea en el flanco, y las hembras de la cepa Balb/c fueron inyectadas con  $1 \times 10^5$  células de la línea 4T-1 en 100 ul de PBS, también en forma subcutánea, pero entre la cuarta y quinta mama. Los animales control fueron inyectados con los volúmenes correspondientes de PBS. Desde su llegada, hasta el sacrificio, los animales fueron mantenidos con agua y comida *ad libitum*, en un rack con sistema de aire filtrado a través de filtros HEPA (Techniplast, Italia). A las 18, 72 y 192 hs.

los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, luego decapitados, y el cerebro fue disecado bajo lupa. Las distintas regiones del cerebro disecadas fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido, y luego guardadas hasta su procesamiento a -80°C.

### *2.2 Modelos de artritis reumatoide:*

Se utilizaron ratones machos adultos de las cepas DBA/1 y C57Bl/6. A los días 1 y 21 los animales fueron inyectados en forma intradérmica en la base de la cola con 0.1 ml de colágeno de pollo tipo II 2mg/ml (Sigma Co., St Louis, MO) combinado con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (CFA, Sigma Co). Los animales control fueron inyectados con el adyuvante completo de Freund, solamente. Al día 24 los animales fueron inyectados en forma intraperitoneal con 40 ug de Lipopolisacárido (LPS), disuelto en 0,1 ml de PBS. Cada dos días se realizó un seguimiento de los animales el cuál constó de la medición con un calibre del nivel de hinchazón en las patas, lo que fue tomado como signo clínico relacionado con el inicio de la enfermedad (Gould, Bright et al. 2004). Al día 31 los animales con síntomas tempranos de aparición de la enfermedad fueron sacrificados y sus cerebros disecados. Utilizando este proceso de inmunización entre un 75 y 95% de los animales tuvieron síntomas tempranos de aparición de artritis reumatoide.

## **3. Determinación de niveles de neurotransmisores mediante HPLC**

### *3.1 Procesamiento de las muestras para HPLC*

Inmediatamente después de disecar el cerebro las regiones cerebrales de interés fueron congeladas en Nitrógeno líquido, pesadas y guardadas a -80°C hasta su procesamiento. Las muestras fueron homogeneizadas mediante

sonicación en 0.5 ml de 0.1M HClO<sub>4</sub> conteniendo 1mM EDTA. Los homogenatos fueron congelados y guardados a -80°C hasta el análisis por HPLC. Previo al análisis las muestras fueron descongeladas y centrifugadas dos veces a 14.000rpm for 25 min. 265ul de los sobrenadantes fueron transferidos a los tubos auto sampler para aplicación directa en un equipo de HPLC de fase reversa con detección electroquímica (GILSON).

### *3.2 Análisis por HPLC*

Se utilizó una fase móvil (pH3.20) conteniendo 75mM Fosfato de Sodio, 0.1mM EDTA, Na Octilsulfato 0.3mM and 7.5% metanol. Las concentraciones de catecolaminas, indoleaminas y sus catabolitos (Norepinefrina, Epinefrina, 3-methoxy, 4-hydroxyphenylethyleneglycol (MHPG), Dopamina (DA), ácido 3,4-dihydroxifenylacetico (Dopac), ácido 5-hydroxiindoleacetico (5-HIAA), serotonina (5-HT) y ácido homovanillico (HVA) fueron determinadas por HPLC. La identificación de los picos correspondientes a cada uno de los neurotransmisores analizados se basó en el tiempo de retención obtenido con estándares comerciales para cada neurotransmisor y metabolito. Luego de finalizada la corrida se calculó el área debajo de cada pico con el software UNIPPOINT como medida de cantidad de neurotransmisor.

La columna analítica utilizada fue una ULTRASPHERE C18, 250 x 4.6 mm. Con partículas de 5um, esféricas, Beckman.

## **4. Extracción de ARN:**

### *4.1 Extracción de ARN de muestras de cerebro*

Las muestras de tejido fueron homogeneizadas en Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), el ARN total fue purificado de acuerdo a las instrucciones del

fabricante, y luego fue sometido a un tratamiento con Dnasa I en presencia de inhibidores de RNasas. Finalmente se extrajo el ARN mediante el método del fenol:cloroformo:isoamílico, se lo precipitó con etanol y se lo resuspendió en agua MilliQ libre de RNasas. Para corroborar la integridad del RNA, una alícuota de cada muestra fue sometida a electroforesis en gel de agarosa. Todas las muestras fueron cuantificadas por absorbancia a 260nm.

## **5. Ensayos de microarreglos de ADN**

### *5.1 Obtención de sondas de c-DNA fluorescentes*

Para este paso se utilizó un método de marcación indirecto, el mismo se basa en la incorporación al c-DNA, de un nucleótido modificado, aminoallyl-dUTP,(aa-dUTP Sigma Chem. Co.; St Louis, MO). Una vez finalizada la síntesis de la primera cadena de c-DNA, se lleva a cabo la marcación propiamente dicha, que consta de la unión de una molécula fluorescente ya sea del colorante Cy3 o del Cy5 (Amersham) al nucleótido modificado. La ventaja principal de este método frente al de marcación directa (a través de la utilización dCTP-Cy5 o dCTP-Cy3) es que la transcriptasa reversa durante la síntesis del c-DNA, no incorpora con la misma eficiencia al dCTP-Cy3, que al dCTP-Cy5, esto hace que las sondas marcadas con uno u otro fluoróforo tengan diferente grado de incorporación de moléculas fluorescentes, lo que a posteriori dificulta el análisis de los datos de los microarreglos. Mientras que en el caso de la marcación indirecta el nucleótido modificado es igual para las dos sondas, por lo tanto la incorporación es similar para ambas, permitiendo de esta forma la obtención de sondas similares en cuanto al grado de incorporación de moléculas fluorescentes.



Como material de partida se utilizaron 75 ug de ARN total. Para la obtención del c-dna se agregó a las muestras de ARN, 2 ug de Oligo (dt)<sub>12-18</sub>, la mezcla fue calentada a 65°C durante 5 minutos, y pasada a hielo. Luego se le agregó 12,5 ul de una mezcla conteniendo, 6 ul de la solución tampón 5X, para la síntesis de la primera cadena de c-DNA, 24 mM DTT, 0,6 ul de una mezcla 50X de aminoallyl-dNTPs (25 mM dATP; 25 mM dCTP; 25 mM dGTP; 25 mM de la mezcla, aa-dUTP:dTTP, en una relación 4:3), 60 U del inhibidor de Rnasas, RNaseOUT (Invitrogen) y 1,4 ul de agua milli-Q. La mezcla fue incubada a 37°C por 2 minutos, luego se le agregaron 400 U de transcriptasa reversa (Superscript II RT (Invitrogen)) y se incubó a 42°C por 2 horas. La reacción fue detenida por incubación a 70°C durante 15 minutos. El ARN fue degradado por agregado de 3 ul de NaOH 2,5 M, e incubación a 37°C durante 15 minutos, luego la mezcla fue neutralizada por el agregado de 15 ul de HEPES 2M.

El c-DNA obtenido fue precipitado con etanol, resuspendido en 4,5 ul de una solución tampón 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.0), mezclado con 4,5 ul de una solución de Cy3 o Cy5 resuspendidos en DMSO, e incubado durante 1 hora a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad. Las sondas fueron purificadas a través de las columnas de purificación SNAP (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante, con una única modificación. En el paso inicial, se le agregó a la mezcla de c-DNA y fluoróforos, 500 ul de una solución de carga 2,25 M de guaninidinio-HCl, todo fue sembrado en la columna SNAP e incubado por 4 minutos a temperatura ambiente.

## *5.2 Fabricación de los microarreglos*

El soporte sólido sobre el cuál se imprimieron los microarreglos fueron los portaobjetos “UltraGAPS Coated slides” (Corning) con la superficie cubierta con amino-silano para la mejor unión del ADN al soporte. Como fuente de secuencias blanco se utilizó una librería comercial (MWG) de 10.000 oligos sintéticos (50mer), representando 9980 genes murinos. Cada uno de los oligos de la librería fueron resuspendidos en DMSO 50% a una concentración. Un total de 27 placas de 384 posillos cada una fueron resuspendidas de esta forma y luego guardadas a -20°C, hasta el momento de la impresión.

La impresión de los microarreglos se llevó a cabo utilizando un robot de impresión (Virtek, Canada), a una humedad relativa de 45%, a temperatura ambiente. Los clavos de impresión (utilizados para la toma de la muestra de ADN y depositarla sobre los portaobjetos), fueron del tipo “quill” (Telechem), se utilizaron un total de 24 clavos de impresión, con un tiempo de contacto con el portaobjeto de 0,05 segundos. Luego de cada impresión y antes de tomar una nueva muestra, los clavos fueron lavados para evitar contaminación con diferentes oligos, con un dispositivo para tal fin dentro del robot de impresión.

Una vez terminada la impresión, los microarreglos fueron irradiados con luz ultravioleta a 600 mJoules/cm<sup>2</sup> para la fijación de los oligos al soporte sólido y guardados en desecadores. Como control de calidad de la impresión, de cada lote de microarreglos impresos, uno, fue teñido con un colorante específico para ADN simple cadena (Sybr Green II, Molecular Probes), y luego escaneado, en un scanner Virtek, preparado para lectura de los fluoróforos Cy5 y Cy3 (el Syber Green II, tiene un espectro de absorción y emisión similar al Cy3).

### *5.3 Pre-hibridación, hibridación y lavado de los microarreglos:*

La pre-hibridación se llevó a cabo durante 45 minutos a 42°C en solución de pre-hibridación conteniendo 2X SSC, 0.1% SDS, 1% BSA. Una vez finalizado

este paso, los microarreglos fueron lavados 5 minutos en agua Mili-Q esteril, luego sumergidos en isopropanol y secados.

Para la hibridación, una sonda proveniente de muestras de animales portadores de tumor, y una proveniente de muestras de animales control (una marcada con Cy5 y otra con Cy3) fueron co-hibridadas sobre un mismo microarreglo. Cada una de las sondas fue llevada a 10 ul en speedvac, mezcladas entre si y la mezcla llevada a 50 ul con una solución de hibridación conteniendo 2X SSC, 5ug/ul de ADN de esperma de salmón, 0,5% SDS y 30% de formamida. La hibridación se llevó a cabo durante 16 hs a 42°C, luego se realizaron 3 lavados sucesivos de 5 minutos cada uno, primero en una solución de lavado con 0,1 %SDS, 2X SSC a 42°C, luego se paso a una solución de 1X SSC a temperatura ambiente, y finalmente se lavó en una solución de 0,1X SSC. Luego fueron secados e inmediatamente escaneados.

## **6. Análisis de datos:**

Todo el procesamiento de datos fue realizado con el sistema R 2.2.1 (The R Project for Statistical Computing).

### *6.1 Adquisición de datos y procesamiento de las imágenes*

Los microarreglos fueron escaneados con un escáner Chip-Reader (Bio-Rad, Hercules, CA) a una resolución de 10 micrones y con una profundidad de píxeles de 16 bits. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa TIGR Spotfinder 2.2.3, disponible en <http://www.tigr.org/software/>.

### *6.2 Filtrado y normalización de los datos:*

Los datos fueron filtrados para eliminar los puntos provenientes de partículas de polvo (puntos con un tamaño menor a 75 píxeles, o con una

correlación entre la media y la mediana menor a 80% (Tran, Peiffer et al. 2002), puntos saturados (puntos con una proporción de píxeles saturados mayor al 20%), y puntos con baja señal (puntos con una relación entre la señal y el ruido de fondo menor a 1,2).

Para la normalización de los microarreglos reemplazamos el logaritmo de la relación entre los canales Rojo y Verde, denominada  $M$  ( $M = \log_2 Red/ Green$ ), con los residuos de una regresión polinomial de superficie 3D localmente ponderada, de  $M$  en función del logaritmo de la intensidad de señal  $A$  y de la posición del punto en el microarreglo ( $M_i = f(x_i, y_i, A_i)$ , donde  $x_i, y_i$  son la posición en el microarreglo del punto  $i$  y  $A_i$  es la intensidad media del punto  $i$ ,  $A_i = \frac{1}{2} \cdot \log_2 R_i/ G_i$ ). El algoritmo de normalización 3D fue aplicado sucesivamente en dos pasos: primero en todo el microarreglo, para eliminar los desvíos sistemáticos que se dan en toda la superficie del microarreglo, y luego en cada grilla en particular, para eliminar los desvíos sistemáticos que se producen como consecuencia del uso de diferentes clavos para la impresión de las grillas. El algoritmo de normalización 3D fue llevado a cabo con la función loess en el sistema R.

### *6.3 Análisis de réplicas biológicas*

Se empleó un modelo experimental de efectos mixtos con el factor *tratamiento* (niveles: *tumor* y *control*) y el efecto al azar *experimento* (niveles: 1-4) sin repetición. La significancia estadística del factor *tratamiento* fue estimada por ANOVA (Pavlidis 2003). Para la identificación de los genes afectados por el factor *tratamiento* a cada uno de los tiempos experimentales se agregó el factor *tiempo* (niveles: 18, 72 y 192 hs), al diseño previo, en lugar de hacer múltiples pruebas de ANOVA, dado que de esta forma se obtiene mayor sensibilidad, sin pérdida de selectividad, comparado con lo que ocurre con

múltiples pruebas de ANOVA de un solo factor, o con las pruebas de t (Pavlidis and Noble 2001). Para identificar genes con niveles de expresión diferencial a lo largo del experimento, se estimó la significancia estadística para el promedio de las diferencias mediante ANOVA.

#### *6.4 Integración de datos entre réplicas de microarreglos, y generación de una matriz de expresión*

Los valores de M de los microarreglos con intercambio de colorantes (réplicas técnicas) fueron ponderados por su nivel de calidad (QC) y promediados. El QC fue definido como la relación entre el área y el perímetro del punto en una escala de (0,1]. La matriz de expresión resultante se le aplicó una normalización de escala, de forma tal que cada muestra tenga la misma desviación absoluta de la media (Smyth and Speed 2003).

#### *6.5 Método de análisis jerárquico*

A partir del listado de genes obtenidos con el criterio 2, se seleccionaron aquellos diferencialmente expresados entre los distintos modelos tumorales ( $p < 0.01$ , prueba de t). Solo fueron incluidos en el análisis los puntos experimentales con menos de 40% de datos perdidos, y los genes con menos de 20% de datos perdidos. Para el cálculo de las distancias Euclidianas, los datos fueron escalados como  $Ms_i = (M_i - \overline{M}) / SD(M)$ , donde SD es el desvío estándar. El análisis de racimos (Cluster analysis) fue realizado utilizando el método de Ward (Hartigan 1975).

#### *6.6 Validación cruzada por el método de "Leave-one-out" (LOO) y análisis multivariado ("ROC-score" análisis)*

Si tenemos n muestras, para cada muestra por vez, se entrena al clasificador con n-1 muestras y luego se pone a prueba la hipótesis en la muestra que no fue usada en el entrenamiento. La clasificación fue realizada con una

versión ponderada del método clásico “k-nearest neighbor”. Las variables (genes) útiles para el clasificador fueron seleccionadas a partir del grupo de entrenamiento (ver abajo). El grupo de entrenamiento (Y) y el grupo de prueba (X), fueron estandarizados dividiendo las variables por el desvío estándar de Y. Luego fueron calculadas las distancias Euclidianas,  $d(y,x)$ , entre cada una de las muestras del grupo de entrenamiento pertenecientes a la clase  $i$ , y la muestra  $x$  del grupo de prueba. Las distancias fueron convertidas a factores de peso ( $w$ ) con la función de Gauss kernel  $s^{-1} (2\pi)^{-1/2} \exp(-d^2 / (2s^2))$ , donde  $s$  es el desvío estándar de la distancias  $d$ . La función de decisión  $f(x)$  fue construida utilizando todas las muestras para entrenar el clasificador  $w$ -nn para que  $k = M$ . El valor de salida fue generado como el valor de consenso estimado para  $x$  perteneciente a la clase 0:  $f_0(x) = m_0^{-1} \sum [w_i (l(i) = 0)] / \sum w$  donde  $l$  es el vector de etiquetas de clase y  $m_0$  es la cantidad de muestras pertenecientes a la clase 0. Por lo tanto el valor de consenso para las clases es:

$$\begin{aligned}
 f_0(x) &= \frac{1}{m_0} \sum_j \frac{1}{s\sqrt{2\pi}} \exp\left\{-\frac{[d(x, y_j)]^2}{2s^2}\right\}, \forall j | l_j = 0 \\
 f_1(x) &= \frac{1}{m_1} \sum_j \frac{1}{s\sqrt{2\pi}} \exp\left\{-\frac{[d(x, y_j)]^2}{2s^2}\right\}, \forall j | l_j = 1 \\
 s^2 &= \frac{1}{M(M-1)} \sum_{i,j=1}^M [d(y_j, y_i)]^2
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

donde  $m_0$  y  $m_1$  son la cantidad de muestras pertenecientes a las clases 0 y 1 respectivamente, y  $M = m_0 + m_1$ .

Definimos la función de decisión como  $D(x) = f_0(x) / (f_0(x) + f_1(x))$ .

El proceso de LOO produjo  $n$  clasificaciones las cuales fueron comparadas con un dado umbral de detección  $\tau$  para predecir la clase. Variando  $\tau$  podemos

graficar una curva de sensibilidad vs 1-especificidad de la clasificación llamada curva ROC (Receiver Operating Characteristic). El área debajo de la curva ROC (ROC score) es una medida de la habilidad de separar las muestras del clasificador. Los clasificadores muy buenos tienen valores de ROC-score cercanos a 1, y los clasificadores malos tienen valores cercanos al 0,5. La significancia estadística del ROC score fue calculada a partir de un modelo nulo generado por 10.000 permutaciones al azar de los niveles de las clases. El valor de p de un ROC score observado fue computado como la fracción de los ROC scores al azar con valores mayores al ROC score observado.

Para seleccionar las variables (genes) aptas para la clasificación, buscamos en el grupo de entrenamiento a un set de genes que maximice el ROC score en un proceso LOO. En resumen, los genes fueron ordenados en una lista de acuerdo a su expresión diferencial entre clases usando una prueba de t. El número de genes del clasificador fue optimizado por el agregado secuencial de genes desde los primeros genes de la lista, comenzando con 2 genes hasta 100. El poder de clasificar correctamente fue estimado para cada set de genes por el ROC-score calculado con el LOO en el set de entrenamiento. El número de genes útiles para un clasificador fue determinado como, el número mínimo de genes que maximizan el ROC-score.

### *6.7 Análisis funcional*

Los grupos de funcionales de genes fueron generados a partir de la base de datos de Procesos Biológicos de Gene Ontology (GO) (Ashburner, Ball et al. 2000) implementada en el paquete GO del sistema R. Este análisis se basó en el método GSEA (gene set enrichment analysis) (Subramanian, Tamayo et al. 2005), con una ligera modificación para encontrar genes que varían en cada uno

de los sentidos. Primero se ordenaron los  $N$  genes del set de expresión  $D$  de acuerdo al valor  $p$  para la expresión diferencial, para obtener  $L = \{g_1, \dots, g_N\}$ . Luego se estimó el score de enriquecimiento (Enrichment score,  $ES$ ) como  $ES = P_{hit} - P_{miss}$ , donde

$$P_{hit}(S, i) = \sum_{\substack{g_j \in S \\ j \leq i}} \frac{(1 - \text{rank}(p)/N)^\alpha}{N_R} \quad \text{con} \quad N_R = \sum_{g_j \in S} (1 - \text{rank}(p)/N)^\alpha$$

$$P_{miss}(S, i) = \sum_{\substack{g_j \in S \\ j \leq i}} \frac{1}{(N - N_H)} \quad \{2\}$$

La significancia estadística de  $ES$  (los valores nominales de  $p$ ) fueron estimados permutando los genes 10.000 veces, es decir, los genes fueron asignados al azar a los sets, manteniendo el tamaño de los mismos. Los gráficos acíclicos fueron generados utilizando la librería RGraphviz del sistema R. Los genes líderes fueron estimados como se describe en (Subramanian, Tamayo et al. 2005)

### *6.7.1 Análisis funcional de los genes líderes (leading edge genes)*

Cada uno de los *genes líderes* fue asignado a un proceso biológico en el contexto del sistema nervioso central, de acuerdo a la información disponible en línea en Entrez gene y en Pubmed ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez)). Cada proceso biológico fue analizado y asignado a una función biológica mas general del sistema nervioso central. Los procesos biológicos con funciones similares en el sistema nervioso central, fueron agrupados dentro del mismo proceso general.



## **7. Experimentos conductuales:**

### *7.1 Ensayo de desplazamiento de leca*

Este ensayo fue realizado esencialmente como se describe en (Guenther, Deacon et al. 2001). Por lo menos dos horas antes del comienzo del período de oscuridad, los animales fueron colocados en jaulas individuales, las cuales contenían unos tubos plásticos de 20 cm de largo por 4 cm de diámetro, con un extremo cerrado y otro abierto. Dentro de cada tubo había 300 gramos de leca (piedras para pecera, previamente lavadas), y cada tubo estaba levantado del piso de la jaula unos 3 cm solo por el lado abierto, para evitar que las piedras cayeran solas. Luego de 16hs se midió peso de las piedras remanentes dentro los tubos, y la diferencia entre el total y el peso remanente, fue el peso desplazado.

### *7.2 Ensayos de nado forzado (forced swimming test)*

Los ratones fueron puestos de a uno, en cilindros de 19 cm de diámetro por 25 cm de alto, lleno con agua a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  hasta los 15 cm de profundidad, y se midió el tiempo hasta que los animales dejaron de intentar flotar (Petit-Demouliere, Chenu et al. 2005). Se consideró que los animales estaban quietos cuando solo hacían unos movimientos mínimos para mantenerse flotando, comparado con los que hacían al comienzo del ensayo. Luego de finalizado el ensayo los animales fueron secados con una toalla y puestos nuevamente en su jaula.

# **Capítulo 1**

## **1.1 Objetivos específicos**

El objetivo específico de este capítulo es definir si distintos tipos de tumor (colon, mama, y pulmón) inducen cambios en el transcriptoma del cerebro, e identificar cuales son las regiones del cerebro donde estos cambios ocurren.

## **1.2 Resultados**

### **1.2.1 Establecimiento de cambios a nivel de neurotransmisores.**

Los análisis de expresión mediante el uso de microarreglos constituyen una metodología costosa y de alta complejidad. Previo al inicio de los análisis de expresión por microarreglos se decidió poner a prueba el diseño experimental a través de la medición de los niveles de neurotransmisores en el cerebro. Para esto se utilizó una técnica de menor complejidad y costo como la cromatografía líquida de alta presión o HPLC. Como fue descrito en la introducción, existen datos en la bibliografía donde a través de la utilización de la técnica de HPLC fue posible detectar cambios en los niveles de neurotransmisores en el cerebro como consecuencia de la presencia de células tumorales en la periferia (Chuluyan, Wolcott et al. 2000)

En esta tesis se utilizó la línea celular CT26.wt, generada a partir de un carcinoma de colon murino ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)). Dicha línea fue seleccionada dada la importancia del cáncer de colon en cuanto su incidencia en humanos y a la experiencia acumulada en el laboratorio del Director de Tesis en el manejo de la misma (Ledda, Adris et al. 1996; Adris, Klein et al. 1999; Adris, Chuluyan et al. 2000),

Se analizaron tres regiones del cerebro a tres tiempos experimentales. Las regiones del cerebro seleccionadas para ser estudiadas fueron el hipotálamo, la corteza prefrontal, y el tallo cerebral. El criterio de selección se basó en las funciones de cada región, en resultados preliminares de nuestro laboratorio y en antecedentes descriptos en la bibliografía.

El conocimiento existente sobre la función del hipotálamo como integrador de la información proveniente de la periferia, fue la principal razón para seleccionar a esta región.

En cuanto a la corteza prefrontal y al tallo cerebral, si bien por un lado ambas tienen conexiones con el hipotálamo, por otro, están involucrados en funciones muy diferentes del sistema nervioso central. Una posibilidad es que el reconocimiento de las células tumorales en la periferia sea sentido por alguna región del cerebro relacionada con el control de funciones vegetativas primarias, tal es el caso del tallo cerebral. Por el contrario, la corteza prefrontal está involucrada en funciones de integración de información, entonces quizás independientemente de donde se sense en primera instancia la presencia de las células tumorales en la periferia, en algún momento esta información pueda ser integrada en la corteza cerebral. El estudiar estas tres regiones nos permite cubrir desde las funciones más primitivas del sistema nervioso central hasta las funciones con aparición más tardía en la evolución.

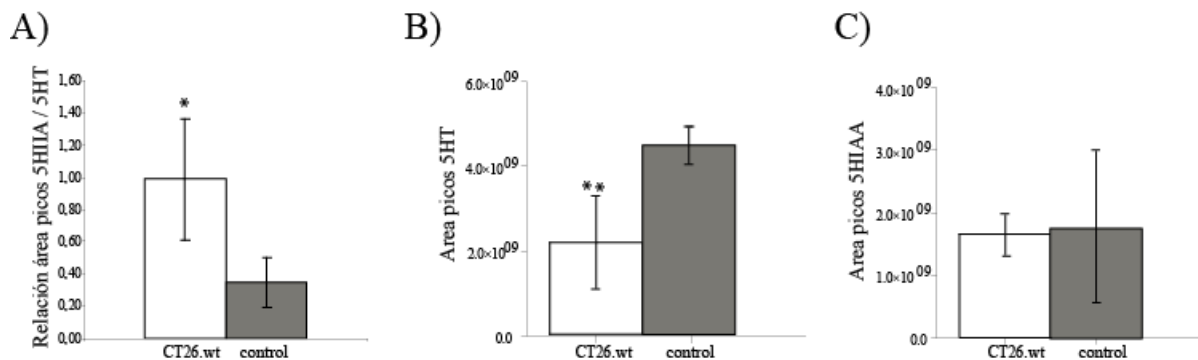
Los tiempos experimentales fueron 18 hs, 3 y 8 días. La elección de los tiempos fue pensada de manera de poder cubrir desde estadios tempranos en el desarrollo tumoral, cuando el tumor aun no es palpable (18 h. y 3 días), hasta estadios tardíos (8 días), cuando ya los tumores son palpables.

Para poder evaluar si la presencia de células tumorales en crecimiento en la periferia son capaces de generar cambios en los niveles de neurotransmisores

en el cerebro se inyectaron 5 animales en forma subcutánea con  $1 \times 10^6$  células de la línea CT26.wt resuspendidas en PBS (materiales y métodos), mientras que el grupo control constó de otros tantos animales inyectados con el mismo volumen solo de PBS. A cada uno de los tiempos experimentales los animales fueron sacrificados, los cerebros disecados, y las regiones de interés fueron pesadas y procesadas para ser analizadas en el HPLC (materiales y métodos).

Los neurotransmisores analizados fueron dopamina, serotonina, norepinefrina, y sus respectivos metabolitos, ácido homovainillínico (HVA) y ácido 3,4-dihidroxyfenilacético (DOPAC) en el caso de dopamina, ácido 5-hidroxyindolacético (5Hiaa) en caso de serotonina, y 3-metoxi, 4-hidroxifeniletilenglicol (MHPG) en el caso de norepinefrina. La cuantificación de los niveles de cada neurotransmisor y metabolito se llevó a cabo calculando el área debajo de cada pico (materiales y métodos). Como índice de recambio de neurotransmisores se utiliza la relación entre cada neurotransmisor y su respectivo metabolito (Lavielle, Tassin et al. 1979; Chuluyan, Wolcott et al. 2000)

Como resultado de estos estudios fue posible detectar cambios significativos en la relación 5HIAA/serotonina (5HT) en el hipotálamo a los tres días posteriores a la inyección de los células (figura 1.1 A). El cambio en la relación estuvo dado por una disminución de los niveles de serotonina en el hipotálamo de los animales portadores de tumor (figura 1.1 B y C).



**Figura 1.1. Efecto de la presencia de células tumorales en la periferia sobre el metabolismo de la serotonina.** A) Relación entre el área de los picos correspondientes a 5HIAA y serotonina (5HT), B) Área de los picos correspondientes a 5HT normalizados por el peso de la muestra disecada, C) Área de los picos correspondientes a 5HIAA normalizados por el peso de la muestra disecada. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$

Estos resultados muestran que el cerebro puede responder a la presencia de células de carcinoma de colon CT26.wt en la periferia, modificando el metabolismo de la serotonina en el hipotálamo.

Si bien datos previos de la bibliografía indican que es posible detectar diferencias en las relaciones de todos los neurotransmisores, es necesario tener en cuenta que fueron obtenidos con otra línea celular y a partir de 10 días posteriores a la inyección de las células (Chuluyan, Wolcott et al. 2000). No obstante los resultados obtenidos coinciden con datos previos de la bibliografía en cuanto a la identificación del hipotálamo como la región más sensible a la presencia de células tumorales en la periferia.

## 1.2.2 Estudios transcripcionales mediante el uso de microarreglos

### 1.2.2.a Diseño experimental.

Dado que a través del estudio de los niveles de neurotransmisores fue posible determinar que en el modelo experimental utilizado, el sistema

nervioso central es capaz de reaccionar frente a la presencia de células tumorales en la periferia, se decidió avanzar con los estudios a nivel transcripcional.

Para poder evaluar si la presencia de células tumorales en crecimiento en la periferia es capaz de generar cambios en los niveles de expresión de genes en el cerebro se diseñó un esquema experimental como el que se muestra en la figura 1.4. A la línea CT26.wt se le sumaron otras dos líneas tumorales murinas, la línea 4T-1 obtenida a partir de un carcinoma de mama, y la línea LL2 (LLC1) obtenida a partir de un carcinoma de pulmón ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)). De esta forma se trabajó con modelos tumorales representando tumores de alta incidencia en la población humana, como son el cáncer de colon, el de mama y el de pulmón.

En cada uno de los modelos tumorales se estudiaron tres regiones del cerebro a tres tiempos experimentales. A pesar de haber detectado cambios solo en el hipotálamo a los 3 días de inyectadas las células tumorales, tanto las regiones del cerebro, como los tiempos experimentales estudiados fueron similares al de los estudios de neurotransmisores. Esto se decidió en primer lugar porque se trabajó con dos líneas celulares nuevas de las cuales no se tenían datos a nivel de neurotransmisores. En segundo lugar porque la probabilidad de detectar genes con expresión diferencial es proporcional a la cantidad de genes analizados y dado que en los microarreglos utilizados en esta tesis se analizan alrededor de 9000 genes, se estimaron altas las probabilidades de detectar cambios a nivel transcripcional a pesar de no haberlo hecho a nivel de neurotransmisores.

Cada región del cerebro en cada tiempo experimental y para cada uno de los modelos tumorales, conformó un punto experimental. De esta forma, se analizaron veintisiete puntos experimentales, nueve para cada modelo tumoral.

A su vez, cada punto experimental fue repetido al menos 4 veces (réplicas biológicas). Para cada réplica biológica de cada punto experimental se utilizaron 30 animales, 15 para el grupo tumor y 15 para el grupo control, lo que constituyó un total de 1100 ratones aproximadamente entre los tres modelos tumorales y los tres tiempos experimentales.

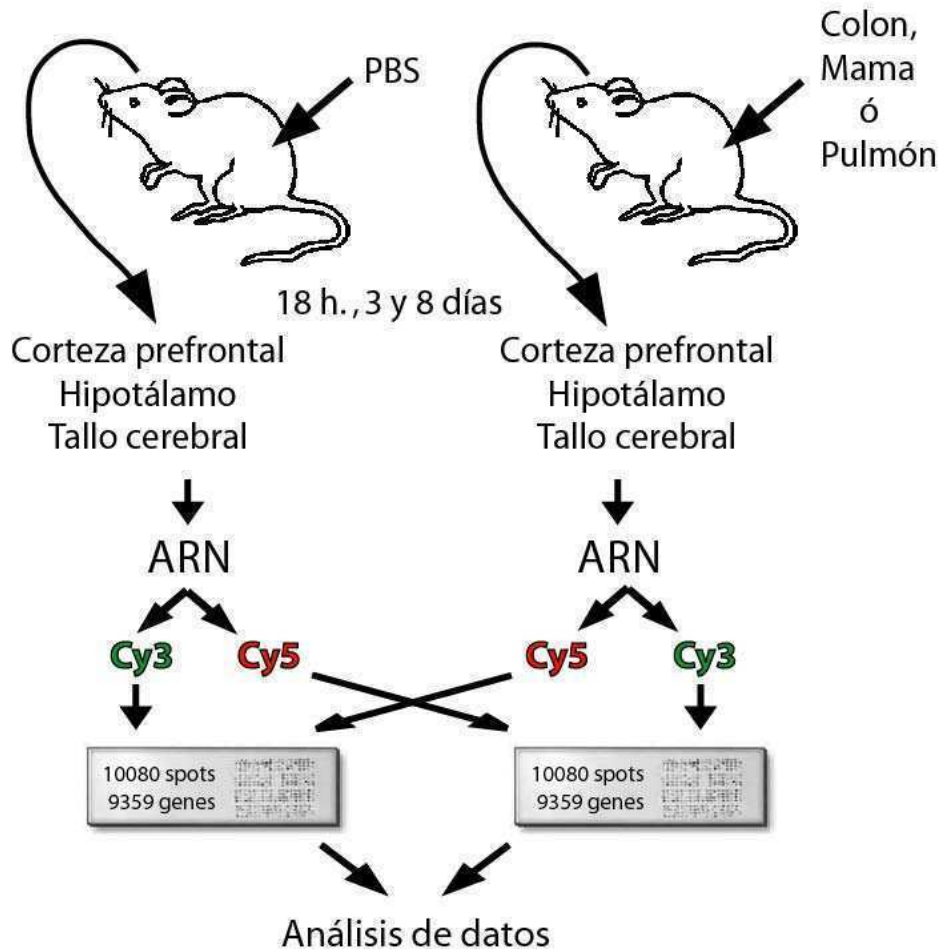
Al agrupar las 15 muestras de cada una de las regiones, se aseguró tener suficiente cantidad de ARN (especialmente del hipotálamo y de la corteza prefrontal) para poder obtener sondas con cantidades detectables de los mensajeros de baja abundancia. Dado que los mensajeros expresados en baja proporción han sido postulados como los responsables de la especificación del fenotipo neuronal (Chaudhari and Hahn 1983), cobra sentido cualquier esfuerzo por detectarlos.

