



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**LABORATORIO DE PROTEÓMICA  
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS**

**CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN PROTEICA DEL TEJIDO CEREBRAL  
DURANTE EL DESARROLLO TUMORAL DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

RÍOS DE ANDA M. E. MITZY

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. SERGIO MANUEL ENCARNACIÓN GUEVARA**

**CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS – UNAM**

**ASESOR**

**BIÓL. ALBERTO CHECA ROJAS**

**CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS – UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:**

**DR. JULIO MORÁN ANDRADE**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR – UNAM**

**DRA. MARÍA MAGDALENA GIORDANO NOYOLA**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA - UNAM**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# ÍNDICE

<b>1. ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>2. RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>3.1 Cáncer</b> .....	<b>4</b>
3.1.1. Estadísticas del cáncer.....	5
3.1.2. Cáncer Cérvico Uterino.....	5
3.1.2.1. Etiología del Cáncer Cérvico Uterino.....	6
3.1.2.1.1. Virus del Papiloma Humano.....	6
3.1.3. Microambiente Tumoral.....	6
3.1.4. Interacción Tumores – órganos lejanos.....	7
3.1.4.1. Alteraciones sistémicas resultado de la presencia de tumores.....	8
<b>3.2 Cáncer y Sistema Nervioso: Antecedentes</b> .....	<b>11</b>
3.2.1. Efectos del cáncer en el Sistema Nervioso.....	12
3.2.1.1. Psico-Oncología.....	12
3.2.1.2. Caquexia.....	12
3.2.1.3. Degeneraciones paraneoplásicas neurológicas.....	13
3.2.1.4. Complicaciones cerebrovasculares.....	14
3.2.1.5. Infecciones.....	15
3.2.1.6. Mielopatías.....	15
3.2.2. Sistema nervioso y su participación en el cáncer.....	15
3.2.2.1. Estrés.....	16
3.2.2.1.1. Distrés y cáncer.....	16
3.2.2.1.2. Eustrés y cáncer.....	18
3.2.2.2. Invasión perineural.....	19
3.2.3. Análisis proteómico cerebral en presencia de un tumor de cáncer cérvico.....	20
<b>3.3 Proteómica – Cáncer y cerebro</b> .....	<b>21</b>
<b>3.4 Modelos para el estudio del CaCu</b> .....	<b>22</b>
3.4.1. Líneas celulares.....	22
3.4.2. Ratón atímico nu/nu.....	22
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>23</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	<b>23</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>23</b>
<b>7. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>23</b>
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
8.1 Cultivo celular.....	24
8.2 Generación Tumores (RPMI).....	24
8.3 Generación Tumores (PBS).....	24
8.4 Extracción de proteína.....	25
8.5 Electroforesis de doble dimensión.....	25
8.6 Comparación de geles.....	25
8.7 Análisis Estadístico – Geles 2D.....	25
8.7 Identificación y análisis de proteínas por espectrometría de masas.....	26
8.8 Western Blot.....	26
8.9 Análisis estadístico WB.....	26
<b>9. RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
<b>9.1 Análisis de Cerebros Grupo 1 – RPMI</b> .....	<b>27</b>
9.1.1 Generación de tumores de SiHa y colecta de cerebros.....	27
9.1.2 Análisis comparativos de los geles 2D de los cerebros de ratones con tumores de SiHa.....	27
9.1.3 Análisis comparativo de la expresión de la tubulina $\beta$ III en cerebros de ratones con tumores de SiHa y otras líneas celulares inyectadas con RPMI*.....	28
<b>9.2 Análisis de Cerebros Grupo 2 – PBS</b> .....	<b>30</b>
9.2.1 Generación de tumores de SiHa y colecta de cerebros.....	30
9.2.2 Análisis de la Expresión de la Tubulina $\beta$ III.....	31
9.2.3 Análisis de la expresión proteica diferencial del tejido cerebral durante el desarrollo de tumores de SiHa.....	32
9.2.3.1 Identificación de las IE diferencialmente expresadas mediante espectrometría de masas.....	32
9.2.3.2 Análisis de enriquecimiento las proteínas sobre-expresadas identificadas.....	33
9.2.4 Análisis de expresión de Complexina 1, Glioxalasa 1 y Proteosoma Subunidad del proteosoma alfa tipo 6.....	33

9.2.4.1	Complexina 1 .....	35
9.2.4.2	Glioxalasa 1 .....	37
9.2.4.3	Subunidad $\alpha$ -6 del proteosoma .....	38
9.2.5	Análisis de CPLX1, GLO1 y PSA6 a tiempos más tempranos del desarrollo de tumores de SiHa (5, 15, 25 días) .....	39
9.2.6	Análisis de CPLX1, GLO1 y PSA6 en cerebros de ratones con tumores con líneas celulares de otros tipos de cáncer: humanos (colon y mama) y de ratón (melanoma) .....	41
<b>10.</b>	<b>ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
<b>10.1</b>	<b>Influencia del medio RPMI* en la expresión de proteínas cerebrales .....</b>	<b>43</b>
<b>10.2</b>	<b>Análisis de proteínas cerebrales sobre expresadas en ratones durante el desarrollo tumoral de SiHa .....</b>	<b>44</b>
10.2.1	Neurodegeneración .....	45
10.2.2	Neuroprotección .....	47
10.2.3	Estrés oxidativo .....	48
10.2.4	Neuroregeneración .....	50
10.2.5	Comunicación Celular – Sinapsis.....	51
10.2.6	Enfermedades neurodegenerativas .....	51
<b>10.3</b>	<b>Dinámica de expresión de GLO1, CPXL1 Y PSA6 en cerebros de ratones durante el desarrollo de tumores de SiHa. ....</b>	<b>55</b>
10.3.1	CPLX1 .....	55
10.3.2	GLO1 .....	56
10.3.3	PSA6 .....	57
<b>10.4</b>	<b>Dinámica de expresión de GLO1, CPXL1 Y PSA6 en cerebros de ratones con tumores de distintas líneas celulares de cáncer .....</b>	<b>58</b>
<b>11.</b>	<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>62</b>
<b>12</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>62</b>
<b>13.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO A – MATERIAL SUPLEMENTARIO – FIGURAS Y TABLAS .....</b>		<b>70</b>
<b>ANEXO B – METODOLOGÍA SUPLEMENTARIA - PROTOCOLOS .....</b>		<b>77</b>
A.	Conteo Celular con Cámara de Neubauer .....	77
B.	Extracción fenólica de proteínas .....	77
C.	Extracción proteica - SDS .....	78
D.	Cuantificación por el método de Bradford ácido .....	79
E.	Protocolo para tratamiento de proteínas .....	80
F.	SDS-PAGE 2D.....	81
G.	Western Blot – Diluciones .....	81

## 1. Abreviaturas

CaCu – Cáncer cérvico uterino  
NIC – Neoplasia intraepitelial cervical  
VPH – Virus del Papiloma Humano  
VIH – Virus de Inmunodeficiencia Humana  
ADN – Ácido desoxirribonucleico  
VEGFR1 – Factor de crecimiento endotelial vascular  
MDSC – Células supresoras de origen mieloide  
SPN – Síndromes paraneoplásicos  
NK – Natural killer  
DSBs – Cortes de doble cadena  
OCDLs – Lesiones de ADN inducidas por oxidación  
ARN – Ácido ribonucleico  
SNC – Sistema Nervioso Central  
SNP – Sistema Nervioso Periférico  
TNF $\alpha$  – Factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
Kv – Canales iónicos de potasio dependientes de voltaje  
DPN – Degeneraciones paraneoplásicas neurológicas  
SPN – Síndromes paraneoplásicos  
SAM – Eje simpático-adrenal-medular  
HPA – Eje hipotalámico-pituitario-adrenal  
ACTH – Hormona adrenocorticotropa  
CRH – Hormona liberadora de corticotropina  
CREB – *cAMP-responsive-element-binding*  
MHC-I – Complejo mayor de histocompatibilidad I  
HSA – Eje hipotalámico-simpáticoneural-adipocito  
WAT – Tejido adiposo blanco  
IPN – Invasión perineural  
LAK – *Lymphokine-activated killer*  
RPMI\* – Medio Advanced RPMI 1640 (Gibco®)  
CRT – Cerebro de ratones con tumores  
CRC – Cerebro de ratones controles  
NFL – Neurofilamento de péptido ligero  
T $\beta$ III – Tubulina  $\beta$ III  
WB – Western blot  
PBS – Amortiguador fosfato salino  
IE – Identidades electroforéticas  
MALDI-TOF – *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*  
ESI - *Electrospray Ionization*  
ESI/QUAD/TOF – *Electrospray Ionization/Quadrupole/Time of Flight*  
TUBB2A – Tubulina beta-2A  
TUBB5 – Tubulina beta-5  
CPLX1 – Complexina 1  
SUMO3 – Modificador pequeño tipo ubiquitina 3  
SUMO1/2 – Modificador pequeño tipo ubiquitina 1/2  
DJ1 – Proteína DJ-1  
PSB4 – Subunidad beta 4 del proteosoma  
RRAS – Proteína relacionada a Ras  
RAB6A – Proteína relacionada a Ras 6a  
APOA1 – Apolipoproteína 1  
PFD3 – Prefoldina 3  
PSA6 – Subunidad alfa 6 del proteosoma  
NCALD – Neurocalcina delta  
ATP5B – ATP sintasa subunidad beta 5, mitocondrial  
LDBH – L-lactato deshidrogenasa cadena B  
TPM1 – Tropomiosina cadena alfa 1  
OMP – Proteína marcadora olfatoria  
PEBP1 – Proteína de unión a fosfatidiletanolamina 1  
CPLX2 – Complexina 2  
PPP2R1A – Subunidad A-alfa reguladora de Serin/Treonin fosfatasa 2A  
TCEAL5 – Proteína similar al factor de elongación transcripcional A 5

MRPL46 – Proteína ribosomal 39S L46  
VILIP1 – Pseudo-vinina  
GLO1 – Glioxalasa 1  
HEBP1 – Proteína de unión a hemo  
HPCAL1 – Pseudo-hipocalcina  
LCR – Líquido cefalorraquídeo  
HCNP – Péptido neuroestimulador del sistema colinérgico del hipocampo  
RE – Retículo endoplásmico  
UPR – Sistema de respuesta a proteínas mal plegadas  
ROS - Especies reactivas de oxígeno  
DDR - Respuestas de daño a ADN  
MG – Metilglioxal  
GX – Glioxal  
AGE – Productos de la glicación avanzada  
AD – Alzheimer  
PD – Parkinson  
Ht – Huntington  
WB-2D – Western Blot de 2 Dimensiones  
MPT – Modificaciones Postraduccionales  
UPS – Sistema ubiquitin-proteosoma

## **2. Resumen**

En el cáncer las interacciones de los tumores con el organismo son de suma importancia, ya que tanto el microambiente, los órganos lejanos y los factores ambientales juegan un papel fundamental en el desarrollo del cáncer. El cerebro es un órgano que interacciona con todo el organismo mandando e interpretando estímulos, por lo que es su papel en el proceso tumorigénico tiene que ser de gran importancia afectando la aparición y la progresión de ciertos tumores. El objetivo de este trabajo fue determinar el patrón de expresión diferencial de las proteínas cerebrales de ratones durante el desarrollo de tumores generados a partir de la inoculación de la línea celular de cáncer cérvico uterino SiHa.

En este estudio, los cerebros de ratones (CRT) presentaron cambios de expresión proteica durante el desarrollo de los tumores distantes de SiHa. Estos cambios se vieron reflejados en la sobre-expresión de 38 proteínas, las cuales mostraron distintas dinámicas de expresión durante los tres tiempos del tumor muestreados (30, 45 y 50 días). Dichas proteínas se asociaron en su mayoría a enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, así como a varios procesos cerebrales, principalmente a aquellos relacionados con enfermedades y alteraciones cerebrales, neurodegeneración, neuroregeneración, protección celular y comunicación celular (sinapsis). La búsqueda bibliográfica de las proteínas identificadas, particularmente de su función y sus variaciones de expresión en el cerebro, permite proponer que durante su desarrollo los tumores generan cambios en el cerebro que activan procesos asociados a daño cerebral y que, al mismo tiempo, el cerebro activa distintos mecanismos de defensa y protección para contrarrestar y reparar estas alteraciones.

### 3. Introducción

#### 3.1. Cáncer

En el cuerpo humano la proliferación celular y el mantenimiento de la homeóstasis son resultado de procesos celulares y químicos altamente regulados y controlados. Dentro de estos procesos se encuentran aquellos que se encargan de mantener constante el número de células, así como de eliminar células con fenotipos anormales. No obstante, cierto tipo de células presentan alteraciones que les permiten evadir dichos mecanismo, por lo que estas células continúan proliferando y adquieren nuevas modificaciones aberrantes, favoreciendo su crecimiento incontrolado formando masas celulares, transformando un tejido normal a uno tumoral, lo que promueve el desarrollo del cáncer [1,2]. El desarrollo de un tejido normal en uno canceroso suele ser un proceso progresivo con múltiples etapas, que incluyen la acumulación de múltiples alteraciones como mutaciones, deleciones, rearrreglos cromosómicos y cambios epigenéticos, que pueden estar influenciados por factores genéticos, químicos y/o ambientales [3,4].

Estudios sobre la biología del cáncer han revelado que éste no sólo implica la formación de tumores constituidos por una masa de células cancerígenas que proliferan sin control e invaden otros tejidos, sino que el cáncer es más bien un conjunto de enfermedades que conllevan a la generación de nuevos tejidos complejos compuestos de distintos tipos celulares interaccionando entre sí. Para que las células cancerosas puedan convertirse en malignas, requieren la adquisición de ciertos rasgos distintivos y complementarios que generan cambios fisiológicos que les confieren nuevas capacidades y funciones. Se ha descrito que los rasgos esenciales que definen a una célula cancerosa son: inestabilidad genómica y mutaciones, autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales anti-crecimiento, evasión de la apoptosis y de la respuesta inmune, promoción tumoral por inflamación, potencial replicativo ilimitado, reprogramación del metabolismo energético, angiogénesis sostenida e invasión de tejidos y metástasis (Fig. 1) [5].



**Fig. 1** – Diagrama donde se muestran los cambios esenciales que sufre una célula normal para convertirse en una célula cancerosa. Modificada de Hanahan & Weinberg 2011 [3].

### **3.1.1. Estadísticas del cáncer**

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. A la fecha, se han registrado más de 100 diferentes tipos de cáncer que tienen comportamientos distintos y particulares dependiendo de su localización y estirpe celular de origen, de tal forma que sus tasas de crecimiento varían, así como sus respuestas hacia distintos tratamientos [6].

En el 2012 se reportaron 8.2 millones de defunciones causadas por algún tipo de cáncer en el mundo, siendo los cánceres de pulmón (19.4%), hígado (9.1%), estómago (8.8%), colon (8.5%), y mama (6.4%) los de mayor mortalidad. En las mujeres los tres principales tipos de cáncer que causaron fallecimientos en el mundo durante 2012 fueron: mama (14.7%), pulmón (13.8%), colon (9%), cérvico uterino (7.5%) y estómago (7.2%). En México, en particular, los más mortales fueron: mama (14.2%), cérvico uterino (11.9%), hígado (7.9%), estómago (7.3%) y pulmón (6.6%) [6].

### **3.1.2. Cáncer Cérvico Uterino**

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es el cuarto cáncer en el mundo más común en mujeres. Alrededor del 84% de los casos de CaCu ocurre en países en vías de desarrollo, principalmente por la falta de información sobre sus factores de riesgo, detección y tratamiento; así como por el mal diagnóstico proporcionado por los sistemas de salud [7].

Como su nombre lo indica, el cáncer cérvico uterino o carcinoma del cuello uterino incluye las neoplasias malignas que se desarrollan en la región fibromuscular inferior del útero (cérvix). El cérvix conecta el útero con la vagina y está conformado principalmente por dos tipos celulares: células escamosas (ectocérvix) y células glandulares (endocérvix), que interactúan en la llamada zona de transición. Es en esta zona donde empiezan la mayoría de los casos de CaCu, esencialmente con alteraciones histológicas de las células epiteliales escamosas, lo que lleva a la interrupción del proceso de diferenciación epitelial, originándose neoplasias pre-invasoras conocidas como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC). Si no se tratan estas lesiones, con el tiempo las células epiteliales anormales rompen la membrana basal e invaden el estroma cervical, invadiendo el torrente sanguíneo y los vasos linfáticos, a través de los cuales se diseminan a otros lugares. Es entonces cuando se trata de un carcinoma invasivo [8, 9, 10].

Existen diversos tipos de cáncer cervicales invasivos que se identifican de acuerdo al tipo de células que se observan por análisis microscópico de las biopsias de los pacientes. El cáncer cervical invasivo más común es el carcinoma escamoso, el cual proviene del epitelio escamoso cervical que cubre la superficie del cérvix y representa aproximadamente el 80% de los casos. En segundo lugar de incidencia se encuentra el adenocarcinoma cervical, que proviene de las glándulas productoras de mucosa del endocérvix y representa 15% de los casos. El 5% restante se compone de tipos menos comunes, incluyendo carcinoma adenoescamoso, carcinoma neuroendocrino, melanoma, linfoma, carcinosarcoma y adenocarcinoma seroso [11].

### **3.1.2.1. Etiología del Cáncer Cérvico Uterino**

Dentro de los factores asociados al desarrollo del CaCu, el principal factor de riesgo y el más estudiado es la infección por el virus del papiloma humano (VPH), el cual es un virus de transmisión sexual que se ha encontrado presente en >99% de los casos de cáncer cérvico uterino [12]. A pesar de que es necesario tener una infección persistente de un VPH de alto riesgo, éste no es el único factor necesario para la aparición y desarrollo del cáncer ya que en mujeres sexualmente activas las infecciones con VPH son frecuentes, pero no todas son vulnerables a desarrollar cáncer, existiendo otros cofactores de riesgo que pueden contribuir, como son: tener múltiples parejas sexuales, uso continuo de anticonceptivos orales, coinfección de VPH con VIH, herpes y clamidia; inmunosupresión, genética del hospedero, múltiples embarazos, hábitos alimenticios y factores ambientales, entre otros [12,13].

#### **3.1.2.1.1. Virus del Papiloma Humano**

El VPH es un virus perteneciente a la familia de los *Papillomavirus*. Estructuralmente no cuentan con envoltura y presentan una simetría icosaédrica formada por 72 capsómeros. Su genoma está conformado por una molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) circular de doble cadena en una estructura que asemeja a la de cromatina asociada a histonas celulares [14].

Las diferencias genotípicas entre los virus están marcadas por las diferencias en la secuencia de aminoácidos de la proteína estructural L1. Actualmente se han caracterizado más de 150 tipos de VPH de los cuales alrededor de un 30% infectan el tracto genital. La mayoría de estas infecciones son benignas por lo que se ha clasificado a los virus de alto y bajo riesgo. Los VPH de alto riesgo son aquellos asociados a CaCu, siendo los tipos 16 y 18 los más prevalentes, estando presentes en el 60-80% de los casos. Por otro lado, los de bajo riesgo son aquellos que no se han asociado a CaCu pero pueden causar verrugas genitales o cambios muy pequeños en las células del cuello uterino [15].

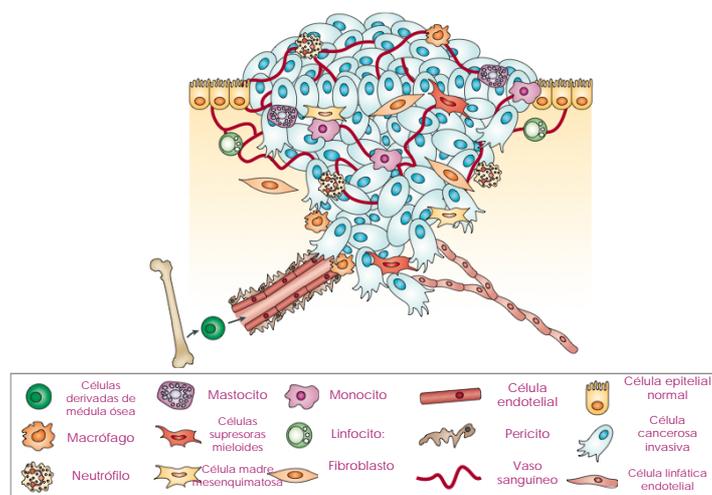
En lesiones precancerosas la mayoría de los genomas persisten en un estado episomal, pero en una minoría de los casos puede ocurrir la integración del ADN viral al del hospedero contribuyendo a la progresión celular. Dicho fenómeno se ha encontrado en las lesiones de alto grado, donde los genomas virales se encuentran integrados dentro de los cromosomas del hospedero. Cuando se lleva a cabo esta integración, el genoma viral se rompe y las proteínas E1 y E2, encargadas de regular la transcripción y replicación viral, pierden su función, ocasionando la desregulación de los oncogenes virales E6 y E7 [16]. Estos oncogenes contribuyen a la inestabilidad genómica, la evasión de la apoptosis y la proliferación celular incontrolada ya que E6 se une y promueve la degradación de la proteína p53, mientras E7 inactiva la transcripción del gen del retinoblastoma, un gen supresor de tumores [17].

### **3.1.3. Microambiente tumoral**

La homeostasis de los tejidos se mantienen gracias a las interacciones dinámicas que hay entre los distintos tipos de células que los componen, así como sus interacciones con la matriz extracelular y sus respuestas a los efectores solubles disponibles en el espacio extracelular. Al

igual que en los tejidos, este microambiente es parte integral y fundamental para la fisiología y estructura tumoral ya que, además de servir de anclaje, provee un ambiente propicio para promover o antagonizar el desarrollo, supervivencia, invasividad y habilidad metastásica de los tumores [18].

El microambiente tumoral consiste en un nuevo tejido complejo que está compuesto por distintos tipos celulares y moléculas. El microambiente de cada tumor depende en gran parte del sitio del organismo donde se esté desarrollando, presentando generalmente como componentes principales: matriz extracelular, fibroblastos activos, células inmunes, pericitos, adipocitos, células epiteliales, células endoteliales linfáticas y vasculares, así como numerosas proteínas contenidas en el espacio extracelular (Fig. 2) [19],



**Fig. 2** – Diagrama que ejemplifica los principales tipos celulares y componentes moleculares del microambiente tumoral. Modificada de Joyce & Pollard 2009 [21].

La comunicación tumor-microambiente es bidireccional, ya que cada uno es capaz de regular la expresión génica y ejercer presión selectiva en el otro, por lo cual ambos tienen una gran influencia sobre el otro en establecer sus respectivos fenotipos. El microambiente modula el desarrollo del tumor en forma positiva y/o negativa, ya que la mayoría de sus componentes funcionan como agentes pro-tumorales y/o anti-tumorales dependiendo del tipo de tumor, su etapa de desarrollo y la concentración de ciertos receptores [20].

### 3.1.4. Interacción tumores – órganos lejanos

Así como las células cancerosas pueden alterar sus tejidos aledaños para crear un ambiente permisivo y de soporte, también existe evidencia de que las interacciones de los tumores con sus hospedero van más allá del microambiente, ya que éstos son capaces de perturbar activamente a órganos y tejidos distantes [22].

Dentro de las áreas de mayor interés en el estudio de la interacción tumor – hospedero/órganos lejanos se encuentran las investigaciones que se enfocan en analizar cómo los tumores influyen en sus órganos blancos de metástasis. Un ejemplo de esto, son los estudios que muestran que el tejido pulmonar de ratones a los que se les generó tumores subcutáneos de

melanomas metastásicos o carcinomas de pulmón se encuentra alterado antes de la diseminación de células tumorigénicas metastásicas hacia los pulmones. En estos estudios, se demostró que los tumores mencionados alteran el parénquima pulmonar reclutando a células derivadas de la médula ósea hacia los pulmones. Estas células expresan el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1) y al establecerse en los nichos pre-metastásicos específicos proveen un microambiente permisivo para la invasión de células tumorales mediante la expresión de integrinas, factores de crecimiento de fibroblastos y metaloproteinasas de matriz [23,24].

Así como los tumores se ayudan de otros órganos para una metástasis exitosa, también se ha demostrado que algunos tumores tienen la capacidad de alterar órganos distantes para inducir cambios que le confieran ventajas para su desarrollo. En modelos animales con tumores grandes se ha observado una elevación significativa en el número de células supresoras de origen mieloide (MDSC) en el bazo y la médula ósea. Estas células se caracterizan por tener la capacidad de atenuar la respuesta inmune antitumoral, por lo que al liberarse al torrente sanguíneo y llegar al tumor le aportan una ventaja proliferativa promoviendo la angiogénesis, invasión y metástasis mediante la producción de metaloproteinasas [25]. En un estudio en el que se utilizaron ratones como modelos experimentales de carcinomas de mama, pulmón y colorectales, se demostró que, mediante un mecanismo todavía no descrito, la presencia de tumores es capaz de modificar a las células del linaje mieloide similares a MDSC generadas en la médula ósea, ya que los bazos de ratones con tumores presentaban un aumento en concentración de estas células, las cuales son después reclutadas al tumor donde promueven el crecimiento tumoral, angiogénesis, la invasión y la metástasis; a diferencia de las MDSC aisladas de bazos de ratones sin tumores, las cuáles no promovían el crecimiento tumoral [22,26].

La capacidad de interacción del tumor no se restringe a lo demás órganos o tejidos del organismo. En un estudio en el que se utilizaron ratones con tumores modelo de cáncer de mama, colon y melanoma; se demostró cómo células circulantes de tumores de orígenes metastásicos son capaces de colonizar a sus tumores primarios en un proceso denominado en inglés "tumor self-seeding". Este proceso requiere de señales de atracción derivadas del tumor primario (interleucinas) y del microambiente tumoral. Una vez que las células son atraídas, se infiltran en los tumores primarios interaccionando con el estroma, desencadenando la expresión y liberación de señales que promueven el crecimiento tumoral, la angiogénesis, la invasión y la metástasis del tumor primario [27].

#### **3.1.4.1. Alteraciones sistémicas en el organismo resultado de la presencia de tumores**

Los mecanismos que utilizan los tumores para comunicarse con otros órganos o tumores pueden también tener efectos secundarios y dañinos en el hospedero. Se cree que estos cambios sistémicos son realmente los causantes de la mayoría de las muertes de pacientes con cáncer. Los casos más estudiados y recurrentes donde los tumores causan daño al hospedero se denominan síndromes paraneoplásicos (SPN), los cuáles se caracterizan por la presencia de síntomas, daños y/o alteraciones en órganos o tejidos sanos distantes del sitio

primario de un tumor o de cualquiera de sus tumores metastásicos. En estos síndromes, las moléculas secretadas por el microambiente tumoral y/o los tumores viajan por el torrente sanguíneo desencadenando respuestas en los órganos o tejidos que son capaces de reconocerlas, generando cambios que pueden afectar la inmunidad, la coagulación y el metabolismo, entre otros [28]. Por ejemplo, algunas pacientes con cánceres ginecológicos pueden presentar hipercalcemia, resultado de la secreción de los tumores de una forma anormal de la hormona paratiroides, la cual desencadena un trastorno electrolítico que puede afectar a los sistemas nervioso, neuro-muscular y gastrointestinal [22].

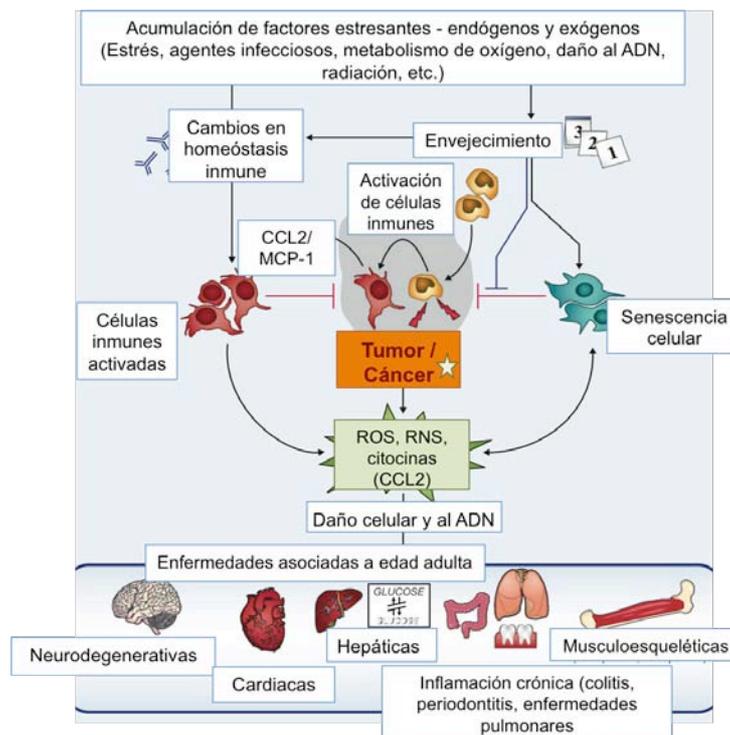
Los trastornos coagulatorios están presentes en alrededor del 50% de los pacientes con cáncer y en 90% de pacientes con metástasis. Se estima que el tromboembolismo (formación de coágulos) es la segunda causa de muertes relacionadas con el cáncer. El estado protrombótico de los pacientes con cáncer se origina debido a las alteraciones y anomalías en el sistema hemodinámico de los tumores y las células endoteliales, macrófagos y plaquetas con las que interactúa. Estos cambios en el sistema de coagulación son fundamentales para la angiogénesis tumoral, donde hay una alta producción y secreción de factores procoagulantes, desequilibrando los niveles de fibrinolíticos (anticoagulantes). Al haber un mayor número de factores procoagulantes, hay una sobre activación de la cascada de coagulación, promoviendo la formación de coágulos. También la actividad procoagulante de los tumores se ha asociado al incremento en el riesgo de presentar metástasis [28].

Las infecciones son otros factores frecuentes que influyen en la mortalidad de pacientes con cáncer. Como se mencionó anteriormente, los tumores inducen el incremento de células MDSC para inhibir la respuesta inmune y promover el crecimiento y proliferación. Debido a que estas células inhiben a las células T y las NK, el organismo es más propenso a contraer infecciones bacterianas y virales [28].

Las obstrucciones y formación de abscesos son complicaciones comunes en pacientes con cánceres metastásicos y se han visto relacionados también a la adquisición de infecciones. Por ejemplo, autopsias de niños con neumonía y carcinomas metastásicos revelaron que el 80% de los casos de neumonía estaban asociados a metástasis pulmonar y la formación de abscesos que además de causar obstrucciones en los bronquios, son lugares de alojamiento para microorganismos. Las infecciones urinarias son comunes en pacientes con tumores en la vejiga o carcinomas prostáticos, ya que éstos pueden obstruir el uréter o el cuello de la vejiga ocasionando la retención de residuos de orina y por lo tanto generando un ambiente propenso a infecciones [29]. Otras obstrucciones comunes son las gástricas en pacientes con cáncer metastásico de mama y páncreas, y las de hígado en pacientes con cáncer colorectal [30,31].

Además de ser sitios privilegiados para las infecciones, los abscesos u obstrucciones pueden propiciar otros efectos dañinos en el organismo. Tal es el caso de la obstrucción biliar, que se presenta con alta frecuencia en pacientes con cáncer pancreático y que puede desencadenar en colestasis extra-hepática caracterizada por ictericia, prurito, deficiencia en la absorción de grasas, coagulopatías y falla hepatocelular progresiva [32].

Por otra parte, los factores liberados por los tumores pueden entrar en contacto con tejidos lejanos a través de la sangre o la linfa ocasionando, de manera indirecta, daños al ADN. Lo anterior se demostró en ratones con tumores subcutáneos de melanoma, sarcoma y carcinoma (tempranas no metastásicas). En estos ratones no sólo los tumores presentaban daños en el ADN, sino también algunos órganos lejanos. Entre las lesiones observadas se encontraron cortes de doble cadena (DSBs por sus siglas en inglés: double-strand break), presentes principalmente en órganos altamente proliferativos como el duodeno, el colon, la piel y, en menor grado, en el estómago y el recto. También se observaron lesiones de ADN (no DSBs) inducidas por oxidación (OCDLs por sus siglas en inglés: oxidative clustered DNA lesions), principalmente en los tejidos del tracto gastrointestinal. Estas últimas lesiones también pueden indicar daño oxidativo en el ARN y a lípidos, contribuyendo al estrés ocasionado por el tumor [33]. La hipótesis sugerida en este estudio es que en los tumores la secreción de citocinas proinflamatorias, principalmente la CCL2, inducen la activación de los macrófagos, propiciando su migración a los tejidos distante donde desencadenan una respuesta inflamatoria que tiene como consecuencias los daños al material genético (Fig. 3) [34].



**Fig. 3** – Diagrama donde se muestran los diferentes mecanismos celulares que inducen la producción de citocinas y agentes oxidativos (recuadro verde), que a su vez generan daño celular y daño al ADN. Entre estos mecanismos se encuentra la presencia de tumores/cáncer (recuadro naranja). Modificada de Martin *et al.* 2011 [34].

### 3.2. Cáncer y Sistema Nervioso: Antecedentes

El sistema nervioso se comunica con todo el organismo recibiendo, interpretando y enviando estímulos [35], por lo que muchas enfermedades y cambios sistémicos involucran manifestaciones neurológicas que suelen ser parte importante de los síntomas que contribuyen al deterioro del paciente (Tabla 1).

**Tabla 1.** Ejemplos de cambios y enfermedades sistémicas que presentan manifestaciones neurológicas [36]

Enfermedad o cambio sistémicas	Enfermedad Neurológica	Características
Insuficiencias Renales	• Encefalopatía renal	Anorexia, náuseas, vómito, convulsiones, hiperactividad, disrupción del sueño, letargia, deficiencias cognitivas, paranoia, fatiga.
	• Polineuropatías	Síndrome de las piernas inquietas: Ardor, comezón, hormigueo y entumecimiento.
Insuficiencias hepáticas	• Encefalopatía hepática	Estado alterado de conciencia, alteración de funciones motoras (asterixis, mioclonos, temblores), discinesia, degeneración de la espina dorsal, edemas convulsiones
	• Síndrome hepatocerebral crónico	Demencia, disartria, marcha atáxica, temblores, coreoatetosis, necrosis cortical, pérdida neuronal en la corteza cerebral, ganglio basal y cerebelo.
	• Mielopatía hepática	Paraparesia espástica, alteraciones en sensibilidad, desmielinización simétrica, pérdida axonal.
Diabetes	• Neuropatía hiperglucémica	Parestesia (adormecimiento), dolor e hiperestesia en las piernas; baja conductividad nerviosa.
	• Polineuropatía simétrica distal	Entumecimiento, ardor, comezón y/o adormecimiento de las piernas; falta de reflejo en los talones, debilidad muscular, pérdida de sensibilidad.
	• Caquexia Diabética	Anorexia, pérdida de peso, dolor en extremidades, depresión, ardor en los pies.
	• Síndrome de compresión nerviosa	Debilidad muscular, dolor.
	• Radiculoneuropatía troncal	Dolor e hiperestesia en el pecho y/o abdomen, debilidad en la zona del pecho, pérdida de peso,
	• Síndrome Bruns-Garland	Dolor, debilidad muscular, pérdida de peso, parálisis en las piernas.
	• Neuropatías craneales	Parálisis oculomotora, deficiencias en la visión.
Embarazo	• Epilepsia	Convulsiones
	• Eclampsia	Migrañas, hipertensión, convulsiones, alteraciones en la visión, estado alterado de conciencia, déficit local (hemorragia intracerebral), edema cerebral, microinfartos cerebrales, proteinuria, edemas faciales, dolor epigástrico, corea gravídica
	• Mononeuropatías – Parálisis de Bell	Parálisis facial
	• Síndrome del túnel carpiano	Calor, calambre y entumecimiento de la mano, atrofia muscular de los dedos.
	• Cáncer cerebral	Gliomas, meningiomas, neurofibromas.
SIDA	• Demencia asociada a SIDA	Espasticidad, psicosis, pérdida de memoria, demencia, cambios conductuales, complicaciones vasculares, miopatías, incontinencia, convulsiones.
	• Toxoplasmosis	Dolor de cabeza, ataxia, convulsiones, fiebre, letargia, parálisis de nervios craneales,
	• Linfoma primario del Sistema Nervioso Central (SNC)	Pérdida de memoria, letargia, confusión, dolor de cabeza, deficiencias neurológicas focales, afasia.
	• Leucoencefalopatía multifocal progresiva	Alteraciones en la vista y el habla, descoordinación de las extremidades, anormalidades al caminar, ataxia.
	• Mielopatía vacuolar	Debilidad, disfunción urinaria, anormalidades sensoriales, paraparesia, deficiencia sensorial.
	• Polineuropatía distal simétrica	Entumecimiento, ardor y parestesia en los pies; hipersensibilidad, disminución en los reflejos del talón.
	• Polineuropatía inflamatoria desmielinizante	Debilidad, hiperreflexia, disminución en sensibilidad, parestesia.
• Miopatía	Debilidad, pérdida de peso, mialgia.	

