

TESIS DOCTORAL 2017

**CÁNCER, INFLAMACIÓN Y DEPRESIÓN:
ALTERACIONES CONDUCTUALES,
INMUNITARIAS Y NEUROQUÍMICAS
PRODUCIDAS POR EL DESARROLLO DE
MELANOMA B16 EN RATONES MACHO**



**ANDREA LEBEÑA
MALUF**



ANDREA LEBEÑA MALUF

.....
**CÁNCER, INFLAMACIÓN Y DEPRESIÓN: ALTERACIONES
CONDUCTUALES, INMUNITARIAS Y NEUROQUÍMICAS
PRODUCIDAS POR EL DESARROLLO DE MELANOMA B16
EN RATONES MACHO**

DIRECTORES:

Dra. Arantza Azpiroz Sánchez

Dr. Oscar Vegas Moreno

TESIS DOCTORAL

Marzo 2017

**Departamento de Procesos Psicológicos Básicos y su Desarrollo,
Facultad de Psicología, Universidad del País Vasco (UPV/EHU)**



Esta tesis ha sido realizada gracias a la Ayuda Predoctoral para la formación de personal investigador no doctor BFI-2012-43 (MOD. A) concedida por el Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco, disfrutada entre enero de 2013 y diciembre de 2016.

“Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro”

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)

“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico, es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”

Marie Curie (1867 -1934)

AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores, Arantza y Oscar, por permitirme aprender de vosotros y junto a vosotros, y de guiarme durante este largo proceso. Sobre todo, os agradezco vuestra disponibilidad y apoyo incondicional, y vuestra inmensurable paciencia. Me gustaría también extender estos agradecimientos a todo el “pasillo” de Psicobiología: Larraitz, Amaia, Joserra, Edu, Gari, Eneritz, Joa, Aritz, Ainara, Aitziber, Eider y Jaione, por vuestros esfuerzos de mantener este gran equipo con espíritu muy familiar. Eneritz, contigo he dado mis primeros pasos en el labo, guardo unos maravillosos recuerdos de cuándo trabajábamos juntas, siempre hacías que todo pareciera más fácil de lo que en realidad era! Posteriormente he tenido el lujo de trabajar con Olatz y Ainitze, las cuales siempre consiguen sacarme una sonrisa; con vosotras he compartido muchas experiencias, os agradezco muchísimo vuestra colaboración y solo os puedo decir que aquí me tenéis para lo que necesitéis. A Nora solo darle la bienvenida a esta gran familia; con conocimiento de causa te puedo decir que vas a estar muy a gusto y vas a aprender un montón de cosas. Vosotras tres, que habéis vivido tan de cerca mi última etapa predoctoral, deciros que no es fácil pero que merece muchísimo la pena, así que ánimo y siempre para adelante! Aritz he vivido contigo la última etapa de tu tesis, pero te puedo asegurar que no he sido capaz de entenderte hasta que no me ha llegado el momento, espero que te esté yendo de maravilla por California. Joa, sólo decirte que tienes una capacidad de trabajo y una humildad realmente envidiables. Te has convertido en este último tiempo en un apoyo incondicional para mí y te lo agradezco. Cada vez que hablo contigo comprendo lo que significa “estrategia activa de afrontamiento”, que en mi opinión, es lo que te caracteriza. Estoy en deuda con todos vosotros y me siento muy orgullosa de haber trabajado en este gran equipo durante todo este tiempo. No creáis que me he olvidado de todo lo que hemos compartido juntos (comidas, boda, congreso y hasta despedida de soletera...) ¡sois geniales! Una mención especial se merece Carmen y Mon, con vosotras emprendí el camino de la investigación, y con vosotras también estoy dando el

cierre a mi tesis. Gracias sobre todo por vuestro apoyo y guía! Gracias a ti Javi también por echarnos un cable con todo lo que supone la maquetación!

También me gustaría agradecer al Dpto. de Procesos Psicológicos Básicos y a los miembros del PAS por hacer nuestra vida burocrática más fácil y por ayudarnos a tener todo bajo control. Me gustaría agradecer especialmente a Hugo e Idoia por cuidar a los bichitos y hacer que no les falte de nada. Conchi y Angelines, no puedo olvidarme de vosotras que tanto nos mimáis y cuidáis, con vuestras risas me habéis alegrado muchas mañanas, ¡os lo aseguro!

Por otro lado me gustaría agradecer a Annemieke Kavelaars, Cobi Heijnen y Robert Dantzer por aceptarme en el Dpto. Symptom Research del M.D. Anderson Cancer Center y permitirme conocer vuestros laboratorios y el trabajo que realizáis en la clínica. Araceli, gracias a ti mi estancia en Houston fue más provechosa y divertida, has sido para mí una mentora magnífica!

Por último, pero no por ello menos importante, me siento en la necesidad de agradecer a mi familia y amigos, quienes sin entender muy bien lo que yo tramaba en Donosti, me han apoyado de forma incansable. Marcela y Andrés, nos habéis inculcado un tremendo espíritu de lucha y nos habéis dado en todo momento la libertad de decidir, apoyándonos a cada paso; sabéis que sois incondicionales para mí y que sin vosotros no hubiera podido llegar hasta aquí. Javier, eres la única persona que me saca de mis casillas y que a la vez me aporta una estabilidad y confianza casi mágicas! A mi cuadrilla de Amorebieta, a la que he tenido bastante descuidada últimamente, os agradezco vuestros ánimos, confianzas y disponibilidad absoluta. Puri, Juan y Joana, me habéis adoptado como una hija y una hermana y habéis cuidado de mí como lo hubiera hecho mi familia, sin vuestro apoyo este trabajo tampoco hubiera sido posible, os estaré agradecida eternamente! Para finalizar el apartado de la tesis con el que quizá he sufrido menos, decirte a ti Unai, que probablemente eres la persona que ha sufrido en mayor medida los efectos colaterales de esta tesis. A pesar de ello, has demostrado una fortaleza y paciencia increíbles. Todavía no

consigo saber qué es lo que hace que me aguantes, incluso en circunstancias, en las que ni yo me soporto!. Tú junto a mi familia, haces que todo cobre sentido y me dais las fuerzas necesarias para seguir adelante!

Agradezco que todos vosotros forméis parte de mi vida y os agradezco lo que me aportáis cada día, sin vosotros yo no sería tan feliz y este trabajo no sería igual...

ABREVIATURAS

3HAA	ácido 3-hidroxiantranílico
3-HK	3-hidroxiquinurenina
5-HIAA	ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
5-HTTP	5-hidroxitriptófano
A	adrenalina
Ach	acetilcolina
ACTH	hormona adrenocorticotropa o corticotropina (del inglés, <i>adrenocorticotropic hormone</i>)
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNasa	enzima desoxirribonucleasa
AK	ácido quinurénico
AMPc	adenosin monofosfato cíclico
ANOVA	análisis de la varianza
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	enzima ribonucleasa
ATV	área tegmental ventral
AVP	arginina vasopresina
BCG	bacillus calmette-Guérin

BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés, <i>brain derived neurotrophic factor</i>)
BH4	tetrahidrobiopterina
CCDA	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
CD 4	linfocitos T cooperadores
CD 40	molécula coestimuladora
CD 8	linfocitos T citotóxicos
CD	células dendríticas
CMH	complejo mayor de histocompatibilidad
CPA	células presentadoras de antígenos
CPF	córtex prefrontal
CREB	factor de transcripción celular (del inglés, <i>cAMP responsive element binding</i>)
CRH	hormona liberadora de corticotropina (del inglés, <i>corticotropin-releasing hormone</i>)
Ct	ciclo umbral (del inglés, <i>cycle threshold</i>)
DA	dopamina
DO	densidad óptica
DOPAC	3-4-dihidroxi-fenilacético
DSM	manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (del inglés, <i>diagnostic and statistical manual of menthal disorders</i>)
EDTA	ácido exilien diamino tetracético
EEM	error estándar de la media

ELISA	ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (del inglés, <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
FST	prueba de natación forzada (del inglés, <i>forced swimming test</i>)
GABA	ácido gamma aminobutírico
GAPDH	gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GC	glucocorticoides
GLU	glutamato
HAAO	enzima 3-hidroxiantranilato 3,4 dioxigenasa
HAM-D	escala de evaluación de la depresión de Hamilton (del inglés, <i>Hamilton depression rating scale</i>)
HPA	eje hipotalámico pituitario adrenal
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución (del inglés, <i>high performance liquid chromatography</i>)
IDO	enzima indolamina 2,3-dioxigenasa
IFN	interferón
IL	interleucina
Inos	enzima inductora de la síntesis de óxido nítrico (del inglés, <i>inducible nitric oxide synthase</i>)
ip	vía intraperitoneal
KYN	quinurenina
LC	locus coeruleus
LPS	lipopolisacárido o endotoxina
MAO	enzima monoamina oxidasa

MHPG	3-metoxi-4-hidroxifenilglicol
NA	noradrenalina
NF-κB	factor nuclear kappa-B
NK	células asesinas naturales (del inglés, <i>natural killer</i>)
nm	nanómetros, longitud de onda
NMDA	receptores N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
NPFT	prueba del alimento novedoso/apetitoso (del inglés, <i>novel palatable food test</i>)
NSB	unión no específica
OFT	prueba de campo abierto (del inglés, <i>open field test</i>)
OMS	organización mundial de la salud
PAH	enzima fenilalanina hidroxilasa (del inglés, <i>phenylalanine hydroxylase</i>)
PBS	solución salina amortiguada por fosfatos
PCR	proteína C reactiva
PHE	fenilalanina
PKU	fenilcetonuria
ROS	especies reactivas de oxígeno (del inglés, <i>reactive oxygen species</i>)
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	reacción de la cadena de polimerasa en transcripción reversa (del inglés, <i>retro transcription polimerase chain reaction</i>)
SAM	eje simpático adreno-medular
SBF	suero bovino fetal

sc	vía subcutánea
SEOM	sociedad española de oncología médica
SI	sistema inmunitario
SNC	sistema nervioso central
SNS	sistema nervioso simpático
SPT	prueba de preferencia de sacarosa (del inglés, <i>sucrose preference test</i>)
TDO	enzima triptófano 2,3 dioxigenasa
Tf	temperatura de fusión
Th	célula T cooperadora (del inglés, <i>T helper</i>)
TH	enzima tirosina hidroxilasa
TMB	3',3',5',5'-tetrametilbenzidina, solución de sustrato
TNF	factor de necrosis tumoral (del inglés, <i>tumor necrosis factor</i>)
TPH	enzima triptófano hidroxilasa
TrKB	tropomiosina quinasa B
TRP	triptófano
TST	prueba de la suspensión de la cola (del inglés, <i>tail suspension test</i>)
TYR	tirosina
UV	ultravioleta

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	vii
ABREVIATURAS	xi
INDICE	22
INDICE DE FIGURAS	26
INDICE DE FIGURAS	27
INDICE DE GRÁFICOS	28
INTRODUCCIÓN.....	22
RELACIONES BIDIRECCIONALES ENTRE EL SNC Y EL SI	22
1.1. Psiconeuroinmunología.....	33
1.2. Vías de comunicación entre el SN y el SI	34
1.3. Estrés e inmunidad	38
INFLAMACIÓN Y DEPRESIÓN	22
1.4. Señales inmunitarias desde la periferia hasta el cerebro.....	43
1.5. Citocinas proinflamatorias: efectos fisiológicos y conductuales.....	45
1.6. Trastorno depresivo	48
1.7. Mecanismos implicados en la relación citocinas-depresión	59
CÁNCER Y DEPRESIÓN	31
1.8. EL MELANOMA MALIGNO.....	73
1.9. MECANISMOS INMUNITARIOS FRENTE AL CÁNCER	78
1.10. CÁNCER, INFLAMACIÓN Y DEPRESIÓN.....	84
OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	31
1. OBJETIVOS.....	91
2. HIPÓTESIS.....	97
3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	98

3.1.	EXPERIMENTO 1: EFECTO DEL DESARROLLO TUMORAL EN LA SECRECIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS, LA ACTIVIDAD MONOAMINÉRGICA CENTRAL Y LA CONDUCTA DEPRESIVA.....	99
3.2.	EXPERIMENTO 2: DESARROLLO TUMORAL, INFLAMACIÓN EN EL SNC Y CONDUCTA DEPRESIVA: ACTIVIDAD DE LOS ENZIMAS IDO Y PAH	102
3.3.	EXPERIMENTO 3: DESARROLLO TUMORAL Y CONDUCTA DEPRESIVA: EFECTO DEL ESTRÉS SOCIAL	104
MATERIAL Y MÉTODOS.....		31
1.	INSTALACIONES, ANIMALES Y ALOJAMIENTO	109
2.	CULTIVO DE CÉLULAS DE MELANOMA B16-F1 y B16-10.....	110
2.1.	Recuento celular y estudio de viabilidad.....	111
2.2.	Inoculación tumoral.....	111
2.3.	Cuantificación del desarrollo tumoral	112
3.	EVALUACIÓN CONDUCTUAL.....	114
3.1.	Prueba de la comida novedosa/apetitosa (Novel Palatable Food Test - NPFT)	114
3.2.	Prueba de la suspensión de cola (Tail Suspension Test - TST).....	114
3.3.	Prueba de la natación forzada (Forced Swimming Test - FST)	115
3.4.	Prueba del campo abierto (Open Field Test - OFT)	116
3.5.	Prueba de la preferencia de sacarosa (Sucrose Preference Test - SPT)	117
4.	EXTRACCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	118
4.1.	Extracción de sangre.....	118
4.2.	Extracción del cerebro, estructuras cerebrales y órganos	119
5.	ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	120
5.1.	Expresión génica de citocinas proinflamatorias y anti-inflamatorias y del enzima IDO en cerebro (Real Time RT-PCR).....	120
5.2.	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC - High Performance Liquid Chromatography)	128

5.3.	Determinación de los niveles de corticosterona en plasma (ELISA)	136
5.4.	Determinación de los niveles plasmáticos de interleucinas proinflamatorias.	139
6.	MODELO DE ESTRÉS SOCIAL POR CONTACTO SENSORIAL	145
6.1.	Selección y entrenamiento de ratones agresivos.....	145
6.2.	Estrés social: interacción física y sensorial	146
6.3.	Evaluación conductual y establecimiento de las estrategias de afrontamiento 148	
7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	149
RESULTADOS	110
EXPERIMENTO 1	112
1.1.	VARIABLES CONDUCTUALES.....	157
1.2.	VARIABLES FISIOLÓGICAS	158
EXPERIMENTO 2	158
2.1.	VARIABLES CONDUCTUALES.....	169
2.2.	VARIABLES FISIOLÓGICAS	172
2.3.	CORRELACIONES ENTRE VARIABLES CONDUCTUALES Y FISIOLÓGICAS	182
EXPERIMENTO 3	185
3.1.	VARIABLES CONDUCTUALES.....	187
3.2.	VARIABLES FISIOLÓGICAS	190
3.3.	CORRELACIONES ENTRE VARIABLES CONDUCTUALES Y FISIOLÓGICAS	196
DISCUSIÓN	199
1.	Efecto del desarrollo tumoral sobre la conducta de tipo depresivo	201
2.	Efecto de las citocinas proinflamatorias en la aparición de conductas depresivas en sujetos con desarrollo tumoral.....	204
3.	Desarrollo tumoral, inflamación y depresión: posibles mecanismos implicados. ...	209
4.	Cáncer, estrés y depresión	213
CONCLUSIONES	215

REFERENCIAS	221
ANEXO	267
ANEXO I. CATEGORIAS CONDUCTUALES	269

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de las principales vías de comunicación entre el SNC y el SI.....	37
Figura 2: Vías de comunicación desde la periferia hacia el cerebro.	45
Figura 3: Evolución temporal de los síntomas neuropsiquiátricos inducidos por el tratamiento crónico con INF- α	48
Figura 4: Hipótesis monoaminérgica.....	54
Figura 5: Sistema HPA de cortisol en depresión.	59
Figura 6: Vía de la IDO y de la kinurenina en la patología del SNC inducida por las citocinas.	64
Figura 7: Efectos de citocinas inflamatorias en la síntesis y la oxidación de BH4, y en la actividad de la óxido nítrico sintasa.	66
Figura 8: Crecimiento celular normal y anormal de la piel.	78
Figura 9: Imágenes obtenidas del lóbulo superior del pulmón izquierdo (anverso y reverso), de tres sujetos con desarrollo de melanoma pulmonar.	113
Figura 10: Vena submandibular de ratón.....	119
Figura 11: Ejemplo de la extracción de algunas estructuras cerebrales.....	120
Figura 12: Amplificación del ADN en la PCR.....	126
Figura 13: Cromatograma correspondiente a los estándares utilizados para determinar el orden y el tiempo de retención de las sustancias.	131
Figura 14: Cromatograma correspondiente a los estándares utilizados para determinar el orden y el tiempo de retención de las sustancias.	134
Figura 15: Representación del Modelo de Estrés Social.	148

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Representación esquemática del diseño del experimento 1	101
Tabla 2 Representación esquemática del diseño del experimento 2	103
Tabla 3 Representación esquemática del diseño del experimento 3	106
Tabla 4: Especificaciones de los cebadores de PCR	127
Tabla 5: Condiciones cromatográficas	132
Tabla 6 Condiciones cromatográficas	135
Tabla 7: Correlaciones bivariadas entre las variables conductuales y fisiológicas del experimento 2 que resultaron significativas	184
Tabla 8 Correlaciones bivariadas entre las variables conductuales y fisiológicas del experimento 3	198

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Tiempo inmóvil por cada episodio en la prueba de la suspensión de la cola..	158
Gráfico 2: Expresión génica de TNF- α e IL-6 en el hipocampo.....	160
Gráfico 3 Niveles plasmáticos de IL-6 (pg/ml).....	161
Gráfico 4: Niveles de DOPAC y DA en el estriado (ng/mg de tejido húmedo).....	163
Gráfico 5: Niveles de 5HT en el estriado (ng/mg de tejido húmedo)..	164
Gráfico 6: Niveles medios de 5HIAA (ng/mg de tejido húmedo) e índice de la actividad serotoninérgica (ratio 5HIAA/5HT) en la corteza prefrontal.....	166
Gráfico 7: Promedio de tiempo inmóvil en segundos, en la prueba de la suspensión de la cola.	170
Gráfico 8: Promedio de tiempo inmóvil en segundos, en la prueba de natación forzada y. Distancia media de natación en la prueba de natación forzada	171
Gráfico 9: Promedio de tiempo inmóvil en segundos, en la prueba de campo abierto y Distancia media recorrida en la prueba de campo abierto.....	172
Gráfico 10: Peso medio del bazo en miligramos.....	173
Gráfico 11: Valores medios de expresión génica de IL-6 en cerebro y valores medios de expresión génica de IFN- γ en cerebro	174
Gráfico 12: Valores medios de expresión génica de TNF- α en cerebro y valores medios de expresión génica de IL-1 β en cerebro.	176
Gráfico 13: Valores medios de expresión génica de IL-4 en cerebro y valores medios de expresión génica de IL-10 en cerebro	177
Gráfico 14: Índice de la actividad inflamatoria en cerebro (ratio IL-6/IL-10). * p < 0.05.....	178
Gráfico 15: Valores medios de expresión génica del enzima IDO en cerebro..	179
Gráfico 16: Niveles plasmáticos medios de quinurenina (ng/ μ l). Niveles plasmáticos medios de triptófano (ng/ μ l) e índice de actividad periférica del enzima IDO (ratio Kyn/Trp).....	180
Gráfico 17: Niveles plasmáticos medios de tirosina (ng/ μ l). Índice de actividad del enzima PAH (ratio Phe/Tyr)	182

Gráfico 18: Promedio de tiempo inmóvil en segundos, en la prueba de campo abierto y distancia media recorrida en la prueba de campo abierto.	188
Gráfico 19: Latencia media de inmovilidad en segundos, en la prueba de natación forzada.y distancia media de natación en la prueba de natación forzada.	189
Gráfico 20 Consumo medio de sacarosa en gramos de solución por cada gramo de peso corporal y porcentaje medio de preferencia de sacarosa en relación a la preferencia de agua.	190
Gráfico 21: Promedio de peso corporal en gramos, 7 días antes de la inoculación tumoral (basal) y 21 días después de la inoculación tumoral (final). † respecto a basal en todos los grupos analizados y peso medio del bazo en miligramos.	191
Gráfico 22: Valores medios de expresión génica de IL-6 en cerebro, valores medios de expresión génica de TNF- α en cerebro y valores medios de expresión génica de IL-1 β en cerebro..	192
Gráfico 23: Valores medios de expresión génica del enzima IDO en cerebro	193
Gráfico 24: Índice de la actividad del enzima IDO en plasma (ratio quinurenina/triptófano) 7 días antes de la inoculación tumoral (basal) y 21 días después de la inoculación tumoral (final). † respecto a basal en el grupo tumor y niveles plasmáticos medios de 3-hidroxiquinurenina (ng/ μ l).	194
Gráfico 25: Índice de la actividad del enzima PAH en plasma (ratio fenilalanina/tirosina) 7 días antes de la inoculación tumoral (basal) y 21 días después de la inoculación tumoral (final). † respecto a basal en el grupo tumor e índice de la actividad del enzima PAH en plasma (ratio fenilalanina/tirosina) 21 días después de la inoculación tumoral (final)	195
Gráfico 26: a) Niveles plasmáticos medios de corticosterona (ng/ml) 7 días antes de la inoculación tumoral (basal), 1 hora después del estrés social (post-estrés) y 21 días después de la inoculación tumoral (final). † respecto a basal y a final en el grupo estresado y niveles plasmáticos medios de corticosterona (ng/ml) 1 hora después del estrés social (post-estrés).	196

Bloque I

INTRODUCCIÓN

Desde el campo la Psiconeuroinmunología que se basa en las relaciones sistema nervioso (SN) y sistema inmunitario (SI), se han logrado desarrollar modelos de enfermedad que han permitido estudiar los cambios conductuales asociados a una gran variedad de desafíos inmunológicos. Todo ello ha dado lugar a nuevas líneas de investigación basadas en la relación entre patrones inmunitarios y neuroendocrinos y ciertos trastornos mentales.

Los primeros estudios de inmunidad realizados en sujetos deprimidos en los años setenta revelaron un estado de inmunosupresión, evidenciado por la baja actividad citotóxica de las células NK y la significativa disminución de la capacidad proliferativa de los linfocitos circulantes en respuesta a mitógenos inespecíficos. Sin embargo, estudios realizados en los años 80 y 90 revelaron una realidad mucho más matizada, la cual evidenciaba la activación de células inmunes innatas y de linfocitos T. Estas observaciones coincidieron con el descubrimiento de que las citocinas proinflamatorias podían actuar fuera del sistema inmunitario, en particular en el cerebro, para producir fiebre, activar el eje hipotalámico hipofisario adrenal e inducir alteraciones conductuales similares a algunos de los síntomas característicos de la depresión. El descubrimiento de la relación entre las acciones de las citocinas en el cerebro y la conducta de enfermedad, condujo a un cambio en la concepción de la propia enfermedad. A partir de este momento, la enfermedad sería considerada como una respuesta normal ante los patógenos infecciosos detectados por las células inmunes innatas, de la misma manera que el miedo es una respuesta adaptativa a los peligros detectados por nuestros órganos sensoriales. De la misma forma en que ciertas alteraciones en el sistema de alerta pueden generar trastornos de ansiedad, podría pensarse que un mal funcionamiento del sistema de defensa podría causar depresión. La posibilidad de que la depresión no sea más que una

mala adaptación del sistema de defensa, no penetró fácilmente en el campo de la psiquiatría dado el predominio de las teorías neurotransmisoras de los trastornos psiquiátricos. Fue todo un reto conciliar la teoría serotoninérgica de la depresión con la imagen un tanto borrosa de las citocinas cerebrales producidas por las células inmunes innatas del cerebro. En los últimos 20 años, se ha producido un profundo cambio motivado no sólo por el rápido progreso en neurociencia y neuroinmunología, sino también por la incapacidad de la industria farmacéutica para generar tratamientos innovadores en el campo de la psiquiatría. Es importante destacar que varios mecanismos inflamatorios están siendo actualmente investigados también en enfermedades neurológicas crónicas tradicionalmente clasificadas como trastornos neurodegenerativos, como alzheimer y parkinson. El cambio de paradigma en el campo de la psiquiatría, impulsado por la intrusión de la inflamación, constituye un abanico de ventajas pero también de retos. Por un lado, puede apuntar a nuevos objetivos de investigación y de desarrollo de fármacos, pero por otro implicaría una revisión de la psicopatología, en cuanto a su descripción categórica y estanca de los síntomas, cualquiera que sea su utilidad para el diagnóstico y el tratamiento. De cualquier forma, ahora sabemos que la inflamación juega un papel fundamental en una variedad de trastornos psiquiátricos que van desde la depresión a los trastornos del espectro autista, incluyendo los trastornos bipolares y la esquizofrenia. Esto requiere un enfoque dimensional para vincular más fácilmente los mediadores inflamatorios a comportamientos específicos, síntomas y circuitos cerebrales.

El presente trabajo incluye una revisión teórica integral de lo que actualmente se conoce sobre el papel de la inflamación en la depresión, los mecanismos que intervienen y cómo estos mecanismos interactúan con los planteamientos

neuroquímicos clásicos. El principal objetivo de este trabajo es estudiar los cambios inmunitarios, fisiológicos y conductuales asociados al desarrollo tumoral de melanoma B16 y determinar si una situación de estrés agudo, durante el desarrollo tumoral, altera dichos cambios.

CAPITULO 1

RELACIONES BIDIRECCIONALES ENTRE EL SNC Y EL SI

1.1. Psiconeuroinmunología

La Psiconeuroinmunología es la convergencia de varias disciplinas (ciencias conductuales, endocrinología, neurociencias e inmunología) que estudia los cambios inmunológicos asociados a los conductuales y viceversa, así como los mecanismos implicados en esta compleja relación. Gracias a los trabajos pioneros de George Solomon y Robert Ader, este área de estudio se ha consolidado como una verdadera disciplina científica con identidad propia, la cual se basa en las relaciones recíprocas entre el Sistema Nervioso (SN) y el Sistema Inmunitario (SI), los dos sistemas más complejos implicados en el mantenimiento de la homeostasis y por tanto, en el equilibrio entre la salud y la enfermedad. Existen numerosas investigaciones que demuestran la existencia de una comunicación bidireccional entre el SN y el SI (Ader & Kelley, 2007; Haddad, 2008; Tausk, Elenkov, & Moynihan, 2008), en la que intervienen neurotransmisores, neurohormonas, neuropéptidos y citocinas, conformando un complejo entramado que continúa descubriéndose cada día. Cuatro líneas generales de investigación evidencian la existencia de canales de comunicación aferentes y eferentes entre ambos sistemas:

- La lesión o estimulación de determinadas regiones cerebrales, causa alteraciones en la respuesta inmune (Rice, Boehm, Moynihan, Bellinger, & Stevens, 2002)
- Una gran cantidad de fibras nerviosas, principalmente noradrenérgicas, inervan las zonas vasculares y parénquimas de los órganos linfoides, tanto primarios como secundarios, proporcionando una estrecha unión anatómica

entre ambos sistemas (vía de comunicación neurovegetativa) (Felten, Carlson, Olschowka, & Livnat, 1985; Lindh, Lundberg, & Hokfelt, 1989).

- Numerosas neurohormonas de origen central, principalmente hipotalámico-hipofisiarias, ejercen un importante papel regulador del SI (Sheridan, 2003), a través de los receptores que para ellas tienen las células inmunitarias (vía de comunicación neuroendocrina) (Jafari & Khansari, 1990; Webster, Tracey, Jutila, Wolfe, & De Souza, 1990).
- Productos de las células inmunitarias, tales como las citocinas, presentan actividad neuroendocrina y son capaces de influir en diversas funciones cerebrales y activar circuitos de retroalimentación inhibitoria para su propia regulación (Konsman, Parnet, & Dantzer, 2002)

1.2. Vías de comunicación entre el SN y el SI

El reconocimiento e integración de estímulos sensoriales internos y externos por parte del SNC, ocasiona cambios en la síntesis y liberación de neurotransmisores, hormonas y neuropéptidos. Estas sustancias, llegan a los órganos y células linfoides a través de dos importantes vías de comunicación descendentes (Figura 1), que permiten al SNC controlar la actividad de los órganos periféricos, incluyendo los órganos del sistema inmunitario. A continuación se detallan las características específicas de cada una de estas vías.

- La vía de comunicación neurovegetativa, a través del Sistema Nervioso Simpático (SNS) y el Sistema Nervioso Parasimpático (SNP), que mediante la inervación autonómica, y la consiguiente secreción de noradrenalina, desde

las terminales nerviosas y de adrenalina desde la médula adrenal, permite al SNC controlar la actividad de los órganos inmunitarios tales como el bazo, el timo y los nódulos linfáticos, entre otros (Oberbeck, 2006). Bajo condiciones fisiológicas normales, o en condiciones generadas en situaciones de estrés, las catecolaminas pueden influir en el sistema inmunitario ligándose a los receptores que para estas monoaminas existen en las células inmunitarias (linfocitos T y B, células NK y macrófagos) (Benschop, Schedlowski, Wienecke, Jacobs, & Schmidt, 1997).

- La vía de comunicación neuroendocrina, el eje hipotalámico pituitario adrenal (HPA), hace referencia a la síntesis y liberación de factores de secreción por parte de ciertas células al sistema porta pituitario de la glándula pituitaria, como la Hormona Liberadora de Corticotropina (CRH) y Arginina-Vasopresina (AVP). Esta estimulación, hará que la glándula pituitaria sintetice y libere diversas hormonas al torrente sanguíneo, principalmente la hormona adrenocorticotropina (ACTH) y ésta a su vez, provocará la síntesis y secreción de nuevas hormonas capaces de influir sobre los diversos órganos y células periféricas. Otras hormonas de la pituitaria, tales como vasopresina, prolactina, hormona del crecimiento, así como neurotransmisores y neuropéptidos, también parecen tener efectos inmunomoduladores (Jessop, 2002). Finalmente, los glucocorticoides (GCs), principales hormonas segregadas en la respuesta de estrés por la corteza adrenal, como consecuencia de la liberación de ACTH, han sido objeto de especial atención. Numerosas investigaciones han puesto de manifiesto el importante papel que estas hormonas desempeñan en la regulación de la respuesta inmune (Besedovsky & del Rey, 2007).

La activación de éstas dos vías de comunicación neuroquímica y la consiguiente secreción de hormonas y neurotransmisores, puede causar importantes efectos en la función del sistema inmunitario. A través de interacciones ligando-receptor, estas sustancias endógenas, afectan a diversos procesos de la respuesta inmunitaria, tales como el desarrollo y la diferenciación celular, activación y proliferación linfocitaria, migración celular, producción y liberación de citocinas, y expresión de receptores de citocinas.

- La tercera vía de comunicación, explica la influencia que puede tener la actividad inmunitaria sobre la actividad del SNC. Las células inmunitarias activadas durante la respuesta del huésped ante la invasión de patógenos, así como en un contexto de daño tisular o estrés psicosocial, liberan señales moleculares que median las reacciones inmunitarias locales. Estas señales son las citocinas proinflamatorias, tales como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (R Dantzer et al., 1998). Estos factores solubles parecen ser los principales mediadores en la comunicación entre el sistema inmunitario y el cerebro y no sólo con objeto de orquestar las respuestas inmunitarias, sino también de coordinar los cambios conductuales que es necesario adoptar para la recuperación. De esta manera, el SI se presenta como un órgano sensorial difuso distribuido por todo el organismo, que le permite al SNC regular la actividad neuroendocrina y vegetativa, y coordinar el conjunto de mecanismos que confluyen en la respuesta inmunitaria y en la modulación de la misma (Besedovsky & Del Rey, 2002; O Vegas et al., 2004).

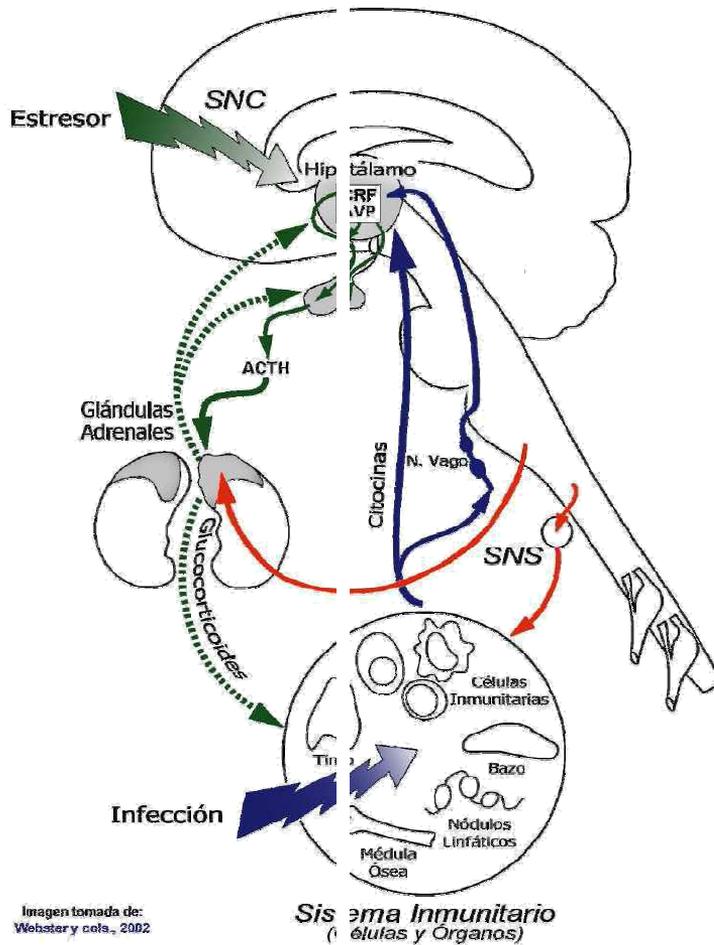


Figura 1: Representación esquemática de las principales vías de comunicación entre el SNC y el SI, incluyendo el eje HPA (en verde), el SAM (en rojo) y el circuito de retroalimentación al cerebro, a través de las citocinas (en azul).

Este creciente cuerpo de conocimiento sugiere que factores psicológicos como el estrés, la depresión, o la falta de apoyo social pueden aumentar la susceptibilidad a enfermarse, debido a que la actividad neuroendocrina y neurovegetativa asociadas a estos factores, alteran el equilibrio inmunitario (Alessandro Bartolomucci, 2007;

Carlson, Speca, Patel, & Goodey, 2003; Garssen & Goodkin, 1999; W. Wu et al., 2000) Una gran cantidad de estudios ha propuesto al estrés social como uno de los principales responsables del desarrollo y progresión de enfermedades infecciosas y neoplásicas, así como de psicopatologías, tales como ansiedad y depresión, (Heffner, Loving, Robles, & Kiecolt-Glaser, 2003).

1.3. Estrés e inmunidad

La mayor cantidad de evidencias a cerca de las relaciones entre el SN y el SI provienen de los estudios realizados sobre estrés. Aunque los estresores no afecten directamente a las células inmunitarias, el SNC codifica e interpreta los estímulos neurosensitivos tanto internos como externos. La modulación de la respuesta inmune por parte del SNC está mediada por una compleja red de señales, que funcionan en comunicación bidireccional entre los sistemas neuroendocrino e inmune. Como se ha descrito anteriormente, el eje HPA y el eje SAM son las dos vías principales a través de las cuales puede alterarse el SI. Ya que ante estímulos estresantes se produce la activación tanto del eje SAM, como del eje HPA, no es sorprendente que el estrés tenga un impacto sobre la inmunidad. En general, diversos estudios coinciden en afirmar que el estrés tiene un efecto inmunopotenciador sobre las células que regulan la función inmunitaria innata (Glaser & Kiecolt-Glaser, 2005), como son las células presentadoras del antígeno (CPA), los monocitos o macrófagos, las células dendríticas (CD) y otras células fagocíticas, mientras que tiene un efecto inmunosupresor sobre las células de la

función inmunitaria adaptativa, como son las células T y B (Bowers, Bilbo, Dhabhar, & Nelson, 2008).

Cada vez son más numerosos los estudios que señalan paradójicamente un efecto inmunopotenciador del estrés (De Raedt, 2006; Meichenbaum, 2007), y/o el aumento de la resistencia a los efectos negativos debidos a la activación de los sistemas de respuesta de estrés (F S Dhabhar, 2009; Firdaus S Dhabhar et al., 2010; Frank, Miguel, Watkins, & Maier, 2010; Sorrells & Sapolsky, 2007). Esta heterogeneidad en el origen y dirección de los efectos del estrés depende en gran medida del tipo de parámetro inmunitario estudiado (proliferación celular T y B, actividad citotóxica NK, secreción de citocinas, etc.), de las características propias del estímulo estresante (físico o psicológico, agudo o crónico, controlable o incontrolable, etc.), de las características propias del individuo (especie, edad, sexo, dieta, estado de salud, experiencia previa, características de personalidad, etc.) (Demetrikopoulos, Keller, & Schleifer, 1999; Moynihan, 2003; Rabin, 1999; Shi et al., 2003) y del momento de la aplicación del estrés (F S Dhabhar, 2009; Firdaus S Dhabhar et al., 2010; Frank et al., 2010).

Es bien conocido que ante un estímulo estresante se puede activar la respuesta inflamatoria que conduce a un marcado aumento de citocinas proinflamatorias, tales como IL-6 (Bierhaus et al., 2003; Pace et al., 2006) En esencia, se desencadena una respuesta inmune no contra un patógeno, sino contra una amenaza psicológica. Experiencias vitales estresantes, como el cuidado a largo plazo de un cónyuge con demencia (Kiecolt-Glaser et al., 2003), el enviudamiento (Schultze-Florey et al., 2012), el aislamiento prolongado (Yi et al., 2014), el desequilibrio entre el esfuerzo-recompensa en el ámbito laboral (Bellingrath, Rohleder, & Kudielka, 2013) y las experiencias adversas en la edad temprana (Slopen, Kubzansky, McLaughlin, &

Koenen, 2013), también aumentan la actividad inflamatoria y han sido asociadas con depresión. Existe una gran cantidad de evidencia a cerca de la relación entre una experiencia traumática (abuso, maltrato, etc.) durante la infancia y el desarrollo de trastornos depresivos (Tursich et al., 2014). Así, en base a un meta-análisis, no sólo se concluyó que la exposición a un trauma estaba positivamente asociada con niveles altos de citocinas (IL-1 β , IL-6 y TNF- α), sino que esta asociación fue especialmente pronunciada en individuos que habían desarrollado síntomas neuropsiquiátricos.

Sabemos que la respuesta inflamatoria es adaptativa en el contexto de una amenaza física, ya que mejora la cicatrización de heridas y la recuperación de la lesión, pero ¿qué pasa cuando esta respuesta es activada ante condiciones sociales adversas? Cuando un individuo es expuesto a situaciones estresantes de evaluación, rechazo, aislamiento o exclusión social, o incluso a amenazas simbólicas o imaginadas, aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades relacionadas con la inflamación, incluida la depresión (Cole et al., 2012).

Con el objetivo de dirigir esta introducción hacia el trabajo que se presentará a continuación, en el siguiente capítulo prestaremos especial atención a la tercera vía de comunicación, que como ya se ha mencionado, explica la influencia que puede tener la actividad inmunitaria sobre el SNC.

CAPITULO 2

INFLAMACIÓN Y DEPRESIÓN

1.4. Señales inmunitarias desde la periferia hasta el cerebro

Cuanto más se conoce acerca de las relaciones entre el cerebro y el sistema inmune, mayor es la evidencia del importante papel que juegan las citocinas y otras moléculas inmunitarias en la función del SNC. De hecho, moléculas y células inmunitarias contribuyen a preservar la integridad neuronal, influyendo en procesos tales como la neurogénesis, la remodelación sináptica y la neurotransmisión. No obstante, la sobreactivación inmunitaria, puede causar estragos en el cuerpo, en el cerebro y finalmente puede afectar a la conducta (R Dantzer, O'Connor, Freund, Johnson, & Kelley, 2008; Andrew H Miller, Maletic, & Raison, 2009).

Las células del SI patrullan los tejidos del organismo, buscando continuamente la presencia de sustancias extrañas (normalmente bacterias, virus y hongos). Cuando se detecta la presencia de un agente extraño, el sistema inmunitario se activa con el fin de destruirlo y devolver al organismo el estado de equilibrio. Este proceso se da de manera constante sin que el individuo sea consciente del mismo. Tras reconocer los componentes antigénicos de un determinado patógeno (antígeno) como “extraños” o “no propios”, la primera línea de defensa que se activa es la inmunidad innata. Los macrófagos, células cuya función es fagocitar al patógeno o antígeno, tienen un papel fundamental en esta respuesta. Una vez que esto ocurre, los macrófagos sintetizan y liberan citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α . La liberación de estas citocinas por parte de las células inmunitarias activadas se produce no sólo en respuesta a patógenos, sino también en un contexto de daño tisular e incluso frente a estrés psicosocial.