Luego de la puesta a punto de cada una de las etapas necesarias para un estudio de microarreglos (definición de la química de la superficie de los microarreglos, de la solución de resuspensión de la librería de oligonucleótidos, de las condiciones de impresión de los microarreglos, procesamiento post impresión, pre-hibridación, hibridación, obtención y cuantificación de las sondas fluorescentes, lavados, escaneo de los microarreglos, procesamiento de las imágenes obtenidas y análisis de datos) se definieron los protocolos experimentales para cada una de ellas (materiales y métodos) y se iniciaron los estudios propiamente dichos.

A 18 horas, 3 días y 8 días posteriores a la inyección de las células, los animales fueron sacrificados y sus cerebros disecados. El ARN extraído de cada pool fue retrotranscrito a c-DNA, marcado fluorescentemente, e hibridado sobre microarreglos impresos con 10.000 oligonucleótidos, representando 9968



genes murinos, en un esquema de intercambio de colorantes (Dye swap) (Figura 1.2 y Materiales y métodos).



**Figura 1.2 Esquema del diseño experimental.**

Los modelos tumorales fueron inducidos por inyección sub-cutánea de líneas tumorales murinas en ratones singénicos para cada una de ellas. En el caso de la línea CT26.wt fueron inyectadas  $1 \times 10^6$  células, en ratones machos Balb-c. Hembras Balb-c fueron inyectadas con  $1 \times 10^5$  células de la línea 4T-1, mientras que de la línea LL2/LLC1 se inyectaron  $1 \times 10^6$  células en ratones machos de la cepa C57Bl/6. Las cantidades de células inyectadas garantizaron que el 100% de los animales desarrolle tumor, requisito fundamental para el estudio desarrollado.

Para el diseño de los grupos control de cada tumor, se definió un control ideal. Éste debería ser capaz de controlar los efectos que podrían ocurrir debido a la inyección (el hecho de que el animal reciba una punción) y a la entrada repentina de una cantidad de células en un determinado volumen. Por lo tanto teniendo en cuenta estas condiciones, cuatro fueron las posibilidades que surgieron como plausibles de ser utilizadas:

- a) Inyección de la misma cantidad y volumen de células normales de cada uno de los tejidos de donde provienen cada uno de los tumores.
- b) Inyección de la misma cantidad y volumen de células tumorales, pero irradiadas, de manera tal que no puedan dividirse y proliferar
- c) Inyección de la misma cantidad y volumen de células tumorales, pero inactivadas por calor
- d) Inyección del mismo volumen, solo del vehículo en el cual estaban resuspendidas las células tumorales.

Con respecto a la inyección de células normales, si bien éstas serían un buen control de entrada de células al organismo, el hecho de que sean inyectadas en forma ectópica, haría que entraran en un forma particular de apoptosis conocida como “anoikis”, la cuál es inducida por la pérdida de adhesión de la célula a su entorno. Este fenómeno podría ser detectado a nivel del sistema nervioso central, con la consecuente alteración del transcriptoma cerebral. Por lo tanto, si bien los cambios ocurridos debido a la inyección y a la entrada de células estarían controlados, este tipo de control introduciría otros cambios con respecto al modelo tumoral, que podrían tener como consecuencia

la aparición tanto de falsos positivos como de falsos negativos. Por ejemplo, si un determinado transcrito disminuyera su nivel de expresión debido a la entrada en anoikis por parte de las células normales, permaneciendo su nivel inalterado en los animales inyectados con células tumorales, entonces, este transcrito sería considerado como diferencial, con un nivel de expresión aumentado en los animales portadores de tumor, transformándose en un falso positivo.

La inyección de células tumorales irradiadas serviría de control para la entrada de células al organismo y específicamente del mismo tipo de células que el grupo tumor. El inconveniente que tiene este control, es que a pesar de no dividirse, estas células permanecen vivas durante un tiempo aun sin replicarse y son capaces de secretar los mismos factores que las células tumorales no irradiadas. Por lo tanto, si la señal detectada por el sistema nervioso central es dependiente de los factores liberados por las células tumorales, parte de los cambios ocurridos en el transcriptoma podrían ser similares en ambos grupos. En ese caso el control enmascararía cambios que realmente hayan sido inducidos por la presencia de células tumorales en la periferia.

En cuanto a la inyección de células inactivadas por calor, tendrían las ventajas ya mencionadas para las células tumorales irradiadas. Este tipo de células han sido usadas para mejorar la respuesta inmunológica en vacunas antitumorales (Harada, Matsuzaki et al. 1994). Por lo tanto existiría la posibilidad de que estas células generen una respuesta inmune en el hospedador. De ocurrir, es altamente probable que esta reacción inmune induzca cambios en los niveles transcripcionales del sistema nervioso central. Por lo tanto, en el caso de que la respuesta inmune sea similar en las células

tumorales inactivadas y en las no inactivadas esto generaría la obtención de falsos negativos. En el caso contrario, se obtendrían falsos positivos.

Por lo tanto, como control, se decidió utilizar animales inyectados con buffer PBS (en el mismo buffer en el cuál fueron resuspendidas las células). La desventaja de este control es que podrían aparecer genes diferencialmente expresados como consecuencia del efecto generado por la entrada de células al organismo, mas allá de que éstas sean tumorales o no. Esta desventaja puede ser controlada dado que en nuestro diseño experimental utilizamos tres líneas tumorales distintas. Por lo tanto, si el único estímulo detectado por el sistema nervioso central fuese “entrada de células” al organismo, independientemente de que tipo celular sea el inyectado, entonces, se podría predecir que el efecto dado que es inespecífico para el tipo celular, debería ser similar en cualquiera de los tres modelos tumorales. Es decir, no deberían encontrarse diferencias significativas entre los genes diferenciales de cada uno de los modelos. Por el contrario, si se encuentran diferencias, podemos asumir entonces que las mismas son inducidas no solo por la entrada de células, sino fundamentalmente por el “tipo” de célula que se esta inyectando.

#### **1.2.2.b. Identificación de genes diferenciales.**

Luego del análisis de los datos surgidos a partir de los estudios de microarreglos, para cada punto experimental, se obtuvo un listado de genes con el nivel de cambio y un valor p asociado (Materiales y métodos).

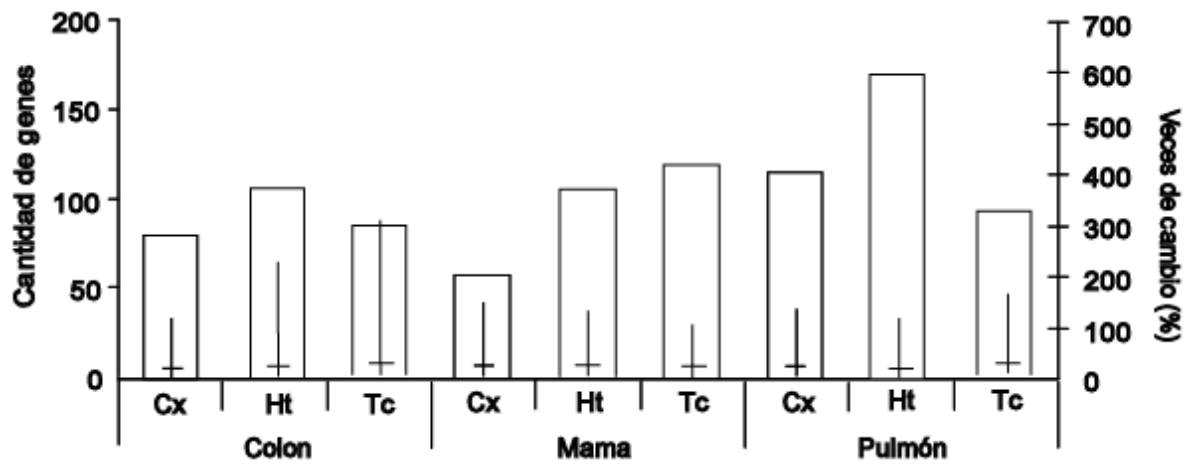
Para definir los genes candidatos a tener expresión diferencial como primera medida se definió un criterio complementario a su significancia estadística, para que un gen fuese considerado como diferencial. Coincidentemente con lo descrito en la bibliografía en cuanto a los cambios en los niveles de expresión observados en el sistema nervioso central (Mirnics and

Pevsner 2004);(Cirelli, Gutierrez et al. 2004), para la mayoría de los genes, los niveles de cambio en todos los modelos y en todas las regiones fueron bajos (entre 5 y 50%). Por lo tanto, para que un gen fuese considerado como expresado en forma diferencial debía cumplir con dos requisitos:

- a) Tener un nivel de cambio mayor al 20% con un valor de  $p < 0,05$  en por lo menos uno de los tiempos experimentales
- b) Los genes que pasaron el requisito a) a su vez debían sufrir cambios en sus niveles de expresión en un mismo sentido (ya se aumentados, o disminuidos en los animales portadores de tumor, comparado con los animales control) en por lo menos dos tiempos experimentales consecutivos.

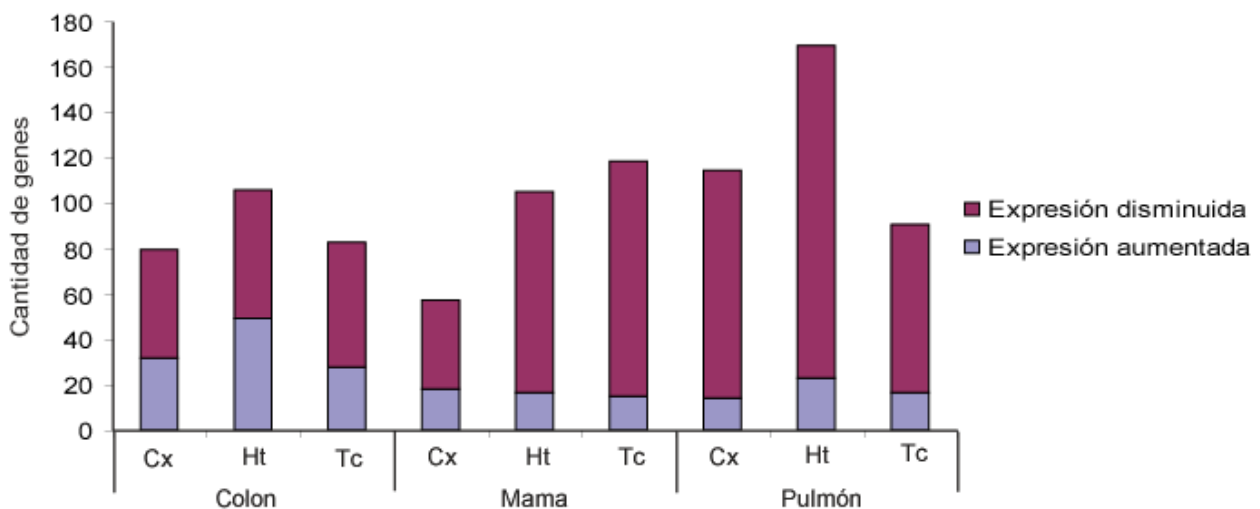
De esta forma se obtuvieron un total de 658 genes diferencialmente expresados, de los cuales 322 fueron observados en el modelo de cáncer de Pulmón y 255 tanto en el modelo de cáncer de mama, como en el de cáncer de Colon. La diferencia entre la suma de los genes de cada modelo, y el número total, se debe a que hay genes compartidos entre los modelos, pero que para la suma total fueron contados una sola vez.

En todas las regiones y tumores estudiados, se detectaron genes candidatos a ser diferenciales (Fig. 1.3). Al estudiar cada una de las regiones se puede observar que el hipotálamo es la región donde mayor cantidad de cambios se observan, principalmente en el modelo de cáncer de pulmón.



**Figura 1.3: Cantidad de genes candidatos a diferenciales por tumor y región.** En el eje y se muestra la cantidad de genes candidatos a ser diferenciales por región y por modelo tumoral, así como la media de los niveles de cambio expresado como  $\text{Log}_2$  de la relación Tratamiento/Control. La barra horizontal dentro de cada una de las barras corresponde a la media de cambio de cada región, y las líneas verticales dentro de cada barra corresponden a los percentilos 5 y 95.

En cuanto al sentido en el cambio de expresión en todas las regiones y modelos tumorales, la mayoría de los genes candidatos tienen su nivel de expresión disminuido en los animales portadores de tumor, comparado con los animales control (Figura 1.4).



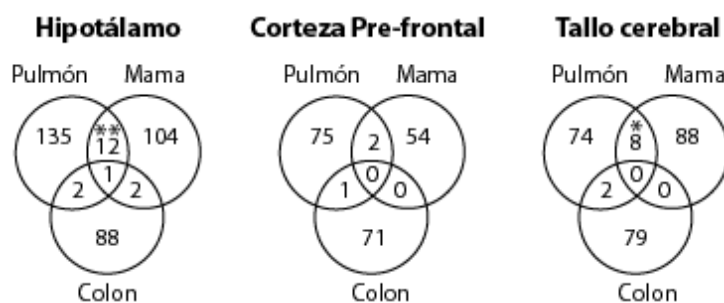
**Figura 1.4: Cantidad de genes con niveles de expresión aumentada y disminuida por tumor y región.** En el eje y se muestra la cantidad de genes candidatos a ser diferenciales por región

y por modelo tumoral. Expresión disminuida o aumentada se refiere a la relación entre los animales portadores de tumor comparado con los animales control.

Estos resultados sugieren que en todas las regiones cerebrales estudiadas, la presencia de células tumorales en la periferia estaría induciendo cambios a nivel transcripcional. En cuanto al sentido en los cambios de niveles de expresión, y especialmente en los modelos de cáncer de mama y pulmón, los resultados sugieren una baja en los niveles transcripcionales del cerebro en los animales portadores de tumor. Con respecto a las regiones cerebrales estudiadas, el hipotálamo aparece como la región mas “sensible” a la presencia de células tumorales en la periferia.

### **1.2.3 Correlación entre los diferentes modelos tumorales**

A continuación se decidió estudiar el grado de correlación existente entre los tres modelos, en cuanto a cuales fueron los genes que modificaron su nivel de expresión. Al comparar los modelos entre sí, se observó que los modelos de cáncer de colon y pulmón compartían un 2,9% de los genes y un 2,6% era compartido entre los modelos de cáncer de mama y colon. Entre los modelos de cáncer de pulmón y mama hubo un 10,1% de genes compartidos ( $p < 10^{-8}$ ) (Figura 1.5). Coincidentemente, los análisis de correlación por el método Kendal rank mostraron que los modelos de cáncer de pulmón y mama eran los de mayor índice correlación entre sí, tanto en la corteza prefrontal, como en el hipotálamo, mientras que el menor índice de correlación se obtuvo entre los modelos de colon y pulmón.



**Figura 1.5: Genes compartidos entre tumores.** Los diagramas muestran las intersecciones entre los 3 modelos en cada una de las áreas cerebrales. Los números indican la cantidad de genes expresados en forma diferencial, compartidos entre los modelos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

Estos resultados apoyan fuertemente el modelo experimental utilizado, dado que los modelos con mayor grado de correlación en cuanto a los genes que modifican su nivel de expresión, son justamente los modelos que mas difieren en entre sí experimentalmente. Los modelos de cáncer de mama y pulmón difieren en la cepa, el sexo, el número de células y en el volumen en que fueron inyectadas. Estos datos sugieren fuertemente que los cambios en los niveles de expresión en el cerebro no serian dependientes de la cepa o del sexo de los animales, como así tampoco dependientes de la cantidad de células o del volumen en las que estas fueron inyectadas, sino que dependerían fundamentalmente del tipo de célula utilizada para la inducción de los tumores.

### 1.2.4 Estudios en el tiempo

La identificación de los genes diferenciales de cada punto experimental mostró que la gran mayoría de estos tenían picos de expresión ya sea a las 18hs o los 8 días post inyección. En función de esto se decidió estudiar como se distribuían estos cambios a través del tiempo para cada región de cada uno de los modelos tumorales. El estudio de los perfiles de cambio en los niveles de expresión a través del tiempo mostró claramente dos grupos de genes. Los genes



“tempranos” con picos de cambio en los niveles de expresión principalmente a las 18hs post inyección de las células tumorales, y los genes “tardíos” con picos de cambio en los niveles de expresión observados principalmente a los 8 días post inyección (fig 1.6).

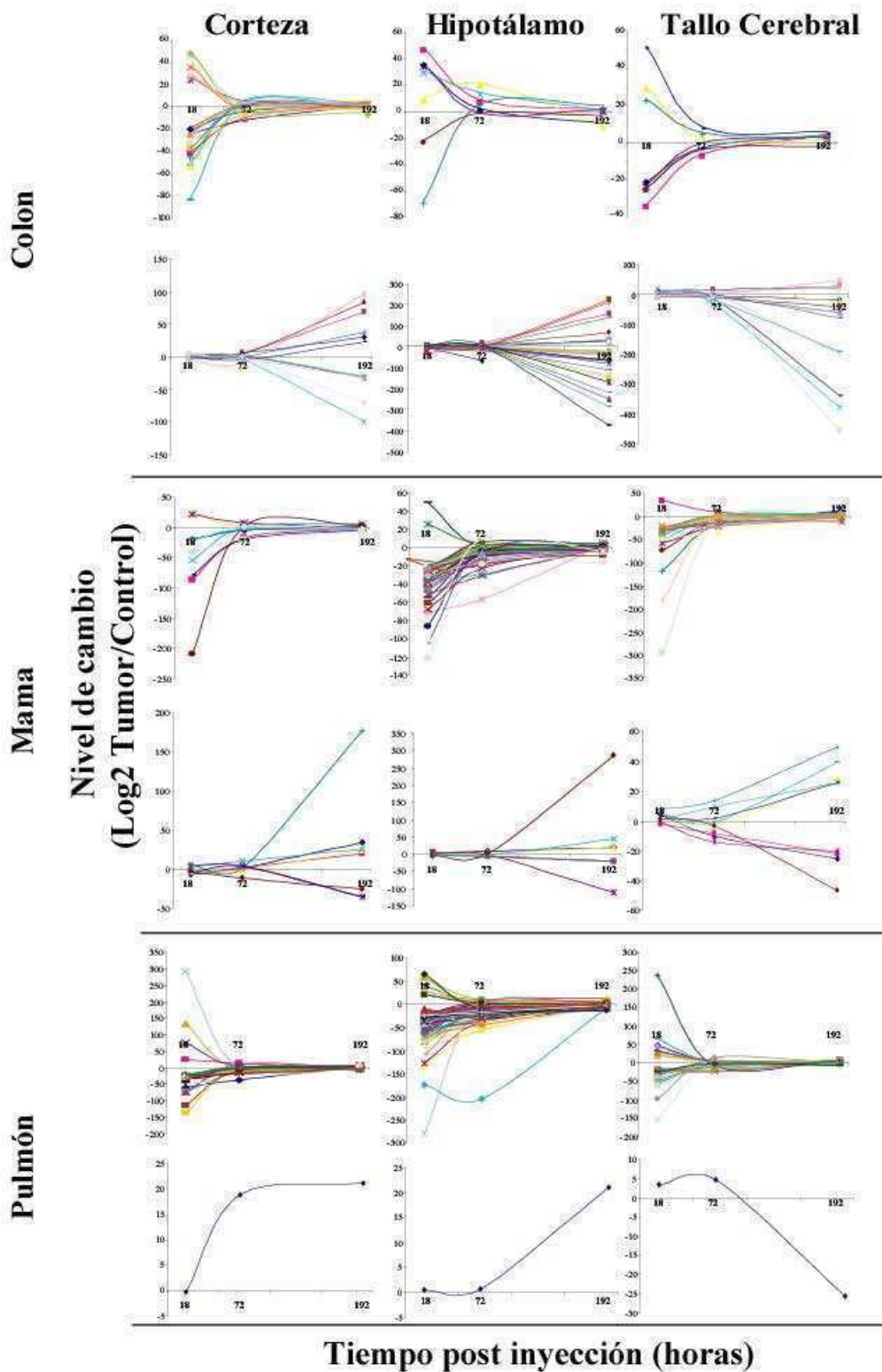
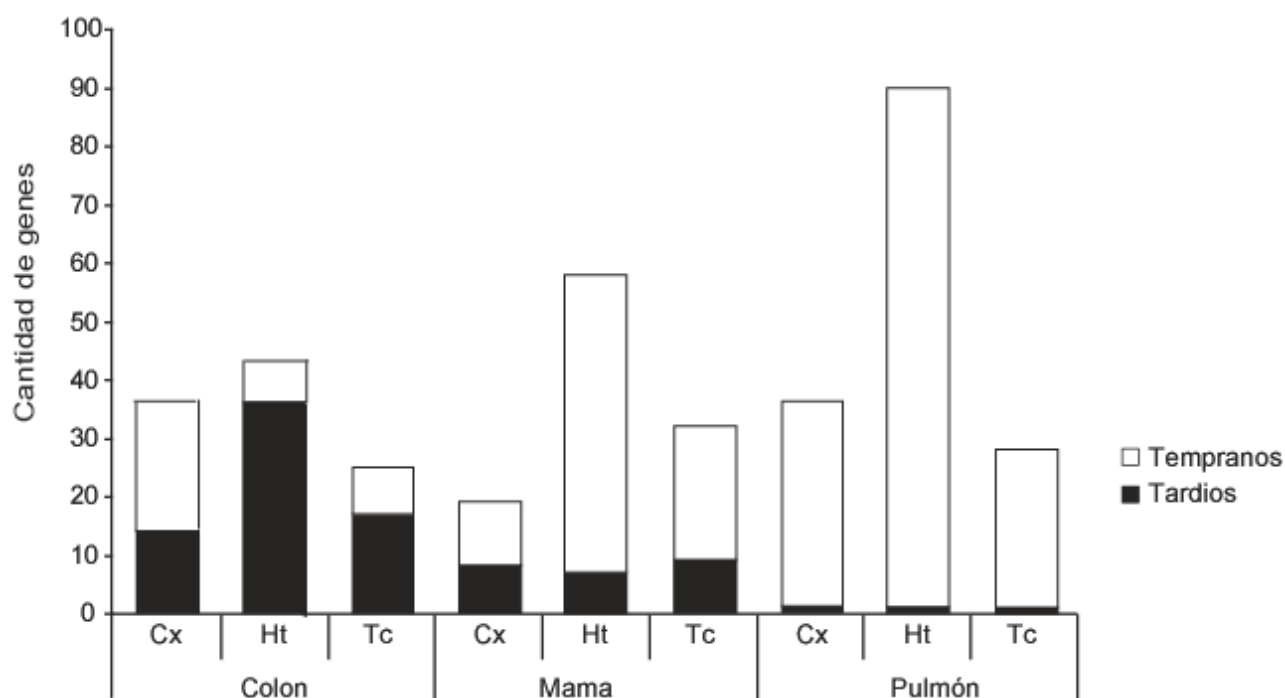


Figura 1.6: Perfiles de expresión en el tiempo de los genes diferenciales de cada región y modelos tumoral. En el panel superior de cada modelo se grafican los perfiles correspondientes a los genes dentro del grupo denominado “tempranos”, mientras que en el panel inferior se grafican los tardíos

Los perfiles de cambio de expresión en el tiempo, fueron específicos para cada modelo tumoral. El modelo de cáncer de colon mostró cambios en la expresión de genes mayoritariamente en tiempos tardíos. Lo opuesto ocurrió en el modelo de cáncer de pulmón donde la mayoría de los genes fueron tempranos. El modelo de cáncer de mama mostró cantidades comparables entre genes tempranos y tardíos (Figura 1.7)



**Figura 1.7: Genes tempranos y tardíos por tumor y región.** Las barras representan cantidades total de genes diferenciales para cada región y tumor.

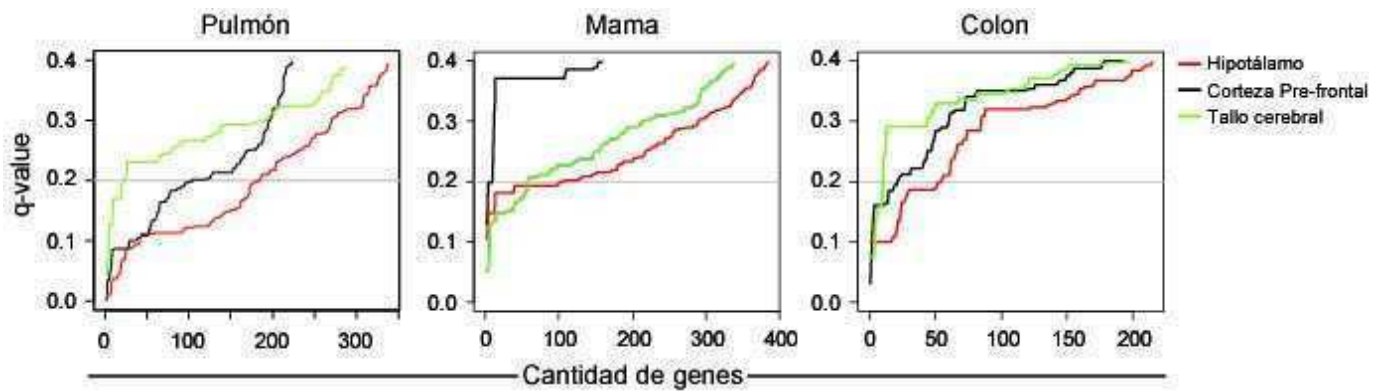
Los perfiles de expresión en el tiempo son independientes de la cantidad de células inyectadas ya que los modelos de cáncer de colon y de pulmón, a pesar de haber sido inyectados con la misma cantidad y volumen de células, presentan perfiles de expresión claramente diferentes.

### 1.2.5 Corrección por comparaciones múltiples

En los estudios donde se analizan simultáneamente una gran cantidad de variables, la probabilidad de identificar como diferencial a alguna variable que

no lo sea (error de tipo I) aumenta considerablemente a medida que aumenta el número de variables analizadas. En los ensayos de microarreglos se analizan simultáneamente los niveles de expresión de miles de genes (variables), para identificar cuales están expresados en forma diferencial. Por lo tanto, en este tipo de estudios es fundamental corregir el aumento en la probabilidad de cometer error de tipo I. Existen diferentes métodos para corregir el efecto de las comparaciones múltiples, específicamente para los estudios de microarreglos se utiliza el método de la tasa de falsos positivos o *False discovery rate* (FDR) (Benjamini, Drai et al. 2001). El método FDR permite definir la proporción de hipótesis nulas rechazadas incorrectamente, dentro las hipótesis nulas rechazadas. Este método permite estimar un q-valor que es el valor mínimo de FDR al que la prueba puede ser considerada significativa.

Previo a la corrección por comparaciones múltiples el hipotálamo de los animales inyectados con células de carcinoma de pulmón, fue de todas las regiones, de todos los modelos tumorales, la que mostró mayor cantidad de genes con niveles de expresión modificados en respuesta a células tumorales en la periferia (Figuras 1.7). Luego de la corrección por comparaciones múltiples, fijando un valor de q de 20% en todos los modelos tumorales, el hipotálamo fue la región con mayor cantidad de genes con expresión modificada en los tres modelos tumorales (fig.1.8). En el modelo de cáncer de pulmón aproximadamente 180 genes modifican su nivel de expresión, contra 60 y 80 genes aproximadamente en los modelos de cáncer de colon y mama respectivamente (fig. 1.8).



**Figura 1.8. Análisis por comparaciones múltiples.** Las figuras muestran los valores q (q values) para cada una de las regiones de cada uno de los tumores.

Estos resultados confirman que el hipotálamo, es la región que mayores cambios a nivel de expresión génica muestra en los tres modelos tumorales como consecuencia de la existencia de células tumorales en crecimiento en la periferia. Asimismo, el hipotálamo en el modelo de cáncer de pulmón es el que muestra mayor cantidad de genes diferenciales.

El valor de  $q=20\%$ , significa que se espera que el 80% de los genes sean verdaderos diferenciales. Se tomó un valor de 20% debido a que con valores por debajo de ese nivel habría muy poca cantidad de genes para poder realizar comparaciones entre regiones, especialmente en los modelos de cáncer de mama y colon (fig. 1.8).

### 1.2.6 Validación por PCR en tiempo real

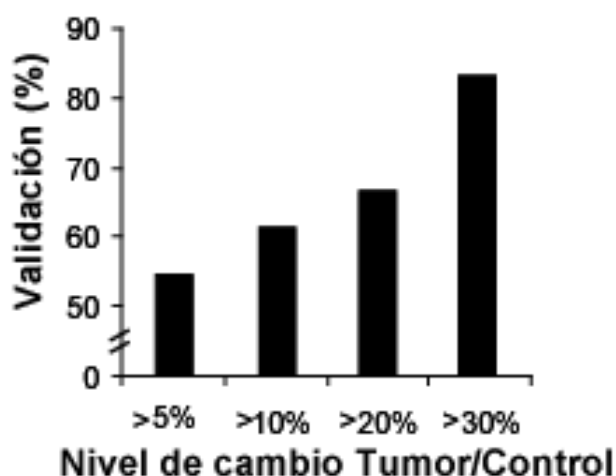
Con el objetivo de obtener una validación de los datos obtenidos por microarreglos, se utilizó la técnica de PCR en tiempo real. En base a los resultados previos, los estudios de validación se centraron en el hipotálamo del modelo de cáncer de pulmón.

Del grupo de genes con expresión diferencial se seleccionaron para la validación, solo los genes de los cuales se conocía su función (genes anotados).

Cada gen fue analizado en tres o cuatro muestras independientes (repeticiones biológicas) y a su vez cada muestra fue analizada por triplicado (repeticiones técnicas). La mayoría de los genes fueron analizados en los tres tiempos experimentales.

Los niveles de expresión de los transcritos analizados fueron normalizados usando dos genes constitutivos, el gen codificante para la Beta 2 microglobulina, y el gen codificante para Beta-actina (Materiales y métodos). Los datos obtenidos fueron analizados de acuerdo a (Alvarez, Vila-Ortiz et al. 2007) (Materiales y métodos).

Los porcentajes de validación aumentaron a medida que aumentó el nivel de cambio. De todos los genes analizados un 55% pudieron ser validados por PCR en tiempo real. Cuando los genes analizados fueron separados por niveles de cambio, el porcentaje de validación subió hasta casi un 80% cuando el nivel de cambio de expresión según los datos de microarrays fue superior al 30% (Figura 1.9). Estos porcentajes de validación coinciden con lo descrito en la bibliografía, sobre genes con bajos niveles de cambio de expresión en el sistema nervioso central (Wurmbach, Yuen et al. 2003).



**Figura 1.9: Validación por PCR en tiempo real.** Los genes seleccionados para ser validados del hipotálamo del modelo de cáncer de pulmón, fueron agrupados de acuerdo al cambio en sus niveles de transcripción obtenidos por microarreglos. Las barras indican los porcentajes de validación obtenidos.

Ninguno de los genes validados pudo ser identificado como diferencial en los otros dos modelos tumorales, mostrando nuevamente que los cambios en el transcriptoma son específicos de cada modelo tumoral.

### **1.2.7 Análisis funcional de los genes validados**

El listado de los genes que fueron validados se muestra en la tabla 1.1. La posible función de cada uno de los genes que resultó validado fue analizada en el contexto del sistema nervioso central utilizando los datos disponibles en la bibliografía. La mayoría de los genes pudo ser relacionado con la función de remodelación y/o transmisión sináptica. Dentro de estos se encuentran, *ataxin-2 (Atxn-2)* relacionado con transmisión dopaminérgica, (Boesch, Donnemiller et al. 2004; Wullner, Reimold et al. 2005); *gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like (Gabarapl2)*, asociada con la transmisión de GABA y con la fusión de vesículas sinápticas (Okazaki, Yan et al. 2000) y *bone morphogenetic protein 15 (BMP15)*, un miembro de la familia de TGF $\beta$  involucrada en el proceso de guía axonal (Charron and Tessier-Lavigne 2005). También fue posible validar la sobre expresión de los transcritos codificantes para el receptor A2 de tromboxano (*Tbxa2r*), un importante mediador lipídico generado en situaciones de stress oxidativo y que fue asociado con mielinización de oligodendrocitos (Ramamurthy, Mir et al. 2006), *contactin-2* un gen cuyo producto esta involucrado con remodelación sináptica (Furley, Morton et al. 1990) y oxitocina, una hormona pleiotrópica involucrada en una variedad de procesos dentro de los cuales esta descrito un rol en remodelación de conexiones sinápticas (Theodosis, Piet et al. 2004). Finalmente se pudieron validar los niveles de expresión de dos transcritos cuyos productos están relacionados con procesos metabólicos. Por un lado se validó la disminución de

la expresión del transcripto codificante para Atp5k una subunidad de la ATP sintetasa mitocondrial (Dunnick, Blackshear et al. 2006) y por otro la sobreexpresión de la Nad quinasa, involucrada en la síntesis de NADP(+) a partir de NAD(+) y ATP (Mailloux, Singh et al. 2006).