Al igual que en las enfermedades referidas en la Tabla 1, el sistema nervioso se ve afectado frecuentemente por el cáncer, por lo que las interacciones que se lleven a cabo entre estos dos sistemas durante el desarrollo del cáncer son de suma relevancia tanto para el hospedero como para la enfermedad, influyendo significativamente en la morbilidad y mortalidad en los pacientes.

### **3.2.1. Efectos del cáncer en el Sistema Nervioso**

Los efectos del cáncer pueden ser directos, como tumores primarios o metastásicos en el sistema nervioso, o indirectos, como los síndromes paraneoplásicos neurológicos causados por tumores distantes. De igual forma, la mayoría de las terapias y tratamientos contra el cáncer pueden dañar al sistema nervioso [37].

Cabe destacar que estas complicaciones neurológicas pueden ayudar al diagnóstico y detección de cáncer: se ha reportado que algunos pacientes acuden al médico debido a la presencia de síntomas o signos de desórdenes neurológicos, que eventualmente se descubre, son originados a causa de un cáncer no diagnosticado [38].

#### **3.2.1.1. Psico-Oncología**

Entre las primeras evidencias que establecieron una interacción tumor-cerebro, se encuentran estudios psicológicos y psiquiátricos donde se establecieron correlaciones entre pacientes con cáncer y trastornos mentales, dando origen a la psico-oncología. Dentro de los trastornos detectados destacan: depresión, ansiedad, estrés post-traumático, desórdenes de personalidad y, en casos muy extremos, esquizofrenia y bipolaridad [39].

#### **3.2.1.2. Caquexia**

La caquexia inducida por cáncer es un síndrome muy frecuente en pacientes con cáncer. Se ha descrito como multifactorial ya que se ven involucrados muchos mediadores como hormonas, neuropéptidos y citocinas. Los pacientes presentan múltiples alteraciones metabólicas, inmunológicas y neurológicas graves. Los síntomas se caracterizan por la presencia de anorexia, pérdida de tejido adiposo y muscular, dolor, perturbaciones homeostáticas severas, depresión, etc. Este síndrome invariablemente está asociado con procesos patofisiológicos crónicos como cáncer o infección por VIH. La caquexia inducida por cáncer contribuye a casi un tercio de las muertes asociadas a cáncer [40].

La influencia del tumor en la reducción de la ingesta de alimentos y otros síntomas de la caquexia inducida por cáncer puede ser directa o indirecta. En el primer caso, el cáncer puede interferir mecánicamente con el tracto digestivo, mientras que en el segundo caso, el cáncer puede influir mediante la liberación, tanto del tumor como del sistema inmune, de sustancias inhibitorias del apetito, como citocinas inflamatorias y hormonas peptídicas, las cuales interactúan con los receptores periféricos y del hipotálamo [41]. Otro mecanismo de influencia indirecta por parte del tumor es la alteración del sistema neuro-peptidérgico del paciente ya que, mediante mecanismos que todavía no se han descrito completamente se presentan cambios en la homeóstasis de neuropéptidos involucrados en la regulación de la ingesta alimenticia, como la melanocortina y el neuropéptido  $\gamma$ . Cabe destacar que las citocinas, las hormonas y los neuropéptidos interactúan teniendo efectos sinérgicos para mediar el efecto caquéctico del cáncer [42].

Debido a que la caquexia está asociada invariablemente con comportamientos anormales y síndromes neurológicos en un estudio se analizó la expresión de canales iónicos de potasio

dependientes de voltaje (Kv), ya que éstos modulan varios de los procesos neuronales. En este estudio se reportó que alteraciones en la expresión de los canales están relacionadas con disfunciones del sistema nervioso en una rata modelo de caquexia con tumores de hepatocarcinoma. En este modelo, los niveles de expresión de los canales Kv, así como sus mecanismos de compensación, se encontraron disminuidos. Estos decrementos de expresión podrían modificar la actividad cerebral, así como las respuestas cognitivas y de conducta, por lo que los autores proponen la deficiencia en los canales Kv podrían estar influyendo en la anorexia y la depresión relacionadas con la caquexia inducida por cáncer. Adicionalmente, en este estudio también se propone que la disminución en la expresión de dichos canales podría estar relacionada con la disfunción neuronal generada por apoptosis en las células neuronales, ya que en los cerebros de las ratas con tumor se encontraron altos niveles de la proteína proapoptótica TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), así como la subexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-XL. De igual forma se detectó una pérdida de peso de los cerebros, lo cual podría reflejar muerte neuronal masiva. [43].

### **3.2.1.3. Degeneraciones paraneoplásicas neurológicas**

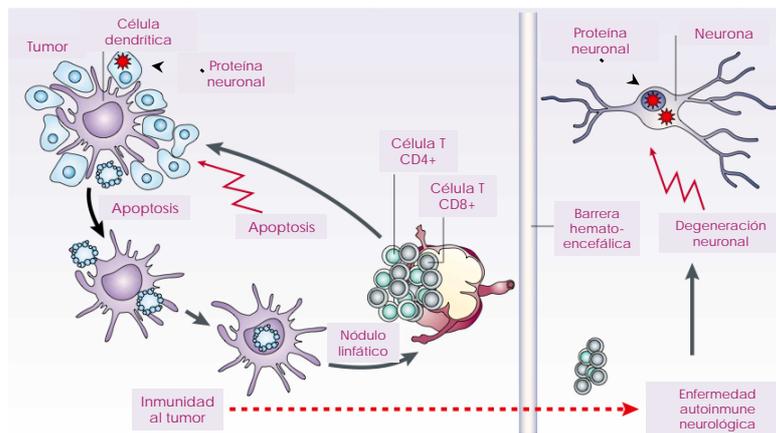
Como se mencionó antes, los síndromes paraneoplásicos (SPN) son muy frecuentes en pacientes con cáncer y pueden afectar a la mayoría de los órganos o tejidos. El sistema nervioso puede verse afectado por estos síndromes de dos maneras:

- El daño generado por un SPN en un tejido u órgano no neuronal puede tener efectos secundarios o daños estructurales en el sistema nervioso.
- Los SPN pueden afectar directamente al sistema nervioso, sin que haya otros órganos involucrados. A éstos SPNs se les conoce como degeneraciones paraneoplásicas neurológicas (DPN) [44].

Las DPN son un grupo diverso de desórdenes neurológicos, no metastásicos, resultado del daño al sistema nervioso por la presencia de tumores remotos. Las DPN pueden afectar a casi todas las partes del sistema nervioso y se han visto más asociadas a cáncer de pulmón y tumores ginecológicos. (Tabla 2) [45].

Existen varios mecanismos de patogénesis, pero en la mayoría de las DPN, la participación del sistema inmune es fundamental. Se considera que los anticuerpos no juegan un papel preponderante en estas patologías, sino que la mayoría están asociadas a mecanismos de células T-citotóxicas, que se consideran las células efectoras de la inmunidad antitumoral [46]. El modelo de los DPN asociados a células-T citotóxicas establece que la respuesta inmune antitumoral está mediada por antígenos onconeuronales. Estos antígenos son resultado de la expresión en tumores de proteínas que generalmente sólo se expresan en condiciones normales en el cerebro, el cual al ser un sitio inmunológicamente privilegiado no presenta tolerancia inmune. Así, cuando las células tumorales que expresan las proteínas onconeuronales mueren, estas proteínas son presentadas como antígenos en células dendríticas desencadenando una respuesta antitumoral y una respuesta autoinmune en el cerebro, ya que al llegar estas células al cerebro y no haber un registro inmune de las proteínas cerebrales, el organismo reconoce a las neuronas que también expresan estas proteínas como

foráneas. Las respuestas antes mencionadas están mediadas por la activación de linfocitos T que, una vez que se activan, regresan al tumor induciendo apoptosis. El cómo esta respuesta inmune antitumoral se desarrolla en enfermedades autoinmunes neurológicas no ha sido completamente descrito, pero se cree que involucra la participación y combinación de células B y T las cuáles cruzan la barrera hematoencefálica, las cuáles son las que desencadenan la respuesta autoinmune atacando a las neuronas que normalmente expresan los antígenos onconeuronales blanco (Fig. 4) [45].



**Fig. 4.** Modelo de las degeneraciones paraneoplásicas neurológicas mediadas por el sistema inmune. Modificada de Albert & Darnell 2004 [45].

**Tabla 2.** Síndromes paraneoplásicos neurológicos más comunes: Patología y características [45,46,47].

Degeneración Paraneoplásica Neuronal	Síntomas clínicos	Cáncer asociado	Patología
Degeneración Paraneoplásica Cerebelar	Náusea, diplopía, alteración de la marcha, mareos	Ovario, mama, linfoma de Hodgkin, pulmón	Pérdida de células Purkinje, degeneración del núcleo olivar y del giro dentado.
Encefalitis límbica paraneoplásica	Convulsiones, pérdida de memoria, insomnio	Pulmón	Pérdida de neuronas, proliferación microglial, inflamación perivascular e intersticial
Encefalomiелitis paraneoplásica	Diplopía, disfagia, disartria, hipotensión, arritmias	Pulmón, testículos, ovario	Inflamación perivascular, pérdida neuronal, gliosis, degeneración walleriana
Síndrome de Stiffman	Rigidez generalizada	Mama, pulmón	Pérdida de neuronas motoras e interneuronas.
Neuropatía sensoriomotora paraneoplásica	Pérdida motora y de sensibilidad en extremidades	Múltiples, más en cánceres avanzados	Degeneración axonal, desmielinización
Neuropatía sensitiva paraneoplásica	Pérdida sensorial en piernas, tronco y cara	Pulmón	Degeneración neuronal
Síndrome miasténico de Lambert-Eaton	Debilidad, fatiga, hiporreflexia, parestesia	Pulmón	Anticuerpos vs canales de calcio voltaje dependientes (tipo P/Q)
Polimiositis y dermatomiositis	Miopatía proximal, resistencia a la flexión del cuello, salpullido en los párpados	Ovario, mama, cáncer, gastrointestinal	Vasculopatía mediada por el sistema inmune, necrosis muscular (expresión elevada de creatina quinasa)

### 3.2.1.4. Complicaciones cerebrovasculares

Los infartos cerebrales isquémicos y hemorrágicos se encuentran entre las principales causas de mortalidad en pacientes con cáncer [48]. Al igual que las complicaciones vasculares presentes en otros órganos debido a la presencia de tumores (mencionadas anteriormente en el texto), las complicaciones cerebrovasculares son ocasionadas por coagulopatías, embolias,

compresión directa del tumor en los vasos sanguíneos y como efectos secundarios de infecciones. Los síntomas típicos de los infartos cerebrovasculares son afasia, debilidad y entumecimiento. [37].

### **3.2.1.5 Infecciones**

Las infecciones en el sistema nervioso central de pacientes con cáncer contribuyen de manera significativa en la morbilidad y mortalidad de los pacientes debido principalmente a que son mal diagnosticadas y son confundidas con otras enfermedades o síntomas asociados al cáncer, como la encefalitis paraneoplásica, así como a efectos secundarios consecuencia de los tratamientos [48].

Existen diversos factores de riesgo que, en sus combinaciones, son fundamentales para que se lleven a cabo las infecciones cerebrales. Dentro de estos factores se encuentra la inmunosupresión de los pacientes, las disrupciones de la barrera hematoencefálica, procedimientos neuroquirúrgicos, catéteres, quimioterapias y estancias en hospitales donde existe una exposición a agentes patógenos [49].

La mayoría de las infecciones son oportunistas ya que se aprovechan de la inmunosupresión de los pacientes inducida generalmente por la mayoría de los tratamientos de quimioterapia y radioterapia, ya que las drogas utilizadas además de atacar a las células tumorales, también atacan esencialmente a las células que se multiplican rápidamente, como las células del sistema inmunológico, en particular los neutrófilos y los linfocitos. Hay una gran variedad de patógenos bacterianos, virales y fúngicos involucrados en las infecciones neurológicas asociadas a cáncer, los cuales pueden infectar simultánea y/o secuencialmente al paciente. La meningitis, encefalitis y los abscesos cerebrales son las complicaciones neurológicas más frecuentes resultado de estas infecciones [48].

### **3.2.1.6. Mielopatías**

Las mielopatías son un conjunto de síntomas que afectan específicamente a la médula espinal. En pacientes con cáncer la causa más común es la compresión de los tumores sobre la médula. La mayoría es causada por metástasis en la columna vertebral, mientras que un 15-20% de los casos se debe a cáncer de mama, próstata y pulmón. En muchos pacientes, las mielopatías son manifestaciones tardías de cáncer metastásico, pero en algunos casos de linfomas, mielomas y cáncer de pulmón, la mielopatía es uno de los síntomas iniciales del cáncer [38].

Los signos clínicos y síntomas dependen del nivel de la médula espinal que se vea afectado (cervico, torácico o lumbar). Algunos de los síntomas más comunes son debilidad, torpeza, espasticidad, déficits sensoriales, disfunción sexual y vejiga neurogénica [50].

### **3.2.2. Sistema nervioso y su participación en el cáncer**

No todos los cambios observados en el sistema nervioso de pacientes con cáncer son debido a daños o alteraciones neurológicas. También se ha descrito que el sistema nervioso puede influir positiva y/o negativamente en el desarrollo, la metástasis y la ocurrencia tumoral.

Estudios clínicos y epidemiológicos han descrito que factores psicológicos específicos como estrés, depresión crónica y falta de apoyo social son factores de riesgo para el desarrollo y progresión del cáncer debido a su impacto en la respuesta inmune, en la reparación del ADN y en la inhibición de la apoptosis regulada por mecanismos neuroendócrinos [51,52].

### **3.2.2.1. Estrés**

El estrés es considerado un proceso complejo que involucra factores ambientales y psicosociales, los cuales inician una cascada de vías de procesamiento de la información tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. Las respuestas a estrés son fundamentales para la sobrevivencia y los procesos de adaptación, generando alteraciones en la homeostasis. Estos cambios pueden tener efectos positivos o negativos en la salud, por lo que se han clasificado dos tipos de estrés: el eustrés y el distrés. El eustrés está asociado a respuestas adaptativas y ambientes enriquecedores que son benignos o que aportan efectos benéficos en la salud, mientras que el distrés está asociado a la exposición de ambientes hostiles o aversivos que pueden resultar en daños a la salud [53]. Ambos tipos de estrés se han asociado al cáncer, teniendo generalmente efectos opuestos en el desarrollo tumoral.

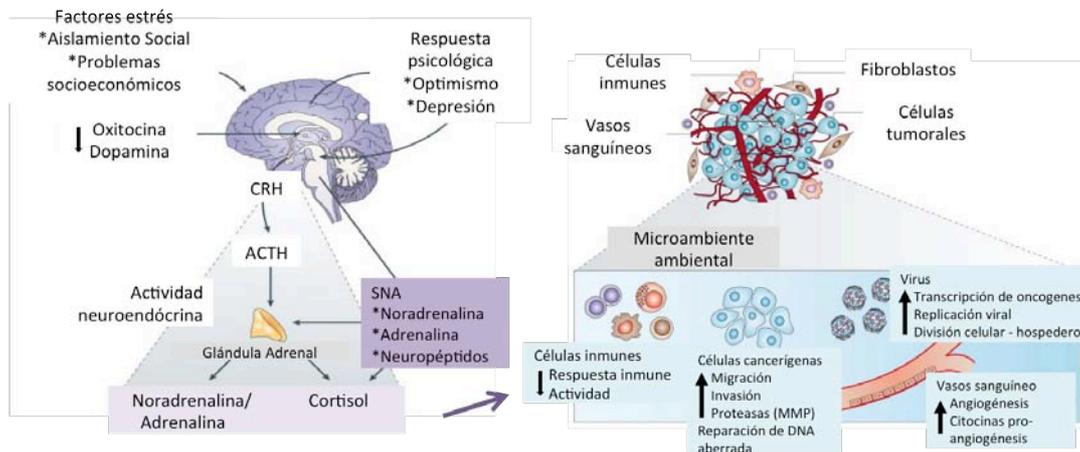
#### **3.2.2.1.1. Distrés y cáncer**

En las respuestas del distrés se activan principalmente dos ejes: el eje simpático-adrenal-medular (SAM) y el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA). La activación de estos ejes resulta en la secreción de varias moléculas efectoras, entre ellas adrenalina y noradrenalina (catecolaminas del estrés) por medio de las neuronas simpáticas y la médula adrenal, así como la secreción de las hormonas glucocorticoides, principalmente cortisol (hormona del estrés) en la corteza adrenal resultado de la síntesis pituitaria de la hormona adrenocorticotropa (ACTH, por sus siglas en inglés: adrenocorticotropic hormone) estimulada por la hormona liberadora de corticotropina (CRH, por sus siglas en inglés: corticotropin-releasing hormone). Estas moléculas son capaces de alterar funciones inmunológicas, neuroquímicas y endócrinas [54].

En el cáncer, la liberación de estos factores producto del estrés pueden modular la actividad de múltiples componentes del microambiente tumoral. Los efectos directos que se han visto son cambios en la proliferación celular, invasión, angiogénesis, metástasis y evasión inmune, mientras que los efectos indirectos pueden ser la activación de virus oncogénicos y la modulación de funciones inmunes como la producción de anticuerpos, los perfiles de citocinas y el tráfico celular (Fig. 5) [55].

Un ejemplo de efectos directos se observó en estudios de distrés en cáncer de ovario y páncreas, donde el aumento de la adrenalina y noradrenalina, tanto en el torrente sanguíneo como en los tumores, influyó en la progresión e invasión del cáncer, estimulando la expresión y secreción de metaloproteinasas, interleucinas y del factor de crecimiento endotelial vascular [55,56]. Estas respuestas están mediadas mayormente por la activación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, los cuales se han visto expresados en varias líneas celulares cancerígenas y en varios tipos de tumores. Estos receptores están acoplados a proteínas G y su función es la de transmitir la información del ambiente externo al interior de la célula mediante la activación de

la adenil ciclasa y la acumulación del segundo mensajero AMP cíclico. Este segundo mensajero es capaz de activar a PKA, la cual fosforila al factor de transcripción CREB (cAMP-responsive-element-binding), promoviendo su migración al núcleo y su interacción con los elementos de respuesta a cAMP localizados en los promotores de los genes de proteínas relacionadas a la proliferación celular, migración, angiogénesis e inhibición de apoptosis, así como a la expresión de oncogenes virales [55].



**Fig. 5.** Diagrama donde se muestran los efectos que pueden tener los factores asociados al estrés en el microambiente y desarrollo tumoral. ACTH= Hormona adrenocorticotropa. Modificada de Antoni *et al.* [54].

La noción de que los receptores  $\beta$  adrenérgicos están involucrados en los procesos tumorigénicos ha permitido la implementación de novedosas terapias contra el cáncer, utilizando los bloqueadores de receptores  $\beta$  que normalmente se usan para el tratamiento de estrés. Estos bloqueadores han mostrado que pueden bloquear la estimulación dependiente de catecolaminas que promueven la proliferación, invasión y angiogénesis, así como también pueden disminuir el riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer [54].

Por otra parte, el estrés en humanos y modelos animales altera la regulación neuroendócrina de la respuesta inmune causando deficiencias que benefician el desarrollo y la progresión tumoral. La desregulación del sistema inmune como resultado del estrés puede deberse a que éste se ha visto asociado a la desregulación producción de citocinas pro-inflamatorias, así como a que la mayoría de las células del sistema inmune presentan receptores para las hormonas, neuropeptidos y neurotransmisores, siendo sensibles a las moléculas efectoras del estrés, por ejemplo, el aumento en la concentración de corticoides durante estrés tiene importantes efectos inmunosupresores en las funciones de linfocitos y macrófagos, afectando también sus patrones de circulación. Por otra parte, es común que en pacientes deprimidos o estresados se presente disminución en actividad y cantidad de células NK y células T, disminución en fagocitosis, inhibición en la síntesis de citocinas como interleucinas e inhibición de la expresión del MHC de clase I y II; lo cuál en conjunto se ha visto que estimulen la progresión tumoral [53].

Otras hormonas que también se ven afectadas por el estrés son la prolactina, la oxitocina y la dopamina. En cáncer de mama aumentos en la expresión de prolactina pueden promover el

crecimiento celular y la supervivencia de los tumores ya que puede funcionar como un agente inhibitorio de la apoptosis similar mediante la estimulación de Akt. Por otra parte, en ciertos tipos de tumores tanto la oxitocina como la dopamina se ven disminuidas. Ambas se han asociado a la inhibición del crecimiento celular en varios tipos de tumores malignos y a la inhibición de la angiogénesis [53].

Como ya se mencionó, el estrés también es capaz de influir en los virus oncogénicos ya que la mayoría éstos son capaces de responder a las vías de señalización activadas por las moléculas efectoras del eje HPA y el sistema nervioso autónomo mencionadas anteriormente. Estas moléculas y la activación de sus vías de señalización pueden influir en la reactivación virus tumorales latentes, la estimulación de expresión de oncogenes y la inhibición de las respuestas antivirales del hospedero. En el caso de los papilomavirus (HPV) de alto riesgo que contribuyen a carcinomas cervicales y rectales, las vías de señalización estimuladas por el glucocorticoide cortisol son capaces de activar la expresión de los genes virales promoviendo la interacción de las proteínas virales con proto-oncogenes y la evasión de respuestas inmunes disminuyendo la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC-I). Por otra parte, evidencia clínica ha establecido una correlación entre eventos de estrés como factores de riesgo para la progresión de displasias cervicales en mujeres HPV positivas [54].

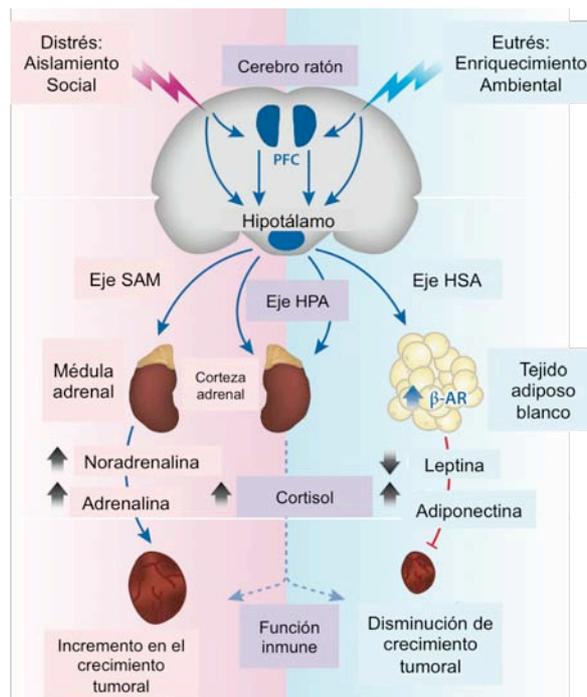
### **3.2.2.1.2. Eustrés y cáncer**

Los factores ambientales positivos son capaces de promover la neurogénesis, la supervivencia celular, el aprendizaje y la memoria. Además de tener efectos benéficos para el sistema nervioso, en un estudio reciente se demostró que estos factores ambientales positivos también son capaces de suprimir el crecimiento tumoral [52].

El modelo propuesto en dicho estudio establece que en ratones con tumores expuestos a un ambiente enriquecido (amplio espacio, acceso a actividad física, interacciones sociales con otros ratones, estimulación sensorial, cognitiva y motora), a diferencia de ratones con tumores en un ambiente aislados, se induce la activación del eje hipotálamico-simpático-adipocito (HSA) mediante el aumento en la expresión del factor neurotrófico BDNF en el hipotálamo. Este factor neurotrófico promueve la secreción de adrenalina en las inervaciones simpáticas discretas del tejido adiposo blanco (WAT), activando los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de los adipocitos. Esto resulta en la supresión de la expresión y liberación de la leptina y en la estimulación de la expresión y secreción de la adiponectina. Los cambios en los niveles de estas dos moléculas en el torrente sanguíneo contribuyen al fenotipo antitumoral ya que dentro de las múltiples funciones descritas para estas moléculas se encuentra la función de mitógeno para la leptina y la de antimitógeno para la adiponectina (Fig. 6) [53,57].

Al igual que en el estrés, en el modelo propuesto antes mencionado, la corteza prefrontal y el hipotálamo son los principales encargados de interpretar los estímulos. También en ambos casos, los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y la adrenalina son factores necesarios para que se lleve a cabo la respuesta. Sin embargo, a pesar de que se comparten estos elementos, los diferentes ejes activados dependiendo del estímulo son los responsables de que los efectos

finales sobre el desarrollo tumoral sean opuestos: mientras que en el distrés el eje SAM estimula la secreción de adrenalina y noradrenalina en la médula adrenal aumentando sus niveles en el torrente sanguíneo, en el eustrés el eje HSA estimula el aumento de la adrenalina y los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en los adipocitos. En el caso del eje HPA, ambos tipos de estrés son capaces de activar este eje promoviendo el aumento de la corticosterona en la corteza adrenal. Sin embargo, mediante mecanismos todavía no descritos, la corticosterona modula de diferente manera al sistema inmune en ambos casos. En el eustrés, a pesar de que su contribución es mínima, contribuye a la supresión del desarrollo tumoral, mientras que en el distrés tiene un papel más activo en promover el crecimiento (Fig. 6) [52].



**Fig. 6.** Esquema donde se muestran los mecanismos responsables de mediar los efectos opuestos del distrés y el eustrés en el desarrollo tumoral. PFC=Corteza prefrontal, SAM=Simpático-Adrenal-Muscular, HSA=Hipotalámico Pituitario-Adrenal, HSA=Hipotalámico-Simpácticoneuronal-Adipocito,  $\beta$ -AR= Receptor  $\beta$ -adrenérgico. Modificada de Cao & During 2012 [52].

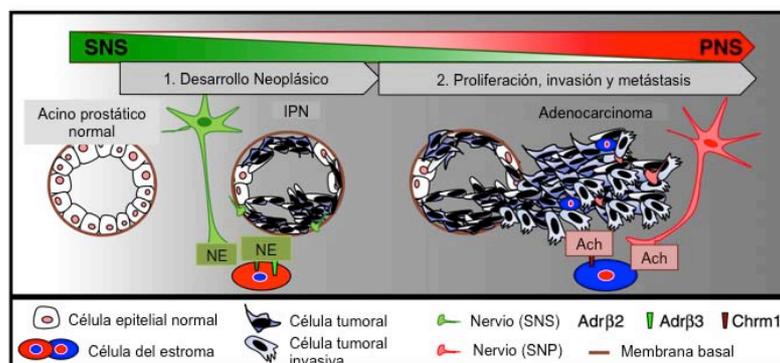
### 3.2.2.2. Invasión perineural

La invasión perineural (IPN) es el proceso mediante el cual las células tumorales son capaces de invadir, penetrar, crecer y migrar en sus nervios aledaños. Este proceso es una característica patológica emergente de algunos tipos de cáncer y se ha descrito como una importante vía para la diseminación metastásica, diferente a la metástasis linfática y vascular. Los tipos de cáncer con mayor frecuencia de IPN son los de páncreas, colon, recto, próstata, cabeza, cuello, tracto biliar y estómago. En la mayoría de los casos, la IPN es un indicador de mal pronóstico y poca supervivencia [58].

Para que se lleve a cabo la IPN, las señales e interacciones recíprocas entre las células tumorales, los nervios y las células del estroma son de suma importancia. En estudios que toman como modelo el adenocarcinoma de próstata se ha demostrado que las células tumorales son capaces de generar señales como el factor de crecimiento nervioso, las cuales estimulan y guían el crecimiento de axones [59]. Una vez que las fibras nerviosas entran en

contacto con los tumores, les proveen señales pro-invasivas que estimulan la proliferación y migración de las células tumorales a través de los nervios ya existentes [58, 60].

Se han detectado dos tipos distintos de fibras nerviosas infiltradas en los tumores: las fibras simpáticas adrenérgicas y las parasimpáticas colinérgicas. Las fibras simpáticas son las primeras en ser reclutadas por los tumores influyendo significativamente en la fases iniciales del desarrollo neoplásico, promoviendo la sobrevivencia de las células tumorales mediante la liberación de noradrenalina y la activación de los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  y  $\beta_3$  presentes en las células del estroma. En cambio, las fibras parasimpáticas colinérgicas son reclutadas en etapas más tardías del desarrollo tumoral y mediante la liberación de acetilcolina promueven la invasión, la migración y la metástasis activando al receptor muscarínico Chrm1 presente en las células del estroma (Fig. 7) [61].



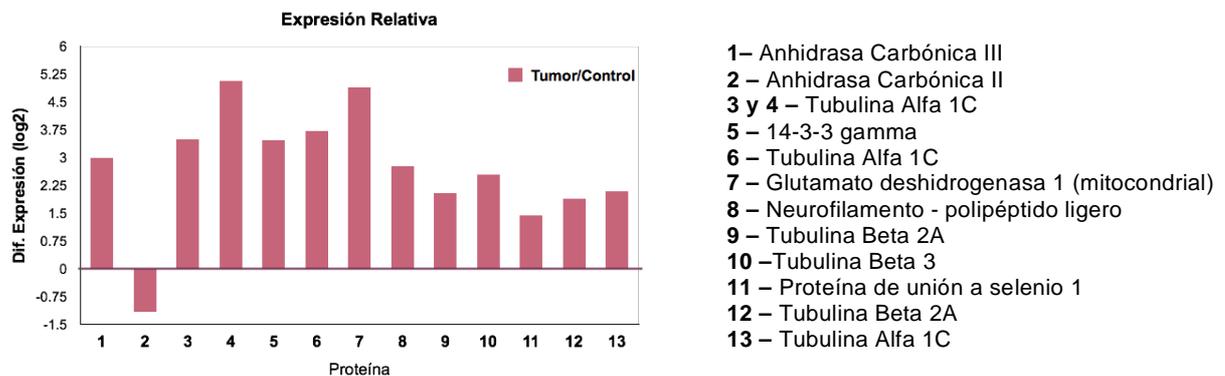
**Fig. 7.** Modelo de la infiltración de las fibras nerviosas y su participación en la iniciación y metástasis del cáncer de próstata. IPN=Invasión Perineuronal, SNS=Sistema Nervioso Simpático, NE=Noradrenalina, PNS=Sistema nervioso parasimpático, ACh=Acetilcolina. Modificada de Claire Magnon *et al.* 2013 [61].

### 3.2.3. Análisis proteómico cerebral en presencia de un tumor de cáncer cérvico uterino

En un trabajo previo realizado en el laboratorio, mediante análisis de proteomas cerebrales, se reportó por primera vez los cambios en la expresión de proteínas cerebrales debido a la presencia de tumores distantes generados con la línea celular de CaCu SiHa (30 días posteriores a su inoculación), en comparación con ratones controles no inoculados. En este trabajo se encontraron 68 identidades electroforéticas diferencialmente expresadas de las cuales se lograron identificar 13: 12 sobre expresadas y una sub expresada (Fig. 8). Además de que este trabajo permitió mostrar la evidencia de que la presencia de tumores distantes de SiHa son capaces de alterar de manera significativa los niveles de expresión en el cerebro, el análisis bibliográfico de las funciones reportadas para las proteínas identificadas y sus niveles expresión en el cerebro nos permitieron proponer que el tumor podría estar propiciando alteraciones posiblemente dañinas, así como la activación de mecanismos de protección para intentar atenuar y reparar estas alteraciones [62].

En el análisis antes mencionado, se analizaron los cerebros de tiempo 30 días del desarrollo del tumor debido a que en el laboratorio ya se había establecido un rango de tiempo (30 a 50 días) como modelo para el estudio de la dinámica del desarrollo tumoral de CaCu, tomando muestreos de los tumores a los 30, 45 y 50 días post-inoculación de las células SiHa ya que

dentro de estos tiempos muestreados los tumores presentan sus mayores cambios en cuanto a volumen (Fig. Supl. 1). Asimismo, utilizando este modelo se hizo un análisis proteómico para identificar las proteínas diferencialmente expresadas en los tumores durante su desarrollo, obteniendo como resultado que había cambios dependientes de los tres tiempos de muestreo tumoral mencionados anteriormente, lo cual sugiere que los cambios en la expresión proteica en el cerebro debido a la presencia de tumores también podrían variar y ser dependiente del desarrollo tumoral [63].



**Fig. 8.** Gráfica donde se observan los niveles de expresión de las proteínas identificadas previamente en el laboratorio como diferencialmente expresadas en cerebros de ratones con tumores de 30 días de crecimiento generados a partir de células de cáncer cérvico uterino humano (SiHa). El nivel de expresión de las proteínas de cerebros de ratones es relativo a los niveles de expresión de las proteínas de los cerebros de ratones controles [64].

### 3.3. Proteómica – Cáncer y cerebro.

En los sistemas biológicos, las proteínas tienen un papel predominante como moléculas biológicamente activas para la mayoría de las funciones celulares como el crecimiento, proliferación, apoptosis, senescencia y metabolismo, entre otros. El complemento proteico de una línea celular, tejido u organismo constituye el proteoma y su característica principal es que es dinámico, difiriendo de un tipo celular a otro o incluso dentro de una misma célula dependiendo de las condiciones o etapas del desarrollo en las que ésta se encuentre [64]. La herramienta tecnológica que permite hacer estudios a gran escala, globales e integrativos del proteoma se denomina proteómica. Dentro de la proteómica, se pueden analizar a las proteínas desde varios enfoques, por ejemplo, la anotación del genoma, la caracterización de las funciones, la cuantificación de la expresión, la caracterización de modificaciones post-traduccionales, la localización y compartimentalización de las proteínas y el análisis de las interacciones-proteína, entre otras [65]. El reto y objetivo principal de la proteómica en el estudio del cáncer es la caracterización del onco-proteoma para su aplicación a nuevos enfoques de diagnóstico y tratamientos [66].

Aproximadamente, entre el 30 y el 50% de los genes en mamíferos se expresan en el sistema nervioso. Los distintos patrones de expresión diferencial de genes son necesarios para la generación de la gran variedad de fenotipos neuronales. Es por esto que el análisis proteómico del sistema nervioso en condiciones normales, en desórdenes neurológicos o enfermedades que lo afecten, son muy útiles para el entendimiento de la función y papel que desempeña este sistema, así como para la búsqueda de marcadores y blancos terapéuticos [67].

### 3.4. Modelos para el estudio del CaCu

El cáncer es uno de los principales causantes de muerte a nivel mundial, por lo que el uso de modelos experimentales es esencial para entender la patofisiología molecular del cáncer, así como para desarrollar enfoques para el descubrimiento, desarrollo y aplicación de nuevas terapias.

#### 3.4.1. Líneas celulares

Un modelo crucial para el estudio del cáncer son las líneas celulares derivadas de tumores humanos [68]. Éstas aportan un modelo *in vitro* del sistema y presentan ciertas ventajas como son morfología y genética muy similar, así como facilidad de manipulación, cultivo y manutención. Otra gran ventaja es su capacidad de generar tumores en modelos de ratón inmunodeficientes, simulando las condiciones de los tumores humanos [69].

Una línea celular modelo de cáncer cérvico uterino proveniente de humano que presenta la propiedad de generar tumores, es SiHa [70]. Ésta proviene de un carcinoma escamoso (Estadio II) del cérvix de una mujer de origen asiático de 55 años de edad. Se ha reportado que tiene integrado en su genoma el genoma del virus del papiloma humano 16 (HPV-16) y que éste es capaz de expresarse [71].

#### 3.4.2. Ratón atímico nu/nu

Uno de los ratones más usados en el estudio del cáncer es el ratón atímico desnudo *nu/nu* llamado así debido a la presencia de dos copias defectuosas del gene *nu* (*Foxn1<sup>nu</sup>*) en el cromosoma 11. Esta mutación no permite el desarrollo normal del timo, lo que imposibilita la correcta formación y maduración de linfocitos T, lo cual afecta la respuesta celular dependiente de linfocitos T y la respuesta humoral dependiente de linfocitos B, ya que los linfocitos T participan en la activación de los linfocitos B. Aunque la respuesta inmune en este tipo de ratones está comprometida, no implica que sea nula, ya que se ha visto que presentan células NK (*Natural Killer*), células LAK (*Lymphotoikine-Activated Killer*), macrófagos y linfocitos B [72]. Las características descritas anteriormente hacen de estos ratones un excelente modelo para el estudio de tejidos cancerosos trasplantados o la inoculación con células formadoras de tumor ya que al carecer de células T CD4+ y CD8+ son incapaces de rechazar tejidos foráneos. Además presentan un bajo potencial de metástasis para la mayoría de los xenotransplantes [73].

#### **4. Justificación**

El CaCu es un problema de salud pública en México y en países en vías de desarrollo por lo que los estudios globales que se enfoquen en analizarlo son de suma relevancia. A pesar de que es evidente que todo el organismo juega un papel importante en el desarrollo del cáncer, son pocos los estudios que se enfocan en analizar los efectos del tumor sobre órganos distantes, así como de la acción contraria. Basándonos en lo anterior, este proyecto se centra en estudiar los efectos del desarrollo de un tumor de CaCu en el tejido cerebral.

#### **5. Hipótesis**

Los cambios de expresión proteica en el tejido cerebral de ratones con tumores distantes presentan una dinámica de expresión dependiente del desarrollo tumoral.