Una gran cantidad de investigaciones ha comprobado la capacidad de las citocinas proinflamatorias para inducir fiebre, activar el eje HPA y producir una serie de síntomas conductuales. Para provocar tales efectos, las citocinas deben llegar al cerebro desde los lugares del cuerpo donde se ha desencadenado la respuesta inmunitaria. Se ha demostrado que existen receptores de citocinas en el cerebro (Dantzer, 2004) y que éstas, pueden alcanzar el cerebro a través de vías humorales, celulares y neurales (Figura 2). Estas vías comprenden al menos cinco mecanismos no excluyentes: 1) paso de citocinas a través de regiones libres de barrera hematoencefálica, incluyendo el plexo coroideo y los órganos circunventriculares, 2) transporte activo en el endotelio cerebral mediante transportadores específicos, 3) activación de células endoteliales, responsables de la subsecuente liberación de segundos mensajeros (p. ej., prostaglandinas y óxido nítrico) en el área parénquima cerebral, 4) transmisión de señales de las citocinas por medio de fibras nerviosas aferentes, tales como el nervio vago, 5) entrada de monocitos periféricos activados dentro del área parénquima cerebral (Capuron & Miller, 2011).

Una vez que las citocinas proinflamatorias acceden al cerebro mediante cualquiera de estas vías, o bien siendo sintetizadas en el propio cerebro, podrían afectar a la neurotransmisión, la actividad neuroendocrina, la plasticidad neuronal y los circuitos cerebrales, pudiendo de esta forma producir un repertorio de cambios conductuales denominado “conducta de enfermedad” (Dantzer, 2001).

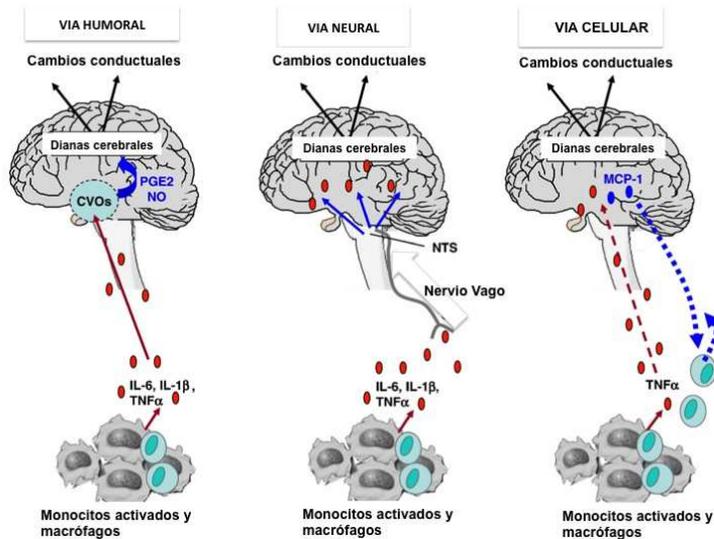


Figura 2: Vías de comunicación desde la periferia hacia el cerebro, mediante las cuales las citocinas acceden al cerebro: A) vía humoral, B) vía neural y C) vía celular.

1.5. Citocinas proinflamatorias: efectos fisiológicos y conductuales

Como ya se ha indicado anteriormente, la activación del SI produce la secreción de numerosas citocinas, las cuales además de combatir la infección, proporcionan al SNC diversa información sobre el estado del organismo y los procesos que ocurren en la periferia. El SNC responde produciendo un conjunto de síntomas inespecíficos conocidos como conducta de enfermedad que constituye una estrategia altamente organizada del organismo para luchar contra la infección (Konsman et al., 2002), ya que inhibe la conducta activa y dirige toda la energía hacia la eliminación de los agentes patógenos (Maier & Watkins, 2003). Los cambios cognitivos y afectivos asociados a la infección, que incluyen apatía, anhedonia, incapacidad de concentración, e incluso pérdida de atención y memoria, van acompañados de cambios conductuales y fisiológicos, tales como una reducción de la actividad,

exploración, interacción social, agresión y conducta sexual, así como un aumento de la sensibilidad al dolor, debilidad, incremento del sueño de ondas lentas, pérdida de apetito y fiebre (R Dantzer et al., 1998; O Vegas et al., 2004). El aumento de temperatura corporal que ocurre durante la infección supone una respuesta fisiológica de defensa (estimulando la proliferación de células inmunitarias e inhibiendo el crecimiento de bacterias y patógenos víricos), y conduce a una serie de cambios conductuales que permiten mantener esta temperatura corporal elevada. El coste metabólico que supone producir y mantener el estado febril, lleva a reducir el gasto energético conductual, en este contexto se entiende el incremento del sueño, y el descenso de la actividad, exploración, interacción social o comportamiento sexual (De La Garza, 2005; Dunn, Swiergiel, de Beaurepaire, & Beaurepaire, 2005; Konsman et al., 2002).

En resumen, las citocinas proinflamatorias tales como IL-1, IL-6, TNF- α e interferones, liberados por los monocitos y macrófagos activados durante el curso de la infección, además de mediar las reacciones inmunitarias locales, son responsables de asegurar la sincronía necesaria entre los componentes metabólicos, fisiológicos y conductuales de la respuesta sistémica a la infección. La liberación de estas citocinas es normalmente transitoria, ya que se limita al período en el que se mantiene el reto inmunitario, por tanto, la conducta de enfermedad constituye una respuesta adaptativa, temporal y controlada del SNC a las señales inmunes. No obstante, cuando el reto inmunitario se convierte en crónico o está mal regulado, como se observa en pacientes que reciben tratamiento crónico con citocinas, o aquellos expuestos a enfermedades médicas y/o a estrés crónico, los efectos conductuales de las citocinas pueden dar lugar al desarrollo de síntomas conductuales clínicamente relevantes y a enfermedades neuropsiquiátricas, como la

depresión mayor (Lucile Capuron & Miller, 2011; Charles L. Raison, Capuron, & Miller, 2006).

A pesar de que tanto la conducta de enfermedad como la depresión propiamente dicha, suceden en respuesta a una estimulación inmunitaria, presentan distinta evolución temporal y diferente capacidad de respuesta a los antidepresivos (Lucile Capuron & Miller, 2004a). La conducta de enfermedad, que se caracteriza por síntomas neurovegetativos tales como, fatiga, enlentecimiento psicomotor, pérdida de apetito y alteraciones del sueño, se suele desarrollar rápidamente (al cabo de la primera semana de tratamiento con $\text{INF-}\alpha$) en la mayoría de los individuos expuestos a citocinas, y persiste durante dicha exposición. Por el contrario, los síntomas cognitivos y del estado de ánimo, que se caracterizan por depresión, ansiedad, irritabilidad y alteraciones de atención y memoria, aparecen sólo en pacientes vulnerables, y por lo general posteriormente (entre la semana 8 y 12 del tratamiento con $\text{INF-}\alpha$) (Figura 3). Estos últimos síntomas responden adecuadamente al tratamiento antidepresivo, a diferencia de los síntomas neurovegetativos (particularmente la fatiga). Se ha hipotetizado que la degradación del triptófano y el metabolismo de la serotonina podrían estar implicados en el desarrollo de los síntomas cognitivos y del estado de ánimo inducidos por $\text{INF-}\alpha$ (C L Raison et al., n.d.), mientras que los síntomas neurovegetativos podrían estar relacionados con alteraciones en el metabolismo de dopamina (DA) en los ganglios basales (L Capuron et al., 2007).

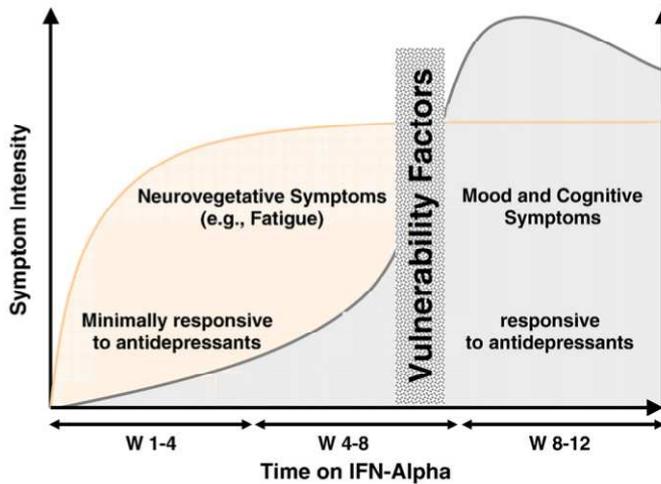


Figura 3: Evolución temporal de los síntomas neuropsiquiátricos inducidos por el tratamiento crónico con INF- α (Lucile Capuron & Miller, 2011).

1.6. Trastorno depresivo

Según el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-V), los trastornos depresivos se pueden clasificar en: trastorno de desregulación destructiva del estado de ánimo, trastorno de depresión mayor, trastorno depresivo persistente (distimia), trastorno disfórico premenstrual, trastorno depresivo inducido por una sustancia/medicamento, trastorno depresivo debido a otra afección médica, otro trastorno depresivo especificado y otro trastorno depresivo no especificado (American Psychiatric Association, 2014).

Los criterios y síntomas específicos del Trastorno de Depresión Mayor, son los siguientes:

- A.** Presencia de cinco (o más) de los siguientes síntomas durante un período de 2 semanas, que representan un cambio respecto a la actividad previa; uno de los

síntomas debe ser (1) estado de ánimo depresivo o (2) pérdida de interés o de placer. Nota: No incluir síntomas que se pueden atribuir claramente a otra afección médica.

1. Estado de ánimo depresivo la mayor parte del día, casi todos los días según lo indica el propio sujeto (p. ej., se siente triste, vacío o sin esperanza) o de la observación realizada por otros (p. ej., llanto). *Nota:* En niños y adolescentes el estado de ánimo puede ser irritable.
2. Disminución acusada del interés o del el placer por todas o casi todas las actividades, la mayor parte del día, casi todos los días (según refiere el propio sujeto u observan los demás).
3. Pérdida importante de peso sin hacer dieta o aumento de peso (p. ej. modificación de más del 5 % del peso corporal en 1 mes), o pérdida o aumento del apetito casi todos los días. *Nota:* En niños considerar el fracaso para el aumento de peso esperado.
4. Insomnio o hipersomnias casi todos días.
5. Agitación o enlentecimiento psicomotor casi todos los días (observable por los demás, no meras sensaciones subjetivas de inquietud o de enlentecimiento).
6. Fatiga o pérdida de energía casi todos los días.
7. Sentimientos de inutilidad o culpabilidad excesiva o inapropiada (que pueden ser delirantes) casi todos los días (no los simples autorreproches o culpa por el hecho de estar enfermo).

8. Disminución de la capacidad para pensar o concentrarse, o para tomar decisiones, casi todos los días (ya sea una atribución subjetiva o una observación ajena).
 9. Pensamientos recurrentes de muerte (no sólo temor a la muerte), ideación suicida recurrente sin un plan específico, tentativa de suicidio o un plan determinado para suicidarse.
- B.** Los síntomas provocan malestar clínicamente significativo o deterioro social, laboral o de otras áreas importantes de la actividad del individuo.
- C.** El episodio no se puede atribuir a los efectos fisiológicos directos de una sustancia (p. ej., una droga, un medicamento) o de una enfermedad médica (p. ej., hipotiroidismo).

Nota: Los criterios A-C constituyen un episodio de depresión mayor.

Nota: Las respuestas a una pérdida significativa (p. ej., duelo, ruina económica, pérdidas debidas a una catástrofe natural, una enfermedad o discapacidad grave) pueden incluir un sentimiento de tristeza intensa, rumiación acerca de la pérdida, insomnio, pérdida del apetito y pérdida de peso que figuran en el criterio A, y pueden simular un episodio depresivo. Aunque estos síntomas pueden ser comprensibles o considerarse apropiados a la pérdida, también se debería pensar atentamente en la presencia de un episodio de depresión mayor además de la respuesta normal a una pérdida significativa. Esta decisión requiere inevitablemente el criterio clínico basado en la historia del individuo y en las normas culturales para la expresión del malestar en el contexto de la pérdida.

- D.** El episodio de depresión mayor no se explica mejor por un trastorno esquizoafectivo, esquizofrenia, un trastorno esquizofreniforme, trastorno

delirante, u otro trastorno especificado o no especificado del espectro de la esquizofrenia y otros trastornos psicóticos.

E. Nunca ha habido un episodio maníaco o hipomaníaco.

Nota: Esta exclusión no se aplica si todos los episodios de tipo maníaco o hipomaníaco son inducidos por sustancias o se pueden atribuir a los efectos fisiológicos de otra afección médica.

Los desencadenantes de la depresión generalmente incluyen una combinación de factores biológicos (genéticos, bioquímicos, neuroendocrinos) y psicosociales (sucesos vitales, indefensión aprendida, factores cognitivo-conductuales) (Gomez-Lazaro et al., 2001). A continuación se detallan las diferentes hipótesis biológicas implicadas en la etiopatogenia de los trastornos depresivos.

- **Hipótesis monoaminérgica**

Durante los últimos 50 años, la investigación sobre depresión ha girado en torno a los sistemas monoaminérgicos y sus implicaciones en la enfermedad. La hipótesis monoaminérgica propone que la depresión es producida por una deficiencia de serotonina, noradrenalina y dopamina, en tanto que la acción antidepresiva de los fármacos está determinada por un incremento de la neurotransmisión de las mismas moléculas (Sthal, 2013).

El aumento de la neurotransmisión puede ser el resultado de la desensibilización (o regulación a la baja) de ciertos receptores para el neurotransmisor. Existe una importante coincidencia, puesto que la desensibilización que producen los fármacos

antidepresivos tiene una latencia de ± 2 semanas, que es el momento en que se inicia la acción terapéutica. De este modo el énfasis en la hipótesis monoaminérgica ha evolucionado desde el neurotransmisor al receptor.

Existen varios receptores para dopamina, el más conocido es el tipo D2, ubicado en la neurona postsináptica, el cual es estimulado por los agonistas dopaminérgicos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y bloqueado por los antagonistas neurolépticos en el tratamiento de las psicosis.

El triptófano (TRP) es un aminoácido esencial que se distribuye en el plasma a lo largo de todo el organismo. Los niveles plasmáticos disponibles de triptófano en el SNC (sistema nervioso central) son de un 5% para ello es necesario que atraviese la barrera hematoencefálica por competición contra otros cinco aminoácidos: valina, leucina, fenilalanina, tirosina e isoleucina con los que compite por su disponibilidad en el SNC.

En el SNC, el triptófano provoca la síntesis de serotonina (5-HT) mediante su descarboxilación. La reducción de los niveles de TRP de la dieta, provoca una disminución de los niveles plasmáticos del triptófano en un porcentaje del 15.-20%. Para el estudio del sistema serotoninérgico en humanos se utiliza el test de depleción aguda del triptófano (TDA) (Young, Smith, Pihl, & Ervin, 1985) con el objetivo de reducir los niveles plasmáticos de trp, se administra un cocktail de aminoácidos que compiten con el TRP por el transporte a través de la barrera hematoencefálica, restringiendo la entrada de TRP (Bell, Abrams, & Nutt, 2001). Se observa una supersensibilidad de los receptores postsinápticos secundarios a la reducción de las sinapsis disponibles de 5-HT, una reducción de los niveles plasmáticos de triptófano y de 5HIAA en un 80-90% a las 5 horas (A. T. Evers, M. van der Veen, Jolles, E. P. Deutz, & A. J. Schmitt, 2009; Murphy, Smith, Cowen, Robbins,

& Sahakian, 2002; van der Veen, Evers, Deutz, & Schmitt, 2007; Young et al., 1985) y 7 horas (Bell et al., 2001) y provocando sintomatología depresiva transitoria reflejada en test de depresión como el HAM-D (Test de depresión de Hamilton) en diferentes tipos de pacientes diagnosticados de depresión o con historia familiar de depresión (Booij, Van Der Does, Haffmans, & Riedel, 2005; Moreno et al., 2010; Murphy et al., 2002; Neumeister et al., 2005). En algunos estudios no se ha observado dicha sintomatología (Bell et al., 2001).

La hipótesis monoaminérgica ha sido cuestionada por diversos motivos:

- La eficacia de los antidepresivos clásicos es inferior al 50% y además, hay un alto porcentaje de pacientes que se resisten a estos fármacos (Nestler et al., 2002).
- Es necesario un tratamiento crónico para conseguir un efecto clínico; se requiere el tratamiento durante al menos 6 semanas para conseguir una remisión verdadera de la sintomatología (Posternak & Zimmerman, 2005). En este periodo de tiempo hasta la aparición del efecto antidepresivo, se ha descrito un aumento del riesgo de suicidio (Jick, Kaye, & Jick, 2004).

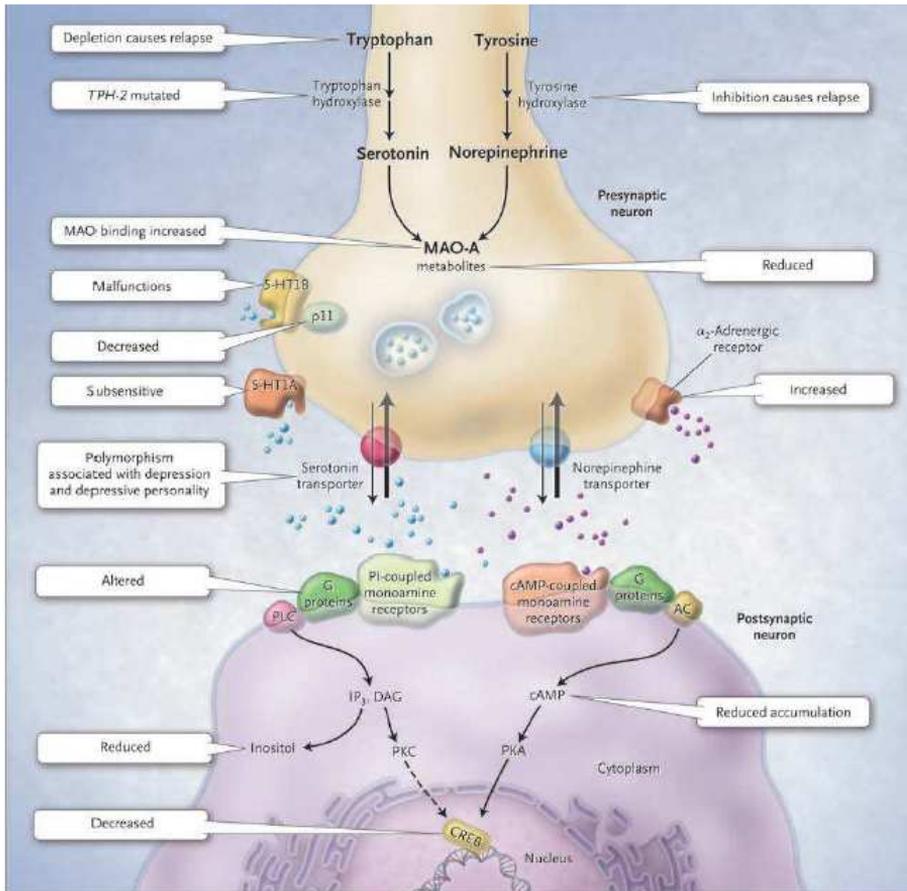


Figura 4: Hipótesis monoaminérgica (Belmaker & Agam, 2008).

- **Hipótesis glutamatérgica**

Las limitaciones de la teoría monoaminérgica llevaron a la implicación de otros sistemas de neurotransmisión para intentar explicar el origen de la depresión. Uno de los resultados más consistentes y aceptados en depresión es el de la reducción glial en cerebros de pacientes deprimidos (Gosselin, Gibney, O'Malley, Dinan, & Cryan, 2009; Rajkowska & Miguel-Hidalgo, 2007). Las funciones principales de la glía

son: a) regulación de la concentración sináptica de GLU (glutamato), b) metabolismo y homeostasis cerebral, c) liberación de factores tróficos en el desarrollo, y d) mantenimiento de las redes sinápticas. Atendiendo a estas funciones, la relación glutamato-glía parece crucial en la fisiopatología de la depresión. Un estudio en pacientes deprimidos mostró concentraciones elevadas de GLU y bajas de GABA en pacientes con depresión no medicados (Sanacora et al., 2004). Además, se ha descrito una disminución de la recaptación de glutamato en corteza, estriado y córtex prefrontal (Almeida et al., 2010). Estudios con espectroscopia con resonancia magnética en pacientes con depresión, reflejan una disminución de las concentraciones de glutamato en el córtex cingulado anterior y en la amígdala; siendo los resultados no concluyentes en el hipocampo y en el córtex occipital (Sibille & French, 2013).

De acuerdo a esto, las alteraciones gliales descritas en pacientes con depresión provocarían una reducción en la recaptación de GLU y por tanto, la concentración extracelular de Glu sería muy elevada. Esto provocaría daño neuronal como consecuencia del efecto neurotóxico y una reducción de la función del factor BDNF afectando al receptor antagonista NMDA (Sibille & French, 2013). Surgiendo así, la hipótesis neurotrófica en depresión. El gen receptor de glutamato GRIK4 es el más común estudiado para la predicción de un tratamiento antidepresivo dentro del sistema glutamatérgico (Breitenstein, Scheuer, & Holsboer, 2014).

- **Hipótesis neurotrófica**

El BDNF es uno de los factores neurotróficos más estudiados por su relación directa con la depresión y por su amplia distribución en el cerebro adulto. Está implicado en plasticidad y promueve señales de supervivencia (Duman & Monteggia, 2006; Monteggia et al., 2004). En pacientes deprimidos y en pacientes bipolares se han descrito niveles anormalmente bajos de BDNF en plasma (Cunha et al., 2006; Karege et al., 2005; Monteleone, Serritella, Martiadis, & Maj, 2008; Piccinni et al., 2008; van Donkelaar, van den Hove, Blokland, Steinbusch, & Prickaerts, 2009).

La administración crónica de antidepresivos produce un aumento de la concentración de BDNF y de la expresión de TrK B, su receptor (Duman & Monteggia, 2006; Nestler et al., 2002). Este aumento coincide con la evolución temporal del tratamiento antidepresivo, lo que indicaría una posible relación entre la concentración de BDNF y la respuesta antidepresiva (Russo-Neustadt y Chen, 2005). 5-HT estimula la expresión de BDNF a través de la producción de cAMP y la activación de respuestas cAMP con sus binding proteicos (en CREB) (Duman, Heninger, & Nestler, 1997). No obstante, el BDNF presenta una acción antidepresiva específica regional (Krishnan & Nestler, 2008). De modo que la administración directa de BDNF en el hipocampo de ratón produce un efecto antidepresivo (Shirayama et al, 2002). Sin embargo, la administración de BDNF en el NAc-ATV tiene un efecto prodepresivo, siendo en este caso antidepresivo el bloqueo de BDNF (Berton et al., 2006). Estas diferencias pueden explicarse por la desigual distribución de BDNF en las diferentes regiones del cerebro y también por la diferente participación de estas áreas en al fisiopatología de la enfermedad. Por otra parte, un déficit en el soporte neurotrófico puede contribuir a una alteración hipocampal durante el desarrollo de la enfermedad y los fármacos antidepresivos

serían capaces de revertir esta alteración, contribuyendo a su efecto clínico (Yu & Chen, 2011).

Por otro lado, el BDNF promueve la función de crecimiento y desarrollo de neuronas serotonérgicas (Mamounas et al., 2000) e incrementa la síntesis de serotonina por un aumento de los niveles de mRNA triptófano hidroxilasa (Siuciak, Clark, Rind, Whittemore, & Russo, 1998).

- **Hipótesis neuroendocrina**

La desregulación del eje HPA juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la sintomatología depresiva (Hammen, Kim, Eberhart, & Brennan, 2009; Holsboer, 2000; Hsu, Langenecker, Kennedy, Zubieta, & Heitzeg, 2010; Kara, Yazici, Güleç, & Ünsal, 2000). El estrés produce también un aumento en los niveles de glucocorticoides, que podría ser desencadenante de un episodio depresivo (Hammen, 2005). De hecho, el 81% de los pacientes con depresión suele experimentar un gran estrés antes del primer episodio de depresión (Parker, Schatzberg, & Lyons, 2003). Pacientes con síndrome de Cushing (hipercortisolemia), presentan cuadros depresivos (McEwen, 2007) y una incidencia inusualmente alta de depresión (Sonino & Fava, 2002). Además, la administración crónica de glucocorticoides en animales de experimentación es considerado un modelo de depresión (Krishnan & Nestler, 2008). En pacientes con depresión mayor se ha encontrado una concentración alta de CRF (Arborelius, Owens, Plotsky, & Nemeroff, 1999) y de cortisol (Belmaker & Agam, 2008; Parker et al., 2003; Villanueva, 2013) (Vreeburg et al, 2009); inhibición deteriorada de la liberación de cortisol por el test

dexametasona y una respuesta hiperactiva a estresores psicológicos (Belmaker & Agam, 2008; Villanueva, 2013).

Sin embargo, los niveles de ACTH (corticotropina) encontrados en suero son normales o incluso bajos (Posener et al, 2000). Cambios en la neurobiología del eje podrían explicar este hecho, dependiendo de si el episodio es agudo o crónico (Gold y Chrousos, 1985). En el caso de un episodio agudo, se secretará CRF y la glándula pituitaria aumentará la síntesis y liberación de ACTH. Como consecuencia, la concentración de cortisol aumentará también. Pero en el caso de un episodio crónico, los niveles de ACTH permanecen reducidos mientras que los de cortisol están aumentados. Además, en pacientes suicidas se ha descrito una baja actividad para el CRF (Nemeroff, 1996). El tratamiento antidepresivo crónico produce una normalización del eje HHA (Bjartmar et al, 2000).

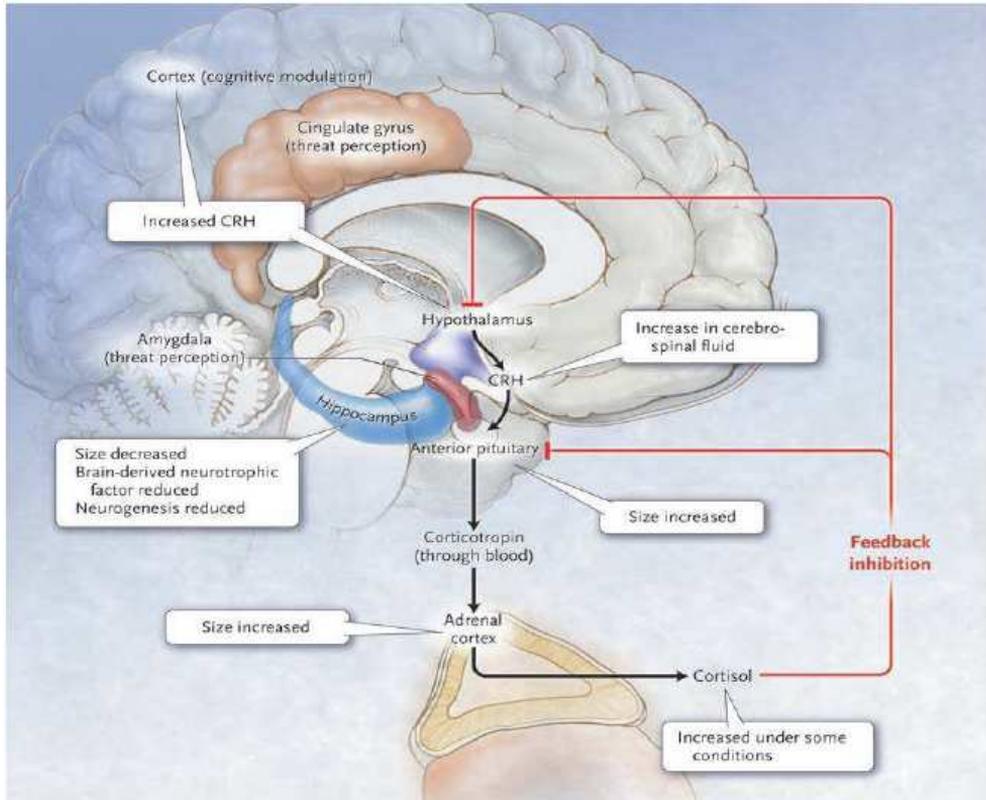


Figura 5: Sistema HPA de cortisol en depresión (Belmaker & Agam, 2008). La hipótesis HPA en depresión postula una anomalía en la respuesta del estrés en el cortisol que quizás subyace a la depresión. Las líneas negras de la figura, señalan la respuesta al estrés que es percibida por el cortex y la amígdala y transmitida al hipotálamo donde el CRF es liberado, induciendo en la hipófisis (pituitaria) la secreción de corticotropina (ACTH) al torrente sanguíneo. La corticotropina estimula al córtex adrenal y éste segregará glucocorticoides (cortisol). Las líneas rojas señalan, la vía del cortisol y su feedback negativo, inhibiendo al hipotálamo e hipófisis; suprimiendo la producción del CRF y de corticotropina respectivamente.

1.7. Mecanismos implicados en la relación citocinas-depresión

Todos los esfuerzos encaminados a establecer relaciones entre conductas de enfermedad, citocinas, inflamación y depresión, han posibilitado el planteamiento

de la hipótesis inflamatoria de la depresión (M Maes, 1995), según la cual los trastornos depresivos pueden estar mediados al menos en parte por la inflamación. En su trabajo pionero en este tema, Smith (1991) desarrolló la teoría de los macrófagos de la depresión, describiendo por primera vez la noción de que las citocinas, pueden actuar en el cerebro para causar depresión. Desde entonces numerosos trabajos han puesto de manifiesto el papel de un sistema inmune innato activado en la depresión.

Los datos obtenidos en sujetos con depresión evidencian que algunos pacientes (o un subgrupo de pacientes deprimidos) presentan un aumento de marcadores inflamatorios. Así, varios meta-análisis y/o revisiones de cientos de artículos publicados en este área concluyen que la IL-6, el TNF- α y la proteína C reactiva (PCR), son los marcadores inflamatorios que con mayor fiabilidad se encuentran aumentados en pacientes con depresión mayor (Dowlati et al., 2010; Liu, Ho, & Mak, 2012). Además, los datos indican la existencia de una relación directa entre la concentración de factores inflamatorios y el número y severidad de síntomas depresivos (Hiles, Baker, de Malmanche, & Attia, 2012). También se ha encontrado un aumento en la expresión en una serie de citocinas en muestras postmortem de víctimas de suicidio que padecieron depresión (Andrew H Miller, 2009). Por otra parte, se ha sugerido que en el estado inflamatorio subyacente a la depresión puede estar comprometido el funcionamiento antiinflamatorio, ya que los niveles séricos de la citocina antiinflamatoria IL-10 correlacionan negativamente con los síntomas depresivos en individuos sin tratamiento (F S Dhabhar, 2009). Es interesante señalar, que no sólo se ha evidenciado un estado inflamatorio en la depresión, sino que se ha puesto de manifiesto que la inflamación periférica puede preceder a la ocurrencia de ésta. Así, niños con elevados niveles circulantes de IL-6 a

la edad de 9 años presentaron un riesgo 10% mayor de desarrollar depresión a la edad de 18 años, que la población general de niños con bajos niveles de IL-6 (Khandaker, Pearson, Zammit, Lewis, & Jones, 2014).

Apoyos adicionales a la hipótesis inflamatoria de la depresión, proceden de informes que muestran que la prevalencia de síntomas depresivos es relativamente elevada en pacientes no-medicados, con enfermedades inflamatorias crónicas (p. ej., hepatitis C crónica, esclerosis múltiple, diabetes, enfermedad coronaria, algunos tipos de cáncer, etc.) (Evans et al., 2005; Kessler et al., 2009; S. S. O'Connor, Beebe, Lineberry, Jobes, & Conrad, 2012). En el caso de la hepatitis C, el 28% de los enfermos son diagnosticados de trastorno depresivo mayor (Golden, O'Dwyer, & Conroy, 2005). La alta prevalencia de síntomas depresivos en pacientes con cáncer ha sido referida en numerosos estudios. Se estima que la prevalencia media de la depresión en pacientes con cáncer es del 30% (Hotopf, et al., 2002), aunque los datos pueden variar en función del tipo y gravedad del tumor, así como del tipo de trastorno depresivo considerado.

Las asociaciones descritas son fundamentalmente correlacionales, y como tales, no indican si los niveles elevados de citocinas causan depresión o si son de alguna manera secundarios al trastorno (p. ej., resultado de alteraciones del sueño o de la enfermedad física). Sin embargo, otro gran cuerpo de evidencias que proceden de datos de la administración de estímulos inflamatorios, apoyan la hipótesis inflamatoria de la depresión. Así, la inmunoterapia con IFN- α (citocina proinflamatoria) para la hepatitis C y para algunos tipos de cáncer, promueve la aparición de síntomas depresivos (Lucile Capuron & Miller, 2004b; Conversano et al., 2015). En un estudio realizado en pacientes estables con hepatitis se observó que, junto a síntomas de anhedonia y fatiga, la administración a largo plazo de IFN-

□□ daba lugar a una menor activación en áreas cerebrales relacionadas con la recompensa (Lucile Capuron et al., 2012). Es interesante señalar, además, que los efectos depresivos inducidos por IFN-□□ pueden ser atenuados por el tratamiento antidepresivo (C L Raison, Capuron, & Miller, 2006).

Teniendo en cuenta que la inflamación puede extenderse al SNC, la siguiente pregunta sería cómo, o a través de qué o mecanismos, pueden las citocinas producir las alteraciones de la función cerebral asociadas con la depresión.

1.7.1. Efecto de las citocinas sobre la neurotransmisión

Probablemente el mecanismo mejor estudiado por el cual las citocinas afectan a la conducta son sus efectos sobre el metabolismo de neurotransmisores. Hay varias vías a través de las cuales las citocinas inflamatorias conducen a una reducción en la disponibilidad sináptica de monoaminas (serotonina, dopamina y noradrenalina), lo cual se cree que es un mecanismo fundamental en la patofisiología de la depresión (Gillespie et al., 2009). El triptófano es el principal precursor de serotonina, por lo que su disponibilidad determinará la cantidad de serotonina sintetizada en el cerebro. Esta disponibilidad se verá afectada por la actividad de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), que es estimulada por las citocinas y que convierte el triptófano en quinurenina, reduciendo la posibilidad de sintetizar serotonina en el cerebro. Diversos estudios en animales ponen de relieve el papel crítico de la activación del enzima IDO en el desarrollo de conductas de tipo depresivo (Jason C O'Connor, Andre, et al., 2009; Jason C O'Connor, Lawson, et al., 2009).

Aunque inicialmente la atención se centró en la depleción de triptófano y por tanto de serotonina, datos obtenidos en estudios con animales demostraron que la administración de quinurenina podía inducir conductas de tipo depresivo reflejadas en diversos modelos conductuales de depresión, como la prueba de natación forzada (FST) y la de suspensión suspensión de la cola (TST) (Krishnan & Nestler, 2008), sin producir cambios en los niveles de serotonina (Jason C O'Connor, Andre, et al., 2009). En humanos, el aumento de quinurenina y la disminución de triptófano se ha asociado con depresión así como con la severidad de estos síntomas (Bonaccorso et al., 2002; L Capuron et al., 2003). Además, productos de las reacciones en cadena de esta vía podrían también ser responsables de alteraciones en estructuras cerebrales y del deterioro de la función neuronal (Figura 6). La quinurenina puede ser convertida en ácido quinolínico, en las células de la microglía, este compuesto neurotóxico, aumenta el estrés oxidativo pudiendo producir muerte neuronal. El ácido quinolínico puede también estimular la actividad de neuronas glutamatérgicas, conduciendo a un aumento de la excitotoxicidad y a una disminución en la producción del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) necesario para la neurogénesis (Hardingham & Bading, 2002), el cual constituye un importante proceso en el desarrollo de la depresión y en la actividad de los antidepresivos (Ronald S Duman & Monteggia, 2006).

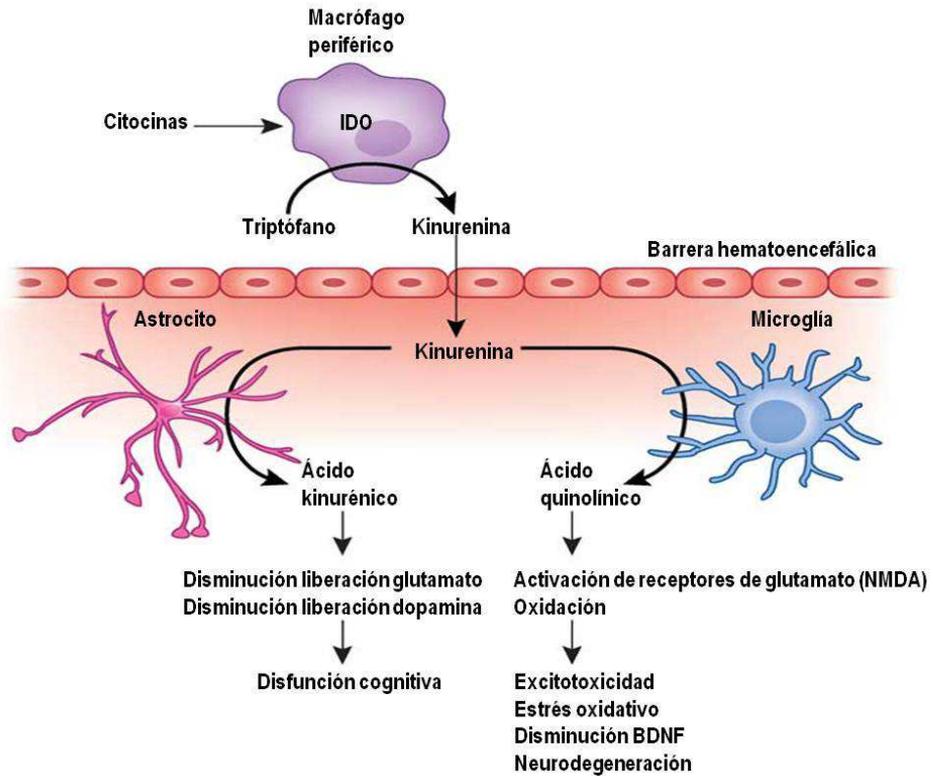


Figura 6: Vía de laIDO y de la kinurenina en la patología del SNC inducida por las citocinas. La activación de IDO inducida por las citocinas en células inmunitarias periféricas (macrófagos y células dendríticas) o en células del cerebro (microglía, astrocitos y neuronas) conduce a la producción de quinurenina, la cual se convierte en ácido quinurénico en astrocitos o en ácido quinolínico en la microglía. El ácido quinurénico puede, por vía indirecta, reducir la liberación de glutamato, así como de dopamina, lo cual puede contribuir a la disfunción cognitiva. Por el contrario, el ácido quinolínico, a través de la activación de receptores NMDA, puede aumentar la liberación de glutamato, así como la peroxidación de los lípidos, contribuyendo así a excitotoxicidad, estrés oxidativo, y en última instancia a neurodegeneración. BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro; IDO, idolamina 2,3-dioxigenasa; NMDA, N-metil-D-aspartato.

En este contexto, se han hallado niveles altos de ácido quinolínico en la microglía de regiones específicas del cerebro en víctimas de suicidio que padecían depresión (Steiner et al., 2011) y también en líquido cefalorraquídeo de pacientes tratados con

IFN- α que presentaban síntomas depresivos (Raison et al., 2010). Por otra parte, la quinurenina es convertida en los astrocitos en ácido quinurénico, el cual disminuye la liberación de dopamina (X. Z. Wu, Wei, Zheng, Jin, & Tian, 2007), que como hemos dicho anteriormente puede estar implicada en la patofisiología de la depresión.

Otra vía por la cual las citocinas pueden influir en la neurotransmisión, es a través de la reducción de tetrahidrobiopterina (BH₄) (Figura 7). La BH₄ es un cofactor enzimático esencial para síntesis de monoaminas, que puede ser alterada por las citocinas inflamatorias a través de dos potenciales mecanismos. Primero, la BH₄ también es un cofactor necesario para la conversión de arginina en óxido nítrico (NO) por parte del enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), y las citocinas pueden estimular esta enzima aumentando la producción de NO. Esto conllevaría un gasto de BH₄, reduciendo su disponibilidad para las reacciones de síntesis de neurotransmisores. Además, las citocinas podrían aumentar la generación de radicales de nitrógeno y oxígeno, contribuyendo de esta forma, a un estado oxidativo y éste a su vez, a una degradación irreversible de BH₄. Una alteración en BH₄ en el cerebro se ha correlacionado con aumento de marcadores inflamatorios en pacientes medicamente enfermos y con síntomas de depresión (L Capuron, Poitou, et al., 2011). También se ha encontrado que, en pacientes tratados con IFN- α , medidas indirectas de la actividad de BH₄ correlacionaban con la concentración de dopamina, así como con síntomas de depresión (Felger & Lotrich, 2013).