ID Gen (Símbolo)	Tiempo experimental (hs)	Cambio en Microarreglo (%)	Cambio por PCR en tiempo real (%)
20239 (Atnx2)	18	-52.16 ± 21.5	-27.43 ± 8.5
	72	-28.06 ± 12.1	-25.31 ± 7.1
	192	-2.13 ± 4.4	-
93739 (Gabarapl2)	18	-18.55 ± 10.0	-31.62 ± 7.5
	72	-6.61 ± 4.4	-18.8 ± 2.4
	192	-7.31 ± 2.9	-19.89 ± 13.1
12155 (Bmp15)	18	-162.55 ± 13.3	-31.95 ± 5.9
	72	-74.80 ± 63.2	-18.89 ± 2.4
	192	-13.52 ± 15.2	N.V.
21390 (Tbxa2r)	18	20.30 ± 9.1	23.07 ± 6.0
	72	8.96 ± 15.8	-
	192	7.87 ± 0.44	-
21367 (Cntn2)	18	15.92 ± 1.9	40.54 ± 24
	72	7.03 ± 2.1	N.V.
	192	-3.35 ± 0.7	-
18429 (Oxt)	18	7.28 ± 3.9	38.54 ± 11.3
	72	7.87 ± 1.7	N.V.
	192	4.13 ± 0.9	-
11958 (Atp5k)	18	-68.88 ± 34.8	-33.3 ± 8.5
	72	-43.75 ± 23.8	-26.72 ± 5.4
	192	-3.08 ± 0.9	-
14089 (Fap)	18	-5.61 ± 1.3	-47.34 ± 12.2
	72	-27.21 ± 12.5	-35.89 ± 7.8
	192	-2.14 ± 15.8	-
16588 (Kin 17)	18	-38.16 ± 30.0	-26.74 ± 1.3
	72	-58.46 ± 23.7	-26.06 ± 3.6
	192	N.D.	-
77053 (Sun1)	18	-38.34 ± 20.8	N.V.
	72	-22.91 ± 18.1	-42.03 ± 11.2
	192	N.D.	-
192185 (Nadk)	18	10.45 ± 2.4	38.9 ± 20.4
	72	0.24 ± 2.1	-
	192	-0.38 ± 1.1	-

**Tabla 1.1: Listado de genes validados.** Los datos están expresados como el promedio de cambio ± Desv. Est. En la columna de PCR en tiempo real solo se muestran los datos de los puntos donde el gen fue validado ( $p < 0,05$ ). N.V.: no validado; - : no se obtuvieron datos.

### 1.2.8 Estudios en un órgano periférico.

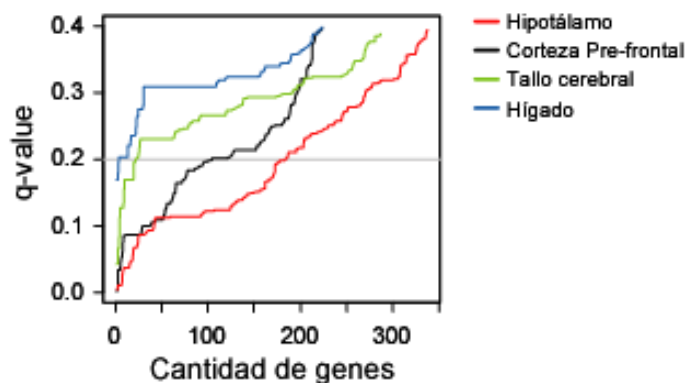
Un órgano periférico como el hígado no mostró cambios en los niveles de expresión como consecuencia de la presencia de células tumorales.

Una vez validado el hecho de que el transcriptoma del sistema nervioso central sufre cambios como consecuencia de la presencia de células tumorales



en la periferia, se decidió evaluar si lo mismo ocurría en un órgano periférico. El órgano elegido fue el hígado. El criterio para la selección se basó en el rol fundamental que cumple en el metabolismo y a la gran variedad de procesos fisiológicos de un organismo en los cuales está involucrado. El hígado aparece como un órgano sensible a los cambios fisiológicos que ocurrirían debido a la presencia de un tumor y que por lo tanto podría sufrir cambios en sus niveles transcripcionales. Todos los estudios fueron llevados a cabo en el modelo de cáncer de pulmón, debido a que fue el modelo que mostró mayor cantidad de genes diferenciales.

Contrariamente a los casi 200 genes que aparecen como diferenciales en el hipotálamo luego del análisis por comparaciones múltiples, en el hígado solo aparecen como diferenciales 3 genes (Fig. 1.10)



**Figura 1.10: Análisis por comparaciones múltiples.** La figura muestra los valores q (q values) para cada una de las regiones cerebrales y el hígado del modelo de cáncer de pulmón.

A pesar de esto, se decidió hacer una validación por PCR en tiempo real de los genes con niveles de cambio mayor al 30%. De los once genes analizados solo uno codificando para una proteína con motivos de dedos de Zinc, denominado *AN1-type domain 2A (Zfand2a)*, pudo ser validado.

De esta forma, en las condiciones en las fue llevado a cabo este experimento, un órgano periférico crucial en la fisiología del organismo como es

el hígado, prácticamente no sufrió cambios en los niveles transcripcionales de sus genes debido a la presencia de células tumorales en crecimiento. Estos resultados muestran un importante grado de sensibilidad por parte del sistema nervioso central, frente a la presencia de células tumorales en a periferia.

El hecho de no encontrar genes diferenciales en un tejido, esta indicando que en las condiciones en las que los experimentos fueron llevados a cabo, y en la forma en que los datos obtenidos de los microarreglos fueron analizados, las posibilidades de hallar falsos positivos fueron minimizadas. Por lo tanto indirectamente, esto esta diciendo que si se detectan genes candidatos a ser diferenciales, es altamente probable que se trate de verdaderos diferenciales y no de ruido del sistema.

### **1.3 Conclusiones**

En su conjunto estos resultados muestran que la presencia de células tumorales en la periferia, induce cambios en el transcriptoma del cerebro y no en un órgano periférico como el hígado. La existencia de cambios pudo ser validada por la técnica de PCR en tiempo real, para el hipotálamo de los animales inyectados con células de carcinoma de pulmón.

Si bien los cambios inducidos serían específicos para cada tipo de tumor, en los tres casos hubo coincidencias en cuanto a que los cambios fueron de baja magnitud y en que la mayoría de los genes sufrió una disminución en sus niveles de expresión.

El hipotálamo aparece como la región con mayor de cantidad de genes con sus niveles transcripcionales alterados en los tres modelos tumorales. En los animales inyectados con células de carcinoma de pulmón es en los que se

detecta la mayor cantidad de genes con cambios significativos en sus niveles transcripcionales.

El análisis funcional de los genes con su expresión diferencial validada por PCR en tiempo real mostró que en su mayoría, en el contexto del sistema nervioso central, están relacionados con procesos de remodelación de sinapsis.

## **Capítulo 2**

### **2.1 Microarreglos: Métodos locales y globales.**

La tecnología de microarreglos ofrece una variedad de caminos para responder preguntas científicas, los cuales caen dentro de dos extremos, los métodos locales y los métodos globales.

Los métodos locales tienen por objetivo la identificación de genes individuales, con cambios en su nivel de expresión entre una muestra tratada y su control. Tratar de asociar listados conteniendo unos pocos genes a fenotipos, o a procesos biológicos alterados en las muestras tratadas carece de sentido dado que tanto un fenotipo determinado, como la alteración de algún proceso biológico, pueden ser resultado del cambio de expresión de cientos de genes.

Los métodos globales se valen de la gran cantidad de información generada por los microarreglos para generar perfiles de expresión. Estos perfiles pueden incluir cambios en niveles de expresión de cientos o miles de genes simultáneamente, pudiendo ser asociados a fenotipos o permitiendo determinar cambios en procesos biológicos, etc.

El análisis de los datos hecho en el capítulo anterior tuvo características de método local. Este permitió identificar un grupo de genes que sufren cambios en los niveles de expresión como consecuencia de la presencia de células tumorales en la periferia. Si bien se pudo analizar qué rol biológico cumplen estos genes en el sistema nervioso central, no se pudo inferir cuales son las funciones biológicas que podrían estar siendo alteradas en el sistema nervioso. Este tipo de análisis también permitió identificar genes compartidos entre los distintos tumores, pero no fue posible determinar la existencia de perfiles de expresión en el cerebro característicos de cada modelo tumoral.

## **2.2 Objetivos específicos**

En función de lo expuesto anteriormente, en este capítulo, nos planteamos utilizar métodos de análisis global con el objetivo de:

- a) Correlacionar los cambios a nivel transcripcional con cambios a nivel de las funciones biológicas de las células del sistema nervioso central.
- b) Definir la existencia de firmas moleculares en el cerebro, capaces de discriminar entre los tres tipos de tumores.

## **2.3 Resultados**

### **2.3.1 Estudios funcionales**

Para tratar de comprender el significado biológico que tendrían los cambios ocurridos, se procedió a realizar un análisis funcional de la información obtenida de los microarreglos.

En el capítulo anterior se analizaron las funciones biológicas de los genes expresados diferencialmente recurriendo a la bibliografía disponible. Esto fue posible en un tiempo razonable dada la cantidad de genes analizados. Como se explicó en la introducción de este capítulo, para poder entender que procesos biológicos pueden estar modificados es necesario analizar la totalidad de los genes presentes en el microarreglo, y no solamente los genes considerados como diferenciales. Esto se hace debido a que es posible que parte de los genes que participan en un proceso biológico determinado experimenten cambios de baja magnitud en sus niveles de expresión, lo que impediría que puedan ser detectados como diferenciales, si se los analiza en forma individual. Por el contrario, si estos genes son analizados como un grupo, entonces si la mayoría sufre cambios en los niveles de expresión aunque de baja magnitud, el grupo

como tal, podría ser diferencial comparado con el control. Con esta forma de análisis se minimiza el riesgo de eliminar genes que estén experimentando cambios de baja magnitud, es decir se minimiza el riesgo de obtener falsos negativos. Por lo tanto, si previo al análisis funcional se eliminan genes que en forma individual no hayan sido detectados como diferenciales, lo que en realidad se está eliminando es una valiosa fuente de información.

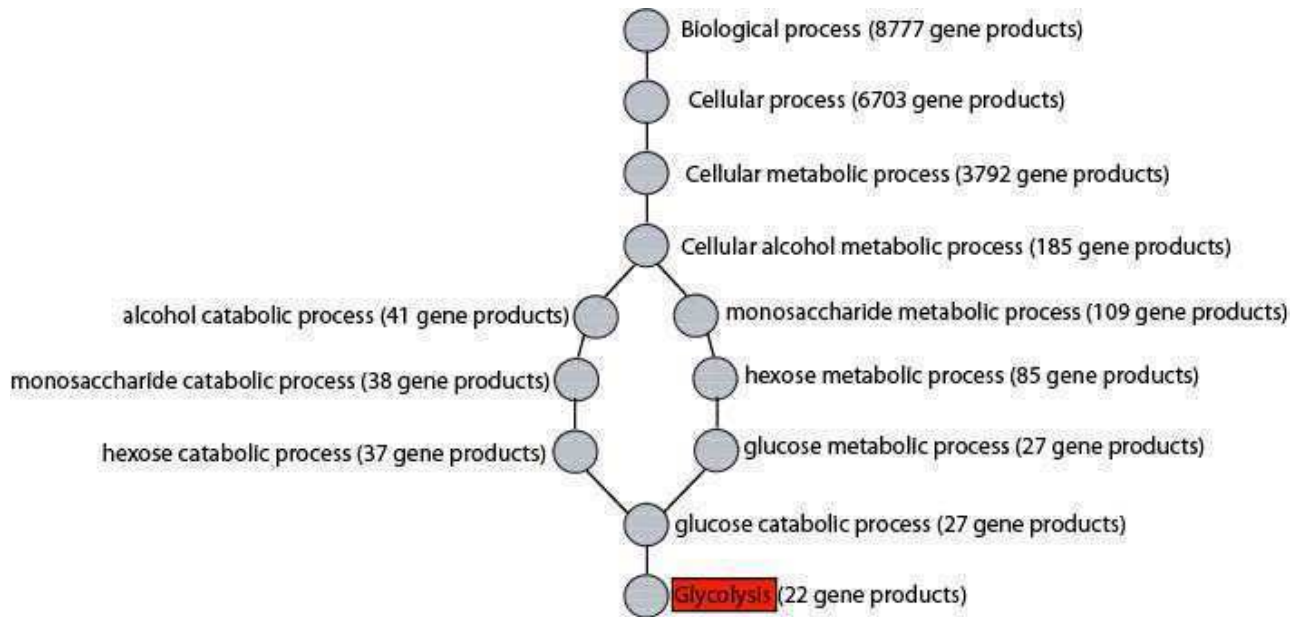
Obviamente analizar la función biológica de más de 9000 genes uno a uno es una tarea imposible, sin embargo en la actualidad es posible llevar a cabo análisis funcionales incluso con el genoma completo de un organismo. Esto puede ser realizado en gran medida gracias a la existencia tanto de una base de datos donde se agrupan los genes de acuerdo a sus funciones biológicas conocidas, como así también gracias a métodos computacionales que permiten analizar la inmensa masa de información contenida en esa base de datos. La base de datos mencionada se denomina GENE ONTOLOGY ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)) (Ashburner, Ball et al. 2000) y surgió como resultado del proyecto denominado GENE ONTOLOGY PROJECT (GO project) iniciado en 1998. Este proyecto surgió con el objetivo de unificar la terminología, para describir productos génicos a través de las distintas bases de datos existentes (por producto génico se refiere a cualquier proteína o ARN codificado por un gen). El proyecto GO comenzó con las bases de datos de tres organismos utilizados como modelos en investigación, como son “Fly Base” (*Drosophila melanogaster*), “Saccharomyces Genome Database” y la “Mouse Genome Database”. Hoy en día el proyecto ya cuenta con una gran cantidad de bases de datos incluyendo otros insectos, plantas y animales. Para poder unificar la terminología se desarrollaron tres tipos de vocabularios estructurados y controlados, llamados “ontologías”. Los tres tipos de ontologías definidas son,

procesos biológicos (BP), componentes celulares (CC) y función molecular (MF). Estos vocabularios describen a los productos génicos de acuerdo a sus asociaciones con cada una de las ontologías, independientemente de la especie. Los vocabularios con los que están construidas las ontologías, están compuestos por los “términos” de GO. Un “término” dentro de la ontología “componentes celulares” puede ser por ejemplo “mitocondria”. Todos los productos génicos localizados en la mitocondria van a estar rotulados con el término “mitocondria” dentro de la ontología componentes celulares, en la base de datos de GO. Dentro de la ontología “función molecular” un término puede ser “unión de NAD”, mientras que dentro de la ontología “Procesos biológicos” podemos encontrar el término “glicólisis”. Un producto génico puede estar en un determinado componente celular, puede estar activo en uno o mas procesos biológicos, durante el cual puede cumplir una o mas funciones moleculares. Por ejemplo, el gen denominado Gapdh codifica para la enzima Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. En la base de datos de GO, esta proteína tiene dos términos relacionados a componente celular, “citoplasma” y “mitocondria”. En cuanto a los procesos biológicos en los que está involucrada, tiene un término asociado que es “glicólisis”, y en cuanto a función molecular que cumple tiene asociado el término “unión de NAD”. De otra forma, dentro del término “mitocondria” se encuentran todos los productos génicos que hasta el día de hoy se sabe que están en la mitocondria. Dentro del término “glicólisis” se encuentran todos los productos génicos que hasta el día de hoy exista certeza de su relación con ese proceso biológico, mientras que lo propio ocurre con el “término unión de NAD” en la ontología función molecular.

Finalmente, los términos dentro de una ontología están estructurados en forma jerárquica, es decir, términos padres generales, los cuales contienen







**Figura 2.2. Gráfico acíclico.** Representación gráfica de las relaciones entre los términos de GO donde los nodos padres están unidos a sus nodos hijos por líneas. En la parte superior del gráfico se encuentra el término mas general “biological process” mientras que en la parte inferior en rojo, resalta el término mas específico en cuanto al proceso biológico de la enzima Gapdh, “Glycolysis”. Entre paréntesis se detalla la cantidad de productos génicos incluidos en cada término.

Para realizar el análisis funcional de la información obtenida de los microarreglos decidimos trabajar con la ontología “procesos biológicos” (GO-BP), dado que es la que nos podría dar una visión mas global de las funciones biológicas modificadas, comparada con las ontologías mas específicas “componente celular” y “función molecular”.

El primer paso del análisis funcional fue obtener el listado completo de los términos definidos dentro de la ontología “Procesos biológicos” en el proyecto GO. Una vez obtenido, se confeccionó otro listado el cual incluía todos los genes que estaban dentro de cada término. Este listado fue luego filtrado para quedarse solo con los genes presentes en el microarreglo. De esta forma se obtuvo el listado de los procesos biológicos representados en el microarreglo, y con el “set de genes” del microarreglo incluido dentro de cada proceso biológico. Finalmente se analizó cada set de genes para ver si estaban enriquecidos en

genes diferenciales. De esta forma se definieron los procesos biológicos que podrían estar siendo modificados por la presencia de células tumorales en la periferia.

Para poder interpretar estos resultados se procedió a organizar toda la información obtenida en forma de gráficos acíclicos (Figuras 2.3 A, 2.4 A y 2.5 A). Al analizar una gran cantidad de información los nodos pueden ser agrupados dentro del gráfico por el proceso biológico general con el cual están relacionados, por ejemplo “Desarrollo”, “Metabolismo”, etc. De esta forma puede visualizarse fácilmente cada uno de los procesos biológicos, representados en el microarreglo, y que términos se encuentran enriquecidos en genes diferenciales.

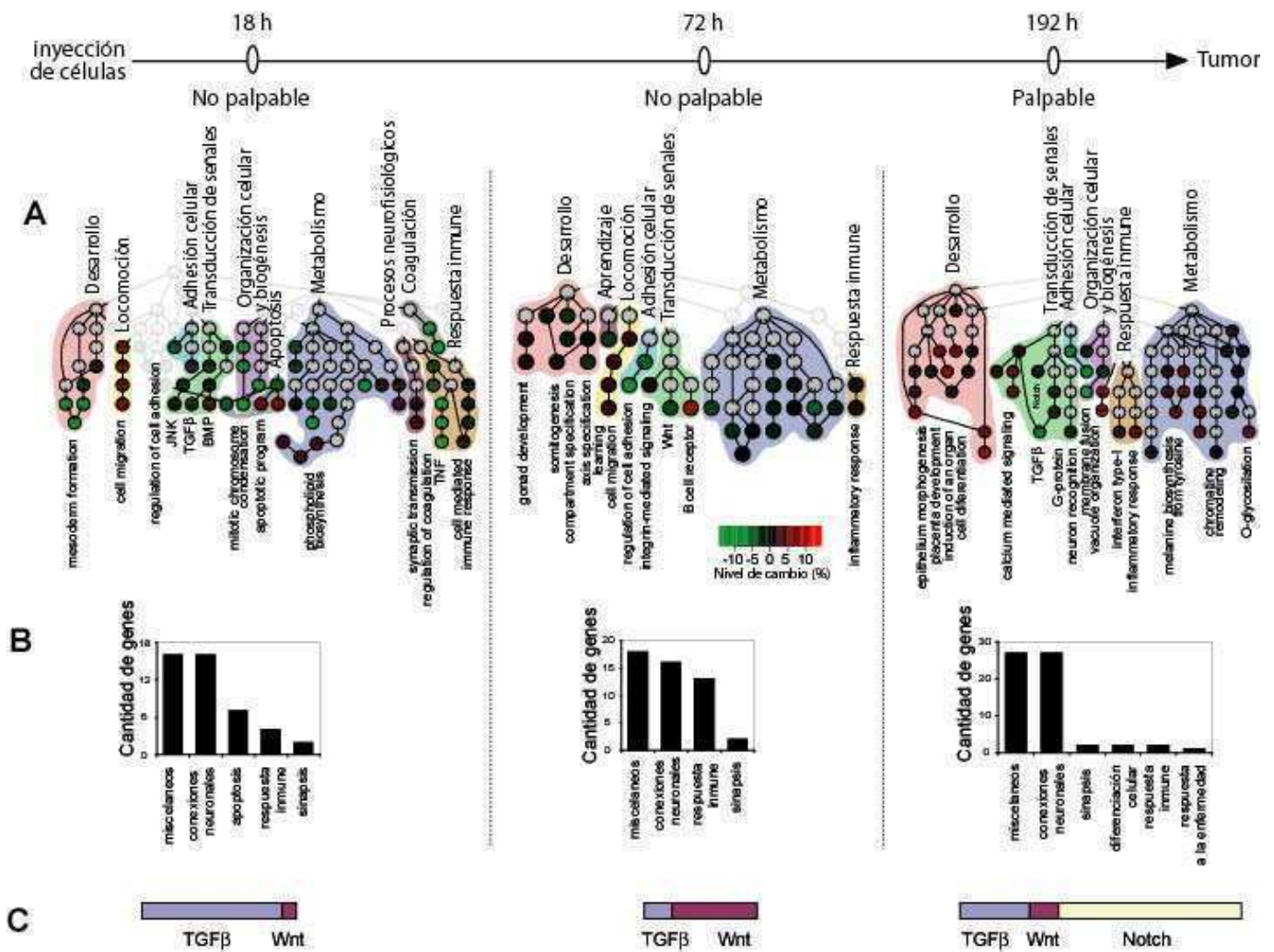
Este análisis mostró categorías funcionales comunes a los tres modelos tumorales mientras que otras eran propias de cada uno de ellos. En cuanto a las categorías funcionales comunes, se destacan los procesos relacionados con el metabolismo, el desarrollo, y con la organización celular (Figuras 2.3 A, 2.4 A y 2.5 A).

En el caso del modelo de cáncer de pulmón aparecen categorías funcionales describiendo procesos que pueden interpretarse en el contexto del sistema nervioso central. Entre estos se destacan procesos de migración y adhesión celular, de transducción de señales, principalmente de la vía de TGF $\beta$ , (incluyendo Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), las cuales también pertenecen a esta familia y procesos de aprendizaje. También en este modelo se pudo observar en los tres tiempos experimentales la presencia de procesos relacionados a la respuesta inmune (Figura 2.3 A).

En cuanto al modelo de cáncer de mama, aparecen categorías relacionadas con procesos de transmisión sináptica, secreción y respuesta

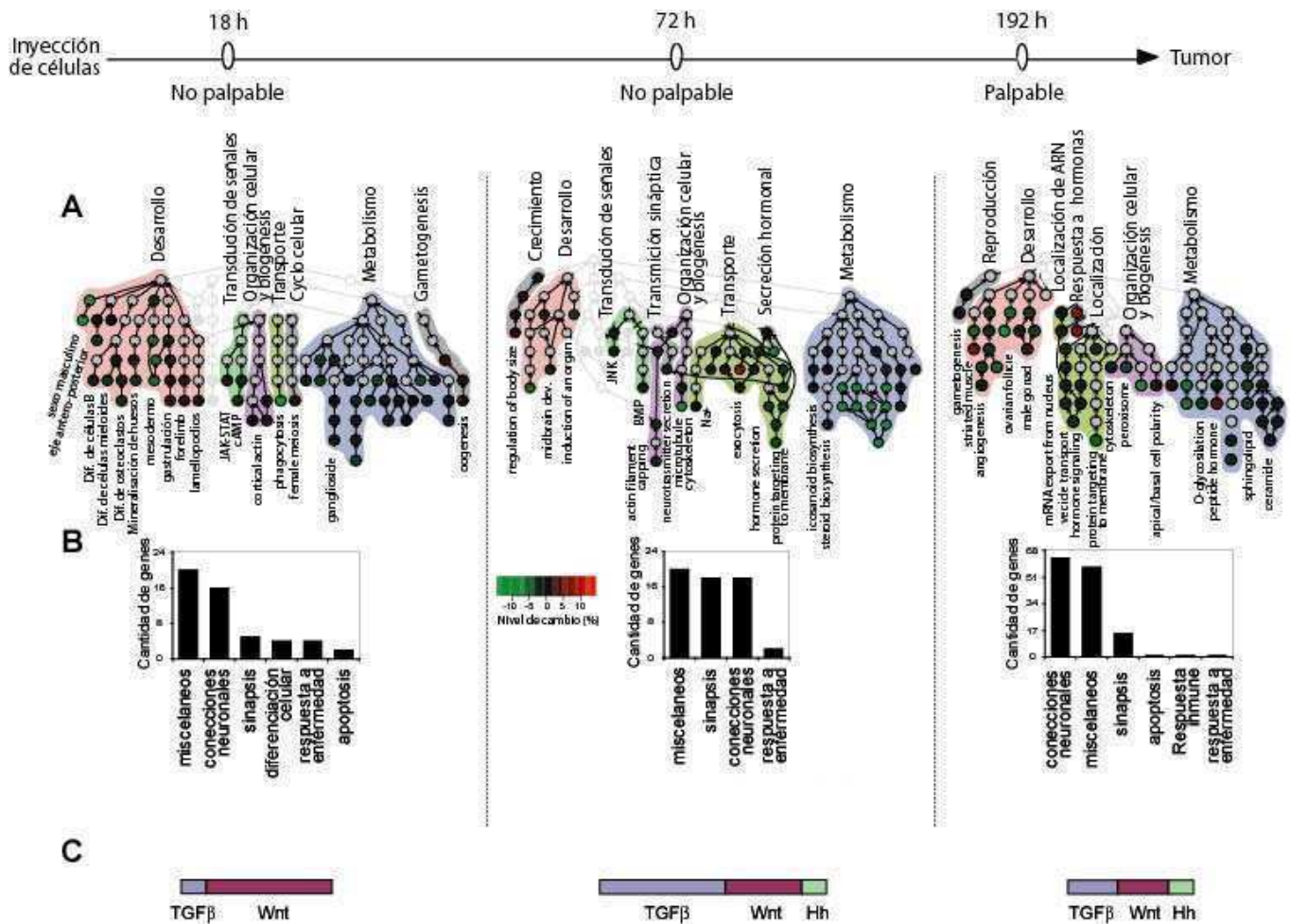
hormonal, y excitación. También en este modelo se pueden observar categorías relacionadas con la transducción de señales (Figura 2.4 A).

En el modelo de cáncer de colon dentro de los procesos que pueden tener lugar en el sistema nervioso central, se destacan los asociados a morfogénesis de neuritas, mielinización, axonogénesis, neurogénesis, y desarrollo del sistema nervioso (Figura 2.5 A.)



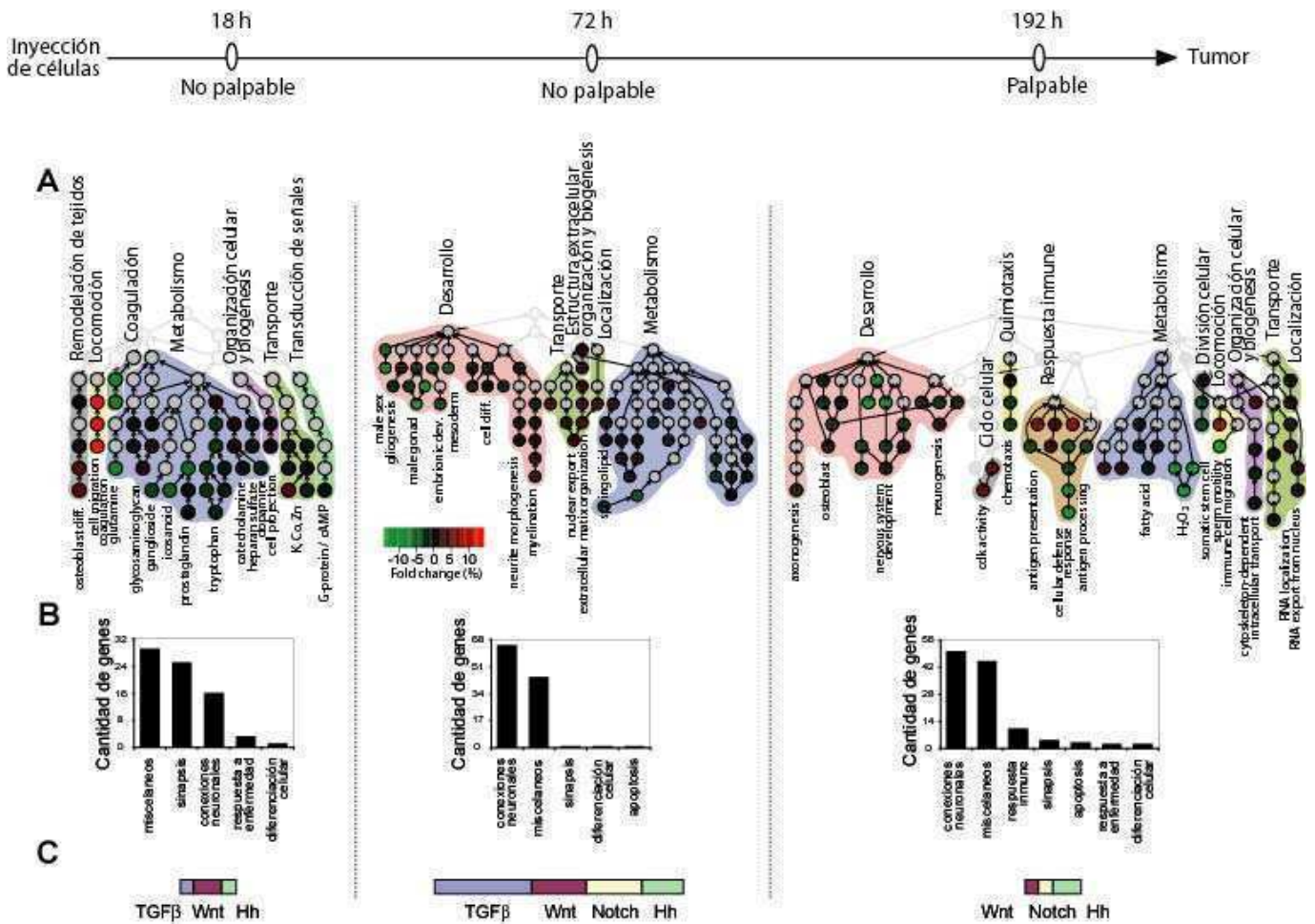
**Figura 2.3: Análisis Funcional.** Los datos corresponden las muestras hipotalámicas del modelo de cáncer de pulmón. **A)** Gráficos acíclicos mostrando los grupos de genes de GO-PB enriquecidos en genes diferenciales. El color indica el nivel de cambio promedio dentro del grupo, en porcentaje ( $p < 0,05$ , GSEA), la escala de colores está incluida en la figura. Gris indica que no hay un nivel de cambio significativo ( $p > 0,05$ ). Los grupos de genes funcionalmente relacionados fueron agrupados en categorías (rótulos superiores), y resaltados con los mismos colores a través de los tres tiempos experimentales. Los genes líderes fueron seleccionados a partir de los grupos de genes terminales inferiores del gráfico (rótulos inferiores)(ver también

tabla 1). **B)** Genes líderes manualmente agrupados en funciones biológicas de acuerdo a su función en el sistema nervioso central. **C)** Genes correspondientes a la función biológica conexiones neuronales que pertenecen a las vías de señalización específicas. La barra horizontal indica la vía de señalización, y el tamaño de las barras es proporcional a la cantidad de genes dentro de cada vía.



**Figura 2.4: Análisis Funcional.** Idem figura 2.3 pero para las muestras hipotalámicas del modelo de cáncer de mama.





**Figura 2.5: Análisis Funcional.** Idem figura 2.3 pero para las muestras hipotalámicas del modelo de cáncer de colon.

Si bien este análisis nos dio información sobre algunos de los procesos biológicos que podrían estar siendo modificados, algunas de las categorías funcionales y los procesos descriptos dentro de ellas, indicaban procesos que difícilmente puedan estar ocurriendo en un cerebro animal adulto. Desarrollo, es una de las categorías funcionales presente en los tres modelos tumorales. Dentro de esta categoría aparecen procesos tales como gametogénesis, diferenciación de osteoclastos, desarrollo de placenta, etc., los cuales claramente no son procesos que puedan tener lugar en el sistema nervioso central. Esto no

quiere decir que la base de datos de Gene Ontology tenga erróneamente asignados los procesos biológicos. Lo que ocurre es que la denominación de la categoría funcional o de un proceso determinado, engloba una función general de la mayoría de los genes que la componen, y no necesariamente se adecuan al contexto en el que el estudio está siendo llevado a cabo. Seguramente los genes dentro de la categoría gametogénesis están relacionados con esta función, pero quizá un subgrupo de estos genes en un contexto de sistema nervioso central estén relacionados con otra función biológica.