#### **6. Objetivo General**

Determinar los patrones y cambios de expresión proteica de cerebros de ratones durante el desarrollo de tumores generados a partir de una línea celular de CaCu

#### **7. Objetivos Particulares**

- Analizar la expresión proteica diferencial de tejido cerebral de ratones con tumores generados a partir de la inoculación de la línea celular SiHa (HPV16) a 3 tiempos (30, 45, 50 días).
- Identificar las proteínas diferencialmente expresadas.
- Validar la expresión de proteínas identificadas de mayor interés.
- Conocer la cinética de expresión a tiempos tempranos de las proteínas validadas.
- Determinar si las proteínas identificadas y validadas en los cerebros de ratones con tumores generados a partir de la línea celular de CaCu SiHa presentan los mismos cambios de expresión en cerebros de ratones con tumores lejanos generados a partir de otras líneas celulares de cáncer humano.
- Determinar si las proteínas identificadas y validadas en los cerebros de ratones con tumores generados a partir de la línea celular de CaCu SiHa presentan los mismos cambios en cerebros de ratones con tumores provenientes de una línea celular de melanoma murino.

## **8. Materiales y métodos**

### **8.1 Cultivo Celular.**

Las líneas celulares SiHa (HPV16), HeLa (HPV18), MDA, COLO205 y B16/BL6 se cultivaron en medio Advanced RPMI 1640 (Gibco®) suplementado con Antibiótico-Antimicótico (1X) y L-Glutamina (1%) en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Nunclon, Dinamarca) bajo una atmósfera constante de 5% de CO<sub>2</sub>, a temperatura de 37°C y un ambiente saturado de humedad.

### **8.2 Generación Tumores (RPMI)**

Se utilizaron como modelos 41 ratones hembras atímicas de la cepa *Foxn1nu-/- Foxn1nu-* de entre 6 y 10 semanas de edad provenientes del bioterio del Instituto de Biotecnología (IBt). Se cosecharon las células SiHa, HeLa y COLO205 en su fase estacionaria a una confluencia aproximada de 80-90%. Para la generación del tumor, cada ratón se inoculó subcutáneamente en la parte trasera derecha con un número aproximado de  $1 \times 10^7$  células resuspendidas en 1 mL de medio Advanced RPMI 1640 (Gibco®). Una vez inoculados los ratones, el tumor subcutáneo generado en cada ratón que fue inoculado con la línea celular SiHa, así como sus cerebros se colectaron en seis fases de crecimiento: 5, 15, 25, 30, 45 y 50 días; el tumor subcutáneo generado en cada ratón que fue inoculado con la línea celular HeLa, así como sus cerebros se colectaron en tres fases: 30, 45 y 50 días y el tumor subcutáneo generado en cada ratón que fue inoculado con la línea celular COLO205, así como sus cerebros se colectaron a los 19 días. El sacrificio de los ratones fue mediante decapitación y congelamiento inmediato de la cabeza con nitrógeno líquido para su almacenamiento y posterior extracción del cerebro. Un grupo de ratones control fue inoculado con 1 mL de medio Advanced RPMI 1640 (Gibco®), mientras que otro grupo de ratones control no pasó por ningún procedimiento. Ambos grupos controles fueron sacrificados con el mismo método y a la misma edad que los ratones inoculados con células. Para cada tiempo de colecta (tumores y controles) mencionado anteriormente se tomaron 3 distintos ratones para la generación de triplicados experimentales. El volumen tumoral fue calculado utilizando la fórmula  $V = (\pi / (6 \times L \times W \times H))$  descrita por Mary M. Tomayko y Patrick Reynolds [74]. Los experimentos con animales fueron realizados bajo la autorización del comité de Bioética del IBt (Clave: 08-31)

### **8.3 Generación Tumores (PBS)**

Para las líneas celulares SiHa, COLO205 y MDA se utilizaron como modelos 41 ratones hembra atímicas de la cepa *Foxn1nu-/- Foxn1nu-* de entre 6 y 10 semanas de edad provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Para la línea celular B16/BL6 se usaron 6 hembras de la cepa C57BL/6 de entre 6 y 10 semanas de edad provenientes del Bioterio del IBt. Para la generación de tumores se cosecharon las células SiHa, COLO205, MDA y B16/BL6 en su fase estacionaria a una confluencia aproximada de 80-90%. Cada ratón se inoculó subcutáneamente en la parte trasera derecha con un número aproximado de  $1 \times 10^7$  células suspendidas en PBS. Una vez inoculados los ratones, el tumor subcutáneo generado en cada ratón que fue inoculado con la línea celular SiHa, así como sus cerebros se colectaron a los 5, 15, 25, 30, 45 y 50 días; el tumor subcutáneo generado en cada ratón que fue inoculado con la línea celular COLO205, así

como sus cerebros se cosecharon al los 15 días, mientras que los de B16/BL6 a los 12 días y los de MDA a los 18 y 28 días. El sacrificio de los ratones fue mediante decapitación y congelamiento inmediato de la cabeza con nitrógeno líquido para su almacenamiento y posterior extracción del cerebro. Los ratones control fueron inoculados con 1mL de PBS y sacrificados con el mismo método y a la misma edad que los ratones con tumores. Para cada tiempo de colecta (tumores y controles) mencionado anteriormente se tomaron 3 distintos ratones para la generación de triplicados experimentales. El volumen tumoral fue calculado de igual manera que en la sección anterior [74]. Los experimentos con animales fueron realizados bajo la autorización del comité de Bioética del IBt (Clave: 08-31)

#### **8.4 Extracción de proteína**

Todas las muestras de cerebros de ratones con tumores generados a partir de la inoculación de las células con RPMI\*, así como los cerebros de ratones con tumores de los tiempos 30, 45 y 50 días generados mediante la inoculación de las células SiHa en PBS procesaron mediante extracción proteica fenólica (Metodología Suplementaria). Los cerebros restantes de los demás tumores generados mediante la inoculación de las células en PBS se les realizó una extracción proteica mediante el método de solubilización basado en SDS (Metodología Suplementaria) y se cuantificó mediante el método de Bradford.

#### **8.5 Electroforesis de doble dimensión**

Se utilizó el protocolo descrito por Encarnación *et al.* [75] (con modificaciones realizadas por Gabriel Bautista) para la elaboración de los geles de doble dimensión de los extractos de proteína cerebral. Se realizó un gel para cada muestra, cargando en todos la misma cantidad de proteína: 1mg. Para su visualización, se tiñeron con Coomassie coloidal y se escanearon en el densitómetro GS-800 (Bio-Rad, CA).

#### **8.6 Comparación de geles**

Para determinar los cambios de expresión de proteínas de los cerebros de ratones con tumores y sus controles, las imágenes digitalizadas de los geles procedentes de la electroforesis de dos dimensiones fueron analizadas y comparadas utilizando el Software PD-Quest 8.01 (Bio-Rad, CA). Primero se detectaron todas las identidades electroforéticas presentes en los geles 2D de cada cerebro, para luego comparar cada tiempo (30, 45 y 50 días) con su respectivo control. Una vez determinadas las identidades electroforéticas cambiantes para cada tiempo, se agruparon y compararon los cambios entre los tiempos para determinar las dinámicas de expresión durante el desarrollo tumoral.

#### **8.7 Análisis Estadístico – Geles 2D**

Para el análisis de expresión diferencial de los geles 2D, se utilizó primero el paquete estadístico de PDQuest, para obtener las identidades electroforéticas con una expresión diferencial de “ $\pm 1.5$  veces”. De las identidades electroforéticas obtenidas en este análisis, se tomaron las densidades ópticas de las réplicas para cada grupo (CRT y CRC). Debido a que los análisis del Software PDQuest no son muy robustos en cuanto a estadística, a las identidades electroforéticas obtenidas en el análisis de PDQuest se les aplicó una prueba

estadística empírica de Bayes (t – moderada) para determinar para en cada tiempo si los dos grupos (CRT, CRC) pertenecían a poblaciones distintas. La prueba estadística se llevó a cabo mediante un *script* del lenguaje de programación R, utilizando los paquetes *limma* y *metaMA*. El valor de corte que se tomó para determinar que la diferencia en nuestros grupos fuera estadísticamente significativa fue un p- value <0.05.

### **8.8 Identificación y análisis de proteínas por espectrometría de masas**

Las entidades electroforéticas de las proteínas seleccionadas mediante el análisis de comparación se recortaron de los geles de dos dimensiones, se procesaron y se identificaron mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF y ESI y ESI/QUAD/TOF) con modificaciones realizadas por Andrés Andrade y Jeovannis Gil al método descrito por Encarnación *et al.* [23] (Metodología Suplementaria). Las listas de los espectros de masas se analizaron con el software MASCOT usando la base de datos de UniProt.

### **8.9 Western Blots**

Los extractos totales fueron separados en geles 1D-SDS-PAGE al 12% (metodología suplementaria), y transferidos a membranas PVDF de 45um (Millipore®). Se hicieron ensayos de Western Blot con los anticuerpos anti-enolasa no neuronal (Abcam®, ab54979), anti-tubulina beta III específica de neuronas (Neuronal marker, Abcam®, ab18207), anti-glioxalasa 1 (Abcam®, ab171121), anti-CPLX1 (Abcam®, ab102761) y anti proteosoma alfa 6 (Abcam®, ab109377). Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano para su revelado con carbazol (Metodología Suplementaria). Las membranas reveladas fueron escaneadas en el densitómetro GS-800 (Bio-Rad®) y analizadas mediante Quantity One (BioRad®) e ImageJ. Los niveles de expresión de las proteínas fueron normalizados con los valores de expresión de la proteína de control de carga: alfa enolasa.

### **8.10 Análisis Estadístico – WB**

Para el análisis de expresión diferencial en los WB, se determinó la densidad óptica de las bandas mediante ImageJ y se utilizó el mismo script de R utilizado para los geles 2D, aplicando la prueba estadística empírica de Bayes (t – moderada) para determinar en cada tiempo si los dos grupos (CRT, CRC) pertenecían a poblaciones distintas. El valor de corte que se tomó para determinar que la diferencia en nuestros grupos fuera estadísticamente significativa fue un p- value <0.05.

## 9. Resultados

Estudios realizados previamente en el laboratorio indicaron que existían cambios en la expresión proteica de cerebros de ratones con tumores distantes de 30 días generados a partir de la línea celular de cáncer cérvico uterino SiHa [65]. Para identificar los cambios dependientes del desarrollo tumoral, se analizó el proteoma cerebral a los tiempos 30, 45 y 50 días posteriores a la generación de tumores de SiHa. Se eligieron estos tres tiempos de acuerdo a estudios realizados anteriormente, donde se implementó este modelo para el estudio del desarrollo del CaCu ya que en este rango de tiempo del desarrollo tumoral los tumores mostraban más diferencias en cuanto a tamaño y características físicas (Fig. Supl. 1), así como en sus perfiles de expresión proteica [63].

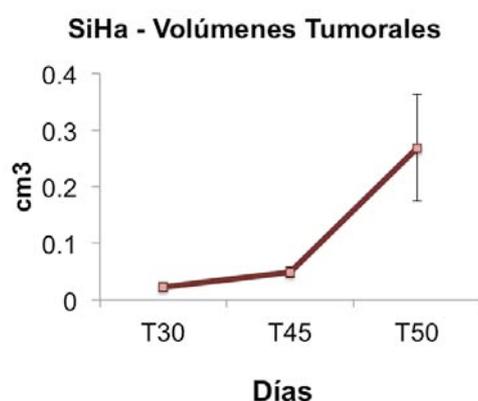
### 9.1 Análisis de Cerebros Grupo 1 – RPMI

#### 9.1.1 Generación de tumores de SiHa y colecta de cerebros

Se tomaron 9 ratones hembras, a las cuales se les generó un tumor subcutáneo mediante la inoculación de células SiHa (HPV16<sup>+</sup>) resuspendidas en 1mL de medio de cultivo RPMI\* (Gibco® Advanced RPMI 1640). Para cada tiempo muestreado se tomaron 3 réplicas experimentales, recolectando los tumores y los cerebros de los ratones a los 30, 45 y 50 días post-inoculación (Tabla 1, Fig. 1).

**Tabla 1.** Volúmenes de las réplicas de tumores generados a partir de células SiHa.

Línea celular SiHa		
Tiempo	Tumor	Volumen (cm <sup>3</sup> )
30 días	1	0.02094
	2	0.03141
	3	0.01570
45 días	1	0.03828
	2	0.05235
	3	0.05497
50 días	1	0.31101
	2	0.33379
	3	0.16022



**Fig. 1.** Cinética de crecimiento tumoral de SiHa. En ella se observa un aumento en el tamaño de los tumores conforme aumenta el tiempo, siendo este cambio más pronunciado a los 50 días.

#### 9.1.2 Análisis comparativos de los geles 2D de los cerebros de ratones con tumores de SiHa

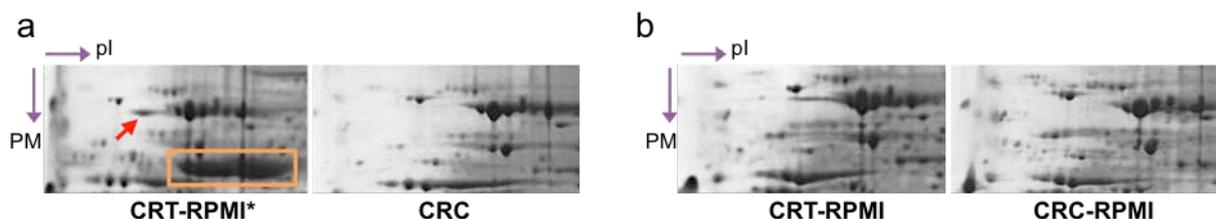
A diferencia del trabajo realizado anteriormente en el laboratorio [62], en este análisis se implementaron como controles cerebros de ratones inyectados con 1mL del vehículo utilizado para la inoculación de células en los ratones (medio de cultivo RPMI\*). Al igual que para los ratones con tumores (CRT-RPMI\*), se tomaron 9 ratones controles (CRC-RPMI\*), colectando los cerebros a los 30, 45 y 50 días post-inyección.

Durante el desarrollo de los tumores, los ratones fueron revisados semanalmente. No se observaron cambios notorios en cuanto a la cantidad de alimento y agua consumidos o al peso y tamaño de los ratones de tumores en comparación de los ratones controles sin tumores.

Cabe destacar que para estas observaciones no se hizo una medición exacta, por lo que son necesarios futuros análisis para determinen si existen o no cambios significativos en cuanto a la alimentación de los ratones en presencia de tumores subcutáneos.

Se tomaron los cerebros completos para llevar a cabo una extracción proteica mediante el método de extracción fenólica (Metodología Suplementaria). Posteriormente se analizaron los perfiles proteómicos de todas las muestras mediante la elaboración y comparación de geles de doble dimensión (2D) (Fig. Supl. 2).

En el trabajo del laboratorio previamente mencionado, se utilizó el mismo protocolo experimental y el mismo modelo de ratón y de línea celular, analizando también mediante geles 2D los cerebros de ratones con tumores de SiHa de 30 días. Para determinar si los geles 2D de los cerebros de ratones muestreados para la dinámica (30, 45 y 50 días) mostraban semejanzas con los geles ya reportados, se compararon los geles 2D de los cerebros de ratones con tumores de SiHa de 30 días realizados para este proyecto con los geles 2D previos antes mencionados. La comparación mostró que los perfiles proteómicos de las nuevas muestras (Fig. 2b) diferían de las muestras previas, mostrando un patrón de expresión proteica diferente (Fig. 2a): no se encontró la sobreexpresión de un grupo de proteínas previamente identificadas y definidas como sobre expresadas. Dentro de este grupo se encontraban varias subunidades de la familia de las tubulinas (rectángulo naranja en Fig. 2a) y el neurofilamento de péptido ligero (NFL) (flecha roja en Fig. 2a) [62].

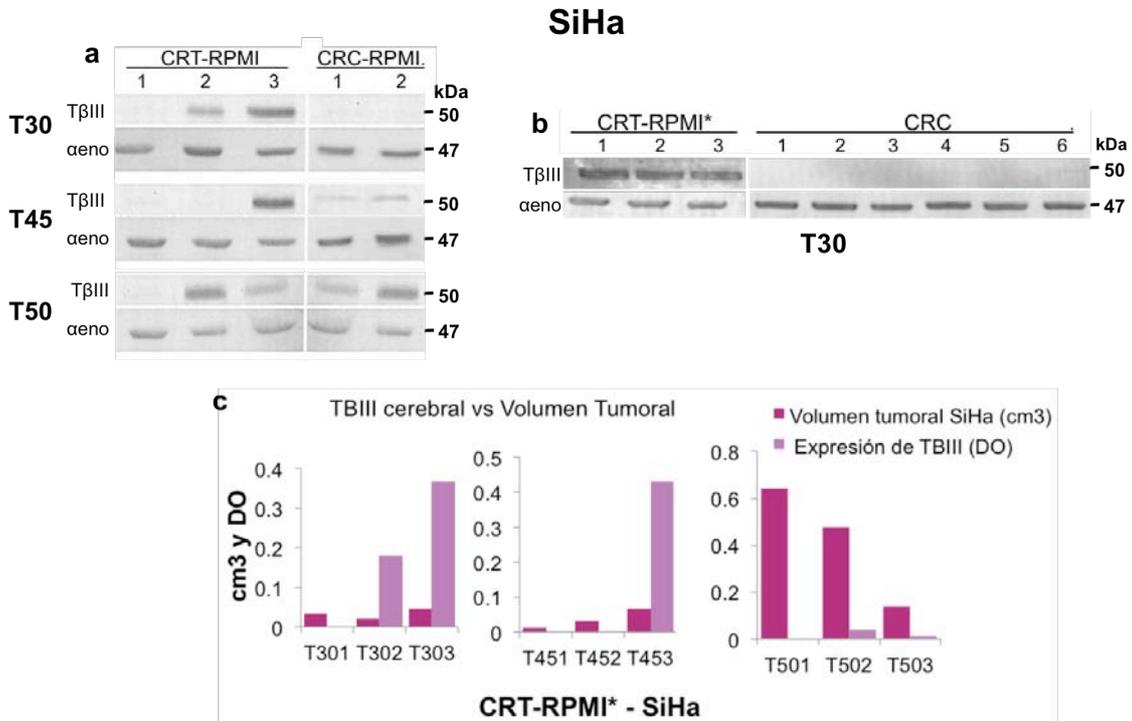


**Fig. 2.** Comparación de los cambios de expresión de proteínas observados en geles 2D de cerebros de ratones con tumor y ratones control de dos distintos estudios. a – Muestras de CRT-RPMI\* de SiHa a 30 días de desarrollo tumoral y CRC de 30 días reportadas previamente [62]. b – Muestras de CRT-RPMI\* de SiHa 30 días y CRC-RPMI\* de 30 días de desarrollo tumoral, donde se observa la ausencia de la familia de las tubulinas (recuadro naranja) y de NFL (flecha roja) lecha verde. PM=Peso molecular. pl=Punto isoeléctrico. Para cada caso se muestra un gel representativo ( $n=3$ ).

### 9.1.3. Análisis comparativo de la expresión de la tubulina $\beta$ III en cerebros de ratones con tumores de SiHa y otras líneas celulares inyectadas con RPMI\*

Dentro de la familia de tubulinas reportadas como sobre expresadas en CRT de SiHa de 30 días se encontraba la tubulina  $\beta$  III ( $T\beta$ III). El estudio de esta proteína resultaba de amplio interés en el cerebro durante el desarrollo tumoral ya que su expresión es casi exclusiva de neuronas y presenta sus niveles máximos de expresión durante el desarrollo, disminuyendo drásticamente en cerebro adulto [76]. Asimismo, cambios en su expresión podrían indicar alteraciones graves en la células cerebrales [77]. A pesar de que las nuevas muestras de CRT-RPMI\* no presentaron estos cambios en los geles 2D, se analizó la expresión de la tubulina  $\beta$ III ( $T\beta$ III) mediante Western Blot (WB) para los tres tiempos y se comparó con las muestras de 30 días utilizadas en el análisis anterior del laboratorio [62] para determinar si, aunque no existía

evidencia en los geles 2D, se observaban incrementos en la expresión de esta proteína en las nuevas muestras de CRT-RPMI\*.



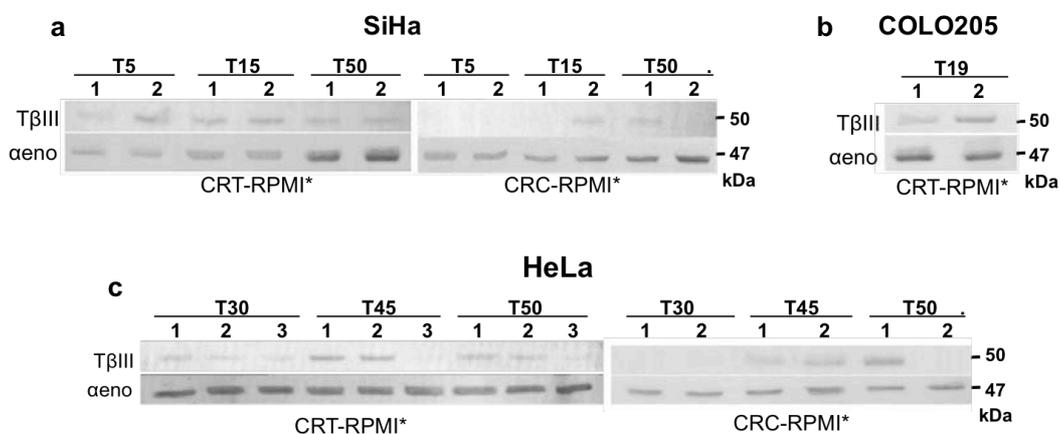
**Fig. 3.** WB de la dinámica de expresión de la tubulina βIII (TβIII) en cerebros CRT-PBS de SiHa. *a* – Muestras de CRT-RPMI\* y CRC-RPMI\* de tiempos 30, 45 y 50 días del desarrollo tumoral. *b* – Muestras de CRT-RPMI\* de SiHa y CRC de tiempo 30 días (muestras tomadas del análisis reportado anteriormente [62]). *c* – Nivel de expresión de TβIII de cada CRT-RPMI\* SiHa (rosa) comparado con el volumen de su respectivo tumor (lila). Se observa que la TβIII no se expresa en todos los CRT-PBS y presenta mayores niveles de expresión en CRT-RPMI\*, mientras que en los CRC sin inyección no hay expresión y en los CRC-RPMI\* inyectados con medio algunas muestras presentan expresión. Los niveles de expresión de la βIII fueron normalizados con la expresión de su respectivo control de carga: Alfa enolasa (αeno). DO=Densidad óptica.

El notable aumento en la expresión de la βIII (TβIII) en los CRT-RPMI\* de 30 días de las muestras anteriores concuerda con los cambios de expresión previamente reportados [62] (Fig. 3b). Sin embargo, en las muestras de los CRT-RPMI\* tomadas para el presente proyecto la TβIII presentó una expresión variable e independiente del tiempo y volumen tumoral (Fig 3 a y c). Sin embargo, el resultado más sobresaliente fue la detección de la TβIII en los CRC inyectados con RPMI\* en los cuales al igual que los CRT-RPMI\*, la expresión de la TβIII fue variable, presentándose solamente en algunas muestras cerebrales (Fig 3a). Esto sugiere alguna participación del RPMI\* presente en las inyecciones en la inducción de la expresión cerebral de la TβIII, ya que los CRC que no fueron inyectados no presentaron estas fluctuaciones de expresión (Fig. 3b)

El mismo comportamiento de expresión se detectó en un lote de muestras de cerebros de ratones previamente obtenidas en el laboratorio utilizando la misma metodología [62]. Los cerebros provenían de ratones a los cuales se les habían generado tumores de SiHa a tiempos más tempranos (5, 15 y 25 días) y sus respectivos controles inyectados con RPMI\* (Tabla Supl. 1, Fig. Supl. 3), así como CRT-RPMI\* de otras dos líneas celulares de cáncer humano: HeLa (CaCu) y COLO205 (cáncer de colón). Para el caso de los tumores de HeLa se

tomó la misma dinámica de crecimiento celular que SiHa, es decir tiempos 30, 45 y 50 días; mientras que para el caso de COLO205 se colectaron los tumores y cerebros a los 19 días debido a que tuvieron un rápido crecimiento y los tumores ya presentaban un volumen elevado, similar a los volúmenes de SiHa a los 50 días. (Tabla Supl. 2, Fig. Supl. 4)

Para los tiempos tempranos la T $\beta$ III estuvo presente en todas las muestras de CRT-RPMI\* y en dos de los CRC-RPMI\* (Fig. 4a). Para las muestras de los tumores de HeLa el comportamiento de la expresión de la T $\beta$ III fue el mismo que el observado en SiHa (Fig. 4c) ya que tampoco estuvo presente en todas las muestras (fue variable en aquellas que sí se observó) y no fue dependiente del tiempo o volumen tumoral (Fig. 4c). Para el caso de COLO205 ambas muestras presentaron expresión proteica (Fig. 4b).



**Fig. 4.** WB de la dinámica de expresión cerebral de la tubulina  $\beta$ III (T $\beta$ III) de CRT-RMPI\* con tumores de distintas líneas celulares. *a* – Muestras de CRT-RMPI\* y CRC-RMPI\* de SiHa a tiempos tempranos (5, 15 y 25 días). *b* – Muestras de CRT-RMPI\* de COLO205 de 19 días. *c* – Muestras de CRT-RMPI\* de HeLa de 30, 45 y 50 días y sus CRC-RMPI\*. Control de carga: Alfa enolasa ( $\alpha$ eno). Se observa que la T $\beta$ III presenta una expresión variable tanto en los CRT-RMPI\* como en sus CRC-RMPI\*.

Para eliminar la posible influencia del medio RPMI\* en la expresión proteica cerebral durante el desarrollo tumoral, se repitió la dinámica de los tumores de SiHa utilizando una distinta metodología en la cual para la inyección de las células y los controles se sustituyó el medio por una solución de amortiguador fosfato salino (PBS).

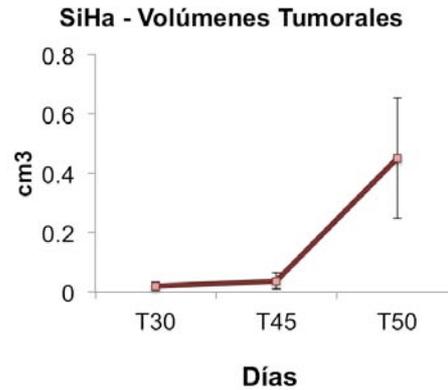
## 9.2 Análisis de Cerebros Grupo 2 – PBS

### 9.2.1 Generación de tumores de SiHa y colecta de cerebros

Se tomaron 9 ratones hembras, a las cuales se les generó un tumor subcutáneo mediante la inoculación de células SiHa (HPV16<sup>+</sup>) resuspendidas en 1mL de PBS y 9 ratones controles inyectados con 1mL de PBS. Para cada tiempo muestreado se tomaron 3 réplicas experimentales, recolectando los tumores y los cerebros de los ratones a los 30, 45 y 50 días post-inoculación (Tabla 2, Fig. 5). Para obtener el extracto total de proteína cerebral se tomó todo el cerebro y se utilizó el método de extracción fenólica (Métodos Suplementarios).

**Tabla 2.** Volúmenes de las réplicas de tumores generados a partir de células SiHa.

Línea celular SiHa		
Tiempo	Tumor	Volumen (cm <sup>3</sup> )
30 días	1	0.033510
	2	0.020943
	3	0.004712
45 días	1	0.012566
	2	0.031415
	3	0.066758
50 días	1	0.640884
	2	0.474642
	3	0.137444

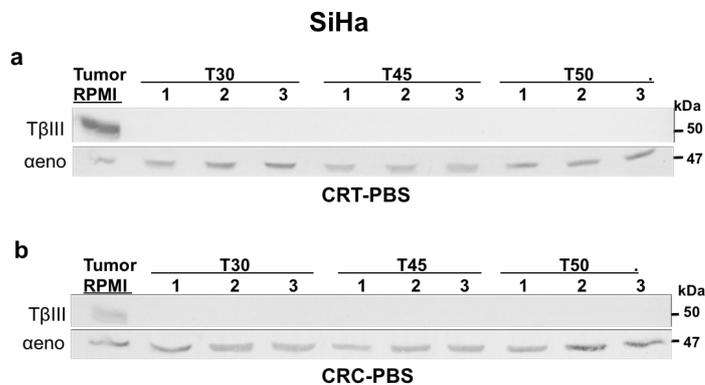


**Fig. 5.** Cinética de crecimiento tumoral de tumores de SiHa. a tiempos: 30, 45 y 50 días. Se observa un aumento significativo en el tamaño de los tumores del tiempo 45 al 50.

Al igual que con los ratones mencionados anteriormente, durante el desarrollo tumoral, los ratones fueron revisados semanalmente y no hubo cambios notorios en cuanto a la cantidad de alimento y agua consumidos o al peso y tamaño de los ratones de tumores en comparación de los ratones controles sin tumores.

### 9.2.2 Análisis de Expresión de la Tubulina $\beta$ III

Se analizó la expresión de la T $\beta$ III en los CRT-PBS y de sus respectivos CRC-PBS con el fin de determinar si, al igual que la inyección del medio RPMI\*, el PBS contribuía a la expresión de esta proteína en el cerebro.



**Fig. 6.** WB de la dinámica de expresión cerebral de T $\beta$ III y  $\alpha$ eno. *a* – Muestras CRT-PBS de SiHa de tiempos 30, 45 y 50 días. *b*- Muestras CRC-PBS inyectados con 1mL de PBS. Control de carga: Alfa enolasa ( $\alpha$ eno). Se muestra en el primer carril de cada figura una muestra de CRT-RPMI\* para indicar la presencia de T $\beta$ III. Los niveles de expresión fueron normalizados con la expresión del control de carga: Alfa enolasa ( $\alpha$ eno). En ellos se observa la ausencia de T $\beta$ III en todos los tiempos y para ambos grupos de ratones (tumor y control).

A diferencia de los CRT-RPMI\* y sus controles, en los CRT-PBS (Fig. 6a) y sus respectivos controles (Fig. 6b) no se detectó la expresión de T $\beta$ III, mostrando que la presencia de PBS no influye de la misma manera que el RPMI\* en la expresión proteica cerebral por lo que se descartaron los CRT-RPMI\* para los análisis posteriores.

### 9.2.3 Análisis de la expresión proteica diferencial del tejido cerebral durante el desarrollo de tumores de SiHa

Para identificar las proteínas diferencialmente expresadas, se utilizaron las muestras de CRT-PBS, las cuales se analizaron mediante la elaboración de geles de doble dimensión (2D) (Fig. Supl. 5) para su posterior comparación utilizando el programa PDQuest (BioRad).

La comparación de los CRT-PBS contra los CRC-PBS mostró 38 identidades electroforéticas (IE) diferencialmente expresadas ( $p.value < 0.05$ ). Todas estas IE tuvieron un perfil de sobre-expresión en los CRT-PBS con respecto a los CRC-PBS (Tabla. 3). No fueron detectadas proteínas subexpresadas en los CRT-PBS ni proteínas únicas para algún tiempo o condición (tumor/control).

**Tabla 3.** Perfiles de expresión de las identidades electroforéticas diferencialmente expresadas en CRT-PBS con respecto a los cerebros controles.

PROTEÍNAS SOBRE EXPRESADAS	
Sobre expresada en los tres tiempos (30, 45 y 50)	13
Sólo sobre expresadas en tiempo 50	9
Sólo sobre expresadas en tiempo 45	2
Sólo sobre expresadas en tiempo 30	3
Fluctuantes	11

#### 9.2.3.1 Identificación de las IE diferencialmente expresadas mediante espectrometría de masas

Utilizando la metodología MALDI-TOF y el software MASCOT se lograron identificar las proteínas de 14 identidades electroforéticas. Las IE que no pudieron ser identificadas mediante MALDI-TOF se analizaron mediante ESI y ESI/QUAD/TOF. Al ser estas metodologías más sensibles, permitieron identificar más de una proteína por IE, obteniendo 14 proteínas más, sumando un total de 28 proteínas identificadas (Tabla 4, Tabla Supl 3, Fig. Supl. 6-11).

**Tabla 4.** Proteínas diferencialmente expresadas clasificadas según su perfil de expresión. Las proteínas marcadas con \* indican identificación mediante ESI o ESI/QUAD/TOF.

<b>SE en tiempos 30, 45 y 50</b> Tubulin beta-2A chain* (TUBB2A) Tubulin beta-5 chain *(TUBB5) Complexin-1* (CPLX1) Small ubiquitin-related modifier 3* (SUMO3) Small ubiquitin-related modifier 2* (SUMO2) Complexin-1* (CPLX1) Protein DJ-1 (DJ1) Proteasome subunit beta type-4 (PSB4) Ras-related protein RRAS (RRAS) Ras-related protein RAB6A* (RAB6A) Apolipoprotein A-I* (APOA1) Prefoldin subunit 3* (PFD3) Proteasome subunit alpha type-6 (PSA6) Neurocalcin-delta (NCALD)	<b>SE en tiempo 30</b> ATP synthase subunit beta, mitochondrial (ATP5B) L-lactate dehydrogenase B chain (LDHB)
<b>SE en tiempo 50</b> Proteasome subunit alpha type-6 (PSA6) Neurocalcin-delta (NCALD)	<b>SE en tiempo 30 y 45</b> Tropomyosin alpha-1 chain (TPM1) Olfactory marker protein (OMP) Complexin-1* (CPLX1) Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 * (PEBP1) Complexin-2* (CPLX2) Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform (PPP2R1A) Transcription elongation factor A protein-like 5* (TCEAL5) 39S ribosomal protein L46* (MRPL46)
<b>SE en tiempo 45 y 50</b> Hippocalcin-like protein (HPCAL1)	<b>SE en tiempo 30 y 50</b> Visinin-like protein (VILIP1) Glyoxalase 1 (GLO1) Heme-binding protein (HEBP1)

### 9.2.3.2 Análisis de enriquecimiento las proteínas sobre-expresadas identificadas

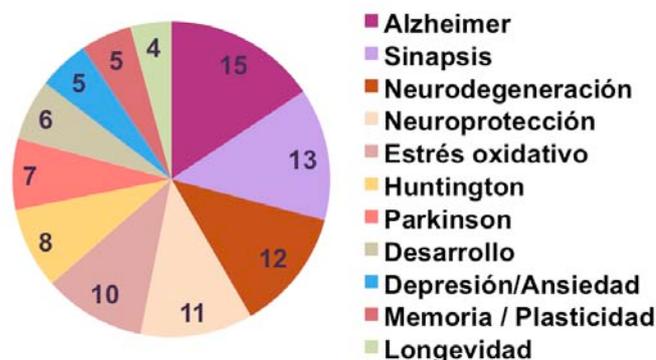
Las proteínas identificadas fueron agrupadas mediante un análisis de sobre representación de vías, procesos biológicos (Fig. 7a) y localización celular (Fig. 7b) utilizando GeneCodis [78-80] y ConcensusPathDB. (Tabla Supl. 4)



**Fig. 7.** Análisis de enriquecimiento de las proteínas cerebrales sobre expresadas. a – Sobre representación de vías metabólicas y procesos celulares ( $p$  value < 0.005). b – Localización celular. Imágenes modificadas de GeneCodis [78-80] y. Puede observarse en a que la vía metabólica más representada es la comunicación celular

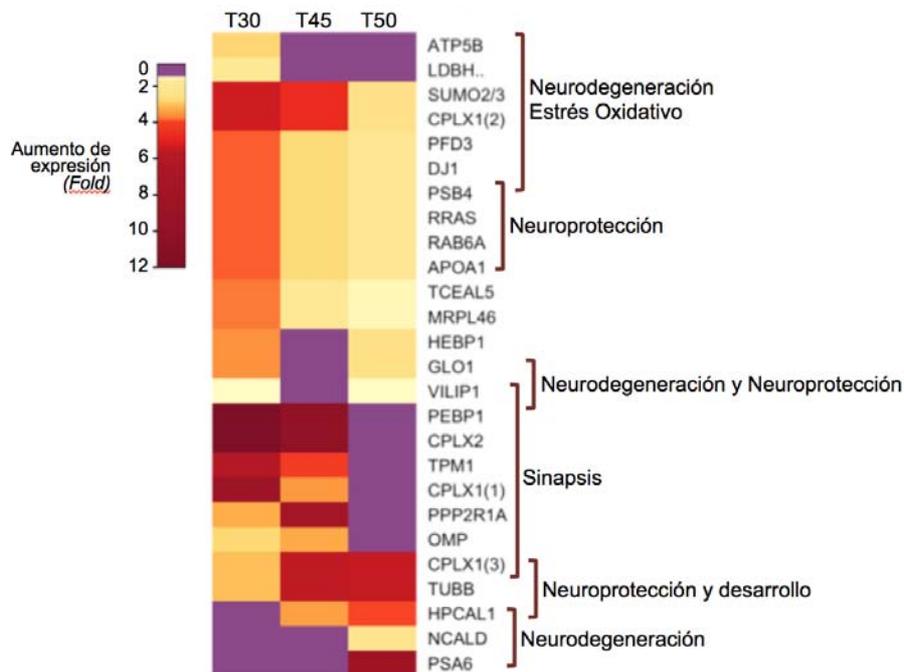
La clasificación obtenida fue muy general y muestra de primera instancia un enriquecimiento en procesos de comunicación y muerte celular (Fig. 7a), así como un número significativo de proteínas mitocondriales (Fig. 7b) Debido a que continuamente se reportan nuevas funciones para las proteínas que no son actualizadas de inmediato en las bases de datos aunada a la redundancia de los programas utilizados para hacer la sobre representación de vías y procesos, se realizó una búsqueda bibliográfica manual para hacer una clasificación de las proteínas identificadas, enfocada principalmente en sus funciones y relevancia en el sistema nervioso. (Tabla Supl. 5)

La nueva clasificación mostró que la mayoría de las proteínas han sido relacionadas con algunas enfermedades neurodegenerativas, en procesos de neurodegeneración, neuroprotección y en el proceso neuronal de sinapsis. (Fig. 8).