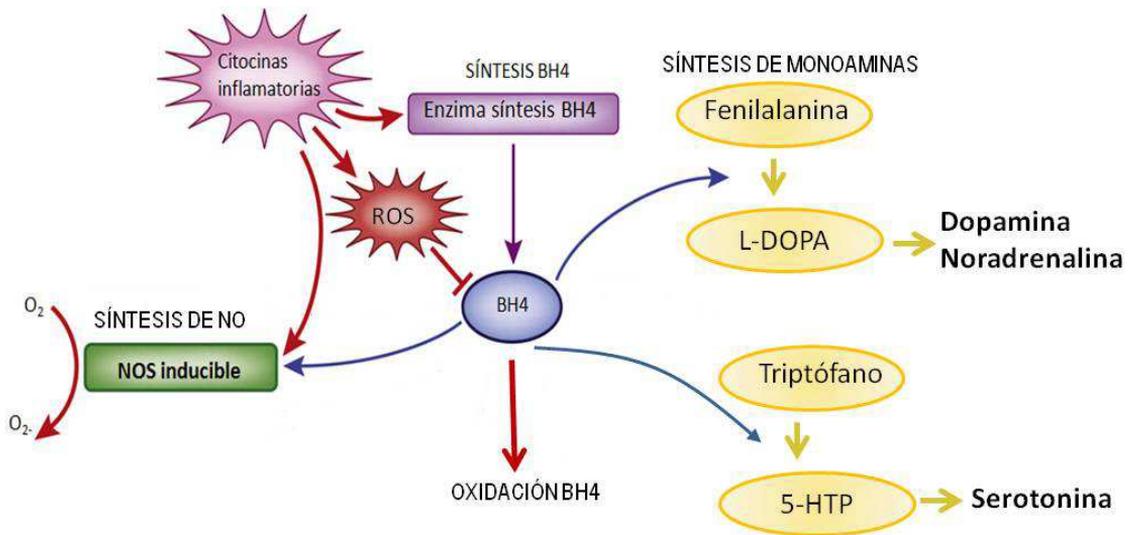


Figura 7: Efectos de citocinas inflamatorias en la síntesis y la oxidación de BH4, y en la actividad de la óxido nítrico sintasa, que contribuyen a la disminución de la disponibilidad de BH4 para la síntesis de monoaminas. Aunque las citocinas inflamatorias inducen la expresión de una enzima necesaria para la síntesis de BH4, también aumentan tanto ROS, como la actividad de la NOS inducible. El aumento de la oxidación de BH4 por ROS así como el aumento de actividad de la NOS inducible resulta en la generación de radicales libres. Esta producción de radicales libres contribuye aún más al estrés oxidativo y a la reducción de BH4. En última instancia, las citocinas inflamatorias conducen a la disminución de la disponibilidad de BH4 para la síntesis de monoaminas. BH4, tetrahidrobiopterina; L-DOPA, L-3,4-dihidroxi-fenilalanina; 5-HTP, 5-hidroxitriptamina; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintasa; ROS, especies reactivas de oxígeno.

1.7.2. Efecto de las citocinas sobre el eje HPA

Otro de los resultados más reproducibles en pacientes con depresión mayor son las alteraciones del eje HPA. Pacientes con depresión mayor muestran un aumento en la concentración de hormonas del eje HPA, ACTH y el cortisol y del péptido regulador del eje CRH, así como una concomitante resistencia a glucocorticoides circulantes. Esta resistencia, en la que se produce una disminución de la sensibilidad

a los efectos inhibitorios de los glucocorticoides, implicaría un fallo en la autorregulación del eje HPA. Los pacientes deprimidos también muestran un patrón de secreción de cortisol alterado. Sorprendentemente, las citocinas inflamatorias son capaces de producir todas estas anomalías, incluyendo la resistencia de glucocorticoides. Tras la primera administración de INF- α se produce una respuesta aguda de ACTH y cortisol intensa, que correlaciona con el subsiguiente desarrollo de síntomas depresivos durante la terapia con INF- α en pacientes con cáncer. La administración crónica se asocia con un patrón cíclico alterado de secreción de cortisol que correlaciona con el desarrollo de depresión y fatiga (para una revisión ver Horowitz et al., 2013).

Todos estos datos ponen, por tanto de manifiesto, la existencia de mecanismos cerebrales que pueden vincular la inflamación con la depresión, aunque quedan muchos aspectos de estos mecanismos por resolver. Tampoco se sabe si una sola citocina es de particular relevancia en lo que se refiere al desarrollo de la depresión, o si los síntomas o conjunto de síntomas (clusters) evolucionan debido a las acciones de varias citocinas o de las interacciones entre citocinas y otros factores. A este respecto, parece que los niveles de citocinas circulantes puede variar mucho en individuos con características típicas *versus* atípicas de la depresión mayor (Karlović, Serretti, Vrkić, Martinac, & Marčinko, 2012).

CAPITULO 3

CÁNCER Y DEPRESIÓN

El cáncer (cancer) [lat. cangrejo, cáncer], ha sido definido como una masa anormal de tejido, cuyo crecimiento excede y es incoordinado en relación al tejido normal, persistiendo en su desmesurado desarrollo tras el cese del estímulo que provocó el cambio (Willis, 1952).

Un tumor se caracteriza por una multiplicación celular anormal, debido a una alteración del mecanismo habitual de reproducción y crecimiento de las células, que les impide responder a las señales reguladoras encargadas de mantener este proceso dentro de los límites normales. Hablamos de cáncer o tumor maligno, cuando este crecimiento celular anormal es además capaz de diseminarse por el cuerpo por invasión (penetrando en tejidos vecinos) o por metástasis (penetrando en los vasos sanguíneos y linfáticos para invadir tejido normal en otras partes del cuerpo).

Existen al menos 200 tipos diferentes de cáncer que se pueden desarrollar en casi cualquier órgano, fluido o tejido. Algunos cánceres afectan a las células que cubren la superficie externa e interna de diferentes órganos como el pulmón o el pecho (carcinomas), otros afectan a las células de los tejidos de sostén, como el hueso, o la grasa (sarcomas), otros se originan en los ganglios linfáticos, afectando a células del SI (linfomas), y otros a células del torrente sanguíneo (leucemias) (Kleinsmith, Kerrigan, & Spangler, 2003; Weinberg & Weinberg, R. A., 1996).

Las células de un tumor descienden de una célula ancestral común, que en algún momento, generalmente décadas antes de que el tumor se manifieste, inició un programa de reproducción indebido. La transformación maligna de la célula acontece después por acumulación de mutaciones en unos genes específicos. En el inicio del cáncer desempeñan un papel fundamental dos clases de genes que en condiciones normales controlan el ciclo de vida de la célula. Los protooncogenes

“activan” el crecimiento, mientras que los genes supresores de tumores lo inhiben. Cuando mutan los protooncogenes pueden convertirse en oncogenes carcinogénicos capaces de dirigir una multiplicación desenfrenada; los genes supresores de tumores, por el contrario, contribuyen al cáncer cuando las mutaciones los silencian, y privan a la célula del freno que en situación de normalidad impide el crecimiento desmesurado (Weinberg & Weinberg, R. A., 1996).

Los problemas en la regulación del crecimiento de las células tienen su causa inmediata en los genes relacionados con el control del ciclo celular y en anomalías del SI, el cual en condiciones normales detectaría y detendría el crecimiento anómalo (Boon & Van den Eynde, 2003; Boon, 1993). Sin embargo, en la mayoría de los casos, en el origen de estas mutaciones se encuentran añadidos, factores ambientales (físicos, químicos, dieta, tóxicos ambientales, consumo de tabaco y alcohol) y algunas infecciones. En la identificación y control de estos componentes ambientales radica la esperanza de la prevención del cáncer (Weinberg & Weinberg, R. A., 1996).

El cáncer es una de las enfermedades que tiene mayor relevancia por su incidencia, supervivencia y prevalencia, y actualmente constituye un problema de salud prioritario. En España, es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares, llegando a alcanzar 8,2 millones de muertes en el año 2012, según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Pese a que las cifras de mortalidad son muy elevadas, los estudios indican que la supervivencia de los pacientes con cáncer ha aumentado de forma continua en los últimos años en todos los países europeos. Los tumores más frecuentemente diagnosticados en varones en el año 2012, fueron el cáncer de próstata, pulmón, colon, vejiga y gástrico; mientras que en mujeres los

tumores más frecuentemente diagnosticados fueron mama, colon, útero, pulmón y ovarios. Las estimaciones poblacionales indican que el número de casos nuevos probablemente aumente en un 70 % en las próximas décadas. Se calcula que en el año 2020 se diagnosticarán 246.713 casos nuevos de cáncer en España. Según la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), uno de cada tres ciudadanos españoles tendrá cáncer a lo largo de su vida. (Sociedad Española de Oncología Médica: año 2016 [citado 18 de marzo de 2017]. Disponible en: [http://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/LAS CIFRAS DEL CANCER EN ESP 2016.pdf](http://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/LAS_CIFRAS_DEL_CANCER_EN_ESP_2016.pdf))

1.8. EL MELANOMA MALIGNO

Para este trabajo se ha elegido como modelo tumoral experimental el Melanoma Maligno. Éste es un tumor de piel canceroso, formado por células de aspecto estrellado o dendrítico (melanocitos) que poseen la capacidad de elaborar y secretar melanina.

- **Epidemiología**

De todos los cánceres de piel, el melanoma es de los menos frecuentes, pero el más peligroso, especialmente cuando ya se ha extendido. Desde que John Hunter realizara la primera descripción de un melanoma humano en 1787, la incidencia de este tumor se ha incrementado paulatinamente en ambos sexos. Actualmente se

diagnostican cerca de 160.000 casos nuevos de melanoma al año en todo el mundo (79.000 hombres y 81.000 mujeres), representando aproximadamente el 1,5% de los tumores en ambos sexos (Parkin, Bray, Ferlay, & Pisani, 2005). Según un informe de la Organización Mundial de la Salud, ocurren cada año cerca de 48.000 muertes relacionadas con el melanoma. La mayor incidencia se registra en países con fuerte irradiación solar, a pesar de que en Australia, el cáncer de piel es una auténtica epidemia (multiplica por más de 20 la incidencia española), ha dejado de ser el país con la mayor tasa de incidencia mundial de melanoma y ahora es la población de raza blanca de Hawai, en la que se observan las máximas incidencias mundiales. Lo realmente preocupante es su tendencia, el índice de incidencia anual de melanoma en las personas blancas ha aumentado más de un 60% durante el período de 1991 a 2011, y la Organización Mundial de la Salud prevé que su incidencia se triplique entre 2015 y 2030. En el caso de España, la incidencia ha aumentado en los últimos cuatro años un 38%, con una tasa de incidencia de 8,3 por cada 100.000 hombres y de 9 de cada 100.000 mujeres. Según los datos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), en el año 2012 se diagnosticaron 5.004 nuevos casos de melanoma y fallecieron unas 967 personas. A pesar de ser un tumor más frecuente entre mujeres (2,7% de los cánceres femeninos) que entre los hombres (1,5%), el índice de mortalidad fue más elevado en el caso de estos últimos. La mayor mortalidad se registra en Baleares, Canarias, País Vasco y la costa de Levante, con algunos otros núcleos de gran frecuencia en capitales importantes como Madrid, Barcelona y Zaragoza. La supervivencia ha mejorado en los últimos años, situándose en torno al 75% para los hombres y al 84% para las mujeres. Esto se debe a la precocidad de los diagnósticos más que a auténticas mejoras en el tratamiento, aunque también podría reflejar cambios poblacionales en cuanto a los hábitos de exposición solar.

- **Etiología**

El melanoma maligno cutáneo es predominantemente, aunque no de forma exclusiva, una enfermedad de individuos con tez blanca, que se queman fácilmente y rara vez se broncean. Los ratios de incidencia son al menos 16 veces mayores en la población blanca que en la afroamericana (Geller, Annas, & Geller, A. C., 2003). Sólo el 10% de los pacientes diagnosticados, tienen antecedentes familiares de melanoma. Sin embargo, ante esta situación, existe un riesgo hasta 12 veces mayor de desarrollar melanoma. A pesar de que las razones del crecimiento de este tumor no están claras, a menudo se relacionan con un incremento en la exposición a la radiación solar ultravioleta (UV) que alcanza la superficie de la tierra; la radiación UV se ha asociado con inmunosupresión e incremento de la incidencia de melanoma (Geller et al., 2003). Teniendo en cuenta que la radiación recibida durante los primeros 18 años supone el 80% de la radiación que recibiremos el resto de nuestra vida, la mayoría de los estudios sugieren una relación directa entre las quemaduras a edades tempranas y el consiguiente riesgo de padecer melanoma. Uno de los problemas del cáncer de piel, como ocurre con el de pulmón, es que aparece años después (20 o 30) de la exposición de riesgo. Los pacientes que presentan un historial de alta exposición a la luz ultravioleta, suelen tener un porcentaje de mutaciones en genes como NRAS12 o BRAF13 (oncogenes) superior al que poseen los pacientes con una exposición normal o baja (Berger et al., 2012). Sin embargo, los altos índices de incidencia en las ciudades del norte de Escandinavia frente a ciudades del sur de Europa proponen al melanoma como un interesante ejemplo de enfermedad multifactorial, en la que están implicados e

interactúan tanto factores genéticos como ambientales. Los mayores factores de riesgo incluyen: historia personal y familiar de melanoma, características cutáneas y pigmentarias, exposición solar y reacciones a la exposición solar. Los factores de riesgo fenotípicos están muy probablemente determinados genéticamente. En la actualidad se conocen 2 genes con alta susceptibilidad al melanoma (CDKN2A y CDK4) y un tercero sospechoso de jugar también algún papel (p14^{ARP}); por otro lado, se ha identificado también un gen (MC1R) con bajo riesgo en la susceptibilidad a desarrollar melanoma (Bressac-de-Paillerets, B., 2002).

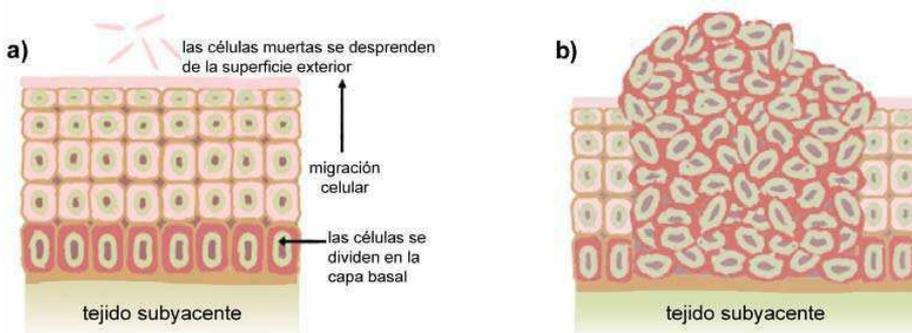
- **Evolución**

El melanoma es una de las neoplasias que ha suscitado mayor interés entre los investigadores, dada su peculiar evolución, en cierto modo imprevisible. Por un lado, se distingue por ser uno de los tumores más virulentos, con una diseminación rápida y evolución fatal en pocas semanas o meses, y en cambio, en otras ocasiones, como ya describieron Allen y Spitz en 1953, puede evolucionar de manera relativamente benigna, permaneciendo en un estado silente durante largo tiempo e incluso llegar a producirse la regresión espontánea del tumor primario (3-15%) (McGovern, 1983) o de las propias metástasis (0,27%) (McCarthy, Shaw, & Milton, 1978; Report & Sroujeh, 1988).

La gran mayoría de los melanomas malignos se pueden curar si se tratan a tiempo. El riesgo de reaparición aumenta cuando la profundidad del tumor aumenta y cuando los ganglios linfáticos se hallan afectados. En el 20% de los pacientes el tumor invade tejidos blandos (piel, tejido celular subcutáneo y ganglios linfáticos) y

en el 80% restante se disemina a nivel visceral (hígado, pulmón y hueso), viéndose afectado el 45% de los pacientes con metástasis a nivel del SNC durante algún momento de la evolución de la enfermedad. Aunque la cirugía puede resultar efectiva en los estadios precoces de la enfermedad, el melanoma diseminado (melanoma metastásico), es prácticamente una enfermedad incurable, con una supervivencia de 4-6 meses, a pesar de los avances de estrategias terapéuticas como la radioterapia, la quimioterapia y la inmunoterapia (Prada, Cuesta, & Zamora, 2001), que aunque obtienen respuestas objetivas, son de corta duración y siguen asociadas a una toxicidad considerable (Houghton, Gold, & Blachere, 2001; Nestle, Burg, & Dummer, 1999; Pawlik & Sondak, 2003).

La inmunoterapia constituye una de las grandes líneas de investigación en el tratamiento de este tipo de tumor, y consiste en estimular el propio sistema inmunitario del paciente con la finalidad de que éste pueda actuar más eficazmente en el reconocimiento y eliminación de las células tumorales. Para ello, se administra una gran cantidad de citocinas (generalmente IFN- α e IL-2). Se ha conseguido reducir las metástasis de entre el 10 y el 20% de los pacientes han recibido dichas sustancias. A pesar de su eficacia, los efectos secundarios del tratamiento con citocinas no son nada desdeñables: cansancio, fiebre, cefalea, dolores musculares, irritabilidad, etc. Por ello, muchos pacientes no pueden tolerar sus efectos secundarios y sólo un 60% de los pacientes completan el tratamiento. Un estudio reciente, ha demostrado que la pérdida de PDK1, una proteína altamente expresada en melanomas primarios y metastásicos, demoró la aparición y redujo la invasión y metástasis en un modelo murino de melanoma; identificando así, una posible vía a donde se podrían dirigir futuros tratamientos para el melanoma (Scortegagna et al., 2015).



Imágenes tomadas de las siguientes direcciones de Internet:
<http://press2.nci.nih.gov/sciencebehind/cancersp/cancersp06.htm>
<http://press2.nci.nih.gov/sciencebehind/cancersp/cancersp08.htm>
 Última actualización de la página: Enero de 2003.
 Último acceso a la página: 23 de Febrero de 2004.

Figura 8: Ilustración del crecimiento celular normal y anormal de la piel.

Las células de la capa basal de la epidermis se dividen con la cadencia necesaria para reemplazar a las células que continuamente se desprenden de la superficie de la piel. Cada vez que una de estas células basales se divide, se producen dos células. Una permanece en la capa basal y retiene la capacidad para dividirse y la otra emigra fuera de la capa basal y pierde la capacidad para dividirse. Así pues, el número de células con la capacidad para dividirse en la capa basal se mantiene igual.

El balance normal entre la división celular y la pérdida de las células se descontrola durante el desarrollo de cáncer de piel. Para reemplazar las células que se desprendieron de la superficie de la piel, las células basales empiezan a dividirse más rápido de lo necesario. Cada vez que una de estas células basales se divide, las dos células nuevas formadas, regularmente mantienen la capacidad para dividirse, lo que lleva a un aumento del número total de las células que se dividen. Este aumento gradual en el número de células con capacidad para dividirse crea una masa creciente de tejido que se conoce como "tumor" o "neoplasma".

1.9. MECANISMOS INMUNITARIOS FRENTE AL CÁNCER

En 1908 Paul Ehrlich sugirió que los seres humanos poseían una gran cantidad de "gérmenes aberrantes" (tumores) que podían provocar efectos destructivos si no eran contrarrestados continuamente por el SI (T. Y. Wu & Fleischmann, 2001).

Siguiendo esta idea, en 1957, Lewis Thomas de la Universidad de Nueva York y MacFarlane Burnett del instituto Hall de Melbourne, desarrollaron la teoría de la vigilancia inmunitaria, según la cual el SI estaría en una constante búsqueda de células anormales para destruirlas (Old, 1996). Se pensaba así que la respuesta inmunitaria frente al tumor, daba lugar a la destrucción de la mayoría de los tumores antes de su manifestación clínica, y que el éxito del desarrollo tumoral era consecuencia del fracaso en la vigilancia del SI.

De acuerdo con la hipótesis de la vigilancia inmune, la expresión de antígenos tumorales, durante la transformación neoplásica, debería inducir una respuesta inmunitaria que pudiera controlar el crecimiento tumoral. Sin embargo, aunque sí que se encuentra una clara implicación del SI en el control de tumores víricos, melanoma y ciertos cánceres de pulmón, aún no se ha encontrado respuesta inmunitaria frente a varias de las mayores neoplasias en humanos como son el cáncer de colon y el cáncer de mama (Bremers & Parmiani, 2000). Contamos así, con la evidencia de que el SI juega un papel fundamental en el control de las enfermedades neoplásicas, pero también conocemos que los tumores cuentan con importantes mecanismos de escape del SI.

Aunque es relativamente fácil entender cómo el SI interviene en la respuesta a invasiones microbianas, resulta difícil explicar cómo puede intervenir frente al cáncer. Los cánceres emergen de los tejidos del propio organismo, y así expresan genes que también expresan los tejidos normales. Podemos pensar entonces, que en los cánceres se deberían mantener las leyes de prevención para el reconocimiento del tejido propio por parte del SI y preguntarnos si los cánceres expresan antígenos que pueden ser objetivo de la inmunidad tumoral.

En la defensa antitumoral, el SI presenta dos tipos de mecanismos: uno de resistencia natural celular y humoral, que supone la primera barrera de defensa del organismo sin requerir una inmunización previa, teniendo especial trascendencia en el control frente a la aparición de metástasis; y un segundo mecanismo inducido, que se corresponde con la respuesta inmunológica generada también por células y anticuerpos con receptores específicos frente al antígeno tumoral, y que activa un complejo sistema de señales estimuladoras y coestimuladoras.

La distinción entre lo propio y lo extraño por parte del SI, se basa en el reconocimiento de las moléculas que se encuentran en la superficie de todas las células de nuestro organismo y que se denominan Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH I y CMH II) y cuyo objetivo final no es otro sino proteger al organismo de la acción bélica de su propio sistema de defensa frente a invasores extraños.

Para que ocurra una reacción inmunitaria frente al tumor, en primer lugar las células presentadoras de antígenos (CPA) deben captar el antígeno tumoral, procesarlo en pequeños fragmentos peptídicos y reexpresarlo en la membrana celular dentro de la huella de una molécula CMH. Cuando el antígeno procesado se presenta sobre una molécula CMH-I, el complejo es reconocido por un linfocito T citotóxico CD8+, y cuando se presenta sobre una molécula CMH-II, es reconocido por el receptor de una célula T cooperadora CD4+. Los receptores de las células T (TCR) deben adecuarse tanto a la huella de la molécula CMH como al péptido que portan.

No obstante, el reconocimiento del antígeno no supone necesariamente la muerte de la célula tumoral. En la respuesta antitumoral están comprometidos ciertos factores activadores como las citocinas y las moléculas coestimuladoras específicas.

Las moléculas coestimuladoras como la B7 y la CD40, se unen a las proteínas CD28 y CD40L respectivamente, presentes en la superficie del linfocito T. Estas moléculas coestimuladoras (B7 y CD40) están presentes en las CPAs de antígeno como las células dendríticas, los macrófagos, los monocitos, o las células B. La presentación de un antígeno a una célula T ingenua sin coestimulación puede llevar a la indiferencia de la célula T. De hecho, las células tumorales, que por sí mismas pueden pasar inadvertidas, provocan una potente respuesta inmune una vez procesadas por una célula dendrítica (Gong, Chen, Kashiwaba, & Kufe, 1997).

Este complejo mecanismo de acción celular inmunitario, está regulado por otro no menos complejo entramado de factores de crecimiento denominado “red de citocinas”. Como ya se ha mencionado en el capítulo 1, la activación de las diferentes células inmunitarias, permite la síntesis y liberación de citocinas, tales como IL-2 e el IFN- γ , por parte de la subpoblación de linfocitos T cooperadoras tipo I (Th1), o las interleucinas IL-4, IL-5 e IL-6 por parte de las células Th2. La citocina principal en el mantenimiento de la inmunocompetencia de los linfocitos T es la IL-2.

Las células NK poseen una capacidad citolítica bien demostrada y constituyen una parte importante tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa. Como parte del sistema de inmunidad innata tienen capacidad para sacrificar tejidos malignos, células infectadas por virus, o células injertadas incompatibles que son reconocidas como diferentes del tejido propio. Por otro lado, las células NK activadas producen un amplio rango de citocinas (IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, M-CSF, IL-2, IL-3, IL-5 e IL-8), que conducen hacia la inmunidad adaptativa, provocando la respuesta celular CD4+. Se ha demostrado también que las células NK estimulan la

producción de anticuerpos por células B e incluso que pueden funcionar como CPA sobre moléculas CMH-II (Roitt, Brostoff, & Male, 1997).

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) es también una importante herramienta para eliminar patógenos intracelulares y células tumorales. Las células B, en presencia de IL-1 secretada por macrófagos, y de IL-2 secretada por las células Th1, se activan y con el estímulo de la IL-4, IL-5 (factores estimuladores de la proliferación de células B) y de la IL-6 (factor diferenciador de las células B), secretadas entre otras, por las células Th2 (Hirano et al., 1985), se diferencian y se expanden de forma clonal en forma de células plasmáticas secretoras de anticuerpo (Casadevall & Pirofski, 2003; Unanue, 1981), o actuando directamente sobre la célula tumoral tras el reconocimiento, por parte del anticuerpo, de estructuras críticas para la proliferación celular (Gómez de la Concha, Puch, Viñuela, & Subiza, 1987). Un área del anticuerpo (fracción Fab) se une al antígeno tumoral y otra área (fracción Fc) se une a las células efectoras que poseen receptores para el anticuerpo, fundamentalmente células K, macrófagos y NK. La CCDA ha sido probada por Eisenthal al prevenir el crecimiento de metástasis de melanoma con un anticuerpo monoclonal anti-B16 junto con células NK activadas (Eisenthal, Cameron, & Rosenberg, 1990). Varias citocinas, incluyendo la IL-2, el INF, el M-CSF y el GM-CSF, pueden inducir la CCDA en las diferentes poblaciones efectoras como las NK, monocitos-macrófagos y células polimorfonucleares. Por otro lado la IL-12, secretada presumiblemente por los linfocitos B, contribuye a la amplificación de la respuesta de las células T (Chizzonite et al., 1991; Gately et al., 1991) y junto con citocinas como la IL-2 y el GM-CSF está implicada en el incremento de la respuesta antitumoral (Rosenberg et al., 1988; H. Y. Wang et al., 2002).

La destrucción tumoral mediada por el SI es multifacética, involucrando todos los componentes celulares y moleculares del SI. Así, la interacción célula-célula, la liberación de citocinas citotóxicas y citoestáticas, enzimas proteolíticas, radicales libres y rotura de membranas celulares, todas son de importancia en la defensa (A H Miller, 2003). El éxito del huésped depende no sólo de los mecanismos de escape del adversario, que son activados por el tumor, sino también de la habilidad para mantener esta respuesta en el área tumoral. De otra forma, el potente sistema de citocinas puede provocar el daño final del órgano y la muerte.

El mayor logro en el campo de la inmunología del cáncer en las pasadas dos décadas ha sido la identificación de genes que codifican antígenos reconocidos por el SI. Ya que generalmente se ha señalado a los linfocitos T citotóxicos como las principales células efectoras para la inducción de una respuesta inmunitaria específica anti-melanoma, se han utilizado clones de células T citotóxicas específicos para el melanoma, como herramienta para descubrir nuevos antígenos (Nestle et al., 1999). En un extenso estudio inmunohistoquímico, el 44% de los melanomas primarios expresaban el antígeno MAGE-3, el 88% el antígeno MelanA/MART-1 y el 94% el antígeno tirosinasa (Hofbauer et al., 1997). Además, se ha descubierto otro antígeno en células de melanoma, denominado NY-ESO-1 (Nestle et al., 1999). Pero existe un miedo razonable a la autoinmunidad en la aplicación de inmunoterapia contra antígenos tumorales, debido a que un grupo de estos antígenos son expresados tanto por las células normales como por las células tumorales.

El melanoma es especialmente inmunogénico (capaz de inducir respuesta inmunitaria mediada por células). A pesar de que el melanoma maligno supone sólo el 1,8% de todos los cánceres, cuenta con el 11% de regresiones espontáneas (entre cinco y seis veces más de lo esperado). La regresión espontánea supone la

desaparición completa o parcial del tumor maligno sin ningún tipo de tratamiento y la mayoría de los datos sugieren que existe un mecanismo inmunitario implicado en la regresión del tumor. Distintas razones han convertido al melanoma en el modelo principal para entender la inmunidad frente al cáncer (Houghton et al., 2001). En primer lugar, el melanoma es uno de los cánceres más fácilmente adaptable a los cultivos de tejido; en segundo lugar, la especial resistencia del melanoma a la quimioterapia y a la radiación, ha facilitado la aplicación de terapias inmunológicas para este cáncer; y en tercer lugar, la aparición del melanoma en tejidos no críticos, lo convierten también en un excelente modelo para estudiar la relación entre la inmunidad tumoral y la autoinmunidad (Das, van den Wijngaard, Wankowicz-Kalinska, & Le Poole, 2001). El estudio de este tumor puede ofrecer importantísimas claves de la compleja relación tumor-huésped y de la implicación del SI en esta relación (King, Spooner, & Rowlands, 2001).

1.10. CÁNCER, INFLAMACIÓN Y DEPRESIÓN

Tal y como hemos señalado anteriormente, los paciente de cáncer padecen una alta prevalencia de trastornos depresivos. Parece hoy evidente que diversos factores relacionados entre sí, pueden subyacer a esta comorbilidad: la biología del tumor, la angustia asociada con el diagnóstico de cáncer y/o los tratamientos contra el cáncer. Sin embargo, a pesar de una reciente explosión en la investigación en esta área, estos factores están raramente diferenciados y siguen sin conocerse sus probables mecanismos de interacción.

Efectivamente, el propio diagnóstico de cáncer resulta un acontecimiento vital estresante y puede provocar una serie de respuestas tales como, shock, incredulidad, ansiedad, ira, desesperación, etc., que de persistir en el tiempo, pueden dar lugar a un trastorno de depresión mayor. Los pacientes de cáncer sufren altos niveles de alteraciones cognitivas, las cuales han sido atribuidas, además de al estrés relacionado con el diagnóstico, al deterioro de la calidad de vida, y a los efectos secundarios de los tratamientos primarios (Robert Dantzer, O'Connor, Lawson, & Kelley, 2011). Se observa por tanto, que en este contexto, son varias las posibles fuentes (estrés crónico, tratamientos, etc.) que pueden producir un aumento de citocinas que podría favorecer la aparición de la depresión. Sin embargo, existe un vacío en el conocimiento del impacto independiente de los procesos biológicos asociados al tumor sobre síntomas somáticos, afectivos y cognitivos, a pesar del reconocimiento de que los tumores son capaces de ejercer una influencia sobre el SNC (Lee et al., 2004) y de que la inflamación es inherente a todas las fases del desarrollo tumoral y de las metástasis (Colotta, Allavena, Sica, Garlanda, & Mantovani, 2009). Los tumores periféricos y su microambiente son fuente de varias citocinas y potencialmente utilizan vías neurales y/o humorales similares a la infección periférica para alcanzar el cerebro. El aumento de marcadores periféricos de inflamación está ligado al aumento de síntomas somáticos y afectivos en pacientes de cáncer en etapas anteriores al inicio del tratamiento, en una gran variedad de enfermedades malignas. Así, en pacientes de cáncer de ovario la concentración elevada de IL-6 ha sido asociada con síntomas somáticos pero no con los afectivos de la depresión (Lutgendorf et al., 2008). En pacientes con cáncer de mama, con un diagnóstico de depresión mediante entrevista estructurada (DSM-IV, SCID) fue también asociada con elevados niveles de IL-6 en plasma (Soygur et al., 2007). Similarmente, los niveles del receptor de IL-6

(sIL-6r) fueron positivamente asociados tanto con síntomas de fatiga como afectivos de depresión, en pacientes de cáncer de mama (Courtier et al., 2013; Pertl et al., 2013). En pacientes con carcinoma peritoneal los niveles en suero de IL-6 fueron asociados con síntomas somáticos de depresión aunque no con los síntomas afectivos (Low et al., 2014). En pacientes con cáncer de próstata los elevados niveles de TNF- α encontrados, fueron asociados con fatiga, depresión y ansiedad (Dirksen et al. 2013). En pacientes con melanoma maligno los niveles de sIL-6r en suero fueron asociados negativamente con una combinación de síntomas afectivos y somáticos y positivamente con niveles de receptores de TNF (sTNF-r).

Muchas teorías de la depresión y de la conducta de la enfermedad enfatizan en supuestos mecanismos inflamatorios comunes para los síntomas somáticos y afectivos de la depresión. Sin embargo, hay también evidencias de que estos síntomas no se dan conjuntamente en enfermedades agudas o crónicas y que la manifestación de síntomas específicos (ej. melancólicos vs. vegetativos) de la depresión, pueden estar producidos por mecanismos distintos aunque asociados. (Michael Maes et al., 2012).

Con la utilización de modelos animales se pretende ahondar en este conocimiento, ya que permiten la diferenciación de factores biopsicosociales potencialmente aditivos/sinérgicos y el estudio empírico de los mecanismos subyacentes. Esencialmente, los modelos de tumor en roedores son comparables a los pacientes con cáncer antes del tratamiento, aunque las investigaciones tanto en humanos como en roedores, reflejan una considerable heterogeneidad en el tipo y sincronía de neoplasias investigadas. La mayoría de los estudios han encontrado un aumento en conductas de tipo depresivo en un amplio rango de modelos de tumor sólido, en relación a controles libres de tumor. En muchos modelos animales de cáncer de

caquexia se encuentran elevados niveles de citocinas proinflamatorias y de receptores de éstas en cerebros completos (Catalano et al., 2003), y en regiones del cerebro que regulan conductas de tipo-depresivo y cognitivo (hipocampo, hipotálamo, corteza, tronco cerebral y cerebelo (Chance, Sheriff, Dayal, & Balasubramaniam, 2003) (Turrin et al., 2004). En una serie de trabajos con modelos de cáncer de conducta tipo-depresivo, se observaron también aumentos de citocinas proinflamatorias en el cerebro relacionados con deterioros cognitivos específicos (Norden et al., 2015; Pyter et al., 2010; Pyter, El Mouatassim Bih, Sattar, & Prendergast, 2014; Yang et al., 2014). Hay que tener en cuenta que cada vez son más abundantes las evidencias que indican que la elevación central de citocinas se debe a las producidas por las células tumorales, más que a las producidas por el propio huésped (Baltgalvis et al., 2010; Cahlin et al., 2000; Kawamura et al., 1999; Rebeca, Bracht, Martinez, Cadena, & Oliveira, 2008).

La presencia en el cerebro de citosinas proinflamatorias puede influir en una serie de vías neurales por las que los tumores pueden inducir cambios conductuales (Plata-salama, 2000)(Tisdale, 2002). Así la consecuencias conductuales negativas de los tumores son asociadas con elevaciones en la expresión de iNOS (enzima óxido nítrico sintetasa inducible) en varias regiones hipotalámicas (Wang et al., 2001; Yang et al., 2012). También se ha detectado evidencias de activación de la microglía en hipocampo y corteza de roedores con desarrollo tumoral (Norden et al., 2015; Pyter et al., 2014). Además se ha observado que la administración periférica de una sustancia inflamatoria, LPS en un modelo de cáncer mamario incrementa las señales neuroinflamatorias de IL-1 β , IDO y del marcador de activación microglial NF-kB, en varias regiones del cerebro que regulan las conductas de tipo afectivo y cognitivo

(Pyter et al., 2014). Estos resultados sugieren que las respuestas neuroinflamatorias pueden ser alteradas por la presencia de tumores periféricos

Hoy día, se sabe, que la actividad de la enzima IDO se asocia con la inducción de tumor y, a menudo, se expresa en niveles altos en tumores sólidos (Munn & Mellor, 2013). Además se ha encontrado en modelos de cáncer de roedores, una alteración del nivel de aminoácidos en el cerebro, particularmente del catabolismo de triptófano (Laviano. et al., 1996). También se ha observado un patrón alterado, previo al tratamiento, en el metabolismo del triptófano en pacientes con cáncer (Sperner-Unterweger et al., 2011).

Ahora bien, ésta no parece ser la única vía por la que la activación inmunitaria durante el desarrollo tumoral puede alterar la conducta, ya que como se ha visto anteriormente, algunos autores han encontrado que las consecuencias conductuales negativas del tumor están asociadas al aumento del enzima iNOS.

Son por tanto necesarias nuevas investigaciones que permitan ir avanzando en el conocimiento de los posibles mecanismos que subyacen a la relación entre cáncer y depresión.

Bloque II

**OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y DISEÑO
EXPERIMENTAL**

1. OBJETIVOS

La depresión es un trastorno comúnmente observado entre pacientes con enfermedades cardiovasculares, diabetes, desórdenes neurodegenerativos o cáncer (Charles L. Raison & Miller, 2003). Teniendo en cuenta la relación que existe entre los síntomas depresivos y varios marcadores inflamatorios, se ha planteado la hipótesis inflamatoria de la depresión, en la cual los procesos inflamatorios e interacciones inmunes, centrales y periféricas, están implicados en la patogénesis de la depresión mayor (Robert Dantzer, O'Connor, Freund, Johnson, & Kelley, 2008; Andrew H Miller et al., 2009; Müller & Schwarz, 2007; Charles L. Raison et al., 2006; Schiepers, Wichers, & Maes, 2005). Se ha observado que la prevalencia de síntomas depresivos en pacientes con cáncer es mayor que la observada en la población general (Brown, Levy, Rosberger, & Edgar, 2003) y estos se asocian con peor pronóstico y menor adherencia al tratamiento (Arrieta et al., 2013). Así, se ha planteado que el aumento del riesgo de desarrollar depresión en estos pacientes no se explica únicamente por el estrés psicosocial asociado al diagnóstico de cáncer, sino también por los procesos inflamatorios crónicos asociados al mismo (Sotelo, Musselman, & Nemeroff, 2014). La presencia de células tumorales genera una respuesta inflamatoria sistémica que, junto con los productos inflamatorios generados por el propio tumor, pueden contribuir a los síntomas de la depresión (Aggarwal, 2004; Burke, Relf, Negus, & Balkwill, 1996; Coussens & Werb, 2002; Naylor, Stamp, Foulkes, Eccles, & Balkwill, 1993; Weinberg, 2007).

Lamkin et al. (2011) utilizando un modelo de cáncer de ovario en roedores, observaron que el desarrollo tumoral produce altos niveles sistémicos tanto de citocinas proinflamatorias como antiinflamatorias a la vez que suscitan

comportamientos anhedónicos (Lamkin et al., 2011). Del mismo modo, las ratas con cáncer de mama presentaron mayores niveles de citocinas proinflamatorias en el hipocampo y en la periferia, así como comportamientos de tipo ansioso-depresivo (Pyter, Pineros, Galang, McClintock, & Prendergast, 2009). Se han identificado varios mecanismos mediante los cuales, citocinas tales como interleucina 1-beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), actúan sobre el sistema nervioso central y ejercen efectos sobre la función y metabolismo de los neurotransmisores, la actividad neuroendocrina, la plasticidad sináptica y los circuitos cerebrales, pudiendo de esta manera alterar la conducta (Dantzer et al., 1999; Dantzer et al., 2008; Hayley, Poulter, Merali, & Anisman, 2005; Raison et al., 2006). Además, estas citocinas proinflamatorias tienen profundos efectos estimuladores sobre el hipotálamo (eje HPA) y la amígdala, una región del cerebro que tiene un importante papel en el miedo y la ansiedad.

Diversos trabajos han encontrado una relación positiva entre estas citocinas, la presencia de síntomas depresivos (Howren, Lamkin, & Suls, 2009) y la conducta de enfermedad (Dantzer et al., 2008). Se ha observado que el 45% de los pacientes que reciben interferon-alfa (IFN- α) para el tratamiento de melanoma maligno, experimentan síntomas depresivos (Musselman DL, Lawson DH, Gumnick JF, Manatunga AK, Penna S, Goodkin RS, 2001). Además, se ha encontrado que la administración crónica y aguda de citocinas, produce alteraciones en el metabolismo de la serotonina, noradrenalina, dopamina y glutamato en regiones del cerebro esenciales en la regulación de las emociones, incluyendo el sistema límbico (amígdala, hipocampo y núcleo accumbens), así como la regulación de la función motora y la recompensa, incluyendo los ganglios basales. Se ha sugerido que un posible mecanismo por el cual las citocinas pueden inducir sintomatología

depresiva, es la capacidad de influir en el metabolismo de las monoaminas (Bonaccorso et al., 2002; Lucile Capuron et al., 2003; Loftis et al., 2013; Andrew H Miller et al., 2009).

Diversos estudios en animales han demostrado un papel de las citocinas en la transmisión serotoninérgica (Anisman, Merali, Poulter, & Hayley, 2005; Dunn et al., 2005; J C O'Connor, Lawson, et al., 2009). Adicionalmente, se ha observado que fármacos antidepresivos tales como paroxetina, facilitan la regulación de la vía de retroalimentación de la liberación de citocinas proinflamatorias y aumentan la actividad del sistema serotoninérgico (Capuron et al., 2002). Así mismo, el efecto de las citocinas inflamatorias sobre la dopamina (DA) en los ganglios basales puede ser especialmente relevante para la depresión y la fatiga, así como para trastornos psicomotores y el desarrollo de trastornos neurovegetativos (Jennifer C. Felger & Miller, 2012).