Por lo tanto para poder extraer la mayor cantidad de información posible lo que se hizo fue someter esta información a otros dos tipos de análisis. Como primera medida se identificó cuáles eran los genes dentro del término más específico que hacían que éste fuese diferencial. Esto se hizo por el método de “Gene set enrichment analysis” (GSEA) (Subramanian, Tamayo et al. 2005) (tabla 2A-C). Este análisis permite identificar dentro de un grupo de genes agrupados por proceso biológico, cuáles son los que hacen que el proceso sea diferencial en el tratamiento, comparado con el control. Los genes que por su nivel de expresión hacen que el proceso biológico sea diferencial, son denominados “genes líderes”. Una vez identificados, a cada uno de los genes líderes se les asignó un proceso biológico, pero, en el contexto del sistema nervioso central. Esta asignación fue hecha en forma manual, gen por gen, utilizando los datos disponibles en la bibliografía y en la base de datos del “National Cancer center for Biotechnology Information” (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Este método permitió identificar una serie de procesos biológicos, de los cuales la mayoría podían ser interpretados en el contexto del sistema nervioso central. Un ejemplo es el caso del proceso relacionado con diferenciación de

osteoclastos. El análisis de los genes líderes de esta categoría mostró que en su mayoría se trataban de proteínas de la familia de las BMPs. Esta familia de proteínas claramente está relacionada con el proceso mencionado, pero, al buscar la función descrita para estas en el sistema nervioso central, se observó que están relacionadas con el crecimiento y desarrollo de axones y dendritas.

Otro ejemplo que ilustra como este análisis facilitó la interpretación de una categoría funcional en el contexto del sistema nervioso central, fue el caso de la categoría “Organización celular y biogénesis”. Al analizar los genes líderes dentro de esta categoría, pudo observarse que la mayoría estaban relacionados con interacción del citoesqueleto (principalmente actina) con exocitosis de vesículas en los terminales pre-sinápticos, anclaje de receptores en los terminales sinápticos, migración celular, y plasticidad sináptica.

Como resultado de estos análisis se observó que los procesos biológicos modificados fueron similares en los tres tipos tumorales (tablas 2A-C). Guía axonal, crecimiento de neuritas, vías de señalización de TGF $\beta$ , Wnt y Hedgehog, remodelación sináptica, etc., fueron algunos de los procesos biológicos comunes a los tres modelos tumorales. A partir de datos de bibliografía se pudo establecer que todos estos procesos, en un contexto de sistema nervioso central podían agruparse dentro de una “función biológica” mas general, relacionada con el establecimiento o mantenimiento de las “conexiones neuronales”. Si bien las vías de señalización arriba mencionadas participan en una gran cantidad de procesos, en el sistema nervioso central, proteínas de las familias de TGF $\beta$ , Wnt y Hedgehog funcionan como guías posicionales para el crecimiento de axones y neuritas participando del proceso de mantenimiento de conexiones neuronales (Crown, Le Gall et al. 2003; de Wit and Verhaagen 2003). Cabe destacar que el microarreglo contenía genes relacionados con aproximadamente otras 30 vías



de señalización, pero solo se detectaron genes líderes para las vías mencionadas además de la vía de Notch.

Además de la función biológica “conexiones neuronales”, también se pudieron determinar otras funciones biológicas alteradas en los tres modelos tumorales, como por ejemplo, respuesta inmune, apoptosis, diferenciación celular etc. (tabla 2A-C). Finalmente hubo genes a los cuales no se les pudo asignar ninguna función biológica clara y fueron agrupados dentro de la categoría misceláneos.

La función biológica conexiones neuronales fue la más importante en los tres modelos tumorales en los tres tiempos experimentales. Al cuantificar los genes líderes para cada una de las funciones biológicas la función “conexiones neuronales” fue preponderante en todos los modelos tumorales en los tres tiempos experimentales (sin tomar en cuenta a los misceláneos) (Figuras 2.3B, 2.4B y 2.5B). La función biológica “sinapsis”, que engloba genes que codifican para canales ya sean voltaje o ligando dependientes, presentes en los terminales sinápticos, si bien no tiene un nivel de preponderancia similar al de conexiones neuronales, esta presente en los tres modelos tumorales, prácticamente en todos los tiempos experimentales (Figuras 2.3B, 2.4B y 2.5B).

Finalmente en los tres modelos tumorales, se destacan otras tres funciones biológicas, como diferenciación celular, respuesta inmune, y respuesta a la enfermedad.

Al analizar las vías de señalización a través del tiempo, se observó para el modelo de cáncer de pulmón un incremento en los genes líderes de la vía de TGF $\beta$ , a las 18hs post inyección, seguido de un incremento en la vía de Wnt a las 72hs y finalmente a los 8 días lo mismo para la vía de Hedgehod. Las tres mismas vías de señalización están representadas en el modelo de cáncer de

mama, mientras que en el modelo de cáncer de colon a estas tres se le suma la vía de Notch.

	<b>Función biológica</b>	<b>Proceso Biológico</b>	<b>Genes líderes</b>
<b>Pulmón 18 hs</b>	<b>Apoptosis</b>	Apoptosis	Bax, Bak1, Casp8ap2, Pcd6, Pycard, Birc4, Traf6
	<b>Conexiones Neuronales</b>	Axon growth	RNf6
		Axon guidance	Nr4a3
		TGFbeta\BMP sig. pathway	BMP7, Bambi, BMPPr1b, Dusp22 BMP8a, BMP8b, Ltbp1, Eng,Sost, Nog,
		Neurogenesis	Relb
		Synaptic plasticity	Tmod2
		Wnt signalling	Madh3
	<b>Respuesta inmune</b>	Immune response	Glmn, Lag3, Lfng
<b>Sinapsis</b>	Synapsis	Park2, Vdac3	
<b>Misceláneos</b>	Sh3rf1, Clec7a, Tbx6, Akap8, Mgmt, Procr, Klkb1, Ptafr, Smc211, Cds2, Agpat4, Piga, Pigf, Rela, Pigc, Gpaa1		
<b>Pulmón 72 hs</b>	<b>Conexiones Neuronales</b>	Axon guidance	Cxcl12, Ephb2, Nfatc4
		Neurite outgrowth	Itagv
		Neurogenesis	Edg3
		TGFbeta\BMP sig. pathway	Mcpt6, Amh
		Wnt signalling	Wnt3a, Dkk3, Wif1, Axin2, Dkk1
		Synaptic plasticity	Catnd2
		Cell adhesion	Icam1
		Cell migration	Vav3
	<b>Sinapsis</b>	Synapsis	Park2, Tac1
	<b>Respuesta inmune</b>	Immune response	Ccl12, Il1f5, Tlr4, Ccl2, Cxcl2, Cxcl10, Ccl4 Cxcl15, Hc, Lta, Ly96, Cxcl1, Tnfrsf4
<b>Misceláneos</b>	Nr5a1, Tbx18, Spo11, Adam24, Insl3, Pycard, Cd79a, Cml2, Nfam1, 1700026J12Rik, Cml3, Adam28, AA408868, Pgr, Cml4, Fancg, Dmc1h, Ccl24		
<b>Pulmón 192 hs</b>	<b>diferenciación celular</b>	Neuronal differentiation	Foxg1, Rgs6
	<b>Conexiones neuronales</b>	cell adhesion	Iama1
		Axon guidance	Rgs3
		Axon pathfinding	Nkx6-1
		Neurite outgrowth	Socs2
		Neurogenesis	Cebpa, Edg6
		Notch Sig. Pathway	Mesp2, Dtx2, Cntn1, Spen, Hes7, Dtx3, Notch1, Il6st, Psen2, Nfkbia, Dtx1
		TGFbeta\BMP sig. pathway	Ltbp1, Nodal, Map3K1,BMP2, BMP7
		Wnt signalling	Wnt7b, Catnb
	<b>Sinapsis</b>	Synaptic remodeling	Cav, Stx11
		Synapsis	Cplx2
	<b>Respuesta a la enfermedad</b>	LTP	Adcy8
		Feeding behaviour	Lep
<b>Respuesta inmune</b>	Immune response	Ifi16, Ifnar1	
<b>Misceláneos</b>	Rgs9, Nkx6-2, Socs3, Adcyap1, Dct, Fgf10, Hoxa11, Galnt2, Socs4, Cish, Hells, Fgf3, Fstl3, Strap, Fcer1a, C1galt1, Gba, Dusp16, Rgs17, Trem11, Hoxd11, Cbx8, Traf3ip1, Fgfr4, Adcy9, Ptger4, Dmbt1,		

**Tabla 2A: Análisis funcional de los genes líderes.** Los genes líderes fueron agrupados en Procesos biológicos, a su vez los Procesos biológicos fueron agrupados en Funciones biológicas.

Tabla 2B. Idem tabla 2A, pero el modelo de cáncer de colon

	<b>Función Biológica</b>	<b>Proceso Biológico</b>	<b>Génes líderes</b>
<b>Colon 18 hs.</b>	<b>diferenciación celular</b>	Neuron differentiation	Trpc7
	<b>Conexiones neuronales</b>	Cell migration	Gp38
		Cell adhesion	Cbl11, Vcl
		Inhibition of neuronal chemorepulsion	Ptgis
		Axon guidance	Nr4a2
		Formation of neuronal networks	Plcz1
		Growth cone collapse	Alox15
		Hedgehog signalling	Tmprss8
		Lamellipodium biogenesis	Capzb, Sh2bpsm1
		Myelination	Chst11
		Neurite branching	Wasl
		Neurogenesis	Edg3
		TGFbeta\BMP sig. Pathway	Bmp2
	Wnt signalling	Catnb, Wnt7b	
	<b>Respuesta a la enfermedad</b>	regulated by anorexia in mouse brain	Adcy6
	Sickness response	Ptger3, Ptges	
<b>Sinapsis</b>	LTP	Adcy8, Gnaq	
	Synapsis	Kcnip1, Kcne4, Kcnk1, Slc30a3, Slc12a2, Kcnq5, Cacng3, Kcna2, Adcy7, Kcnj1, Ube2b, Gria4, Kcna3, Kcnd1, Slc30a1, Slc5a7, Hcn2, Cacng4, Cacna1g, Snca, Atp2c1, Gria1, Kcnn1	
<b>Miscelaneous</b>		Trpc7, Arg1, Pnmt, Slc39a4, Kcnh1, Prodh2, Thbd, Hexb, Cnga2, Ggt1a1, Slc38a3, Slc39a3, Pdgfb, Afmid, Dync2l1, Pcnt2, Procr, Ndst2, Ifi16, Trpv6, P2ry12, Tnfaip1, Slc10a1, Slc30a5, Cacna1f, Alox8, Gtrgeo22, Fcer1a, Pln, Ptgds2,	
<b>Colon 72 hs.</b>	<b>Conexiones neuronales</b>	Axon guidance	Robo1, Ntn4, Gsk3b, Nr4a3, Unc5c, Ntf3, Vasp, Etv1, Sema3b, Sema7a, Foxd1, Tbr1, Lhx2, Pax6, Kif5c, Dpysl5, Eph4a, Vax1, Plxnb2, Nr4a2, Gbx2, B3gnt1, Pak1
		Axonogenesis	Cckar, Bcl11b, Rtn4r
		Dendrite morphogenesis	Mecp2
		Hedgehog signalling	Gli3, Zic2, Rab23
		Myelination	Pou3f1, Cldn11, Egr2
		Neurogenesis	Elavl3, Sox3
		Notch signalling	Tbx6, Hes5, Hes1, Jag1
		TGFbeta\BMP sig. Pathway	Tgfb2, Bmpr1b, Sitpec, Amh, Tgfb3, Gdnf, Bmp7
		Wnt signalling	Wnt3a, Axin2, Wnt7b, Catnb
		Synaptic plasticity	Fmr1, S100b, Gal
		Neuron migration	Top2b, Pex5, Ndn, Twist1, Tift1
		Neurite outgrowth	Gas7, Socs2
	Brain development	Ncoa6	
	Neuron survival	Atrx	
	Neuron development	Pitx3	
<b>Apoptosis</b>	Apoptosis	Insrr	
<b>diferenciación celular</b>	Neuron differentiation	Aldh1a2	
<b>Sinapsis</b>	Synapsis	Ap3b1	
<b>Miscelaneous</b>		Chx10, Dmbt1, Ncbp2, Zfp36, Hexb, Itgb1bp3, Hmgb3, Eomes, Fancg, Il4, Pitpnb, Mia, Smpd1, Gest, Matn3, Ina, Col5a3, Insr, Thoc1, Dnmt3l, Nruxa, Nr5a1, Xpo6, Ar, Msh4, Pura, Crvm, Mln51, Rbm8a, Crvga, Olig1, Hspa9a	
<b>Colon 192 hs.</b>	<b>Apoptosis</b>	Apoptosis	Bad, Apaf1, Bcl10
	<b>Conexiones neuronales</b>	Axon guidance	Nkx6-1, Sema4d, Lhx2, Plxnb2, Vax1, Efnb3, Chl1, Robo1, Ntn4, Sema5b, Foxd1, Sema6b, Gap43, Ntn4, Sema4b
		Brain development	Dpysl3, Epm2a, Hesx1, Pax5, Hoxa1, Hmx3
		Dendrite morphogenesis	Mcf2, Mtap2
		Myelination	Olig2, Ugt8
		Neurite morphogenesis	Galr2
		Neurite outgrowth	Gas7
		Neurogenesis	Sox3, Elavl3
		Neuronal migration	Ndn, Top2b, Neurog2, Tlx3, Tift1, Pafah1b1, Ednrb
		Neuron development	Foxg1, Kif3c
		Neuron projection	Kif5a
		Synaptic plasticity	Egr3, Snca, Catnd2, Fmr1
		Axonogenesis	Rtn4r, Pip5k1c, Bcl11b
	Notch signalling	Hes5	
	Wnt signalling	Dvl2	
Hedgehog signalling	Ihh, Lrp2		
<b>diferenciación celular</b>	Neuronal differentiation	Zic1, En1	
<b>Sinapsis</b>	Synapsis	Spnb4, Kif1b, Ap3b1, Kif17	
<b>Respuesta a la enfermedad</b>	Sickness response	Fasn, Il1b	
<b>Respuesta inmune</b>	Immune response	Ccl2, Fcer1g, Tnfrsf4, Ccr7, Nfam1, Ccl1, Ccr3, Cxcl2, Il8rb, Cxcl12	
<b>Miscelaneous</b>		Cdkn1b, H2-Oa, Ntrk2, Epb4.9, Ltc4s, Pten, Aplp1, Sepp1, Nes, Epx, Kif20a, Kif3b, Alox12, Cat, Kif5b, Cmtm8, Ggt1a1, Elovl3, Dnchc1, Scd3, Gapds, Thoc3, Ccr8, Kif21b, Ascl2, Dncic1, Stau1, Gpr2, Cklfsf7, Ap3d1, Mid1, Dncic2, Prps1, Glmn, Scd1, Trim54, Magoh, H2-Ob, Prkag1, Pccb, H2-Q10, AA409541, Ncbp2, Gcst, Fads1,	

**Tabla 2C:** Ídem tabla 2A, pero para muestras del modelo de cáncer de mama

	<b>Función Biológica</b>	<b>Proceso Biológico</b>	<b>Genes líderes</b>
<b>Mama 18 hs.</b>	<b>Apoptosis</b>	Apoptosis	Bad, Insr
	<b>diferenciación celular</b>	Neuron differentiation	Pace4, TdGF1, Aldh1a2
		Astrocyte differentiation	Cicf1
	<b>Conexiones neuronales</b>	Maintenance of myelin	Galgt1
		axon guidance	Nr4a3
		TGFbeta/BMP sig. pathway	Sitpec
		cytoskeleton	Epb4.112, Diap2
		lamellipodium biogenesis	Nckap1, Capzb
		neurite outgrowth	Pxn, Igf1r
		neurogenesis	Edg3
<b>Respuesta a la enfermedad</b>	wnt signalling pathway	Catnb, Wnt4, Mitf, Madh3	
	control of food intake	Insr	
<b>Sinapsis</b>	sickness response	Ptger3	
	LTP	Eif4ebp2, Gnaq	
	Synapsis	Rims2, Adcy7, Pclo	
<b>Misceláneos</b>		Tbx18, Rag1, P2ry12, Clec7a, Gulp1, Tbx6, Mlh3, Mglap, Ugdh, Gmpr2, Nsd1, Nkx2-3, P2rx7, Coro1c, Cebpa, Jak2, Fgf23, Clec2g, Ifnz, Ptger4	
<b>Mama 72 hs.</b>	<b>Conexiones neuronales</b>	TGFbeta/BMP sig. pathway	Bmp2, Bmper, Sost, Bmp6, Dusp22
		brain development	Nde1
		cytoskeleton	Spna2, Clasp2, Pcnt2
		Dendrite morphogenesis	Dbnl, Cappa1
		Hedgehog signalling	Mtap1b
		Synaptic plasticity	Tmprss8
		wnt signalling pathway	Tmod4, Tmod2
	<b>Respuesta a la enfermedad</b>	sickness response	Siah1a, Spry1, Fgf8
	<b>Sinapsis</b>	Synapsis	Ptges2, Ptgs2
	<b>Misceláneos</b>		Sncap, Park2, Rims2, Snap25, Slc8a1, P7, Fxyd2, Stxbp2, Spnb4, Slc12a3, Slc10a1, Pclo, Atp1b4, Nrnx1, Stxbp3
		Sh3rf1, Map3k11, Sc4mol, Hook2, Mvk, Dhrr8, Mid1, Alox15, Tpx2, Akr1c6, Cyp39a1, Tekt2, Akt2, Ptgis, Alox8, Alox12b, Tekt3, Ggtla1, Tbxas1, Alox12	
<b>Mama 192 hs.</b>	<b>Apoptosis</b>	Apoptosis	Hip1
	<b>Respuesta inmune</b>	Immune response	Fcerg1
	<b>Conexiones neuronales</b>	brain development	Hsf2, Arpc1a, Afp, Tbx20
		Cell adhesion	Msr1, Mylk, Itgav, Stx18, Slc38a3, Slc5a7, Epb4.113, Ptpnj, Was, Tln, Myln, Rab3b, Epb4.111, Gtrgeo22, Cldn11
		Cell migration	Vav1, Vav3, Plg, Pafah1b1, Nisch
		Cytoskeleton	Ktr2-5, Trim54, Fnml1, Arhg, Pdlim3, Tagln, Ckap1, Mtss1, Bicc2, Krt2-17, Myo1f, Krt2-7, Ina, Diap2, Myh1, Krt1-14, Krt1-15, Krt1-2, Ktr2-16
		Hedgehog signalling	Ihh
		Lamellipodia formation	Wasf1
		Neuron development	Avil, Pax5
		Axon guidance	Kras2, Fbxo5, Stxbp2, Rfn6, Kif5c, Cdc42, Nef3, Map11c3, Arf6, Nxf1, Nck2, Cxcl12, Myo5a, Kif5a
		TGFbeta/BMP sig. pathway	Idb1, Bmp8b
		wnt signalling pathway	Wnt4, Fzd5
	Synaptic plasticity	Mtap6	
	<b>Respuesta a la enfermedad</b>	Feeding behaviour	ASIP
	<b>Sinapsis</b>	Synapsis	Gabarap, Ap3b1, Unc13a, Anpep, Sec8, Clasp2, Sec2211, Pascin, Cpe, Gabarapl2, Rab3c, Kif1b, Gga2, Golga3, Pclo
<b>Misceláneos</b>		Cena1, 4921524J06Rik, Exoc2, Pesk2, Sytl4, Acox1, Bet1, Lrba, Rab6ip2, Ap2m1, Clint1, Tgfa, Nefh, 1700013G10Rik, Styx, Adam24, Ggt1, Boll, P140, Gulp1, Myo7a, Ldlr, Dmclh, Fancg, Ush1c, Rbm8a, C1galt1, Sox9, Vldlr, Hrb, Gent3, Mln51, Akt1, D1Pas1, Cel, Ap2a1, Insl3, Vezf1, Sara1, Trfr, Azi1, Tssk4, Llglh, Lass4, Tekt3, Rnuxa, Scamp2, Rin2, Adam18, Vamp5, Smpd3, Galnt1, Brd2, Frap1, Gvpa,	

### **2.3.2 Análisis de la expresión de genes no presentes en el microarreglo relacionados con comportamiento de respuesta a la enfermedad.**

Otras de las funciones biológicas que de acuerdo al análisis funcional podrían verse afectadas por la presencia de células tumorales en la periferia fueron los relacionados con respuesta inmune y respuesta a la enfermedad.

El concepto de comportamiento de respuesta a la enfermedad inducido por citoquinas, o “*cytokine-induced sickness behavior*” surgió a fines de los años '80 (Konsman, Parnet et al. 2002). Estos trabajos proponían por un lado, la idea de que las citoquinas inducidas por el sistema inmune durante un proceso infeccioso eran las moléculas responsables de la comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso (Dantzer and Kelley 1989). Y por otro, que los síntomas de enfermedad observados en las personas o animales no eran efectos debidos a la debilidad, sino que en realidad se trataba de una respuesta adaptativa, organizada para mantener la homeostasis, y facilitar el rol de la fiebre para combatir un agente infeccioso (Hart 1988). En la actualidad es aceptado por toda la comunidad científica que la producción periférica de citoquinas pro-inflamatorias es responsable de la inducción del estado de comportamiento de respuesta a la enfermedad, el cual incluye cambios en los niveles de citoquinas cerebrales (Pitossi, del Rey et al. 1997), hormonas hipotalámicas y también, como su nombre lo indica, en el comportamiento (Dantzer 2004). Estado febril, fatiga, dolor en los músculos y las articulaciones, y la pérdida del apetito están entre los síntomas mas comunes de este estado.

Dado los roles claves que cumple el sistema inmune durante la génesis y el desarrollo tumoral, y la similitud entre los síntomas del estado de respuesta a

la enfermedad y algunos de los síntomas observados en los pacientes con cáncer (Cleeland, Bennett et al. 2003) nos propusimos estudiar si existían cambios en genes relacionados con el estado de respuesta a la enfermedad.

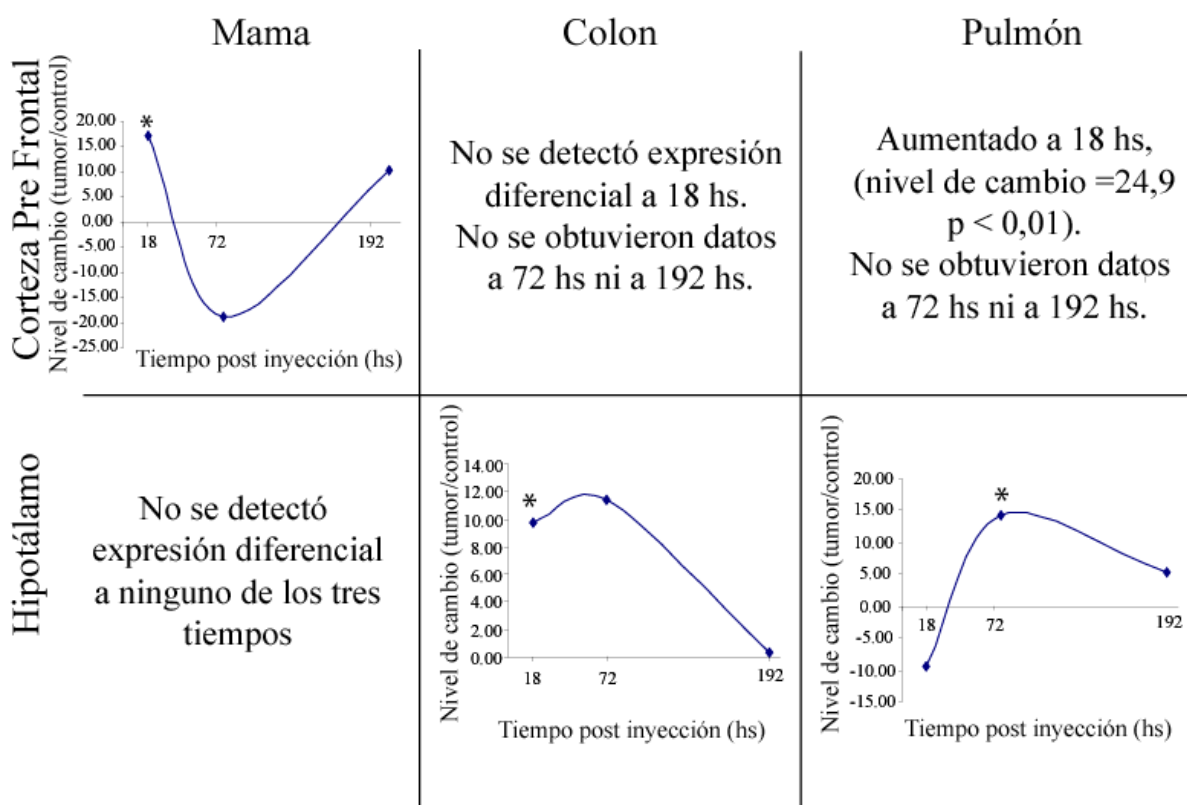
Dentro de los genes validados como diferencialmente expresados mediante PCR en tiempo real, tanto el receptor A2 de tromboxano, como la oxitocina son moléculas involucradas en la inducción del estado de “comportamiento de respuesta a la enfermedad”. Por lo tanto si los cambios en los niveles transcripcionales de estos dos genes fuesen debidos al inicio del proceso de respuesta a la enfermedad, otros genes relacionados con este estado deberían también mostrar alteraciones en sus niveles transcripcionales. Al analizar el listado de genes representados en el microarreglo no se halló ningún otro aparte de los dos anteriormente mencionados que tuviesen niveles de variación como para considerarlos potenciales genes diferenciales. En función de esto se decidió explorar si existían cambios en los niveles de expresión de otros transcritos relacionados con este estado particular, los cuales no estaban presentes en el microarreglo. Dado que este es un proceso general para cualquier tipo de tumor, decidimos hacer los estudios en los tres modelos tumorales y en las tres regiones cerebrales.

Utilizando la técnica de PCR en tiempo real se evaluaron los niveles transcripcionales de los transcritos codificantes para Ciclo oxigenasa 2 (Cox-2), Arginina vasopresina (Avp), Pro-opiomelanocortina (POMC), el receptor de melanocortina 4 (Mc4r), Neuropéptido Y (NPY), Indoleamina-pirrol 2,3 dioxigenasa (INDO) y el factor de crecimiento insulínico de tipo I (IGF-1).

Cox-2, es una enzima clave en la síntesis de la prostaglandina E2, uno de los principales mediadores del estado de “comportamiento de respuesta a la enfermedad” inducido por citoquinas (Cao, Matsumura et al. 1997;

Parsadaniantz, Lebeau et al. 2000). A las 18 y 72 horas post inyección de las células tumorales se observó un leve pero significativo incremento en los niveles del transcripto de Cox-2 en el hipotálamo de los animales portadores de tumor para los modelos de cáncer de colon y pulmón respectivamente (Figura 2.6 y Tabla 3). Mientras que en el modelo de cáncer de mama, este transcripto no registró cambio alguno en el hipotálamo, sí lo hizo en la corteza prefrontal aumentando significativamente su nivel a las 18 horas post inyección, cosa que también ocurrió en el modelo de cáncer de pulmón (Figura 2.6 y Tabla 3).

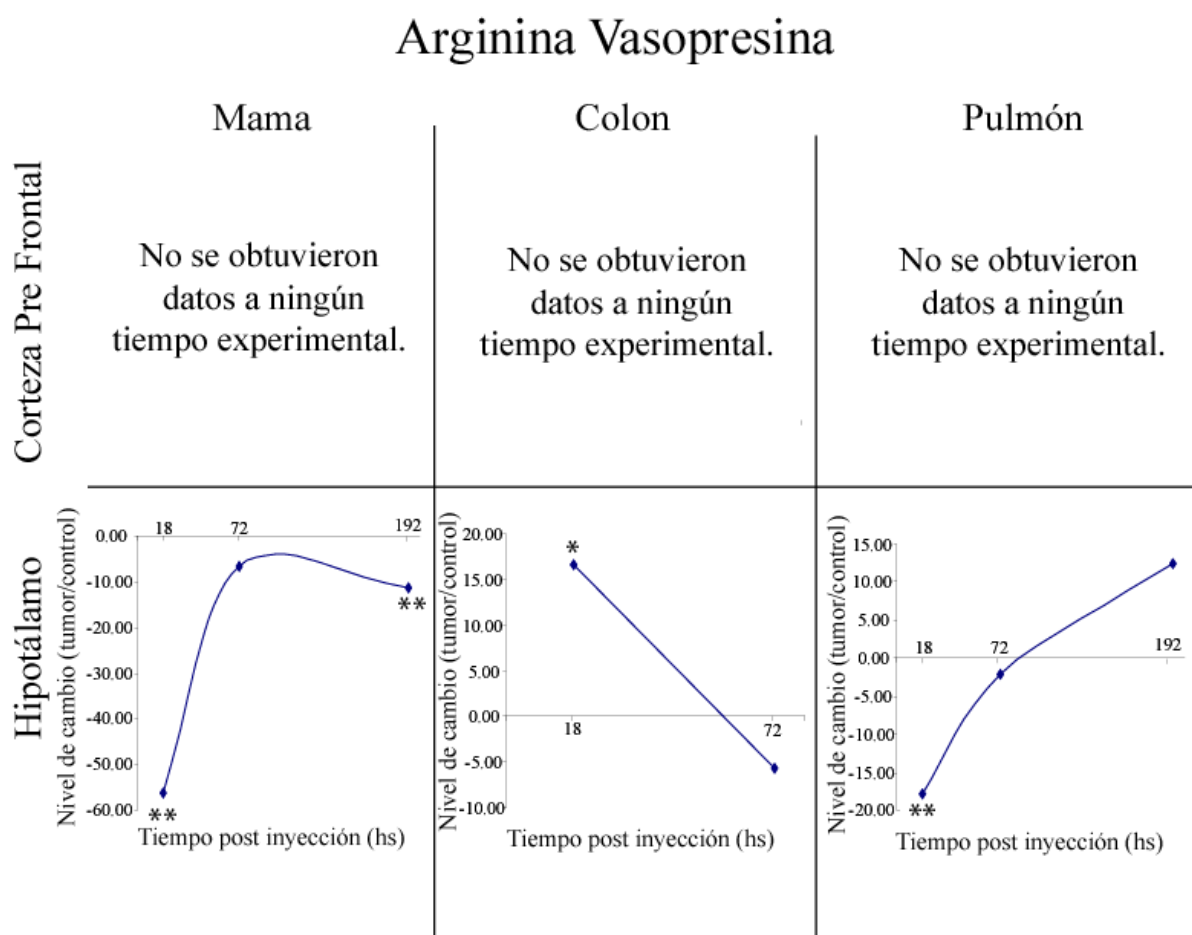
### Ciclo oxigenasa 2



**Figura 2.6: Análisis del transcripto para Cox-2.** Cuadro de doble entrada mostrando los perfiles de expresión en el tiempo en la combinación tumor-región donde se obtuvieron datos para los tres tiempos experimentales. \* p < 0,05

Una de las principales citoquinas involucradas en el estado de comportamiento de respuesta a la enfermedad es la interleuquina-1 (IL-1). Se ha

descripto que la neurotransmisión mediada por Avp, atenúa los síntomas del estado de comportamiento de respuesta a la enfermedad inducidos por IL-1 (Dantzer, Bluthé et al. 1991). Por lo tanto se decidió estudiar los perfiles de expresión de Avp. Los perfiles de expresión hipotalámicos de este transcripto, fueron particulares para cada uno de los modelos tumorales. Mientras que en el modelo de cáncer de colon los niveles disminuyeron a las 18 horas post inyección, lo contrario ocurrió en el modelo de cáncer de pulmón (Figura 2.7 y tabla 3). En el modelo de cáncer de mama los niveles de los transcritos permanecieron disminuidos a las 18 y 192 horas post inyección, mientras que a las 72 horas no hubo cambios significativos (Figura 2.7 y tabla 3)



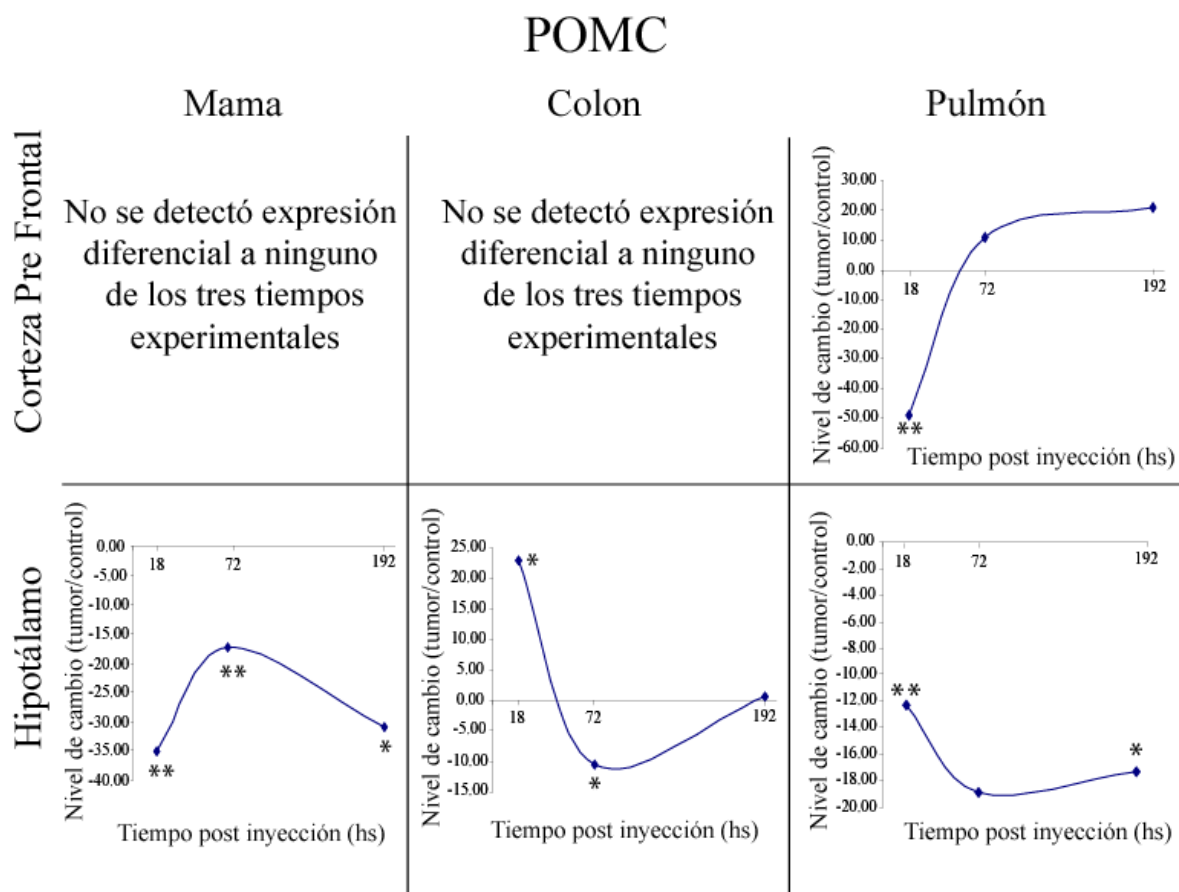
**Figura 2.7: Análisis del transcripto para Avp.** Cuadro de doble entrada mostrando los perfiles de expresión en el tiempo en la combinación tumor-región donde se obtuvieron datos para los tres tiempos experimentales. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .



POMC, es un precursor polipeptídico complejo, el cuál es procesado generando péptidos mas pequeños con actividad biológica. El procesamiento del precursor POMC es llevado a cabo en forma tejido específica, y los péptidos derivados tienen un papel vital en la integración de una gran diversidad de procesos fisiológicos. En la última década se generó una gran cantidad de información que muestra que los péptidos derivados de POMC en el hipotálamo tienen un rol crucial en control del apetito y el peso corporal. Específicamente el grupo de péptidos derivados de POMC conocido como las melanocortinas (compuesto por  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -MSH mas ACTH) conjuntamente con uno de los receptores sobre los que actúan, el receptor de melanocortina 4 (Mc4r) son componentes cruciales de un circuito homeostático regulador del balance energético del organismo.

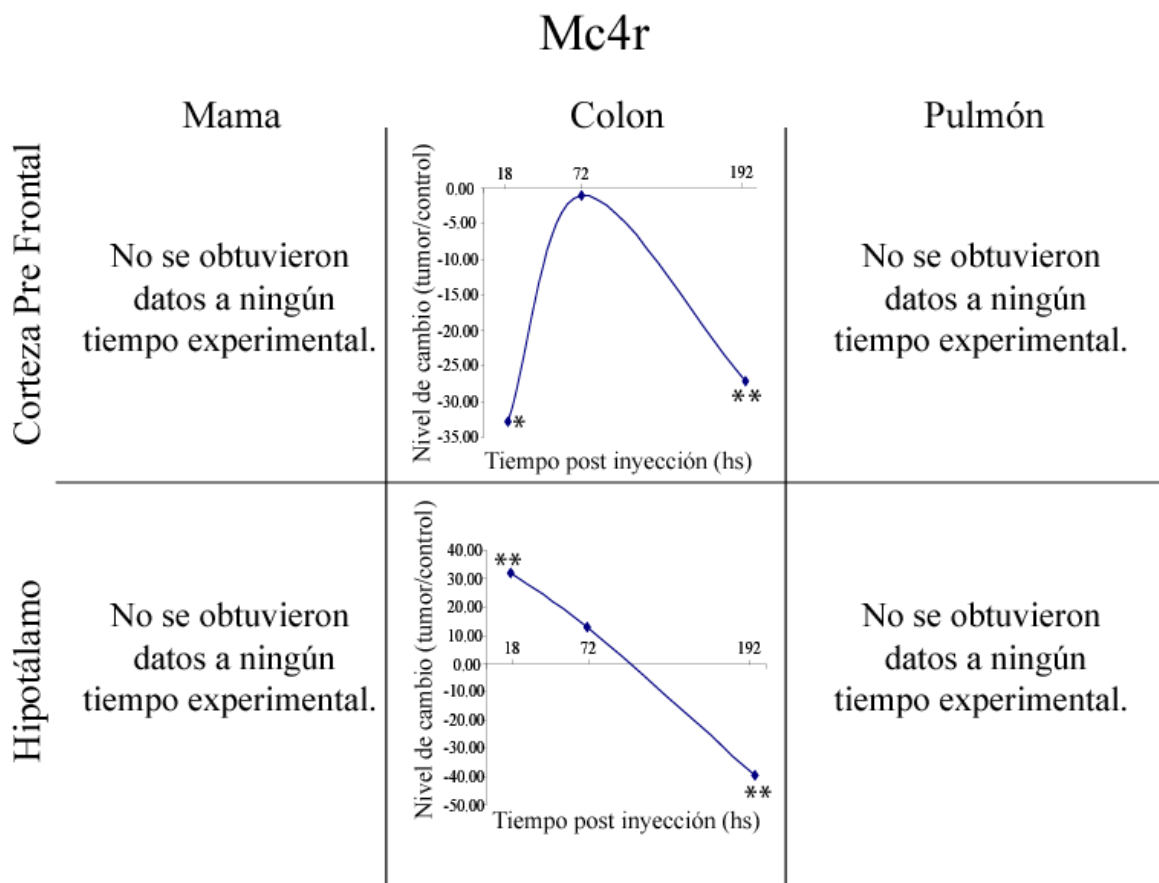
En función de todos estos datos se decidió analizar los niveles de expresión del transcriptos para *Pomc*, y *Mc4r*.

*Pomc* mostró niveles disminuidos de expresión en el hipotálamo de los modelos de cáncer de mama y pulmón hasta las 192 horas post inyección. En el modelo de cáncer de colon este transcripto respondió a la inyección de células tumorales incrementando sus niveles en el hipotálamo a las 18hs, luego disminuyéndolos a las 72 horas, para regresar a valores normales a las 192 horas (Figura 2.8 y Tabla 3).



**Figura 2.8: Análisis del transcritpo para Pomc.** Cuadro de doble entrada mostrando los perfiles de expresión en el tiempo en la combinación tumor-región donde se obtuvieron datos para los tres tiempos experimentales. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

En cuanto al transcritpo para Mc4r, solo fue posible obtener datos para el modelo de cáncer de colon. En la corteza se observó una disminución significativa en su nivel tanto a las 18 como a las 192 horas post-inyección, mientras que no sufrió cambios a las 72 horas (Figura 16 y Tabla 3). En el hipotálamo Mc4r aumentó sus niveles significativamente a las 18hs para luego disminuirlos también significativamente a las 192 horas (Figura 2.9 y Tabla 3).



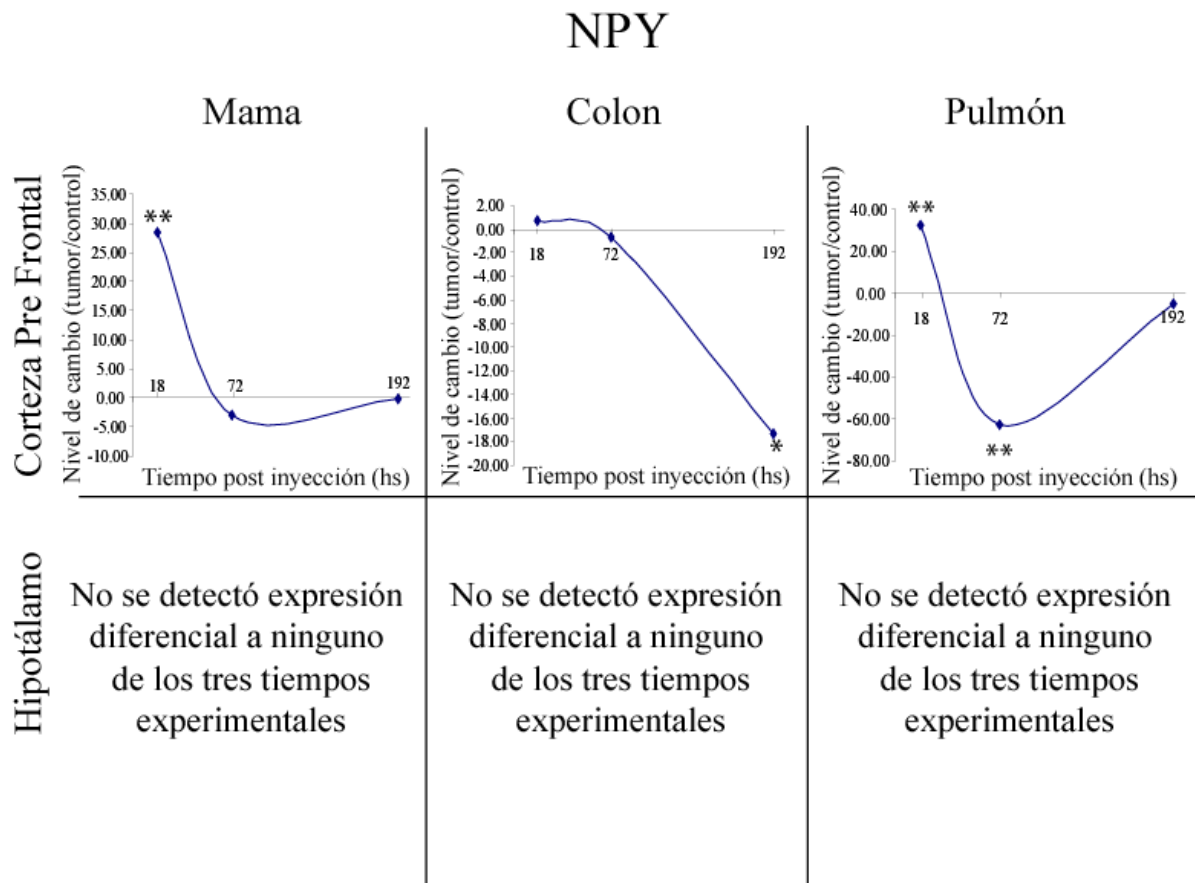
**Figura 2.9 Análisis del transcritto para Mc4r:** Cuadro de doble entrada mostrando los perfiles de expresión en el tiempo en la combinación tumor-región donde se obtuvieron datos para los tres tiempos experimentales. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Como fue descrito en la introducción el sistema hipotalámico de melanocortina, esta compuesto por los circuitos neuronales que incluyen dos grupos principales de neuronas, las productoras de POMC y las productoras del NPY, ambas en el núcleo arcuato del hipotálamo, los cuales envían proyecciones a neuronas de segundo orden que expresan los receptores de melanocortina 3 y 4 (Mc3r y Mc4r) (Hakansson, Brown et al. 1998). Dada esta relación entre POMC y NPY se decidió analizar el nivel de expresión del mensajero para NPY. Llamativamente, no se observaron cambios en los niveles hipotalámicos de este transcritto en ninguno de los tres modelos tumorales. Dado que recientemente ha sido demostrada la influencia de la leptina fuera del hipotálamo (Fulton, Pissios et al. 2006; Hommel, Trinko et al. 2006) y que han sido halladas

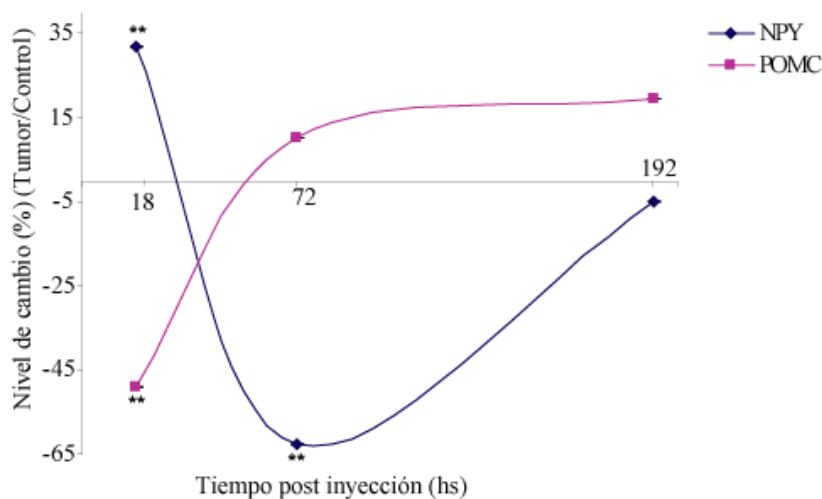
neuronas expresando POMC y Mc4r fuera del hipotálamo (Grill and Kaplan 2002), los niveles del transcrito para NPY también fueron analizados en la corteza pre frontal y el tallo cerebral. Tanto en el modelo de cáncer de mama, como en el de pulmón, en la corteza pre frontal hubo aumentos significativos a las 18 horas, mientras que a las 192 horas los niveles volvieron a la normalidad, pasando por una disminución significativa a en el modelo de cáncer de pulmón a las 72 horas post inyección (Figura 2.10 y Tabla 3). En el modelo de cáncer de colon, se observó una disminución significativa solo a las 192 horas post inyección (Figura 2.10 y Tabla 3).

Resultó interesante que al analizar en forma conjunta los resultados del modelo de cáncer de pulmón para POMC y NPY, se pudo observar una relación recíproca entre ellos en la corteza prefrontal, similar a lo descrito en cuanto a la regulación de estas dos moléculas en el hipotálamo (Figura 2.11).

El concepto de que las citoquinas pueden estar involucradas en la depresión, viene de observaciones donde pacientes deprimidos mostraron signos clínicos de aumento en la inmunidad innata (Maes 1999). Esta asociación es reforzada por datos de la clínica que muestran una prevalencia mayor a la normal de síntomas de depresión en individuos con patologías inflamatorias crónicas. Los síntomas de depresión en pacientes con cáncer han



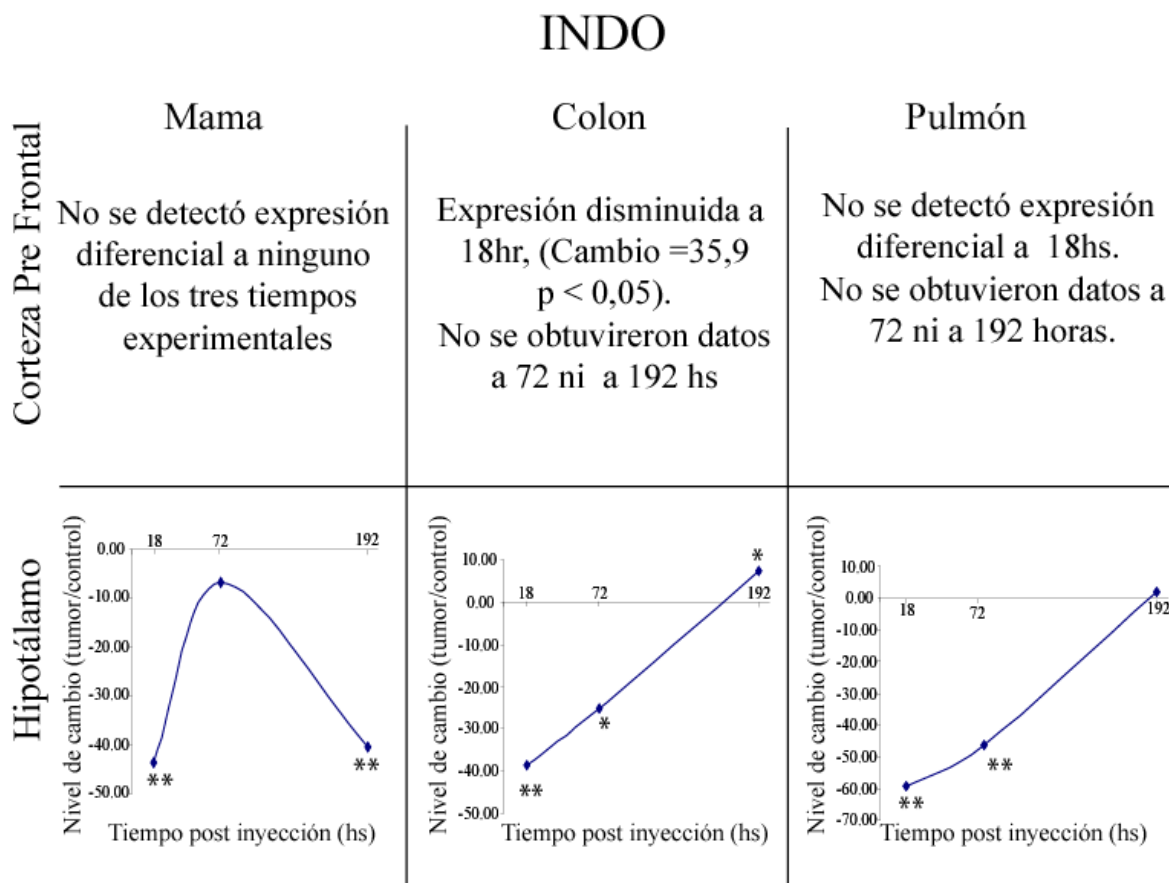
**Figura 2.10: Análisis del transcrito para Npy.** Cuadro de doble entrada mostrando los perfiles de expresión en el tiempo en la combinación tumor-región donde se obtuvieron datos para los tres tiempos experimentales. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .



**Figura 2.11: Perfiles de expresión el tiempo de los transcritos de Pomc y Npy.** Perfiles de expresión en el tiempo obtenidos por PCR en tiempo real, a partir de muestras de corteza prefrontal, del modelo de cáncer de pulmón. \*\*  $p < 0,01$ .

sido asociados con la disminución en los niveles de triptofano en plasma. Esto ocurre como resultado de la inducción de la enzima Indoleamina-pirrol 2,3 dioxigenasa (INDO) por la inmunoterapia (Capuron, Ravaut et al. 2002). Esta enzima es inducida en monocitos, macrófagos y microglía por estímulos inmunológicos y cataliza la síntesis de Kinurenina a partir del triptofano, disminuyendo consecuentemente los niveles de disponibilidad de este. Otras de las vías metabólicas en la que está involucrado el triptofano es en la síntesis de Serotonina (5-HT) relacionado con la caquexia asociada al cáncer. En base a esto se analizaron los niveles del transcripto para INDO. Este transcripto respondió disminuyendo sus niveles a las 18 horas post inyección en el hipotálamo de los tres modelos tumorales y en la corteza prefrontal del modelo de cáncer de colon. Mientras que en el hipotálamo de los modelos de cáncer de colon y pulmón, dejaron de observarse cambios significativos a las 192 horas, en el modelo de cáncer de mama, a este tiempo experimental los niveles hipotalámicos de los transcriptos para INDO permanecieron significativamente disminuidos (Figura 2.12 y Tabla 3).

Por último se analizaron los niveles del factor de crecimiento insulínico (IGF-1). IGF-1 es un péptido polifuncional, esencial para un normal crecimiento y desarrollo, el cuál cumple también funciones reparadoras y de neuroprotección en el sistema nervioso central (Carro, Trejo et al. 2003). Este péptido tiene la particularidad de antagonizar la inducción del estado de respuesta a la enfermedad por parte de Lipopolisacáridos (LPS), ya sea cuando ambos son inyectados en los ventrículos laterales del cerebro (Dantzer, Gheusi et al. 1999), o cuando son inyectados en la periferia en forma intraperitoneal (Johnson, O'Connor et al. 2005).



**Figura 2.12: Análisis del transcripto para Indo.** Cuadro de doble entrada mostrando los perfiles de expresión en el tiempo en la combinación tumor-región donde se obtuvieron datos para los tres tiempos experimentales. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

El mensajero para IGF-1 solo pudo ser detectado en el hipotálamo del modelo de cáncer de mama, y sus niveles se vieron modificados significativamente con aumentos a las 72 y disminuciones a las 192 hs post inyección, en los animales portadores de tumor (Figura 2.13 y Tabla 3).

Ninguno de los transcriptos analizados pudo ser detectado como diferencial en el tallo cerebral de los tres modelos tumorales.

ID gen (símbolo)	Modelo Tumoral	Región	Tiempo experimental (hs)	Nivel de cambio
19225 (Ptgs2/COX2)	Colon	Ht	18	+9.8 ± 1.2*
		Cx	18	+17.3 ± 5.1*
	Pulmón	Ht	72	+14.3 ± 4.2*
		Cx	18	+24.9 ± 5.9**
18976 (Pomc)	Colon	Ht	18	+23.0 ± 21.8*
			72	-10.5 ± 6.2*
			18	-35.1 ± 8.8**
	Mama	Ht	72	-17.3 ± 1.9**
			192	-31.0 ± 1.4*
			18	-12.3 ± 3.5**
Pulmón	Ht	192	-17.3 ± 8.8*	
		18	-38.4 ± 8.2**	
15930 (Indo)	Colon	Ht	72	-25.0 ± 8.1*
			192	+7.3 ± 1.2*
			18	-43.6 ± 8.5**
	Mama	Ht	192	-40.5 ± 13.4**
			18	-48.1 ± 7.2**
			72	-46.5 ± 10.8**
Pulmón	Ht	192	2.0 ± 1.5	
		18	+16.7 ± 2.0*	
11998 (Avp)	Colon	Ht	72	-5.6 ± 3.2
			18	-56.4 ± 13.1**
			192	+6.6 ± 4.1
	Mama	Ht	192	-11.4 ± 0.5**
			18	-17.8 ± 6.5**
			72	+32.0 ± 7.6**
17202 (Mc4r)	Colon	Ht	72	+13.1 ± 9.2
			192	-35.5 ± 7.7**
			18	-32.9 ± 16.2*
	Cx	Ht	72	- 1.0 ± 1.2
			192	-27.2 ± 8.6**
			18	-2.9 ± 1.6
17203 (Mc5r)	Colon	Ht	72	-14.6 ± 9.5*
			192	-33.7 ± 2.5**
			18	-44.8 ± 6.2**
	Cx	Ht	72	+6.2 ± 4.3
			192	-40.0 ± 7.7**
			18	+0.8 ± 1.3
109648 (Npy)	Colon	Cx	72	-0.6 ± 0.3
			192	-17.4 ± 7.5*
			18	+28.3 ± 8.7**
	Mama	Cx	72	-3.0 ± 2.0
			192	-0.3 ± 0.8
			18	+32.0 ± 7.1**
Pulmón	Cx	72	-62.7 ± 4.4**	
		192	-5.0 ± 2.3	
		18	-47.3 ± 25.2	
16000 (Igf-1)	Mama	Ht	72	45.7 ± 10.5**
			192	-46.4 ± 8.6**
			18	

**Tabla 3: Análisis de genes relacionados con respuesta a la enfermedad.** Los niveles de expresión de genes con relación conocida con el estado de respuesta a la enfermedad, no



presentes en el microarreglo, fueron analizados por PCR en tiempo real. \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ . Los datos están expresados como el promedio de cambio  $\pm$  Desv. Est

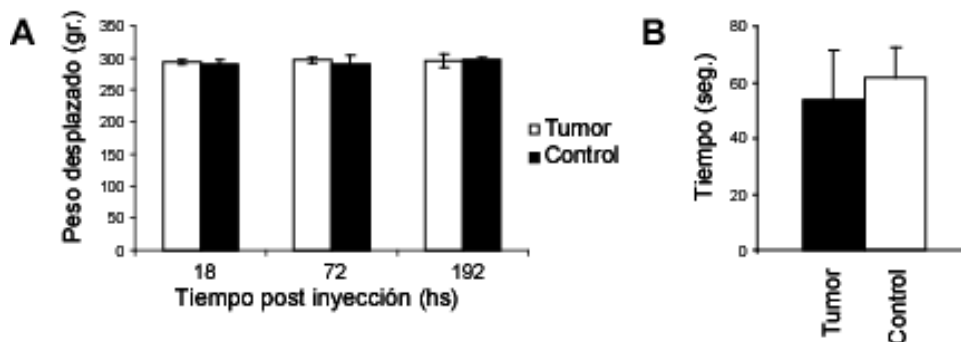
### 2.3.3 Estudios de comportamiento

Todos estos resultados sugieren un entorno molecular que se correspondería con un estado de comportamiento de respuesta a la enfermedad. Por lo tanto se decidió evaluar si existía un correlato con estos datos a nivel del comportamiento en los animales portadores de tumor. Para esto se realizaron dos tipos de ensayos comportamentales. Por un lado se analizó el comportamiento de los animales mediante el ensayo de “desplazamiento de leca” o *Borrowing* (Guenther, Deacon et al. 2001) (Materiales y Métodos). En condiciones normales, solo en minutos los animales sanos son capaces de desplazar la totalidad de la leca de los tubos, mientras que los animales con síntomas de comportamiento de respuesta a la enfermedad, tardan horas, o directamente no desplazan la leca.

El ensayo de desplazamiento de leca no mostró signos de comportamiento de respuesta a la enfermedad en los animales portadores de tumor. Este ensayo fue llevado a cabo en los tres tiempos experimentales, con los tres modelos tumorales, y en ninguno de los casos se observaron diferencias significativas entre los animales control y los animales inyectados con células tumorales (Figura 2.14 A). Como control positivo del ensayo se indujo en un grupo de animales el comportamiento de respuesta a la enfermedad inyectándolos en forma intraperitoneal con LPS, los cuales al cabo del tiempo que duró el ensayo no desplazaron pellet.

El segundo ensayo que se llevó cabo fue el conocido como ensayo de nado forzado o *forced swimming test*. (Petit-Demouliere, Chenu et al. 2005). Este

ensayo es comúnmente usado en ratones para evaluar los efectos de los antidepresivos. De la misma forma en el ensayo anterior, tampoco existieron diferencias entre los animales portadores de tumor y los animales control (Figura 2.14 B).



**Figura 2.14: Ensayos de comportamiento.** A) Datos representativos del Ensayo de Borrowing o desplazamiento de pellet. B) Datos representativos del ensayo de nado forzado. Ambos gráficos corresponden al modelo de cáncer de pulmón.

#### **2.3.4. Identificación de firmas moleculares específicas para cada modelo tumoral.**

##### **Concepto de firma molecular.**

Una firma molecular es una representación de un estado biológico, en la forma de un patrón de expresión génica, única para una determinada circunstancia. En este concepto se asume que cada condición biológica (estado patológico, respuesta a un ligando extracelular, etc.) va a estar reflejado en el patrón de expresión génica (Nevins and Potti 2007). Si bien con el nivel de expresión de uno o unos pocos genes no sería posible definir un estado biológico, los patrones de expresión génica obtenidos al medir simultáneamente miles de genes como ocurre con los microarreglos permiten obtener firmas moleculares asociadas a estados biológicos.

### **Utilización de las firmas moleculares.**

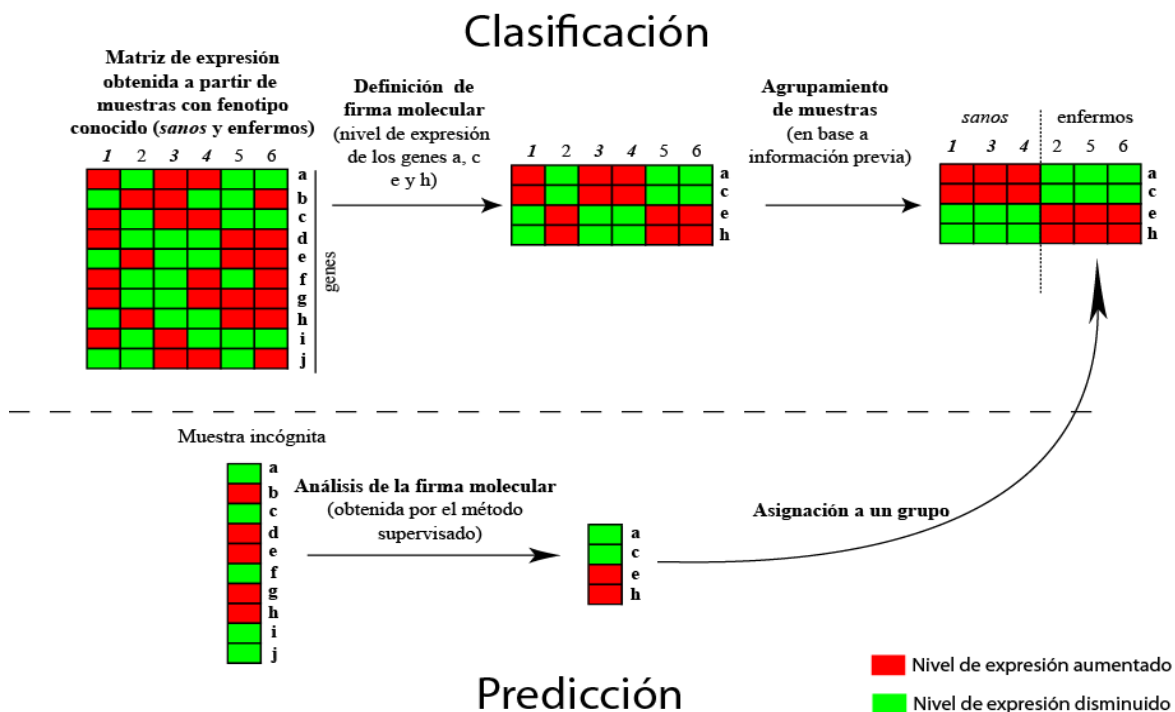
Una de las áreas donde el uso de las firmas moleculares ha tenido un gran impacto, es en el diagnóstico asociado al cáncer (Nevins and Potti 2007). Los métodos tradicionales para caracterizar tumores se basan principalmente en características histológicas, en el tamaño tumoral, en el grado de diseminación, y en ensayos bioquímicos como por ejemplo receptores para hormonas, antígenos nucleares etc. Estos métodos son utilizados para definir subgrupos dentro de un tipo de tumor (por ejemplo dentro de cáncer de mama, es relevante determinar si un tumor pertenece al subgrupo dependiente de hormonas o al subgrupo independiente de hormonas). En la actualidad está claro que las clasificaciones con los métodos tradicionales generan una heterogeneidad en el agrupamiento de tumores. A través de la utilización de los microarreglos ha sido posible establecer firmas moleculares las cuales demostraron la heterogeneidad existente al utilizar los métodos de clasificación tradicionales (Golub, Slonim et al. 1999; Alizadeh, Eisen et al. 2000).

Para poder detectar la existencia de firmas moleculares dentro de un perfil de expresión es necesario utilizar métodos de análisis conocidos como métodos de agrupamiento o *clustering*.