**Fig. 8.** Análisis de sobre representación de procesos celulares y enfermedades asociadas al sistema nervioso de las proteínas identificadas. El Alzheimer sobre sale como la enfermedad con más proteínas, mientras la sinapsis lo hace como el proceso celular.

El enriquecimiento de enfermedades neurodegenerativas sugiere que durante su desarrollo los tumores de SiHa podrían generar alteraciones en el cerebro que propicien daños o alteraciones que desencadenen en muerte celular y/o procesos neurodegenerativos. Por otra parte, el enriquecimiento de procesos de neuroprotección sugiere que el cerebro intenta contrarrestar los daños activando mecanismos de protección. Para determinar el comportamiento de las proteínas y sus procesos asociados conforme al tiempo del desarrollo tumoral, se hizo un análisis de *clustering* mediante la elaboración de un *heatmap* tomando los cambios de expresión de cada proteína en los tiempos 30, 45 y 50 días (Fig. 9).



**Fig. 9.** *Heatmap* que muestra los distintos niveles de sobre-expresión (>1.5 fold) de las proteínas identificadas en los CRT-PBS con tumores de SiHa durante el desarrollo del tumor (30, 45 y 50 días) y los *clusters* de los procesos asociados a las proteínas. Los colores amarillos indican los aumentos de expresión más bajos mientras que los colores rojos indican los aumentos de expresión más altos. El color morado indica que la proteína no tuvo aumento de expresión en ese tiempo.

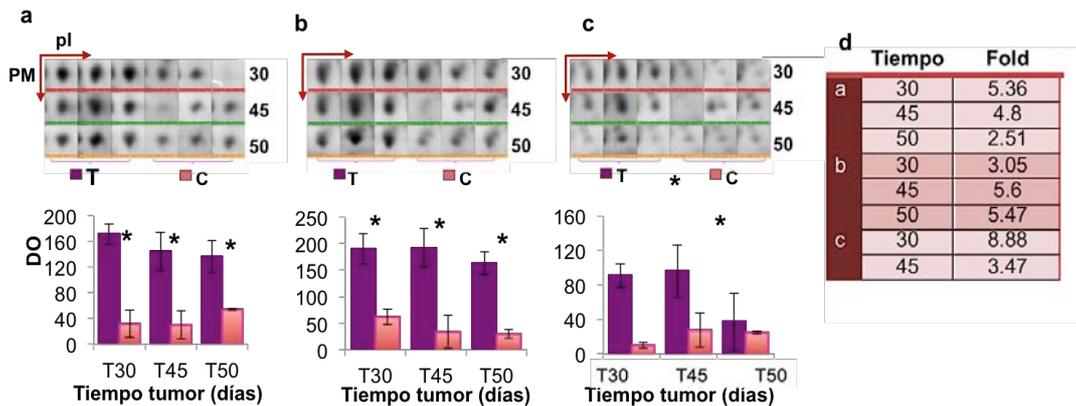
En el *heatmap* se puede observar que la mayoría de las proteínas asociadas a neurodegeneración y estrés oxidativo presentan mayor expresión en el tiempo más temprano (30 días) y van disminuyendo, presentando niveles más bajos de expresión en los otros dos tiempos (45 y 50 días). El mismo comportamiento se observó para las proteínas asociadas a neuroprotección. Por otra parte, las proteínas asociadas a sinapsis se agruparon en un *cluster* en el que las proteínas presentaban aumentos en el tiempo 30 y 45 días, pero no en el tiempo 50 días. Finalmente, las proteínas asociadas a desarrollo y protección mostraron su mayor nivel de expresión en el tiempo 50 días.

#### 9.2.4 Análisis de expresión de Complejina 1, Glioxalasa 1 y Proteosoma Subunidad del proteosoma alfa tipo 6

Para analizar y corroborar los niveles de sobre expresión de algunas proteínas de interés, se llevaron a cabo Western Blots para las siguientes proteínas: complejina1 (CPLX1), glioxalasa 1 (GLO1) y subunidad alfa tipo 6 del proteosoma (PSA6).

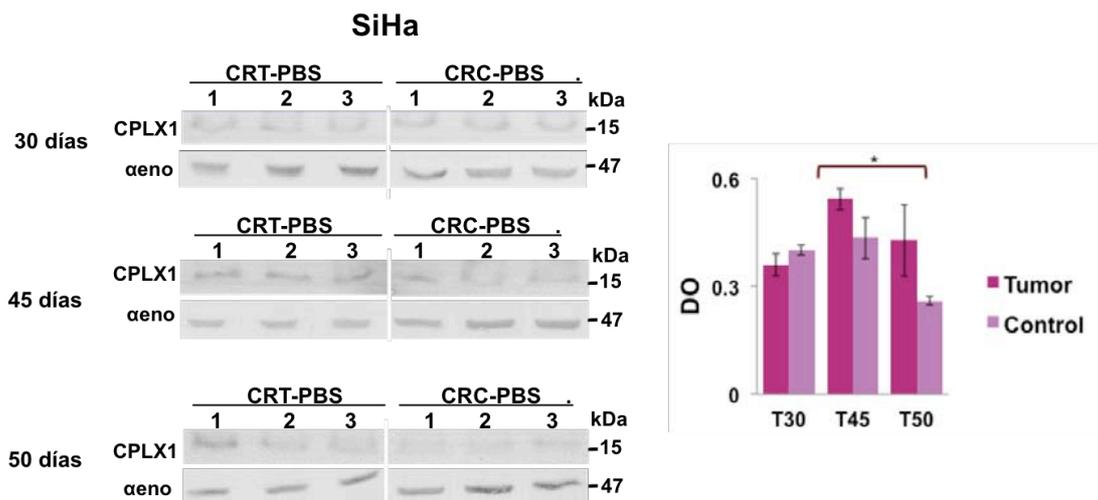
### 9.2.4.1 Complexina 1

Dentro de las proteínas sobre expresadas se identificaron 3 posibles isoformas de la CPLX1 con distintas dinámicas de expresión (Fig. 10). Uno de los papeles fundamentales de las complexinas en el tejido cerebral es la regulación de la transmisión sináptica controlando el ensamblaje y la estabilidad de los complejos proteico SNARE, los cuales tienen como función principal mediar la fusión vesicular, es decir, promover la fusión de vesículas con su membrana blanco [81]. Debido a la importancia de esta proteína en los procesos de sinapsis cerebral se analizó su expresión mediante Western Blot (WB).



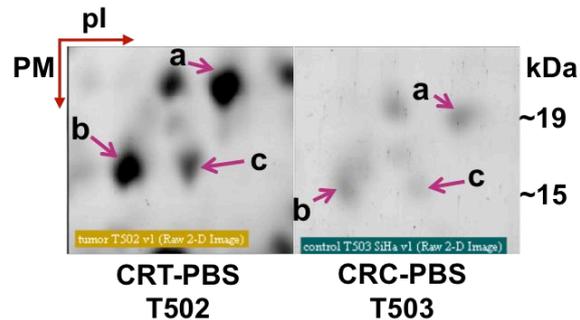
**Fig. 10.** Posibles isoformas de la CPLX1 (a-c) sobre expresadas en CRT-PBS de SiHa. Para cada isoforma se muestra su identidad electroforética en las tres réplicas de geles 2D de CRT-PBS (T-morado) de SiHa y CRC-PBS (C-Rosa), así como sus gráficas de expresión en los tres tiempos (30, 45 y 50 días). *d* – Niveles de sobre expresión de cada isoforma. Puede observarse tanto en las gráficas como en la tabla que cada isoforma presenta cambios de expresión distintas, estando dos sobre expresadas durante los tres tiempos (30, 45 y 50) y una solamente sobre expresada en los tiempos 30 y 45. \**p*.value <0.05. PM=Peso molecular. pl=Punto isoeléctrico. DO=Densidad Óptica.

A diferencia de lo observado en los geles de 2D (Fig. 10), el análisis de expresión de la Cplx1 mediante WB no mostró aumentos de expresión en las muestras de tiempo 30 días, presentando cambios en los tiempos tiempo 45 días (1.5 veces) y 50 días (1.65 veces)(Fig. 11).



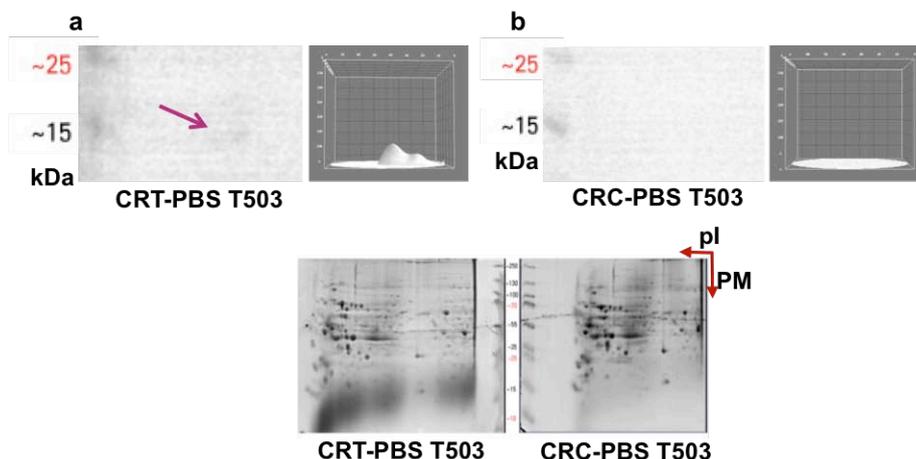
**Fig. 11.** WB de la dinámica de expresión cerebral de CPLX1. *a* – Expresión de CPLX1 en CRT-PBS con tumores de SiHa y CRC-PBS a tres tiempos (30, 45 y 50 días). *b* – Gráfica de los niveles de expresión de CPLX1 en CRT-PBS (rosa) contra CRC-PSB (lila), donde se observa una diferencia significativa de expresión en los tiempos 45 y 50 días. Los niveles de expresión fueron normalizados con la expresión del control de carga: Alfa enolasa ( $\alpha$ eno). \**p*.value <0.05.

En los CRT-PBS se identificaron 3 posibles isoformas de la complexina como sobre expresadas en los CRT-PBS. En el gel 2D se puede observar que dos de las isoformas identificadas contaban con en el mismo PM (~15)(Fig. 12 a y b), mientras que la isoforma restante presentó un PM mayor (~19)(Fig. 12 c). A pesar de la utilización de geles PAGE-1D con buffer de tricina para una mejor separación de proteínas de bajo peso molecular (CPLX1 ≈17 KDa) con el objetivo de detectar las distintas isoformas, en los WB solamente se distinguió una banda (Fig. 11), que sugiere que los niveles de expresión observados en ella podrían ser la combinación de las dos isoformas del mismo peso molecular o la detección de una sola isoforma.



**Fig. 12.** Sección del gel 2D donde se muestran las tres posibles isoformas (a-c) de CPLX1 y en CRT-PBS y CRC-PBS. En ellos se observa que en los CRT-PBS las tres isoformas presentan un notable aumento de expresión en comparación de los CRC-PBS. Se muestra una réplica representativa de CRT-PBS (T503) y una de CRC-PBS (T503). PM=Peso molecular. pI=Punto isoeléctrico.

Para determinar si el anticuerpo era capaz de identificar y distinguir las distintas isoformas, se realizó un WB contra la complexina en minigeles 2D: uno para una muestra representativa de CRT-PBS (T503) y otro para una de CRC-PBS (T503). El WB-2D presentó una señal de detección de la complexina muy baja en el CRT-PBS (Fig. 13a) y señal nula en el control (Fig 13b).

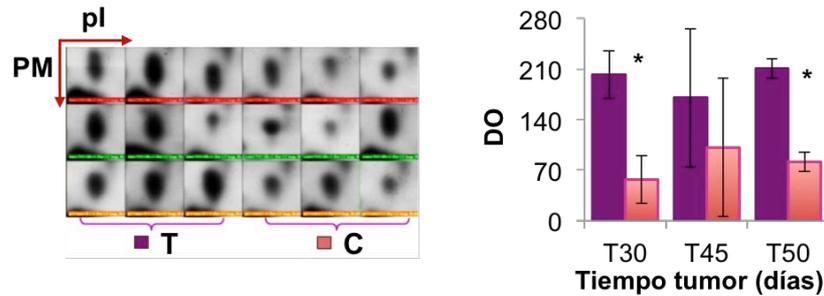


**Fig. 13 –** WB-2D de la expresión cerebral de CPLX1 en CRT-PBS de SiHa. *a* – CRT-PBS de SiHa (T503). Se observa que en los CRT-PBS hay una ligera expresión de CPLX1 y en los CRC-PBS no se detectó su presencia. *b* – CRC-PBS (T503). *c* – Minigeles 2D teñidos con Coomassie como control de carga. PM=Peso Molecular. pI=Punto isoeléctrico.

A pesar de la baja señal obtenida en los WB, el análisis mediante ImageJ de la membrana escaneada permitió distinguir dos puntos (Fig. 13a – recuadro gris), indicando que el anticuerpo es capaz de reconocer dos distintas identidades electroforéticas en el mismo rango de peso molecular (~15), por lo que los niveles de expresión detectados en el WB-1D (Fig. 11) podrían representar la suma de estas dos isoformas (Fig.12 b y c).

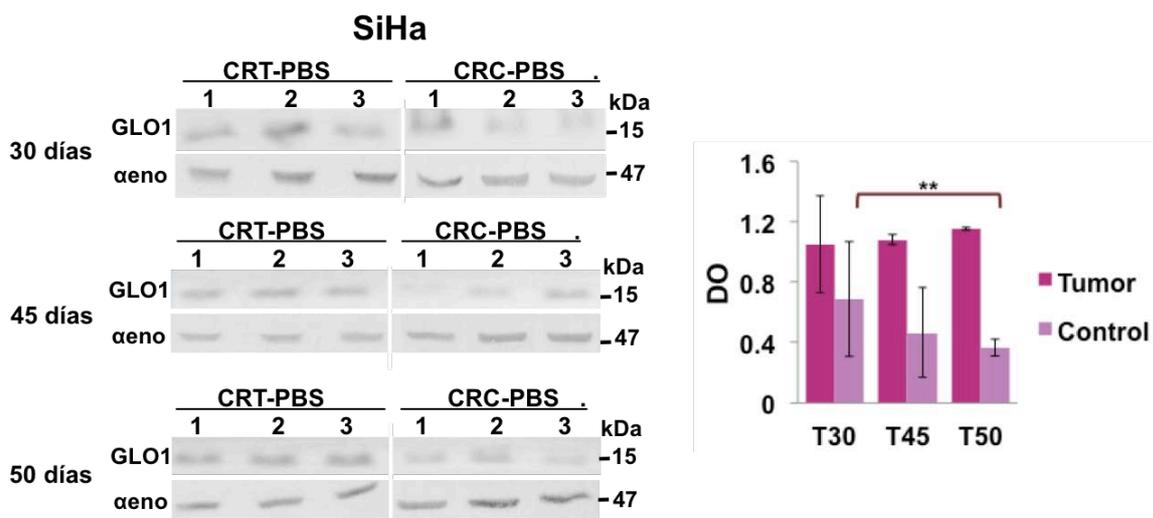
#### 9.2.4.2 Glioxalasa 1

En los CRT-PBS, la glioxalasa 1 (GLO1) se encontró sobre expresada en los cerebros de tiempos 30 y 50 días del desarrollo del tumor. (Fig. 14)

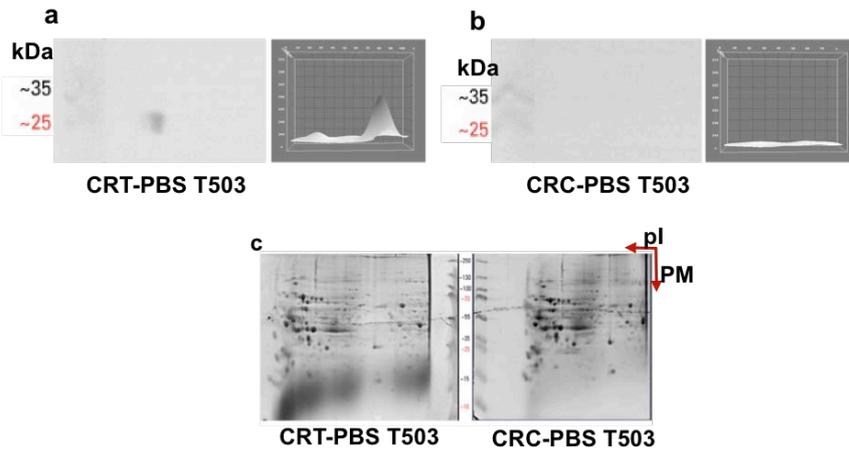


**Fig. 14.** Cambios de expresión de GLO1 en CRT-PBS de SiHa. Se muestra la identidad electroforética identificada como GLO1 en las tres réplicas de geles 2D de CRT-PBS (T-morado) de SiHa y CRC-PBS (C-Rosa), así como su gráfica de expresión en los tres tiempos (30, 45 y 50 días), donde se observa el aumento significativo de la expresión de GLO1 en los tiempos 30 y 45 días. \* p.value <0.05. PM=Peso molecular. pl=Punto isoeléctrico. DO=Densidad Óptica.

GLO1 tiene como función principal la de detoxificar los niveles citotóxicos de metilglioxal (MG) y glioxal (GX), los cuales son precursores de los productos de la glicación avanzada (AGE por sus siglas en inglés: advanced glycation end products) [82]. Al igual que el MG, los AGEs son elementos tóxicos para la célula y sus niveles elevados están asociados a estrés oxidativo y apoptosis [83]. El cerebro es el cuarto tejido con mayor expresión de GLO1 [84], indicando un papel fundamental de esta enzima en el SNC, por lo que se analizaron sus cambios de expresión mediante Western Blot (WB).



**Fig. 15.** WB de la dinámica de expresión cerebral de GLO1. a – Expresión de Glo1 en CRT-PBS con tumores de SiHa y CRC-PBS a tres tiempos (30, 45 y 50 días). b – Gráfica de los niveles de expresión de GLO1 en CRT-PBS (rosa) contra CRC-PSB (lila), donde se observa una diferencia significativa de expresión en los tiempos 45 y 50 días. Los niveles de expresión fueron normalizados con la expresión del control de carga: Alfa enolasa (αeno). \*p.value <0.05.

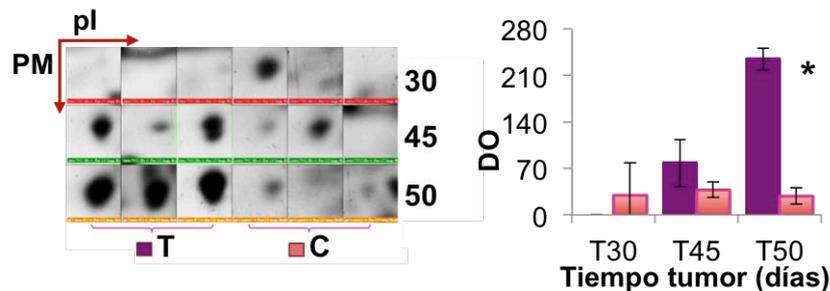


**Fig. 16.** WB-2D de la expresión cerebral de GLO1. *a* – CRT-PBS de SiHa (T503). *b* – CRC-PBS (T503). Se observa que en el CRC-PBS se detectó la expresión de GLO1, mientras que se en los CRT-PBS sí hubo expresión. *c* – Minigeles 2D teñidos con Coomassie como control de carga. PM=Peso Molecular. pI=Punto isoeléctrico.

En análisis mediante WB de la GLO1 mostró cambios estadísticamente significativos en los tiempos 45 (2.33 veces) y 50 días (3.13 veces) (Fig. 15 a y b) a diferencia de lo observado en los geles 2D, donde los cambios se dieron en el tiempo 30 (3.55 veces) y 50 (2.58 veces) (Fig. 14). A pesar de que una muestra control del análisis de 30 días mostró un alta expresión, en general, tanto en el WB (Fig. 15) como en el WB2D (Fig. 16) se puede observar una tendencia al aumento de expresión de GLO1 debido a la presencia de tumores.

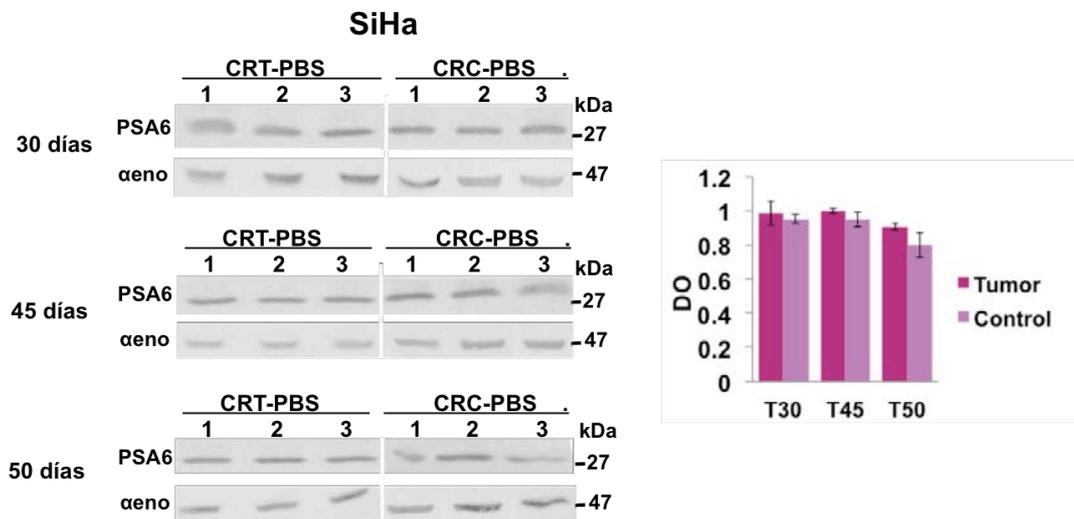
#### 9.2.4.3 Subunidad $\alpha$ -6 del proteosoma

El sistema ubiquitin-proteosoma (UPS) es una maquinaria catalítica encargada de la degradación de proteínas celulares, siendo esencial para controlar diversos procesos celulares básicos y la supervivencia celular [85]. En los CRT-PBS dos subunidades de esta maquinaria ( $\alpha$ 6 y  $\beta$ 4) presentaron cambios en su perfil de expresión, lo cual podría indicar alteraciones, ya sea en la regulación, estabilidad o actividad proteolítica del proteosoma. Debido a que la subunidad  $\alpha$ 6 (PSA6) solamente mostró sobre-expresión a los 50 días en los CRT-PBS (Fig. 17), se analizó su expresión mediante WB.



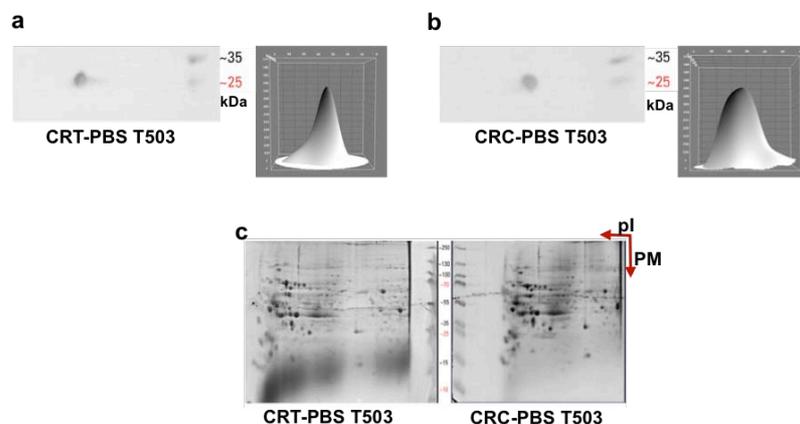
**Fig. 17.** Cambios de expresión de PSA6 en CRT-PBS de SiHa. Se muestra la identidad electroforética identificada como PSA6 en las tres réplicas de geles 2D de CRT-PBS (T-morado) de SiHa y CRC-PBS (C-Rosa), así como su gráfica de expresión en los tres tiempos (30, 45 y 50 días), donde se observa el aumento significativo de la expresión de PSA6 solamente en el tiempo 50 días. \* p.value <0.05. PM=Peso molecular. pI=Punto isoeléctrico. DO=Densidad Óptica.

El análisis mediante WB no reflejó la expresión observada en los geles 2D. Para todas las muestras la expresión fue constante y uniforme en los tres tiempos, tanto para los CRT-PBS como para los controles (Fig. 18).



**Fig. 18. a** – WB de la dinámica de expresión cerebral de PSA6. *a* – Expresión de PSA6 en CRT-PBS con tumores de SiHa y CRC-PBS a tres tiempos (30, 45 y 50 días). *b* – Gráfica de los niveles de expresión de PSA6 en CRT-PBS (rosa) contra CRC-PBS (lila), donde se observa que no hay diferencias significativas de expresión en ninguno de los tres tiempos. Los niveles de expresión fueron normalizados con la expresión del control de carga: Alfa enolasa (αeno). \*p.value <0.05.

El mismo comportamiento se observó en el WB de mini geles 2D, donde para ambas muestras se detectó la misma identidad electroforética con los mismos niveles de expresión (Fig. 19).



**Fig. 19.** WB-2D de la dinámica de expresión cerebral de PSA6. *a* – CRT-PBS de SiHa (T503). *b* – CRC-PBS (T503). En ambos se observan la presencia de PSA6 con los mismos niveles de expresión. *c* – Minigeles 2D teñidos con Coomassie como control de carga. PM=Peso Molecular. pI=Punto isoeléctrico.

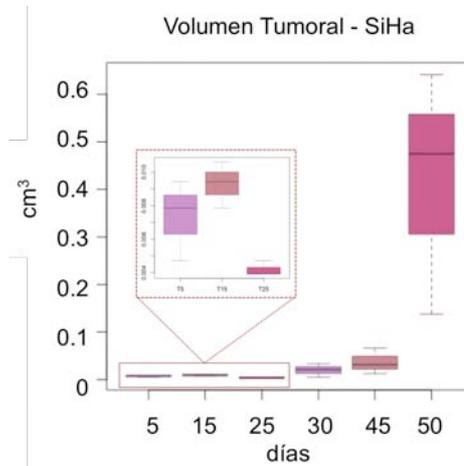
### 9.2.5 Análisis de CPLX1, GLO1 y PSA6 a tiempos más tempranos del desarrollo de tumores de SiHa (5, 15, 25 días)

Para determinar si GLO1, CPLX1 y PSA6 presentan cambios en expresión desde etapas más tempranas del desarrollo tumoral se generaron tumores a partir de la línea celular SiHa, mediante el método previamente descrito (PBS). Se colectaron los cerebros y los tumores a 5, 15 y 25 días post-inoculación, tomando para cada tiempo tres réplicas experimentales con sus respectivos controles (Tabla 5, Fig. 20).

Para estas muestras, se empleó un método distinto de extracción: en lugar de utilizar la extracción fenólica previamente utilizada para los tiempos 30, 45 y 50 días, se utilizó un amortiguador de extracción proteica base de SDS para la solubilización de las proteínas [86] (Metodología Suplementaria).

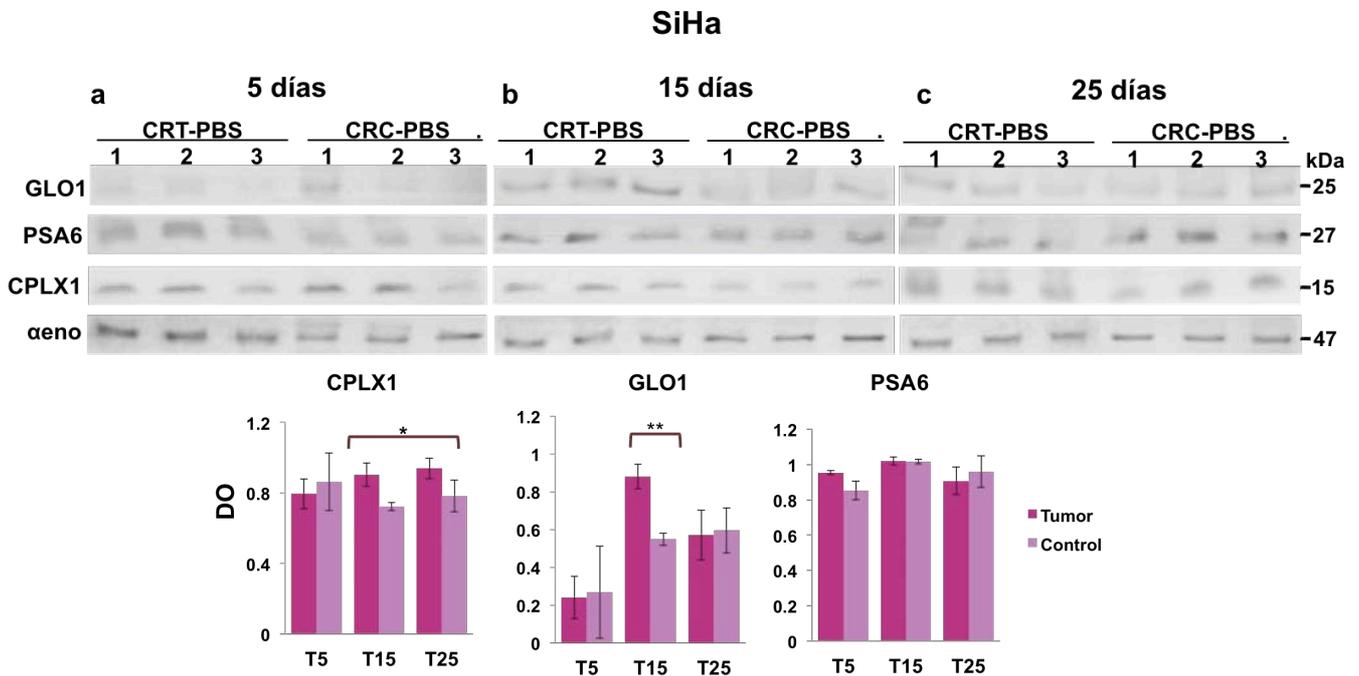
**Tabla 5.** Tiempos y volúmenes de los tumores generados a partir de la línea celular SiHa.

Línea celular SiHa		
Tiempo	Tumor	Volumen (cm <sup>3</sup> )
5 días	1	0.009424
	2	0.007853
	3	0.004712
15 días	1	0.009424
	2	0.007853
	3	0.010602
25 días	1	0.004712
	2	0.003926
	3	0.003926



**Fig. 20.** Cinética de crecimiento de tumores de SiHa donde se comparan los volúmenes de los tumores generados en tiempos tempranos (5, 15 y 25 días)(recuadro rosa) con los tiempos 30, 45 y 50 días.

Posteriormente, las muestras se analizaron mediante WB para determinar los niveles de expresión de GLO1, PSA6 y CPLX1.



**Fig. 21.** WB de la expresión cerebral de GLO1, PSA6, CPLX1 y αeno en CRT- CRT-PBS de SiHa y CRC-PBS. *a* – 5 días, *b* – 15 días y *c* – 25 días. *d* – Gráfica de los niveles de expresión de GLO1, PSA6, CPLX1 en CRT-PBS contra CRC-PSB, donde observan cambios de expresión en los tiempos 15 y 25 días para CPLX1, en el tiempo 15 días para GLO1 y ningún cambio no para la PSA6. Los niveles de expresión fueron normalizados con la expresión del control de carga: Alfa enolasa (αeno). \*p.value <0.05. Gráfica de los niveles de expresión para cada proteína. \*p.value<0.05. Control de carga: Alfa enolasa (αeno). DO=Densidad Óptica.

Al igual que para los tiempos más tardíos, la expresión de la PSA6 se mantuvo constante tanto para los CRT-PBS como para sus controles (Fig. 20). Por otra parte, GLO1 y Cpx11 presentaron cambios de expresión, aunque no fueron los mismos en los tres tiempos. Para GLO1 solamente los CRT-PBS de 15 días presentaron un aumento (1.6 veces)(Fig. 20b y d) mientras que para la CPLX1 tanto los CRT-PBS de tiempo 15 días (Fig. 20b y d)(1.5 veces) como de 25 días (Fig. 20c y d)(1.5 veces) mostraron ligeros aumentos.

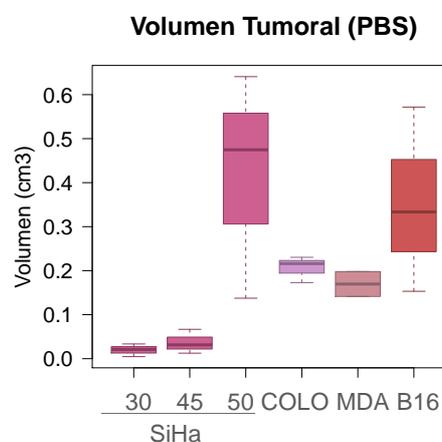
### 9.2.6 Análisis de CPLX1, GLO1 y PSA6 en cerebros de ratones con tumores con líneas celulares de otros tipos de cáncer: humanos (colon y mama) y de ratón (melanoma)

Con el objetivo de analizar si los cambios de CPLX1, GLO1 y PSA6 en los cerebros de ratones con tumores de SiHa pudieran ser una generalidad de la presencia de un tumor distante sin importar la línea celular de origen, se generaron tumores a partir de líneas celulares de cáncer humano de colon (COLO205) y mama (MDA). También se tomó como modelo de tumores no provenientes de células humanas una línea celular de melanoma de origen murino (B16/BL6). Estos últimos tumores fueron generados en ratones de la cepa C57BL/6. Todos los tumores se generaron mediante el método previamente descrito utilizando PBS.

La dinámica de crecimiento tumoral de estas tres líneas celulares fue distinta a la de los tumores de SiHa, presentando un crecimiento tumoral más rápido por lo cual, el criterio para el sacrificio de los ratones y la recolección de cerebros fueron los volúmenes tumorales, tomando como referencia los volúmenes tumorales de SiHa de 50 días (Tabla 6, Fig. 22).

**Tabla 6.** Tiempos y volúmenes de los tumores generados a partir de distintas líneas celulares de cáncer.

Línea Celular	Tiempo	Tumor	Volumen (cm <sup>3</sup> )
COLO205	15 días	1	0.17278
		2	0.23038
		3	0.21598
MDA	18 días	1	0.14137
	18 días	2	0.19792
	28 días	3	0.10053
B16/BL6	12 días	1	0.57176
		2	0.33353
		3	0.15315

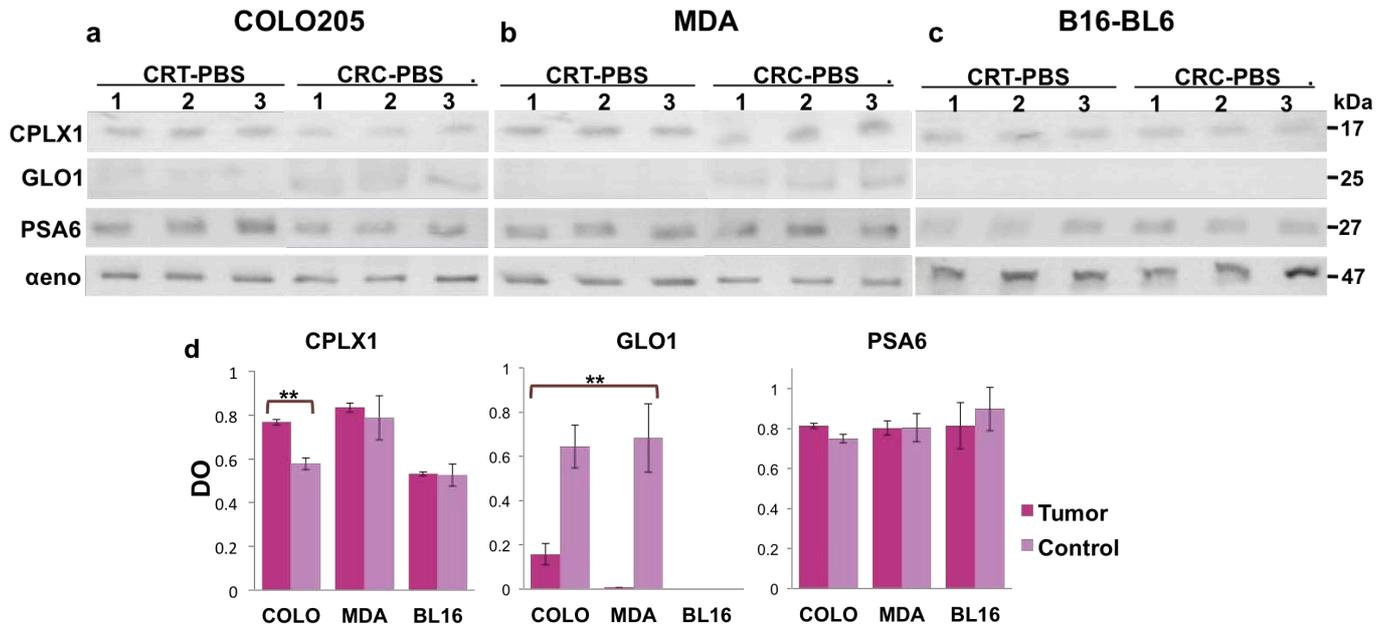


**Fig. 22.** Volúmenes de tumores generados a partir de COLO, MDA y BL16. Se muestra la cinética de crecimiento de los volúmenes generados a partir de SiHa de 30, 45 y 50 días.