Una creciente literatura ha propuesto la activación de los enzimas indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) y/o fenilalanina hidroxilasa (PAH) como posibles mediadores entre la respuesta inmune y la disponibilidad monoaminérgica. Las citocinas proinflamatorias, especialmente el interferon-gamma (IFN- γ), potencian la actividad del enzima IDO, el cual convierte el triptófano (Trp), esencial precursor de serotonina (5-HT), en derivados de la quinurenina (Kyn) (Aye Mu Myint, Schwarz, & Müller, 2012)(Widner et al., 2000; Hu et al., 1995; Kohl y Sperner-Unterweger, 2007). Al eliminar el triptófano, el enzima IDO limita la síntesis de 5-HT, contribuyendo de esta forma al desarrollo de depresión (Bernhard Widner, Laich, Sperner-Unterweger, Ledochowski, & Fuchs, 2002). Por otro lado, se ha observado que la inflamación crónica conduce a una pérdida oxidativa de tetrahidrobiopterina (BH₄), disminuyendo así la síntesis de dopamina (DA), adrenalina (A) y noradrenalina

(NA) (Celik et al., 2010; Hashimoto, Nagatsu, Ohta, Mizutani, & Omura, 2004; Kim et al., 2007; Aye M. Myint et al., 2007). El enzima PAH, en presencia del cofactor BH₄, convierte la fenilalanina (Phe) en tirosina (Tyr), precursor de DA, A y NA (Shintaku, 2002). Se considera que la ratio (Phe/Tyr) proporciona una buena estimación de la actividad de PAH (Anderson et al., 1994). En enfermedades inflamatorias y oncológicas se han observado concentraciones elevadas de fenilalanina sérica así como de la ratio Phe/Tyr (Neurauter et al., 2008). Un estudio realizado por Capuron et al. (2011) en población de edad avanzada, ha puesto de manifiesto una relación positiva entre el aumento de inflamación, las ratios Kyn/Trp y Phe/Tyr, así como diversos síntomas neuropsiquiátricos, incluida la depresión. Curiosamente, el aumento del catabolismo del triptófano se relacionó con falta de motivación y pesimismo, mientras que la reducción en la actividad de PAH se asoció a síntomas neurovegetativos y motores (Capuron et al., 2011).

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que el desarrollo de tumores de melanoma B16 produce cambios neuroquímicos y conductuales, característicos de la conducta de enfermedad, a la vez que induce un aumento de la actividad del sistema inmunitario (Vegas, O., et al., 2006). Teniendo en cuenta que las células de melanoma producen diversas citocinas proinflamatorias tales como IL-1 β , IL-6, y TNF- α que actúan como factores de crecimiento autocrinos (Colombo et al., 1992; Valles et al., 2013), estos resultados nos han permitido hipotetizar que los cambios neuroquímicos y conductuales producidos por las células de melanoma B16F10 podrían ser el resultado de la secreción de dichas citocinas en varias áreas del cerebro. Por otra parte, se sabe que el propio estrés psicosocial puede activar los procesos inmunitarios e inflamatorios incrementando los niveles de citocinas, pudiendo así contribuir al desarrollo de la depresión mayor. En estudios llevados a

cabo previamente, hemos podido comprobar que frente a situaciones de estrés social, los sujetos inoculados con estas células manifiestan un mayor desarrollo metastásico pulmonar y una disminución en diversas conductas proactivas, lo cual ha ido acompañado por un aumento de la densidad de los receptores D2 de DA en el estriado y de la actividad de DA y 5-HT en el hipotálamo (Cacho, R., et al., 2008; 2004 Vegas, O., et al., 2004).

Teniendo en consideración estas evidencias, planteamos como objetivo general de este trabajo, estudiar los cambios inmunitarios, fisiológicos y conductuales asociados al desarrollo tumoral de melanoma B16 y determinar si una situación de estrés agudo durante el desarrollo tumoral altera dichos cambios. Para abordar dicho objetivo y teniendo en cuenta la necesidad de utilizar un gran número de animales dada la variedad de determinaciones fisiológicas y la propia dinámica del desarrollo tumoral, se han diseñado tres experimentos diferentes, cuyos objetivos específicos se detallan a continuación:

EXPERIMENTO 1: Efecto del desarrollo tumoral en la secreción de citocinas proinflamatorias, la actividad monoaminérgica central y la conducta depresiva:

Determinar si el desarrollo de metástasis pulmonar promueve la manifestación de conductas depresivas y si existe alguna relación entre estas, la expresión de citocinas proinflamatorias y la actividad monoaminérgica central.

- Observar si las conductas manifestadas en el Tail Suspension Test (TST) y Novel Palatable Food Test (NPFT) son indicativas de un estado depresivo.

- Analizar la expresión génica de IL-1 β , IL-6, y TNF- α en hipocampo e hipotálamo, y determinar la actividad dopaminérgica y serotoninérgica en hipocampo, estriado y corteza prefrontal.
- Determinar los niveles plasmáticos de IL-6 y TNF- α .

EXPERIMENTO 2: Desarrollo tumoral, inflamación en el SNC y conducta depresiva:

Actividad de los enzimas IDO y PAH: Estudiar el efecto del desarrollo de un tumor singénico de melanoma, en la respuesta inflamatoria a nivel central y su efecto sobre la conducta depresiva. Así mismo, se estudia el efecto del desarrollo tumoral sobre la activación de los enzimas IDO y PAH.

- Observar si las conductas manifestadas tanto en el TST como en el Open Field Test (OFT) y Forced Swimming Test (FST), son indicativas de un estado depresivo.
- Determinar los niveles plasmáticos de serotonina (5-HT), triptófano (Trp), quinurenina (Kyn), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe), así como las ratios Kyn/Trp y Phe/Tyr.
- Analizar la expresión génica tanto de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ) como antiinflamatorias (IL-10, IL-4), y del enzima IDO en cerebro.

EXPERIMENTO 3: Desarrollo tumoral y conducta depresiva: Efecto del estrés

social: Estudiar el efecto del desarrollo metastásico pulmonar de un tumor

singénico así como del estrés social, sobre la conducta depresiva y analizar las alteraciones inmunitarias y neuroquímicas producidas por ambos factores.

- Observar si las conductas manifestadas en el OFT, Sucrose Preference Test (SPT) y FST, son indicativas de un estado depresivo.
- Determinar los niveles plasmáticos de serotonina (5-HT), triptófano (Trp), quinurenina (Kyn), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) y 3-hidroxiquinurenina (3-HK), así como las ratios Kyn/Trp y Phe/Tyr.
- Observar si existen diferencias en las variables anteriores en función de la exposición a estrés social.
- Analizar la expresión génica tanto de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ) como antiinflamatorias (IL-10, IL-4), y del enzima IDO en cerebro.

2. HIPÓTESIS

Esperamos que el desarrollo tumoral de melanoma B16 produzca conductas de tipo depresivo, reflejadas en la aparición de anhedonia y el aumento de la inmovilidad en diferentes pruebas conductuales. También esperamos que el desarrollo tumoral de melanoma B16 produzca alteraciones inmunitarias y neuroquímicas relacionadas con dichas conductas depresivas. Concretamente, los sujetos inoculados con el tumor experimental presentarán mayores niveles de citocinas proinflamatorias, una menor disponibilidad de monoaminas, así como una mayor actividad del enzima IDO y una menor actividad del enzima PAH. También esperamos encontrar una

relación positiva entre dichas alteraciones neuroquímicas y la conducta depresiva. Por último, esperamos que el estrés social incremente las alteraciones neuroquímicas y conductuales producidas por el desarrollo tumoral de melanoma B16.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el primer experimento se utilizaron ratones de la cepa OF1 y células de melanoma murino B16F10, las cuales se inyectaron vía intravenosa. Dichas células se alojaron en los pulmones y desarrollaron metástasis. Se estableció un desarrollo tumoral de 21 días, a lo largo del cual se realizaron las diferentes pruebas conductuales.

En el segundo experimento se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6JRj y células de melanoma murino B16F1, que en este caso se inocularon de forma subcutánea. Se determinaron dos grupos de desarrollo tumoral (7 y 21 días) y durante los dos días previos al sacrificio, se realizaron las diferentes pruebas conductuales.

En el tercer y último experimento se utilizaron nuevamente ratones de la cepa C57BL/6JRj y células de melanoma murino B16F10 que se inyectaron vía intravenosa. La semana posterior a la inoculación, un subgrupo de cada condición experimental fue sometido a una situación de estrés social por contacto sensorial. En este caso, se estableció un desarrollo tumoral de 21 días, durante los cuales se fueron realizando las diferentes pruebas conductuales.

Alcanzado el tiempo de desarrollo tumoral establecido en cada experimento, y recogidos los datos conductuales necesarios para determinar si existe conducta tipo

depresivo, los animales fueron sacrificados para extraer las muestras biológicas (sangre y cerebro) y poder determinar los diferentes parámetros de la actividad inmunitaria, monoaminérgica y neurovegetativa.

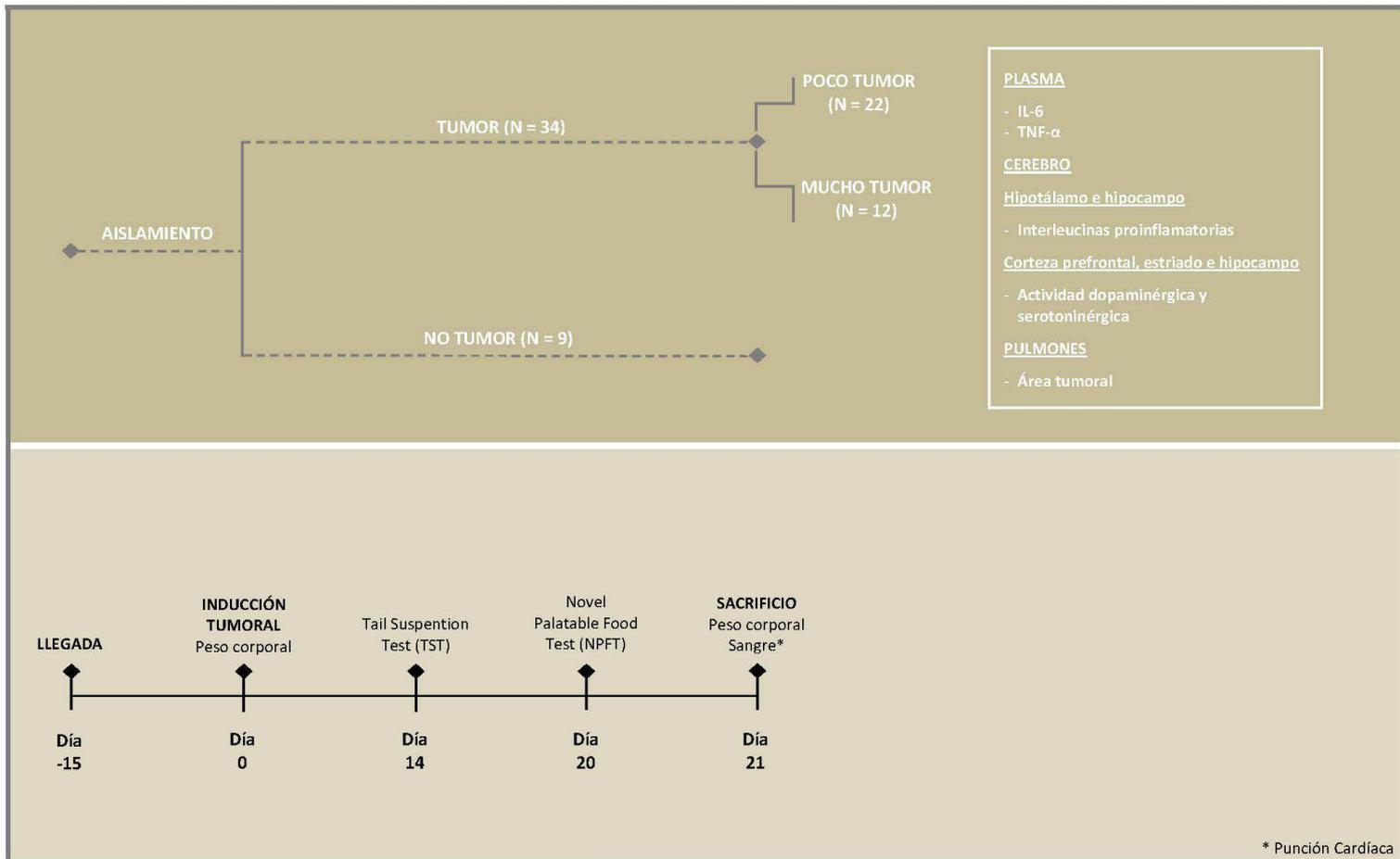
A continuación se detallan los procedimientos específicos de cada experimento.

3.1. EXPERIMENTO 1: EFECTO DEL DESARROLLO TUMORAL EN LA SECRECIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS, LA ACTIVIDAD MONOAMINÉRGICA CENTRAL Y LA CONDUCTA DEPRESIVA

Después de un período de adaptación de 15 días, los animales fueron asignados aleatoriamente a dos grupos. Un grupo fue inoculado con células de melanoma B16F10 (n = 37) y el otro con PBS (n = 9). Todos aquellos sujetos inoculados que no recibieron la dosis de forma completa (0,1 ml) durante el primer pinchazo, fueron eliminados del experimento (n = 3). Tras 14 días desde la inoculación, todos los sujetos fueron sometidos a la prueba de la suspensión de la cola (TST). El día 20, todos los ratones fueron sometidos a la prueba del alimento novedoso/apetitoso (NPFT) y al día siguiente, se registraron los pesos corporales y se sacrificaron todos los sujetos por dislocación cervical. Inmediatamente después, se recogió la sangre por punción cardíaca, se aisló el plasma y se congeló a -80°C para determinar posteriormente los niveles de IL-6 y TNF- α . Los pulmones fueron infundidos con formal calcium y conservados en solución de Bouin hasta poder determinar el área tumoral. Finalmente, se extrajeron los cerebros para diseccionar el hipotálamo, la corteza prefrontal, el estriado y los hipocampos. Todas las disecciones se realizaron en condiciones estériles y bajo observación microscópica con referencia a los atlas

de cerebro de ratón. Todas las estructuras fueron almacenadas a -80°C para determinar posteriormente la expresión génica de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en el hipocampo y el hipotálamo, así como determinar la actividad dopaminérgica y serotoninérgica en el otro hipocampo, el estriado y la corteza prefrontal.

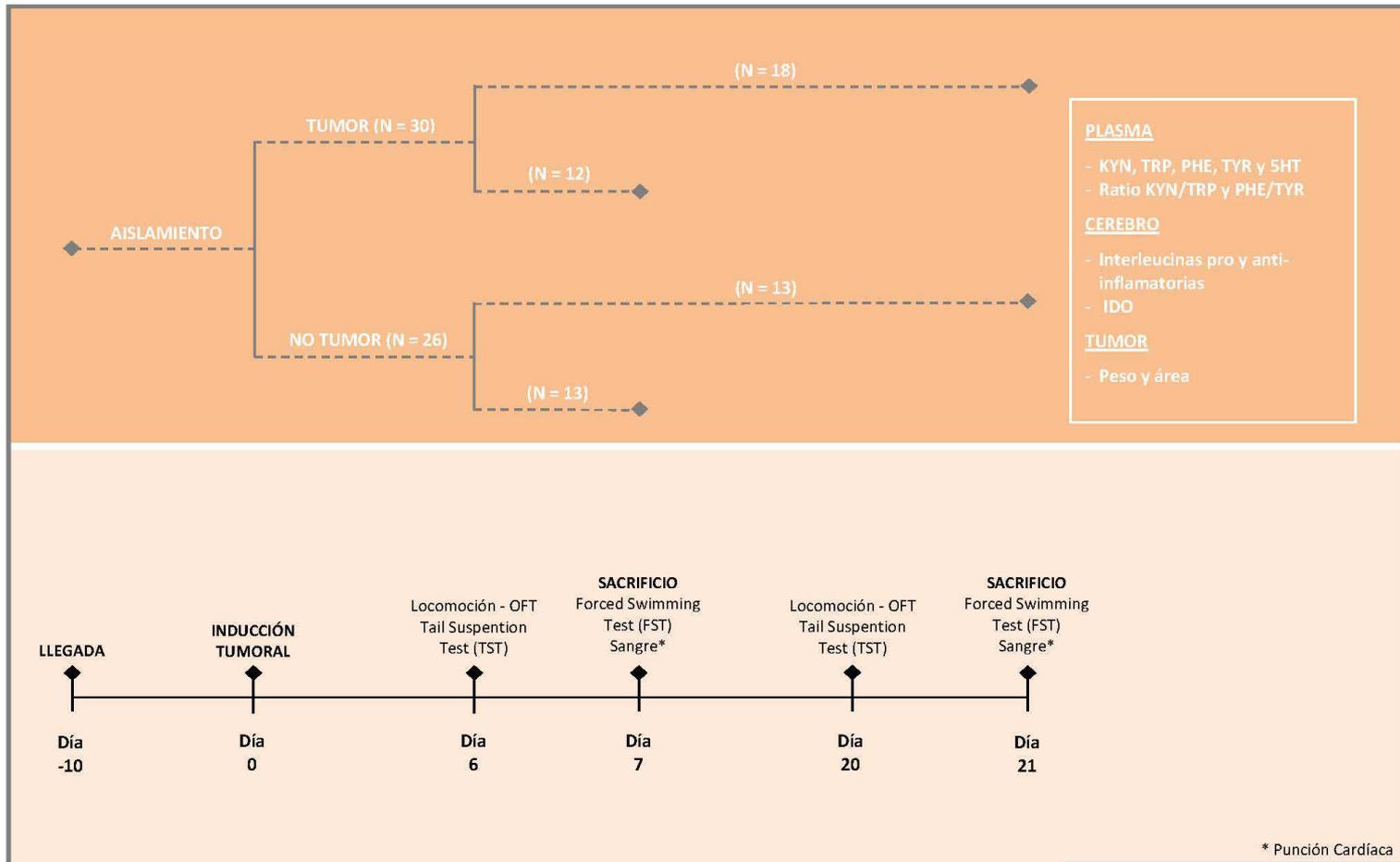
Tabla 1 Representación esquemática del diseño del experimento 1



3.2. EXPERIMENTO 2: DESARROLLO TUMORAL, INFLAMACIÓN EN EL SNC Y CONDUCTA DEPRESIVA: ACTIVIDAD DE LOS ENZIMAS IDO Y PAH

Después de un período de adaptación de 10 días, los animales fueron asignados aleatoriamente a dos grupos. Un grupo fue inoculado con 5×10^4 células de melanoma B16F1 por vía subcutánea en el flanco derecho ($n = 31$) y el otro con PBS ($n = 26$). Todos aquellos sujetos inoculados que no recibieron la dosis de forma completa (0,1 ml) durante el primer pinchazo, fueron eliminados del experimento ($n = 1$). Tras 6 días desde la inoculación, un subgrupo de cada condición experimental fue sometido al test de campo abierto (OFT) y al test de suspensión de la cola (TST). Al día siguiente (día 7), estos mismos subgrupos fueron sometidos al test de la natación forzada (FST) para posteriormente ser sacrificados. Los dos subgrupos restantes, fueron sometidos a las mismas pruebas conductuales y bajo las mismas condiciones los días 20 y 21. El último día de desarrollo tumoral para cada subgrupo, es decir el día 7 y 21 respectivamente, se midió el tamaño del tumor con un calibre digital, posteriormente los animales fueron sacrificados por dislocación cervical para extraer el tumor y pesarlo. Inmediatamente después, se recogió sangre por punción cardíaca, se aisló el plasma y se congeló a -80°C para determinar los niveles de serotonina (5HT), triptófano (Trp), kinurenina (Kyn), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe), así como las ratios Kyn/Trp y Phe/Tyr. Finalmente, se extrajeron los cerebros en condiciones estériles y se almacenaron a -80°C para determinar posteriormente la expresión génica de las siguientes citocinas: IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, IL-4, IFN- γ , así como del enzima IDO.

Tabla 2 Representación esquemática del diseño del experimento 2

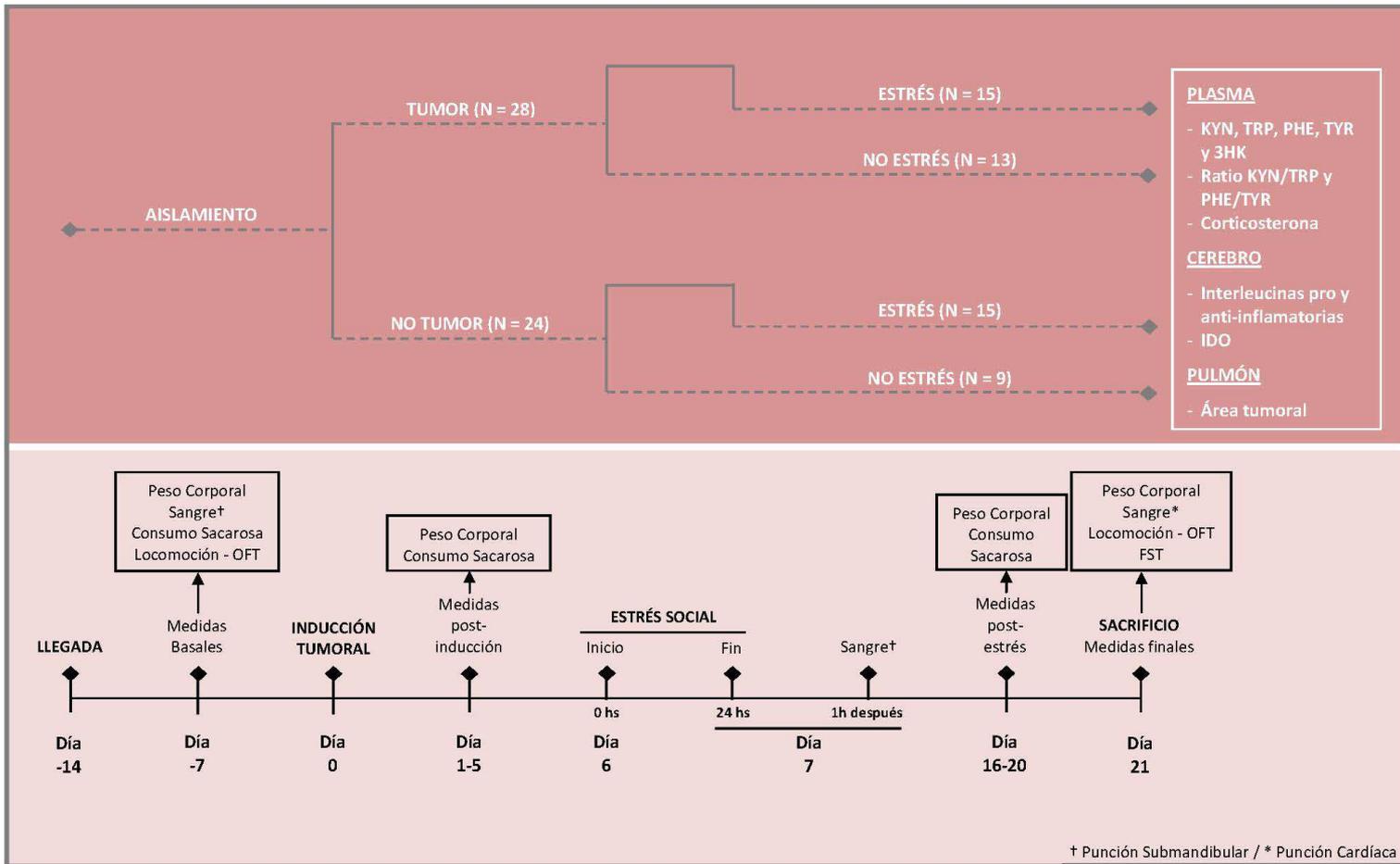


3.3. EXPERIMENTO 3: DESARROLLO TUMORAL Y CONDUCTA DEPRESIVA: EFECTO DEL ESTRÉS SOCIAL

Tras 7 días de la llegada de los animales al estabulario, se recogieron medidas basales en cuanto a peso corporal, actividad locomotora, consumo de sacarosa y muestra sanguínea de cada uno de los animales. Después de un periodo de adaptación de 14 días y dado que no se observaron diferencias iniciales entre los animales en cuanto a las medidas recogidas, los animales fueron asignados aleatoriamente a dos grupos. Un grupo fue inoculado con 5×10^4 células del melanoma B16F10 en la vena lateral de la cola ($n = 31$) y el otro grupo con PBS ($n = 24$). Todos aquellos sujetos inoculados que no recibieron la dosis de forma completa (0,1 ml) durante el primer pinchazo, fueron eliminados del experimento ($n = 3$). Durante los 5 días posteriores a la inoculación tumoral, se recogieron datos del peso corporal y el consumo de sacarosa. El sexto día desde la inoculación, un subgrupo de cada condición experimental fue sometido a una situación aguda de estrés social por contacto sensorial. Una hora después de la finalización del estrés social, se obtuvieron muestras sanguíneas de todos los sujetos por punción submandibular. Finalmente, durante los 5 días previos al sacrificio (del día 16 al día 20) se obtuvieron nuevamente datos en cuanto al peso corporal y al consumo de sacarosa. El día 21, todos los sujetos fueron sometidos a la prueba de campo abierto (OFT) y natación forzada (FST), se registraron nuevamente los pesos corporales y posteriormente se sacrificaron todos los sujetos por dislocación cervical. Inmediatamente después, se recogió sangre por punción cardiaca, se aisló el plasma y se congeló a -80°C para determinar posteriormente los niveles de serotonina (5HT), triptófano (Trp), kinurenina (Kyn), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe)

y 3-hidroxiquinurenina (3HK), así como las ratios Kyn/Trp y Phe/Tyr. Los pulmones fueron infundidos con formal calcium y conservados en solución de Bouin hasta poder determinar el área tumoral. Finalmente, se extrajeron los cerebros en condiciones estériles y fueron almacenados a -80°C para determinar posteriormente la expresión génica de las siguientes citocinas: IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, IL-4, IFN- γ , así como del enzima IDO.

Tabla 3 Representación esquemática del diseño del experimento 3



Bloque III

MATERIAL Y MÉTODOS

1. INSTALACIONES, ANIMALES Y ALOJAMIENTO

Los experimentos que se describen a continuación se llevaron a cabo en el Laboratorio de Psicobiología de la Facultad de Psicología de la Universidad del País Vasco, en San Sebastián. La destreza requerida en las distintas técnicas de análisis de muestras biológicas, fue totalmente adquirida en dicho laboratorio.

Se emplearon dos cepas diferentes de ratones macho, por un lado OF1 de 6 semanas de edad (Charles River, Oncins, Francia), línea no consanguínea, y por otro, C57BL/6JRj de 8 semanas de edad (Janvier, Saint-Berthevin, Francia), consanguíneos y singénicos de las células de melanoma utilizadas. Las instalaciones del animalario se mantuvieron en unas condiciones estables, que consistieron en una temperatura constante de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, una humedad relativa del 55% y un ciclo artificial de iluminación revertido, para asegurar que los ensayos conductuales se realizaran en la fase activa de los animales correspondiente al ciclo de oscuridad (12 horas de oscuridad 08:00 – 20:00, y 12 horas de luz, 20:00 – 08:00). Asimismo, todos los animales tuvieron en todo momento libre acceso a agua y comida.

A su llegada al animalario, los ratones fueron alojados individualmente en cajas de plástico transparente de 24,5 x 24,5 x 15 cm (Panlab S.L., Barcelona, España) durante un periodo de entre 10 y 15 días para facilitar su aclimatación. Tras el correspondiente periodo de aislamiento se dio comienzo a los ensayos experimentales, cuyos procedimientos también se llevaron a cabo en condiciones estables y bajo luz roja tenue en una sala adyacente al animalario. De forma adicional a la manipulación establecida según el diseño experimental, los animales fueron manipulados cuidadosamente cada 14 días para limpiar sus respectivas cajas.

Todos los procedimientos de manipulación animal se llevaron a cabo respetando la Directiva Europea sobre protección de animales utilizados con fines científicos (2010/63/UE), siendo además aprobados y controlados por el Comité Ético de Bienestar Animal de la Universidad del País Vasco (CEBA) y por la Diputación Foral de Guipúzcoa.

2. CULTIVO DE CÉLULAS DE MELANOMA B16-F1 y B16-10

La manipulación de todos los cultivos celulares se realizó en una campana de flujo laminar Cultair BC 100 (Cultair S. L., Madrid, España). Las células de melanoma murino B16F1 y B16F10 se descongelaron y se mantuvieron in vitro a 37°C en una estufa de cultivo (Jouan, Saint Herblain, Francia), en una atmosfera humidificada al 5% de CO₂ a una concentración de 10⁵ células/ml en frascos de cultivo de 75 cm³ (Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.). El medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Madrid, España), fue suplementado con un 10% de suero fetal bovino (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.), 25 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 5 x 10⁻⁵M de 2-mercaptoetanol (Gibco, Life Technologies, Madrid, España) y 2 g/l de bicarbonato sódico (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Dada su propiedad adherente, estas células de melanoma permanecen adheridas a la base del frasco de cultivo, por ello para ser despegadas fueron expuestas a una solución de PBS al 0,02% de ácido exilien diamino tetracético (EDTA) durante 5 minutos. Inmediatamente después, se les añadió 40 ml de medio RPMI-1640 y se centrifugaron a 400 xg y a 4°C durante 5 minutos. Este proceso de lavado se repitió hasta 3 veces para eliminar cualquier resto tóxico de EDTA. Tras la última centrifugación, se eliminó el sobrenadante, y el sustrato que contenía las células fue resuspendido en 1 ml de medio RPMI-1640. Se recogió una muestra de 50 µl y se procedió al recuento

celular y al estudio de viabilidad de las células. Conocido el número de células, se ajustaron las concentraciones a 1×10^5 células/ml en el caso de seguir manteniendo el cultivo, o a 5×10^5 células/ml en caso de proceder a la inoculación tumoral.

2.1. Recuento celular y estudio de viabilidad

Estos análisis se realizaron mediante una cámara cuentaglóbulos Bürker (Brand, Wertheim/Main, Alemania), con un área cuadrículada de dimensiones conocidas y un microscopio invertido (Olympus CK2. Tokio. Japón). Una muestra de la suspensión celular se diluyó en tinción azul tripán 90:10 (Sigma-Aldrich, Madrid, España), y se situó en la cámara de recuento. El azul tripán es una molécula coloreada de gran peso molecular que sólo es capaz de entrar en las células que tienen la membrana alterada, de esta manera, se contaron tanto las células vivas (incoloras) como las células muertas (azules). Todos los cultivos celulares que se llevaron a cabo, contaron con un índice de células vivas, viables o incoloras, superior al 95% del total de células de la muestra.

2.2. Inoculación tumoral

Las células de melanoma fueron inoculadas bien de forma subcutánea (sc) o bien de forma intravenosa (iv), dependiendo de cada experimento. En el caso de la inoculación intravenosa, los sujetos del grupo "TUMOR" fueron pesados y anestesiados via intraperitoneal (ip) con Nembutal (pentobarbital sódico; 60 mg/kg). Tras asegurar una sedación completa, se procedió a la inoculación de 5×10^4 células viables de melanoma B16-F10 en 0,1 ml de PBS en las venas laterales de

la cola, utilizando una aguja de calibre 30½, tras calentar previamente la zona con una almohadilla térmica para facilitar la vasodilatación.

Para asegurar el éxito de la inoculación tumoral, se eliminaron del experimento a todos aquellos sujetos que: 1) habían recibido más de dos pinchazos hasta alcanzar la vena caudal, 2) no se mostraron completamente inmóviles durante el pinchazo; o 3) no recibieron la dosis de forma completa (0,1 ml) durante el primer pinchazo.

En el caso de la inoculación subcutánea (sc), los sujetos del grupo "TUMOR" fueron inoculados con 5×10^4 células viables de melanoma B16F1 en 0,1 ml de PBS en el flanco derecho, utilizando una aguja de calibre 30½. Para asegurar el éxito de la inoculación tumoral, todos aquellos sujetos que no recibieron la dosis de forma completa (0,1 ml) durante el primer pinchazo, fueron eliminados del experimento.

2.3. Cuantificación del desarrollo tumoral

Dependiendo de la vía de inoculación de las células tumorales, las características del tumor (sólido o metástasis) y su crecimiento (palpable, no visible), la cuantificación se llevó a cabo utilizando diferentes métodos:

- *Inoculación intravenosa:* Determinación del número y área de los focos metastásicos pulmonares: La solución de Bouin añade a su propiedad de fijación, la capacidad de tinción del tejido dado el componente acuoso del ácido pícrico. Esto permitió destacar los focos tumorales (negros-grisáceos) sobre un fondo amarillo intenso, facilitando la determinación final del número de focos metastásicos pulmonares. Tras varios días en solución de Bouin, los 5 lóbulos pulmonares fueron separados cuidadosamente para realizar el recuento de los focos metastásicos visibles bajo una lupa binocular (Zoom Estereo Olympus SZ30). Además, se obtuvieron imágenes

digitales del anverso y reverso de cada uno de los lóbulos. Cada imagen fue capturada bajo las mismas condiciones de exposición y además se incluyó un círculo de referencia de 9,62 mm². El área tumoral se determinó con el software de dominio público ImageJ desarrollado en los Institutos nacionales de Salud de EE.UU. (ImageJ, EE.UU. NIH, Bethesda, MD, EE.UU., disponible en <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

- ***Inoculación subcutánea:*** Determinación del volumen y peso tumoral: A partir del quinto día de desarrollo tumoral, los ratones empezaron a ser evaluados mediante palpación para detectar la presencia de los tumores en el flanco derecho. Utilizando este modelo de desarrollo tumoral, los tumores comienzan a ser palpables y visibles a partir del sexto día tras la inyección de las células. A partir de este día, los tumores fueron medidos con un calibre digital cada 3 días y dichas medidas fueron registradas para analizar el crecimiento tumoral. Después de 7 o 21 días de desarrollo tumoral respectivamente, los ratones fueron sacrificados para extirpar y pesar los tumores. Los sujetos cuyo tumor superaba los 773 mg o sujetos en los cuales se observaba metástasis en algún órgano interno, fueron excluidos del estudio (n=1).

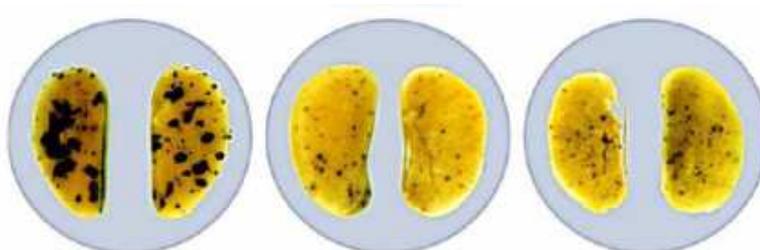


Figura 9: Ejemplos de las imágenes obtenidas del lóbulo superior del pulmón izquierdo (anverso y reverso), de tres sujetos con desarrollo de melanoma pulmonar.

3. EVALUACIÓN CONDUCTUAL

3.1. Prueba de la comida novedosa/apetitosa (Novel Palatable Food Test - NPFT)

Dado que la anhedonia es un sello distintivo de los trastornos depresivos, esta prueba ha sido ampliamente utilizada para evaluar conductas depresivas.

Los ratones fueron habituados a un alimento novedoso y apetitoso, en este caso un cacahuete, en sus respectivas cajas durante 1 h/día (5:00 - 6:00 p.m.) durante los 3 días anteriores a la prueba (del día 17 al 19 tras la inoculación tumoral). El día 20, cuando se espera que la latencia de la ingesta del cacahuete haya disminuido a causa de la habituación a la novedad y a la respuesta hedónica (Dadomo et al., 2011; Merali, Levac, & Anisman, 2003), se introdujo el cacahuete en una jaula idéntica a la que se alojan los animales, pero sin sustrato y se midió el consumo (mg) substrayendo al peso inicial del cacahuete, el peso del cacahuete tras una hora de exposición. Teniendo en cuenta el consumo depende del peso corporal, esta variable se expresó como un porcentaje del peso corporal de cada animal, calculando la relación entre la cantidad de cacahuete consumido y el peso corporal $\times 100$, tal y como se describe en Frenois et al., (2007). Los ratones que consumían menor cantidad de cacahuete se consideraba que presentaban un estado anhedónico que podría asociarse a los síntomas de depresión (Dadomo et al., 2011).

3.2. Prueba de la suspensión de cola (Tail Suspension Test - TST)

Se llevó a cabo de una manera similar a la descrita por Steru, Chermat, Thierry, & Simon, 1985. Esta prueba se ha convertido en uno de los modelos más ampliamente

utilizados para evaluar la conducta depresiva en ratones, y se basa en el hecho de que los animales sometidos a corto plazo al estrés inevitable de ser suspendidos, desarrollarán una postura inmóvil.

Los ratones fueron suspendidos individualmente de la cola en una barra horizontal colocada a 60 cm por encima del suelo. Las colas fueron aseguradas con pinzas de plástico revestidas con cinta adhesiva colocadas aproximadamente a 2 cm de las puntas de las colas. El comportamiento fue grabado durante 6 minutos con cámaras de video (GZ-MG773, JVC, Yokohama, Japón) para posteriormente evaluar los últimos 5 minutos con la versión 4.96 del software ANY-maze© (Stoelting Europe, Dublín, Irlanda). Tal y como se describe en Lamkin et al., 2011 la inmovilidad se calculó dividiendo el tiempo que cada animal permaneció inmóvil por el número total de episodios (móviles e inmóviles). Los animales fueron considerados inmóviles cuando colgaban de forma pasiva y mantenían al menos el 60% de su cuerpo completamente inmóvil.

Con el objetivo de prevenir el comportamiento de escalada sobre la propia cola, el cual ha sido frecuentemente observado en ratones C57BL/6 en comparación a otras cepas (Mayorga & Lucki, 2001), se introdujo en la cola de los ratones un cono de plástico que impedía que los ratones se sujetaran de la cola.

3.3. Prueba de la natación forzada (Forced Swimming Test - FST)

Siguiendo el modelo descrito por Duarte et al., 2006, los ratones fueron introducidos individualmente en un recipiente cilíndrico (18,5 cm de altura y 12,5 cm de diámetro) que contenía 13,5 cm de agua a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. El agua de los recipientes fue cambiada tras cada sesión. La prueba tuvo una duración de 6 minutos, los cuales fueron grabados (JVC, GZ-MG77E) para posteriormente evaluar los últimos 5

minutos utilizando la versión 4.96 del software ANY-maze© (Stoelting Europe, Dublín, Irlanda). La inmovilidad y la natación fueron las conductas evaluadas. En cuanto al criterio de evaluación, se consideró que los animales estaban inmóviles cuando el 60% de su cuerpo permanecía quieto. Los movimientos mínimos realizados con el objetivo de mantenerse a flote también fueron considerados como un estado de inmovilidad. La conducta de natación implica movimientos activos de las patas delanteras, bien en dirección horizontal cruzando el recipiente, o bien girando en círculo (Kaster, Gadotti, Calixto, Santos, & Rodrigues, 2012). A la hora de realizar los análisis estadísticos se tuvieron en cuenta tanto el tiempo total dedicado a cada conducta como la latencia de inmovilidad en segundos.

Probablemente, éste modelo de depresión sea el más utilizado a la hora de estudiar la efectividad de los tratamientos antidepresivos (Ronald S Duman & Monteggia, 2006). Según este paradigma, el hecho de que los ratones estén más tiempo inmóviles indica un estado de indefensión que puede ser revertido con antidepresivos (Porsolt et al., 2000).

3.4. Prueba del campo abierto (Open Field Test - OFT)

Se llevo a cabo tal y como describe Zomkowski et al., 2010 con el objetivo de evaluar la actividad locomotora de los animales. El área del campo abierto consistió en una caja de plexiglás (40 cm x 40 cm). Al comenzar la prueba se colocó el ratón en el centro de la caja y se le permitió explorar libremente durante 6 minutos. La conducta fue grabada para posteriormente ser evaluada con la versión 4.96 del software ANY-maze© (Stoelting Europe, Dublín, Irlanda). Con la ayuda de este software, la caja fue virtualmente dividida en dos zonas (periferia y centro) para posteriormente determinar el número de entradas a cada zona y el tiempo que

cada animal permanece en cada una de ellas. Además, se tuvo en cuenta la distancia recorrida por cada sujeto (m), así como el tiempo que cada sujeto permanecía inmóvil (s). La caja se limpió entre los ensayos con una solución de ácido acético al 0,5%.

3.5. Prueba de la preferencia de sacarosa (Sucrose Preference Test - SPT)

El consumo de sacarosa en esta prueba refleja la sensibilidad a la recompensa y es indicativa de la conducta anhedónica, uno de los síntomas principales de la depresión mayor (Monleon et al., 1995). En este caso, se ha utilizado un paradigma de doble botella, en el cual los ratones pueden elegir entre consumir de una botella de agua y de una botella que contiene una solución de sacarosa. Se ha observado que, desde la exposición a una solución de sacarosa, la mayoría de los ratones C57BL/6 dejan de beber agua y prefieren beber solamente la solución de sacarosa (Elizalde et al., 2008).

Durante la semana anterior a la inducción tumoral, todos los ratones tuvieron acceso continuo a ambas botellas en sus propias jaulas con el objetivo de reducir su reacción a la novedad y para garantizar la estabilidad del consumo basal. El volumen medio ingerido utilizado para calcular la línea base fue el correspondiente a los últimos 5 días, previos a la inducción tumoral. Cada día, una botella que contenía una solución recién preparada de sacarosa al 1% era yuxtapuesta a la botella de agua durante 24 h, coincidiendo justo con el periodo de oscuridad. Con el fin de evitar cualquier preferencia de lugar, la ubicación relativa (izquierda o derecha) de la botella de sacarosa fue alternada cada 24 h, es decir, cada vez que se registró el consumo. Los ratones no fueron en ningún momento privados de comida ni de agua.