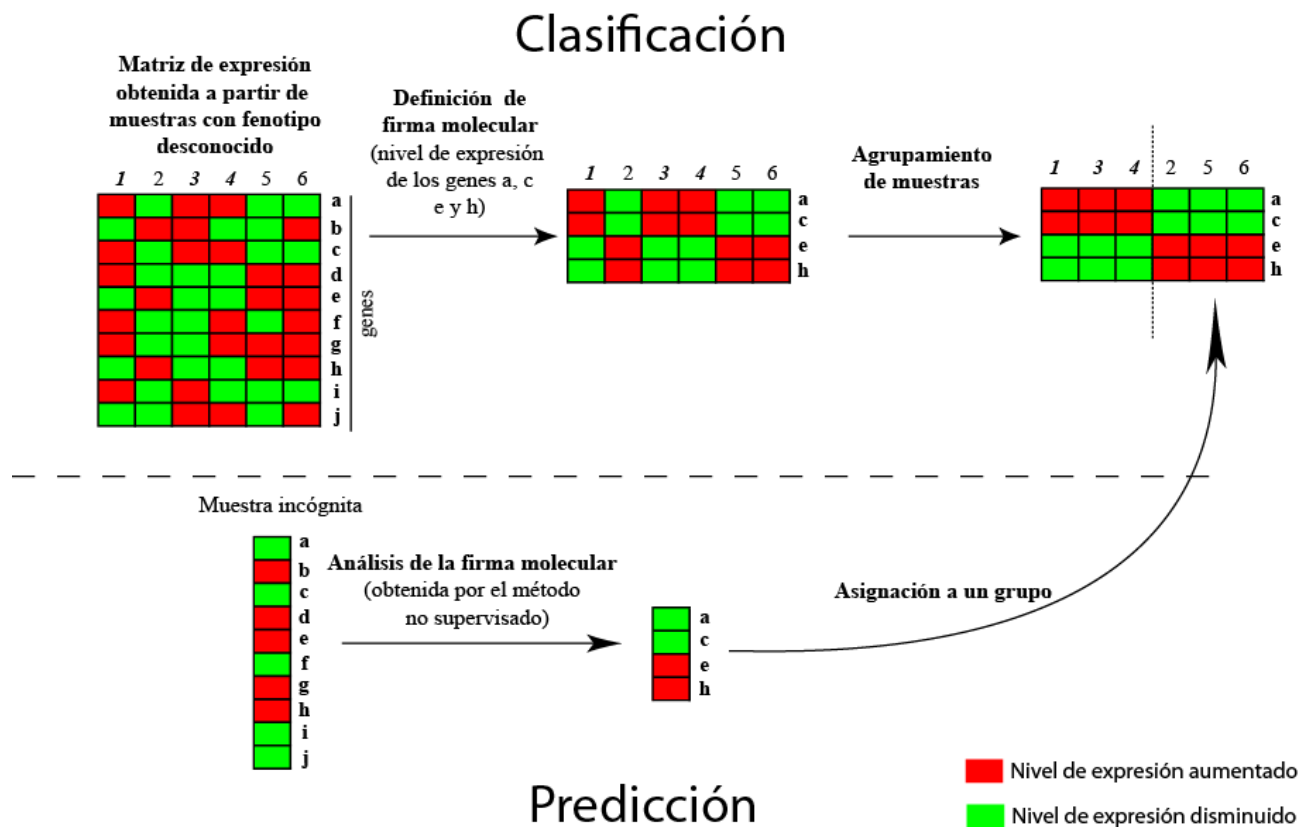
Agrupamiento o *clustering*, es un término general que puede ser aplicado a una gran cantidad de métodos pensados para organizar grupos de datos en base a similitudes entre ellos. Los métodos de agrupamiento tienen por objetivo encontrar una estructura dentro de una gran cantidad de datos *no rotulados*, como puede ser por ejemplo una matriz de expresión obtenida a partir de un experimento de microarreglos. Por lo tanto un grupo o *cluster* definido por estos métodos, es una colección de objetos los cuales son similares entre sí y diferentes de los objetos del otro grupo. En el caso de los microarreglos se utiliza

el nivel de expresión de los genes analizados, como parámetro de similitud entre las muestras (objetos) estudiadas.

Existen dos tipos de métodos de agrupamiento, los métodos supervisados, y los no supervisados. Los métodos supervisados hacen uso de información preexistente para ayudar a generar asociaciones entre los datos. En estos métodos un grupo de muestras es identificado como perteneciente a un tipo u otro y esta información es usada para ayudar a definir los grupos de genes que clasifican a las muestras de acuerdo a su tipo (Figura 2.15). Por el contrario, los métodos no supervisados se valen solo de los niveles de expresión de los genes para encontrar patrones en los datos (Figura 2.16). En ambos casos, una vez obtenida la firma molecular capaz de clasificar las muestras, es posible utilizarla para “predecir” el fenotipo de una muestra incógnita (Figuras 2.15 y 2.16).



**Figura 2.15. Obtención de una firma molecular mediante un método supervisado.** En el panel superior de la figura se muestra una matriz de expresión obtenida a partir de un experimento de microarreglos. Las columnas representan las muestras y las filas los genes. A partir de la información conocida sobre el fenotipo de las muestras (sanos y enfermos), se define una firma molecular capaz de clasificar a las muestras según su fenotipo. En el panel inferior se muestra una matriz de expresión de una muestra de fenotipo desconocido. Utilizando la firma molecular definida en el panel superior, se puede determinar que el fenotipo de la muestra incógnita es enfermo.



**Figura 2.16. Obtención de una firma molecular mediante un método No supervisado.** En el panel superior de la figura se muestra una matriz de expresión obtenida a partir de un experimento de microarreglos. Las columnas representan las muestras y las filas los genes. A partir de la matriz de expresión, se define una firma molecular capaz de clasificar a las muestras. En el panel inferior se muestra una matriz de expresión de una muestra de fenotipo desconocido. Utilizando la firma molecular definida en el panel superior, se puede predecir el fenotipo de la muestra incógnita.

El grado de certeza de que la firma molecular represente realmente un estado biológico determinado, y que no sea debido al azar puede ser analizado por métodos estadísticos que permiten estimar la capacidad de predicción. Uno de los métodos es denominado “dejar una muestra fuera” o “*Leave One Out*” (LOO) (Materiales y métodos). En este método se obtiene una firma molecular a partir de un grupo de muestras, dejando fuera a una muestra del grupo (no se la utiliza para generar la firma molecular). Una vez obtenida la firma molecular se utiliza la muestra que quedó fuera para evaluar si la firma molecular es capaz de

clasificarla correctamente. Dado que este proceso se realiza con todas las muestras del grupo, es posible obtener un valor p asociado, para determinar la capacidad de predicción de la firma molecular. La obtención del valor p se logra mediante un análisis multivariado denominado “Roc-score” (materiales y métodos) el cual fue desarrollado para obtener la habilidad un clasificador, como puede ser una firma molecular, para clasificar muestras de un sistema binario. Los clasificadores muy buenos tienen valores de ROC-score cercanos a 1, y los clasificadores malos tienen valores cercanos al 0,5.

### **Determinación de existencia de firmas moleculares.**

En esta sección de la tesis nos preguntamos si existía en los perfiles de expresión obtenidos algún sub-grupo de genes que de acuerdo a su nivel de expresión pudiera ser característico de cada modelo tumoral. Dicho de otra forma, nos preguntamos si existía una firma molecular con capacidad de clasificar a los distintos tipos de tumores. Para esto sometimos a los datos obtenidos a un análisis supervisado.

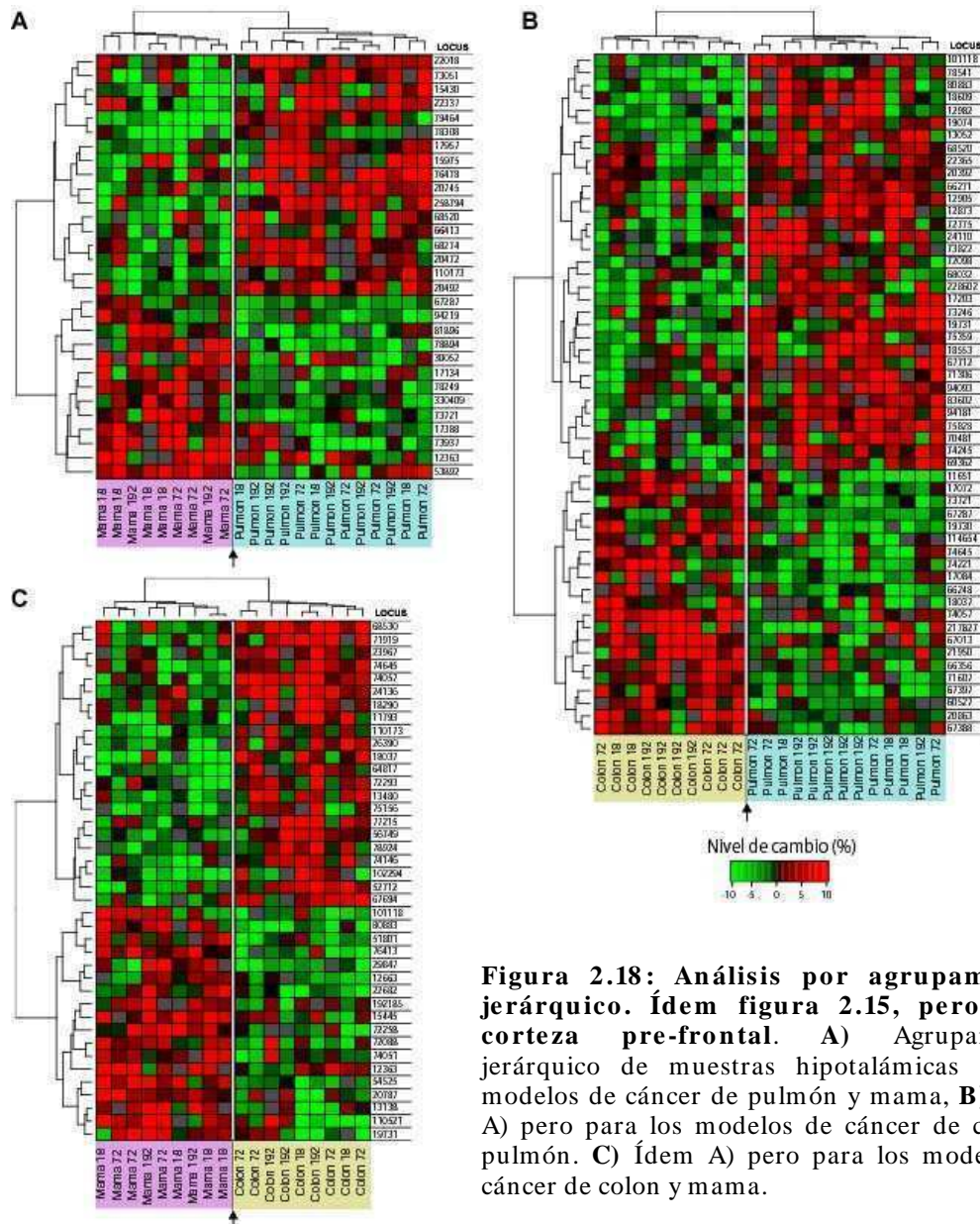
Al analizar los perfiles de expresión hipotalámicos, se encontró una firma molecular característica de los modelos de cáncer de mama y pulmón (Figura 2.17 A). Al analizar el resto de las posibles combinaciones también se hallaron firmas moleculares las cuales permitieron clasificar correctamente a las muestras entre los modelos de cáncer de mama y colon y entre los modelos de cáncer de pulmón y colon (Figuras 2.17 B y C respectivamente).

Es importante destacar que esta región también mostró capacidad de predicción estadísticamente significativa. Al utilizar el método LOO, se pudo determinar que las firmas moleculares tenían una alta capacidad para predecir correctamente a que modelo tumoral correspondía cada muestra. La firma



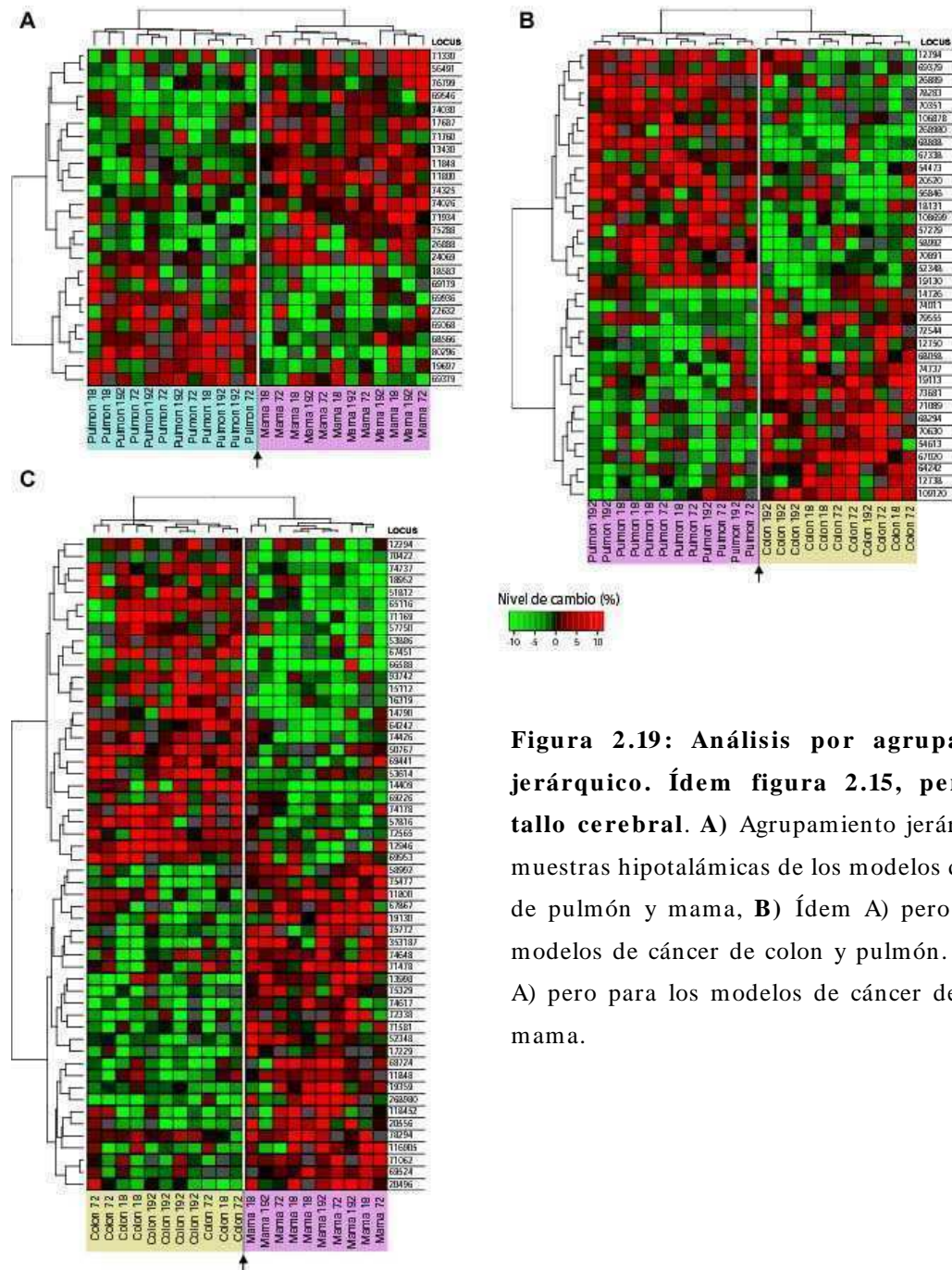


Estos resultados indican que cada tipo de tumor induce, por lo menos en las tres regiones del cerebro estudiadas, un perfil de expresión característico de sí mismo y que puede ser distinguible de los otros dos modelos tumorales.



**Figura 2.18: Análisis por agrupamiento jerárquico. Ídem figura 2.15, pero para corteza pre-frontal. A) Agrupamiento jerárquico de muestras hipotalámicas de los modelos de cáncer de pulmón y mama, B) Ídem A) pero para los modelos de cáncer de colon y pulmón. C) Ídem A) pero para los modelos de cáncer de colon y mama.**





**Figura 2.19: Análisis por agrupamiento jerárquico. Ídem figura 2.15, pero para tallo cerebral. A) Agrupamiento jerárquico de muestras hipotalámicas de los modelos de cáncer de pulmón y mama, B) Ídem A) pero para los modelos de cáncer de colon y pulmón. C) Ídem A) pero para los modelos de cáncer de colon y mama.**

## 2.4 Conclusiones:

En su conjunto estos análisis globales permitieron integrar una gran masa de información inicial, que permitió por un lado identificar los procesos biológicos que podrían estar siendo afectados y por otro, la determinación de

existencia de firmas moleculares en las tres regiones del cerebro estudiadas. Estos métodos permitieron interpretar a nivel funcional, los cambios que se vieron en el hipotálamo a nivel transcripcional. Los tres modelos tumorales mostraron cambios en prácticamente los mismos procesos biológicos (ver Figuras 2.3, 2.4 y 2.5). En los tres modelos los principales procesos afectados serían los relacionados al mantenimiento y/o al establecimiento de nuevas conexiones neuronales, procesos a nivel del metabolismo, y procesos relacionados con respuesta inmune y con respuesta a enfermedades. Si bien fue posible validar la expresión diferencial de genes relacionados con procesos de respuesta a la enfermedad no presentes en el microarreglo, no fue posible observar diferencias a nivel del comportamiento entre los animales portadores de tumor y los animales sanos.

Tanto los procesos biológicos, como el método que permitió definirlos (especialmente el análisis manual de los genes líderes), ayudaron a una interpretación del posible significado biológico representado por los cambios en el transcriptoma del hipotálamo. El análisis de los genes líderes que posteriormente permitieron definir la categoría “conexiones neuronales”, dio lugar a pensar que en el hipotálamo, como consecuencia de la presencia de células tumorales en la periferia, hubiese alguna alteración de procesos relacionados con la remodelación sináptica.

Finalmente, fue posible establecer la existencia de firmas moleculares en las regiones estudiadas capaces de discriminar entre los tres tipos de tumores. A su vez en el hipotálamo las firmas moleculares mostraron una muy buena capacidad de predicción.

## **Capítulo 3**

### 3.1 Objetivos específicos

En función de los resultados obtenidos en los dos capítulos anteriores, se plantearon dos nuevos objetivos específicos.

a) Estudiar si otra enfermedad periférica como la artritis reumatoide, podría también inducir cambios en el transcriptoma del sistema nervioso central y si estos cambios podrían ser distinguibles de los inducidos por las células tumorales.

### 3.2 Estudios con modelos animales de artritis reumatoide:

#### **Artritis reumatoide.**

La artritis reumatoide es una enfermedad sistémica, caracterizada por provocar inflamación crónica en articulaciones produciendo destrucción progresiva e incapacidad funcional de la misma. En ocasiones su comportamiento puede ser extra articular y afectar otros órganos.

Actualmente es aceptado por la comunidad científica que esta enfermedad cumple con todas las condiciones para ser considerada como una enfermedad autoinmune. A pesar de esto aún no se conoce con exactitud cual podría ser el autoantígeno contra el cual se estaría montando la respuesta inmune.

#### **La artritis reumatoide como artritis mediada por un complejo**

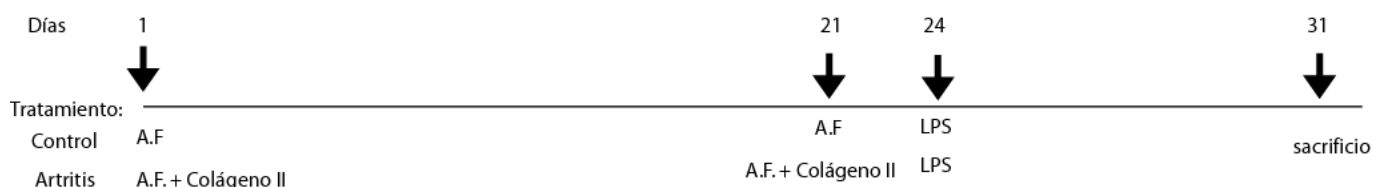
**inmune:** La sinovitis reumatoide es una enfermedad inflamatoria mediada por el sistema inmune. La maquinaria inmune que hoy en día es vista como la esencia de la enfermedad esta compuesta por el receptor Fcγ expresado en macrófagos, activación del complemento, influjo de leucocitos y liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Nabbe, Blom et al. 2003). Si bien no se han

determinado con exactitud los orígenes de la antigenicidad, esta claro que esta enfermedad tiene un componente inmune. Dado que existen modelos murinos de la artritis reumatoide decidimos estudiar si también era posible detectar cambios en el transcriptoma del cerebro de animales portadores de esta enfermedad.

### **3.3.1 Diseño experimental:**

Dos cepas de ratones fueron utilizadas para el los estudios con el modelo de artritis, la cepa C57Bl\6 y DBA/1. Para cada cepa se realizaron 4 experimentos independientes de 30 animales cada uno (15 con artritis y 15 control), y se analizó un solo tiempo experimental (31 días, Figura 3.2) lo que hizo un total de 240 animales. El tiempo experimental fue determinado en función del momento mas temprano en el cual se pudo determinar si el animal había desarrollado o no artritis. Dado que no se logró que el 100% de los animales desarrollaran la enfermedad, no se pudo analizar tiempos experimentales previos; de haberlo hecho hubiera existido la posibilidad de incluir como enfermo a algún animal que no hubiera desarrollado artritis. En los tiempos mayores a 31 días, los animales con artritis mostraban molestias al caminar. Se decidió no estudiar estos tiempos dado que podrían existir cambios transcripcionales en el cerebro no solo debido a la aparición de la artritis, sino también al estrés ocasionado por las molestias motoras.

Tanto el sacrificio de los animales, como la disección del cerebro, procesamiento del material y el esquema de hibridación fueron los mismos que los utilizados para los modelos tumorales.



**Figura 3.1 Generación de modelos animales de artritis reumatoide y diseño experimental.** A.F: Adyuvante completo de Freund, LPS: lipolisacárido

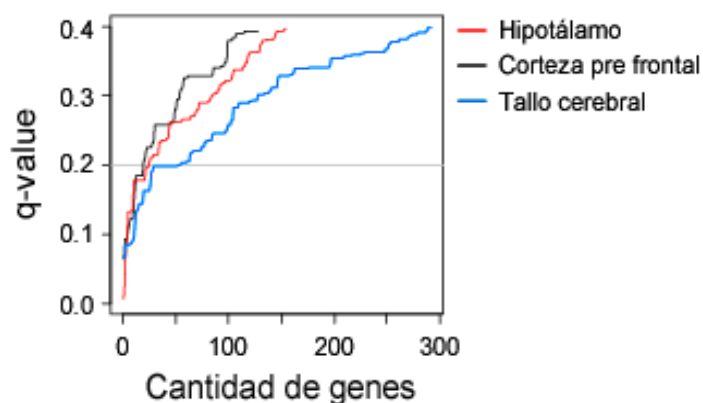
La obtención de animales con artritis se hizo de acuerdo a (Gould, Bright et al. 2004) (Figura 3.2 y Materiales y métodos). Los animales fueron inmunizados en los días 1 y 21 uno del protocolo mediante la inyección de colágeno de tipo II junto con adyuvante completo de Freund. Los animales control fueron inyectados solo con adyuvante completo de Freund mas el vehículo en el cual estaba resuspendido el colágeno. En el día 24 todos los animales fueron inyectados con LPS en forma intradérmica. El día 31 la totalidad de los animales control, y los animales tratados con colágeno que presentaban signos clínicos correspondientes al inicio de la artritis fueron sacrificados. La aparición de artritis se determinó macroscópicamente por la inflamación generada en las patas traseras de los animales. De esta forma se obtuvo entre un 75 y 90% de animales al día 31 con signos clínicos de artritis reumatoide.

### 3.2.2 Resultados:

#### 3.2.2.a Detección de genes diferenciales.

Utilizando el mismo criterio de selección de genes candidatos a ser diferenciales que el utilizado para los modelos de cáncer, (nivel de cambio mayor a 20%,  $p < 0,05$ ) se detectaron 89, 73 y 104 genes en el hipotálamo, corteza pre frontal, y el tallo cerebral respectivamente.

Al realizar el análisis por comparaciones múltiples, contrariamente a lo observado para los tres modelos de cáncer, donde el tallo cerebral era la región con menor cantidad de genes diferenciales, en los modelos de artritis, esta región fue la que mostró mayor cantidad de genes con modificación en sus niveles de expresión (Figura 3.3).



**Figura 3.3: Análisis por comparaciones múltiples.** La figura muestra los valores q (q values) y la cantidad de genes, para cada una de las regiones cerebrales en los modelos de artritis.

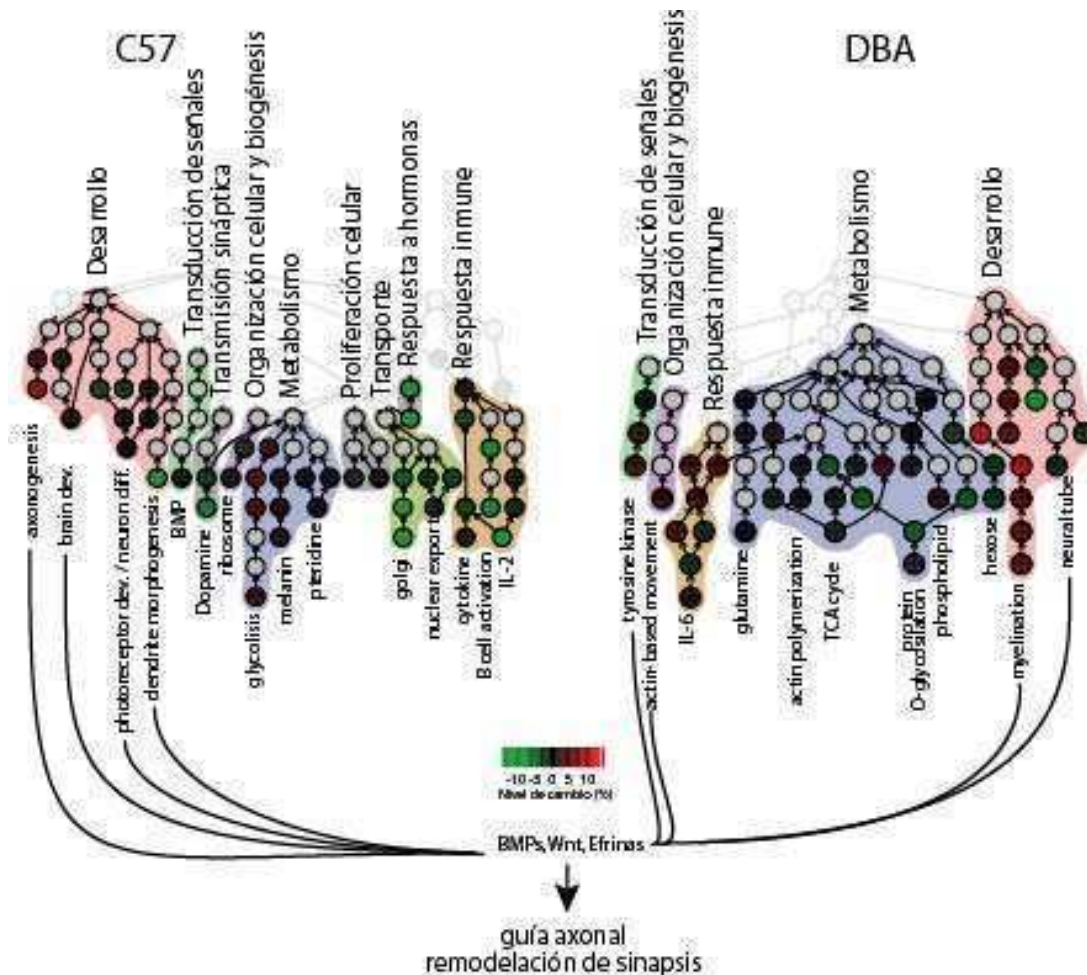
Al comparar los listados de genes diferenciales entre los modelos tumorales y los de artritis, no se encontraron similitudes entre los mismos.

### 3.2.2.b. Estudios funcionales.

De la misma forma que se hizo para los modelos tumorales, se realizaron los estudios funcionales para los modelos de artritis. A pesar de que el tallo cerebral fue la región con mayor cantidad de genes diferenciales en los animales con artritis, para poder comparar los modelos tumorales con los de artritis, los estudios funcionales fueron realizados con los datos obtenidos a partir del hipotálamo.

Los procesos biológicos modificados fueron similares a los modificados en los animales portadores de tumor. Los gráficos acíclicos mostraron gran

similitud en las categorías funcionales entre los dos modelos de artritis y ambos con respecto a los obtenidos en los tres modelos tumorales (Figura 3.4).



**Figura 3.4: Análisis Funcional.** Gráficos acíclicos mostrando los grupos de genes de GO-PB enriquecidos en genes diferenciales. Los datos corresponden las muestras hipotalámicas de los modelos de artritis reumatoide. El color indica el nivel de cambio promedio dentro del grupo, en porcentaje ( $p < 0,05$ , GSEA), la escala de colores está incluida en la figura. Gris indica que no hay un nivel de cambio significativo ( $p \geq 0,05$ ). Los grupos de genes funcionalmente relacionados fueron agrupados en categorías (rótulos superiores), y resaltados con los mismos colores en los dos modelos.

Nuevamente, como en los animales portadores de tumor, desarrollo, metabolismo, respuesta inmune y organización celular y biogénesis, fueron categorías funcionales que aparecieron modificadas en los animales con artritis. En este caso, una categoría pudo ser directamente relacionada con el sistema



nervioso central, como fue “transmisión sináptica”. A diferencia de los modelos tumorales, muchos de los grupos de genes (nodos) dentro de las categorías funcionales pudieron ser interpretados en el contexto del sistema nervioso central sin necesidad de profundizar en el estudio de los genes líderes. Genes relacionados con génesis de axones, morfogénesis de dendritas, o mielinización por ejemplo, aparecieron dentro de la categoría desarrollo. Dado que estamos en presencia de animales adultos todos estos datos nuevamente apuntan a procesos relacionados con la remodelación de sinapsis. Dentro de la categoría transducción de señales, en uno de los modelos aparecen genes de las familias de las BMPs, mientras que en el otro modelo aparecen dentro de esta categoría genes de la familia de los tirosina quinasa. En el caso del nodo relacionado con las BMPs, este pudo ser interpretado dentro del contexto del sistema nervioso central dado que como se explicó anteriormente, en este contexto las proteínas de la familia de las BMPs están relacionadas con la remodelación de sinapsis.

Al analizar los genes incluidos en el nodo de tirosina quinasa, dentro de la categoría de transducción de señales, encontramos genes que codifican para una familia de receptores llamados Efrinas. Estos receptores, han sido descritos como involucrados en desarrollo del sistema nervioso, y en remodelación de sinapsis en adultos (Flanagan and Vanderhaeghen 1998).

Todos estos resultados están nuevamente indicando que los cambios a nivel transcripcional en el hipotálamo, que ocurren como consecuencia de la inducción de artritis, estarían relacionados con procesos relacionados al mantenimiento y/o establecimiento de nuevas conexiones neuronales, procesos metabólicos, y de respuesta inmune.

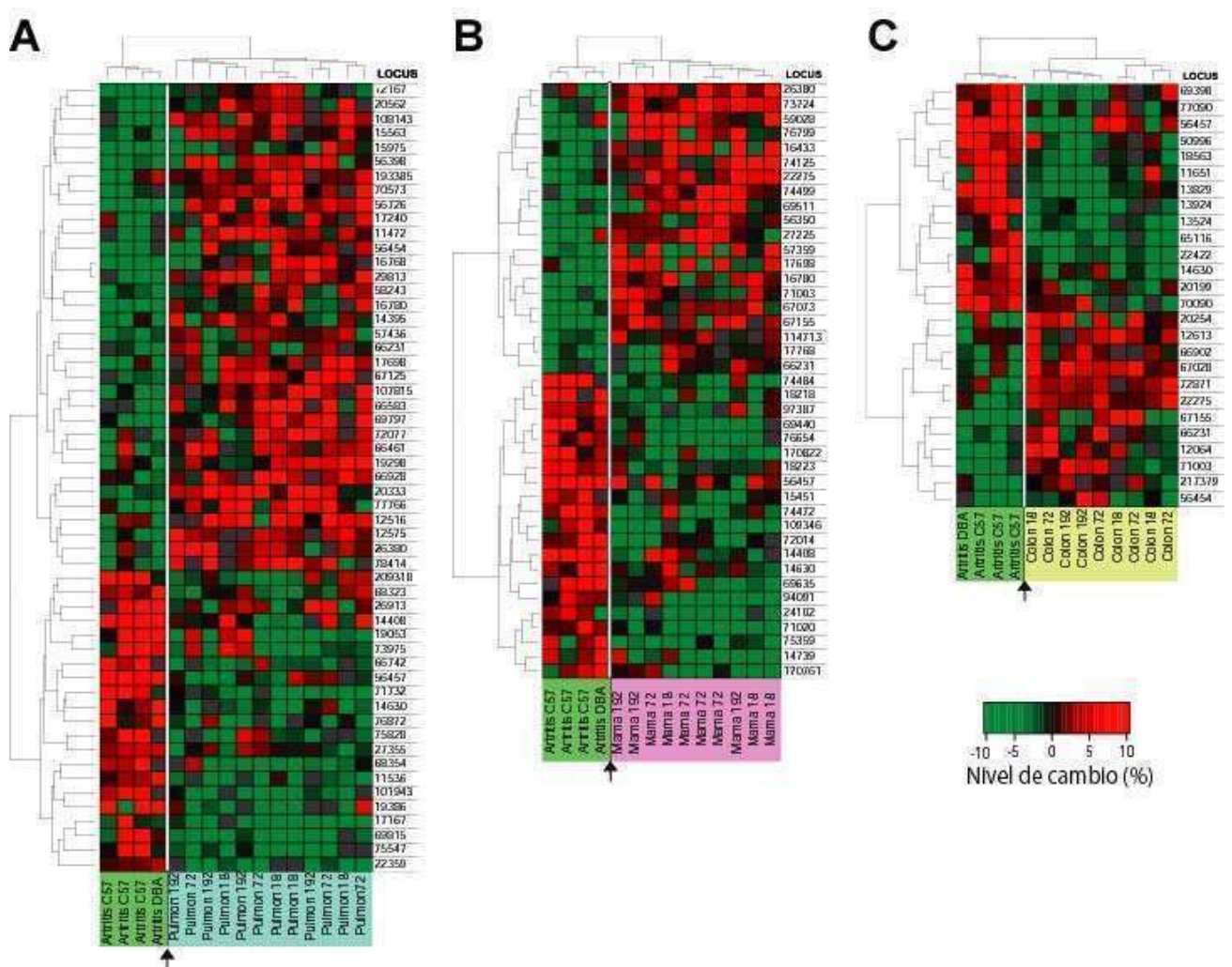
### **3.2.2.c. Estudios de agrupamiento.**

Si bien no hubo coincidencias entre los genes diferenciales entre los modelos de cáncer y los de artritis, para poder estudiar si existe algún tipo de especificidad en los cambios transcripcionales en el sistema nervioso central en cuanto al tipo de enfermedad periférica, es necesario determinar la capacidad del cerebro de discriminar entre una enfermedad y otra. Por lo tanto se realizaron estudios de agrupamiento similares a los realizados para la clasificación entre modelos tumorales.