Al igual que las muestras de tiempos tempranos, se utilizó la extracción de las proteínas con la amortiguador de SDS (Metodología Suplementaria) y se hizo un análisis de la expresión proteica CPLX1, PSA6 y GLO1 mediante WB.

Al igual que en los CRT-PBS de SiHa, la PSA6 no presentó cambios significativos en ninguno de los CRT-PBS de los tres distintos tipos de tumores. Por otra parte, Cpx11 sólo mostró aumento de expresión en los CRT-PBS de COLO205 (1.53 veces), mostrando los mismos

niveles para los tumores de MDA y BL16. En el caso de GLO1, contrario de lo observado en los CRT-PBS de SiHa, esta proteína mostró una disminución de expresión tanto para los tumores de COLO205 (-4.09 veces) como para los de MDA (-103.1 veces). Finalmente, en BL16 no se detectó expresión en ninguno de los cerebros (tumores y controles). Los resultados anteriores sugieren que los cambios en los cerebros con tumores distantes no son los mismos y dependen de la línea celular de cáncer (Fig. 23).



## **10. Discusión**

Los tumores al no ser tejidos normales, repercuten en la homeóstasis de todo el organismo mediante alteraciones a niveles moleculares. Análisis previos realizados en el laboratorio mostraron que existían cambios en la expresión proteica de cerebros de ratones con tumores distantes. Tomando en cuenta la evidencia anterior, en este trabajo se analizaron los cambios generados por tumores distantes en tejido cerebral de ratones durante varios tiempos del desarrollo tumoral, describiendo el comportamiento de las proteínas conforme al desarrollo de los tumores.

### **10.1 Influencia del medio RPMI\* en la expresión de proteínas cerebrales**

Para la descripción de los cambios en el cerebro durante el desarrollo tumoral, en el presente trabajo se utilizó el método experimental (generación de tumores, colecta de cerebros, extracción proteica y elaboración de geles 2D) previamente descrito en el laboratorio para el análisis de ratones con tumores de SiHa de 30 días de desarrollo, ampliando para el presente análisis tiempos de muestreo de tumores y cerebros (30, 45 y 50 días) y tomando como controles ratones inyectados con 1mL de RPMI\*. Al igual que para el proyecto anterior, los cerebros se analizaron mediante geles 2D. La comparación de los geles 2D previos con los desarrollados en este proyecto, mostró que los cambios de expresión previamente reportados no se compartían con el nuevo análisis. Una de las diferencias más notorias fue la ausencia de la sobre expresión de la T $\beta$ III previamente reportada. Al hacer el análisis de esta proteína en ambos grupos de muestras se observó que la expresión de la T $\beta$ III de las muestras previas concordaba con lo descrito, mientras que en las muestras del presente proyecto su expresión era variable y no se encontraba en todas ellas. Sin embargo, el resultado más sobresaliente fue el aumento de expresión de la tubulina T $\beta$ III en algunos cerebros controles inyectados con RPMI\* (Fig 3). La T $\beta$ III es una proteína fundamental en el desarrollo cerebral, presentando niveles de expresión bajos en el cerebro adulto. Lo anterior se pudo comprobar en los cerebros controles sin inyección en los cuales no se detectó la expresión de T $\beta$ III. Por lo tanto, su presencia no resulta normal en cerebros de ratones adultos con tumores ni en inyectados con RPMI\*.

El análisis de más muestras de cerebros de ratones que también fueron sometidos a tratamientos que involucraban la inyección de RPMI\* presentaron expresión de T $\beta$ III sugiere que los componentes de este medio tienen efectos en la expresión proteica del tejido (Fig. 4). El medio RPMI\* está constituido de una amplia variedad de compuestos (Tabla Supl. 6), entre ellos las proteínas albúmina, transferina e insulina. Tanto la transferina como la insulina pueden cruzar la barrera hematoencefálica mediante un proceso denominado transcitosis mediada por receptor, donde al unirse a sus respectivos receptores en las células endoteliales capilares del cerebro inducen la endocitosis y la formación de una vesícula que las libera al interior [87]. La pureza en el medio RPMI\* de estas proteínas no es del 100%, por ejemplo la pureza de la insulina es del 95%. Esto sugiere la presencia de "contaminantes" u otras proteínas ligadas que, junto con la transferina y/o insulina, crucen hacia el sistema nervioso contribuyendo a los cambios.

Cabe destacar que el hecho de que no todas las muestras de cerebros de ratones a los cuáles se les inyectó RPMI\* presentaran cambios en la expresión de T $\beta$ III puede indicar que el RPMI\* por sí mismo no siempre es suficiente para modificar la expresión proteica del cerebro, habiendo factores adicionales (ambientales o propios del organismo) que al interactuar con el medio promueven los cambios. Estudios futuros son necesarios para analizar cómo, y mediante qué componentes y mecanismos el medio RPMI\* afecta al cerebro incluso hasta 50 días después de ser inyectado subcutáneamente en ratones.

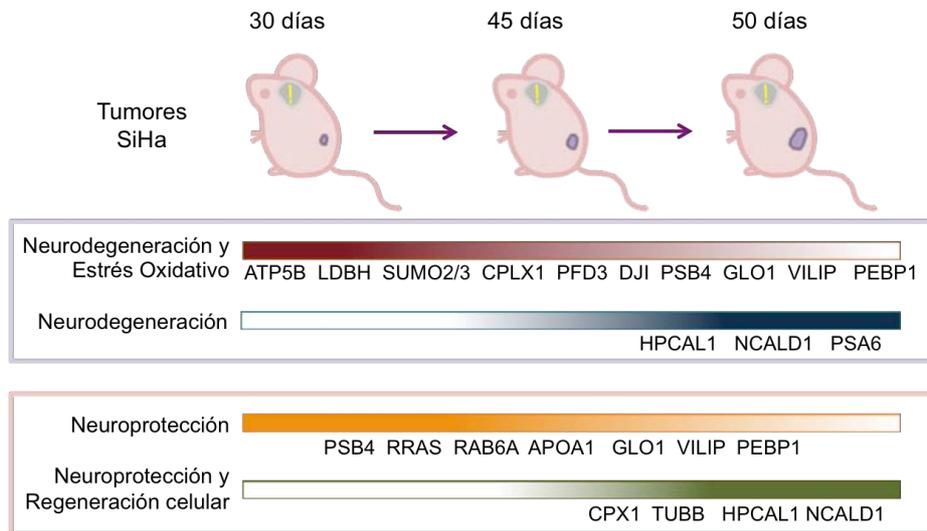
Con el objetivo de descartar la influencia del medio RPMI\* en el cerebro, se implementó la misma metodología utilizando PBS como el vehículo de inyección de las células SiHa. El análisis de los cerebros obtenidos con esta metodología indicaron que tanto los tumores de SiHa como la presencia del PBS en la inyección no influye de la misma manera que el RPMI\* en la expresión de la T $\beta$ III, siendo el PBS un más adecuado para la inoculación celular y el análisis del tejido cerebral.

## **10.2 Análisis de proteínas cerebrales sobre expresadas en ratones durante el desarrollo tumoral de SiHa.**

El análisis mediante geles 2D y espectrometría de masas permitió analizar e identificar aquellas proteínas con expresión diferencial en el cerebro de ratones durante el desarrollo tumoral. Todas las proteínas arrojadas en el análisis comparativos fueron caracterizadas como sobre expresadas, lo cual no descarta que haya proteínas sub expresadas que puedan ser detectadas mediante enfoques más sensibles que los geles 2D, como el análisis mediante masas/masas.

Los análisis de enriquecimiento de vías y procesos celulares, así como el agrupamiento de las proteínas de acuerdo a sus papeles reportados en el sistema nervioso, indicaron que los procesos más representados fueron la comunicación celular y la sinapsis. De igual forma, la mayoría de las proteínas se agruparon en procesos asociados a enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson y a mecanismos de neuroprotección (Fig. 7 y 8). El análisis de las variaciones de sobre expresión conforme al tiempo de las proteínas y sus procesos asociados permite proponer que en etapas tempranas del desarrollo del tumor de SiHa (T30 días) se activan principalmente mecanismos que promueven alteraciones en la comunicación y daño celular, lo cual podría desencadenar en muerte y procesos neurodegenerativos. Dentro de estos procesos, las proteínas asociadas presentan mayores niveles de expresión en el tiempo 30, los cuáles van disminuyendo durante el desarrollo en tiempos más tardíos. El hecho de que las proteínas asociadas a muerte y neurodegeneración se vean reducidos en etapas tardías (T45 y T50) puede deberse a que el tumor disminuya su capacidad de desencadenar estos daños o a la activación de mecanismos de protección en el cerebro en respuesta a los daños y alteraciones provocados desde las etapas tempranas del tumor. En los cerebros de ratones son SiHa, las proteínas asociadas a neuroprotección también presentaron niveles de expresión elevada desde el tiempo 30 días, pero con menores aumentos de expresión que las proteínas asociadas a neurodegeneración. Así mismo, proteínas asociadas tanto a neuroprotección y a desarrollo presentaron aumentos hasta los

tiempos más tardíos, principalmente a los 50 días. Dichos comportamientos en los mecanismos de protección podrían indicar que simultáneamente a la activación de mecanismos asociados a muerte y degeneración, en el cerebro se mantienen activos los mecanismos de protección, activando también posibles vías involucradas en neuroregeneración para poder reparar los daños, lo que disminuyendo la magnitud de la neurodegeneración en las etapas tardías (Fig. 9 y 24).



**Fig. 24.** Modelo donde se ilustran los procesos asociados a las proteínas conforme al tiempo del desarrollo tumoral de SiHa. El modelo propone que en las primeras etapas del tumor (T30) existe una mayor representación de proteínas asociadas a procesos neurodegenerativos y estrés y a etapas tardías (T50) procesos asociados a neuroprotección y regeneración celular. Para cada proceso se ilustra la dinámica de expresión general de todas las proteínas enlistadas debajo de los recuadros de colores. El color más intenso representa mayor aumento de expresión y los colores más tenues menor aumento. El color blanco indica que no se detectaron cambios de expresión en ese tiempo.

Para determinar la posible participación de las proteínas identificadas en el modelo propuesto de interacción cerebro-desarrollo del tumor, se analizó más a detalle el papel de las proteínas en el sistema nervioso, tanto para los procesos celulares en los que intervienen, como en las enfermedades en las cuáles han sido asociadas.

### 10.2.1 Neurodegeneración

La lactato deshidrogenasa (LDBH) ha sido ampliamente usada como un indicador de daño celular. Esta proteína es la enzima responsable de llevar el último paso de la glicólisis anaeróbica, catalizando la conversión de piruvato a lactato [88]. En los CRT-PBS se detectó aumento en la expresión de la isoforma B solamente a los 30 días (1.76 veces), mientras que regresó a sus niveles normales en los tiempos 45 y 50. Particularmente la isoforma B cataliza la conversión de lactato a piruvato, por lo que su aumento en CRT-PBS puede indicar un aumento en la necesidad de generar energía en las neuronas en etapas tempranas del tumor. Este aumento en los requerimientos energéticos puede deberse al un transporte (shuttle) de lactato intercelular propuesto, en el cual los astrocitos producen lactato a través de la glicólisis, el cual es transportado a las neuronas adyacentes y convertido a piruvato mediante la LDBHB para que posteriormente pueda entrar al Ciclo de Krebs y generar energía [89].

El mantenimiento del citoesqueleto es fundamental para la correcta fisiología celular. La prefoldina (PFD3) es una proteína chaperona necesaria para el plegamiento de las tubulinas y el mantenimiento de microtúbulos [90]. Esta proteína también ha sido reportada en el LCR como consecuencia de daño celular [91], por lo que su sobre-expresión durante el desarrollo tumoral (T30: 3.87, T45: 2.72 y T50: 2.07 veces) podría desencadenar alteraciones en los microtúbulos, los cuales son fundamentales para la sobrevivencia y correcto funcionamiento celular.

La tropomiosina (TPM1) también tiene un papel importante en el citoesqueleto, asociándose a microfilamentos, participando en la movilidad y el mantenimiento de la morfología celular. En patologías neurofibrilares ha dado positiva en sueros y LCR [92]. Durante el desarrollo tumoral esta proteína se encontró sobre-expresada sólo en los tiempos 30 (6.11 veces) y 45 días (4.09 veces). El papel específico de esta proteína en respuesta a estrés o daño no es claro, pero se ha sugerido que podría estar implicada en la activación de astrocitos, promoviendo procesos patológicos [93]. También cambios en sus niveles de expresión pueden alterar el transporte retrógrado y anterógrado en algunas neuronas, desencadenando pérdida neuronal en ratones viejos [94].

El calcio es un mensajero secundario muy importante en el tejido nervioso, regulando una amplia variedad de eventos celulares fisiológicos y patofisiológicos. Las proteínas pseudo-vinisinina 1 (VILIP1) y la neurocalcina delta (NCALD) son censoras de calcio específicas de neuronas [95]. VILIP1 presentó un perfil de expresión fluctuante, aumentando en T30 (1.41 veces), disminuyendo a niveles normales en T45 y aumentando de nuevo en T50 (1.46 veces), mientras que la NCALD solo aumentó su expresión en el T50 (2.18 veces). La sobre-expresión de estas proteínas está asociada a déficits cognitivos y a un aumento en la tasa de muerte celular resultado de las fluctuaciones en las concentraciones de calcio, el cual puede ser tóxico para las neuronas [96-98]. También se han reportado en la sangre y LCR de pacientes que han sufrido derrames cerebrales [99].

Los declives cognitivos son una característica común en pacientes con enfermedades neurodegenerativas. La proteína de unión a fosfatidiletanolamina (PEBP1) y su derivado péptido neuroestimulador del sistema colinérgico del hipocampo (HCNP), están asociados a neurodegeneración y desórdenes de aprendizaje y memoria, principalmente en el sistema colinérgico [100, 101]. PEBP1 es un efector de las vías de transducción de señales que controlan crecimiento celular, motilidad, apoptosis, integridad genómica y resistencia terapéutica. Su aumento CRT-PBS (T30: 22.39 y T45: 10.22 veces) podría indicar alteraciones en el sistema colinérgico que afecten la memoria y el aprendizaje de los pacientes a etapas tempranas del cáncer [102].

El sistema ubiquitin-proteosoma es una maquinaria catalítica necesaria para la degradación de proteínas celulares y esencial para controlar varios procesos celulares básicos y la supervivencia celular [85]. El complejo catalítico encargado de la degradación es el 26S del proteosoma, el cual se compone de la subunidad 20S y la 19S [103]. En los CRT-PBS se

identificaron dos subunidades de la subunidad 20S: la subunidad alfa tipo 6 (PSA6) y la beta tipo 4 (PSB4). PSA6 no presentó cambios significativos en el cerebro a los 30 y 45 días del desarrollo tumoral pero sí aumentó notablemente a los 50 días (8.34 veces). Por otro lado, PSB4 presentó aumentos en los tres tiempos (T30: 3.88, T45: 2.72 y T50: 2.07 veces). Se ha sugerido que cambios en la expresión y la estequiometría de las subunidades del complejo proteosomal inducen alteraciones en la actividad de degradación del proteosoma, así como respuestas patológicas que eventualmente propician la muerte neuronal, por lo que los cambios de PSB4 y PSA6 podrían propiciar estos mecanismos [104].

### **10.2.2 Neuroprotección**

En respuesta a las posibles alteraciones generadas en el sistema nervioso por la presencia de tumores lejanos, el cerebro podría desencadenar mecanismos de protección y mantenimiento de la homeostasis. Lo anterior se vio reflejado en el aumento de expresión de ciertas proteínas que ya se han reportado involucradas en vías de defensa y regeneración neuronal/celular.

La hipocalcina (HPCL1) brinda neuroprotección contra estímulos de muerte celular inducida por calcio. Las neuronas del hipocampo deficientes en HPCL1 son vulnerables a daño y muerte debido a las fallas en los mecanismos de extrusión de calcio del citosol [105]. Los niveles elevados de HPCL1 en los CRT-PBS (T30: 3.4 y T50: 3.96 veces), así como el aumento de VILIP1 y NCALD (mencionadas anteriormente) permiten proponer que durante el desarrollo tumoral existen fluctuaciones y cambios en la homeostasis intracelular de calcio, y que la activación de estas proteínas puede contribuir en mantener niveles fisiológicos normales de este ion con el objetivo de evitar su citotoxicidad.

El mal plegamiento y la formación de agregados proteicos son características de diversas enfermedades neurodegenerativas. Como se mencionó anteriormente, la PFD3 es una chaperona involucrada en el mantenimiento de microtúbulos, siendo también una proteína fundamental para la protección cerebral previniendo la agregación de proteínas mal plegadas para contrarrestar el estrés en el retículo endoplásmico (RE) y la muerte celular activada por agregación proteica. En etapas tempranas de Alzheimer sus niveles elevados y su interacción con el péptido  $\beta$ -amiloide incrementan la proporción de agregados oligoméricos menos tóxicos, disminuyendo la tasa de muerte celular [106]. En las enfermedades de Huntington y Parkinson ayuda a inhibir la elongación y formación de agregados tóxicos de huntingtina y  $\alpha$ -sinucleína respectivamente [107-109]. Por otra parte, ratones con mutaciones donde la PFD3 pierde su función, presentan neurodegeneración en el cerebelo, aumento en la agregación de proteínas poliubiquitiladas y reducción de la viabilidad celular [106]. RAB6A (T30: 3.88, T45: 2.72 y T50: 2.07 veces), al igual que la PFD3, se activa en respuesta al estrés del RE contribuyendo a la expansión y relajación del mismo [109]. También ayuda a reducir el número de proteínas en dicho organelo, regulando positivamente el transporte retrógrado de membrana y contrarrestando el estrés en él. Alternativamente, RAB6A facilita los procesos autofágicos, los cuáles son la principal vía de degradación cuando se activa la respuesta a proteínas mal plegadas [110]. La sobre-expresión de RAB6A y PFD3 en los CRT-PBS sugiere que el cerebro mantiene activados los mecanismos de protección a proteínas mal plegadas para así mantener

la homeóstasis del RE.

La proteína serin/treonin fosfatasa 1 (PPP2R1A) se sitúa estratégicamente río arriba de muchas vías de apoptosis y supervivencia celular [111], sugiriendo un papel en la regulación de vías en los CRT-PBS (T30: 3.25 y T45 7.53 veces). En el SNC, esta proteína participa en la desfosforilación e inactivación algunas fosfoproteínas que contribuyen a la neurotoxicidad y a reguladores del metabolismo energético, el balance iónico y la apoptosis, por lo que podría tener un impacto en vías que contrarrestaran y limitan la excitotoxicidad [112]. Así mismo, esta proteína regula mecanismos de recuperación en el cerebro adulto y en cerebros sometidos a estrés. Por ejemplo, su sobre-expresión en el hipotálamo de ratas sometidas a estrés promueve el crecimiento celular [110, 113].

Además de las modificaciones post traduccionales (MPT) mencionadas, existen otras modificaciones que son de suma relevancia para la función protectora de ciertas proteínas e igualmente relevantes para el funcionamiento celular. Una modificación que se ha descrito como primordial para la función antiapoptótica de DJ1 en células sometidas a radiación UV es la SUMOilación [114]. Los modificadores pequeños tipo ubiquitina (SUMO) son un grupo de proteínas que se conjugan a residuos de lisina de sus proteínas blanco modificando su actividad, estabilidad y localización subcelular. Una gran parte de sus proteínas blanco son factores de transcripción y proteínas involucradas en la expresión génica [115]. Existen tres tipos de SUMO(1-3). La tipo 1 participa principalmente en la manutención de la fisiología celular normal, mientras que las que se encontraron en los CRT-PBS (T30: 5.36, T45: 4.8 y T50: 2.5 veces), es decir las tipo 2/3, aumentan y participan principalmente en respuestas a estrés oxidativo, calórico y lipídico, teniendo impactos importantes en el destino celular, la estabilidad genómica, control de calidad de proteínas recién sintetizadas, degradación proteosomal y reparo de daño a ADN [116].

En pacientes con cáncer una de las principales causas de mortalidad son los infartos cerebrales isquémicos, resultado del bajo flujo sanguíneo ocasionado por la presencia del tumor [45]. El aumento de SUMO 2/3 en el cerebro durante el desarrollo tumoral podría ayudar a las células cerebrales a sobrellevar este bajo flujo sanguíneo. En estudios de hibernación e hipotermia se ha propuesto un modelo en el cual la activación de la vía de conjugación de SUMO protege a neuronas del daño y estrés metabólico ocasionado por el bajo flujo de sangre, así como de la privación transitoria de glucosa/oxígeno [117,118].

Cabe destacar que al igual que RAB6A y la PFD3, la SUMOilación es un componente de la respuesta a proteínas mal plegadas que influye en el balance entre supervivencia o muerte celular [117]. La identificación de aquellas proteínas que son conjugadas con esta modificación puede ayudar a esclarecer qué vías están siendo reguladas y activadas en los CRT-PBS mediante la SUMOilación.

### **10.2.3 Estrés oxidativo**

Los tumores son capaces de liberar radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno

(ROS), los cuales pueden ser capaces de generar estrés oxidativo en órganos lejanos. Se ha reportado que los tumores generan lesiones al ADN en otros órganos mediante mecanismos de oxidación, y se ha propuesto que también este estrés puede generar daño oxidativo a lípidos, proteínas y ARN, contribuyendo a procesos de muerte celular y al desarrollo de enfermedades crónicas o degenerativas [34].

En el cerebro y tejido neuronal, los ROS son particularmente activos debido a que el metabolismo de los neurotransmisores es una fábrica de estos oxidantes, que a niveles elevados atacan a las células gliales y a las neuronas. Estas últimas son particularmente sensibles al daño, por lo que los sistemas antioxidantes de defensa son fundamentales para la sobrevivencia neuronal [119].

La desfosforilación juega un papel importante en la regulación de las respuestas de daño a ADN (DDR, por sus siglas en inglés: DNA damage response). PPP2R1A tiene un papel importante la regulación de estas vías ya que muchos de sus interactores están involucrados en las vías de reparación y mantenimiento de la integridad genómica. Durante la DDR, PPP2R1A reconoce el daño a ADN, promueve la transducción de señales y regula los controles del ciclo celular y la reparación del ADN [120], por lo que el incremento de PPP2R1A en los tiempos tempranos (T30: 3.25 y T45 7.53 veces) de los CRT-PBS puede reflejar el mecanismo de respuesta y protección contra el daño oxidativo al ADN.

Otra proteína involucrada en los mecanismos de reparación de ADN, específicamente en aquéllos generados por estrés oxidativo, es la proteína glioxalasa 1 (GLO1) (T30 - 3.55 y T50 - 2.58 veces). Esta proteína es fundamental para la eliminación de metilglioxal (MG) y glioxal, los cuales son altamente tóxicos para las células, incrementando los niveles de especies reactivas de oxígeno, superóxidos, peróxidos y radicales hidroxilo [82]. GLO1 contiene una región regulatoria que es reconocida por Nrf2, un factor de transcripción que coordina el incremento de expresión de una batería de genes asociados a la protección contra estrés oxidativo [121]. La sobre-expresión de GLO1, al disminuir los niveles de MG y glioxal brinda protección, evita la muerte celular inducida por fragmentación de ADN por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y disminuye la concentración de marcadores de estrés [82,122].

Un organelo blanco del estrés oxidativo es la mitocondria. DJ1 presenta función de peroxidasa atípica que oxida una de sus cisteínas para eliminar el exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la mitocondria y así contrarrestar el estrés oxidativo [123]. Generalmente esta función protectora ocurre en etapas tempranas del estrés, mientras que en etapas tardías, DJ1 funciona preferentemente como señalizador [124,125]. Este comportamiento dependiente del tiempo podría también presentarse en los CRT-PBS, donde se observó que DJ1 tuvo una sobre-expresión en todos los tiempos (T30: 3.88, T45: 2.72 y T50: 2.07 veces). DJ1 es capaz de censar el estado redox, por lo que en etapas tempranas del tumor podría funcionar como un sensor antioxidante encargado de regular transcripcionalmente genes antioxidativos, moduladores de vías apoptóticas, de supervivencia y del mantenimiento del complejo 1 mitocondrial [125]. Por otra parte, en etapas tardías podría funcionar como señalizador a células aledañas. Por ejemplo,

células que sufrieron isquemia e hipoxia, secretan DJ1 para que, mediante vías parácrinas o autócrinas, contribuya a la protección de neuronas y células aledañas [126].

Además del daño al ADN y a la mitocondria, otro efecto principal del estrés oxidativo es la generación de proteínas oxidadas capaces de formar agregados tóxicos e inducir estrés en el RE [127]. Como se discutió anteriormente, el sistema ubiquitin-proteosoma (26S) es el complejo responsable de la degradación proteica. Dos componentes de la subunidad catalítica 20S se encontraron sobre-expresados en la presencia de tumores. La subunidad 20S puede funcionar como un complejo independiente y degradar proteínas poco oxidadas [128]. Esta propiedad de la subunidad 20s, podría tener un papel fundamental en las respuestas rápidas al estrés inducido por los tumores, ya que a diferencia del complejo 26S completo, la subunidad 20S es menos propensa a oxidación y desactivación y es capaz de degradar proteínas oxidadas sin el consumo de energía y sin la necesidad de la activación previa del sistema de ubiquitinación [129].

Otras proteínas sobre expresadas en CRT-PBS relacionadas con el estrés oxidativo son SUMO, APOA1 y ATP5B. APOA1 (T30: 3.88, T45: 2.72 y T50: 2.07 veces) y la ATP5B (T30: 2.79 veces) contrarrestan el estrés oxidativo en neuronas reduciendo la producción de ROS en estrés lipídico [130,131], mientras que la SUMOilación de proteínas aumenta en varios tipos de estrés como el oxidativo, el calórico y el metabólico [116].

#### **10.2.4 Neuroregeneración**

La participación de algunas proteínas identificadas en procesos de crecimiento y desarrollo permite proponer que parte de las posibles funciones neuroprotectoras de estas proteínas sea la de promover regeneración y crecimiento celular en respuesta al daño causado por el ambiente estresante que generan los tumores.

Dos de los factores fundamentales para la regeneración axonal son la remielinización y la reparación de las membranas axonales, donde es necesaria la movilización y redistribución de lípidos. Las apolipoproteínas son un conjunto de proteínas multifuncionales que se encargan de controlar la homeostasis lipídica del cerebro [132]. La apolipoproteína 1 (APOA1) se encontró sobre-expresada en los CRT-PBS durante el desarrollo tumoral (T30: 3.88, T45: 2.72 y T50: 2.07 veces). APOA1 es el receptor primario de lípidos como el colesterol y la fosfatidilcolina, siendo parte del complejo de lipoproteínas de alta densidad que remueve el exceso de colesterol de los tejidos [130]. APOA1 se ha asociado a los procesos de remielinización [132,133], por lo que su sobre-expresión en CRT-PBS podría indicar cambios en el metabolismo lipídico, ligado posiblemente a la regeneración de membranas axonales [134].

Los factores neurotróficos son necesarios para la estimulación del crecimiento neuronal y regeneración celular. La proteína PEBP1 mencionada anteriormente, es precursora del factor neurotrófico HCNF [135], el cual es un péptido pequeño que participa en el desarrollo de las neuronas colinérgicas del hipocampo, así como en procesos de memoria y aprendizaje [136,137]. Este péptido no fue identificado en los geles 2D, ya que tiene un peso molecular muy

bajo (~1.17kDa), pero la sobre-expresión de PEBP1 podría reflejando su aumento en los CRT-PBS, dónde gracias a su función neurotrófica promueva el desarrollo y la regeneración en conjunto con VILIP1 la cual también se ha visto involucrada en promover el crecimiento de dendritas [95].

### 10.2.5 Comunicación Celular – Sinapsis

La función cerebral depende en gran medida de la habilidad de las neuronas de comunicarse entre ellas. La comunicación interneuronal tiene lugar en las sinapsis, donde la información de una neurona es transmitida rápidamente a una neurona receptora. Al ser la sinapsis un proceso muy complejo y de suma relevancia, éste tiene que ser altamente regulado y controlado [138]. En el análisis proteico realizado en este trabajo, se detectaron proteínas que participan en la comunicación celular, principalmente en promover y regular la sinapsis.

Entre los componentes esenciales para la señalización es la formación, el transporte y la fusión de vesículas. Las complexinas son fundamentales para la regulación de la transmisión sináptica al controlar el ensamblaje y la estabilidad de los complejos SNARE en la fusión vesicular [81]. En los CRT-PBS se detectaron 2 isoformas de la complexina 1 (CPLX1) y la complexina 2 (CPLX2)(T30: 22.39 y T45: 10.28 veces). Los cambios de expresión de estas proteínas en el CRT-PBS podrían reflejar cambios en la actividad sináptica neuronal ya que su sobre-expresión está involucrada tanto en la promoción e inhibición de la fusión y liberación de las vesículas que contienen los neurotransmisores y que promueven la exocitosis [139].

El proteosoma además de participar en proteólisis y en la protección de neuronas de proteínas mal plegadas también podría estar involucrado en la regulación y homeostasis de vesículas sinápticas en los CRT-PBS. El complejo 26S se redistribuye en las espinas dendríticas después de la estimulación neuronal donde regula la internalización de los receptores de glutamato, además de ayudar a degradar una gran variedad de proteínas sinápticas, entre ellas algunas que normalmente inhiben la plasticidad cerebral [129].

### 10.2.6 Enfermedades neurodegenerativas

Lo que más llamó la atención del grupo de proteínas identificadas es que cambios de expresión de la mayoría de ellas han sido reportadas en estudios de Alzheimer, ya sea como factores que contribuyen al desarrollo de la enfermedad, que son consecuencia de las patologías o que participan en vías de protección y regeneración celular.

En la Tabla 7 se resumen la relevancia de las proteínas identificadas en relación a su participación, función o asociación en enfermedades, tales como Alzheimer (AD), Parkinson (PD) y de Huntington (Ht), así como otros trastornos como depresión y ansiedad.

Proteína	Trastorno	Función	Ref.
APOA1	Alzheimer	• Actúa como chaperona impidiendo formación de fibrillas amiloides tóxicas.	[132]
		• Propicia la generación de fibrillas más delgadas menos tóxicas y dañinas.	[140]
		• Se une a APP previniendo su agregación	[141]
		• Previene déficit de memoria y aprendizaje.	[142]
		• Disminuye citotoxicidad.	
		• Presencia, LCR, suero y placas seniles indica menor deterioro cognitivo.	