Partiendo de la diferencia entre el peso de las botellas antes y después de cada sesión, se calcularon dos variables. Por un lado, el consumo de sacarosa (g), el cual dado que depende del peso corporal, fue dividido por el peso corporal de cada ratón y se expresó como la ratio de consumo por cada gramo de peso corporal mediante la siguiente fórmula: $(\text{consumo de sacarosa en g}) / (\text{peso corporal en g})$. Por otro lado, se determinó la preferencia de sacarosa mediante la relación entre la ingesta de sacarosa y la ingesta de agua, calculada de acuerdo con la siguiente fórmula: $\% \text{ de preferencia} = (\text{consumo de la solución de sacarosa}) / (\text{consumo de la solución de sacarosa} + \text{consumo de agua}) \times 100$.

La prueba de la preferencia de sacarosa se repitió en dos ocasiones, es decir, se registró el consumo diario durante los 5 días anteriores a la inoculación tumoral y los 5 días anteriores al sacrificio. La prueba se realizó en las propias jaulas de los animales.

4. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

4.1. Extracción de sangre

La extracción de sangre se llevó a cabo mediante dos técnicas diferentes. Por un lado, mediante punción submandibular, la cual permite extraer muestras sanguíneas de ratones in vivo. Esta técnica, consiste en un procedimiento propuesto por Golde, Gollobin, & Rodriguez, (2005), como una alternativa a técnicas más agresivas y que a menudo resultan complicadas. Esta técnica permite obtener volúmenes suficientes de sangre (100-250 μl), de una manera muy rápida, realizando una punción sobre la vena submandibular (Figura X) con una lanceta de 5 mm (Lancetas 5mm Goldenrod, Medipoint International Inc., EE.UU). Para ello

únicamente es necesario inmovilizar al animal manualmente, sin necesidad de utilizar anestesia. Por otro lado, mediante punción cardíaca. En este caso, tras la dislocación cervical, los sujetos se colocan en posición dorsal y se desinfecta el área del pinchazo, posteriormente, se introduce la aguja en el segundo o tercer espacio intercostal del lado izquierdo, coincidiendo con el ventrículo izquierdo. Esta última técnica permite obtener volúmenes de sangre mayores (1 ml aprox.) pero solo se puede realizar en el momento del sacrificio.

En ambos casos, la sangre fue recolectada en tubos revestidos con heparina, los cuales se mantuvieron 1 hora a temperatura ambiente para ser posteriormente centrifugados a 3000 xg durante 10 minutos a 4°C. El plasma resultante fue transferido a un microvial que fue almacenado a -80°C hasta su procesamiento y posterior análisis.



Figura 10: Ilustración de la vena submandibular de ratón. La venas retro-orbital (arriba) y submandibular (abajo), procedentes de la vena yugular, drenan la cara del ratón. Imagen tomada de (Golde et al., 2005).

4.2. Extracción del cerebro, estructuras cerebrales y órganos

En una plataforma de aluminio colocada sobre hielo en escamas a 4°C, se extrajeron los bazo y pulmones de los sujetos. Posteriormente, los animales fueron decapitados para la extracción del cerebro y en caso que fuera necesario, se procedió a diseccionar el hipotálamo, hipocampos, corteza prefrontal y núcleo estriado (Figura X). Los cerebros enteros, o bien las diferentes estructuras extraídas, fueron guardadas en viales separados que primeramente fueron congelados en nitrógeno líquido y, posteriormente, almacenados a -80°C para posteriores análisis.

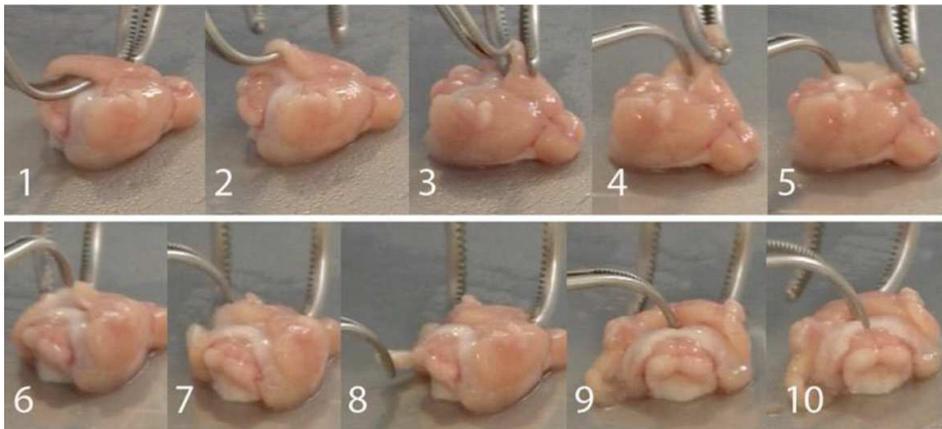


Figura 11: Ejemplo de la extracción de algunas estructuras cerebrales. En este caso, se ilustra la extracción del hipocampo. Imagen tomada de Spijker, 2011.

5. ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

5.1. Expresión génica de citocinas proinflamatorias y anti-inflamatorias y del enzimaIDO en cerebro (Real Time RT-PCR)

En todos los procedimientos que se describen a continuación se tomaron todas las medidas de esterilidad pertinentes con el fin de evitar la contaminación de las

muestras. Así mismo, todo el material plástico utilizado está fabricado libre de ARNasa y ADNasa.

5.1.1. Extracción de ácido ribonucleico (ARN)

Cada muestra de tejido fue homogenizada (Homogenizador T10 Basic Dispenser, IKA Crushing) utilizando 1 ml de Trizol (Invitrogen, Barcelona, España). A continuación, las muestras fueron incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente y trascurrido este periodo fueron centrifugadas a 11900 xg durante 15 minutos a 4°C (Miofuge 22R Centrifuge, Beckman Coulter). El sobrenadante obtenido fue transferido a un nuevo tubo y se añadieron 200 µl de cloroformo (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España). Esta mezcla fue agitada vigorosamente en posición vertical durante 2 minutos, y para ello, se utilizó un agitador (Vortex Genie-2, Scientific Industries). Tras la agitación, se dejó reposar las muestras durante 3 minutos a temperatura ambiente y posteriormente fueron centrifugadas a 11900 xg durante 15 minutos a 4°C. Tras la centrifugación se obtuvo un precipitado con tres fases. En la superficie se observa una fase acuosa que contiene el ARN de las muestras. En segundo lugar, una interfase de color blanco que contiene el ADN, y finalmente, en el fondo, una fase orgánica de color rosa compuesta fundamentalmente por proteínas. La fase acuosa de la superficie fue transferida a un nuevo tubo y se le añadieron 200 µl de isopropanol (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España). El resto de las fases fueron desechadas. La fase acuosa con el isopropanol fue agitada vigorosamente en el vortex (Vortex Genie-2, Scientific Industries) se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugó a 11900 xg durante 10 min a 4°C. Tras la centrifugación, se desechó el sobrenadante y se reservó el pellet al que se le añadió, en el mismo tubo, 1 ml de

Etanol (Merck, Darmstadt, Alemania), que previamente había sido diluido al 75% con agua libre de ARNasa y ADNasa (Ambion Inc.). Tras comprobar que el tubo está cerrado correctamente, se invierte para que el pellet se suelte de la pared del tubo. Seguidamente, las muestras se centrifugaron por última vez a 7500 xg durante 5 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, se desechó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Finalmente, se añadieron 10 µl de agua libre de ARNasa y ADNasa y las muestras fueron almacenadas a -80°C.

5.1.2. Valoración de la calidad y la cantidad de ARN de las muestras procesadas por espectrofotometría

Es recomendable conocer tanto la calidad como la cantidad del ARN obtenido antes de realizar el análisis de los ácidos nucleicos. Para ello, en la cubeta del espectrofotómetro (Biomate 3. Thermo Fisher Scientific., Alcobendas, España), se añadieron 99 µl de EDTA (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España) y 1 µl de la muestra y se midió la absorbancia a dos longitudes de onda: 260 y 280 nm. Así, se obtuvieron dos datos:

- *La calidad de las muestras:* mediante la división de los valores de absorbancia para cada longitud de onda (A_{260}/A_{280}) se obtuvo un índice que indica la calidad de nuestras muestras. Las muestras mostraron valores comprendidos entre 1,8 y 2. Índices menores indicarían la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes.
- *La cantidad de ARN en las muestras:* ésta fue calculada teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale aproximadamente a 40

mg/ml de ARN, por lo que se aplicó la siguiente fórmula para cada muestra:
 $(A260 \times 100 \times 40) / 1000 = \text{cantidad de ARN en } \mu\text{g/ml}$.

Por último, considerando que lo adecuado sería que todas las muestras partan de la misma cantidad de ARN en el proceso de amplificación, todas ellas fueron ajustadas a la misma concentración en un volumen de 10 μl utilizando la cantidad de agua libre de ARNasa y ADNasa necesaria para cada caso. La concentración elegida la determinó la muestra que presentaba menor cantidad de ARN. Así mismo, necesariamente esta concentración debe situarse en un rango comprendido entre 0,5 ng/ μl y 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el siguiente procedimiento.

5.1.3. Tratamiento con ADNasa

A la hora de extraer el ARN, también se pueden extraer trazas de ADN que pueden dar lugar a falsos positivos en el proceso de transcripción reversa, debido a la amplificación del ADN genómico o incluso a la de pseudogenes. Por ello, las muestras fueron tratadas con un kit de ADNasa I (DNase I, Amplification Grade, Invitrogen, Barcelona, España), para purificar el ARN de las muestras, y se procedió tal y como se describe a continuación. Las muestras fueron sacadas del congelador y se mantuvieron en hielo durante el proceso. A los 10 μl de muestra se le añadieron 2 μl de una mezcla compuesta por 1 μl del enzima ADNasa y 1 μl de un tampón diluyente específico. Posteriormente, las muestras (12 μl) fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C en la PCR. Tras la incubación, a las muestras se les añadió 1 μl de EDTA 50mM (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España) y se volvieron a incubar durante 10 minutos a 75°C . Completado el proceso, las muestras (13 μl) fueron almacenadas a -80°C .

5.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa

El análisis por RT-PCR se realizó en dos etapas, primeramente se realizó la retrotranscripción del ARN y posteriormente se realizó el proceso de amplificación, tal y como se explica a continuación. Sin embargo, antes de determinar la expresión génica es necesario seleccionar, diseñar y fabricar los cebadores o primers directos e inversos de cada gen a analizar. Para obtener la secuencia genómica de los genes a analizar se utilizó la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). Una vez obtenida la secuencia, se procedió a la selección y al diseño de los cebadores utilizando el programa informático Primer Express 3.0 de Applied Biosystems. Para saber si los primers seleccionados eran específicos de cada uno de los genes a analizar se utilizó el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La fabricación de los cebadores se le encargó a Applied Biosystems. Los cebadores son entregados por la casa comercial en estado liofilizado en una concentración de 10 nM, por lo que es necesario reconstituirlos añadiendo agua libre de ARNasa y ADNasa consiguiendo una concentración final de 13 μ M.

- *Retrotranscripción del ARN*: En este proceso, parte del ARN de las muestras se transcribió a ADNc (ADN complementario). En primer lugar, se añadieron 4 μ l de las muestras a un nuevo tubo térmico especial para RT-PCR el cual contenía una mezcla compuesta por 8 μ l de tampón para el enzima retrotranscriptasa, 2 μ l del enzima Prime Script RT, 2 μ l de cebadores hexaméricos aleatorios (Random Primers), 2 μ l de cebador diseñado para iniciar la síntesis de ADNc (Oligo dT) y 4 μ l de agua libre de ADN y ARN (Takara, Madrid, España). A continuación, las muestras se introdujeron en la PCR y se puso en marcha la reacción de retrotranscripción en la

siguientes condiciones: 37°C durante 15 minutos, 85°C durante 5 segundos y finalmente la muestra alcanza 4 °C, en ese momento las muestras fueron extraídas de la PCR y almacenadas a -20°C.

- *Amplificación del ADNc*: Una vez obtenido el ADNc mediante transcripción reversa, se determinó la expresión génica mediante PCR a tiempo real (PCR 7500 Real time PCR System, Applied Biosystems, Madrid, España). Para ello, se emplearon microplacas de 96 pocillos específicas para PCR y en cada pocillo se añadieron 23 µl de la siguiente reacción: 9 µl de agua libre de ARNasa y ADNasa, 12,5 µl de QuantiTect SYBR Premix Ex Taq II como fluorocromo (Takara, Madrid, España), 0,5 µl del fluorocromo ROX utilizado para normalizar la señal, 0,5 µl del cebador directo y 0,5 µl del cebador inverso, ambos específicos de cada gen analizado. Una vez completada la placa, se añadieron 2 µl del ADNc de cada una de las muestras por triplicado. La placa fue sellada y centrifugada a 400 xg durante 3 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, la placa se introdujo en la PCR y se dio comienzo al proceso de amplificación. Las condiciones de tiempo y temperatura utilizados fueron las mismas para todos los genes, excepto la temperatura de fusión (Tf) que es específica para cada gen. Así, las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un primer ciclo de 30 segundos a 95°C, a continuación 40 ciclos de amplificación (5 segundos a 95°C, 34 segundos a Tf) y por último una fase para obtener la curva de fusión o melt curve (15 segundos a 95°C, un minuto a Tf y 15 segundos a 95°C).

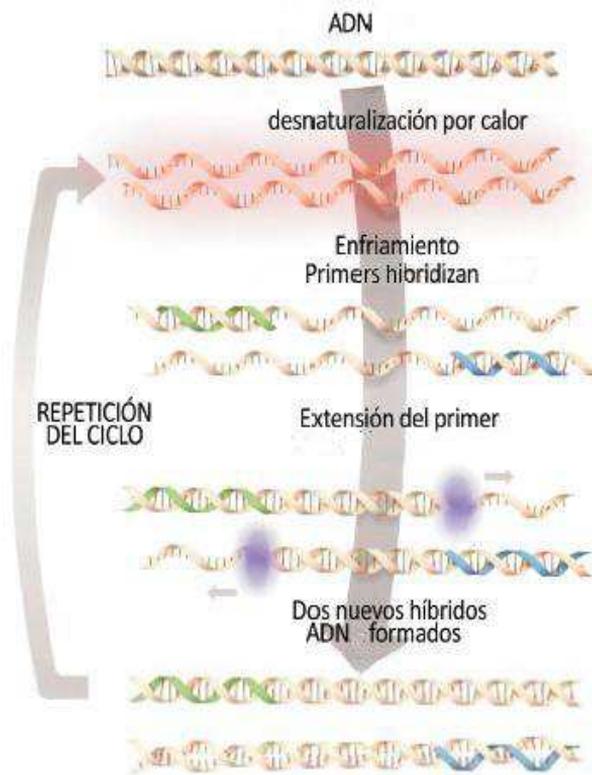


Figura 12: Amplificación del ADN en la PCR.

Siguiendo este protocolo, se determinó la expresión génica de los siguientes genes: IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-10, IL-4, IFN- γ , IDO. El GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) se utilizó como gen endógeno de control para todas las muestras (Tabla 4).

Tabla 4: Especificaciones de los cebadores de PCR

Gen	Descripción	Secuencia del cebador (5' - 3')	Secuencia de referencia NCBI
IL-6	INTERLEUCINA 6	F: AGC CAG AGT CCT TCA GAG A R: TCC TTA GCC ACT CCT TCT GT	NM_031168.1
IL-1β	INTERLEUCINA 1 BETA	F: GAT GAT AAC CTG CTG GTG TGT GA R: GTT GTT CAT CTC GGA GCC TGT AG	NM_008361.3
TNF-α	FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA	F: GAC GTG GAA CTG GCA GAA GAG R: TGC CAC AAG CAG GAA TGA GA	NM_013693.2
IL-10	INTERLEUCINA 10	F: GCC AAG CCT TAT CGG AAA TG R: CCG CAT CCT GAG GGT CTT C	NM_010548.2
IL-4	INTERLEUCINA 4	F: CCA CGG ATG CGA CAA AAA T R: TCT CCT GTG ACC TCG TTC AAA A	NM_021283.2
IFN-γ	INTERFERON GAMMA	F: TTC TTC AGC AAC AGC AAG GC R: TGT GGG TTG TTG ACC TCA AAC T	NM_008337.4
IDO	INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASA	F: AAA GCA ATC CCC ACT GTA TCC A R: TGC CTT TTC CAA TGC TTT CAG	NM_008324.2
GAPDH	GLICOLISIS	F: CGG CCG CAT CTT CTT GTG R: GTG ACC AGG CGC CCA ATA C	NM_008084.2

5.1.5. Valoración de los resultados

La medida de la expresión génica del ARNm por medio de RT-PCR es una cuantificación relativa que se sustenta en la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudiar y el gen endógeno de control. Para ello se utilizan los valores Ct que corresponden al número de ciclos que han sido necesarios para que se

produzca un incremento significativo de la fluorescencia durante la reacción. La cantidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADNc de partida. Así, teniendo en cuenta los valores Ct se aplicó la siguiente fórmula matemática descrita por Pfaffl, (2001) Expresión génica (ARNm) del Gen X = $2^{-\Delta C T \text{ Gen X} / 2^{-\Delta C T \text{ Gen GAPDH}}}$.

5.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC - High Performance Liquid Chromatography)

Esta es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada y consiste en la separación y cuantificación de los compuestos de una mezcla de sustancias, basándose en sus características químicas. La separación se efectúa en una columna cromatográfica que contiene una fase estacionaria sólida, la cual es apolar. A medida que la fase líquida móvil, la cual es polar, arrastra a gran presión una mezcla por la columna, los componentes de la mezcla interactúan con la fase estacionaria. Según sea la polaridad de los distintos compuestos de la mezcla, sus interacciones con la fase estacionaria serán más o menos intensas y duraderas. Esto da como resultado la separación de los componentes de la mezcla y la identificación de los mismos en base al tiempo que tarda cada componente en atravesar la columna. El registro resultante de la separación de los distintos compuestos de la muestra se plasma en un cromatograma. Una vez que los compuestos de la muestra están separados, es necesario identificarlos (análisis cualitativo) y determinar sus cantidades (análisis cuantitativo) y para ello se utilizan patrones de sustancias puras. La identificación de los compuestos de la muestra se realizó comparando su orden y tiempo de retención con respecto a los de los estándares de referencia

(Herrera-Marschitz et al., 1996), mientras que la cuantificación se realizó comparando las áreas de sus picos con las áreas de los estándares de referencia.

A continuación se detallan las características generales del equipo HPLC utilizado, la columna cromatográfica, los sistemas de detección y el procesamiento de los datos. Posteriormente se profundizará en las características específicas de cada método analítico utilizado en función del tipo de muestras (cerebro y plasma) analizadas, dado que existen ciertas diferencias en cuanto a su procesamiento, la preparación de las curvas de calibrado, las fases móviles, el programa de elución y la expresión de los resultados.

El equipo HPLC utilizado consiste en un sistema LC Agilent 1200 (Agilent Technologies, Madrid, España) equipado con un desgasificador de vacío, una bomba cuaternaria, inyector automático refrigerado, compartimento de columna termostaticado, un detector de fluorescencia Agilent 1260 Infinity/ serie 1200 (FLD - G1321B) y un detector ultravioleta de onda variable (VWD - G1314A). La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna Poroshell 120 EC-C18 (100 mm x 4,6 mm d.i, tamaño de partícula 2,7 μm) protegida por un guarda columna que contenía el mismo material que la columna analítica (Agilent Technologies, Madrid, España). Durante todo el análisis, las muestras se mantuvieron a 4°C en la unidad de inyección automática.

Todos los reactivos y productos químicos utilizados, fueron de calidad analítica y todas las soluciones se prepararon con agua ultrapura obtenida mediante el sistema de purificación Milli-Q (Millipore, España). Las fases móviles fueron preparadas diariamente y filtradas a través de un filtro Durapore de 0,22 μm (Millipore, Madrid, España).

La integración de los picos obtenidos en el cromatograma y el procesamiento de los datos se llevó a cabo con el software HP ChemStation específico de Agilent para sistemas LC (Hewlett Packard. Waldbronn, Alemania).

5.2.1. Determinación de la actividad noradrenérgica, serotoninérgica y dopaminérgica en la corteza prefrontal, hipocampo y estriado

Para determinar la actividad monoaminérgica central se analizaron los niveles de noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) y dopamina (DA), así como de sus metabolitos, 3-metoxi-4-hidroxifenil glicol (MHPG), ácido 5-hidroindolacético (5-HIAA) y ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), respectivamente.

Preparación de la curva de calibrado: Todos los estándares fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Madrid, España) y fueron disueltos en una solución 0,1 N de ácido clorhídrico (10 mg/10 ml) a una concentración de 1000 ppm (peso por millón). Partiendo de esta solución stock, se prepararon los cuatro niveles de la curva de calibrado (0,5 ppm, 0,2 ppm, 0,1 ppm y 0,05 ppm) añadiendo las cantidades apropiadas para cada caso de agua ultrapura. En el sistema HPLC se inyectaron 20µl de cada uno de los niveles para crear la tabla de calibrado, la cual fue posteriormente utilizada para determinar la concentración de los compuestos de las muestras.

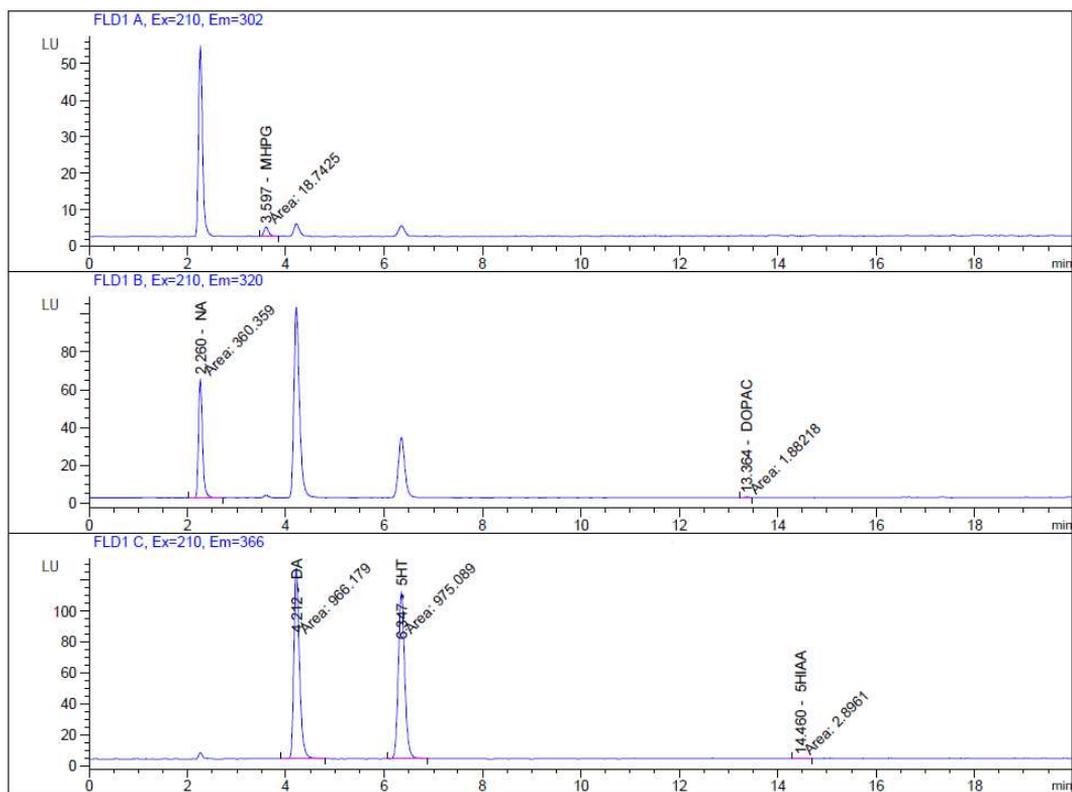


Figura 13: Cromatograma correspondiente a los estándares utilizados para determinar el orden y el tiempo de retención de las sustancias.

Procesamiento de las muestras: El tejido congelado fue pesado en una balanza analítica AG204 (Mettler-Toledo International, Inc., Columbus, OH, EE.UU.) para añadir su peso equivalente de bolas de óxido de circonio de entre 0,5 y 1 mm. Posteriormente, el tejido fue homogeneizado y desproteinizado en 60µl de solución de homogeneización (ácido fórmico al 1% en acetonitrilo), durante 3 minutos a velocidad 8 en el homogeneizador de disrupción celular Bullet Blender (BBY24M Bullet Blender Storm, Next Advance, Nueva York, EE.UU.). Inmediatamente después, los sobrenadantes resultantes fueron agitados durante 5 minutos (Vortex Genie; Scientific Industries, Bohemia, NY, EE.UU.) y centrifugados durante 15 min. a

15000 xg a 4°C (Microfuge 22R Centrífuga; Beckman Coulter, Madrid, España). A continuación, los sobrenadantes se evaporaron durante 30 min. con aire comprimido para concentrar las muestras y posteriormente se reconstituyeron en 30 µl de ácido trifluoroacético al 0,05%. Dada la imposibilidad de filtrar volúmenes tan pequeños, los sobrenadantes fueron nuevamente centrifugados durante 20 minutos a 15000 xg a 4°C. Por último, se inyectaron 20 µl de cada muestra en el sistema HPLC para su análisis.

Condiciones cromatográficas: La fase móvil estuvo compuesta por ácido trifluoroacético al 0,05% (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). El flujo se mantuvo constante a 0,5 ml/minuto y el gradiente de elución fue el siguiente:

Tabla 5: Condiciones cromatográficas

TIEMPO DE ANÁLISIS (en minutos)	VOLUMEN DE DISOLVENTE B (en porcentaje)
0-8	6
8-15	10
15-22	20
22-25	2

La columna se mantuvo a una temperatura constante de 30°C durante todo el análisis. El efluente se monitorizó con el detector de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 320 nm para la DA, DOPAC, NA y MHPG, y de 366 nm para la 5-HT, 5HIAA y TRP. La longitud de onda de emisión se fijó a 210 nm para todas las sustancias analizadas. El tiempo total de análisis de cada muestra fue de 22 m.

Procesamiento de los datos: Las concentraciones de los diferentes compuestos se determinaron comparando las áreas de sus picos con las áreas de los picos de los estándares, de acuerdo con la siguiente fórmula: [AA] (ng/mg de tejido húmedo) = [(área del pico de AA en la muestra) / (área del pico de AA en la solución estándar)] x (la concentración de AA en la solución estándar). AA representa las diferentes sustancias: NA, 5HT, DO, MGPG, 5HIAA o DOPAC. Posteriormente, el valor obtenido fue dividido entre el peso del tejido registrado inicialmente (mg).

5.2.2. Determinación de la actividad de IDO y PAH en plasma

Para determinar la actividad de IDO (indolamina 2,3 dioxigenasa) y PAH (fenilalanina hidroxilasa) se analizaron los niveles plasmáticos de fenilalanina (PHE), tirosina (TYR), serotonina, (5-HT), triptófano (TRP) y kinurenina (KYN). Todos estos compuestos se denominan colectivamente como TRYCATs, junto con el KA, QA, CAAs, VAL, LEU e ILE (Ormstad, Verkerk, Aass, Amthor, & Sandvik, 2013).

Preparación de la curva de calibrado: Todos los estándares fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Madrid, España) y fueron disueltos por separado en una solución de acetato sódico a 10 mmol/L y pH 4,5 hasta obtener una concentración de 2 mmol/L. Partiendo de esta solución stock, se prepararon los cuatro niveles de la curva de calibrado (16 µmol/L, 8 µmol/L, 4 µmol/L y 2 µmol/L) añadiendo en cada caso las cantidades apropiadas de la solución stock arriba mencionada. En el sistema HPLC se inyectaron 30 µl de cada uno de los niveles para crear la tabla de calibrado que posteriormente se utilizó como referencia para cuantificar las muestras.

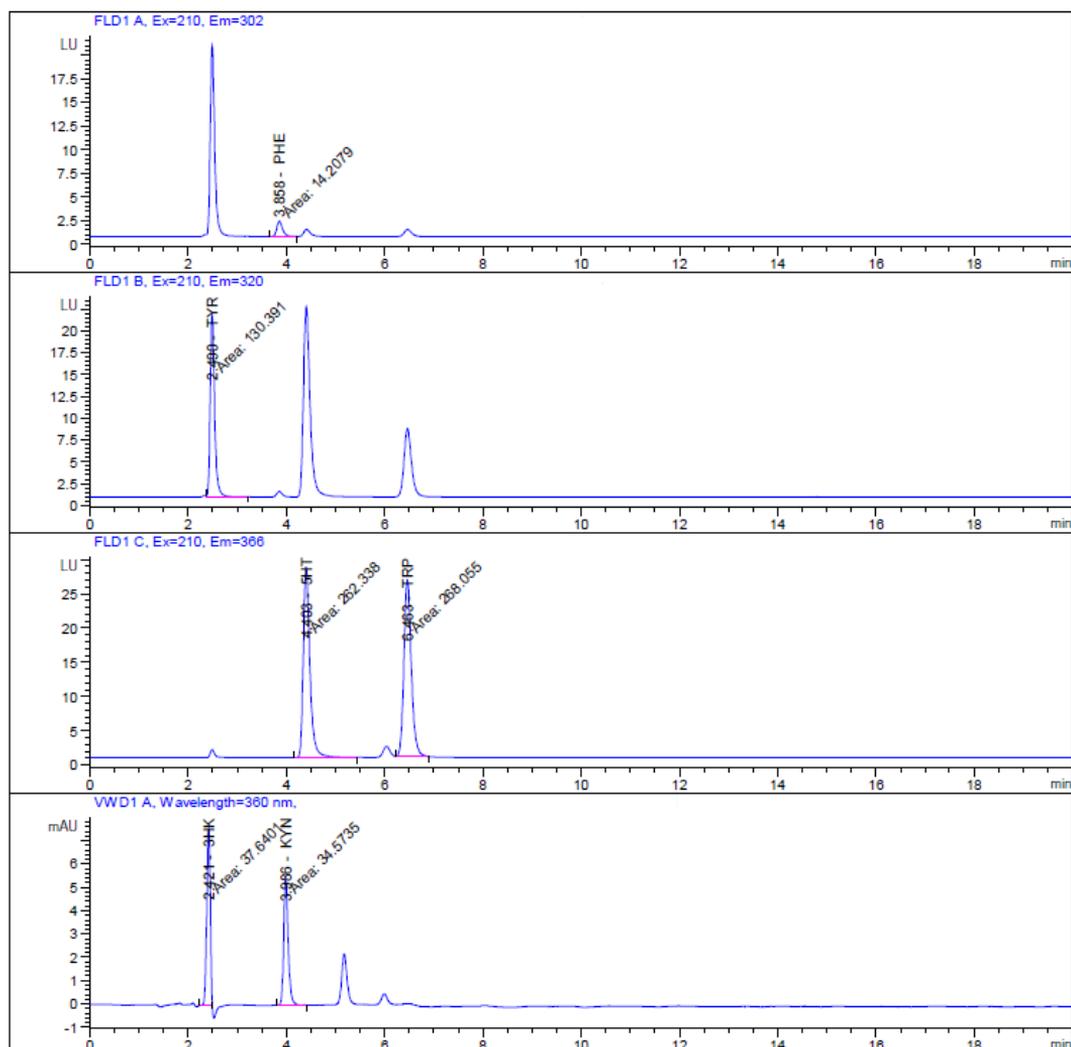


Figura 14: Cromatograma correspondiente a los estándares utilizados para determinar el orden y el tiempo de retención de las sustancias.

Procesamiento de las muestras: Se descongelaron 100 µl de plasma a temperatura ambiente y se les añadió 10 µl de ácido perclórico al 35% para desproteínezarlo. El plasma acidificado fue inmediatamente agitado durante 1 m (Vortex Genie-2, Scientific Industries, Bohemia, NY, EE.UU.) e incubado a temperatura ambiente durante 10 m para precipitar las proteínas; posteriormente fue centrifugado a

15000 xg durante 10 m a 4°C (Microfuge 22R Centrífuga; Beckman Coulter, Madrid, España). Dada la imposibilidad de filtrar volúmenes tan pequeños, los sobrenadantes fueron nuevamente centrifugados a 15000 xg durante 15 m a 4°C. Finalmente, se inyectaron en el sistema HPLC 30 µl de cada muestra para proceder con el análisis.

Condiciones cromatográficas: Se utilizó un método de elución isocrático, en el cual el flujo se mantuvo constante a 0,6 ml/minuto. La fase móvil estuvo compuesta en un 94% (v/v) por una solución de acetato sódico a 10 mmol/L y ph 4,5 (disolvente A) y en un 6% (v/v) por acetonitrilo (disolvente B). Durante el análisis la columna se mantuvo a una temperatura constante de 25°C. El tiempo total de análisis para cada muestra fue de 20 m.

El efluente fue monitorizado tanto con el detector de fluorescencia (FLD) como con el detector ultravioleta de onda variable (VWD), en función de las características de cada sustancia. A continuación se detallan las respectivas longitudes de onda para cada uno de ellas.

Tabla 6 Condiciones cromatográficas

SUSTANCIA	DETECTOR	LO DE EXCITACIÓN (nm)	LO DE EMISIÓN (nm)
PHE	FLD	210	302
TYR	FLD	210	320
TRP	FLD	230	366
5HT	FLD	230	366
KYN	VWD	360	

Procesamiento de los datos: Las concentraciones plasmáticas de los diferentes compuestos se determinaron a partir de la relación entre las áreas de sus picos y las áreas de los picos de los estándares, de acuerdo con la siguiente fórmula: $[AA] \text{ (ng /}\mu\text{l)} = [(\text{área del pico de AA en la muestra}) / (\text{área del pico de AA en la solución estándar})] \times (\text{la concentración de AA en la solución estándar})$. AA representa las diferentes sustancias: 5HT, KYN, TRP, PHE o TYR. Además, se calcularon los ratios PHE/TYR y KYN/TRP.

5.3. Determinación de los niveles de corticosterona en plasma (ELISA)

La determinación de los niveles de corticosterona en plasma se realizó utilizando el kit comercial de ensayo inmunoenzimático competitivo DetectX de Arbor Assays (AntibodyBcn, Barcelona, España), tipo “sándwich” (ELISA). Cada kit contiene una placa de 96 pocillos pre-tratada con un anticuerpo policlonal de oveja específico para corticosterona. El ensayo fue llevado a cabo de acuerdo con las instrucciones recomendadas por el fabricante y únicamente fueron utilizados los reactivos que proporciona el kit, los cuales fueron estabilizados a temperatura ambiente 15 minutos antes de ser utilizados.

Preparación de los reactivos, los estándares y las muestras: El tampón de ensayo fue previamente diluido, añadiendo una parte del mismo por cada cuatro partes de agua desionizada (dilución 1:5). Así mismo, el tampón de lavado también fue diluido añadiendo una parte de este por cada diecinueve partes de agua desionizada (dilución 1:20).

Para generar la curva estándar, el kit proporciona un vial de solución stock de corticosterona con una concentración de corticosterona de 100.000 pg/ml. Primeramente se rotularon 8 tubos (del número 1 al 8) y se añadió 450 µl de tampón de ensayo en el tubo número 1 y 250 µl en los tubos restantes (del número 2 al 8). Tras agitar vigorosamente el tubo de la solución stock de corticosterona, se cogieron cuidadosamente 50 µl y se añadieron al tubo número 1. Después de agitar por completo el tubo número 1, se cogieron 250 µl para añadirlos al tubo número 2, el cual también fue agitado por completo antes de repetir el procedimiento. Esta dilución serial se repitió sistemáticamente para los tubos restantes (del número 3 al 8). De tal forma que el rango de concentraciones de corticosterona del tubo 1 al 8 fue la siguiente: 10.000 pg/ml, 5.000 pg/ml, 2.500 pg/ml, 1.250 pg/ml y 625 pg/ml, 312,5 pg/ml, 156,25 pg/ml, 78,125 pg/ml.

Dado que las muestras de suero y de plasma deben ser previamente tratadas con el reactivo de disociación, se añadieron 5 µl de este reactivo en un tubo al que posteriormente se le añadió 5 µl de plasma y se agitó suavemente. Antes de la adición de las muestras, éstas fueron mantenidas a 4°C. Tras 5 m de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 490 µl de Assay Buffer (dilución final 1: 100).

Adición de la curva estándar y las muestras: Primeramente se diseñó la placa teniendo en cuenta el número de pocillos necesarios en función de la cantidad de muestras, estándares, pocillos de máxima unión (B0 - 0 pg / ml) y pocillos de unión no específica (NSB). De esta forma, se tuvieron identificados todos los pocillos durante todo el proceso. Se añadieron por duplicado 50 µl de cada uno de los estándares y de las muestras en sus pocillos correspondientes. Posteriormente, se pipetearon por duplicado 75 µl de tampón de ensayo en los pocillos NSB y 50 µl en

los pocillos B0. Estos pocillos sirvieron de controles de la capacidad de unión de la corticosterona.

Incubación con el conjugado y el anticuerpo de corticosterona: Una vez añadidas las muestras, los estándares y los controles, se añadieron 25 µl del conjugado de corticosterona (corticosterona peroxidasa conjugada en una solución estabilizadora) a cada pocillo, utilizando una pipeta multicanal. Finalmente, se añadieron 25 µl del anticuerpo policlonal de corticosterona a cada pocillo, excepto los pocillos NSB, para dar inicio a la unión. Posteriormente, la placa fue sellada y agitada durante una hora a temperatura ambiente en un agitador de placas a ~500 rpm (Minishaker, IKA). Durante este periodo de incubación, se produce el llamado “sándwich” anticuerpo-antígeno-anticuerpo.

Lavado y adición del sustrato: Tras el periodo de incubación, todos los pocillos fueron lavados cuatro veces con 300 µl de tampón de lavado. Tras el último lavado, la placa fue escurrida sobre papel absorbente y se añadieron 100 µl del sustrato TMB en cada pocillo, el cual reacciona con el conjugado de corticosterona peroxidasa unido. Posteriormente, la placa fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Detención y revelado de la reacción enzimática: Tras este último periodo de incubación, se añadieron 50 µl de una solución 1M de ácido clorhídrico a todos los pocillos para detener la reacción enzimática. Seguidamente, la placa fue leída con un lector de placas ELx 800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VE., EE.UU) con un filtro de absorbancia de 450 nm de longitud de onda, con el objetivo de detectar la intensidad del color generado por cada pocillo y obtener la densidad óptica (DO).

Valoración de los resultados: En primer lugar, se calcularon las medias de las DOs de los pocillos duplicados para cada uno de los estándares, muestras y controles. A estas DO medias se les sustrajo la DO media de los pocillos NSB. Posteriormente estos valores fueron divididos por la DO media de los pocillos B0 y multiplicados por 100 (%B/B0). Con estos valores, se creó una curva estándar que tenía en consideración la concentración de corticosterona y el porcentaje de unión según la DO. De tal forma que a mayor porcentaje de unión, menor concentración de corticosterona y menor DO media. Partiendo de esta curva logística, se calcularon las concentraciones de corticosterona de cada una de las muestras con la ayuda de la aplicación online My assays (www.myassays.com/arbor-assays-corticosterone-enzyme-immunoassay-kit.assay). Posteriormente, los valores obtenidos fueron multiplicados por el factor de dilución de las muestras (1:100) y convertidos a ng/ml.

5.4. Determinación de los niveles plasmáticos de interleucinas proinflamatorias

Las muestras de sangre obtenidas mediante punción cardiaca fueron recolectadas en tubos revestidos de heparina para evitar que se coagulen y tras ser incubadas media hora a temperatura ambiente, fueron centrifugadas a 2000 xg durante 20 m a 4°C. El plasma resultante fue almacenado a -80°C en diferentes alícuotas hasta su análisis.

5.4.1. Determinación de los niveles de TNF- α en plasma

La determinación de los niveles plasmáticos de TNF- α (pg/ml) se realizó utilizando el kit comercial de ensayo inmunoenzimático tipo “sandwich” (ELISA), Quantikine Mouse TNF- α Immunoassay, suministrado por R&D Systems Europe, Ltd. (Abingdon, Reino Unido). Este ensayo contiene dos placas de 96 pocillos pre-tratadas con un anticuerpo monoclonal específico para el TNF- α murino. El ensayo fue llevado a cabo de acuerdo con las instrucciones recomendadas por el fabricante y únicamente se utilizaron los reactivos proporcionados en el propio kit. Cada reactivo fue estabilizado a temperatura ambiente 15 minutos antes de ser utilizado. Además, las muestras se mantuvieron a 4°C antes de ser sembradas.