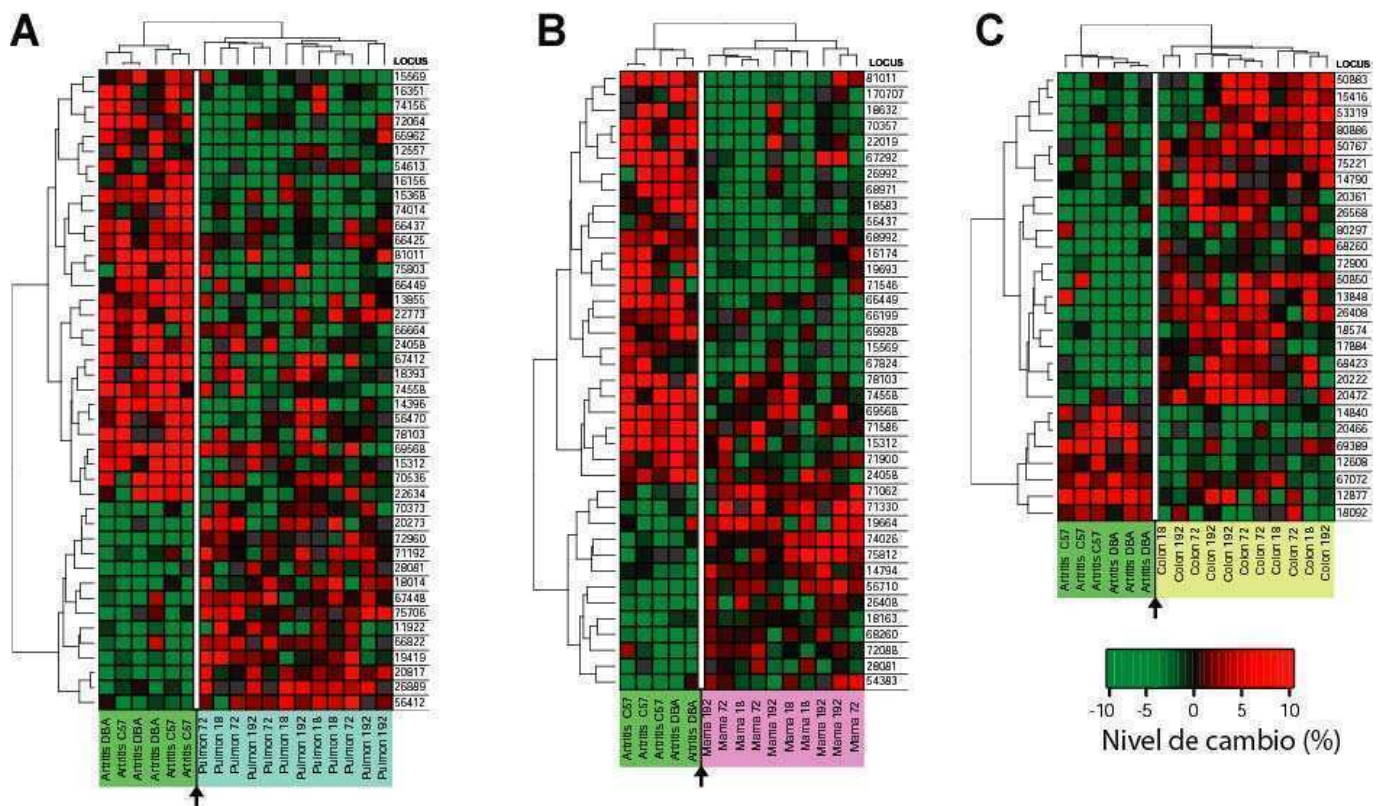
El sistema nervioso central fue capaz de discriminar entre los animales con artritis y cada uno de los modelos tumorales. Tanto el hipotálamo, como la corteza, y el tallo cerebral mostraron que la primera división del agrupamiento separa a los animales con artritis de los animales portadores de tumor (Figuras 3.5-3.7). Esto sugirió fuertemente que las tres regiones analizadas existían perfiles de expresión con capacidad de discriminar entre animales con artritis y animales de cada uno de los modelos tumorales.

Para confirmar la capacidad del cerebro de discriminar entre artritis y cáncer se llevó a cabo un análisis de agrupamiento, entre estas dos enfermedades, pero con todos los modelos tumorales simultáneamente, para las tres regiones estudiadas. Las tres regiones fueron capaces de discriminar entre los animales con artritis, y los 3 modelos tumorales. Tanto el hipotálamo como el tallo cerebral discriminaron los animales con artritis de los portadores de tumor casi con un 100% efectividad, dado que en ambas regiones solo un grupo de animales con artritis quedó clasificado en el grupo portador de tumor (Figuras 3.8 y 3.9). La corteza prefrontal fue capaz de discriminar a la totalidad de los animales con artritis y solo clasificó tres grupos de animales portadores de tumor dentro del grupo de artritis (Figura 3.10). Para estudiar la capacidad

de predicción de cada región se utilizó el método de LOO. La corteza prefrontal mostró capacidad de predicción entre los modelos de artritis y cáncer de mama (ROC-score, 0.8333;  $p < 0.001$ ) y entre los modelos de artritis y cáncer de pulmón (ROC-score, 0.8013;  $p < 0.001$ ), mientras que el hipotálamo hizo lo propio entre los modelos de artritis y de cáncer de colon (ROC-score, 0.9107;  $p < 0.001$ ) y entre artritis y cáncer de mama (ROC-score, 1;  $p < 0.001$ ).

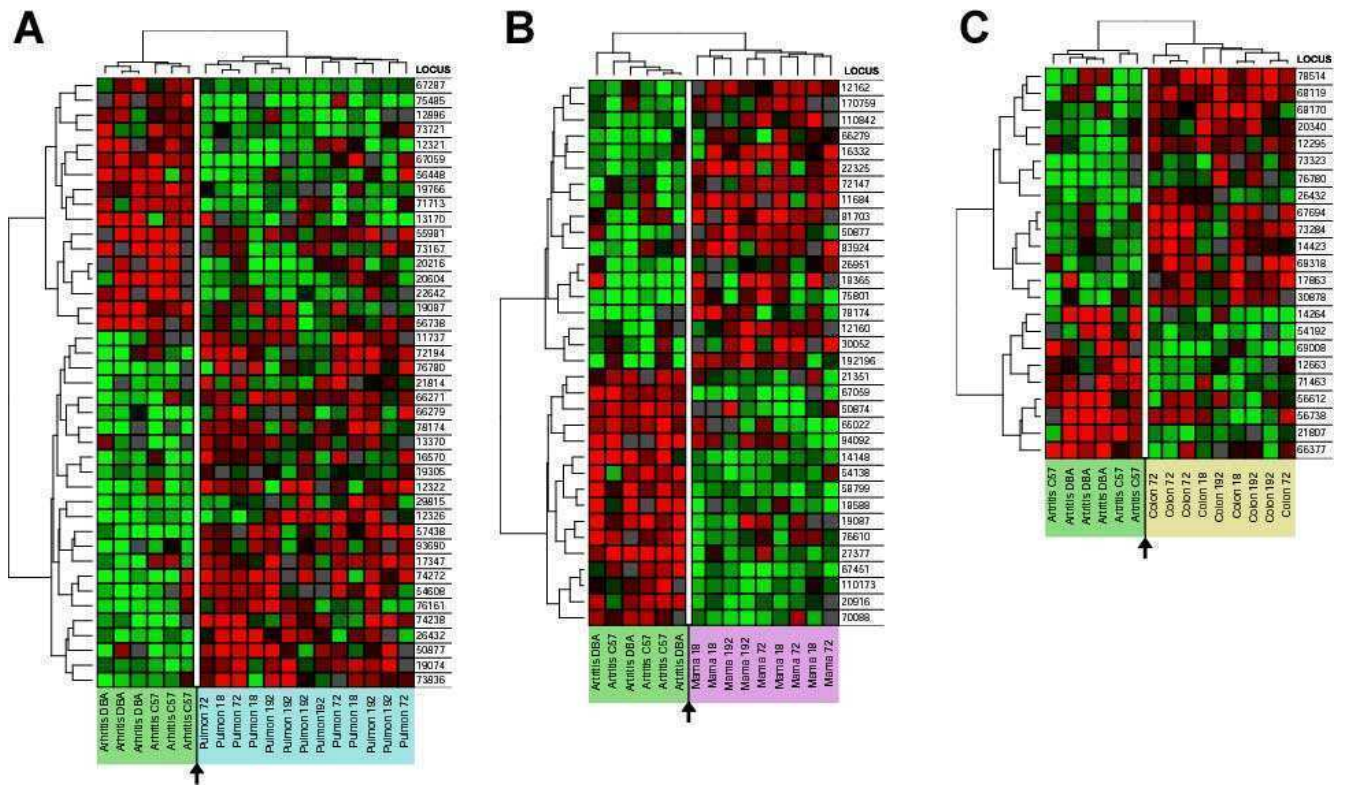


**Figura 3.5: Agrupamiento de muestras hipotálamicas de modelos animales de artritis y cáncer.** Análisis de agrupamiento de animales con artritis y con los tres tipos de tumor, basado en los genes respondiendo en forma diferencial entre cada par de modelos. A) Pulmón, B) Mama y C) Colon

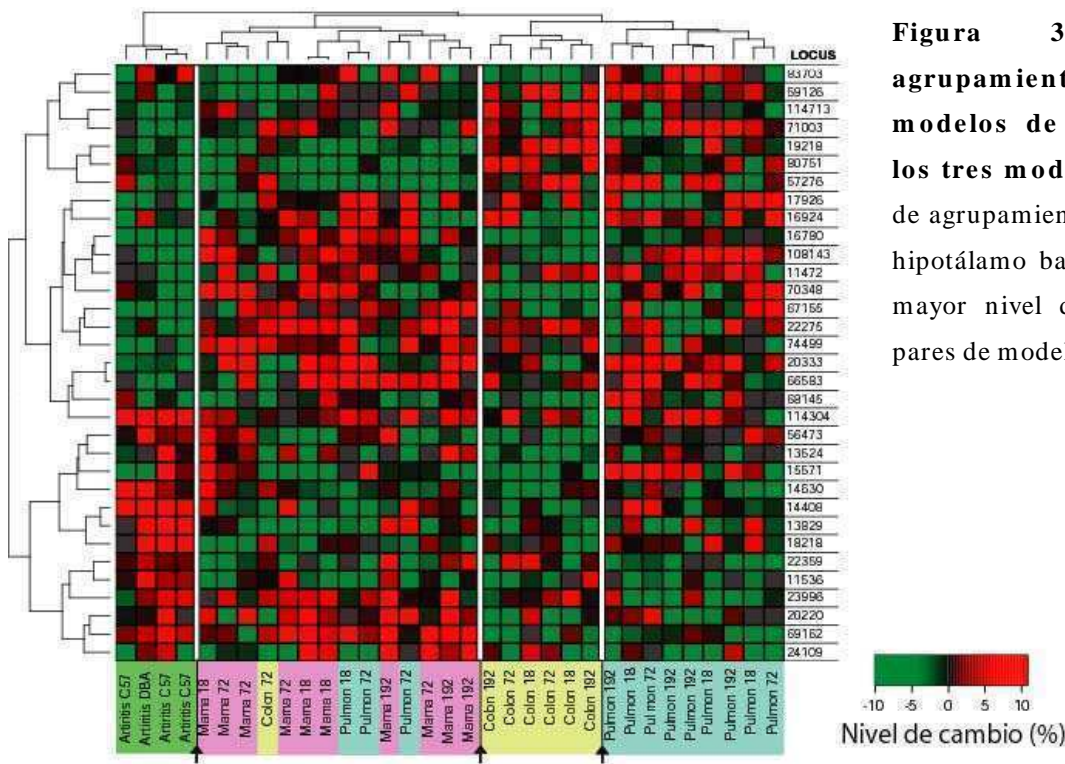


**Figura 3.6: Agrupamiento jerárquico a partir de muestras de tallo cerebral de modelos animales de artritis y cáncer.** Análisis de agrupamiento jerárquico de animales con artritis y con los tres tipos de tumor, basado en los genes respondiendo en forma diferencial entre cada par de modelos. A) Pulmón, B) Mama y C) Colon



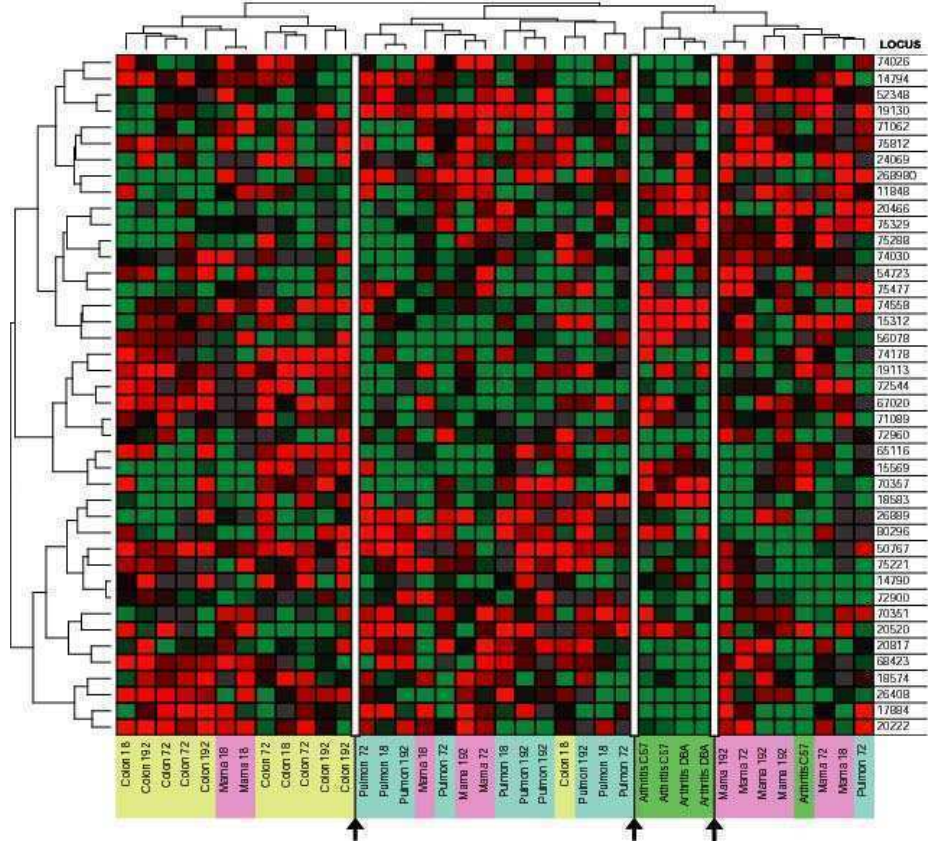


**Figura 3.7: Agrupamiento jerárquico a partir de muestras de corteza de modelos animales de artritis y cáncer.** Análisis de agrupamiento jerárquico de animales con artritis y con los tres tipos de tumor, basado en los genes respondiendo en forma diferencial entre cada par de modelos. A) Pulmón, B) Mama y C) Colon

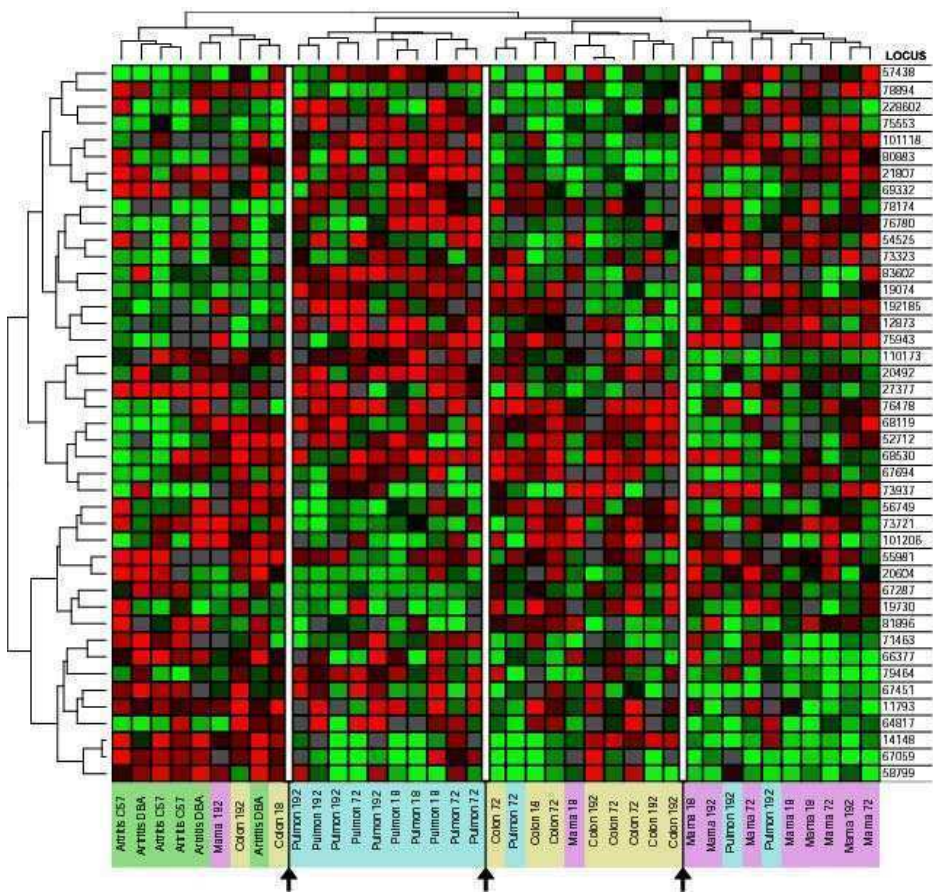


**Figura 3.8: Análisis de agrupamiento jerárquico entre modelos de artritis reumatoide y los tres modelos tumorales.** Análisis de agrupamiento a partir de muestras de hipotálamo basado en los 10 genes con mayor nivel de cambio entre los tres pares de modelos.





**Figura 3.9:** Análisis de agrupamiento jerárquico entre modelos de artritis reumatoide y los tres modelos tumorales. Análisis de agrupamiento a partir de muestras de Tallo cerebral basado en los 10 genes con mayor nivel de cambio entre los tres pares de modelos.



**Figura 3.10:** Análisis de agrupamiento jerárquico entre modelos de artritis reumatoide y los tres modelos tumorales. Análisis de agrupamiento a partir de muestras de corteza pre frontal basado en los 10 genes con mayor nivel de cambio entre los tres pares de modelos.



### **3.3 Conclusiones:**

Estos resultados muestran que otra enfermedad crónica periférica es capaz de inducir cambios en los transcriptomas del hipotálamo, el tallo cerebral, y la corteza pre frontal. A diferencia de lo descrito para los animales portadores de tumores, donde el hipotálamo fue la región donde ocurrieron la mayor cantidad de cambios en los niveles de expresión en los animales con artritis el tallo cerebral se mostró como la región con mayor sensibilidad.

Los estudios de agrupamiento permitieron demostrar la existencia de firmas moleculares específicas para cada enfermedad, en las tres regiones del cerebro analizadas. A su vez mediante el método de LOO, fue posible determinar la capacidad de predicción entre artritis y los modelos de cáncer de las firmas moleculares obtenidas tanto de la corteza prefrontal, como del hipotálamo.

## **Discusión**



El objetivo principal de este trabajo fue establecer si el cerebro, desde su función como integrador de información proveniente de todo el organismo, podría detectar la presencia de células tumorales en la periferia. A lo largo de esta tesis se obtuvo por primera vez evidencia de que un tumor en la periferia es capaz de inducir cambios en el transcriptoma de al menos tres regiones del cerebro, en forma tumor y enfermedad específica. Los resultados obtenidos mostraron que fue posible discriminar entre los animales portadores de cada uno de los tumores entre sí, y estos a su vez de los animales portadores de artritis reumatoide. Por lo tanto estos cambios a nivel transcripcional en el cerebro pueden ser interpretados como una capacidad de este órgano para detectar la aparición de por los menos dos enfermedades periféricas. Si bien con los datos obtenidos en este trabajo no se puede asegurar que el cerebro sea el único órgano con esta capacidad, esta claro que no todos los órganos del cuerpo la tienen, dado que el análisis del transcriptoma hepático de animales portadores de tumor no mostró la existencia de cambios comparables en cuanto a cantidad y a intensidad, a los obtenidos en el cerebro.

#### Características de detección:

Una de las características observadas en los estudios de microarreglos en este trabajo, fueron los bajos niveles de cambio detectados y la baja cantidad de genes diferenciales. Esto es una particularidad de los estudios del transcriptoma en el sistema nervioso central, especialmente en el cerebro. Las causas residen tanto en cuestiones biológicas, como en aspectos técnicos intrínsecos de los microarreglos.

A nivel biológico hoy en día es aceptado que la heterogeneidad celular en tejidos complejos como el cerebro es uno de los factores que mas pueden

complicar los estudios de microarreglos (Geschwind 2000; Mirnics and Pevsner 2004; Arlotta, Molyneaux et al. 2005; Dougherty and Geschwind 2005). Las neuronas tienen una gran diversidad de fenotipos y los cambios en los niveles de expresión pueden afectar solo a subpoblaciones de neuronas, por lo tanto grandes cambios en los niveles de un transcripto en un determinado subgrupo neuronal, pueden verse diluidos por otros subgrupos neuronales donde ese transcripto no haya sufrido modificaciones en sus niveles de expresión. Por otro lado, tanto la expresión *de novo*, como la inducción o represión transcripcional son fenómenos poco observados en el sistema nervioso central adulto, por ende los niveles de expresión diferencial en el cerebro suelen ser bajos y difíciles de separar del ruido experimental (Mirnics and Pevsner 2004). Asimismo es necesario tener en cuenta por ejemplo, que moléculas involucradas en señalización pueden estar diferencialmente expresadas en sentidos opuestos en neuronas excitatorias e inhibitorias adyacentes, por lo tanto al ser analizadas en forma conjunta, esa expresión diferencial puede no ser detectada luego del análisis de datos (Coppola and Geschwind 2006).

En lo referente a los aspectos técnicos, los estudios de genómica funcional utilizando microarreglos impresos con c-DNA u oligonucleótidos, si bien conforme pasan los años aumenta la sensibilidad, todavía resulta difícil detectar mensajeros de muy baja abundancia. Asimismo, hay modelos de desarrollo del sistema nervioso que postulan que aspectos específicos del fenotipo neuronal están dados por los mRNAs de baja abundancia (Chaudhari and Hahn 1983), por lo tanto esto hace que muchos de los transcriptos que puedan estar experimentando modificaciones en sus niveles transcripcionales no superen el límite de detección de la plataforma de microarreglos utilizada (Coppola and Geschwind 2006).

Hipotálamo como sensor principal:

En cuanto a las regiones cerebrales estudiadas, el hipotálamo fue la región donde mayor cantidad de genes diferenciales se detectaron en los modelos tumorales. Este resultado no es sorprendente debido a las conocidas funciones del hipotálamo como integrador de señales provenientes de la periferia por ejemplo a través del eje Hipotálamo-pituitario-adrenal (eje HPA), cumpliendo un rol central en la comunicación existente entre el sistema nervioso central, el sistema inmune y el sistema endócrino. Específicamente, el núcleo paraventricular del hipotálamo representa un centro anatómico de integración de activación del sistema inmune, el sistema endocrino y el sistema nervioso (Turnbull and Rivier 1999). En función de todo esto, no es de extrañar que el hipotálamo muestre mayores alteraciones en su transcriptoma comparado con la corteza pre frontal y el tallo cerebral. A esto se suma que la corteza prefrontal es una de las regiones de mayor complejidad, debido a que cientos de tipos celulares diferentes pueden encontrarse en unos pocos milímetros cuadrados (Sawatari and Callaway 2000). Ha sido propuesto que en los estudios de genómica funcional utilizando microarreglos la posibilidad de encontrar transcritos modificados disminuye a medida que aumenta la complejidad del tejido analizado (Geschwind 2000; Sandberg, Yasuda et al. 2000), por lo tanto la gran complejidad de la corteza prefrontal, haría que fuese una región con mayor dificultad para detectar transcritos expresados diferencialmente, comparada con el hipotálamo.

Si bien es altamente probable que los efectos descritos previamente, estén siendo responsables en parte de los resultados obtenidos en los modelos tumorales, resulta muy interesante destacar que en los modelos de artritis, la

región donde mayor cantidad de genes diferenciales se detectó, fue el tallo cerebral. Estos resultados abren interesantes interrogantes sobre las diferentes formas en que el cerebro detecta y procesa la presencia de diferentes tipos de enfermedades.

Especificidad de detección:

El cerebro es capaz de detectar en forma específica cada tipo de tumor a partir de un perfil transcripcional definido. La comparación de los cambios transcripcionales inducidos en el cerebro por los tres tipos de tumores, tanto en cuanto a los listados de genes, como en los perfiles de cambio en función del tiempo, mostró claras diferencias entre cada uno de ellos. Debido al diseño experimental utilizado, podemos postular que estas diferencias serían debidas al tipo de célula que fue inyectada en cada caso. Una posible interpretación de nuestros resultados sería que una respuesta mayoritariamente temprana, podría por ejemplo, deberse a que el cerebro detecta la entrada masiva de una gran cantidad de células al organismo. Nuestros resultados muestran que si bien este podría ser el caso para el modelo de cáncer de pulmón (dado que es el modelo donde se detectan mayor cantidad de genes con cambios a las 18 hs post-inyección de las células tumorales), en el modelo de cáncer de colon, los animales fueron inyectados con la misma cantidad de células y sin embargo la respuesta fue principalmente tardía. A pesar de que en el modelo de cáncer de mama los animales fueron inyectados con una cantidad de células de un orden de magnitud inferior al de los otros dos modelos, el perfil de cambio en el tiempo para este modelo, fue el de un perfil intermedio. Por lo tanto la cinética de cambio de los perfiles de expresión no es dependiente de la cantidad de células inyectadas. La existencia de firmas moleculares específicas para cada

modelo tumoral termina por confirmar que el modelo experimental utilizado, permite demostrar la capacidad del cerebro de detectar la presencia de células tumorales de un tipo específico.

Estudios funcionales:

Para poder traducir los cambios observados a nivel molecular, en cambios a nivel celular, se llevaron a cabo estudios teóricos sobre la función biológica de los genes detectados. Estos estudios que incluyeron una serie de pasos sucesivos, fueron necesarios para poder llegar a una interpretación del posible significado biológico de los cambios transcripcionales. Esto mostró que no alcanza solo con la aplicación de algoritmos que generen listados de procesos biológicos, sino que también es necesaria la identificación de los genes líderes, y luego la interpretación de las funciones biológicas que éstos pueden llegar a cumplir, pero en el contexto biológico adecuado.

Estos estudios mostraron que en el hipotálamo, a pesar de que los tres tipos de tumores no mostraron similitudes entre los listados de genes diferenciales, si fueron similares en cuanto a las funciones biológicas modificadas. Una de las funciones biológicas mas representada en los tres modelos tumorales fue la que denominamos conexiones neuronales, dentro de la cuál se agruparon genes relacionados con el establecimiento o la remodelación de sinapsis.

El concepto de remodelación de sinapsis no es nuevo, dado que hace casi 100 años Ramón y Cajal sugirió que la conectividad neuronal en el cerebro adulto podría cambiar como consecuencia de la actividad mental. La remodelación de sinapsis es un proceso que tiene lugar en el cerebro adulto, como consecuencia de estímulos tanto centrales como de la periferia. Este

proceso puede tener lugar bajo condiciones fisiológicas normales, lo que denota la capacidad del sistema nervioso de adaptarse a los requerimientos funcionales del organismo, a través de la reestructuración de la morfología de las sinapsis existentes.

El hipotálamo es una de las regiones del cerebro más estudiadas con relación a este proceso, pero también ocurre en una gran variedad de otras áreas del sistema nervioso central. Dentro del hipotálamo, uno de los sistemas más estudiados es el sistema oxitocinérgico, específicamente en neuronas productoras de oxitocina y células gliales dentro del núcleo supraóptico, y la porción magnocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo (Theodosis, Piet et al. 2004). En forma general la activación de este sistema induce una retracción de los procesos astrocíticos que se encuentran entre los somas de las neuronas magnocelulares y las dendritas del núcleo supraóptico. Esta retracción produce un aumento del contacto directo de membranas somáticas y dendríticas, la aparición de “paquetes de dendritas” y la formación de nuevas sinapsis (Theodosis and MacVicar 1996; Hatton 1997). Son varios los estímulos conocidos hasta la fecha que llevan a la activación de este sistema, con los consecuentes cambios conformacionales. Entre ellos se puede mencionar a la deshidratación celular, la baja en la presión sanguínea, eventos relacionados a estadios finales del embarazo, parto, y amamantamiento de los recién nacidos, así como también eventos relacionados a stress como fiebre, dolor o apareo (Hatton 1997), y los esteroides gonadales (Parducz, Hajszan et al. 2006) .

En este contexto los resultados obtenidos a partir de los análisis funcionales tanto para los modelos tumorales como para los animales con artritis reumatoide, concuerdan con un proceso ya descrito, que efectivamente ocurre en el hipotálamo, como es la remodelación de sinapsis. Por otro lado por

PCR en tiempo real, fue validada la sobreexpresión del transcrito codificante para oxitocina, en los animales inyectados con células de carcinoma de pulmón. En función de esto, en este trabajo se presenta por primera vez evidencia que permite hipotetizar que dos enfermedades periféricas como el cáncer y la artritis reumatoide, serían un estímulo inductor de remodelación de sinapsis en el hipotálamo. Es importante destacar que estas vías de señalización surgieron como diferenciales dentro de un grupo de aproximadamente otras 30 vías que están representadas en el microarreglo.

Si bien las conclusiones de los análisis funcionales fueron similares en ambas patologías, no lo fueron las familias de genes a través de los cuales se llegó a estas conclusiones. Genes pertenecientes a las familias de proteínas de TGF-Beta/BMPs, aparecieron como modificadas en las dos enfermedades. Pero genes de las familias de Wnt y hedgehog aparecieron como modificadas en los modelos tumorales, mientras que la familia de las efrinas surgieron en el caso de los animales con artritis reumatoide.

Diferentes estímulos producen diferencias en los cambios observados. Los estímulos débiles agudos (privación de agua por períodos cortos), inducen cambios conformacionales, los cuales difieren con los generados por estímulos mas fuertes y crónicos como por ejemplo, 7-10 días de lactancia. En los estímulos débiles no se observa hipertrofia neuronal, como si ocurre en estímulos mas fuertes (Hatton 1997). Asimismo los cambios morfológicos no son completamente similares en la zona dendrítica comparado con la zona somática del magnocelular hipotálamo-neurohipofisial (Hatton 1997). Por otro lado, recientemente ha sido demostrado como consecuencia del uso de cocaína, la existencia de cambios a nivel transcripcional en varias regiones cerebrales, de las cuales el hipotálamo fue la región donde mayor cantidad de cambios fueron

detectados (Ahmed, Lutjens et al. 2005). Notablemente, el análisis funcional mostró que los genes con sus niveles transcripcionales modificados estaban relacionados con procesos de remodelación de sinapsis. Todos estos datos muestran que bajo la denominación de “remodelación de sinapsis” conviven diferentes tipos de procesos y mecanismos. La activación de uno u otro proceso es dependiente del tipo de estímulo, por ende requiriendo de modificación en los niveles de diferentes grupos de genes, asociados a cada proceso.

Otro de los procesos biológicos que se vieron alterados en los tres modelos tumorales, fue el relacionado con respuesta a enfermedades (*sickness behaviour*). Evidencia sobre la alteración de los niveles transcripcionales de genes relacionados a este proceso fue obtenida tanto por los métodos de análisis de la base de datos de GO, como por la técnica de PCR en tiempo real.