	Parkinson	• Biomarcador en LCR.	[143]
	Demencia	• Polimorfismos están asociados a demencia. • Aumentos en su precursor indican menor riesgo demencia.	[144]
<b>ATP5B</b>	Alzheimer	• Se une a agregados AB y promueve toxicidad. • Genera alteraciones en proteínas del transporte de electrones.	[145]
<b>HPCL1</b>	Alzheimer	• Niveles altos en pacientes y en ratones transgénicos que forman placas AB. • Su deficiencia en ratones los hace más susceptibles a la toxicidad de las placas de AB.	[146]
	Parkinson	• Colocaliza con los cuerpos de Lewis en cerebros de pacientes con PD. • Podría estar actuando como proteína andamiaje que favorezca la formación y mantenimiento de los cuerpos de Lewis.	[147]
<b>NCALD</b>	Alzheimer	• En pacientes con AD, se localiza principalmente en la corteza temporal. • Niveles bajos reflejan déficits relacionados con la degeneración sináptica. • Secuestra calcio en las terminales nerviosas incrementando la concentración de Ca <sup>+</sup> intracelular, el cual podría llevar a degeneración de las terminales presinápticas y muerte neuronal • Pérdida de neurocalcina afecta la transducción de señales, alterando el procesamiento de la información. • Interactúa con tubulinas y actina previniendo el desensamblaje de microtúbulos en la presencia de altas concentraciones de Ca <sup>+</sup> y cuando hay daño neuronal. • Deficiencia de neurocalcina puede distorsionar la regulación de ensamblaje de los microtúbulos, lo cual es un fenómeno frecuente en pacientes con AD.	[98]
<b>OMP</b>	Alzheimer	• Reciprocidad entre desórdenes olfatorios y riesgo de AD. • Deficiencias olfatorias en pacientes con discapacidades cognitivas.	[148]
	Depresión	• Hay alteración en identificación de olores en pacientes con depresión. • Marcadores olfatorios pueden servir como una herramienta para la detección de depresión. • Hay una relación entre olfato y depresión, síntomas de depresión son más prevalentes en pacientes con pérdida de olfato.	
<b>PEBP1</b>	Alzheimer	• Niveles altos de PEBP en muestras postmortem de hipocampo de pacientes con AD. • Niveles altos de PEBP incrementan los niveles de HCNP, el cual se acumula y se asocia a cuerpos de Hirano en muestras postmortem de cerebros de pacientes con AD. • Niveles elevados de HCNP en LCR.	[149]
		• Alteraciones de PEBP1 tienen el potencial de contribuir a los procesos patofisiológicos.	[136]
	Parkinson	• Su fosforilación y degradación de están involucradas en la sobre activación de la vía ERK/MAPK, lo cual lleva a que las neuronas reentren a la fase S y eventualmente mueran.	[150]
	Depresión	• Alteraciones en el hipocampo han sido asociadas a depresión. • Análisis proteómicos de hipocampo de ratas después de un tratamiento crónico con antidepressivos mostró una sobre-expresión de PEBP1. • Niveles altos de PEBP1 podrían aumentar los niveles de HCNP e inducir la síntesis de acetilcolina. En depresión se ha reportado una hipersensibilidad colinérgica y antagonistas del receptor nicotínico de acetilcolina están asociados a efectos antidepressivos. • Incremento de PEBP1 o HCNP puede llevar a fenotipos depresivos debido a la sobre-exposición del sistema a la acetilcolina.	[151]
	Demencia	• Involucrada en ciertas alteraciones patofisiológicas asociadas con demencia.	[136]
<b>PFD3</b>	Alzheimer	• En neuronas de cerebros de ratón los oligómeros b-amiloideas que se forman en presencia de prefoldina humana indujeron menos muerte neuronal. • Sobre-expresada en ratones modelo de AD (APP23). • En estudios de pacientes con AD, se sobre-expresa. • Posible papel en modular los plegamientos de AB ejerciendo un efecto protector en las células.	[91]
	Huntington	• Retrasa la formación de dímeros y trímeros de huntingtina patogénica, inhibiendo su elongación e inclusión • Interacciona con los di y trímeros de huntingtina que todavía no tóxicos para mantenerlos o cambiarlos a oligómeros pequeños no tóxicos.	[108]
	Parkinson	• Colocaliza con los agregados de alfa sinucleína. • Protege en etapas tempranas de la enfermedad previniendo las agregaciones de alfa-sinucleína. • Fomenta la formación de oligómeros más pequeños no tóxicos. • Asiste en la degradación dependiente de autofagia de los agregados de alfa sinucleína mediante su deliberación al lisosoma.	[107]
<b>PSA6 PSB4</b>	Alzheimer	• En lisados de cerebros postmortem de pacientes con AD hay decrementos en la actividad proteolítica de la unidad 20S del proteosoma. • Aumento en la actividad catalítica de la unidad 20S aumenta en muestras de pacientes con AD. • Cambios en los puntos isoeléctricos de varias subunidades del proteosoma en pacientes AD (postmortem), lo cual señala posibles modificaciones post-transcripcionales. • Subunidad 20S contribuye a la degradación de tau recombinados.	[152]
		• Subunidad 20S lleva a cabo la degradación inmediata de proteínas tau mal plegadas que escapan el control de calidad del retículo endoplásmico.	[153]
	Parkinson	• Proteosomas son recluidos dinámica y reversiblemente a los cuerpos de inclusión en	[154]

		Huntington. Estos proteosomas permanecen catalíticamente activos y accesibles a sus sustratos. Fragmentos PolyQ que entran al proteosoma son degradados eficientemente.	
<b>RAB6A</b>	Alzheimer	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rab6 - incrementan en la corteza temporal de pacientes con AD, al mismo tiempo que se activa la respuesta a proteínas mal plegadas</li> <li>Colocalización de Rab6 y tau hiperfosforilada.</li> <li>Rab6 inhibe la formación del péptido beta-amiloide.</li> <li>En modelos de ratón para AD, el máximo nivel de Rab6 en neuronas sin placas seniles y los niveles más bajos en neuronas ya con placas seniles.</li> <li>Niveles de Rab6 en AD reflejan posiblemente la respuesta neuronal al proceso patológico. Regiones con los más altos niveles de Rab6 en cerebros de AD son afectadas en épocas tardías de la patología.</li> </ul>	[110]
			[109]
<b>SUMO 2 SUMO 3</b>	Alzheimer	<ul style="list-style-type: none"> <li>Las proteínas beta-amiloide y tau son sustratos de SUMO.</li> <li>SUMO inmunoreacciona con agregados de tau-fosforilada en ratones modelos de AD.</li> <li>Muchas proteínas que tienen funciones o que se encuentran alteradas en AD son sustratos de SUMO, incluyendo aquellas involucradas en la fisiología sináptica, dinámica mitocondrial y señalización inflamatoria.</li> <li>Sobre-expresión de SUMO2 resulta en menor número de agregados del péptido beta-amiloide.</li> <li>SUMO3 es un regulador de la generación del péptido beta-amiloide, Sobre-expresión de ésta reduce la producción del péptido beta-amiloide, mientras que mutantes que no pueden ser conjugadas incrementan los péptidos amiloidogénicos. Al contrario otro estudio reportó lo opuesto, SUMO3 promovía la generación del péptido beta-amiloide.</li> </ul>	[155]
	Parkinson	<ul style="list-style-type: none"> <li>Se activa la SUMOilación en respuesta a estrés en PD.</li> <li>Ayuda a transportar a las proteínas para su degradación.</li> <li>También tiene efectos detrimentales, como el aumento de oligómeros solubles tóxicos o mediante la antagonización de la degradación mediada por proteosomas.</li> </ul>	[156]
	Huntington	<ul style="list-style-type: none"> <li>Colocaliza con las inclusiones asociadas a la enfermedad.</li> <li>Huntingtina es sustrato de SUMOilación, la cual podría generar cambios en la solubilidad o en los niveles de toxicidad de los oligómeros tóxicos y por lo tanto disminuir la sobrevivencia.</li> <li>SUMOilación de huntingtina podría brindar estabilidad y reducir la agregación de la mutante de huntingtina, incrementando los niveles de intermediarios tóxicos de oligómeros con poliQ, así como el incremento en su habilidad de reprimir la transcripción.</li> </ul>	[114]
<b>TPM1</b>	Alzheimer	<ul style="list-style-type: none"> <li>Isoformas de Tm1 son parte integral de ovillos neurofibrilares.</li> <li>Altos niveles de Tm1 en materia blanca periventricular y en hipocampo de pacientes con AD.</li> <li>Tm3 está elevada en hipocampo de cerebros de AD.</li> <li>La acumulación de Tm3 en la materia blanca de pacientes con AD podría tener efectos negativos en la dinámica de la organización del citoesqueleto de actina.</li> <li>Tm está involucrada en la progresión de AD, debido a las alteraciones en el mantenimiento del citoesqueleto.</li> </ul>	[157]
			[158]
<b>VILIP1</b>	Alzheimer	<ul style="list-style-type: none"> <li>En LCR de pacientes con AD hay concentraciones elevadas de VILIP1.</li> <li>Se considera un marcador de muerte/daño neuronal en pacientes desde 10, o hasta 20 años antes de los síntomas y de los déficits cognitivos.</li> <li>Niveles de VILIP1 están correlacionados con los niveles de tau. Ambos incrementan en respuesta a daño o derrame cerebral.</li> <li>Promueve la hiperfosforilación de tau desestabilizando microtúbulos e incrementando la muerte mediada por Ca+.</li> <li>Podría influir en la fosforilación de tau y participar en la neurotoxicidad mediada por calcio.</li> </ul>	[159]
			[160]
		Se libera de neuronas durante insultos neurotóxicos, por lo que su presencia extracelular es una características patológicas de AD.	[160]
	Demencia	<ul style="list-style-type: none"> <li>Posible biomarcador en LCR que indica pérdida neuronal.</li> <li>Marcador de declive de la cognición y severidad de la enfermedad.</li> <li>En pacientes de AD sin demencia no hay aumento de VLP1 en LCR, por lo que ésta podría estar relacionada con los mecanismos o alteraciones específicas de la demencia.</li> </ul>	[95]
<b>GLO1</b>	Alzheimer	<ul style="list-style-type: none"> <li>Incrementada en cerebros de pacientes con AD temprano y presenta un decremento continuo en pacientes con medianos y avanzados niveles de AD.</li> <li>Los decrementos de GLO1 en etapas avanzadas de AD podría contribuir a problemas neuronales, apoptosis y formación de placas y aglomerados inducidos por los niveles de metilgloxal.</li> <li>Su aumento en cerebros AD podrían deberse en respuesta a la acumulación de agregados tau.</li> <li>Sobre-expresada en AD como una manera compensatoria de mantener niveles fisiológicos normales de MG y gloxal.</li> <li>Su regulación positiva en AD podría ser consecuencia del aumento del estrés oxidativo y de nitrosativo.</li> <li>Depleción de GLO1 causa neurodegeneración y aparición de patologías de AD.</li> <li>Restauración de GLO1 puede ayudar a combatir el AD.</li> <li>Se regula positivamente en respuesta a la agregación de tau.</li> </ul>	[83]
			[161]
		Esquizofrenia	<ul style="list-style-type: none"> <li>Déficits en GLO1 y estrés por dicarbonilos están ligados al desarrollo de un cierto tipo</li> </ul>

		de esquizofrenia. • Polimorfismo (mutación silenciosa) se ha asociado a desórdenes esquizofrénicos.	
	Depresión	• Niveles bajos en hipocampo de ratas derrotadas, resultando en comportamientos depresivos y de ansiedad inducidos por estrés oxidativo, así como deficiencias en memoria.	[163]
	Ansiedad	• Dependiendo del estudio y el enfoque sus niveles aumentan o disminuyen en pacientes o ratones modelos de ansiedad.	[164]
<b>CPLX1 CPLX2</b>	Parkinson	• CPLX1 – Identificada en sustancia negra de pacientes con PD avanzado • CPLX2 – Sobre-expresada en un modelo de ratón de Parkinson. • Los incrementos podrían ser debido a un método de compensación en respuesta a la alteración de la actividad neuronal y a la muerte celular progresiva presente en esta enfermedad.	[165]
	Esquizofrenia	• CPLX1y2 - Cambios en hipocampo generan déficits cognitivos. • Cambios expresión perturban la función secretoria presináptica.	[166]
<b>DJ1</b>	Parkinson	• Aumentada en astrocitos de pacientes con Parkinson y de pacientes que sufrieron un infarto.	[126]
		• Estimula y soporta la supervivencia de neuronas dopaminérgicas, rescatándolas de situaciones vulnerables y estrés en un modelo de ratón de Parkinson.	[167]
		• Funciona como chaperona en agregados de alfa-sinucleína en pacientes con Parkinson.	[126]
		• Protege a neuronas dopaminérgicas incrementando la respuesta antioxidativa y favoreciendo mejoras en funciones motrices.	[168]
		• Regula e inhibe la autofagia en células dopaminérgicas de pacientes con PD.	[169]
		• Protege de muerte neuronal por lo que al no estar presente en Parkinson contribuye a la neurodegeneración.	[170]
Huntington	• Falta de expresión de DJ1 disminuye la habilidad de astrocitos de proteger a las neuronas, dando como resultado daño neuronal acelerado.	[171]	
	• Ratones knock out de DJ1 presentaron alta vulnerabilidad a estrés oxidativo en un modelo de PD.	[171]	
	• Se encuentra altamente expresada en su estado oxidativo altamente expresada en cerebros de pacientes con Huntington, así como en ratones modelos para esta enfermedad. • Interacciona directamente con un fragmento expandido del exón 1 de la huntingtina, tanto en ensayos en tubos como en modelos celulares, contribuyendo a la agregación acelerada de poliglutamina y a la toxicidad por daño oxidativo. • Blanco terapéutico para HD debido a su posible papel en la agregación de proteínas mal plegadas.	[171]	
<b>RRAS</b>	Huntington	• Activación anormal y de sus efectores río abajo en ratones modelos de Huntington. • Colocaliza con huntingtina mutante en células y estriado de ratón, sugiriendo que la activación de RRAS ocurre mediante la interacción con esta proteína. • Inhibición farmacológica de la vía de RRAS puede conferir beneficios terapéuticos en Huntington. • Activación de RRAS es una consecuencia patogénica de la huntingtina mutante. La expresión de esta mutante correlaciona con el aumento de RRAS en células de ratones modelo y puede ejercer influencia en la función de RRAS. • Señalización aumentada de RRAS es una característica patogénica de Ht. • Su manipulación farmacológica podría considerarse una estrategia terapéutica contra esta enfermedad.	[172]

**Tabla 7.** Proteínas sobre-expresadas en CRT-PBS y su asociación y función en trastornos y enfermedades cerebrales. AD=Alzheimer, PD=Parkinson, Ht=Huntington.

Se puede observar que la mayoría de las proteínas colocalizan con los agregados proteicos característicos de las enfermedades Alzheimer, Parkinson y Huntington (Tabla 7) ya sea para propiciar o disminuir su patogenicidad y toxicidad, por lo que sería de interés la búsqueda de agregados proteicos en los CRT-PBS para determinar, si al igual que en las enfermedades mencionadas, las proteínas identificadas en este proyecto contribuyen con el mal plegamiento proteico.

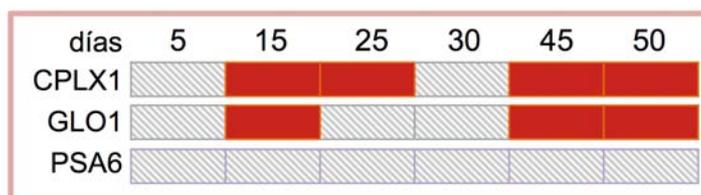
De acuerdo con la importante relación entre las proteínas detectadas en este estudio y los padecimientos asociados (Tabla 7), estudios que analicen el efecto que tienen los tumores sobre la conducta y los procesos cognitivos de los ratones pueden ser un enfoque que permita establecer si la sobre-expresión causa trastornos de conducta similares a los del AD, PD, Ht y demencia. Esta relación comprobaría el efecto de tumores lejanos en daño y alteraciones en el cerebro. Más aún, resultaría de interés el estudiar si la presencia de tumores lejanos afecta al

cerebro mediante mecanismos o procesos de daño semejantes a los de las enfermedades antes mencionadas.

### 10.3 Dinámica de expresión de GLO1, CPXL1 Y PSA6 en cerebros de ratones durante el desarrollo de tumores de SiHa.

Tomando en cuenta que todas las proteínas identificadas son de suma relevancia para la el entendimiento del funcionamiento de cerebro durante el desarrollo de tumores de SiHa, se realizaron análisis de expresión para tres proteínas: CPLX1, GLO1 y PSA6.

Para las tres proteínas, los niveles y perfiles de expresión detectados mediante WB presentaron algunas diferencias a los detectados en los geles 2D, siendo la diferencia más sobresaliente la ausencia de cambios en PSA6 en el análisis de WB. Sin embargo, tanto para GLO1 como para CPLX1 se pudo corroborar que la presencia de tumores de SiHa genera aumentos en su expresión en los cerebros, los cuales pueden ser detectados desde tiempos más tempranos (Fig. 11, 15, 21 y 25).



**Fig. 25.** Dinámica de expresión de CPLX1, GLO1 y PSA6 en cerebros de ratones durante el desarrollo tumoral de SiHa. Para cada para cada proteína se ilustra la dinámica de expresión obtenida mediante el análisis de WB durante los 6 tiempos del desarrollo tumoral analizados. El color rojo representa aumento de expresión. Las diagonales indican que no se detectaron cambios de expresión en ese tiempo.

Por otra parte la ampliación del análisis tomando en cuenta tiempos más tempranos del tumor permitió describir una dinámica de expresión fluctuante, teniendo cada proteína cambios de expresión variables y dependientes del tiempo de desarrollo del tumor de SiHa muestreado. Estas fluctuaciones demuestran que hay una relación dinámica entre el cerebro y el tumor, siendo el cerebro un tejido dinámico y moldeable capaz presentar cambios en respuesta a distintos factores, en este caso a los tumores distantes de SiHa (Fig. 25).

A continuación se analizan más a detalle las funciones de GLO1, CPLX1, PSA6 así como su posible participación en el cerebro durante el desarrollo tumoral. Cabe destacar que a pesar de los análisis de PSA6 no permitieron observar los cambios de expresión descritos en los geles 2D (Fig. 18 y 25), también se hizo el análisis bibliográfico donde se sugiere una razón por la cual pudo ser detectada su expresión mediante WB.

#### 10.3.1 CPLX1

La familia de las complexinas se compone de 4 miembros. La CPLX1 se expresa específicamente en el sistema nervioso central (SNC) y la CPLX2 se encuentra tanto en el SNC como en otros tejidos no neuronales [139]. En el SNC, ambas se expresan en los cuerpos y

sinapsis neuronales, mostrando CPLX1 una expresión enriquecida en el axosoma de terminales GABAérgicas, mientras que CPLX2 está enriquecida en axo-espinas y axo-dendritas de terminales glutamatérgicas presinápticas, por lo que ambas sirven de marcadores de terminales GABAérgicas y glutamatérgicas, respectivamente. Uno de los papeles fundamentales de las complexinas en el tejido cerebral es la regulación de la transmisión sináptica controlando el ensamblaje y la estabilidad de los complejos proteico SNARE, los cuales tienen como función principal mediar la fusión vesicular, es decir, promover la fusión de vesículas con su membrana blanco [81].

Tanto la sobre como la sub-expresión de los miembros de la familia de las complexinas puede perturbar la función secretora sináptica ya sea facilitándola o inhibiéndola dependiendo de la cepa de ratón y el enfoque experimental utilizados [173]. Entre las funciones facilitadoras, las complexinas estabilizan al complejo SNARE en un estado altamente fusionable, proveyendo de una fuente de vesículas sinápticas listas para ser liberadas al haber un acción de potencial e incremento de calcio intrasínáptico [164]. Por otra parte al estabilizar al complejo SNARE las complexinas también bloquean la reacción de fusión de las vesículas con la membrana. Estos procesos son fundamentales, ya que permiten coordinar y sincronizar la rápida liberación de neurotransmisores cuando las concentraciones de calcio aumentan [174].

Las modificaciones post-traduccionales (MPT) podrían ser las responsables de determinar el papel inhibitorio o facilitador de las complexinas en la sinapsis. Se han reportado que la complexina 1 se une con mayor afinidad a los complejos SNARE cuando está fosforilada en su serina 115, alterando la conformación del dominio de unión a SNARE de la complexina. Los efectos de esta fosforilación en la sinapsis no han sido esclarecidos todavía, pero se cree que puede ser fundamental para la inhibición de la liberación rápida de neurotransmisores [175]. Debido a la importancia que podrían tener las MPT para la función de la complexina, la identificación y análisis de las MPT presentes en las distintas isoformas de las complexinas sobre-expresadas en los CRT-PBS representa un enfoque fundamental para entender cómo éstas influyen en la función de la complexina en el cerebro durante el desarrollo tumoral.

Como se mencionó anteriormente, la sobre-expresión de la CPLX1 también se ha asociado a enfermedades neurodegenerativas (Tabla 7) y a déficits cognitivos [166], así como a mecanismos compensatorios que contribuyan la correcta liberación vesicular [176], por lo que sus cambios en los CRT-PBS podrían reflejar alteraciones en la regulación de la actividad sináptica cerebral y estar relacionados con los déficits cognitivos reportados en pacientes con cáncer en etapas terminales [177].

### **10.3.2 GLO1**

La enzima glioxalasa 1 (GLO1) se expresa de manera ubicua en todas las células de mamíferos [178]. Su función principal es la de detoxificar los niveles citotóxicos de metilglioxal (MG) y glioxal (GX), los cuales son precursores de los productos de la glicación avanzada (AGE por sus siglas en inglés: advanced glycation end products) [83]. Al igual que el MG, los AGEs son elementos tóxicos para la célula y sus niveles elevados están asociados a estrés

oxidativo y apoptosis [179].

El sistema de detoxificación mediante glioxalinas es indispensable en todos los tejidos del ser humano, interactuando con diversas cascadas de vías metabólicas asociadas a múltiples procesos como apoptosis, glicólisis y respuesta a estrés oxidativo [162]. Cambios en la actividad y expresión de GLO1 en el cerebro, así como en los niveles de su sustrato MG, también están asociados a depresión, ansiedad, esquizofrenia, desórdenes de pánico, autismo, epilepsia y al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como AD y PD [180] (Tabla 7). Dentro de los desórdenes previamente mencionados, la ansiedad es el que se ha visto más asociado a cambios de GLO1 en el cerebro [181]. La ansiedad, a su vez, es uno de los factores psicológicos más comunes que afectan significativamente a los pacientes con cáncer [182], por lo que la elevada expresión de GLO1 en CRT-PBS podría sugerir que cambios en esta proteína influyen en los desórdenes de ansiedad que presentan los pacientes con cáncer.

Además, la sobre-expresión GLO1 podría reflejar una contribución a la neuroprotección bajo condiciones de estrés inducidas por la presencia de tumores, propiciando la viabilidad celular y la habilidad de proteger a las neuronas de la toxicidad [83]. El papel protector de GLO1 ya ha sido reportado en enfermedades neurodegenerativas, como AD, para evitar el aumento en las concentraciones de MG y GX, mantener sus niveles fisiológicos aceptables y contrarrestar el estrés oxidativo característico de esta enfermedad. También contribuye a disminuir los niveles de AGEs, los cuales se han visto implicados en la formación de agregados insolubles como placas amiloideas y ovillos neurofibrilares y en la activación de células gliales, promoviendo inflamación y disfunción neuronal [179].

Otra característica interesante de GLO1 en daño cerebral es su localización celular. En condiciones normales, ésta se localiza predominantemente en células endoteliales cerebrales mientras que en daño neuronal además de aumentar su expresión se redistribuye a neuronas y astrocitos como un mecanismo de sobrevivencia para prevenir la muerte excitotóxica [183]. Una vez en las neuronas, GLO1 tiene una redistribución del citosol a la membrana neuronal después del daño [84]. A pesar de que no se ha definido a detalle la función de estas redistribuciones, se sugiere que es fundamental para su función protectora neuronas dañadas, por lo que la determinación de la localización y distribución de GLO1 en CRT-PBS podrían contribuir al estudio y análisis del papel de GLO1 cerebral durante el desarrollo tumoral.

### **10.3.3 PSA6**

La degradación vía UPS es un proceso altamente regulado que requiere que la proteína blanco se marque mediante ubiquitinación para posteriormente ser reconocida por el complejo proteosoma 26S [85]. El complejo 26S tiene un componente catalítico (20S) y uno regulatorio (19S), el cual reconoce y se une a las proteínas ubiquitiladas [128].

El componente catalítico 20S se compone a su vez de 14 subunidades codificadas por genes tipo alfa y beta. Las subunidades alfa no tienen actividad catalítica y se sugiere que son subunidades regulatorias, mientras que las beta son las que presentan la actividad catalítica.

La unidad 20S puede ser funcional sin la unidad 19S y, a diferencia del complejo 26S, actuar independientemente de la presencia de ATP o ubiquitina [129]. Aunado a lo anterior, la unidad 20S es un complejo dinámico capaz de sobrellevar cambios que le permitan cumplir las necesidades proteolíticas requeridas por la célula. Para llevar esto a cabo, se han reportado reacomodos y cambios en la expresión de sus subunidades [104].

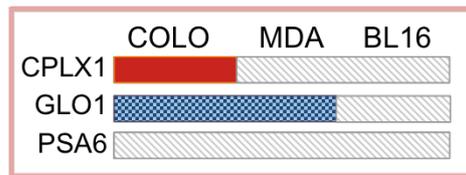
Se han identificado múltiples isoformas de las subunidades del proteosoma resultado de distintas modificaciones post-traduccionales (MPT) [152], por lo que la identidad electroforética identificada en los geles 2D podría tratarse de una isoforma con una MPT que el anticuerpo utilizado no sea capaz de reconocer.

Futuros análisis son necesarios para determinar si las diferencias en los niveles de expresión de la PSA6 encontrada en los CRT-PBS corresponden a una MPT que se sobre-regule, particularmente en tiempos más avanzados del desarrollo tumoral. Las modificaciones de esta isoforma podrían ser reflejo de la respuesta del cerebro a una acumulación de estrés proteolítico por proteínas mal plegadas. Tal es el caso en AD, donde las isoformas con MPT, como acetilaciones y fosforilaciones, difieren en su abundancia entre muestras de pacientes enfermos y pacientes sanos, contribuyendo a cambios en la actividad catalítica. Por ejemplo, se ha visto que las fosforilaciones en las subunidades afectan la interacción del 20S con otras proteínas, ya sea ayudando a la interacción y degradación o viceversa [152].

Cabe mencionar que debido a que el análisis de expresión estuvo restringido a solo 3 proteínas es necesario ampliar el estudio para las demás proteínas identificadas y así describir su dinámica durante los distintos tiempos del desarrollo tumoral. Además el análisis de éstas en tiempos tempranos permitirá determinar qué proteínas son las primeras en alterar su expresión y conocer las primeras respuestas a nivel molecular en el cerebro debido a la presencia de tumores lejanos de SiHa.

#### **10.4 Expresión de GLO1, CPXL1 Y PSA6 en cerebros de ratones con tumores de distintas líneas celulares de cáncer.**

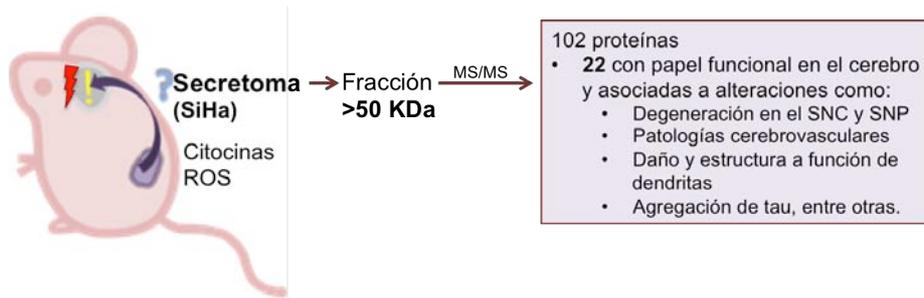
Cada tipo de cáncer tiene características particulares y comportamientos distintos dependiendo de su localización y estirpe celular de origen. El análisis de GLO1 y CPLX1 mostró que dentro de estas características particulares, tumores de distintos orígenes celulares son capaces de desencadenar distintos cambios de expresión en proteínas cerebrales. Algunos de estos cambios pueden compartirse entre algunos tumores pero no son una generalidad a la presencia de un tumor. Por ejemplo, CPLX1 aumentó su expresión en la presencia de tumores de SiHa y COLO205 pero no sufrió cambios con los tumores de MDA y BL16. El análisis de GLO1, por otra parte, ilustró que distintos tumores son capaces de alterar la misma proteína cerebral pero de manera opuesta, ya que en CRT-PBS de SiHa GLO1 aumentó su expresión, mientras que en los CRT-PBS de COLO205 y MDA, GLO1 tuvo un decremento en su expresión (Fig. 23 y 26).



**Fig. 26.** Diferencias en la expresión de CPLX1, GLO1 y PSA6 en cerebros de ratones con tumores de COLO, MDA y BL16. Para cada para cada proteína se ilustra la dinámica de expresión obtenida mediante el análisis de WB para cada tumor analizado. El color rojo representa aumento de expresión, el color azul indica subexpresión y las diagonales indican que no se detectaron cambios de expresión en ese tiempo.

COLO205 y MDA son líneas celulares que provienen de adenocarcinomas, mientras que SiHa proviene de un carcinoma de células escamosas [70,186]. Esto permite proponer que el tipo celular y tejido de dónde provienen la líneas celulares contribuye a las diferencias observadas para GLO1: bajos niveles en COLO205 y MDA podrían ser una característica de adenocarcinomas, mientras altos niveles en SiHa podrían ser un fenómeno común en carcinomas de células escamosas. Para corroborar esta hipótesis, son necesarios estudios enfocados a la búsqueda de proteínas diferencialmente expresadas que sean comunes en los CRT generados a partir de distintas líneas celulares de cáncer humano que tengan como origen común a células escamosas, así como de aquellas diferencialmente expresadas en presencia de tumores originados a partir de líneas celulares de adenocarcinomas. Cabe destacar que lo anterior no descarta la posibilidad de que también haya cambios en el tejido cerebral que sean una generalidad para cualquier tipo de cáncer. Futuros análisis que tomen en cuenta un mayor muestreo de cerebros de ratones con tumores de distintos órganos, tomando en cuenta tumores con el mismo y distinto origen celular, presentan un nuevo enfoque para la búsqueda de nuevas propiedades, ya sean para el cáncer en general o para cada tipo particular de cáncer.

El hallazgo de diferencias significativas en la expresión proteica en el cerebro como consecuencia de la presencia de tumores lejanos pone en evidencia la complejidad, tanto del cáncer como de los efectos que tienen los tumores en el organismo. Un enfoque implementado en el laboratorio que busca analizar y describir el secretoma de la línea celular modelo utilizada en el presente proyecto (SiHa) sugiere que proteínas presentes en el secretoma del tumor podría contribuir a los cambios observados en los cerebros. Datos todavía no reportados muestran que el tratamiento de neuronas mHypoE-N1 con la fracción >50 KDa del secretoma de SiHa presentan menor crecimiento (~50%) después de 48 horas del tratamiento. El análisis de masas/masas de esta fracción ha identificado hasta el momento 102 proteínas en la fracción, de las cuáles 22 tienen un papel funcional en el cerebro, pudiendo ser proteínas onconeuronales que contribuyan a desencadenar los cambios y alteraciones cerebrales (Fig. 27) [185]. Es fundamental el estudio sobre cómo es que el tumor logra comunicarse o ejercer estos efectos sobre órganos lejanos para poder abrir rutas para el entendimiento, tratamiento y prevención del cáncer o algunas de sus características particulares.



**Fig. 27.** Posible participación del secretoma de tumores de SiHa en el tejido cerebral. En el modelo se ilustra los factores que podrían contribuir a los cambios de expresión cerebral durante el desarrollo tumoral. ROS=Especies reactivas de oxígeno, KDa= Kilo Daltones. SNC=Sistema Nervioso Central. SNP=Sistema Nervioso Periférico.

Aunque si bien es complejo determinar la sobre y sub-expresión de proteínas en órganos lejanos al tumor –y más aún, enfocarse en estudiar específicamente un conjunto de proteínas dentro de la gran variedad que se ven alteradas- este estudio comprueba que el análisis de distintos órganos y tejidos puede servir como un enfoque para la el estudio del cáncer y demuestra la importancia de continuar con esta línea de investigación y tomar el análisis de la expresión proteica diferencial de tejidos lejanos como una herramienta fundamental para entender, prevenir y tratar el cáncer y sus padecimientos asociados. Por ejemplo, análisis en los cambios de expresión de los órganos lejanos podría ayudar a determinar los cambios necesarios para la generación de nichos pre-metastásicos que provean un microambiente permisivo para la invasión de células tumorales.

## **11. Conclusión**

El presente proyecto es el primer estudio en analizar y estudiar a nivel proteómico los cambios en el cerebro durante distintas etapas del desarrollo tumoral y propone una comunicación compleja y dinámica entre el cerebro y un tumor distante. En este estudio, los cerebros de ratones presentaron cambios de expresión proteica durante el desarrollo de un tumor distante de cáncer cérvico uterino. La función y variación de expresión de las proteínas analizadas en los CRT, nos permite proponer que durante el desarrollo tumoral se generan cambios que activan procesos asociados a daño cerebral y que, al mismo tiempo, el cerebro activa mecanismos de defensa y protección para contrarrestar y reparar estas alteraciones. Los resultados presentados en este trabajo manifiestan la importancia de futuros análisis enfocados en el estudio del tejido cerebral y otros órganos lejanos al tumor para determinar la respuesta y del organismo durante la progresión del cáncer, así como para determinar el papel del organismo en el desarrollo tumoral y así tener una mejor comprensión de la biología y del cáncer, encaminada a la prevención, diagnóstico oportuno y tratamientos más efectivos.

## **12. Perspectivas**

- Identificar las proteínas diferencialmente expresadas faltantes y ampliar el análisis de expresión diferencial tomando en cuenta los cerebros de ratones con tumores de tiempos tempranos (5, 15 y 25 días) con el objetivo de determinar y definir la dinámica de expresión en el cerebro durante varias etapas del desarrollo tumoral de SiHa.
- Establecer las regiones cerebrales donde se están sobre-expresando GLO1, CPLX1 y otras proteínas de interés, ya que conocer su ubicación y distribución en el cerebro así como su tipo celular puede ayudar a inferir su función, además de determinar las regiones cerebrales que presentan más cambios durante el desarrollo tumoral.
- Determinar la localización a nivel subcelular de GLO1 y CPLX1 y examinar si en la presencia de tumores éstas presentan cambios en su ubicación que permitan determinar si existen redistribuciones que influyan o alteren su función.
- Caracterizar las posibles modificaciones post-traduccionales que sufren la CPLX1 y PSA6 y determinar la relevancia de éstas para su función y participación en el cerebro durante el desarrollo tumoral.
- Describir los cambios en la expresión proteica cerebral tomando en cuenta un muestreo mayor usando tumores originados a partir de diversas líneas celulares de cáncer y determinar los cambios generales, así como los cambios particulares y los compartidos en tumores provenientes del mismo tipo celular (células escamosas y adenocarcinomas) y tumores provenientes del mismo órgano/tejido.
- Hacer un análisis enfocado en la búsqueda de agregados proteicos (tau, amiloide, etc.) para corroborar si las proteínas analizadas en este estudio contribuyen a la formación de agregados similares a las enfermedades neurodegenerativas a las que han sido asociadas.
- Llevar cabo análisis conductuales y cognitivos que permitan determinar si la presencia y el desarrollo de tumores lejanos genera cambios en el comportamiento y aprendizaje en los ratones.
- Determinar si el secretoma del tumor es el responsable de los cambios observados en el tejido cerebral, y de ser así, qué tipo de moléculas inducen estos cambios.
- Implementar el enfoque utilizado en este estudio para otros órganos distantes con el fin de esclarecer la relación y comunicación entre organismo-tumor lejano.

### 13. Bibliografía

1. Vincent T. Devita, Samuel Hellman, Steven A. Rosenberg. **Cancer: Principles and Practice of Oncology**. 6th edition. USA. Lippincott Williams & Wilkins Publishers. 2001. 95p.
2. Robert A. Weinberg. **How Cancer Arises**. *Scientific American*. 1996. 275:62–70.
3. Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg. **The Hallmarks of Cancer: Next Generation**. *Cell*. 2011. 144:646-674.
4. Bert Vogelstein and Kenneth W. Kinzler. **The multistep nature of cancer**. *Trends in Genetic* 1993. 9(4):138-41.
5. Robert A. Weinberg. **The Biology of Cancer**. USA. Garland Science. 2006.
6. Globocan 2012: **Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)
7. **World Cancer Research Fund International: Cervical Cancer**. [http://www.wcrf.org/cancer\\_statistics/data\\_specific\\_cancers/cervical\\_cancer\\_statistics.php](http://www.wcrf.org/cancer_statistics/data_specific_cancers/cervical_cancer_statistics.php)
8. **American Cancer Society; What is cervical cancer?** <http://www.cancer.org/cancer/cervicalcancer/detailedguide/>
9. Thomas E. Rohan, Keerti V. Shah. **Cervical cancer: from etiology to prevention**. USA. Springer, 2004. XXVII p.
10. Alan Stevens. **Histología Humana**. 3ª Edición. Elsevier Mosby. 2006. 352p.
11. Don S. Dizon, Paul DiSilvestro, Michael L. Krychman. **100 Questions & Answers about Cervical Cancer**. *Jones & Bartlett Learning*. 2008. 39-43.
12. F. Xavier Bosch, Nubia Muñoz. **The viral etiology of cervical cancer**. *Virus Research*. 2002. 89: 183 - 190.
13. Xavier Castellsagué, F. Xavier Bosch, Nubia Muñoz. **Environmental co-factors in HPV carcinogenesis**. *Virus Research*. 2002. 89: 191-199.
14. G Sanclemente, DK Gill. **Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis**. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2002. 16: 231– 240.
15. Thomas, M. *et al.* **Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity**. *Oncogene*. 2008. 27: 7018–7030.
16. Cary A. Moody, Laimonis A. Laimins. **Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation**. *Nature Reviews Cancer*. 2010. 10: 550-560.
17. Jonathan R. Carter, Zongqun Ding and Barbara R. Rose. **HPV infection and cervical disease: A review**. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2011. 51: 103–108.
18. Catherine C. Park, Mina J. Bissell and Mary Helen Barcellos-Hoff. **The influence of the microenvironment on the malignant phenotype**. *Molecular Medicine Today*. 2000. 6: 324 - 329
19. Singh S. and Kaur H. **Tumor microenvironment: A review**. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol*. 2013.
20. Margareta M. Mueller and Norbert E. Fusenig. **Friends or foes - bipolar effects of the tumor stroma in cancer**. *Nature Reviews Cancer*. 2004. 4: 839 - 849.
21. Johanna A. Joyce and Jeffrey W. Pollard. **Microenvironmental regulation of metastasis**. *Nature Reviews Cancer*. 2009. 9: 239-252.
22. Sandra S. McAllister and Robert A. Weinberg. **Tumor-Host Interactions: A Far-Reaching Relationship**. *Journal of Clinical Oncology*. 2010. 28 (26): 4022 - 4028.
23. Rosandra N. Kaplan *et al.* **VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche**. *Nature*. 2005. 438: 820-827.
24. Sachie Hiratsuka *et al.* **MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis**. *Cancer Cell*. 2002. 2: 289-300.
25. Yang L. *et al.* **Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis**. *Cancer Cell*. 2004. 6(4): 409-421.
26. Yang L. *et al.* **Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr- 1+CD11b+ myeloid cells that promotes metastasis**. *Cancer Cell*. 2008. 13(1): 23-35.
27. Mi-Young Kim *et al.* **Tumor Self-Seeding by Circulating Cancer Cells**. *Cell*. 2009. 139: 1315– 1326.
28. Mikala Egeblad, Elizabeth S. Nakasone and Zena Werb. **Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism**. *Dev Cell*. 2010 June 15; 18(6): 884–901.
29. Bast R. Jr., Kufe D., Pollock R., *et al.*. **Holland-Frei Cancer Medicine. 5th edition. Chapter 157: Infections in Patients with Cancer**. *Hamilton*. 2000.
30. Atsushi Hiraoka *et al.* **Three cases of liver abscesses complicated with colon cancer without liver metastasis: importance of screening for digestive disease**. *Intern Med*. 2007. 46 (24): 2013-7.
31. Hussain *et al.* **Gastric obstruction secondary to metastatic breast cancer: a case report and literature review**. *Journal of Medical Case Reports*. 2012, 6:232.
32. Everson L *et al.* **Surgery or Endoscopy for Palliation of Biliary Obstruction Due to Metastatic Pancreatic Cancer**. *American Journal of Gastroenterology*. 2006. 101: 2031–2037
33. Christophe E. Redon *et al.* **Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo**. *PNAS*. 2010. 107(42): 17992–17997.