Preparación de los reactivos y de la curva estándar: Primeramente se diluyeron 20 ml del tampón concentrado de lavado en 480 ml de agua desionizada. A continuación se mezclaron a partes iguales los dos reactivos de color (peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina) para obtener la solución de sustrato. Para la preparación de la curva estándar el kit suministra un vial liofilizado que contiene TNF- α , el cual debe ser reconstituido en agua desionizada, dando lugar a una solución stock de 7000 pg/ml. Para crear la curva estándar se añadieron las cantidades apropiadas del diluyente calibrador en cada uno de los tubos y se realizaron diluciones seriadas partiendo de la solución stock arriba mencionada. El rango de concentraciones de TNF- α de la curva estándar fue el siguiente: 700 pg/ml, 350 pg/ml, 175 pg/ml, 87,5 pg/ml, 43,8 pg/ml, 21,9 pg/ml y 10,9 pg/ml. El diluyente por sí solo constituyó la medida de control (0 pg/ml).

Adición de estándares, controles y muestras e incubación con el anticuerpo-detector: En primer lugar se añadieron 50 µl del diluyente RD1-63 a cada pocillo. En segundo lugar, se añadieron 50 µl de cada uno de los estándares, controles y muestras a los pocillos correspondientes, por duplicado. A continuación, se selló la placa, se agitó durante 1 m y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.

Adición e incubación del conjugado enzimático: Tras el periodo de incubación, se lavó la placa 5 veces con 400 µl de tampón de lavado y tras el último lavado la placa fue decantada y escurrida sobre papel secante. Posteriormente, se añadió a cada pocillo 100 µl del conjugado enzimático (anticuerpo policlonal específico para TNF- α murino conjugado con HRP) y se selló nuevamente la placa para ser posteriormente incubada durante 2 horas a temperatura ambiente. Durante este periodo de incubación, se produce el llamado “sandwich” anticuerpo-antígeno-anticuerpo.

Adición del sustrato: Una vez concluida la incubación, se lavó nuevamente la placa siguiendo el procedimiento utilizado en el lavado anterior. Una vez escurrida la placa y eliminado el material no ligado, se añadieron 100 µl de la solución de sustrato a cada pocillo, a continuación se selló la placa y se incubó durante 30 minutos en total oscuridad y a temperatura ambiente.

Detención y revelado de la reacción enzimática: Tras este último periodo de incubación, se añadieron 100 µl de ácido clorídrico a todos los pocillos para detener la reacción enzimática y se agitó suavemente la placa. Seguidamente, se determinó la densidad óptica (DO) de cada pocillo con un lector de microplacas Synergy HT (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU) con un filtro de absorbancia ajustado a 450 nm de longitud de onda. Para corregir las imperfecciones ópticas

que la placa pudiera tener, se corrigieron las DOs obtenidas restándoles las DOs obtenidas de la lectura a 540 nm. El límite de detección fue de 1,88 pg/ml (coeficiente de variación intraensayo 3,1-3,8% e interensayo 5,8-7,7 %).

Valoración de los resultados: En primer lugar, se calcularon las medias de las DOs de los pocillos duplicados para cada uno de los estándares, muestras y controles. A estas DOs medias se les sustrajo la DO media de los pocillos control (0 pg/ml). Con la ayuda de la aplicación informática GraphPad Prism 3.0 (San Diego, California, EE.UU) se generó una curva logística de 4 parámetros (4-PL), en base a la DO media y concentración de cada uno de los estándares. A partir de esta curva y mediante un análisis de regresión, se pudo estimar la concentración de TNF- α (pg/ml) de cada una de las muestras analizadas.

5.4.2. Determinación de los niveles de IL-6 en plasma

La determinación de los niveles plasmáticos de IL-6 (pg/ml) se realizó utilizando el kit comercial de ensayo inmunoenzimático tipo “sandwich” (ELISA), Quantikine Mouse IL-6 Immunoassay, suministrado por R&D Systems Europe, Ltd. (Abingdon, Reino Unido). Este ensayo contiene dos placas de 96 pocillos pre-tratadas con un anticuerpo monoclonal específico para la IL-6 murina. El ensayo fue llevado a cabo de acuerdo con las instrucciones recomendadas por el fabricante y únicamente se utilizaron los reactivos proporcionados en el propio kit. Cada reactivo fue estabilizado a temperatura ambiente 15 minutos antes de ser utilizado. Además, las muestras se mantuvieron a 4°C antes de ser sembradas.

Preparación de los reactivos y de la curva estándar: Primeramente se diluyeron 20 ml del tampón concentrado de lavado en 480 ml de agua desionizada. A continuación se mezclaron a partes iguales los dos reactivos de color (peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina) para obtener la solución de sustrato. Para la preparación de la curva estándar el kit suministra un vial liofilizado que contiene IL6, el cual debe ser reconstituido añadiendo el diluyente calibrador RD5T, dando lugar a una solución stock de 500 pg/ml. Para crear la curva estándar se añadieron las cantidades apropiadas del diluyente calibrador en cada uno de los tubos y se realizaron diluciones seriadas partiendo de la solución stock arriba mencionada. El rango de concentraciones de IL6 de la curva estándar fue el siguiente: 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml y 7,8 pg/ml. El diluyente por si solo constituyó la medida de control (0 pg/ml).

Adición de estándares, controles y muestras e incubación con el anticuerpo-detector: En primer lugar se añadieron 50 µl del diluyente RD1-14 a cada pocillo. En segundo lugar, se añadieron 50 µl de cada uno de los estándares, controles y muestras a los pocillos correspondientes, por duplicado. A continuación, se selló la placa, se agitó durante 1 m y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.

Adición e incubación del conjugado enzimático: Tras el periodo de incubación, se lavó la placa 5 veces con 400 µl de tampón de lavado y tras el último lavado la placa fue decantada y escurrida sobre papel secante. Posteriormente, se añadió a cada pocillo 100 µl del conjugado enzimático (anticuerpo policlonal anti-IL6 murina conjugado con HRP) y se selló nuevamente la placa para ser posteriormente incubada durante 2 horas a temperatura ambiente. Durante este periodo de incubación, se produce el llamado “sandwich” anticuerpo-antígeno-anticuerpo.

Adición del sustrato: Una vez concluida la incubación, se lavó nuevamente la placa siguiendo el procedimiento utilizado en el lavado anterior. Una vez escurrida la placa y eliminado el material no ligado, se añadieron 100 μ l de la solución de sustrato a cada pocillo, a continuación se selló la placa y se incubó durante 30 minutos en total oscuridad y a temperatura ambiente.

Detención y revelado de la reacción enzimática: Tras este último periodo de incubación, se añadieron 100 μ l de ácido clorídrico a todos los pocillos para detener la reacción enzimática y se agitó suavemente la placa. Seguidamente, se determinó la densidad óptica (DO) de cada pocillo con un lector de microplacas Synergy HT (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU) con un filtro de absorbancia ajustado a 450 nm de longitud de onda. Para corregir las imperfecciones ópticas que la placa pudiera tener, se corrigieron las DOs obtenidas restandoles las DOs obtenidas de la lectura a 540 nm. El límite de detección fue de 1,6 pg/ml (coeficiente de variación intraensayo 3,5-6,7% e interensayo 6,2-8,8%).

Valoración de los resultados: En primer lugar, se calculó el promedio de las DOs de los pocillos duplicados para cada uno de los estándares, muestras y controles. A estos valores se les sustrajo la DO media del control (0 pg/ml). Con la ayuda de la aplicación informática GraphPad Prism 3.0 (San Diego, California, EE.UU) se generó una curva logística de 4 parámetros (4-PL), en base al promedio de las DOs y concentración de cada uno de los estándares. A partir de esta curva y mediante un análisis de regresión, se pudo estimar la concentración de IL6 (pg/ml) de cada una de las muestras analizadas.

6. MODELO DE ESTRÉS SOCIAL POR CONTACTO SENSORIAL

6.1. Selección y entrenamiento de ratones agresivos

Se utilizaron ratones machos de la cepa OF1, los cuales se caracterizan por su alto nivel de agresividad. En primer lugar, se enfrentaron parejas de ratones al azar en una caja neutra, hasta observar las primeras conductas de defensa/huida por parte de uno de los contrincantes. Una vez establecida la jerarquía (dominantes vs sumisos), se llevo a cabo un segundo enfrentamiento, en el cual los sumisos se enfrentaron como intrusos a los dominantes, con el objetivo de registrar la latencia de ataque de estos últimos. Se establecieron tres grupos de ratones dominantes en función de la latencia de ataque; los ratones cuya latencia superaba los 6 m, los ratones con una latencia media (entre 3 y 6 m) y por último, los ratones con una latencia inferior a los 3 m. Con el objetivo de igualar la latencia de ataque, se llevo a cabo un entrenamiento de la agresividad de estos sujetos, que consistió en enfrentar los ratones con mayor latencia de ataque como intrusos de los sujetos con menor latencia. Posteriormente, se afianzó esta conducta de ataque a través de cinco sesiones de interacciones diádicas residente- intruso, en las cuales el intruso era alternativamente un ratón agresivo con mayor latencia de ataque o un ratón sumiso. Esta vez, el ratón sumiso podía ser tanto de la cepa OF1 como de la cepa C57BL6/jRJ, y al igual que en los enfrentamientos anteriores, la duración de la interacción física-directa finalizó con la observación de las primeras conductas de defensa/huida. Por lo tanto, la experiencia previa de victorias acumuladas en el grupo agresivo frente al grupo experimental, antes de la primera sesión de estrés social, fue de 6 ± 1 . Aunque se registró la latencia de ataque de todos los sujetos dominantes a lo largo de todos los enfrentamientos, se utilizó la media de los tres

últimos registros para la selección de los ratones dominantes más homogéneamente agresivos, eliminando todos aquellos sujetos con latencias de ataque superiores a los 10 segundos.

De esta forma, se logró homogeneizar las características del estímulo estresor-agresivo, que posteriormente iba a ser utilizado como residente durante la situación de estrés social agudo, frente a un ratón experimental de la cepa C57BL6/jRJ.

6.2. Estrés social: interacción física y sensorial

- *Grupo Experimental* (sometido a estrés social): Se realizaron interacciones diádicas residente-intruso utilizando el modelo de contacto sensorial propuesto por Kudryavtseva, Bakshtanovskaya, & Koryakina, 1991). Los animales del grupo estresado se enfrentaron como intrusos a animales agresivos residentes, que habían sido previamente entrenados, durante un período de 24 horas (Ilustración X). Durante este período de tiempo, los animales fueron sometidos a interacción física- directa sólo en tres intervalos de 5 minutos cada uno. (8:00h-8:05h, 20:00h-20:05h y al día siguiente 8:00h-8:05h). El resto del tiempo, los animales intrusos-experimentales fueron físicamente protegidos de los animales agresivos-residentes mediante un separador de metacrilato perforado, que permitía que el enfrentamiento continuase de una manera sensorial-indirecta en la misma jaula del sujeto dominante. De esta manera, los ratones se olían y se veían, pero no podían agredirse con lo cual evitamos que se produjeran heridas que pudiesen poner en marcha el sistema inmunitario e interfiriesen en los resultados. A pesar de que durante las interacciones con el sujeto agresivo, los sujetos experimentales recibieron algunas mordeduras, la

mayoría de ellos no mostraron heridas visibles. En el caso de observarse heridas evidentes, los sujetos fueron retirados del experimento.

Los períodos de interacción física-directa se llevaron a cabo en una habitación contigua al estabulario, en la que las conductas manifestadas por los sujetos experimentales durante las dos primeras sesiones de 5 minutos de interacción social fueron grabadas con una cámara de video digital (JVC, GZ-MG77E). Con la introducción del separador de metacrilato terminaba la interacción directa, y los sujetos eran trasladados al estabulario para continuar en interacción sensorial-indirecta.

- *Grupo Control:* Sin ser sometido a la sesión de estrés social, este grupo fue manipulado de igual manera que el grupo experimental estresado. Durante los períodos correspondientes a interacción social física-directa, los animales manipulados permanecieron también fuera del estabulario, en la habitación contigua donde se realizaban las interacciones sociales, pero en sus propias jaulas. De la misma manera, durante los períodos correspondientes a interacción sensorial-indirecta también se introdujo en la mitad de sus respectivas jaulas el separador de metacrilato, con el objetivo de controlar los posibles efectos que este, así como la consecuente reducción del espacio, pudiera ocasionarles.

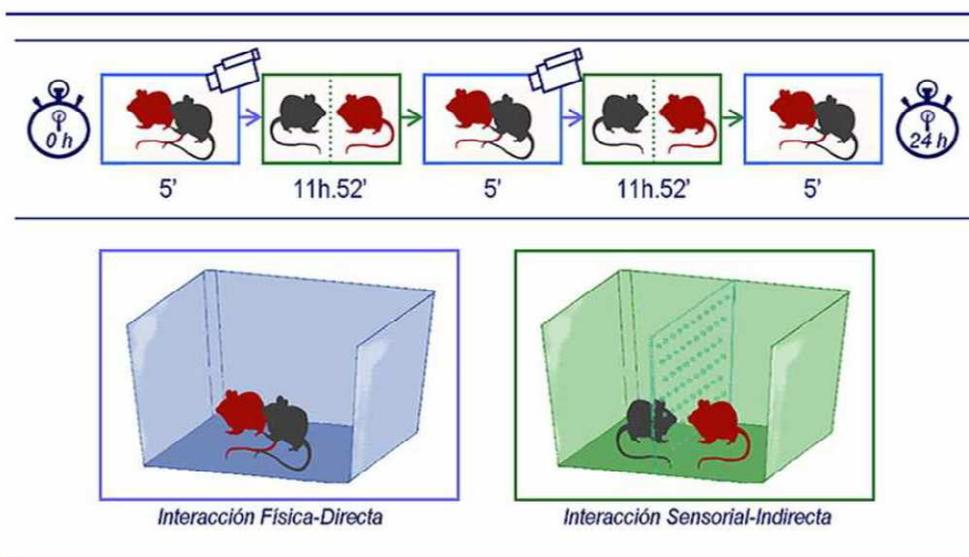


Figura 15: Representación del Modelo de Estrés Social [Ratón rojo] Animal Experimental Intruso; [Ratón negro] Animal Agresivo Residente; [Cámara] Filmación.

6.3. Evaluación conductual y establecimiento de las estrategias de afrontamiento

Los videos de las conductas manifestadas por los sujetos experimentales durante las dos primeras sesiones de interacción física directa, fueron evaluados utilizando un programa informático THE OBSERVER 3.0 (Noldus, IT, Wageningen, Holanda). Este programa permite cuantificar el tiempo que cada sujeto dedica a cada una de las categorías conductuales establecidas. La evaluación se realizó en base al etograma del ratón elaborado por el profesor Brain, (1972) y detalladamente descrito por Martinez, Calvo-torrent, & Pico-alfonso, (1998). Dicho etograma contempla 52 pautas conductuales agrupadas en 11 categorías. En el presente trabajo se evaluaron 7 de esas categorías (para la descripción detallada de cada una de las pautas conductuales evaluadas ver ANEXO I):

1. Escarbar
2. Exploración Social
3. Exploración a Distancia
4. Ataque
5. Amenaza
6. Evitación/Huida
7. Defensa/Sumisión
8. Inmovilidad
9. Autoaseo
10. Exploración No-social
11. Conducta Sexual

Una vez finalizada la evaluación conductual, el porcentaje de tiempo dedicado a cada una de las categorías conductuales evaluadas se exportó a la aplicación de tratamientos estadísticos SPSS para Windows (SPSS Inc. Chicago, Illinois, EE.UU). Dado el reducido tamaño de la muestra, resultó imposible llevar a cabo un análisis de clúster jerárquico para establecer y distinguir entre grupos de ratones con estrategias activas y pasivas de afrontamiento al estrés.

7. ANALISIS ESTADÍSTICOS

Previo al análisis de los datos correspondientes a cada experimento, se examinaron todas las variables dependientes con el objetivo de descartar valores atípicos y distribuciones no normales. Todos los análisis que se presentan a continuación se llevaron a cabo con el programa de análisis estadísticos SPSS 21.0 para Windows XP

(SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU). En todos los casos se consideró un valor de $p \leq 0,05$ como estadísticamente significativo y se utilizaron los valores de la media \pm el error estándar de la media (E.E.M) para las representaciones gráficas. Para realizar comparaciones múltiples se utilizó la prueba post hoc HSD de Tukey, mientras que para las correlaciones bivariadas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.

EXPERIMENTO 1: Para determinar si el desarrollo tumoral influye en la conducta de inmovilidad y anhedonia, en los niveles de citocinas proinflamatorias a nivel central y periférico, y/o en la actividad serotoninérgica y dopaminérgica en el hipocampo, estriado y corteza prefrontal, se realizó un ANOVA de un factor en el cual el tumor (grupo tumor vs. control) constituyó el factor intersujeto. Debido a la gran variabilidad observada en cuanto al desarrollo de metástasis pulmonar al cabo de 21 días, el grupo tumor fue dividido en 2 subgrupos: mucho tumor y poco tumor para repetir el ANOVA, esta vez, con un factor de tres niveles (grupo de mucho tumor vs. grupo de poco tumor vs. control). Dado que los datos derivados del peso corporal fueron recogidos tanto en la fase inicial como final del experimento, se analizaron mediante un ANOVA mixto de dos factores, donde el factor intersujeto fue el tumor (grupo tumor vs. control) y el factor intrasujeto fue el tiempo (basal vs. final).

EXPERIMENTO 2: Para estudiar el efecto que el desarrollo tumoral pudiera tener en función del tiempo, sobre la conducta y sobre las diferentes variables fisiológicas, se llevó a cabo un ANOVA de dos factores en el cual el tumor (grupo tumor vs. control) y el tiempo (7 días vs. 21 días) constituyeron los factores intersujetos. En el caso de que la interacción entre ambos factores resultara significativa para alguna de las variables, se procedía a analizar las diferencias entre los cuatro grupos

experimentales a través de la prueba post hoc HSD de Tukey para comparaciones múltiples. También se llevó a cabo un análisis de correlaciones bivariadas para estudiar si las variables conductuales se relacionaban con alguno de los marcadores inmunitarios y neuroquímicos analizados.

EXPERIMENTO 3: Para analizar los posibles efectos que el desarrollo tumoral y el estrés social pudieran tener sobre la conducta y las distintas variables fisiológicas al cabo de 21 días de desarrollo tumoral, dichos factores se examinaron conjuntamente mediante un ANOVA de dos factores en el cual el tumor (grupo tumor vs. control) y el estrés (grupo estresado vs. no estresado) constituyeron los factores intersujetos. En el caso de aquellas variables con medidas recogidas en varias fases a lo largo del experimento, se llevó a cabo un ANOVA mixto, en el cual los factores intersujeto fueron el tumor (grupo tumor vs. control) y/o el estrés (grupo estresado vs. no estresado), mientras que el factor intrasujeto fue el tiempo (basal vs. final). En el caso de que la interacción entre alguno de estos factores resultara significativa para alguna de las variables, se procedía a analizar las diferencias entre los cuatro grupos experimentales a través de la prueba post hoc HSD de Tukey para comparaciones múltiples. También en este experimento se comprobó si existía alguna relación entre las variables conductuales y fisiológicas analizadas, utilizando para ello correlaciones bivariadas.

Bloque IV

RESULTADOS

EXPERIMENTO 1

Efecto del Desarrollo Tumoral en la Secreción de
Citocinas Proinflamatorias, la Actividad
Monoaminérgica Central y la Conducta Depresiva

Debido a la gran variabilidad observada en cuanto al desarrollo de metástasis pulmonar tras un periodo de 21 días, el grupo de animales experimentales fue dividido en 2 subgrupos: *mucho tumor* (n = 12; área tumoral > 85,73 mm²) y *poco tumor* (n = 22; área tumoral < 85,73 mm²).

A continuación se presentan los efectos del tumor (poco y mucho tumor), sobre las diferentes variables conductuales y fisiológicas analizadas. El apartado de variables conductuales incluye todas aquellas pruebas conductuales realizadas para evaluar la conducta depresiva, mientras que el apartado de variables fisiológicas hace referencia a la actividad inmunitaria tanto central como periférica y a la actividad monoaminérgica central.

1.1. VARIABLES CONDUCTUALES

1.1.1. Consumo de cacahuete en NPFT

Para analizar el efecto que el tumor pudiera tener sobre la anhedonia, se llevó a cabo la prueba de la comida novedosa/apetitosa (NPFT, del inglés *Novel Palatable Food Test*), en la cual se registró el consumo de cacahuete a los 20 días de desarrollo tumoral. El ANOVA realizado mostró sólo un efecto tendencial del factor tumor (F [1,40] = 3,573, p = 0,066), el cual indicaba que los ratones con tumor consumían menor cantidad de cacahuete que los controles. En cuanto a los grupos de desarrollo tumoral, no se observaron diferencias significativas.

1.1.2. Inmovilidad en TST

Por otro lado, se llevó a cabo la prueba de la suspensión de la cola (TST, del inglés *Tail Suspension Test*) el día 14 de desarrollo tumoral. En este caso, el factor tumor resultó ser significativo para la variable inmovilidad ($F [1,41] = 4,471, p = 0,041$); los ratones con tumor mostraron mayor inmovilidad que los controles (Gráfico 1a). Tal y como se muestra en el gráfico 1b, también se observaron diferencias significativas según el desarrollo tumoral, en concreto, los ratones con mayor desarrollo tumoral, mostraron mayor inmovilidad que los controles ($p = 0,014$). No se observaron diferencias significativas entre el grupo de menor desarrollo y el resto de los grupos.

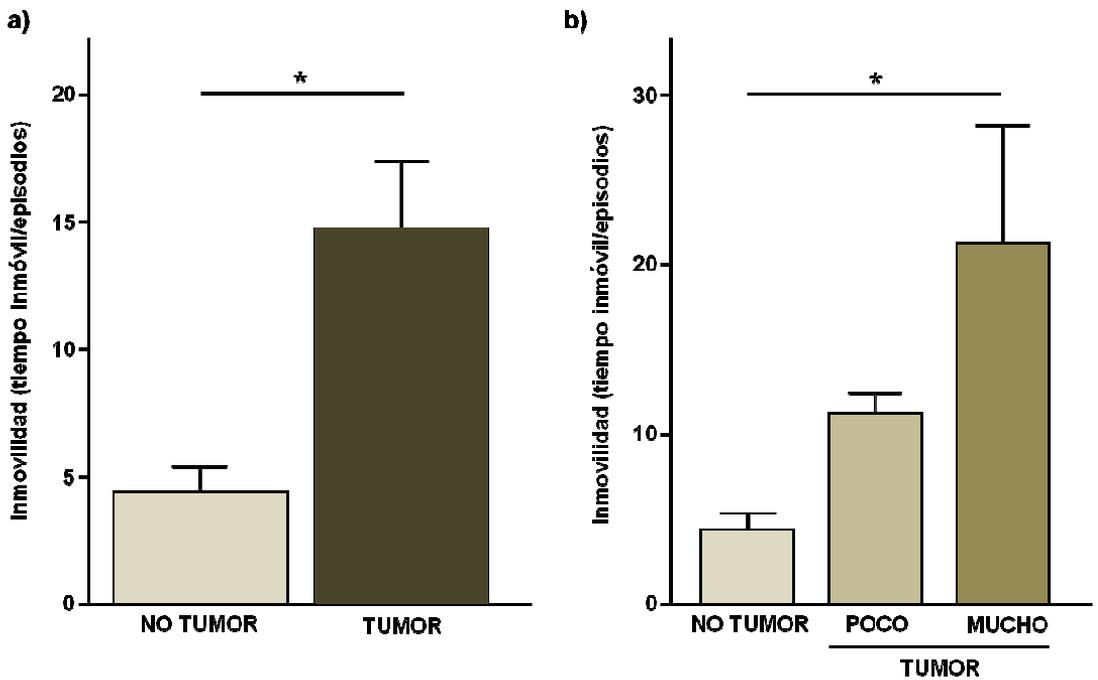


Gráfico 1: Promedio de tiempo inmóvil (\pm E.E.M.) por cada episodio en la prueba de la suspensión de la cola. * $p < 0.05$.

1.2. VARIABLES FISIOLÓGICAS

1.2.1. Peso corporal

No se observaron diferencias significativas en cuanto al peso corporal entre los sujetos de los diferentes grupos, a lo largo del experimento.

1.2.2. Actividad inmunitaria

Para analizar los posibles efectos del tumor sobre la actividad inmunitaria, se analizaron diferentes parámetros, tanto a nivel central como periférico.

No se observaron efectos significativos del factor tumor en la expresión de ARNm de citocinas proinflamatorias en el hipotálamo. En el hipocampo, si se pudo observar un efecto significativo de este mismo factor para la expresión de IL-6 ($F [1,38] = 4,820$, $p = 0,034$) pero no para la de TNF- α e IL-1 β . Los ratones con tumor mostraron una mayor expresión de IL-6 en el hipocampo, en relación a los controles (Gráfico 2c). Además, al comparar la expresión génica de TNF- α en el hipocampo en función el desarrollo tumoral, se observó que los ratones con un gran desarrollo tumoral expresaban mayores niveles de TNF- α con respecto a los de menor desarrollo ($p = 0,018$) y a los controles ($p = 0,05$; Gráfico 2b). Del mismo modo, el grupo con un gran desarrollo tumoral expresó niveles más altos de IL-6 en el hipocampo en relación a los de poco desarrollo ($p = 0,010$) y a los controles ($p = 0,002$; Gráfico 2d).

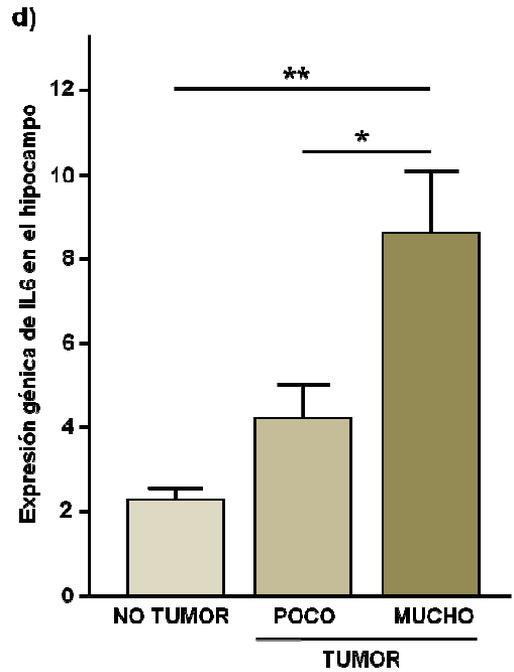
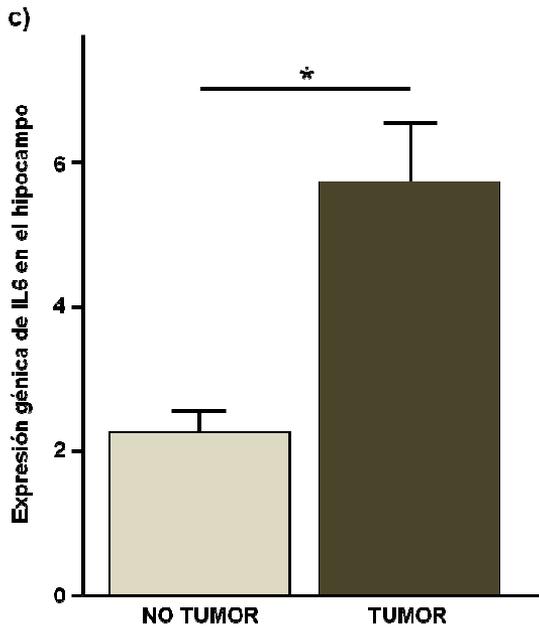
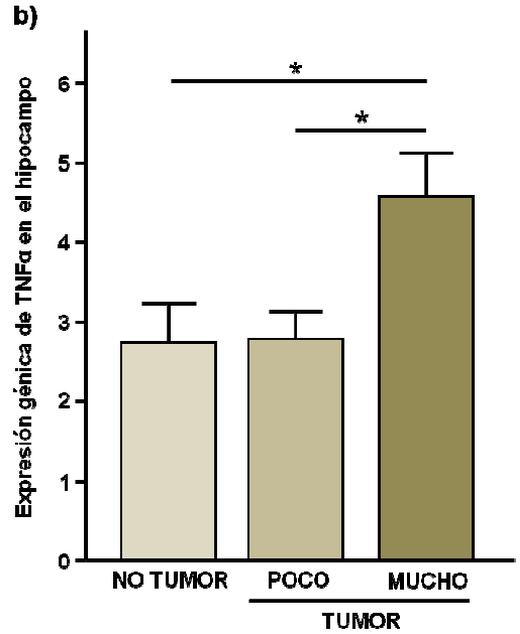
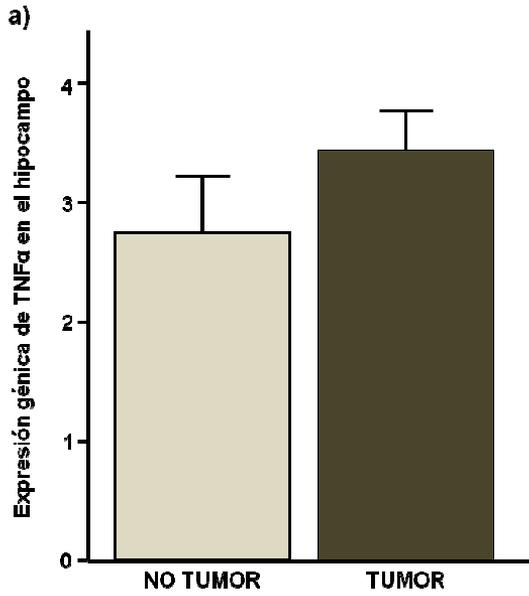


Gráfico 2: Valores medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de TNF- α (a y b) e IL-6 (c y d) en el hipocampo. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

A nivel periférico, no se identificó ningún efecto significativo del factor tumor con respecto a los niveles plasmáticos de TNF- α . En cuanto a los niveles plasmáticos de IL-6, el análisis post hoc (Gráfico 3b) reveló que el grupo de ratones con mayor desarrollo tumoral presentaba mayores niveles de IL-6, en relación a los sujetos con menor desarrollo tumoral ($p = 0,003$) y a los propios controles ($p = 0,041$).

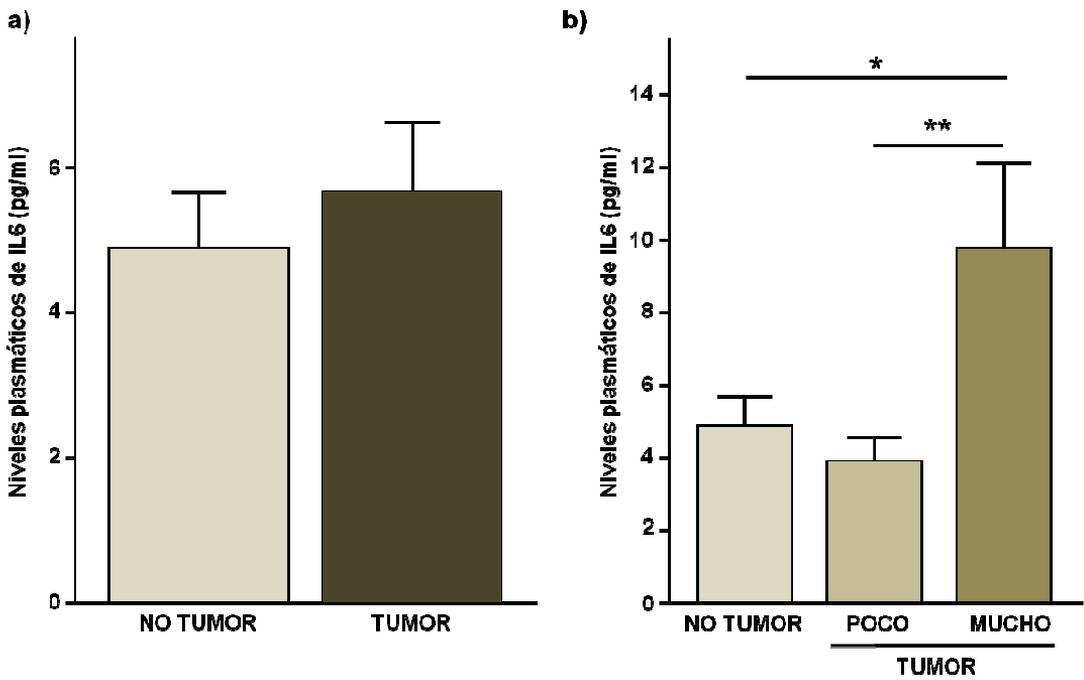


Gráfico 3 Niveles plasmáticos medios (\pm E.E.M.) de IL-6 (pg/ml). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

1.2.3. Actividad monoaminérgica central

El análisis de la actividad monoaminérgica central reveló un efecto significativo del factor tumor para los niveles de DOPAC ($F [1,41] = 5,305$, $p = 0,026$; Gráfico 4a) y DA ($F [1,41] = 4,825$, $p = 0,034$; Gráfico 4c) en el cuerpo estriado. Los ratones con tumor mostraron menores niveles de dicha monoamina así como de su metabolito, en relación a los controles. No se observaron diferencias significativas en cuanto a los niveles de DOPAC y DA en el cuerpo estriado entre los distintos grupos de desarrollo tumoral.

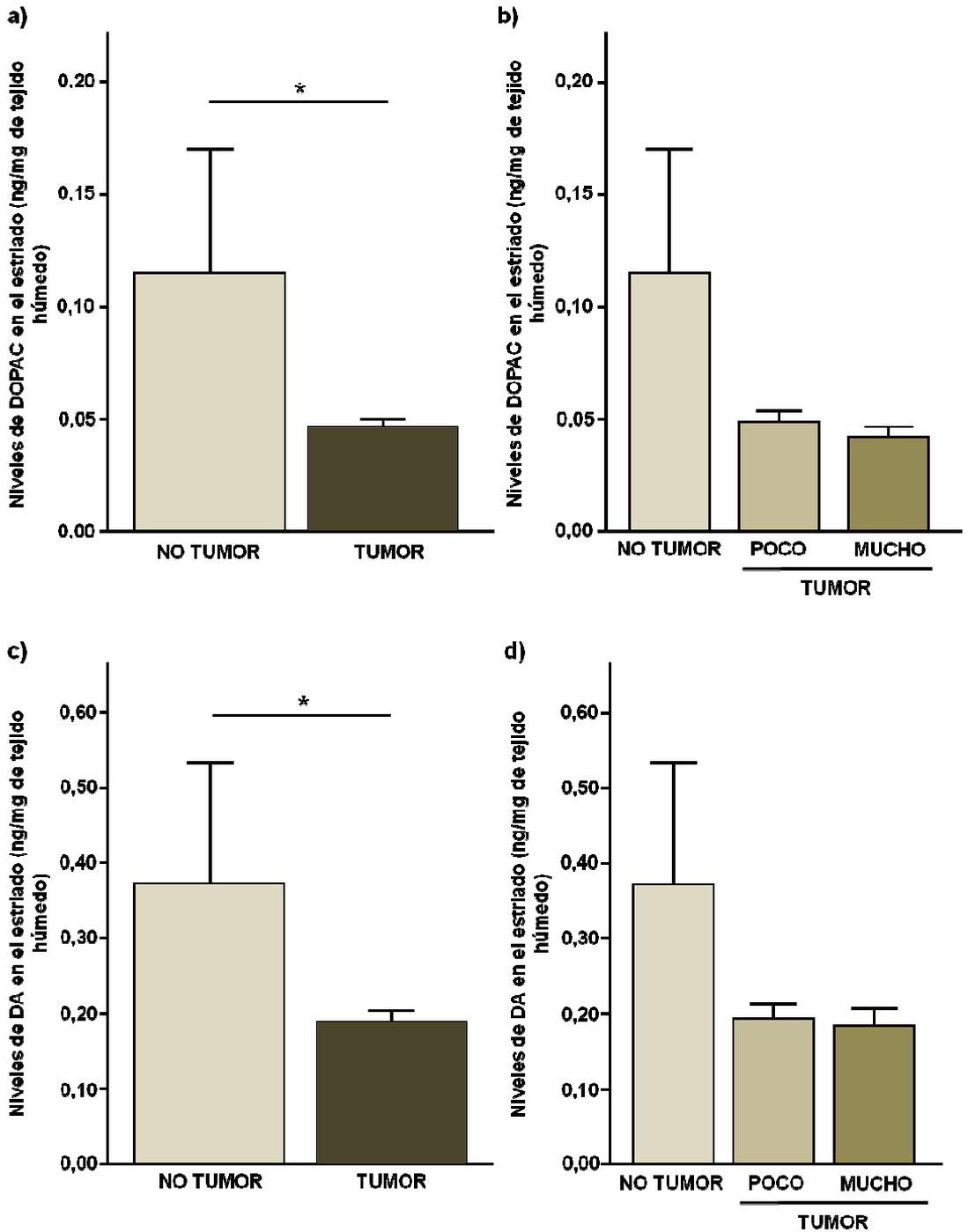


Gráfico 4: Niveles medios (± E.E.M.) de DOPAC (a y b) y DA (c y d) en el estriado (ng/mg de tejido húmedo). * p < 0.05.

En este mismo sentido, dicho análisis reveló un efecto significativo del factor tumor para los niveles de 5-HT en el cuerpo estriado ($F [1,41] = 8,746, p = 0,005$). También en este caso, fueron los ratones con tumor los que mostraron menores niveles de esta monoamina en comparación con los controles (Gráfico 5a). Además, se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos de desarrollo tumoral, siendo los sujetos con un gran desarrollo tumoral los que presentaron menores niveles de 5-HT en el cuerpo estriado, con respecto a los controles ($p = 0,010$; Gráfico 5b).

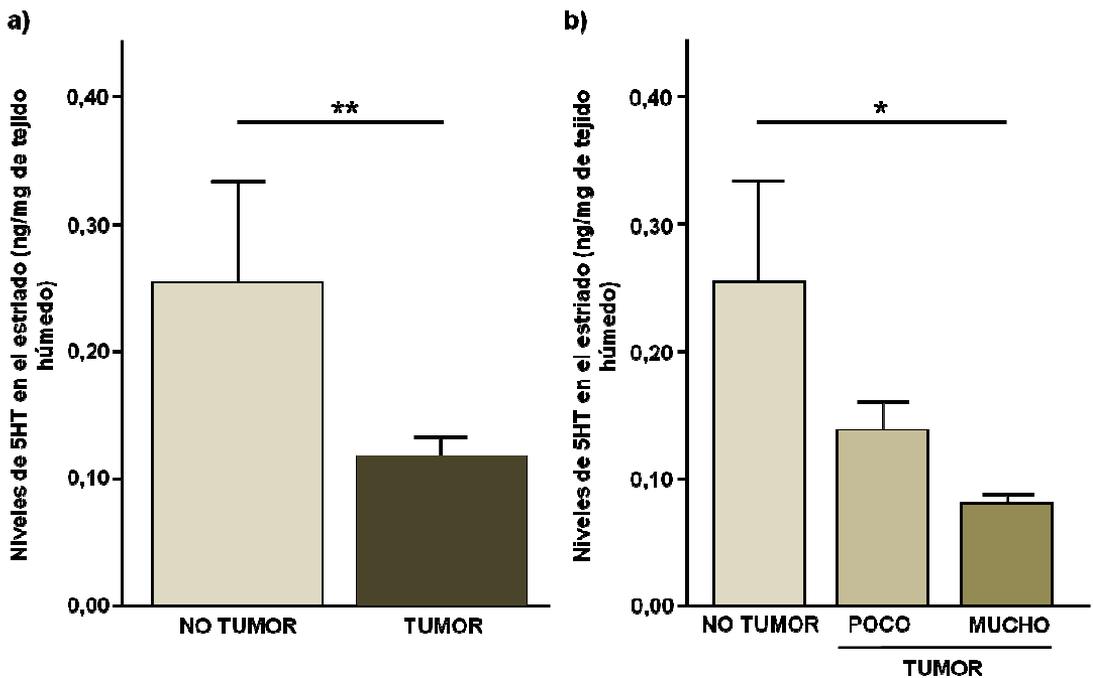


Gráfico 5: Niveles medios (\pm E.E.M.) de 5HT en el estriado (ng/mg de tejido húmedo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Nuevamente, el factor tumor resultó ser significativo para los niveles de 5-HIAA ($F [1,41] = 5,268, p = 0,027$) y la ratio 5-HIAA/5-HT ($F [1,41] = 12,224, p = 0,001$) en la corteza prefrontal. Los ratones con tumor presentaron menores niveles de 5HIAA así como una baja ratio 5HIAA/5HT en relación a los controles (Gráficos 6a y 6c). También se observaron diferencias significativas en los niveles de 5-HIAA y la ratio 5-HIAA/5-HT en la corteza prefrontal, en función del desarrollo tumoral. Los análisis post hoc pusieron de manifiesto que el grupo control presentaba mayores niveles de 5-HIAA que el grupo de mayor desarrollo tumoral ($p = 0,014$; Gráfico 6b). Además, el grupo control mostró una elevada ratio 5-HIAA/5-HT con respecto a los grupos tanto de menor ($p = 0,014$) como de mayor ($p = 0,004$) desarrollo tumoral (Gráfico 6d).