Al integrar toda la información obtenida a partir de los estudios de PCR en tiempo real, se pudo determinar que el sentido de cambio de los niveles tanto de los transcritos para Cox-2 como para Indoleamina-pirrol 2,3 dioxigenasa (INDO) fueron similares en los tres modelos tumorales. Estas modificaciones fueron consistentes con lo esperado para un estado de respuesta a la enfermedad. El aumento en los niveles de Cox-2 en el hipotálamo de los tres modelos tumorales sugiere que la presencia de células tumorales en la periferia estaría induciendo un estado de respuesta a la enfermedad. Desde hace tiempo es sabido el rol crucial de esta enzima como mediadora de este proceso aumentando sus niveles transcripcionales como consecuencia de la inyección periférica de LPS (Cao, Matsumura et al. 1997; Parsadaniantz, Lebeau et al. 2000). En cuanto a la enzima INDO, la baja en los niveles del transcripto que la codifica, sugiere una mayor disponibilidad del triptofano para producir



serotonina, un neurotransmisor relacionado con la caquexia asociada al cáncer (Konsman, Parnet et al. 2002; Laviano, Russo et al. 2002).

El resto de los transcriptos no mostró coincidencias en el sentido de cambio entre los tres modelos tumorales, o bien, no pudo ser detectado en alguno de ellos. A pesar de esto, algunos de los cambios detectados siguieron siendo consistentes con la inducción de un estado de respuesta a la enfermedad. Resultó muy interesante encontrar niveles disminuidos del transcripto para AVP en el hipotálamo de los modelos de cáncer de mama y colon, dado la conocida función AVP como atenuador de los efectos inductores del estado de respuesta a la enfermedad por parte de IL-1. Asimismo, las modificaciones en los niveles de los transcriptos para NPY y Mc4r podrían también estar relacionadas a cambios en los comportamientos alimenticios y respuesta al estrés, como ocurre en estadios avanzados del cáncer (Heilig and Thorsell 2002). Por lo tanto todos estos resultados sugirieron que un tumor en la periferia podría estar induciendo en los animales de los tres modelos experimentales un estado de respuesta a la enfermedad. A pesar de todos estos resultados, los ensayos comportamentales llevados a cabo, no mostraron indicios de que en los animales portadores de tumor estuviese teniendo lugar algún proceso relacionado con respuesta a la enfermedad. En línea con estos resultados no se detectó diferencias en los pesos de los animales portadores de tumor, comparados con los animales control (datos no mostrados)

Si bien las características del estado de respuesta a la enfermedad en animales tienen mucho en común con los síntomas observados en pacientes con cáncer, es importante tener en cuenta que estos síntomas son observados en estadios avanzados de la enfermedad, y no en estadios tempranos en los que se encuentran los animales que forman parte de nuestro estudio. A su vez resulta

también importante contemplar que los síntomas del estado de respuesta a la enfermedad observados en pacientes con cáncer, son inducidos en parte por los tratamientos a los cuales éstos son sometidos (Cleeland, Bennett et al. 2003).

Preguntas abiertas:

Posibles vías de detección:

Una de las preguntas mas interesantes que surgen de este trabajo es cual es la vía por la cuál la información de la presencia de células tumorales llega al cerebro. En este trabajo no se exploró cuales podrían las formas por las cuales esto podría ocurrir. Pero existe una gran cantidad de información relacionada a la comunicación entre la periferia y el sistema nervioso central que permite especular sobre los posibles mecanismos de detección. Específicamente, el sistema inmune podría jugar un rol clave en la detección temprana de un tumor por parte del cerebro.

Como fue desarrollado en la INTRODUCCION por un lado la génesis y el desarrollo tumoral están altamente relacionados con el sistema inmune. Por otro lado, hoy en día esta claro la existencia de la comunicación entre el sistema inmune, el sistema endócrino y el sistema nervioso. Por lo tanto podemos especular con tres posibles vías por las cuales tendría lugar la llegada de la información de la presencia de células tumorales en la periferia al cerebro. Una vía humoral, con transmisión lenta de la información (Mravec, Gidron et al. 2006), una vía nerviosa, con transmisión rápida (Ek, Kurosawa et al. 1998; Gidron, Perry et al. 2005) o ambas simultáneamente.

De la vía humoral podrían participar ya sea factores solubles liberados por las células tumorales, citoquinas, o algún factor liberado por el entorno tumoral durante el crecimiento del tumor. En cualquiera de los casos, los

factores deberían ingresar al cerebro, o activar desde el exterior alguna vía de señalización. Específicamente en el caso de las citoquinas, podrían cumplir con ambos requisitos. Estas podrían ingresar al cerebro ya sea atravesando la barrera hematoencefálica en forma directa, o mediante transporte activo (Elmqvist, Scammell et al. 1997). Otra posibilidad de ingreso sería a nivel de los órganos circumventriculares (Buller 2001). Por otro lado podrían activar las células endoteliales cerebrales, las cuales a su vez inducirían la activación de la microglia.

La vía nerviosa podría ser mediada principalmente por el nervio vago. Desde hace una década se conoce el rol de este nervio en la conversión de información desde el sistema inmune hacia el sistema nervioso central (Ek, Kurosawa et al. 1998) y recientemente fue propuesto como mediador del llamado reflejo inflamatorio (Tracey 2002). Las vías aferentes del nervio vago traen información desde el torax y el abdomen hacia el núcleo del tracto solitario en el tallo cerebral. En una situación de inflamación en la periferia, la interleuquina-1 (IL-1) periférica es capaz de unirse a receptores en los paraganglios del nervio vago. Esta información es luego transmitida al núcleo del tracto solitario, lo que resulta en la activación del eje H-P-A (Xu, Day et al. 1999)

Si bien es altamente probable que ambas vías funcionen simultáneamente, los resultados obtenidos con respecto a los cambios de los perfiles de expresión en el tiempo permiten especular con la posibilidad que diferentes tipos tumorales sean detectados primordialmente por una vía o por otra. En el caso de los modelos de cáncer de pulmón y mama, la vía de detección podría ser principalmente nerviosa, dado que la rapidez con que ocurren los cambios en el transcriptoma. En el caso del modelo de cáncer de colon, podría

estar ocurriendo lo opuesto. Dado que en este modelo la mayoría de los cambios ocurren a las 192 horas post inyección, podría suponerse que la detección se de fundamentalmente por una vía humoral.

Factores propios de cada tipo de célula tumoral deberían estar involucrados en la detección de las células tumorales. Dado el conocimiento existente sobre la comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso central, hasta el momento se ha centrado la atención en el sistema inmune como principal responsable de la detección de las células tumorales. En este trabajo se demostró la existencia de firmas moleculares capaces de discriminar entre los tres tipos de tumores y la artritis reumatoide. En función de esto es posible especular con que en el proceso de detección de tumores deberían estar involucrados además de factores liberados por células del sistema inmune, los cuales también deberían estar involucrados en la detección de la artritis reumatoide, factores propios de las células tumorales. Estos, al llegar al cerebro, podrían ser los responsables de la especificidad de la detección, tanto entre los distintos tipos de tumores, como entre estos y la artritis reumatoide.

Otro interrogante que surge de este trabajo es si los genes diferenciales son solo indicadores de la presencia de una enfermedad en la periferia, o también cumplen algún rol en el desarrollo de patologías como el cáncer y la artritis reumatoide. Este interrogante quizá pueda ser respondido cuando sea posible modular farmacológicamente la expresión de los genes en cuestión.

#### Conclusión final:

Los resultados de esta tesis muestran la capacidad del sistema nervioso central de detectar en forma específica el desarrollo de dos enfermedades periféricas como el cáncer y la artritis reumatoide a través de un patrón de

actividad transcripcional específico. El sistema nervioso central debería empezar a ser considerado como una posible fuente de información indicadora del desarrollo de patologías en el organismo. En función de esto resultaría de suma importancia poder llevar a cabo estudios tendientes a identificar cambios tanto en niveles de transcritos como de proteínas, en la periferia, dependientes de estos cambios en el sistema nervioso central.

## **Bibliografía**

- Ader, R. and N. Cohen (1975). "Behaviorally conditioned immunosuppression." *Psychosom Med* 37(4): 333-40.
- Ader, R., N. Cohen, et al. (1995). "Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system." *Lancet* 345(8942): 99-103.
- Adris, S., E. Chuluyan, et al. (2000). "Mice vaccination with interleukin 12-transduced colon cancer cells potentiates rejection of syngeneic non-organ-related tumor cells." *Cancer Res* 60(23): 6696-703.
- Adris, S., S. Klein, et al. (1999). "IL-10 expression by CT26 colon carcinoma cells inhibits their malignant phenotype and induces a T cell-mediated tumor rejection in the context of a systemic Th2 response." *Gene Ther* 6(10): 1705-12.
- Ahmed, S. H., R. Lutchens, et al. (2005). "Gene expression evidence for remodeling of lateral hypothalamic circuitry in cocaine addiction." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(32): 11533-8.
- Alaniz, R. C., S. A. Thomas, et al. (1999). "Dopamine beta-hydroxylase deficiency impairs cellular immunity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5): 2274-8.
- Alizadeh, A. A., M. B. Eisen, et al. (2000). "Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling." *Nature* 403(6769): 503-11.
- Alvarez, M. J., G. J. Vila-Ortiz, et al. (2007). "Model based analysis of real-time PCR data from DNA binding dye protocols." *BMC Bioinformatics* 8(1): 85.
- Arlotta, P., B. J. Molyneaux, et al. (2005). "Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo." *Neuron* 45(2): 207-21.
- Ashburner, M., C. A. Ball, et al. (2000). "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium." *Nature Genetics* 25(1): 25-9.
- Banks, W. A. and A. J. Kastin (1991). "Blood to brain transport of interleukin links the immune and central nervous systems." *Life Sci* 48(25): PL117-21.
- Basu, S., P. S. Dasgupta, et al. (1995). "Enhanced tumor growth in brain dopamine-depleted mice following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment." *J Neuroimmunol* 60(1-2): 1-8.
- Benjamini, Y., D. Drai, et al. (2001). "Controlling the false discovery rate in behavior genetics research." *Behavioural brain research* 125(1-2): 279-84.
- Berkenbosch, F., J. van Oers, et al. (1987). "Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1." *Science* 238(4826): 524-6.
- Bernards, R., P. I. Schrier, et al. (1983). "Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity." *Nature* 305(5937): 776-9.
- Bernik, T. R., S. G. Friedman, et al. (2002). "Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway." *J Exp Med* 195(6): 781-8.
- Besedovsky, H., A. del Rey, et al. (1989). "Host endocrine responses during tumor growth." *Progress in clinical and biological research* 288: 203-13.
- Besedovsky, H., A. del Rey, et al. (1983). "The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons." *Science* 221(4610): 564-6.
- Besedovsky, H., A. del Rey, et al. (1986). "Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones." *Science* 233(4764): 652-4.
- Besedovsky, H. and E. Sorkin (1977). "Network of immune-neuroendocrine interactions." *Clin Exp Immunol* 27(1): 1-12.
- Besedovsky, H., E. Sorkin, et al. (1977). "Hypothalamic changes during the immune response." *Eur J Immunol* 7(5): 323-5.
- Besedovsky, H., E. Sorkin, et al. (1975). "Changes in blood hormone levels during the immune response." *Proc Soc Exp Biol Med* 150(2): 466-70.
- Besedovsky, H. O. and A. del Rey (1996). "Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses." *Endocrine reviews* 17(1): 64-102.

- Besedovsky, H. O., A. del Rey, et al. (1981). "Lymphokine-containing supernatants from con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels." *J Immunol* 126(1): 385-7.
- Besedovsky, H. O., A. del Rey, et al. (1979). "Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system." *Cell Immunol* 48(2): 346-55.
- Besedovsky, H. O., A. Del Rey, et al. (1985). "Lymphoid cells produce an immunoregulatory glucocorticoid increasing factor (GIF) acting through the pituitary gland." *Clin Exp Immunol* 59(3): 622-8.
- Besedovsky, H. O. and A. D. Rey (2007). "Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view." *Brain Behav Immun* 21(1): 34-44.
- Blaha, V., Z. J. Yang, et al. (1998). "Ventromedial nucleus of hypothalamus is related to the development of cancer-induced anorexia: in vivo microdialysis study." *Acta Medica (Hradec Kralove)* 41(1): 3-11.
- Blalock, J. E. (1984). "The immune system as a sensory organ." *J Immunol* 132(3): 1067-70.
- Blalock, J. E. (2005). "The immune system as the sixth sense." *Journal of Internal Medicine* 257(2): 126-38.
- Boesch, S. M., E. Donnemiller, et al. (2004). "Abnormalities of dopaminergic neurotransmission in SCA2: a combined 123I-betaCIT and 123I-IBZM SPECT study." *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 19(11): 1320-5.
- Borovikova, L. V., S. Ivanova, et al. (2000). "Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin." *Nature* 405(6785): 458-62.
- Buller, K. M. (2001). "Role of circumventricular organs in pro-inflammatory cytokine-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28(7): 581-9.
- Cao, C., K. Matsumura, et al. (1997). "Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain." *Am J Physiol* 272(6 Pt 2): R1712-25.
- Capuron, L., A. Ravaut, et al. (2002). "Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy." *Mol Psychiatry* 7(5): 468-73.
- Carro, E., J. L. Trejo, et al. (2003). "Brain repair and neuroprotection by serum insulin-like growth factor I." *Mol Neurobiol* 27(2): 153-62.
- Chance, W. T., A. Balasubramaniam, et al. (1995). "Neuropeptide Y and the development of cancer anorexia." *Ann Surg* 221(5): 579-87; discussion 587-9.
- Chance, W. T., S. Sheriff, et al. (1998). "Reciprocal changes in hypothalamic receptor binding and circulating leptin in anorectic tumor-bearing rats." *Brain Res* 803(1-2): 27-33.
- Charron, F. and M. Tessier-Lavigne (2005). "Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance." *Development* 132(10): 2251-62.
- Chaudhari, N. and W. E. Hahn (1983). "Genetic expression in the developing brain." *Science* 220(4600): 924-8.
- Chuluyan, H. E., R. M. Wolcott, et al. (2000). "Catecholamine, indoleamine and corticosteroid responses in mice bearing tumors." *Neuroimmunomodulation* 8(3): 107-13.
- Cirelli, C., C. M. Gutierrez, et al. (2004). "Extensive and divergent effects of sleep and wakefulness on brain gene expression." *Neuron* 41(1): 35-43.



- Cleeland, C. S., G. J. Bennett, et al. (2003). "Are the symptoms of cancer and cancer treatment due to a shared biologic mechanism? A cytokine-immunologic model of cancer symptoms." *Cancer* 97(11): 2919-25.
- Coppola, G. and D. H. Geschwind (2006). "Microarrays and the microscope: balancing throughput with resolution." *J Physiol* 575(Pt 2): 353-9.
- Crowner, D., M. Le Gall, et al. (2003). "Notch steers *Drosophila* ISNb motor axons by regulating the Abl signaling pathway." *Current Biology* 13(11): 967-72.
- Dantzer, R. (2004). "Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity." *Eur J Pharmacol* 500(1-3): 399-411.
- Dantzer, R., R. M. Bluthé, et al. (1991). "Androgen-dependent vasopressinergic neurotransmission attenuates interleukin-1-induced sickness behavior." *Brain Res* 557(1-2): 115-20.
- Dantzer, R., G. Gheusi, et al. (1999). "Central administration of insulin-like growth factor-1 inhibits lipopolysaccharide-induced sickness behavior in mice." *Neuroreport* 10(2): 289-92.
- Dantzer, R. and K. W. Kelley (1989). "Stress and immunity: an integrated view of relationships between the brain and the immune system." *Life Sci* 44(26): 1995-2008.
- Daruna, J. (2004). *Introduction to psychoneuroimmunology*, Elsevier.
- de Wit, J. and J. Verhaagen (2003). "Role of semaphorins in the adult nervous system." *Progress in neurobiology*. 71(2-3): 249-67.
- Dighe, A. S., E. Richards, et al. (1994). "Enhanced *in vivo* growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors." *Immunity* 1(6): 447-56.
- Dougherty, J. D. and D. H. Geschwind (2005). "Progress in realizing the promise of microarrays in systems neurobiology." *Neuron* 45(2): 183-5.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, et al. (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nature Immunology* 3(11): 991-8.
- Dunnick, J., P. Blackshear, et al. (2006). "Critical pathways in heart function: bis(2-chloroethoxy)methane-induced heart gene transcript change in F344 rats." *Toxicol Pathol* 34(4): 348-56.
- Ek, M., M. Kurosawa, et al. (1998). "Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins." *J Neurosci* 18(22): 9471-9.
- Elenkov, I. J., R. L. Wilder, et al. (2000). "The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system." *Pharmacol Rev* 52(4): 595-638.
- Elmqvist, J. K., T. E. Scammell, et al. (1997). "Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response." *Trends Neurosci* 20(12): 565-70.
- Flanagan, J. G. and P. Vanderhaeghen (1998). "The ephrins and Eph receptors in neural development." *Annu Rev Neurosci* 21: 309-45.
- Fukuoka, H., M. Kawatani, et al. (1994). "Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of interleukin-1 beta in the rat." *Brain Res* 657(1-2): 133-40.
- Fulton, S., P. Pissios, et al. (2006). "Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway." *Neuron* 51(6): 811-22.
- Furley, A. J., S. B. Morton, et al. (1990). "The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity." *Cell* 61(1): 157-70.

- Geschwind, D. H. (2000). "Mice, microarrays, and the genetic diversity of the brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20): 10676-8.
- Gidron, Y., H. Perry, et al. (2005). "Does the vagus nerve inform the brain about preclinical tumours and modulate them?" *The lancet oncology* 6(4): 245-8.
- Golub, T. R., D. K. Slonim, et al. (1999). "Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring." *Science* 286(5439): 531-7.
- Gould, D. J., C. Bright, et al. (2004). "Inhibition of established collagen-induced arthritis with a tumour necrosis factor-alpha inhibitor expressed from a self-contained doxycycline regulated plasmid." *Arthritis Res Ther* 6(2): R103-13.
- Grill, H. J. and J. M. Kaplan (2002). "The neuroanatomical axis for control of energy balance." *Front Neuroendocrinol* 23(1): 2-40.
- Guenther, K., R. M. Deacon, et al. (2001). "Early behavioural changes in scrapie-affected mice and the influence of dapsone." *The European journal of neuroscience* 14(2): 401-9.
- Hadden, J. W., E. M. Hadden, et al. (1970). "Lymphocyte blast transformation. I. Demonstration of adrenergic receptors in human peripheral lymphocytes." *Cell Immunol* 1(6): 583-95.
- Hakansson, M. L., H. Brown, et al. (1998). "Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus." *J Neurosci* 18(1): 559-72.
- Harada, M., G. Matsuzaki, et al. (1994). "Generation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by combined treatment with inactivated tumor cells and recombinant interleukin-2." *Cancer Immunol Immunother* 38(5): 332-8.
- Hart, B. L. (1988). "Biological basis of the behavior of sick animals." *Neurosci Biobehav Rev* 12(2): 123-37.
- Hartigan, J. A. (1975). *Clustering Algorithms*. New York, John Wiley & Sons Inc.
- Hatton, G. I. (1997). "Function-related plasticity in hypothalamus." *Annu Rev Neurosci* 20: 375-97.
- Heilig, M. and A. Thorsell (2002). "Brain neuropeptide Y (NPY) in stress and alcohol dependence." *Reviews in the neurosciences* 13(1): 85-94.
- Holmes, T. H. and R. H. Rahe (1967). "The Social Readjustment Rating Scale." *J Psychosom Res* 11(2): 213-8.
- Holsboer, F., G. K. Stalla, et al. (1988). "Acute adrenocortical stimulation by recombinant gamma interferon in human controls." *Life Sci* 42(1): 1-5.
- Hommel, J. D., R. Trinko, et al. (2006). "Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding." *Neuron* 51(6): 801-10.
- Hopkins, S. J. and N. J. Rothwell (1995). "Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition." *Trends Neurosci* 18(2): 83-8.
- Johnson, D. R., J. C. O'Connor, et al. (2005). "Inhibition of vagally mediated immune-to-brain signaling by vanadyl sulfate speeds recovery from sickness." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(42): 15184-9.
- Katafuchi, T., T. Hori, et al. (1991). "Central administration of interferon-alpha enhances rat sympathetic nerve activity to the spleen." *Neurosci Lett* 125(1): 37-40.
- Khong, H. T. and N. P. Restifo (2002). "Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes." *Nature Immunology* 3(11): 999-1005.

- Kohm, A. P. and V. M. Sanders (1999). "Suppression of antigen-specific Th2 cell-dependent IgM and IgG1 production following norepinephrine depletion in vivo." *J Immunol* 162(9): 5299-308.
- Kohm, A. P. and V. M. Sanders (2001). "Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo." *Pharmacol Rev* 53(4): 487-525.
- Konsman, J. P., P. Parnet, et al. (2002). "Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications." *Trends in neurosciences* 25(3): 154-9.
- Krause, R., J. H. James, et al. (1979). "Brain tryptophan and the neoplastic anorexia-cachexia syndrome." *Cancer* 44(3): 1003-8.
- Kruszewska, B., S. Y. Felten, et al. (1995). "Alterations in cytokine and antibody production following chemical sympathectomy in two strains of mice." *J Immunol* 155(10): 4613-20.
- Lang, K., T. L. Drell, et al. (2003). "Neurotransmitters regulate the migration and cytotoxicity in natural killer cells." *Immunol Lett* 90(2-3): 165-72.
- Laviano, A., M. M. Meguid, et al. (1996). "Cracking the riddle of cancer anorexia." *Nutrition* 12(10): 706-10.
- Laviano, A., M. Russo, et al. (2002). "Neurochemical mechanisms for cancer anorexia." *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 18(1): 100-5.
- Lavielle, S., J. P. Tassin, et al. (1979). "Blockade by benzodiazepines of the selective high increase in dopamine turnover induced by stress in mesocortical dopaminergic neurons of the rat." *Brain Res* 168(3): 585-94.
- Ledda, M. F., S. Adris, et al. (1996). "Tumor cells engineered to express interleukin-6 exhibit a reduced tumorigenicity depending on the tumor cell model." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 42(5): 769-78.
- Leibowitz, S. F., G. F. Weiss, et al. (1990). "Medial hypothalamic nuclei mediate serotonin's inhibitory effect on feeding behavior." *Pharmacol Biochem Behav* 37(4): 735-42.
- Maes, M. (1999). "Major depression and activation of the inflammatory response system." *Adv Exp Med Biol* 461: 25-46.
- Maestroni, G. J. and P. Mazzola (2003). "Langerhans cells beta 2-adrenoceptors: role in migration, cytokine production, Th priming and contact hypersensitivity." *J Neuroimmunol* 144(1-2): 91-9.
- Mailloux, R. J., R. Singh, et al. (2006). "In-gel activity staining of oxidized nicotinamide adenine dinucleotide kinase by blue native polyacrylamide gel electrophoresis." *Anal Biochem* 359(2): 210-5.
- Mantovani, G., A. Maccio, et al. (2000). "Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in patients with advanced-stage cancer at different sites." *J Mol Med* 78(10): 554-61.
- Meguid, M. M., T. Sato, et al. (2000). "An analysis of temporal changes in meal number and meal size at onset of anorexia in male tumor-bearing rats." *Nutrition* 16(4): 305-6.
- Mirnic, K. and J. Pevsner (2004). "Progress in the use of microarray technology to study the neurobiology of disease." *Nat Neurosci* 7(5): 434-9.
- Morton, G. J., D. E. Cummings, et al. (2006). "Central nervous system control of food intake and body weight." *Nature* 443(7109): 289-95.
- Mravec, B., Y. Gidron, et al. (2006). "Neural-endocrine-immune complex in the central modulation of tumorigenesis: facts, assumptions, and hypotheses." *J Neuroimmunol* 180(1-2): 104-16.

- Nabbe, K. C., A. B. Blom, et al. (2003). "Coordinate expression of activating Fc gamma receptors I and III and inhibiting Fc gamma receptor type II in the determination of joint inflammation and cartilage destruction during immune complex-mediated arthritis." *Arthritis Rheum* 48(1): 255-65.
- Naitoh, Y., J. Fukata, et al. (1988). "Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats." *Biochem Biophys Res Commun* 155(3): 1459-63.
- Nevins, J. R. and A. Potti (2007). "Mining gene expression profiles: expression signatures as cancer phenotypes." *Nat Rev Genet* 8(8): 601-9.
- Normann, S., H. Besedovsky, et al. (1988). "Interactions between endogenous glucocorticoids and inflammatory responses in normal and tumor-bearing mice: role of T cells." *J Leukoc Biol* 44(6): 551-8.
- Okazaki, N., J. Yan, et al. (2000). "Interaction of the Unc-51-like kinase and microtubule-associated protein light chain 3 related proteins in the brain: possible role of vesicular transport in axonal elongation." *Brain research. Molecular brain research* 85(1-2): 1-12.
- Parducz, A., T. Hajszan, et al. (2006). "Synaptic remodeling induced by gonadal hormones: neuronal plasticity as a mediator of neuroendocrine and behavioral responses to steroids." *Neuroscience* 138(3): 977-85.
- Parsadaniantz, S. M., A. Lebeau, et al. (2000). "Effects of the inhibition of cyclooxygenase 1 or 2 or 5-lipoxygenase on the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis induced by interleukin-1beta in the male Rat." *J Neuroendocrinol* 12(8): 766-73.
- Pavlidis, P. (2003). "Using ANOVA for gene selection from microarray studies of the nervous system." *Methods* 31(4): 282-9.
- Pavlidis, P. and W. S. Noble (2001). "Analysis of strain and regional variation in gene expression in mouse brain." *Genome Biology* 2(10): 42.
- Petit-Demouliere, B., F. Chenu, et al. (2005). "Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity." *Psychopharmacology (Berl)* 177(3): 245-55.
- Pitossi, F., A. del Rey, et al. (1997). "Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice." *Journal of neuroscience research* 48(4): 287-98.
- Plata-Salaman, C. R. (1996). "Anorexia during acute and chronic disease." *Nutrition* 12(2): 69-78.
- Plata-Salaman, C. R. (1997). "Anorexia during acute and chronic disease: relevance of neurotransmitter-peptide-cytokine interactions." *Nutrition* 13(2): 159-60.
- Plata-Salaman, C. R. (2000). "Central nervous system mechanisms contributing to the cachexia-anorexia syndrome." *Nutrition* 16(10): 1009-12.
- Plata-Salaman, C. R., Y. Oomura, et al. (1988). "Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta: suppression of food intake by direct action in the central nervous system." *Brain Res* 448(1): 106-14.
- Ramamurthy, S., F. Mir, et al. (2006). "Characterization of thromboxane A2 receptor signaling in developing rat oligodendrocytes: nuclear receptor localization and stimulation of myelin basic protein expression." *J Neurosci Res* 84(7): 1402-14.
- Rasmussen, A. F., Jr., J. T. Marsh, et al. (1957). "Increased susceptibility to herpes simplex in mice subjected to avoidance-learning stress or restraint." *Proc Soc Exp Biol Med* 96(1): 183-9.
- Razavi, R., Y. Chan, et al. (2006). "TRPV1+ sensory neurons control beta cell stress and islet inflammation in autoimmune diabetes." *Cell* 127(6): 1123-35.

- Rossi Fanelli, F., C. Cangiano, et al. (1986). "Plasma tryptophan and anorexia in human cancer." *Eur J Cancer Clin Oncol* 22(1): 89-95.
- Rothwell, N. J. and S. J. Hopkins (1995). "Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action." *Trends Neurosci* 18(3): 130-6.
- Sandberg, R., R. Yasuda, et al. (2000). "Regional and strain-specific gene expression mapping in the adult mouse brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20): 11038-43.
- Sanders, V. M., D. J. Kasprovicz, et al. (2003). "Adaptive immunity in mice lacking the beta(2)-adrenergic receptor." *Brain Behav Immun* 17(1): 55-67.
- Saper, C. B. and C. D. Breder (1994). "The neurologic basis of fever." *N Engl J Med* 330(26): 1880-6.
- Sawatari, A. and E. M. Callaway (2000). "Diversity and cell type specificity of local excitatory connections to neurons in layer 3B of monkey primary visual cortex." *Neuron* 25(2): 459-71.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, et al. (2000). "Central nervous system control of food intake." *Nature* 404(6778): 661-71.
- Shankaran, V., H. Ikeda, et al. (2001). "IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." *Nature* 410(6832): 1107-11.
- Sharp, B. M., S. G. Matta, et al. (1989). "Tumor necrosis factor-alpha is a potent ACTH secretagogue: comparison to interleukin-1 beta." *Endocrinology* 124(6): 3131-3.
- Simons, J. P., A. M. Schols, et al. (1997). "Plasma concentration of total leptin and human lung-cancer-associated cachexia." *Clin Sci (Lond)* 93(3): 273-7.
- Smyth, G. K. and T. Speed (2003). "Normalization of cDNA microarray data." *Methods* 31(4): 265-73.
- Steinman, L. (2004). "Elaborate interactions between the immune and nervous systems." *Nature immunology* 5(6): 575-81.
- Sternberg, E. M. (2006). "Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens." *Nat Rev Immunol* 6(4): 318-28.
- Stoler, D. L., N. Chen, et al. (1999). "The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26): 15121-6.
- Straub, R. H., M. Mayer, et al. (2000). "Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes." *J Leukoc Biol* 67(4): 553-8.
- Street, S. E., E. Cretney, et al. (2001). "Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis." *Blood* 97(1): 192-7.
- Subramanian, A., P. Tamayo, et al. (2005). "Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*
- Szelenyi, J. (2001). "Cytokines and the central nervous system." *Brain Res Bull* 54(4): 329-38.
- Szentivanyi, A. and G. Filipp (1958). "Anaphylaxis and the nervous system. II." *Ann Allergy* 16(2): 143-51.
- Szentivanyi, A. and J. Szekely (1958). "Anaphylaxis and the nervous system. IV." *Ann Allergy* 16(4): 389-92.
- Theodosius, D. T. and B. MacVicar (1996). "Neurone-glia interactions in the hypothalamus and pituitary." *Trends Neurosci* 19(8): 363-7.
- Theodosius, D. T., R. Piet, et al. (2004). "Neuronal, glial and synaptic remodeling in the adult hypothalamus: functional consequences and role of cell surface and

- extracellular matrix adhesion molecules." *Neurochemistry international* 45(4): 491-501.
- ThyagaRajan, S., S. Y. Felten, et al. (1998). "Antitumor effect of L-deprenyl in rats with carcinogen-induced mammary tumors." *Cancer Lett* 123(2): 177-83.
- Thyagarajan, S., K. S. Madden, et al. (1999). "Inhibition of tumor growth by L-deprenyl involves neural-immune interactions in rats with spontaneously developing mammary tumors." *Anticancer Res* 19(6B): 5023-8.
- ThyagaRajan, S. and S. K. Quadri (1999). "L-deprenyl inhibits tumor growth, reduces serum prolactin, and suppresses brain monoamine metabolism in rats with carcinogen-induced mammary tumors." *Endocrine* 10(3): 225-32.
- ThyagaRajan, S. and S. K. Quadri (1999). "L-Deprenyl stimulates the release of catecholamines in the rat medial basal hypothalamus in vivo." *Neurosci Lett* 270(2): 79-82.
- Tracey, K. J. (2002). "The inflammatory reflex." *Nature* 420(6917): 853-9.
- Tracey, K. J. (2007). "Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway." *J Clin Invest* 117(2): 289-96.
- Tran, P. H., D. A. Peiffer, et al. (2002). "Microarray optimizations: increasing spot accuracy and automated identification of true microarray signals." *Nucleic Acids Research* 30(12): e54.
- Turnbull, A. V. and C. L. Rivier (1999). "Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action." *Physiological reviews* 79(1): 1-71.
- Van Dam, A. M., M. Brouns, et al. (1993). "Immunocytochemical detection of prostaglandin E2 in microvasculature and in neurons of rat brain after administration of bacterial endotoxin." *Brain Res* 613(2): 331-6.
- van den Broek, M. E., D. Kagi, et al. (1996). "Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice." *J Exp Med* 184(5): 1781-90.
- van den Broek, M. F., D. Kagi, et al. (1995). "Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo." *Eur J Immunol* 25(12): 3514-6.
- van der Poll, T., J. Jansen, et al. (1994). "Noradrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin 6 production in human whole blood." *Infect Immun* 62(5): 2046-50.
- Varma, M., G. F. Torelli, et al. (1999). "Potential strategies for ameliorating early cancer anorexia." *J Surg Res* 81(1): 69-76.
- Wan, W., L. Wetmore, et al. (1994). "Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced c-fos expression in the rat brain." *Brain Res Bull* 34(1): 7-14.
- Wang, H., M. Yu, et al. (2003). "Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation." *Nature* 421(6921): 384-8.
- Wullner, U., M. Reimold, et al. (2005). "Dopamine transporter positron emission tomography in spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, and 6." *Archives of neurology* 62(8): 1280-5.
- Wurmbach, E., T. Yuen, et al. (2003). "Focused microarray analysis." *Methods* 31(4): 306-16.
- Xu, Y., T. A. Day, et al. (1999). "The central amygdala modulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to systemic interleukin-1beta administration." *Neuroscience* 94(1): 175-83.
- Yang, Z. J., V. Blaha, et al. (1999). "Interleukin-1alpha injection into ventromedial hypothalamic nucleus of normal rats depresses food intake and increases release of dopamine and serotonin." *Pharmacol Biochem Behav* 62(1): 61-5.

Zorrilla, E. P., L. Luborsky, et al. (2001). "The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review." *Brain Behav Immun* 15(3): 199-226.