34. Olga A. Martin, Christophe E. Redon, Asako J. Nakamura, et al. **Systemic DNA Damage Related to Cancer.** *Cancer Res.* 2011. 71: 3437-3441.
35. Richard S. Snell. **Neuroanatomía Clínica.** 6a Edición. México. *Editorial Médica Panamericana.* 2007. 2-74.
36. LA Weisberg, C. García. **Essentials of Clinical Neurology: Neurologic Complications of Systemic Diseases.** Chapter 22.
37. Pierre Giglio and Mark R. Gilbert. **Neurologic Complications of Cancer and its Treatment.** *Curr Oncol Rep.* 2010. 12: 50–59.
38. Mustafa Khasraw and Jerome B. Posner. **Neurological complications of systemic cancer.** *Lancet Neurol.* 2010. 9: 1214–27.
39. Michael Miovic and Susan Block. **Psychiatric Disorders in Advanced Cancer.** *Cancer.* 2007. 110 (8): 1665 - 1676.
40. Swarnali Acharyya *et al.* **Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products.** *J. Clin. Invest.* 2004. 114: 370–378.
41. Carlos Camps *et al.* **Anorexia–Cachexia syndrome in cancer: implications of the ubiquitin–proteasome pathway.** *Support Care Cancer.* 2006. 14: 1173–1183.
42. Eduardo J.B. Ramos *et al.* **Cancer anorexia-cachexia syndrome: cytokines and neuropeptides.** *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.* 2004. 7 :427–434.
43. Mireia Coma *et al.* **Impaired voltage-gated K+ channel expression in brain during experimental cancer cachexia.** *FEBS Letters.* 2003. 536: 45-50.
44. Robert B. Darnell and Jerome B. Posner. **Paraneoplastic Syndromes Affecting the Nervous System.** *Seminars in Oncology.* 2006. 33:270-298.
45. Matthew L. Albert and Robert B. Darnell. **Paraneoplastic neurological degenerations: keys to tumour immunity.** *Nature.* 2004. 4: 36 – 44.
46. Francesc Grausa and Josep Dalmaub. **Paraneoplastic neurological syndromes: diagnosis and treatment.** *Curr Opin Neurol.* 2007. 20: 732–737.
47. F. Leyboldt and K.P. Wandinger. **Paraneoplastic neurological syndromes.** *Clinical and Experimental Immunology.* 2013. 175: 336–348.
48. Kelly Jo Baldwin, Sasa A. Zivkovi and Frank S. Lieberman. **Neurologic Emergencies in Patients Who Have Cancer: Diagnosis and Management.** *Neurol Clin.* 2012. 30: 101–128.
49. Alixis Van Horn *et al.* **Neurologic Complications of Cancer and Cancer Therapy.** *Clinical Journal of Oncology Nursing.* 2013. 17(4): 418 – 424.
50. MedlinePlus. **Enfermedades de la médula espinal.**  
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/spinalcorddiseases.html>
51. J. K. Kiecolt - Glaser *et al.* **Psycho-oncology and cancer: psychoneuroimmunology and cancer.** *Ann. Oncol.* 2002. 13(4): 165 - 169.
52. Lei Cao and Matthew J. During. **What Is the Brain-Cancer Connection?.** *Annu. Rev. Neurosci.* 2012. 35: 331-345.
53. Premal H. Thaker and Anil K. Sood. **The Neuroendocrine Impact of Chronic Stress on Cancer.** *Semin Cancer Biol.* 2008. 18(3): 164–170.
54. Michael H. Antoni *et al.* **The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms.** *Nat Rev Cancer.* 2006 March 6(3): 240–248.
55. Hildegard M.Schuller *et al.* **Regulation of pancreatic cancer by neuropsychological stress responses: a novel target for intervention.** *Carcinogenesis.* 2011. 33 (1):191–196.
56. Premal H Thaker *et al.* **Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma.** *Nature Medicine.* 2006. 12(8): 939–944.
57. Lei Cao *et al.* **Environmental and Genetic Activation of a Brain-Adipocyte BDNF/Leptin Axis Causes Cancer Remission and Inhibition.** *Cell.* 2010. 142: 52–64.
58. Catherine Liebig *et al.* **Perineural invasion in cancer: a review of the literature.** *Cancer.* 2009. 115 (15): 3379-91.
59. Yang G *et al.* **Perineural invasion of prostate carcinoma cells is associated with reduced apoptotic index.** *Cancer.* 78(6): 1267-71.
60. Gustavo E. Ayala *et al.* **In Vitro Dorsal Root Ganglia and Human Prostate Cell Line Interaction: Redefining Perineural Invasion in Prostate Cancer.** *The Prostate.* 2001. 49: 213-223.
61. Claire Magnon *et al.* **Autonomic Nerve Development Contributes to Prostate Cancer Progression.** *Science* 2013. **341:** 1-10.
62. Ríos de Anda M. E. Mitzy. **Análisis proteómico del tejido cerebral de ratones atímicos xenotransplantados con la línea celular de Cáncer Cérvico Uterino SiHa.** Tesis (Licenciatura en Ciencias Genómicas). Morelos, México. Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Ciencias Genómicas. 2012.

63. Delgadillo Silva Luis Fernando. **Dinámica Proteómica en Tumores de Cáncer Cérvico Uterino**. Tesis (Licenciatura en Ciencias Genómicas). Morelos, México. Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Ciencias Genómicas. 2011.
64. Nawin Mishra. **Introduction to proteomics. Principles and Applications**. John Wiley & Sons, Inc.
65. Paul R. Graves and Timothy A. J. Haystead. **Molecular Biologist's Guide to Proteomics**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002. 6(1): 39–63.
66. Samir Hanash and Ayumu Taguchi. **The grand challenge to decipher the cancer proteome**. *Nature*. 2010. 10: 652 - 660.
67. Michael Fountoulakis. **Application of proteomics technologies in the investigation of the brain**. *Mass Spectrometry Reviews*. 2004. 23: 231– 258.
68. Teicher, Beverly A. **Tumor Models in Cancer Research**. 2nd Edition. Humana Press. Series: Cancer Drug Discovery and Development. 2011. 99-105.
69. Ye F. *et al.* **Establishment of a cervical cancer model via inoculating SiHa Cells into humanized severe combined immunodeficient mice**. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 2006. 27(6): 566-572.
70. ATCC. Product description. Cell Biology. SiHa: <http://www.atcc.org/Products/All/HTB-35.aspx>
71. Carole Yee *et al.* **Presence and Expression of Human Papillomavirus Sequences in Human Cervical Carcinoma Cell Lines**. *American Journal of Physiology*. 1985. 119 (3): 361-366.
72. National Cancer Institute. **Transplatation mouse Models**. <http://emice.nci.nih.gov/aam/mouse/transplantation-mouse-models-1>
73. Robert Clarke. **Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer - The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines**. *Breast cancer Research and Treatment*. 1996. 39: 68-86.
74. Mary M. Tomayko and Patrick Reynolds. **Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice**. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1989. 24(3)148-154.
75. Sergio Encarnación *et al.* **Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulons and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes**. *Biol. Proced. Online*. 2005. 7(1): 117-135.
76. Max A. Tischfield and Elizabeth C. Engle. **Distinct  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin isotypes are required for the positioning, differentiation and survival of neurons- new support for the 'multi-tubulin' hipótesis**. *Bioscience Reports*. 2010. 30:319-330.
77. Katsetos, C.D., Herman, M.M. & Mo, S.J. **Class III  $\beta$  -Tubulin in Human Development and Cancer**. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 2003. 96: 77-96.
78. Tabas-Madrid D, Nogales-Cadenas R, Pascual-Montano A: **GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics**. *Nucleic Acids Research*. 2012.
79. Nogales-Cadenas R, *et al.* **GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information**. *Nucleic Acids Research*. 2009.
80. Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. **GENECODIS: A web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists**. *Genome Biology*. 2007. 8(1).
81. Nils Brose. **For Better or for Worse: Complexins Regulate SNARE Function and Vesicle Fusion**. *Traffic*. 2008. 9: 1403–1413.
82. Min Jea Shin *et al.* **Tat-glyoxalase protein inhibits against ischemic neuronal cell damage and ameliorates ischemic injury**. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014. 67: 195–210.
83. Björn Kuhla *et al.* **Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains**. *Neurobiology of Aging*. 2007. 28: 29–41.
84. Philipp Pieroh, Gerd Birkenmeier and Faramarz Dehghani. **The temporal and spatial dynamics of glyoxalase I following excitotoxicity and brain ischaemia**. *Biochemical Society Transactions*. 2014. 42: 534–537.
85. Margarida V. Caldeira *et al.* **Role of the ubiquitin–proteasome system in brain ischemia: Friend or foe?**. *Progress in Neurobiology*. 2014. 112: 50–69.
86. Christer Ericsson and Monica Nistér. **Methods in Biobanking, Methods in Molecular Biology**. Joakim Dillner (ed.). 2011. Vol. 675. Chapter 17. *Protein Extraction from Solid Tissue*. pp:307-312.
87. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, *et al.*, editors. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. Chapter 32. Blood—Brain—Cerebrospinal Fluid Barriers.
88. C. Legrand *et al.* **Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker**. *Journal of Biotechnology*. 1992. 25: 231-243.
89. Jordan T. Newington, Richard A. Harris, and Robert C. Cumming. **Reevaluating Metabolism in Alzheimer's Disease from the Perspective of the Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle Model**. *Journal of Neurodegenerative Diseases*. 2013. 4: 1-13.
90. Nathalie Delgehyr *et al.* **Drosophila Mgr, a Prefoldin subunit cooperating with von Hippel Lindau to regulate tubulin stability**. *PNAS*. 2012. 109 (15): 5729–5734.

91. Karin Margareta Sörgjerd *et al.* **Human Prefoldin Inhibits Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) Fibrillation and Contributes to Formation of Nontoxic A $\beta$  Aggregates.** *Biochemistry*. 2013. 52: 3532–3542.
92. Pamela G. Galloway *et al.* **Immunohistochemical Demonstration of Tropomyosin in the Neurofibrillary Pathology of Alzheimer's Disease Neurofibrillary pathology (NFP).** *American Journal of Pathology*. 1990. 137(2): 291–300.
93. Xinmin Wu *et al.* **Increased expression of actin filament-stabilizing protein tropomyosin after rat traumatic brain injury.** *J Mol Hist*. 2013. 44:37–45.
94. H. Fai Poon *et al.* **Proteomic identification of differentially expressed proteins in the aging murine olfactory system and transcriptional analysis of the associated genes.** *Journal of Neurochemistry*. 2005. 94: 380–392.
95. Jin-Moo Lee *et al.* **The Brain Injury Biomarker VLP-1 Is Increased in the Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's Disease Patients.** *Clinical Chemistry*. 2008. 54(10): 1–7.
96. Karl H. Braunevel. **The visinin-like proteins VILIP-1 and VILIP-3 in Alzheimer's disease—old wine in new bottles.** *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2012. 5(20): 1–12.
97. Anne M. Fagan *et al.* **Longitudinal Change in CSF Biomarkers in Autosomal-Dominant Alzheimer's Disease.** *Science Translational Medicine*. 2014. 6:226–230.
98. Shun Shimohama *et al.* **Changes of neurocalcin, a calcium-binding protein, in the brain of patients with Alzheimer's postmortem normal human and Alzheimer's disease (AD) brains disease.** *Brain Research*. 1996. 716: 233–236.
99. Omar F. Laterza *et al.* **Identification of Novel Brain Biomarkers.** *Clinical Chemistry*. 2006. 52(9): 1713–1721.
100. Kosei Ojika *et al.* **Hippocampal cholinergic neurostimulating peptides (HCNP).** *Progress in Neurobiology*. 2000. 60: 37–83.
101. Norihiko Uematsu *et al.* **Overexpression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide in heterozygous transgenic mice increases the amount of ChAT in the medial septal nucleus.** *Brain Research*. 2009. 1305: 150–157.
102. Li Wang *et al.* **Phosphatidylethanolamine binding protein 1 in vacular endothelial cell autophagy and atherosclerosis.** *J Physiol*. 2013. 591(20): 5005–5015.
103. Jeffrey N. Keller, Keith B. Hanni and William R. Markesbery. **Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress multicatalytic proteasome (MCP).** *Mechanisms of Ageing and Development*. 2000. 113: 61–70.
104. Jeffrey N. Keller, Jillian Gee and Qunxing Ding. **The proteasome in brain aging.** *Ageing Research Reviews*. 2002. 1:279–293.
105. Masaaki Kobayashi *et al.* **Hippocalcin mediates calcium-dependent translocation of brain-type creatine kinase (BB-CK) in hippocampal neurons.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012. 429: 142–147.
106. Akira Abe *et al.* **Prefoldin plays a role as a clearance factor in preventing proteasome inhibitor-induced protein aggregation.** *J. Biol. Chem*. 2013, 288: 27764–27776.
107. Mariko Takano *et al.* **Prefoldin prevents aggregation of  $\alpha$ -synuclein.** *Brain Research*. 2014. 1542: 186–194.
108. Erika Tashiro *et al.* **Prefoldin Protects Neuronal Cells from Polyglutamine Toxicity by Preventing Aggregation Formation.** *J. Biol. Chem*. 2013. 288: 19958–19972.
109. W. Scheper *et al.* **Rab6 is increased in Alzheimer's disease brain and correlates with endoplasmic reticulum stress.** *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2007. 33: 523–532.
110. Hyung Lim Elfrink *et al.* **Rab6 is a Modulator of the Unfolded Protein Response: Implications for Alzheimer's Disease.** *Journal of Alzheimer's Disease*. 2012. 28: 917–929.
111. Gaël F. Hédou *et al.* **Protein Phosphatase 1-Dependent Bidirectional Synaptic Plasticity Controls Ischemic Recovery in the Adult Brain.** *The Journal of Neuroscience*. 2008. 28(1): 154–162.
112. Jimcy Platholi *et al.* **Activation of brain protein phosphatase-1 following cardiac arrest and resuscitation involving an interaction with 14-3-3 $\gamma$ .** *Journal of Neurochemistry*. 2008. 105: 2029–2038.
113. Yu-Zhen Gao *et al.* **Possible involvement of integrin signaling pathway in the process of recovery from restraint stress in rats.** *Neuroscience Bulletin*. 2007. 23(4): 229–235.
114. Kevin D. Sarge and Ok-Kyong Park-Sarge. **Sumoylation and human disease pathogenesis.** *Trends in Biochemical Sciences*. 2009. 34(4): 200–205.
115. Wei Yang *et al.* **Small ubiquitin-like modifier 1–3 is activated inhuman astrocytic brain tumors and is required for glioblastoma cell survival.** *Cancer Science*. 2013. 104(1): 70–77.
116. Chun Guo and Jeremy M. Henley. **Wrestling with Stress: Roles of Protein SUMOylation and deSUMOylation in Cell Stress Response.** *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 2014. 66 (2): 71–77.
117. Wei Yang *et al.* **Transient global cerebral ischemia induces a massive increase in protein sumoylation.** *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2008. 28: 892–896.

118. Wei Yang *et al.* **Deep hypothermia markedly activates the small ubiquitin-like modifier conjugation pathway; implications for the fate of cells exposed to transient deep hypothermic cardiopulmonary bypass.** *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2009. 29: 886–890.
119. Iiris Hovatta, Juuso Juhilaa and Jonas Donner. **Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders.** *Neuroscience Research.* 2010. 68: 261–275.
120. Thomas Küntzige *et al.* **Protein phosphatase 1 regulators in DNA damage signaling.** *Cell Cycle.* 2011. 10(9): 1356-1362.
121. Warner B Bair III *et al.* **GLO1 Overexpression in Human Malignant Melanoma.** *Melanoma Res.* 2010. 20(2): 85–96.
122. Mingzhan Xue *et al.* **Transcriptional control of glyoxalase 1 by Nrf2 provides a stress-responsive defence against dicarbonyl glycation.** *Biochem. J.* 2012. 443: 213–222.
123. Benny Björklom *et al.* **Parkinson Disease Protein DJ-1 Binds Metals and Protects against Metal-induced Cytotoxicity.** *J. Biol. Chem.* 2013. 288: 22809-22820.
124. Yuji Kaneko, Naoki Tajiri, Hideki Shojo and Cesar V. Borlongan. **Oxygen–Glucose-Deprived Rat Primary Neural Cells Exhibit DJ-1 Translocation into Healthy Mitochondria: A Potent Stroke Therapeutic Target.** *CNS Neuroscience & Therapeutics.* 2014. 20: 275–281.
125. Yuji Kaneko *et al.* **DJ-1 ameliorates ischemic cell death in vitro possibly via mitochondrial pathway.** *Neurobiology of Disease.* 2014. 62: 56–61.
126. Philipp J. Kahle, Jens Waak and Thomas Gasser. **DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders.** *Free Radical Biology & Medicine.* 2009. 47: 1354–1361.
127. Kelvin J.A. Davies. **Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome.** *Biochimie.* 2001. 83: 301–310.
128. Hwan-Ching Tai. **Characterization of the brain 26S proteasome and its interacting proteins.** *Front Mol Neurosci.* 2010. 3(12): 1-19.
129. Friguet B, Bulteau AL, Chondrogianni N, Conconi M and Petropoulos I. **Protein Degradation by the Proteasome and Its Implications in Aging.** *Ann N Y Acad Sci.* 2000. 908:143-154.
130. Jeriel T. R. Keeney *et al.* **Apolipoprotein A-I: Insights from redox proteomics for its role in neurodegeneration.** *Proteomics Clin. Appl.* 2013. 7: 109–122.
131. Chunjong Wang *et al.* **Hepatic Overexpression of ATP Synthase 13 Subunit Activates PI3K/Akt Pathway to Ameliorate Hyperglycemia of Diabetic Mice.** *Diabetes.* 2014. 63: 947-959.
132. Radosveta P. Koldamova, Iliya M. Lefterov, Martina I. Lefterova, and John S. Lazo. **Apolipoprotein A-I Directly Interacts with Amyloid Precursor Protein and Inhibits AB Aggregation and Toxicity.** *Biochemistry.* 2001. 40: 3553-3560.
133. J K Boyles, L M Notterpek and L J Anderson. **Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve.** *J. Biol. Chem.* 1990. 265: 17805-17815.
134. Mikihiko Kawano *et al.* **Marked decrease of plasma apolipoprotein AI and AII in Japanese patients with late-onset non-familial Alzheimer's disease.** *Clinica Chimica Acta.* 1995. 239: 209-211.
135. Norihiko Uematsu *et al.* **Overexpression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide in heterozygous transgenic mice increases the amount of ChAT in the medial septal nucleus.** *Brain Research.* 2009. 1305: 150–157.
136. Yasukuni Tsugu *et al.* **High levels of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP) in the CSF of some patients with Alzheimer's disease.** *European Journal of Neurology.* 1998. 5: 561-569.
137. Kosei Ojika *et al.* **Hippocampal cholinergic neurostimulating peptides (HCNP).** *Progress in Neurobiology.* 2000. 60: 37-83.
138. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, *et al.*, editors. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.** 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. Chapter 10. Synaptic Transmission and Cellular Signaling: An Overview.
139. Martin Begemann *et al.* **Modification of Cognitive Performance in Schizophrenia by Complexin 2 Gene Polymorphisms.** *Arch Gen Psychiatry.* 2010. 67(9): 879-888.
140. Andréa C. Paula-Lima *et al.* **Human apolipoprotein A-I binds amyloid-B and prevents AB-induced neurotoxicity.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2009. 41: 1361–1370.
141. Terry L. Lewis *et al.* **Overexpression of Human Apolipoprotein A-I Preserves Cognitive Function and Attenuates Neuroinflammation and Cerebral Amyloid Angiopathy in a Mouse Model of Alzheimer Disease.** *J. Biol. Chem.* 2010. 285: 36958-36968.
142. Thomas Wisniewski *et al.* **Conformational Mimicry in Alzheimer's Disease.** *American Journal of Pathology.* 1995. 147(2): 238-244.
143. Judy K. Qiang *et al.* **Plasma Apolipoprotein A1 as a Biomarker for Parkinson Disease.** *ANNALS of Neurology.* 2013. 74: 119–127.
144. Jane S. Saczynski, Lon White, Rita L. Peila, Beatriz L. Rodriguez, and Lenore J. Launer. **The Relation between Apolipoprotein A-I and Dementia.** *American Journal of Epidemiology.* 2007. 165(9): 985–992.

145. Xing S, Shen D, Chen C, Wang J, Liu T and Yu Z. **Regulation of neuronal toxicity of  $\beta$ amyloid oligomers by surface ATP synthase.** *Mol Med Rep.* 2013. 8(6): 1689-1694.
146. Yun-An Lim *et al.* **Role of hippocalcin in mediating A $\beta$  toxicity.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 2012. 1822: 1247-1257.
147. Masahiro Nagao and Hideaki Hayashi. **Mixed lineage kinase 2 and hippocalcin are localized in Lewy bodies of Parkinson's disease.** *Journal of the Neurological Sciences.* 2009. 281: 51-54.
148. Naudin Marine and Atanasova Boriana. **Olfactory markers of depression and Alzheimer's disease.** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 2014. 45: 262-270.
149. Qinghua Chen *et al.* **Identification and characterization of PEBP as a calpain substrate.** *Journal of Neurochemistry.* 2006. 99: 1133-1141.
150. Zheng Wen *et al.* **CDK5-mediated phosphorylation and autophagy of RKIP regulate neuronal death in Parkinson's disease.** *Neurobiology of Aging.* 2014. 35(12): 2870-2880.
151. Yang Sun, Zhu-Min Luo, Min-Jun Zheng and Xia Liu. **Phosphatidylethanolamine-Binding Protein 1 (PEBP1) as a Potential Target for the Treatment for Depression.** *CNS Neuroscience & Therapeutics.* 2013. 19: 982-983.
152. Frank Gillardon *et al.* **The 20S proteasome isolated from Alzheimer's disease brain shows post-translational modifications but unchanged proteolytic activity.** *Journal of Neurochemistry.* 2007. 101: 1483-1490.
153. Samuel S. Yen. **Proteasome degradation of brain cytosolic tau in Alzheimer's disease.** *Int J Clin Exp Pathol.* 2011. 4(4): 385-402.
154. Sabine Schipper-Krom *et al.* **Dynamic recruitment of active proteasomes into polyglutamine initiated inclusion bodies.** *FEBS Letters.* 2014. 588: 151-159.
155. Linda Lee *et al.* **SUMO and Alzheimer's Disease.** *Neuromol Med.* 2013. 15: 720-736.
156. Véronique Dorval and Paul E. Fraser. **SUMO on the road to neurodegeneration.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 2007. 1773: 694-706.
157. Michael Veitinger *et al.* **A platelet protein biochip rapidly detects an Alzheimer's disease-specific phenotype.** *Acta Neuropathol.* 2014. 128: 665-677.
158. Eduardo M. Castaño *et al.* **Alzheimer disease periventricular white matter lesions exhibit specific proteomic profile alteration.** *Neurochemistry International.* 2013. 62: 145-156.
159. Anne M. Fagan *et al.* **Longitudinal Change in CSF Biomarkers in Autosomal-Dominant Alzheimer's Disease.** *Sci Transl Med.* 2014. 226(6): 1-16.
160. Schnurra, H.-G. Bernstein, P. Riederer, and K.-H. Braunewell. **The Neuronal Calcium Sensor Protein VILIP-1 Is Associated with Amyloid Plaques and Extracellular Tangles in Alzheimer's Disease and Promotes Cell Death and Tau Phosphorylation in Vitro: A Link between Calcium Sensors and Alzheimer's Disease?.** *Neurobiology of Disease.* 2001. 8: 900-909.
161. Swati S. More, Ashish P. Vartak, and Robert Vin. **Restoration of Glyoxalase Enzyme Activity Precludes Cognitive Dysfunction in a Mouse Model of Alzheimer's Disease.** *ACS Chem. Neurosci.* 2013. 4: 330-338.
162. Makoto Arai *et al.* **Enhanced Carbonyl Stress in a Subpopulation of Schizophrenia.** *Arch Gen Psychiatry.* 2010. 67(6):589-597.
163. Gaurav Patki, Naimesh Solanki, Fatin Atrooz, Farida Allam and Samina Salim. **Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress.** *Brain Research.* 2013. 1539: 73-86.
164. Boris Hamsch. **Altered glyoxalase 1 expression in psychiatric disorders: Cause or consequence?.** *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2011. 22: 302-308.
165. Manuela Basso *et al.* **Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease.** *Proteomics.* 2004. 4: 3943-3952.
166. Begemann M *et al.* **Modification of Cognitive Performance in Schizophrenia by Complexin 2 Gene Polymorphisms.** *Arch Gen Psychiatry.* 2010. 67(9): 879-88.
167. Saurabh Khasnavis and Kalipada Pahan. **Cinnamon Treatment Upregulates Neuroprotective Proteins Parkin and DJ-1 and Protects Dopaminergic Neurons in a Mouse Model of Parkinson's Disease.** *J Neuroimmune Pharmacol.* 2014. 9: 569-581.
168. Joo-Young Im, Kang-Woo Lee, Eunsung Junn, and M. Maral Mouradian. **DJ-1 protects against oxidative damage by regulating the thioredoxin/ASK1 complex.** *Neuroscience Research.* 2010. 67: 203-208.
169. Haigang Ren *et al.* **DJ-1, a cancer and Parkinson's disease associated protein, regulates autophagy through JNK pathway in cancer cells.** *Cancer Letters.* 2010. 297: 101-108.
170. Nirit Lev *et al.* **Knocking Out DJ-1 Attenuates Astrocytes Neuroprotection Against 6-Hydroxydopamine Toxicity.** *J Mol Neurosci.* 2013. 50: 542-550.
171. Sajjad MU *et al.* **DJ-1 modulates aggregation and pathogenesis in models of Huntington's disease.** *Hum Mol Genet.* 2014. 23(3): 755-66.

172. John P. Miller *et al.* **A Genome-Scale RNA–Interference Screen Identifies RRAS Signaling as a Pathologic Feature of Huntington’s Disease.** *PLoS Genetics*. 2012. 8(11): 1-22.
173. Mingshan Xue *et al.* **Tilting the Balance between Facilitatory and Inhibitory Functions of Mammalian and Drosophila Complexins Orchestrates Synaptic Vesicle Exocytosis.** *Neuron*. 2009. 64: 367–380.
174. Jiong Tang *et al.* **A Complexin/Synaptotagmin 1 Switch Controls Fast Synaptic Vesicle Exocytosis.** *Cell*. 2006. 126: 1175–1187.
175. J. U. Sommer *et al.* **Differential expression of presynaptic genes in a rat model of postnatal hypoxia: relevance to schizophrenia.** *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2010. 260(2): 81–89.
176. Atsushi Shata, Hideo Saisu, Shoji Odani and Teruo Abe. **Phosphorylated synaphin/complexin found in the brain exhibits enhanced SNARE complex binding.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007. 354: 80-813.
177. Jose Pereira, John Hanson and Eduardo Bruera. **The Frequency and Clinical Course of Cognitive Impairment in Patients with Terminal Cancer.** *Cancer*. 1997. 79(4): 835-842.
178. Thore Santel *et al.* **Curcumin Inhibits Glyoxalase 1—A Possible Link to Its Anti-Inflammatory and Anti-Tumor Activity.** *PLoS ONE*. 2008. 3(10): 1-13.
179. Björn Kuhla *et al.* **Methylglyoxal, Glyoxal, and Their Detoxification in Alzheimer’s Disease.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005. 1043: 211–216.
180. Thore Santel *et al.* **Curcumin Inhibits Glyoxalase 1—A Possible Link to Its Anti-Inflammatory and Anti-Tumor Activity.** *PLoS ONE*. 2008. 3(10): 1-13.
181. Paul J. Thornalley. **Unease on the role of glyoxalase 1 in high-anxiety-related behaviour.** *TRENDS in Molecular Medicine*. 2006. 12(5): 195-199.
182. Marta Kulpa, Mariola Kosowicz, Beata J. Stypuła-Ciuba and Aorota Kazalska. **Anxiety and depression, cognitive coping strategies, and health locus of control in patients with digestive system cancer.** *Prz Gastroenterol*. 2014. 9(6): 329–335.
183. Philipp Pieroh *et al.* **Temporal Dynamics of Glyoxalase 1 in Secondary Neuronal Injury.** *PLOS ONE*. 2014. 9(2):1-7.
184. **ATCC.** Product description. Cell Biology. COLO 205: <http://www.atcc.org/Products/All/CCL-222.aspx>. MDA MB 231: <http://www.atcc.org/products/all/HTB-26.aspx>
185. Alberto Checa Rojas. **Análisis del secretoma en líneas celulares de cáncer cérvico uterino.** En: Seminario Interno de Grupo. 2013. Laboratorio de proteómica. Centro de Ciencias Genómicas. Cuernavaca, Morelos.

ANEXO A

MATERIAL SUPLEMENTARIO – FIGURAS Y TABLAS



Fig. Supl. 1 – Cinética de los volúmenes de tumores generados en ratones apartar de la inoculación de la línea de cáncer cérvico uterino SiHa diferentes días. (Elaborada por Alberto Checa y Luis F. Delgadillo)

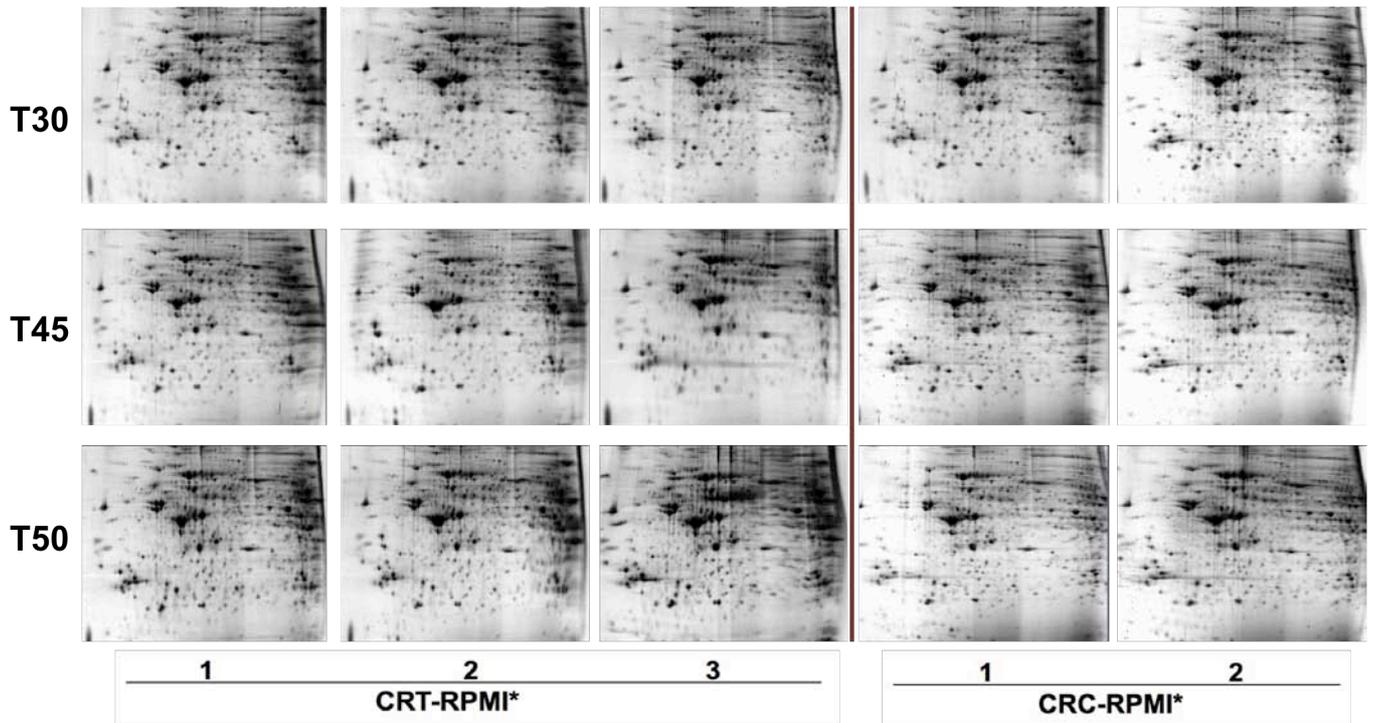


Fig. Supl. 2 - 2D SDS-PAGE. Geles de dos dimensiones de CRT-RPMI\* y CRC-RPMI\* de 30, 45 y 50 días.

Línea celular SiHa		
Tiempo	Tumor	Volumen (cm <sup>3</sup> )
5 días	1	0.0219911
	2	0.0209439
15 días	1	0.0196349
	2	0.0188495
25 días	1	0.0172787
	2	0.0215984

Tabla Supl. 1 - Volúmenes de las réplicas de tumores generados a partir de células SiHa.

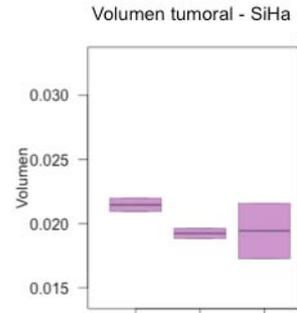


Fig. Supl. 3 - Volúmenes de las réplicas tumorales de SiHa a tiempo 5, 15 y 25 días.

Línea celular HeLa		
Tiempo	Tumor	Volumen (cm <sup>3</sup> )
5 días	1	0.1099557
	2	0.0952949
	3	0.2638937
15 días	1	0.3518583
	2	0.2042035
	3	0.3518583
25 días	1	1.0775662
	2	0.7372270
	3	0.6220353
Línea celular COLO205		
19 días	1	0.7257079
	2	0.5372123

Tabla Supl. 2 - Volúmenes de las réplicas de tumores generados a partir de células HeLa y COLO205.

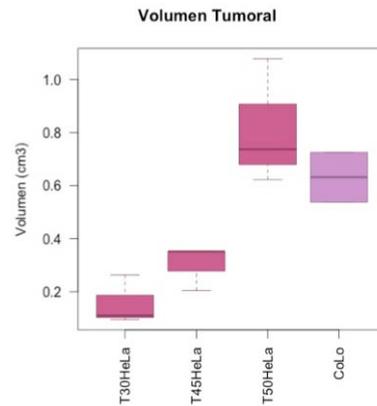


Fig. Supl. 4 - Volúmenes de las réplicas tumorales de HeLa a tiempo 30, 45 y 50 días y COLO205 a 19 días.

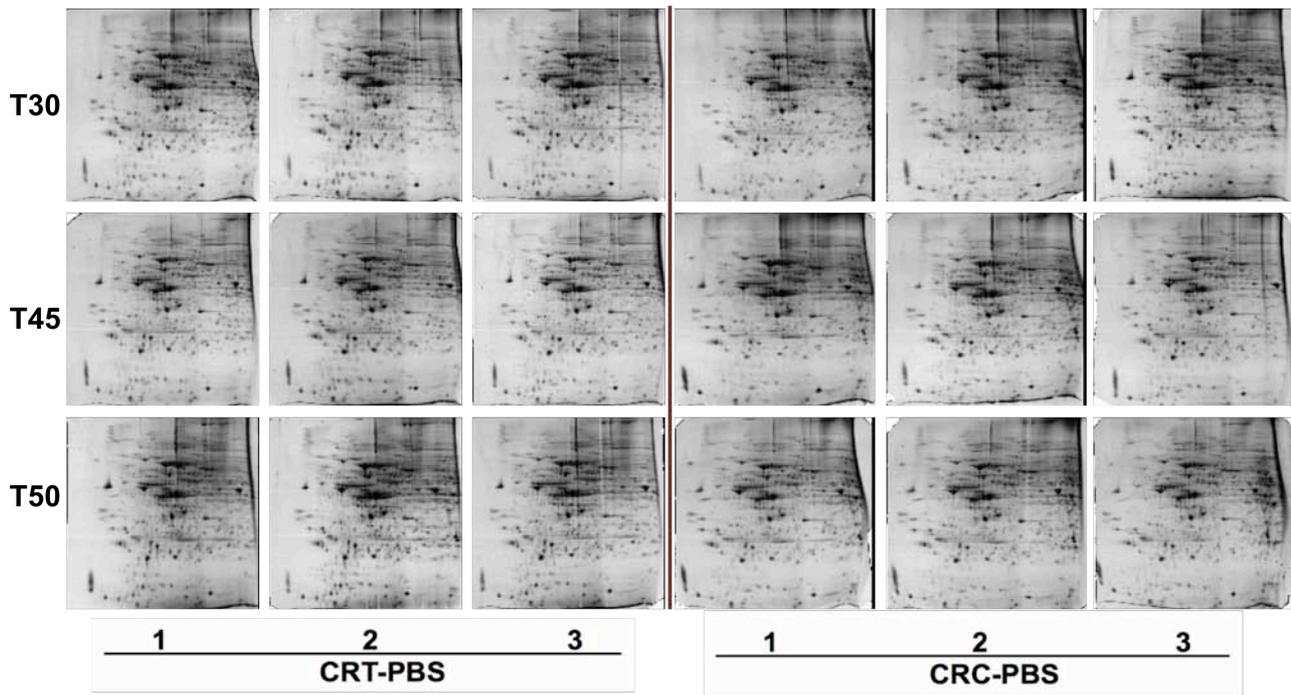
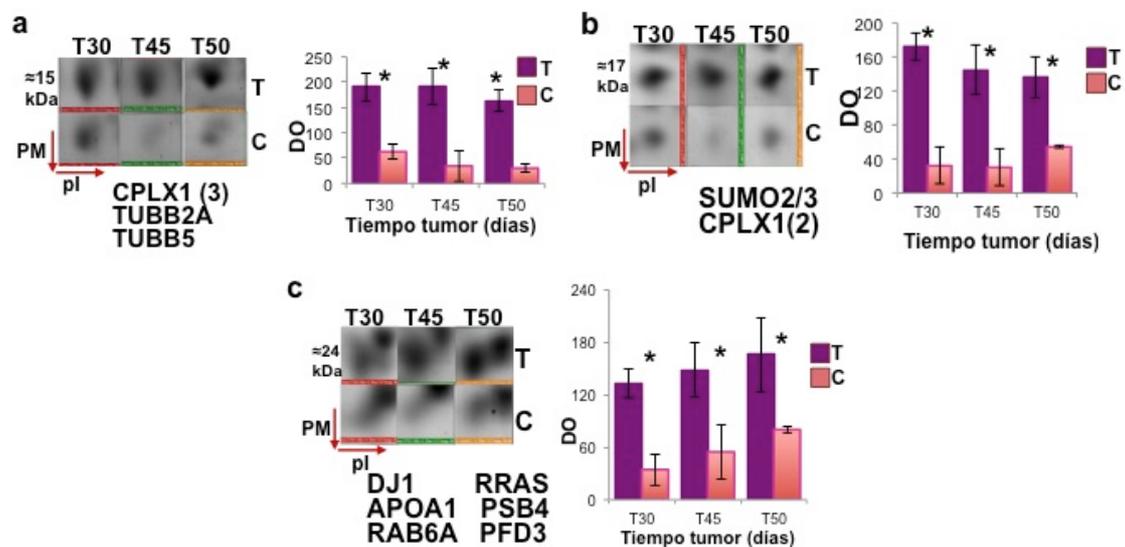


Fig. Supl. 5 - 2D SDS-PAGE. Geles de dos dimensiones de CRT-PBS y CRC-PBS de 30, 45 y 50 días.