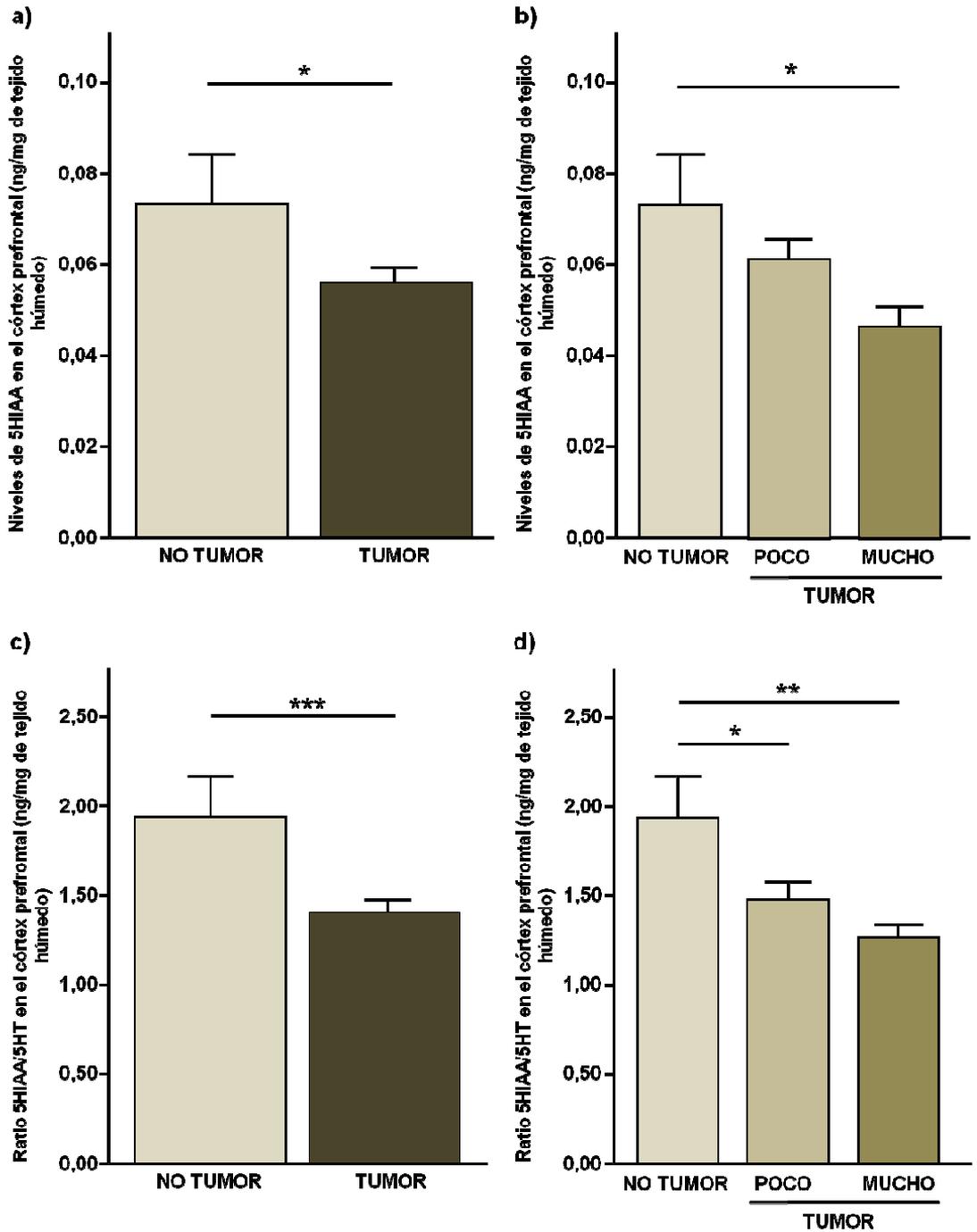


Gráfico 6: Niveles medios (\pm E.E.M.) de 5HIAA (a y b) (ng/mg de tejido húmedo) e índice de la actividad serotoninérgica (ratio 5HIAA/5HT) (c y d) en la corteza prefrontal. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

EXPERIMENTO 2

Desarrollo Tumoral, Inflamación en el SNC y
Conducta Depresiva: Actividad de los Enzimas
IDO y PAH

A continuación se presentan los efectos tanto del tumor (Factor Tumor) como del tiempo (Factor Tiempo), sobre diferentes variables conductuales y fisiológicas. El apartado de variables conductuales incluye todas aquellas pruebas conductuales realizadas para evaluar la conducta depresiva, mientras que el apartado de variables fisiológicas hace referencia a la actividad inmunitaria y a la actividad de los enzimas IDO y PAH.

2.1. VARIABLES CONDUCTUALES

2.1.1. Inmovilidad en TST

Para analizar el efecto que el tumor pudiera ejercer sobre la conducta, se llevó a cabo el TST el día previo al sacrificio de cada grupo (día 6 y 20, respectivamente) y se registró el tiempo que los animales permanecieron inmóviles. El ANOVA realizado desveló un efecto significativo del factor tumor ($F [1,52] = 6,936$, $p = 0,011$; Gráfico 7), indicando que los ratones con tumor permanecieron inmóviles durante más tiempo que los controles. El factor tiempo no resultó ser significativo.

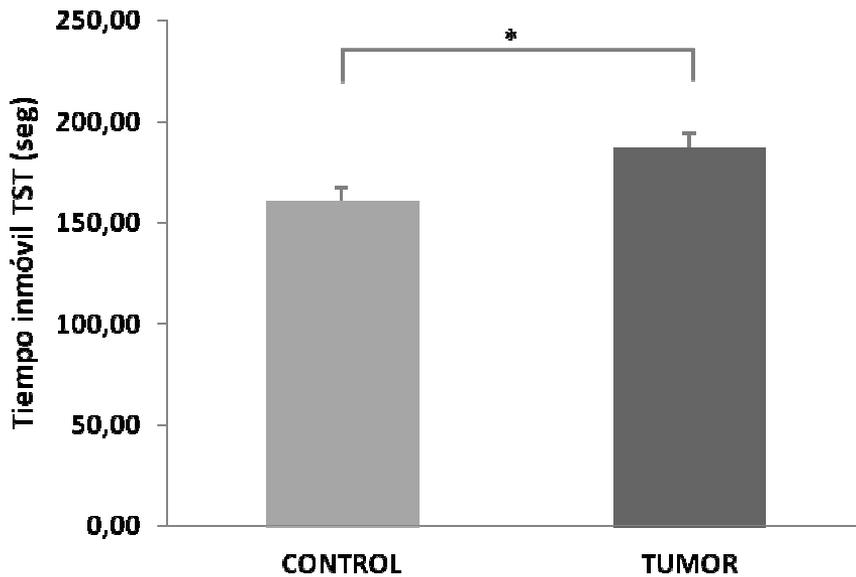


Gráfico 7: Promedio de tiempo inmóvil (\pm E.E.M.) en segundos, en la prueba de la suspensión de la cola. Se representa el grupo control frente al grupo de 7 días de desarrollo tumoral y al grupo de 21 días de desarrollo tumoral. * $p < 0.05$.

2.1.2. Inmovilidad y natación en FST

Por otro lado, se llevó a cabo la prueba de natación forzada (FST) los días 7 y 21 respectivamente, registrándose en este caso el tiempo de inmovilidad y la distancia de natación. El factor tumor resultó ser significativo tanto para la variable inmovilidad ($F [1,52] = 40,669$, $p = 0,000$), como para la natación ($F [1,52] = 254,819$, $p = 0,000$). Tal y como se muestra en los gráficos 8a y 8c, los ratones con tumor permanecieron inmóviles durante más tiempo y recorrieron menor distancia en comparación con los sujetos control. El factor tiempo resultó ser significativo solo para la variable inmovilidad ($F [1,52] = 4,150$, $p = 0,047$; Gráfico 8b), poniendo de

manifiesto que los sujetos evaluados a los 7 días dedicaron más tiempo a la conducta de inmovilidad que los sujetos evaluados a los 21 días.

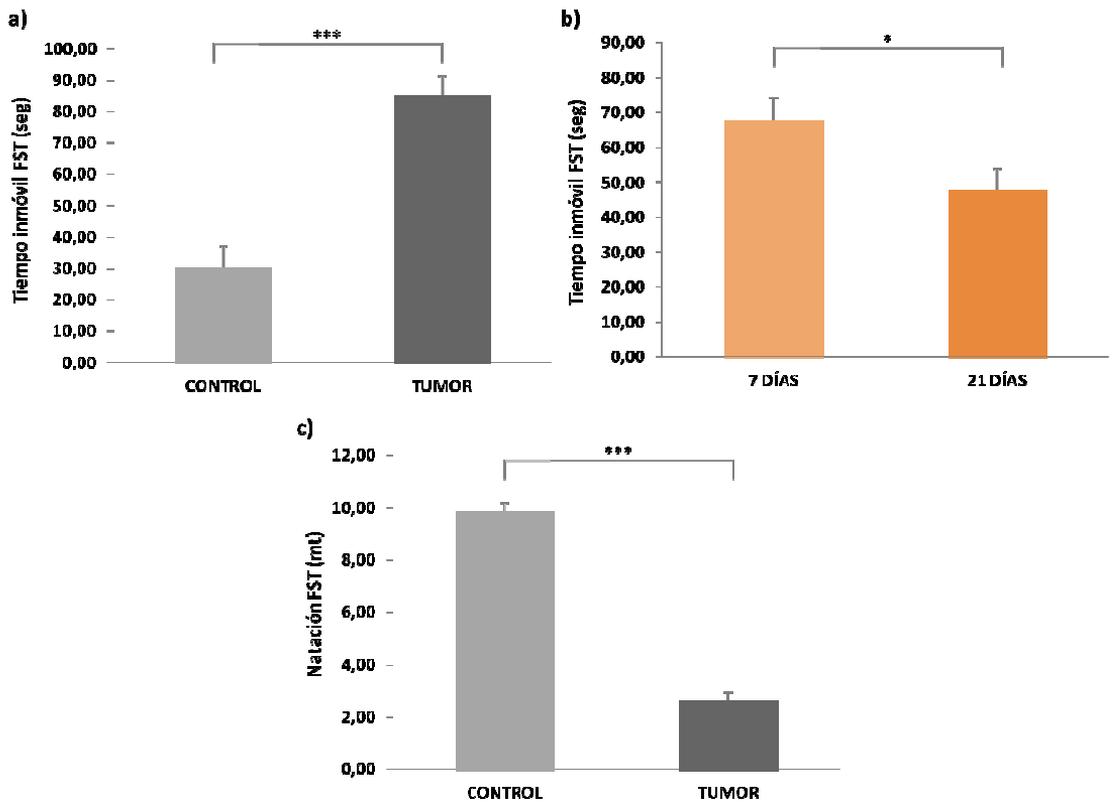


Gráfico 8: Promedio de tiempo inmóvil (\pm E.E.M.) en segundos, en la prueba de natación forzada (a y b). Distancia media de natación (\pm E.E.M.) en la prueba de natación forzada (c). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

2.1.3. Inmovilidad y distancia recorrida en OFT

Además, para analizar el posible efecto del tumor sobre la conducta locomotora, se realizó la prueba de campo abierto (OFT), en la cual se registró el tiempo de inmovilidad y la distancia recorrida por cada grupo los días 6 y 20, respectivamente.

En este caso, el factor tumor resultó ser significativo tanto para la variable inmovilidad ($F [1,52] = 8,009$, $p = 0,007$; Gráfico 9a), como para la distancia recorrida ($F [1,52] = 53,222$, $p = 0,000$; Gráfico 9b). Los ratones con tumor mostraron mayor inmovilidad y menor distancia recorrida que los controles. No se observaron efectos significativos del factor tiempo en ninguna de las variables analizadas en el OFT.

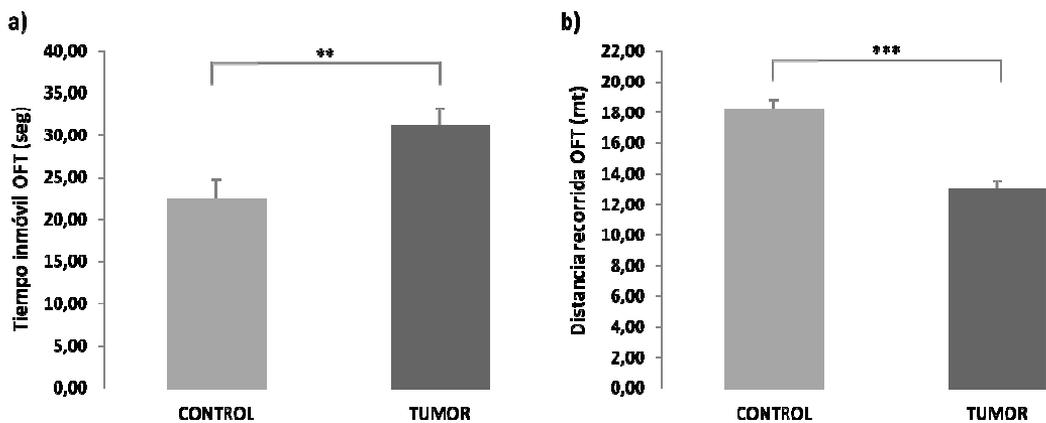


Gráfico 9: Promedio de tiempo inmóvil (\pm E.E.M.) en segundos, en la prueba de campo abierto **(a)**. Distancia media recorrida (\pm E.E.M.) en la prueba de campo abierto **(b)**. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

2.2. VARIABLES FISIOLÓGICAS

2.2.1. Peso del bazo

El ANOVA realizado puso de manifiesto un efecto significativo y exclusivo del factor tiempo ($F [1,52] = 15,583$, $p < 0,000$). Como se puede observar en el gráfico 10, los

sujetos de 21 días, tanto inoculados como no inoculados, mostraron mayor peso del bazo que los de 7 días.

No se observaron diferencias significativas en cuanto al factor tumor en esta variable.

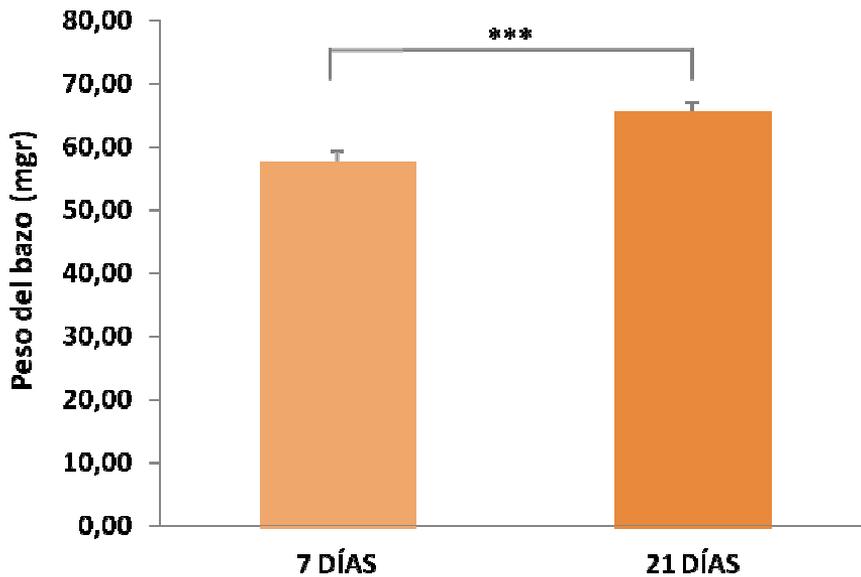


Gráfico 10: Peso medio del bazo (\pm E.E.M.) en miligramos. *** $p < 0.001$.

2.2.2. Expresión génica de citocinas proinflamatorias en cerebro: IL6 e IFN γ

Para estudiar los posibles efectos del tumor sobre la actividad inmunitaria, se analizó la expresión génica de varias citocinas proinflamatorias a nivel central. El ANOVA realizado ha indicado un efecto significativo del factor tumor en la expresión de ARNm de IL-6 ($F [1,52] = 47,143$, $p = 0,000$) e IFN- γ ($F [1,52] = 12,505$, p

= 0,001). Los ratones con tumor mostraron una mayor expresión tanto de IL-6 como de IFN- γ en cerebro, con respecto a los controles (Gráficos. 11a y 11b, respectivamente). Además, en el caso del IFN- γ , el factor tiempo también ha resultado ser significativo ($F [1,52] = 39,233$, $p = 0,000$), poniendo de manifiesto que el grupo de 7 días expresaba niveles significativamente más altos de esta citocina, en relación al grupo de 21 días (tanto inoculados como no inoculados) (Gráfico 11c).

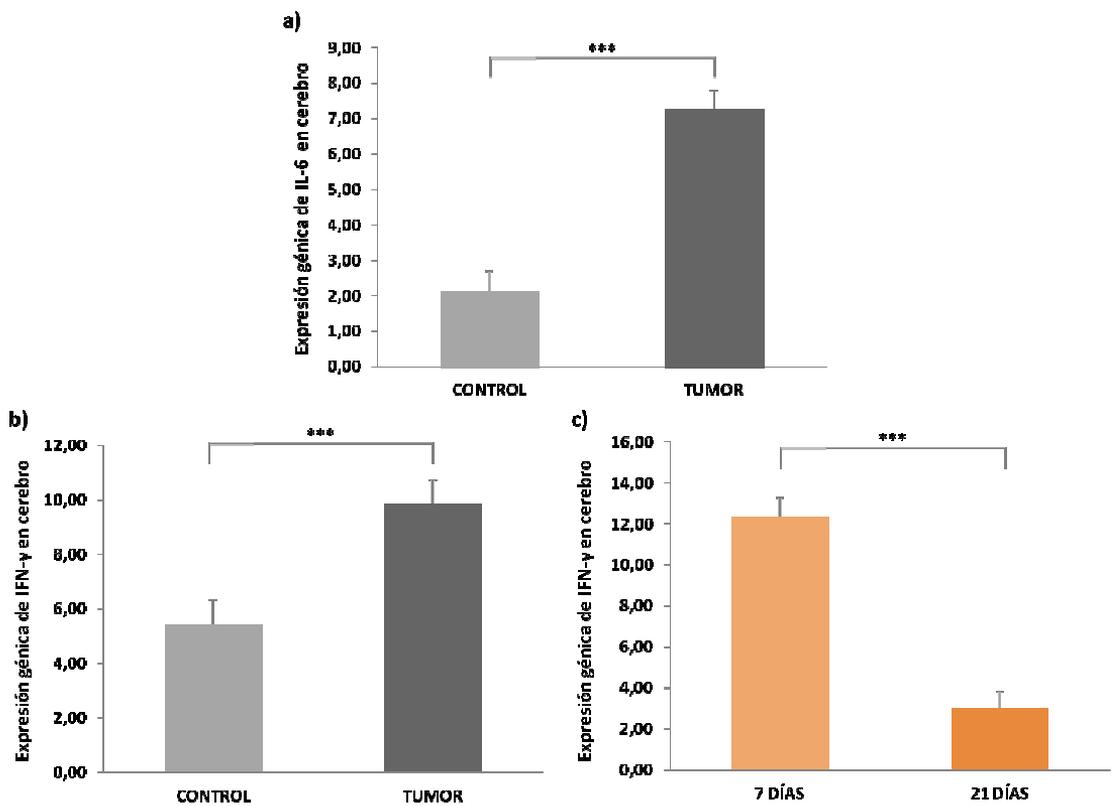


Gráfico 11: Valores medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de IL-6 en cerebro **(a)**. Valores medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de IFN- γ en cerebro **(b y c)**. *** $p < 0.001$.

2.2.3. Expresión génica de citocinas proinflamatorias en cerebro: TNF α e IL1 β

En este mismo sentido, también se ha observado un efecto significativo del factor tumor en la expresión de ARNm de IL-1 β (F [1,52] = 81,461, p = 0,000) y TNF- α (F [1,52] = 42,238, p = 0,000). Los ratones con tumor mostraron una mayor expresión de ambas citocinas proinflamatorias en cerebro, en comparación a los controles (Gráficos. 12a y 12c, respectivamente). A pesar de que el factor tiempo no resultó ser significativo para ninguna de estas variables, en ambos casos se ha podido observar una interacción significativa entre el factor tumor y el factor tiempo. Así, en el caso del TNF- α (F [1,52] = 30,243, p = 0,000), los sujetos con un desarrollo tumoral de 21 días presentaban niveles de expresión de TNF- α significativamente más elevados que los sujetos con un desarrollo tumoral de 7 días (p = 0,000). Por otro lado, a los 21 días se observaron diferencias significativas entre los ratones con tumor y los controles (p = 0,000), mientras que a los 7 días no se encontraron diferencias significativas. En cuanto a la IL-1 β (F [1,52] = 4,920, p = 0,031), los sujetos con desarrollo tumoral de 21 días presentaban así mismo, niveles de expresión de IL-1 β significativamente más elevados que los sujetos con un desarrollo tumoral de 7 días (p = 0,030). Además, en este caso se han observado diferencias significativas entre los grupos de tumor y sus respectivos controles tanto a los 7 (p = 0,000) como a los 21 días (p = 0,000).

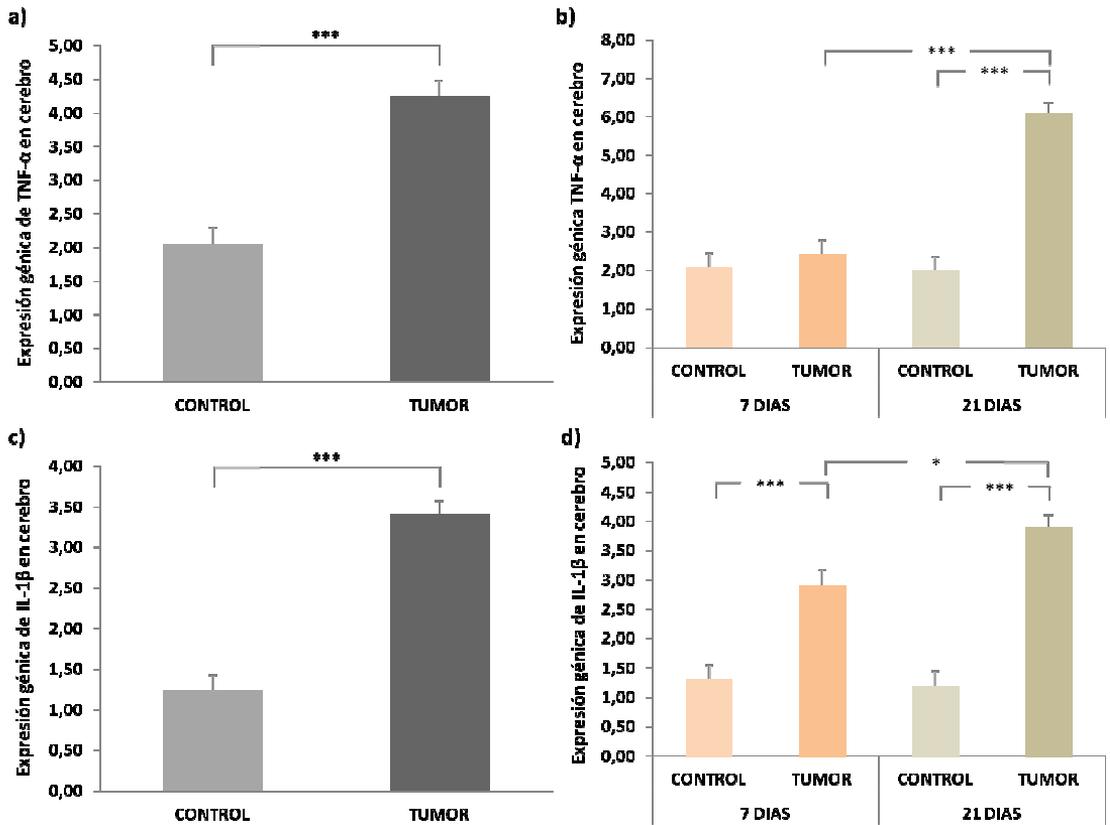


Gráfico 12: Valores medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de TNF- α en cerebro (**a y b**). Valores medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de IL-1 β en cerebro (**c y d**). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

2.2.4. Expresión génica de citocinas anti-inflamatorias en cerebro: IL4 e IL10

El análisis de la expresión génica de citocinas antiinflamatorias a nivel central, reveló un efecto significativo del factor tumor tanto para la IL4 ($F [1,52] = 33,497$, $p = 0,000$) como para la IL10 ($F [1,52] = 42,911$, $p = 0,000$). Al igual que los resultados obtenidos en cuanto a expresión de citocinas proinflamatorias, en este caso es el

grupo de ratones con tumor el que ha expresado niveles más elevados tanto de IL4 como de IL10 en cerebro en relación a los controles (Gráfico. 13a y 13b, respectivamente). El factor tiempo no ha resultado ser significativo para ninguna de estas variables.

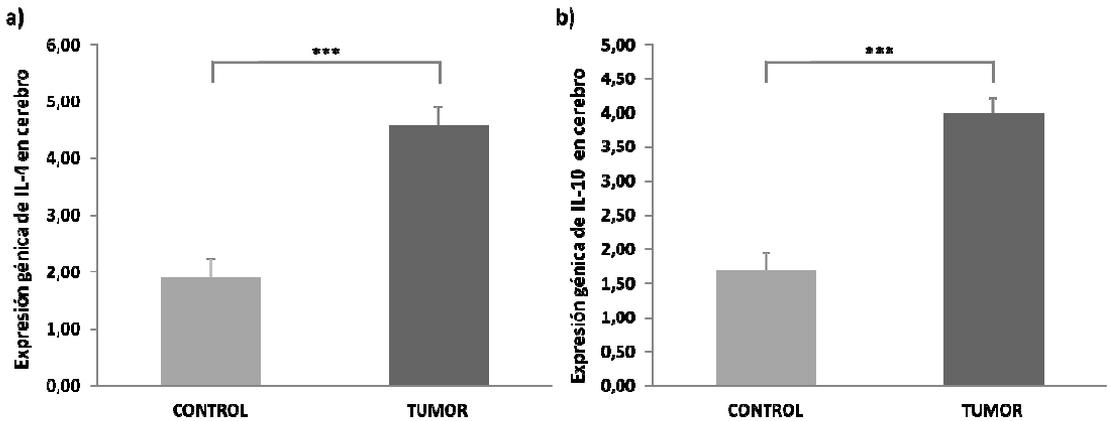


Gráfico 13: Valores medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de IL-4 en cerebro (a). Valores medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de IL-10 en cerebro (b). *** $p < 0.001$.

2.2.5. Balance inflamatorio a nivel central: Ratio IL6/IL10

Respecto al balance entre marcadores pro y antiinflamatorios, se ha observado un efecto significativo del factor tumor ($F [1,52] = 5,188$, $p = 0,027$), pero no del factor tiempo. Tal y como se puede observar en el gráfico 14, el grupo con tumor muestra una mayor ratio IL6/IL10 en cerebro en relación al grupo control.

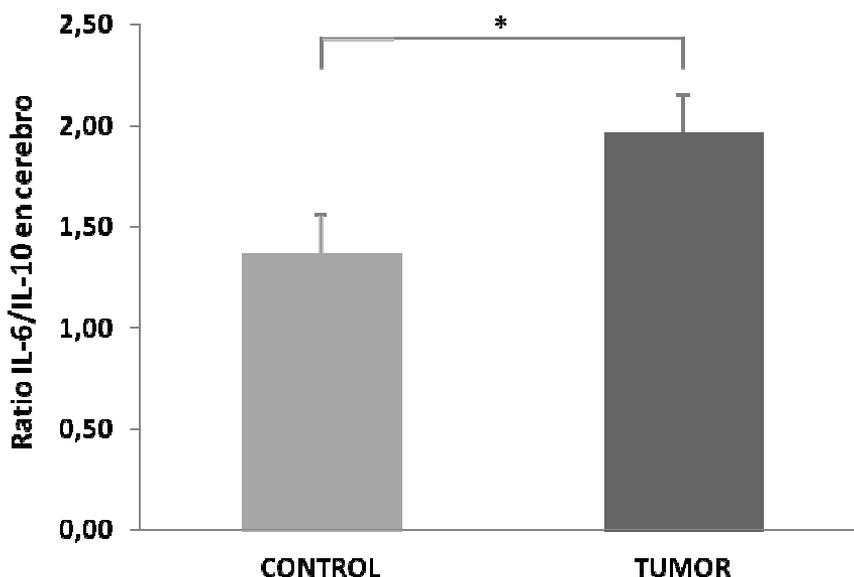


Gráfico 14: Índice de la actividad inflamatoria en cerebro (ratio IL-6/IL-10). * $p < 0.05$.

2.2.6. Expresión génica del enzimaIDO en cerebro

Para analizar el posible efecto del tumor y del tiempo sobre el enzimaIDO, se analizó la expresión génica de dicha enzima a nivel central. Se ha podido observar un efecto significativo tanto del factor tumor ($F [1,52] = 32,046$, $p = 0,000$; Gráfico. 15), como del factor tiempo ($F [1,52] = 6,237$, $p = 0,016$; Gráfico. 15). Por un lado, los sujetos con tumor presentaban una mayor expresión de dicha enzima en comparación a los controles y por otro, el grupo de 7 días mostraba niveles de expresión deIDO significativamente más elevados que el grupo de 21 días (tanto inoculados como no inoculados).

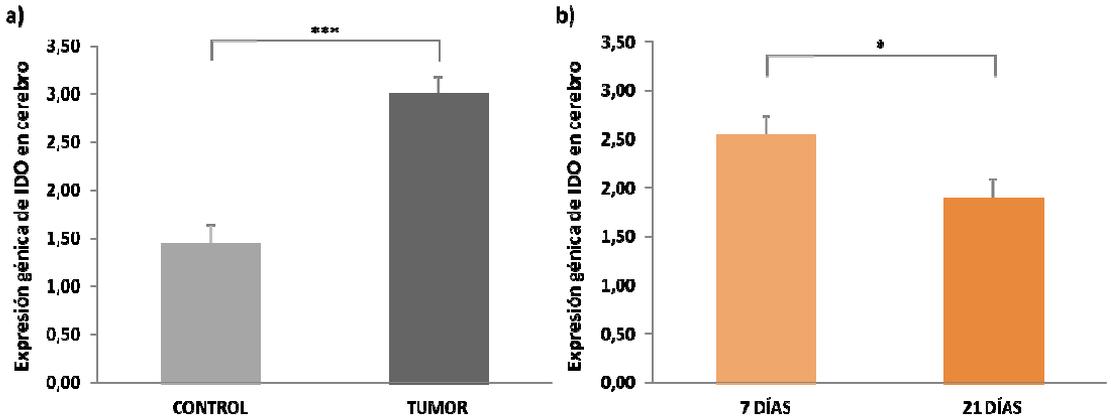


Gráfico 15: Valores medios (± E.E.M.) de expresión génica del enzima IDO en cerebro. * p < 0.05 *** p < 0.001.

2.2.7. Actividad periférica del enzima IDO: Niveles plasmáticos de Kyn y Trp y ratio Kyn/Trp

Con el objetivo de estudiar el efecto que el tumor y el tiempo pudieran tener en la actividad periférica del enzima IDO, se han analizado los niveles plasmáticos de quinurenina y triptófano, así como la ratio Kyn/Trp. Se ha observado un efecto significativo del factor tumor sobre los niveles plasmáticos de Kyn ($F [1,51] = 10,134$, $p = 0,002$), Trp ($F [1,51] = 86,533$, $p = 0,000$) y la ratio Kyn/Trp ($F [1,51] = 8,377$, $p = 0,006$). Como se puede observar en el gráfico 16, los sujetos con tumor presentaban menores niveles de Kyn y Trp así como una menor ratio Kyn/Trp. A pesar de que el factor tiempo no ha tenido un efecto significativo en ninguna de estas variables, la interacción entre el factor tumor y el factor tiempo si ha resultado ser significativa para los niveles plasmáticos de Trp ($F [1,51] = 12,751$, $p = 0,001$). Así, teniendo en cuenta los 4 grupos experimentales, observamos que tanto a los 7 ($p = 0,001$) como a los 21 días ($p = 0,000$), los sujetos control muestran

mayores niveles de Trp en plasma en comparación a sus respectivos controles. Así mismo, podemos observar que los controles de 21 días presentan mayores niveles de Trp que los controles de 7 días ($p = 0,006$).

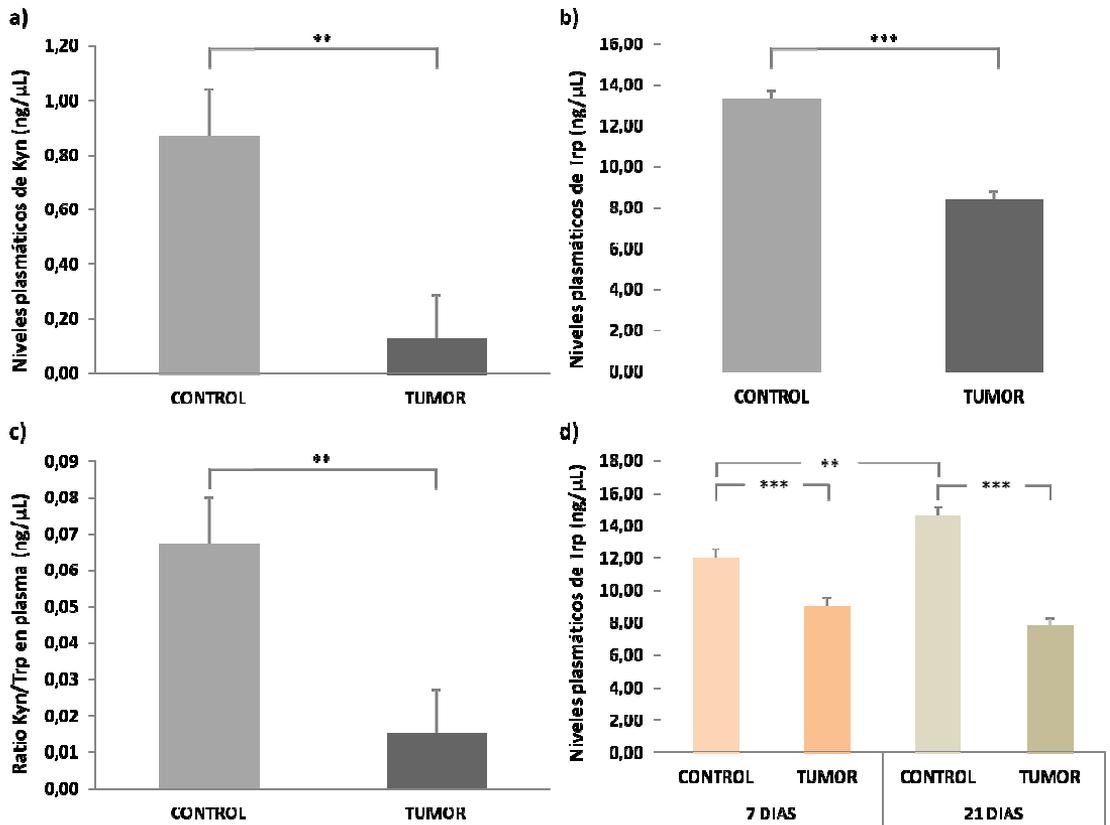


Gráfico 16: Niveles plasmáticos medios (\pm E.E.M.) de quinurenina (ng/ μ l) **(a)**. Niveles plasmáticos medios (\pm E.E.M.) de triptófano (ng/ μ l) **(b y d)**. Índice de actividad periférica del enzimaIDO (ratio Kyn/Trp) **(c)**. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

2.2.8. Actividad periférica del enzima PAH: Niveles plasmáticos de Tyr y ratio Phe/Tyr

Por último, se ha analizado el efecto del factor tumor y el factor tiempo en los niveles plasmáticos de tirosina así como en la ratio Phe/Tyr, medida indirecta de la actividad del enzima PAH. Se ha podido observar un efecto significativo del factor tumor tanto para los niveles plasmáticos de tirosina ($F [1,51] = 13,726$, $p = 0,001$), como para la ratio Phe/Tyr ($F [1,51] = 9,054$, $p = 0,004$). En este caso, los sujetos con tumor mostraron menores niveles de Tyr en plasma y por tanto, una mayor ratio Phe/Tyr en relación a los controles. No se han encontrado diferencias significativas en función del factor tiempo, pero si se ha encontrado una interacción significativa entre ambos factores para los niveles plasmáticos de Tyr ($F [1,51] = 10,626$, $p = 0,002$). Solo se aprecian diferencias significativas entre el grupo control y tumor a los 21 días ($p = 0,000$). Por otro lado, los controles de 21 días presentan mayores niveles plasmáticos de Tyr que los controles de 7 días ($p = 0,035$) (Gráfico 17).

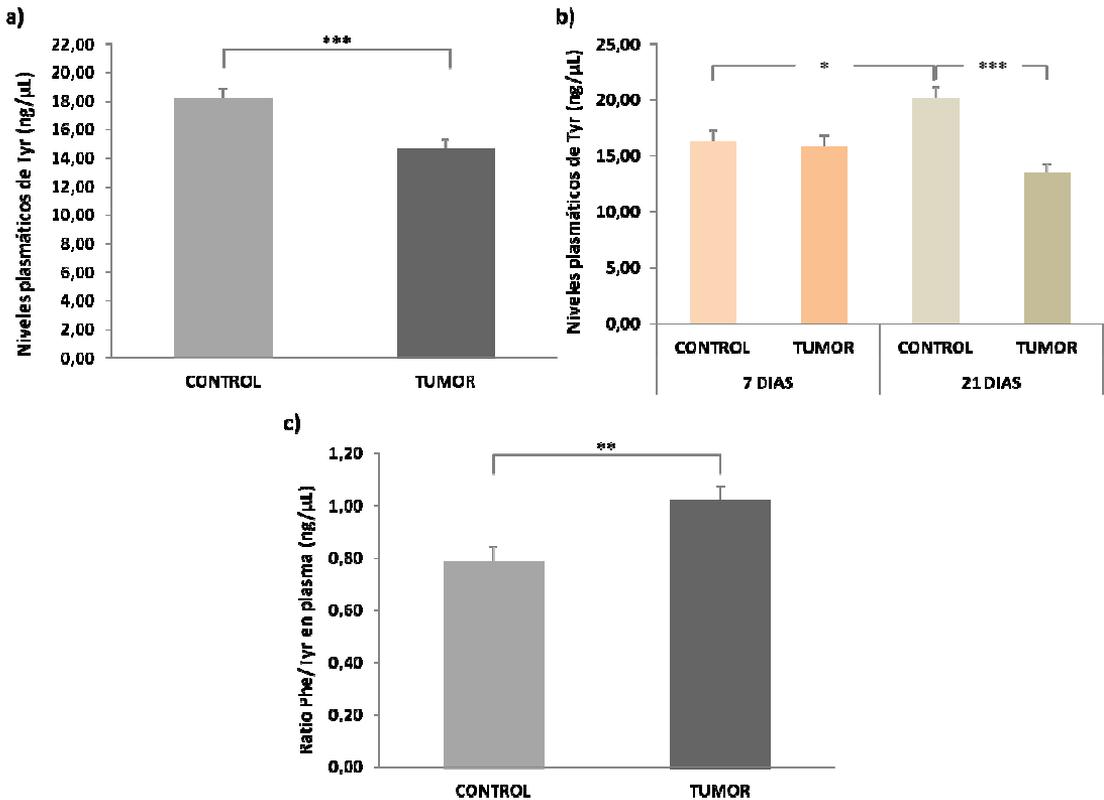


Gráfico 17: Niveles plasmáticos medios (\pm E.E.M.) de tirosina (ng/ μ l) (a y b). Índice de actividad del enzima PAH (ratio Phe/Tyr) (c). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

2.3. CORRELACIONES ENTRE VARIABLES CONDUCTUALES Y FISIOLÓGICAS

El estudio de las correlaciones entre variables conductuales y fisiológicas (Tabla 7) mostró que el tiempo dedicado a la conducta de inmovilidad en el TST correlacionaba positivamente con la expresión de TNF- α en cerebro ($r = 0,323$, $p = 0,015$). En este mismo sentido, el tiempo dedicado a la conducta de inmovilidad en el FST correlacionaba positivamente con la expresión de IL-6 ($r = 0,473$, $p = 0,000$), IFN- γ ($r = 0,340$, $p = 0,010$), TNF- α ($r = 0,299$, $p = 0,025$), IL-1 β ($r = 0,522$, $p = 0,000$),

IL-4 ($r = 0.550$, $p = 0.000$), IL-10 ($r = 0.663$, $p = 0.000$), así como con la expresión del enzima IDO en cerebro ($r = 0.411$, $p = 0.002$) y la ratio Phe/Tyr en plasma ($r = 0.277$, $p = 0.039$). Además, esta misma variable correlacionaba negativamente con la ratio Kyn/Trp en plasma ($r = -0.298$, $p = 0.026$). También se encontró una relación positiva entre el tiempo dedicado a la conducta de inmovilidad en el OFT y la expresión de IL-6 ($r = 0.413$, $p = 0.002$), IL-1 β ($r = 0.389$, $p = 0.003$), IL-4 ($r = 0.506$, $p = 0.000$), IL-10 ($r = 0.320$, $p = 0.016$), así como con la ratio IL6/IL10 ($r = 0.295$, $p = 0.027$) y la expresión del enzima IDO en cerebro ($r = 0.306$, $p = 0.022$). Por el contrario, la conducta locomotora reflejada en la distancia recorrida en el OFT, correlacionaba negativamente con la expresión de IL-6 ($r = -0.514$, $p = 0.000$), TNF- α ($r = -0.374$, $p = 0.005$), IL-1 β ($r = -0.554$, $p = 0.000$), IL-4 ($r = -0.452$, $p = 0.000$), IL-10 ($r = -0.472$, $p = 0.000$), así como con la ratio IL6/IL10 ($r = -0.295$, $p = 0.028$), la expresión del enzima IDO en cerebro ($r = -0.429$, $p = 0.001$) y la ratio Phe/Tyr en plasma ($r = -0.319$, $p = 0.017$). Así mismo, también se observó que la conducta de natación en el FST correlacionaba negativamente con la expresión de IL-6 ($r = -0.610$, $p = 0.000$), IFN- γ ($r = -0.311$, $p = 0.019$), TNF- α ($r = -0.516$, $p = 0.000$), IL-1 β ($r = -0.725$, $p = 0.000$), IL-4 ($r = -0.571$, $p = 0.000$), IL-10 ($r = -0.674$, $p = 0.000$), así como con la expresión del enzima IDO en cerebro ($r = -0.539$, $p = 0.000$) y la ratio Phe/Tyr en plasma ($r = -0.374$, $p = 0.005$). Además, esta misma variable correlacionaba positivamente con la ratio Kyn/Trp en plasma ($r = 0.358$, $p = 0.007$).