Tabla Supl. 3 – Proteínas diferencialmente expresadas clasificadas según su perfil de expresión. Las proteínas marcadas con \* indican identificación mediante ESI o ESI/QUAD/TOF.

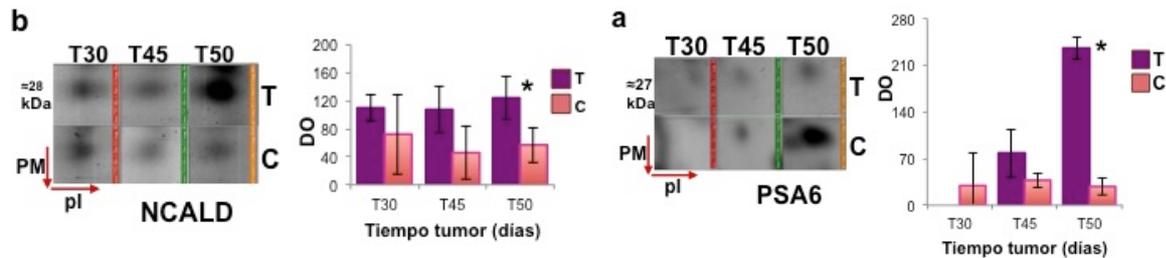
SE - Sobre-expresión en los tres tiempos	Score	Uniprot ID	FS. 6
Tubulin beta-2A chain* (TUBB2A)	77	Q7TMM9	a
Tubulin beta-5 chain *(TUBB5)	73	P99024	a
Complexin-1* (CPLX1)	115	P63040	a
Small ubiquitin-related modifier 3* (SUMO3)	40	Q9Z172	b
Small ubiquitin-related modifier 2* (SUMO2)	40	P61957	b
Complexin-1* (CPLX1)	42	P63040	b
Protein DJ-1 (DJ1)	81	Q99LX0	c
Proteasome subunit beta type-4 (PSB4)	121	P99026	c
Ras-related protein RRAS (RRAS)	72	P10833	c
Ras-related protein RAB6A* (RAB6A)	55	P35279	c
Apolipoprotein A-I* (APOA1)	51	Q00623	c
Prefoldin subunit 3* (PFD3)	47	P61759	c



**Fig. Supl. 6.** Proteínas cerebrales sobre-expresadas en los 30, 45 y 50 días del desarrollo tumoral y su visualización en los geles 2D, así como sus niveles de expresión durante los tres tiempos del desarrollo tumoral (gráficas). *a* – CPLX1, TUBB2A, TUBB5. *b* – SUMO2, SUMO3, CPLX1. *c* – DJ-1, APOA1, PFD3, RRAS, PSB4. Solamente se ilustra una réplica representativa para cada tiempo de los CRT-PBS (T) y los CRC-PBS (C)  $n=3$ . \*  $p$ .value <0.05. PM=Peso molecular. pl=Punto isoeléctrico.

**Tabla Supl. 3 – Continuación.**

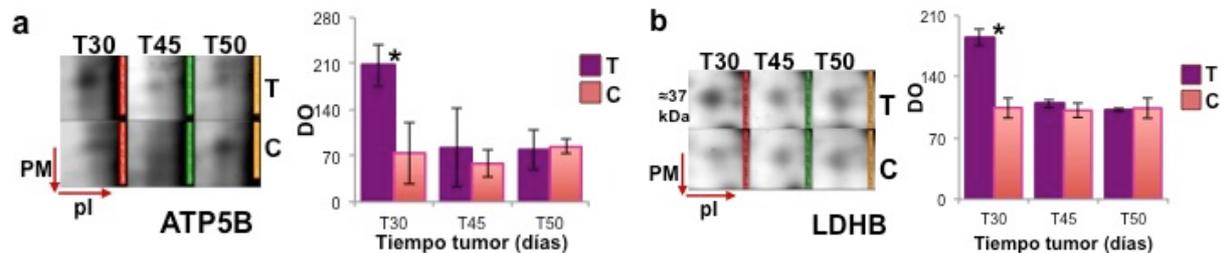
Sobre-expresadas en tiempo 50	Score	Uniprot ID	FS. 7
Proteasome subunit alpha type-6 (PSA6)	113	Q9QUM9	a
Neurocalcin-delta (NCALD)	128	Q91X97	b



**Fig. Supl. 7.** Proteínas cerebrales sobre-expresadas solamente a los 50 días del desarrollo tumoral y su visualización en los geles 2D, así como sus niveles de expresión durante los tres tiempos del desarrollo tumoral (gráficas). *a* - PSA6. *b* - NCALD. Solamente se ilustra una réplica representativa para cada tiempo de los CRT-PBS (T) y de los CRC-PBS (C)  $n=3$ . \*  $p$ .value <0.05. PM=Peso molecular. pl=Punto isoeléctrico.

**Tabla Supl. 3 – Continuación.**

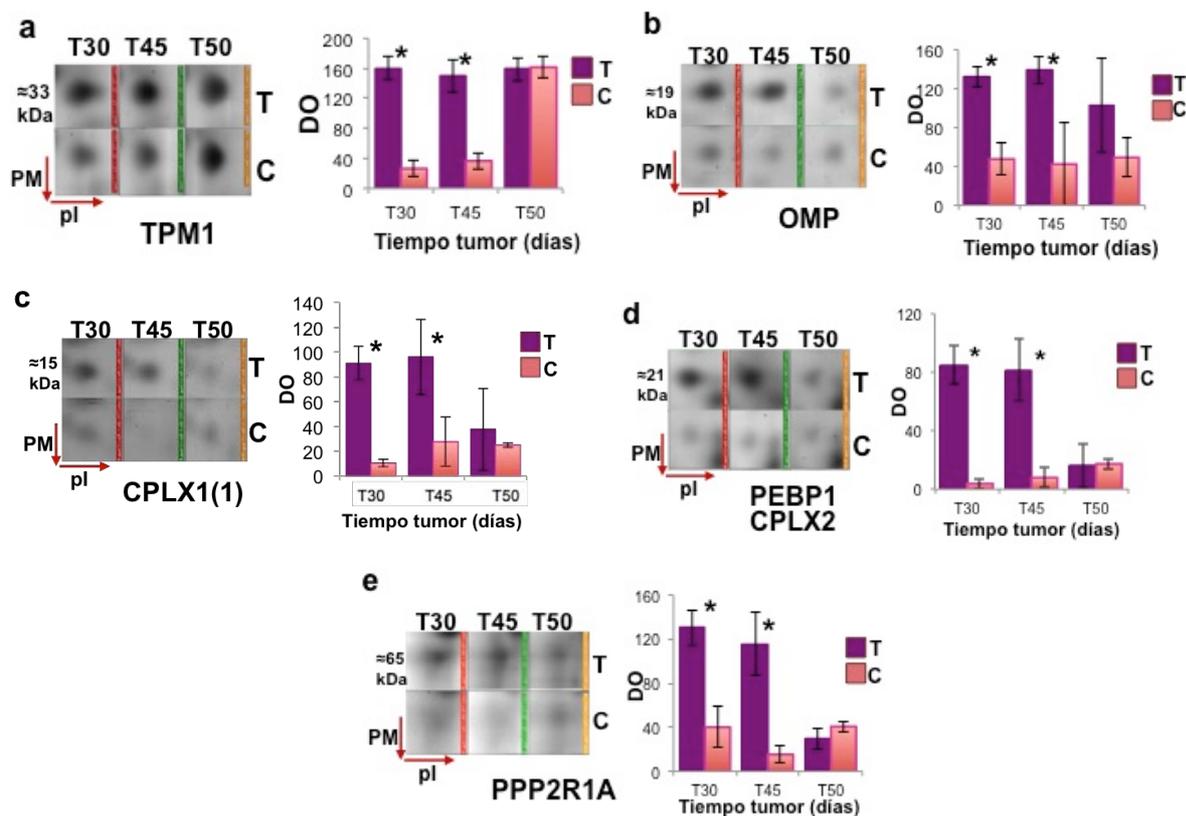
Sobre-expresadas en tiempo 30	Score	Uniprot ID	FS. 8
ATP synthase subunit beta, mitocondrial (ATP5B)	152	P56480	a
L-lactate dehydrogenase B chain (LDHB)	92	P16125	b



**Fig. Supl. 8.** Proteínas cerebrales sobre-expresadas solamente a los 30 días del desarrollo tumoral y su visualización en los geles 2D, así como sus niveles de expresión durante los tres tiempos del desarrollo tumoral (gráfica). *a* – ATP5B. *b* – LDBH. Solamente se ilustra una réplica representativa para cada tiempo de los CRT-PBS (T) y de los CRC-PBS (C)  $n=3$ . \*  $p$ .value <0.05. PM=Peso molecular. pl=Punto isoeléctrico.

**Tabla Supl. 3 – Continuación.**

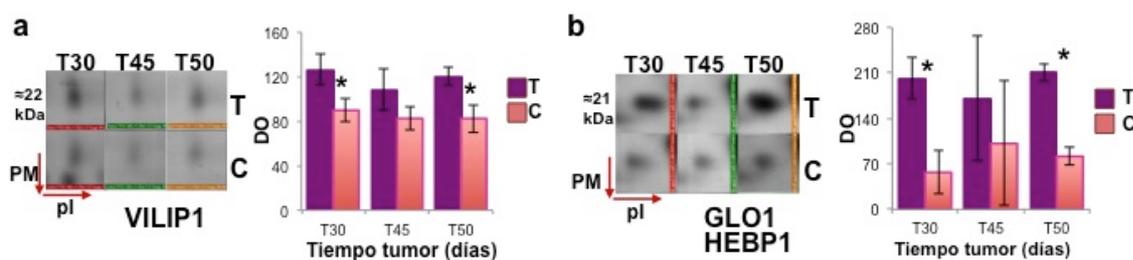
Fluctuantes – Sobre-expresadas en tiempo 30 y 45	Score	Uniprot ID	FS. 9
Tropomyosin alpha-1 chain (TPM1)	166	P58771	a
Olfactory marker protein (OMP)	93	Q64288	b
Complexin-1* (CPLX1)	73	P63040	c
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 * (PEBP1)	62	P70296	d
Complexin-2* (CPLX2)	27	P84086	d
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform (PPP2R1A)	123	Q76MZ3	e
Transcription elongation factor A protein-like 5* (TCEAL5)	46	Q8CCT4	f
39S ribosomal protein L46* (MRPL46)	32	Q9EQI8	f



**Fig. Supl. 9.** Proteínas cerebrales sobre-expresadas a los 30 y 45 días del desarrollo tumoral y su visualización en los geles 2D, así como sus niveles de expresión durante los tres tiempos del desarrollo tumoral (gráfica). *a* – Tmp1. *b* – OMP. *c* – CPLX1. *d* – PEBP1, CPLX1. *e* – PPP2R1A. MRPL46, TCEAL5. Solamente se ilustra una réplica representativa para cada tiempo de los CRT-PBS (T) y de los CRC-PBS (C)  $n=3$ . \*  $p$ .value <0.05. PM=Peso molecular. pl=Punto isoeléctrico.

**Tabla Supl. 3 – Continuación.**

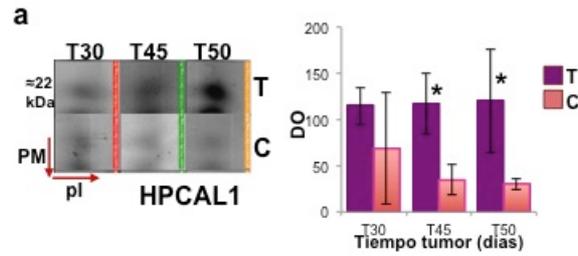
Fluctuantes – Sobre-expresadas en tiempo 30 y 50	Score	Uniprot ID	FS. 10
Visinin-like protein (VILIP1)	153	P62761	a
Glyoxalase 1 (GLO1)	119	Q9CPU0	b
Heme-binding protein (HEBP1)	73	Q9R257	b



**Fig. Supl. 10.** Proteínas cerebrales sobre-expresadas a los 30 y 50 días del desarrollo tumoral y su visualización en los geles 2D, así como sus niveles de expresión durante los tres tiempos del desarrollo tumoral (gráfica). *a* – VILIP1. *b* – GLO1, HEBP1. Solamente se ilustra una réplica representativa para cada tiempo de los CRT-PBS (T) y de los CRC-PBS (C)  $n=3$ . \*  $p$ .value <0.05. PM=Peso molecular. pl=Punto isoeléctrico.

**Tabla Supl. 3 – Continuación.**

Fluctuantes – Sobre-expresadas en tiempo 45 y 50	Score	Uniprot	FS. 11
Hippocalcin-like protein (HPCAL1)	122	P62748	a



**Fig. Supl. 11.** Proteínas cerebrales sobre-expresadas a los 45 y 50 días del desarrollo tumoral y su visualización en los geles 2D, así como sus niveles de expresión durante los tres tiempos del desarrollo tumoral (gráfica). a – HPCAL1. Solamente se ilustra una réplica representativa para cada tiempo de los CRT-PBS (T) y de los CRC-PBS (C)  $n=3$ . \* p.value <0.05. PM=Peso molecular. pl=Punto isoeléctrico.

**Tabla Supl. 4.** Proteínas identificadas en CRT-PBS SiHa y su agrupación en el análisis de sobre representación. a – Vías metabólicas y procesos celulares. b – Localización celular. (*GeneCodis* y *ConsensusPathDB*)

**a**

Comunicación Celular	Muerte celular	Sinapsis	Ciclo Celular	Neurogénesis	Parkinson	Metabolismo mRNA	Ciclo de liberación de nt	Ciclo citrato
APOA1 PSB4 OMP PPP2R1A PSA6 RAB6A RRAS CPLX1 CPLX2 DJ1 NCALD	PSA6 GLO1 DJ1 PPP2R1A PSB4	RRAS CPLX2 CPLX1 DJ1 NCALD	TUBB5 PSA6 PSB4 PPP2R1A TUBB2A	OMP APOA1 RRAS	PSA6 ATPb5 DJ1	PPP2R1A PSA6 PSB4	CPLX1 CPLX2 DJ1	LDHB ATP5B

**b**

Citosol	Mitocondria	Núcleo	Vesícula	Neurona
LDHB OMP PSA6 HEBP1 NCALD APOA1 PPP2R1A RAB6A TUBB2A TPM1 CPLX1 CPLX2 DJ1	PSA6 ATP5B LDHB HEBP1 MRPL46 PPP2R1A PEBP1 DJ1	PSA6 TCEAL5 PFD3 OMP PPP2R1A DJ1 PSB4	APOA1 NCALD RAB6A TUBB2A	OMP DJ1 CPLX1 CPLX2 PEBP1

**Tabla Supl. 5** Proteínas identificadas en CRT-PBS SiHa y su agrupación en el análisis de sobre representación de procesos celulares y enfermedades asociadas al sistema nervioso. (Búsqueda Bibliográfica)

Alzheimer	Sinapsis	Neuro- protección	Estrés oxidativo	Huntington	Desarrollo
APOA1	CPLX1	APOA1	APOA1	DJ1	PEBP1
ATP5B	CPLX2	DJ1	ATP5B	PFD3	RRAS
LDHB	DJ1	HPCAL1	DJ1	HPCAL1	TPM1
NCALD	NCALD	PEBP1	PSA6	PSA6	TUBB5
OMP	OMP	PPP2R1A	PSB4	PSB4	TUBB2A
PEBP1	PEBP1	PFD3	RAB6A	RRAS	VILIP1
PFD3	PPP2R1A	Rab6	SUMO3	SUMO2	
PSA6	PSA6	SUMO2	SUMO2	SUMO3	
PSB4	PSB4	SUMO3	TPM1		
RAB6A	Rab6	TPM1	GLO1		
SUMO3	SUMO2	GLO1			
SUMO2	SUMO3				
TPM1	VILIP1				
VILIP1					
GLO1					
Parkinson	Neuro- degeneración	Longevidad	Depresión/ Ansiedad	Memoria/ Plasticidad	
APOA1	ATP5B	APOA1	OMP	PPP2R1A	
CPLX1	LDHB	HPCAL1	PEBP1	RRAS	
DJ1	NCALD	GLO1	VILIP1	SUMO2	
HPCAL1	PEBP1	PEBP1	GLO1	SUMO3	
PEBP1	PPP2R1A		APOA1	VILIP1	
SUMO	PFD3				
GLO1	PSA6				
	PSB4				
	RRAS				
	TPM1				
	TUBB5				
	VILIP				

**Tabla Supl. 6.** Componentes del Medio de cultivo Gibco® Advanced RPMI 1640 (RPMI\*).

Componentes	Concentración (mg/L)
<b>Aminoácidos</b>	
Glicina	10
L-Alanina	8.9
L-Arginina	200
L-Asparagina	50
L-Aspartato	20
L-Cistina 2HCl	65
L-Glutamato	20
L-Glutamina	300
L-Histidina	15
L-Hidroxiprolina	20
L-Isoleucina	50
L-Leucina	50
Hidrocloruro de L-Lisina	40
L-Metionina	15
L-Fenilalanina	15
L-Prolina	20
L-Serina	30
L-Treonina	20
L-Triptófano	5
L-Tirosina sal disódica dihidrato	29
L-Valina	20
<b>Vitaminas</b>	
Biotina	0.2
Ácido ascórbico fosfato	2.5
Cloruro de colina	3
Pantotenato de calcio	0.25
Ácido Fólico	1
Niacinamida	1
Ácido para-aminobenzoico	1
Hidrocloruro de piridoxina	1
Riboflavina	0.2
Hidrocloruro de tiamina	1
Vitamina B12	0.005
i-Inositol	35
<b>Sales Inorgánicas</b>	
Nitrato de calcio (Ca(NO3)2 4H2O)	100
Sulfato de magnesio (MgSO4) (anhyd.)	48.84
Cloruro de potasio (KCl)	400
Bicarbonato de sodio (NaHCO3)	2000
Cloruro de sodio (NaCl)	6000
Fosfato disódico (Na2HPO4) (anhyd.)	800
Sulfato de zinc (ZnSO4-7H2O)	0.874
<b>Proteínas</b>	
Albúmina (AlbuMAX® II)	400
Transferina Humana (Holo)	7.5
Insulina Recombinante (Cadena Completa)	10
<b>Elementos traza</b>	
Metavanadato de amonio	0.0003
Sulfato cúprico	0.00125
Cloruro de mangneso	0.00005
Selenito de Sodio	0.005
<b>Otros componentes</b>	
D-Glucosa (Dextrosa)	2000
Glutación (reducido)	1
Etanolamina	1.9
Rojo Fenol	5
Piruvato de sodio	110

## ANEXO B

### METODOLOGÍA SUPLEMENTARIA - PROTOCOLOS

#### A. Conteo Celular con Cámara de Neubauer.

1. Se toman las cajas de cultivo celular cuando estén a una confluencia de 80 - 90% aproximadamente. Se retira el medio y se agrega 10 ml de Verseno a cada caja.
2. Se dejan en la incubadora por 10 minutos.
3. Se recupera el Verseno de cada caja y se centrifuga a 4500 rpm por 4 minutos.
4. Se retira el sobrenadante para quedarse con el botón.
5. Se agregan 2ml (mínimo) de medio a cada botón, se resuspende y se juntan todas las muestras.
6. Se toman 20 µl de la muestra y se le agregan 4 µl de Azul Tripano.
7. Se deja reposar 5 minutos.
8. Se toma la Cámara de Neubauer y se agregan 12 µl de la muestra en cada cuadrícula.
9. Se cuentan las células al microscopio, así como la proporción de células vivas y muertas
10. Se calcula el número de células con la siguiente fórmula:

$$\text{No. Células} = \frac{(x)(10,000)(\text{Vol. Total})(\text{Cuadrantes Totales}) * \text{Porcentaje de cél. vivas}}{\text{Cuadrantes contados}}$$

Dónde, x= Promedio de células contadas en las dos cuadrículas.

#### B. Extracción fenólica de proteínas

Muestra de cerebro.

1. Congelar la muestra en nitrógeno líquido y colocarla en un tubo de 50ml.
2. En presencia de nitrógeno líquido, poner la muestra en un mortero y presionar con un pistilo hasta que se observe la formación de un polvo.  
Nota: Agregar nitrógeno líquido cada vez que sea necesario para evitar el descongelamiento y la formación de una pasta.
3. Añadir inhibidores de proteasas. Agregar 5 ml de Agua MiliQ. Se adicionan 20 µl de inhibidores por mL de agua. Sonicar las veces que sean necesarias en lapsos de diez segundos dejando reposar las muestras en hielo por un 1 minuto. a. Sonicar hasta que sea una pasta homogénea sin grumos.
4. Agregar 5 volúmenes de acetona al 100% y dejar toda la noche a -70 °C.
5. Centrifugar a 7000 rpm durante 10 min. y retirar el sobrenadante.  
Nota: La centrifuga deberá balancearse antes y mantenerse entre 10 y 20 °C.
6. Poner la muestra en hielo para evaporar la acetona.
7. Agregar 5 ml (Depende del botón, si es grande se agrega más y viceversa) de buffer de extracción e incubar en hielo por 10 min dando vortex en intervalos de dos a tres minutos.
8. Agregar 6ml de fenol e incubar por 10 min. dando vortex en intervalos de dos a tres minutos.
9. Centrifugar a 7000 rpm por 10 min y recuperar la fase fenólica (fase superior). Separar y conservar la fase fenólica. Si la fase que tiene el buffer de extracción se ve lechosa, agregar de 1 a 3 mL de fenol y repetir los pasos 7 y 8.

Nota:

Los pasos 6 y 7 se repiten hasta que el fenol y el buffer de extracción queden transparentes. Esto es para asegurarnos de sólo estar tomando proteína. Al menos tres lavados. Y no más de 4.

10. Agregar 5 volúmenes de acetato de amonio - metanol. Mezclar y agitar por 10 min y dejar reposar toda la noche a -70 °C.
11. Centrifugar a 8000 rpm por 20 min. y tirar la fase líquida cuidando de no despegar el botón.
12. Agregar Acetato de amonio-metanol y centrifugar hasta que deje de oler a fenol. a. Este paso se hace mínimo 3 veces.
13. Hacer 2 lavados con 20 ml. de acetona 80% centrifugando 20 min a 7000 rpm entre cada lavado.

Nota:

Es preferible que esté muy fría y dejar reposar los tubos a -70 °C mínimo 10 min.

14. Sólo son dos lavados para no llevarnos muchas proteínas. En este proceso se quitan sales.
15. La centrifuga deberá permanecer entre 10 y 20 °C.
16. Recomendable no más de 2 lavados.
17. Centrifugar a 8000 por 20 min. se quita la acetona, dejando el botón.
18. Agregar 1 ml - 2ml de acetona al 80%.
19. Resuspender y pasar a tubos de 1.5 ml.
20. Centrifugar a 13.2 rpm por 10 min a 10 °C. Sólo una vez. Decantar sacar la acetona.
21. Distribuir la pastilla en el ependorf con una punta sellada.
22. Dejar los tubos abiertos y dejar que se evapore la acetona.
23. Evaporar los restos de acetona en una centrifuga de vacío. (Speedvac). 1 minuto.
24. Solubilizar el botón con 0.500 ml de buffer de solubilización. El volumen añadido es dependiendo del tamaño de la muestra.
25. Centrifugar a 13.2 rpm por 30 min a 17 °C para retirar el material insoluble. Depositar e. sobrenadante en un tubo nuevo (proteína solubilizada). La fase soluble es la de arriba.
26. Repetir el paso 22 agregando buffer de solubilización hasta que esté lo más transparente y limpio posible de restos insolubles
27. Cuantificar la muestra por el método de Bradford.

### Soluciones

#### BUFFER DE EXTRACCIÓN

Conc. Final	Reactivo	Cantidad
0.7 M	Sacarosa	71.883 g
0.5 M	Tris Base	18.165 g
0.1 M	KCl	2.1 g
30mM	HCl	0.72 mL
50mM	EDTA	75 mL
2% v/v	β-Mercaptoetanol	6mL
12 mg/ml	PVPP	3.6 g
Aforar a 300 mL		

#### BUFFER DE SOLUBILIZACIÓN

Conc. Final	Reactivo	Cantidad
7M	Urea RT	2.1033 g
2M	Thiourea RT	0.761 g
4%	CHAPS	0.2 g
2 mM	TBP	0.05 mL
2%	Anfolinas 3-10pH	0.1 mL
60 mM	DTT	0.04627 g
Aforar a 5 mL y filtrar con filtro de 0.45 µm.		

### C. Extracción proteica - SDS

1. Macerar la muestra con nitrógeno líquido.
2. Adicionar buffer de solubilización al polvillo - 10 volúmenes en función del peso del tejido. (Para los cerebros que pesan alrededor de 400mg, agregar 3ml para que quede concentrado)
3. Dar 6 ciclos de sonicación de 15 segundos dejando reposar la muestra en hielo por al menos 1 minuto.
4. Centrifugar 15 min a 13200 rpm en centrifuga refrigerada a 5 °C.
5. Recuperar el sobrenadante.
6. Cuantificar.
7. Almacenar a -20°C.

## Soluciones

### BUFFER DE SOLUBILIZACIÓN

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>
Tris-HCl 2M pH 7.5	0.625 mL
SDS 10%	2 mL
$\beta$ -mercaptoetanol	0.5 mL
Inhibidores de proteasas 50X	0.2 mL
Glicerol	1 mL

Aforar con Agua miliQ - 10 mL

(Hacer stocks sin los inhibidores y guardarlos a -20°C. Cuando vayan a ser utilizados, se le agregan los inhibidores)

### D. Cuantificación por el método de Bradford ácido

1. Acidificar 4  $\mu$ L de muestra con 36  $\mu$ L de HCl 0.12 N y dejar reposar por 10 minutos.
2. Agregar 1.4 mL de solución de Bradford.
3. Vortexear por 1 minuto
4. Cuantificar absorbancia a 595 nm.
5. Interpolarse valores de absorbancia con una curva estándar Bradford para estimar la concentración de la muestra.

## Soluciones

### SOLUCIÓN DE BRADFORD

Diluir Bradford Dye (Bio-Rad, AC) en agua MiliQ con una razón de 1:3. 2. Filtrar con papel Watman.

### E. Protocolo para tratamiento de proteínas

1. Recortar el spot del gel 2D y depositarlo en un tubo de 1.5 mL.
2. Lavar 2 ó 3 veces el gel con mucha agua MiliQ. Vortexear 15-20 segundos en cada lavado.
3. Quitar toda el Agua.

Teñidas con Coomassie

#### Desteñir

4. Dar lavados de 2 horas en 50% de acetonitrilo en bicarbonato de amonio 2.5 mM. Hacer esto hasta que las muestras se tornen color blanco-transparente.

#### Deshidratar

5. Dar lavados de 20 min. apróx. en acetonitrilo puro. Hacer esto hasta que la muestra se torne blancuzca-opaca.

#### Reducir y alquilar

6. Adicionar DTT 15 mM hasta cubrir la muestra. Reducir la proteína por media hora.
7. Extraer la solución DTT con una pipeta y desechar.  
**Solución DTT** - se pesan 2.3 mg de DTT en un ependorff de 1.5 ml y se disuelven en 1 ml de bicarbonato de amonio 50 mM
8. Adicionar iodoacetamida 100 mM hasta cubrir la muestra y alquilar la proteína durante media hora.  
**Solución Iodoacetamida** - se pesan 18 mg de IAM en un ependorff de 1.5 ml y se disuelve en 1 ml de bicarbonato de amonio 50 mM
9. Extraer la solución de iodoacetamida con una pipeta y desechar.

10. Adicionar 100 µl de acetonitrilo o hasta cubrir la muestra y deshidratar las piezas por 20 min a temperatura ambiente. Hacer 1 ó 2 lavados, hasta que las piezas se vean opacas, de color blanco y de un tamaño mucho menor.
11. Extraer el acetonitrilo de la muestra con una pipeta y desechar.
12. Rehidratar las piezas en 100 µl o hasta cubrir la muestra de bicarbonato de amonio 50mM incubándolas por 10 minutos a temperatura ambiente.
13. Extraer el bicarbonato de amonio de la muestra con una pipeta y desechar.
14. Adicionar 100 µl de acetonitrilo o hasta cubrir la muestra y deshidratar las piezas por 20 min a temperatura ambiente. Hacer 1 ó 2 lavados, hasta que las piezas se vean opacas, de color blanco y de un tamaño mucho menor.
15. Secar completamente las piezas metiéndolas en speedvac a temperatura ambiente de 2 a 3 minutos.

#### Digerir

16. Dependiendo de la concentración de la muestra se le adiciona 2, 5, 10 µl de la solución de tripsina.

##### **Solución de tripsina:**

- a. Resuspender 20 µg de tripsina liofilizada (Promega) en 100 µl de HCl 1mM, esto corresponde a 0.2 µg/µl y se puede guardar a -20 °C en alícuotas de 10 µl.
  - b. Justo antes de usar, agregar a cada alícuota 70 µl Agua MiliQ, para obtener una concentración de 12.5 ng/µl de tripsina.
17. Dejar 30 minutos en hielo.
  18. Agitar al menos 2 veces en el vortex.
  19. Remover el sobrenadante.
  20. Adicionar agua MiliQ hasta cubrir la muestra.
  21. Dejar toda la noche a 37 °C. No más de 16 hrs.

#### Extraer

22. Tener tubos de 1.5 ml etiquetados con la muestra correspondiente. Lavarlos previamente con acetonitrilo
  23. Adicionar 100 µl de Agua MiliQ con TFA al 0.5%.
  24. Vortexear. Incubar por 30-45 minutos manteniendo en agitación.
  25. Centrifugar la muestra 1 min a 13.4 rpm. Colectar el sobrenadante y transferirlo a los tubos del paso 1 (previamente lavados y etiquetados)
  26. Adicionar 100 µl del buffer de extracción A
- Buffer de extracción A**  
Acetonitrilo 50% /Agua MiliQ  
TFA 0.5%
27. Vortexear. Incubar por 15 minutos manteniendo en agitación.
  28. Centrifugar la muestra 1 min a 13.4 rpm. Colectar el sobrenadante y transferirlo a los respectivos tubos usados en el paso 3.
  29. Reducir el volumen del extracto por evaporación en el speedvac a temperatura ambiente.
  30. Hay que tener mucho cuidado al manejar los tubos, para embarrar lo menos posible.

#### Plaquear

31. Tomar 30 mg apróx. de matriz y disolverla en 200ul apróx. de Buffer A, tiene que quedar saturada.

##### **Buffer A**

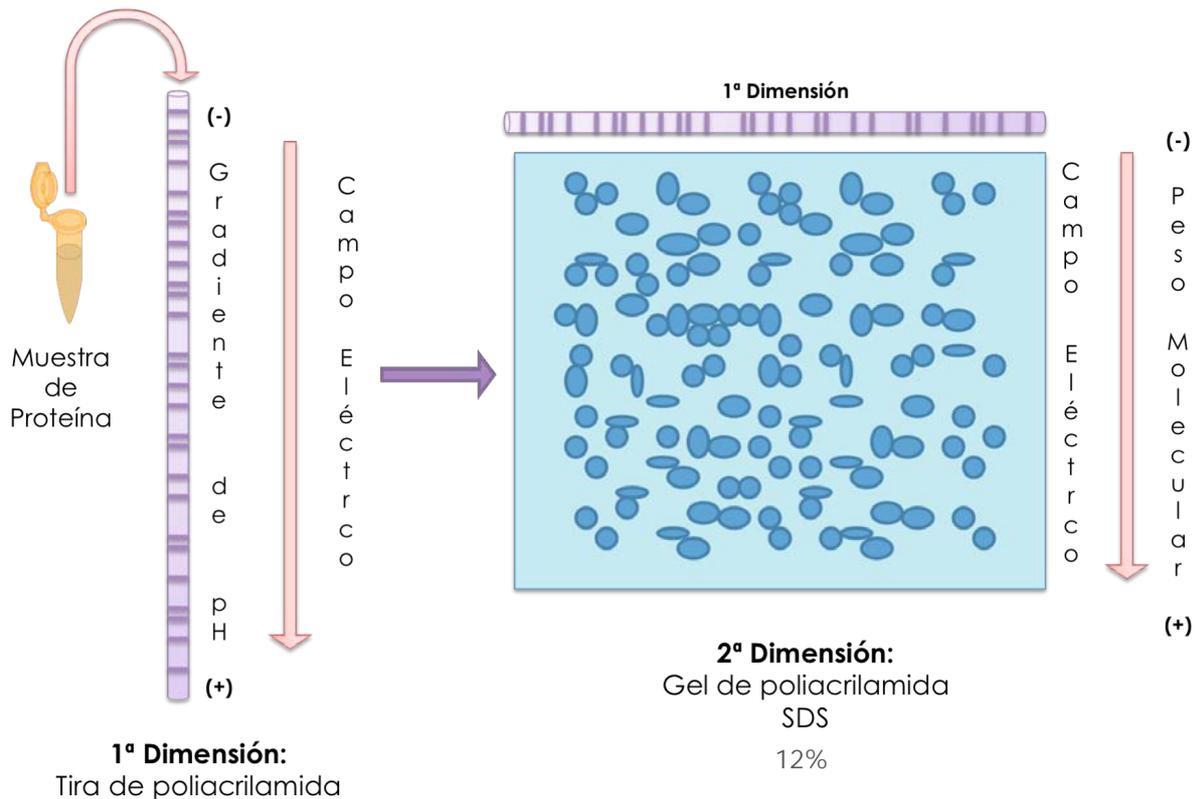
Acetonitrilo 50% /Agua MiliQ  
TFA 0.1%

32. Preparar matriz diluida: Tomar 50 ul de la matriz concentrada y agregar 150 ul del buffer A.

33. Tomar 4  $\mu$ l y lavar el tubo para extraer los péptidos.
34. Tomar 1  $\mu$ l y ponerlo en la placa anotando en una hoja especial de placas qué muestra es y en qué lugar de la placa se encuentra.  
 NOTA: En la placa se coloca un STD (estándar) al centro de cada grupo de muestras. El STD se prepara tomando 1  $\mu$ l de mezcla de péptidos Bruker con 1  $\mu$ l de matriz y de ésta solución, se coloca 1  $\mu$ l en la placa.
35. Analizar en MALDI.

## F. SDS-PAGE 2D

1. Ilustración del proceso de elaboración de los geles de acuerdo al protocolo utilizado por *Encarnación et al.* [23].



## G. Western Blot – Diluciones

<b>Alfa Enolasa</b>	<b>Abcam®, ab54979</b>
<b>Primario</b>	<b>1:10000</b> Incubación 2 horas
<b>Secundario</b>	<b>1:10000</b>
<b>Anti Ratón</b>	Incubación – 1 a 2 horas

<b>Tubulina Beta III</b>	<b>Abcam®, ab18207</b>
<b>Primario</b>	<b>1mg/10mL = 3.3<math>\mu</math>l – 10mL</b> Incubación 2 horas
<b>Secundario</b>	<b>1:15000</b>
<b>Anti Conejo</b>	Incubación – 1 a 2 horas

<b>Complexina (CPLX1)</b>	<b>1</b>	<b>Abcam®, ab102761</b>
<b>Primario</b>		<b>1:250 – 1:1000</b>
		Incubación – Toda la noche a 4C
<b>Secundario Anti Conejo</b>		<b>1:7500</b>
		Incubación – 1 a 2 horas
<b>Hacer en geles de Tricina o 18%</b>		

<b>Glioxalasa 1 (GLO1)</b>		<b>Abcam®, ab171121</b>
<b>Primario</b>		<b>1:13000</b>
		Incubación – 2 horas
<b>Secundario Anti Ratón</b>		<b>1:13000</b>
		Incubación – 1 a 2 horas
<b>Hacer en geles de Tricina o 18%</b>		

<b>Anti-proteosoma alfa 6</b>		<b>Abcam®, ab109377</b>
<b>Primario</b>		<b>1:20000</b>
		Incubación – 2 horas
<b>Secundario Anti Conejo</b>		<b>1:20000</b>
		Incubación – 1 a 2 horas