Tabla 7: Correlaciones bivariadas entre las variables conductuales y fisiológicas del experimento 2 que resultaron significativas

	Inmovilidad (TST)	Inmovilidad (FST)	Natación (FST)	Inmovilidad (OFT)	Locomoción (OFT)	IL-6	IFN- γ	TNF- α	IL-1 β	IL-4	IL-10	Ratio IL6/IL10	IDO	Ratio Kyn/Trp	Ratio Phe/Tyr
Inmovilidad (TST)	1	,134	-,261	,298*	-,314*	,255	-,206	,323*	,204	,221	,187	,143	,171	-,253	,171
Inmovilidad (FST)	,134	1	-,731**	,295*	-,522**	,473**	,340*	,299*	,522**	,550**	,663**	,107	,411**	-,298*	,277*
Natación (FST)	-,261	-,731**	1	-,233	,656**	-,610**	-,311*	-,516**	-,725**	-,571**	-,674**	-,198	-,539**	,358**	-,374**
Inmovilidad (OFT)	,298*	,295*	-,233	1	-,503**	,413**	,100	,229	,389**	,506**	,320*	,295*	,306*	-,194	,104
Locomoción (OFT)	-,314*	-,522**	,656**	-,503**	1	-,514**	-,248	-,374**	-,554**	-,452**	-,472**	-,295*	-,429**	,240	-,319*
IL-6	,255	,473**	-,610**	,413**	-,514**	1	,188	,479**	,744**	,610**	,561**	,758**	,741**	-,267*	,160
IFN- γ	-,206	,340*	-,311*	,100	-,248	,188	1	-,204	,321*	,343**	,308*	,009	,463**	-,078	,090
TNF- α	,323*	,299*	-,516**	,229	-,374**	,479**	-,204	1	,544**	,343**	,514**	,171	,117	-,210	,303*
IL-1 β	,204	,522**	-,725**	,389**	-,554**	,744**	,321*	,544**	1	,646**	,764**	,358**	,696**	-,280*	,185
IL-4	,221	,550**	-,571**	,506**	-,452**	,610**	,343**	,343**	,646**	1	,558**	,302*	,567**	-,198	,100
IL-10	,187	,663**	-,674**	,320*	-,472**	,561**	,308*	,514**	,764**	,558**	1	-,040	,502**	-,221	,234
Ratio IL6/IL10	,143	,107	-,198	,295*	-,295*	,758**	,009	,171	,358**	,302*	-,040	1	,505**	-,156	-,027
IDO	,171	,411**	-,539**	,306*	-,429**	,741**	,463**	,117	,696**	,567**	,502**	,505**	1	-,259	,048
Ratio Kyn/Trp	-,253	-,298*	,358**	-,194	,240	-,267*	-,078	-,210	-,280*	-,198	-,221	-,156	-,259	1	-,764**
Ratio Phe/Tyr	,171	,277*	-,374**	,104	-,319*	,160	,090	,303*	,185	,100	,234	-,027	,048	-,764**	1

* p < 0.05; ** p < 0.01

EXPERIMENTO 3

Desarrollo tumoral y Conducta Depresiva: Efecto
del Estrés Social

A continuación se presentan los efectos del tumor (Factor Tumor) y, del estrés social (Factor Estrés), así como del tiempo, en el caso de medidas recogidas varias veces a lo largo del experimento, sobre la conducta depresiva, la actividad inmunitaria, la actividad de los enzimas IDO y PAH y los niveles de corticosterona en plasma.

3.1. VARIABLES CONDUCTUALES

3.1.1. Inmovilidad y distancia recorrida en OFT

Para analizar el efecto que el tumor y el estrés pudieran tener en la conducta de tipo depresivo, se llevó a cabo la prueba de campo abierto (OFT) el último día del experimento, en la cual se registró el tiempo de inmovilidad y la distancia recorrida. El ANOVA realizado ha mostrado un efecto significativo del factor tumor tanto para inmovilidad ($F [1,48] = 27,219, p = 0,000$), como para la distancia recorrida ($F [1,48] = 34,663, p = 0,000$). Como se puede observar en el gráfico 18, los sujetos con tumor permanecen inmóviles durante más tiempo y recorren menor distancia en relación a los controles. El factor estrés no resultó significativo para ninguna de las variables analizadas en dicha prueba conductual.

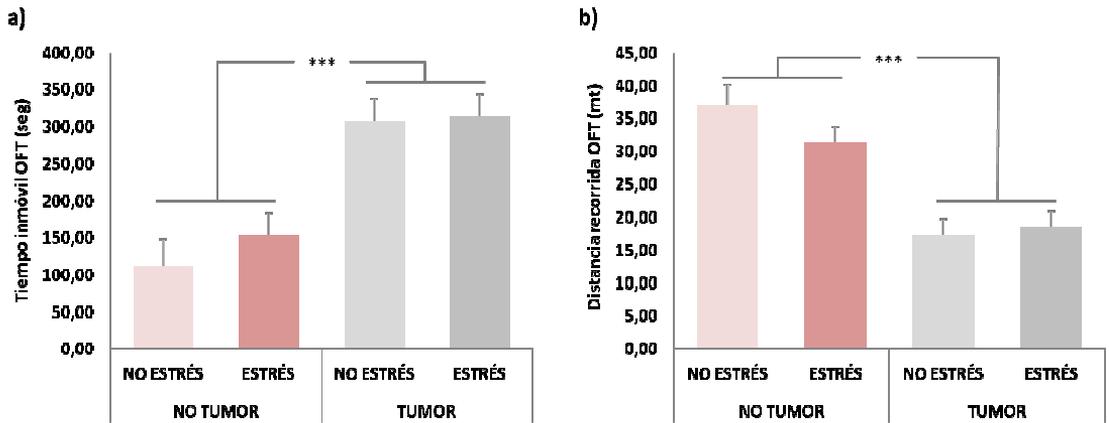


Gráfico 18: a) Promedio de tiempo inmóvil (\pm E.E.M.) en segundos, en la prueba de campo abierto b) Distancia media recorrida (\pm E.E.M.) en la prueba de campo abierto. *** p < 0.001.

3.1.2. Latencia de inmovilidad y natación en FST

Por otro lado, se llevó a cabo la prueba de natación forzada (FST), en la cual se registró el tiempo y la latencia de inmovilidad así como la distancia recorrida. En este caso, el factor tumor también ha resultado significativo aunque solo para la variable latencia de inmovilidad ($F [1,48] = 4,168$, $p = 0,047$) y natación ($F [1,48] = 4,583$, $p = 0,037$). Los sujetos con tumor muestran menor latencia de inmovilidad, así como menor natación en relación a los controles (Gráfico 19). En este caso, el factor estrés tampoco resultó significativo para ninguna de estas variables.

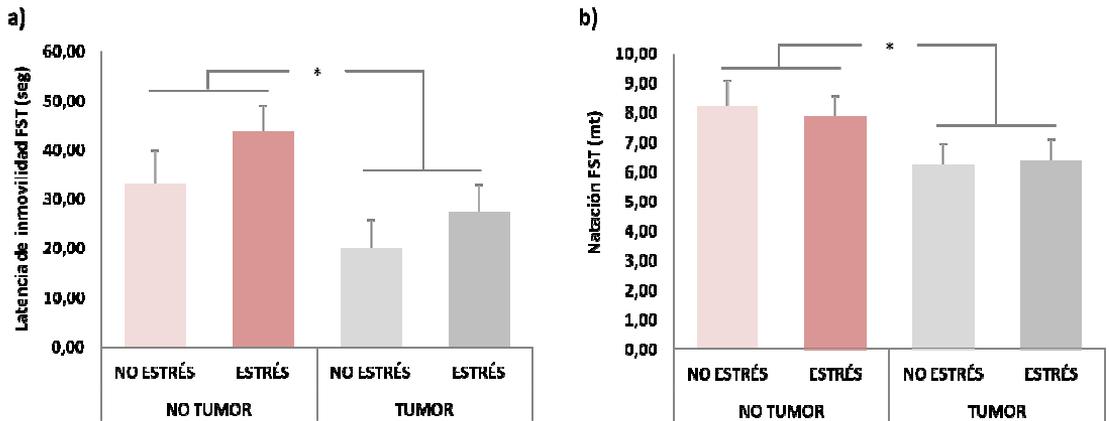


Gráfico 19: a) Latencia media de inmovilidad (\pm E.E.M.) en segundos, en la prueba de natación forzada. b) Distancia media de natación (\pm E.E.M.) en la prueba de natación forzada. * $p < 0.05$.

3.1.3. Consumo y preferencia de sacarosa

Para analizar el efecto que el tumor y el estrés pudieran tener sobre la conducta anhedónica, se registró el consumo y preferencia de sacarosa. Una vez más, el factor tumor ha resultado significativo tanto para el consumo ($F [1,48] = 15,064$, $p = 0,000$) como para la preferencia de sacarosa ($F [1,48] = 8,165$, $p = 0,006$). Tal y como se presenta en el gráfico 20, el grupo de ratones con tumor mostró un menor consumo así como una menor preferencia de sacarosa con respecto a los controles, al final del experimento. No se han encontrado diferencias significativas en cuanto al estrés en ninguna de las variables analizadas.

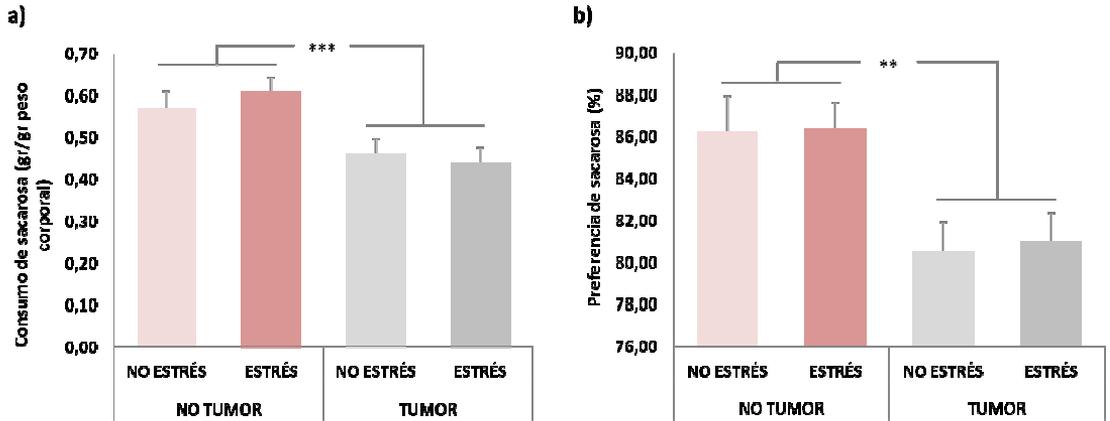


Gráfico 20 a) Consumo medio de sacarosa (\pm E.E.M.) en gramos de solución por cada gramo de peso corporal. **b)** Porcentaje medio de preferencia de sacarosa (\pm E.E.M.) en relación a la preferencia de agua. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3.2. VARIABLES FISIOLÓGICAS

3.1.4. Peso corporal y peso del bazo

En cuanto al peso corporal no se han observado diferencias en función del desarrollo tumoral o del estrés. Sin embargo, podemos observar un incremento significativo del peso en todos los grupos experimentales ($F [1,48] = 234,739$, $p = 0,000$; Gráfico 21a). Por el contrario, observamos diferencias significativas en lo que respecta al peso del bazo entre los sujetos con tumor y los controles ($F [1,48] = 21,769$, $p = 0,000$), siendo el que corresponde a los sujetos con desarrollo tumoral superior al de los controles (Gráfico 21b).

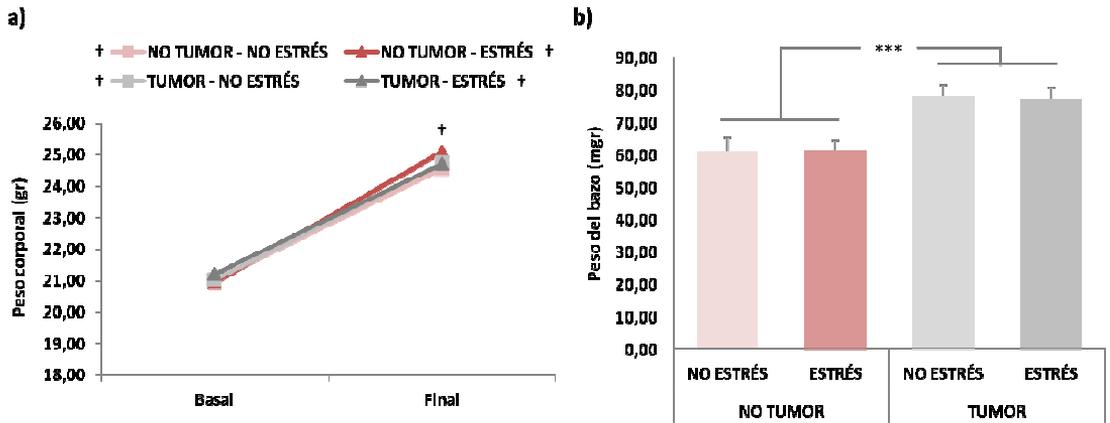


Gráfico 21: a) Promedio de peso corporal en gramos, 7 días antes de la inoculación tumoral (basal) y 21 días después de la inoculación tumoral (final). † respecto a basal en todos los grupos analizados. b) Peso medio del bazo (\pm E.E.M.) en miligramos. *** $p < 0.001$. *

3.1.5. Expresión génica de citocinas proinflamatorias en cerebro: IL6, TNF α e IL1 β

Para comprobar si el desarrollo tumoral o el estrés producen cambios en la actividad inmunitaria, se analizó la expresión génica de citocinas pro y antiinflamatorias en cerebro. El ANOVA realizado ha revelado un efecto principal del factor tumor para la IL6 ($F [1,48] = 5,286$, $p = 0,026$), TNF α ($F [1,48] = 7,518$, $p = 0,009$) e IL β ($F [1,48] = 11,840$, $p = 0,001$). Como se presenta en el gráfico 22, el grupo de sujetos con tumor presenta una mayor expresión de dichas citocinas proinflamatorias en comparación con el grupo control. No se han encontrado diferencias significativas en función del estrés social ni se han observado diferencias significativas en el resto de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias analizadas.

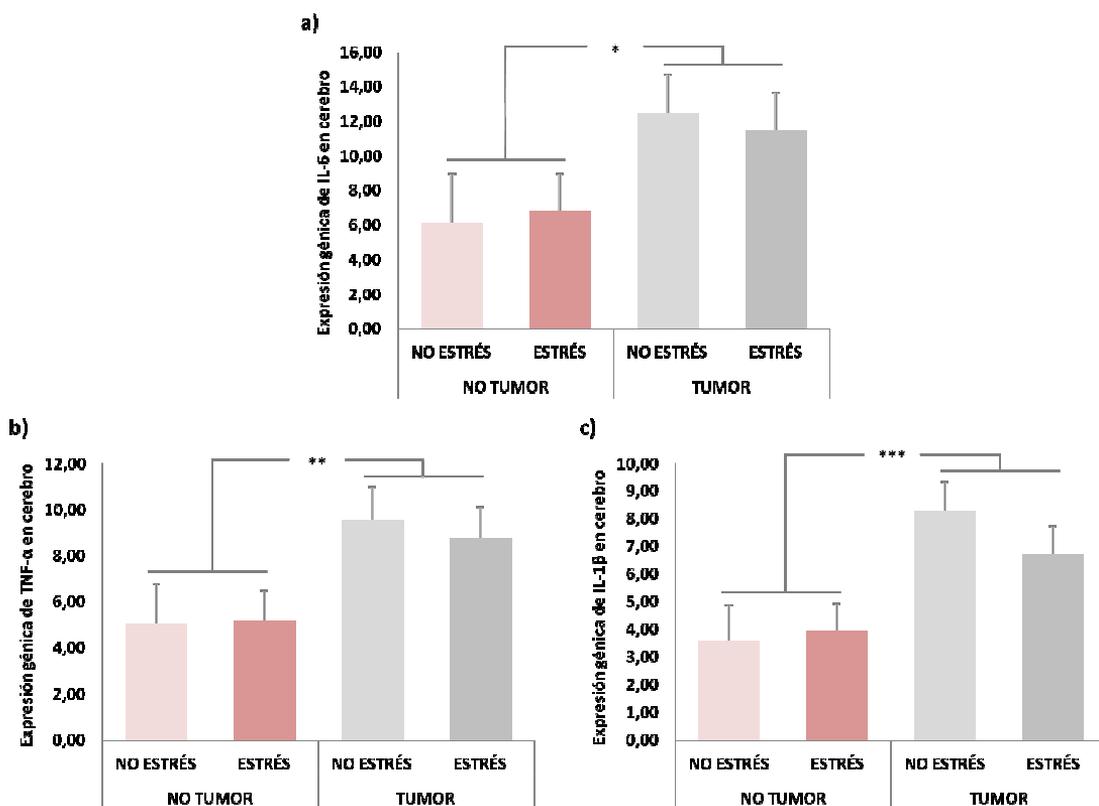


Gráfico 22: a) Valores medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de IL-6 en cerebro. b) Valores medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de TNF- α en cerebro. c) Valores medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de IL-1 β en cerebro. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.1.6. Expresión génica del enzima IDO en cerebro

Con el objetivo de estudiar si el tumor o el estrés alteran la actividad del enzima IDO a nivel central, se ha analizado la expresión de dicha enzima en cerebro. Se ha observado un efecto significativo del factor tumor en la expresión génica de IDO (F [1,48] = 4,956, $p = 0,031$; Gráfico 23), siendo el grupo de ratones inoculados el que muestra una mayor expresión de dicha enzima.

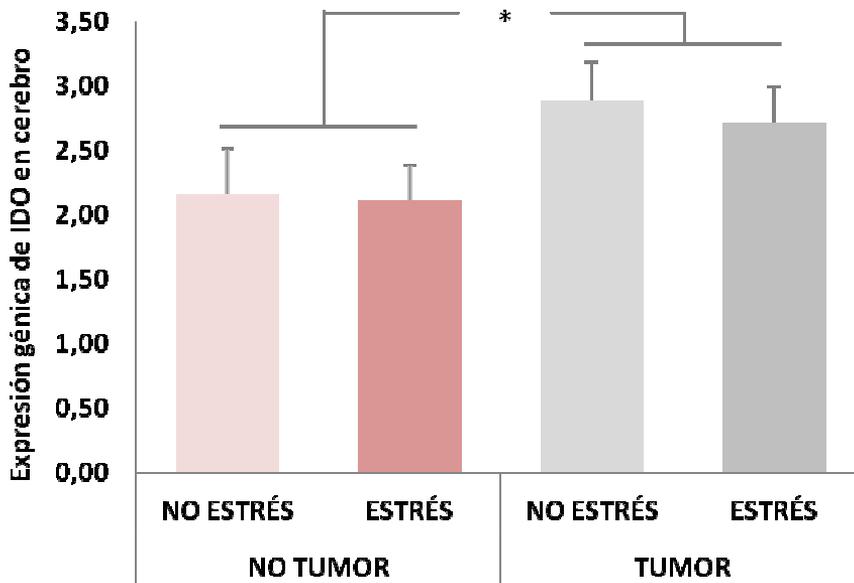


Gráfico 23: Valores medios (\pm E.E.M.) de expresión génica del enzimaIDO en cerebro. * $p < 0.05$.

3.1.7. Actividad periférica del enzimaIDO: Ratio Kyn/Trp y niveles plasmáticos de 3HK

También se ha analizado la actividad del enzimaIDO a nivel periférico mediante la ratio Kyn/Trp en plasma. Por otro lado, se ha determinado la concentración plasmática de 3HK. El ANOVA realizado ha puesto de manifiesto un efecto significativo del factor tumor en los niveles plasmáticos de 3HK ($F [1,44] = 4,350$, $p = 0,043$). Como se puede observar en el gráfico 24b, los sujetos con tumor presentan mayores niveles de 3HK en relación al grupo control, sin embargo no se han observado diferencias significativas en cuanto a la ratio Kyn/Trp. Además, el factor estrés no ha producido ningún efecto en estas variables.

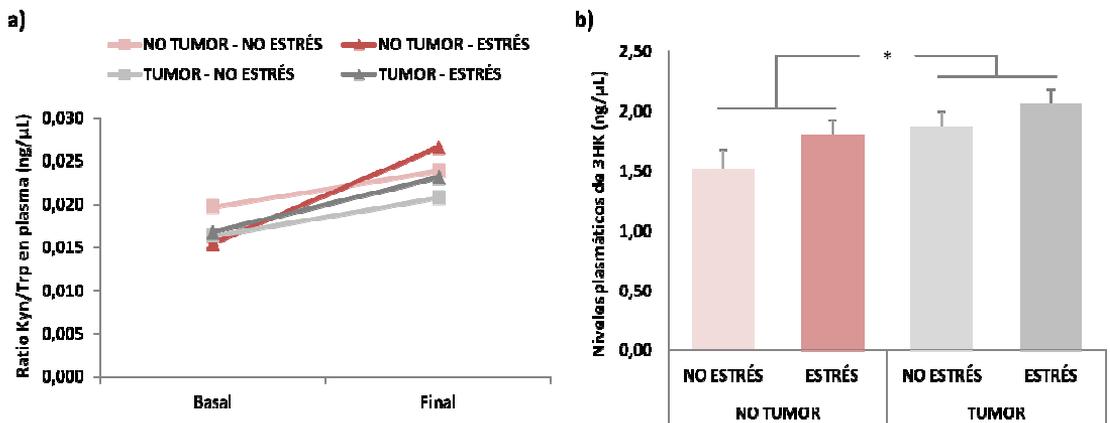


Gráfico 24: a) Índice de la actividad del enzimaIDO en plasma (ratio quinurenina/triptófano) 7 días antes de la inoculación tumoral (basal) y 21 días después de la inoculación tumoral (final). † respecto a basal en el grupo tumor. b) Niveles plasmáticos medios (± E.E.M.) de 3-hidroxiquinurenina (ng/μl). * p < 0.05.

3.1.8. Actividad periférica del enzima PAH: Ratio Phe/Tyr

Por otro lado, se ha analizado el efecto del tumor y el estrés en la ratio Phe/Tyr, medida indirecta de la actividad del enzima PAH. Se ha observado un efecto significativo del factor tumor en dicha ratio ($F [1,48] = 10,581$, $p = 0,002$), sin embargo el factor estrés no ha producido ningún efecto. Como se puede observar en el gráfico 25b, los sujetos con tumor presentaban una mayor ratio Phe/Tyr. En este mismo sentido, el ANOVA de medidas repetidas revela una interacción significativa del factor tumor y el factor tiempo ($F [1,48] = 11,944$, $p = 0,001$), que indica un incremento significativo de la ratio Phe/Tyr a lo largo del experimento solo en aquellos sujetos con tumor.

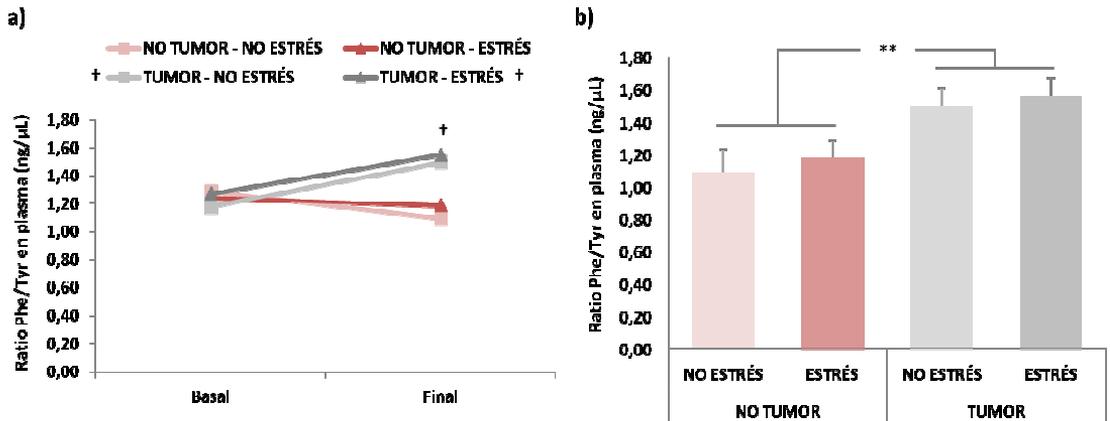


Gráfico 25: a) Índice de la actividad del enzima PAH en plasma (ratio fenilalanina/tirosina) 7 días antes de la inoculación tumoral (basal) y 21 días después de la inoculación tumoral (final). † respecto a basal en el grupo tumor. b) Índice de la actividad del enzima PAH en plasma (ratio fenilalanina/tirosina) 21 días después de la inoculación tumoral (final). ** p < 0.01.

3.1.9. Niveles plasmáticos de corticosterona

En cuanto a los niveles plasmáticos de corticosterona, no se han observado diferencias significativas entre los cuatro grupos en las medidas basales y finales. Sin embargo, el ANOVA de medidas repetidas revela una interacción significativa del factor estrés y el factor tiempo ($F [2,47] = 25,265$, $p = 0,000$), que indica un incremento significativo de los niveles plasmáticos de corticosterona tras la aplicación del estrés en aquellos sujetos estresados (no tumor y tumor). En este mismo sentido, también se ha observado un efecto significativo del factor estrés en los niveles de corticosterona ($F [2,47] = 20,270$ $p = 0,000$). Los sujetos estresados (no tumor y tumor) mostraban mayores niveles de corticosterona en plasma que los sujetos no estresados la hora posterior al último enfrentamiento del estrés social.(Gráfico 26).

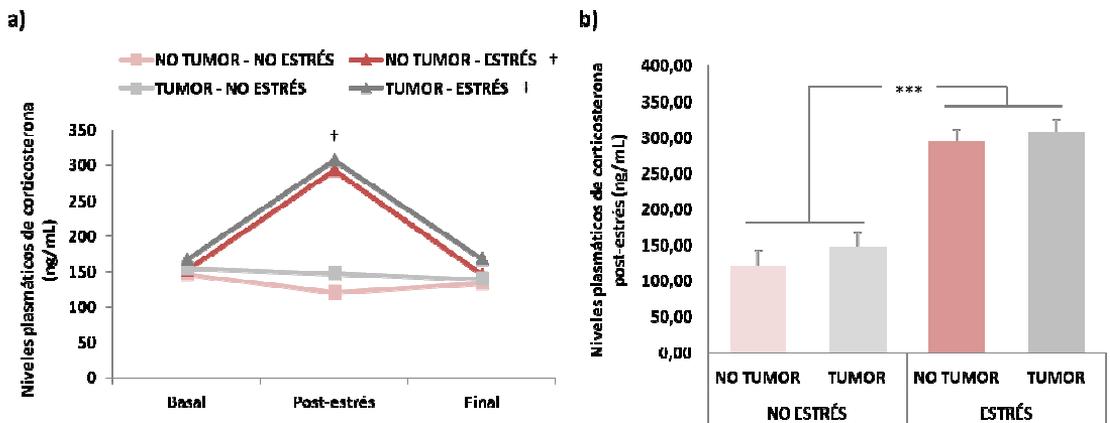


Gráfico 26: a) Niveles plasmáticos medios de corticosterona (\pm E.E.M.) (ng/ml) 7 días antes de la inoculación tumoral (basal), 1 hora después del estrés social (post-estrés) y 21 días después de la inoculación tumoral (final). † respecto a basal y a final en el grupo estresado. **b)** Niveles plasmáticos medios de corticosterona (\pm E.E.M.) (ng/ml) 1 hora después del estrés social (post-estrés). *** $p < 0.001$.

3.3. CORRELACIONES ENTRE VARIABLES CONDUCTUALES Y FISIOLÓGICAS

El estudio de las correlaciones entre variables conductuales y fisiológicas (Tabla 8) mostró que el tiempo dedicado a la conducta de inmovilidad en el OFT correlacionaba positivamente con la ratio Phe/Tyr en plasma ($r = 0.559$, $p = 0.000$). Por el contrario, la conducta locomotora reflejada en la distancia recorrida en el OFT, correlacionaba negativamente con la expresión de IL-1 β en cerebro ($r = -0.288$, $p = 0.027$), así como con los niveles plasmáticos de 3HK ($r = -0.269$, $p = 0.039$) y la ratio Phe/Tyr en plasma ($r = -0.494$, $p = 0.000$). En este mismo sentido, se observó que la conducta de natación en el FST correlacionaba negativamente con los niveles plasmáticos de 3HK ($r = -0.340$, $p = 0.008$) así como con la ratio Phe/Tyr en plasma ($r = -0.322$, $p = 0.013$). También se encontró una relación negativa entre el consumo

de sacarosa y la expresión de TNF- α ($r = -0.272$, $p = 0.037$) e IL-1 β ($r = -0.299$, $p = 0.021$) en cerebro, así como con la ratio Phe/Tyr en plasma ($r = -0.289$, $p = 0.026$). En cuanto a la preferencia de solución de sacarosa, hemos observado una relación negativa solo con la expresión de IL-1 β ($r = -0.343$, $p = 0.008$) en cerebro.

Tabla 8 Correlaciones bivariadas entre las variables conductuales y fisiológicas del experimento 3

	Latencia												
	Inmovilidad (OFT)	Locomoción (OFT)	Inmovilidad (FST)	Natación (FST)	Consumo Sacarosa	Preferencia Sacarosa	IL-6	TNF- α	IL-1 β	IDO	Ratio Kyn/Trp	3HK	Ratio Phe/Tyr
Inmovilidad (OFT)	1	-,944**	-,637**	-,679**	-,625**	-,727**	,087	,023	,241	,217	,208	,227	,559**
Locomoción (OFT)	-,944**	1	,629**	,655**	,608**	,681**	-,161	-,109	-,288*	-,233	-,117	-,269*	-,494**
Latencia Inmovilidad (FST)	-,637**	,629**	1	,523**	,426**	,599**	,151	,146	-,151	-,016	-,101	-,049	-,239
Natación (FST)	-,679**	,655**	,523**	1	,566**	,576**	-,071	,029	-,184	-,205	-,188	-,340**	-,322*
Consumo Sacarosa	-,625**	,608**	,426**	,566**	1	,691**	-,103	-,272*	-,299*	-,201	-,175	-,230	-,289*
Preferencia Sacarosa	-,727**	,681**	,599**	,576**	,691**	1	,021	,073	-,343**	-,086	-,228	-,005	-,229
IL-6	,087	-,161	,151	-,071	-,103	,021	1	,546**	,476**	,668**	-,147	,146	,259*
TNF- α	,023	-,109	,146	,029	-,272*	,073	,546**	1	,557**	,555**	-,226	,011	,071
IL-1 β	,241	-,288*	-,151	-,184	-,299*	-,343**	,476**	,557**	1	,670**	-,170	-,046	,141
IDO	,217	-,233	-,016	-,205	-,201	-,086	,668**	,555**	,670**	1	-,056	,009	,433**
Ratio Kyn/Trp	,208	-,117	-,101	-,188	-,175	-,228	-,147	-,226	-,170	-,056	1	-,013	,138
3HK	,227	-,269*	-,049	-,340**	-,230	-,005	,146	,011	-,046	,009	-,013	1	,153
Ratio Phe/Tyr	,559**	-,494**	-,239	-,322*	-,289*	-,229	,259*	,071	,141	,433**	,138	,153	1

* p < 0.05; ** p < 0.01

Bloque V

DISCUSIÓN

1. Efecto del desarrollo tumoral sobre la conducta de tipo depresivo

Los resultados de los diversos experimentos realizados demuestran que el desarrollo tumoral de melanoma B16, independientemente de si el tumor es singénico o alogénico y de la vía de inoculación de las células tumorales, produce cambios en la conducta, y de acuerdo con nuestra hipótesis, estos cambios son indicativos de un estado depresivo.

Hemos observado que los sujetos con tumor muestran mayor inmovilidad que los sujetos control en la prueba TST en todos los experimentos en los que se ha utilizado dicha prueba. El TST es considerado un paradigma estandarizado que permite establecer el grado de “desesperación”, reflejado en la adopción de una postura inmóvil y pasiva, evitando cualquier intento de escape de la situación desagradable que conlleva dicha prueba (Willner, 1991).

En cuanto al FST, observamos nuevamente que son los animales con tumor los que presentan más conductas de tipo depresivo, bien sea por un aumento significativo del tiempo de inmovilidad y/o la menor latencia de inmovilidad, o bien por una reducción significativa del tiempo de natación, en todos los casos en los que se ha utilizado dicha prueba. Según este paradigma, probablemente el más utilizado a la hora de estudiar la efectividad de los tratamientos antidepresivos (Ronald S Duman & Monteggia, 2006), el hecho de que los sujetos permanezcan inmóviles durante más tiempo, indica un estado de “indefensión” que es revertido con la administración de antidepresivos (Porsolt et al., 2000).

De forma coherente con los resultados indicados anteriormente, la evaluación de la conducta locomotora a través del OFT, pone de manifiesto que los sujetos con

tumor dedican menos tiempo a la exploración del área de evaluación y permanecen inmóviles durante más tiempo.

En el caso del segundo experimento, se podría pensar que el crecimiento tumoral en el flanco derecho pudiera estar dificultando la movilidad de los ratones inoculados, lo cual explicaría el incremento significativo de inmovilidad encontrado en todas las pruebas conductuales realizadas. Sin embargo, también hemos encontrado un incremento de inmovilidad en los experimentos en los cuales la inoculación intravenosa ha producido metástasis pulmonar. La consistencia de esta observación, nos permite afirmar que las conductas manifestadas en todas las pruebas conductuales a lo largo de todos los experimentos, se asocian al desarrollo tumoral en sí mismo y pueden ser consideradas de tipo depresivo. Por último, los resultados encontrados en cuanto a la conducta anhedónica, sello distintivo de los trastornos depresivos, apoyan esta afirmación (Dadomo et al., 2010). Para evaluar dicha conducta se han utilizado dos pruebas, ampliamente utilizadas, que reflejan la sensibilidad a la recompensa, por un lado el NPFT (primer experimento) y por otro, el consumo y preferencia de sacarosa (tercer experimento).

En el caso del NPFT, aunque los animales con tumor consumían menor cantidad de cacahuete que los sujetos control, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Esta falta de diferencias, puede ser interpretada como una falta de efecto del desarrollo tumoral sobre dicha conducta, o bien ser atribuida a una falta de precisión en cuanto a los datos de consumo recogidos. Otra posible explicación es que el NPFT no cuente, en esta ocasión, con las características reforzantes suficientes (Pyter et al., 2009). Para comprobar si realmente el desarrollo tumoral produce anhedonia, decidimos utilizar en el tercer experimento la prueba del consumo y preferencia de sacarosa. En esta prueba, se considera que aquellos

sujetos que muestran menor consumo y/o menor preferencia de dicha solución, presentan un estado anhedónico, que es equivalente a los síntomas de anhedonia manifestados por pacientes deprimidos. Los sujetos con tumor mostraron una disminución significativa tanto del consumo como de la preferencia de sacarosa. Conviene destacar además, que en ninguno de los experimentos en los que se evaluó la conducta anhedónica se observó un cambio significativo en el peso corporal, y que por tanto, el descenso en el consumo de sacarosa no ha sido debido a una falta de apetito sino al efecto anhedónico específico producido por el propio tumor. En este sentido, otros autores han observado que animales con diferentes tipos de tumor sufren reducciones consistentes en la preferencia de sacarosa, y que dicha reducción no parece estar producida por cambios en su motivación nutricional (Lamkin et al., 2011; Pyter et al., 2009; Xiu, Lin, & Wei, 2010).

Todos estos resultados tomados en conjunto, demuestran que el desarrollo tumoral de melanoma B16 produce conductas de tipo depresivo, tanto en la cepa OF1 como en la cepa C57/BL6. Además, estos efectos se producen independientemente de la vía de inoculación del tumor e incluso en fases tempranas del desarrollo tumoral.

2. Efecto de las citocinas proinflamatorias en la aparición de conductas depresivas en sujetos con desarrollo tumoral

Se ha hipotetizado que los síntomas depresivos frecuentemente observados en sujetos con cáncer, podrían ser atribuidos a los procesos inflamatorios generados por el desarrollo tumoral. Se han identificado varios mecanismos mediante los cuales citocinas tales como IL-1 β , IL-6 o TNF- α , actúan sobre el SNC y ejercen efectos sobre la función y el metabolismo de los neurotransmisores, la actividad neuroendocrina, la plasticidad sináptica y los circuitos cerebrales; pudiendo de esta manera alterar la conducta (R Dantzer et al., 1999; Robert Dantzer et al., 2008; Hayley et al., 2005; Charles L. Raison et al., 2006). De acuerdo con nuestra hipótesis, hemos encontrado una clara relación entre el aumento de la expresión génica de citocinas proinflamatorias, producidas por el desarrollo tumoral de melanoma B16, y la manifestación de conductas depresivas.

En el primer experimento, en el cual se analizó la expresión génica de citocinas proinflamatorias tanto en el hipotálamo como en el hipocampo, los ratones con tumor mostraron un aumento significativo de la expresión de IL-6 en el hipocampo. Así mismo, los sujetos con mayor desarrollo tumoral presentaron una mayor expresión de IL-6 y TNF- α en el hipocampo, frente a los de poco desarrollo tumoral y a los controles. Es importante señalar que esta misma relación se encontró cuando se analizaron los niveles de IL-6 en plasma. Estos datos indican que es necesario un determinado desarrollo tumoral para que se produzca un aumento significativo de estas citocinas. En este sentido, Moretti et al., (2001) encontraron un aumento significativo de los niveles plasmáticos de IL-6 sólo en pacientes con un desarrollo avanzado de melanoma. La falta de diferencias significativas en la

expresión de citocinas entre los sujetos de poco desarrollo tumoral y los controles, puede deberse a que dicho análisis se haya realizado en estructuras cerebrales en vez de en cerebro completo. Tampoco se puede descartar que esta falta de diferencias significativas pueda deberse a que en este experimento se haya utilizado un tumor alogénico.

En los experimentos (segundo y tercero), en los que el tumor es singénico y se analizó el cerebro completo, encontramos un aumento significativo de la expresión de IL-6, TNF- α e IL-1 β , tanto en el caso de la inoculación subcutánea como intravenosa. Además, en el segundo experimento se ha observado un incremento significativo de la expresión génica de IFN- γ . En contraste con el primer experimento, en el segundo observamos que el aumento de la expresión de citocinas proinflamatorias se producía desde fases tempranas del desarrollo tumoral. Además, en este mismo experimento también se observó un incremento significativo de la expresión de citocinas antiinflamatorias (IL-4 e IL-10). A este respecto, es importante destacar que a pesar de dicho incremento, la elevada ratio IL-6/IL-10 encontrada en ratones con tumor, parámetro habitualmente utilizado para cuantificar el balance inflamatorio, ha revelado la prevalencia de citocinas proinflamatorias.

Este aumento, consistentemente encontrado, respecto a la expresión de citocinas proinflamatorias a nivel central y periférico, puede deberse a la respuesta del sistema inmune frente a los antígenos tumorales del melanoma B16 (Houghton et al., 2001), o bien a la secreción de citocinas producidas por el propio tumor (Azpiroz, De Miguel, Fano, & Vegas, 2008; De Miguel et al., 2011; Lazar-Molnar et al., 2000; Vegas, Garmendia, & Azpiroz, 2006). Tomando en conjunto el incremento de la expresión de citocinas proinflamatorias y los resultados derivados de la

evaluación conductual, encontramos una relación directa entre ambos parámetros en todos los experimentos realizados.

Así, en el primer experimento los animales con mayor desarrollo tumoral, que presentaron mayor expresión de IL-6 y TNF- α en el hipocampo y mayores niveles de IL-6 en plasma, también mostraron un aumento significativo de la inmovilidad en el TST. En este mismo sentido, en el segundo y tercer experimento, el incremento de citocinas proinflamatorias en sujetos con tumor, se corresponde con la manifestación de conductas de tipo depresivo, manifestadas en el TST, FST y OFT, así como en la reducción del consumo y preferencia de sacarosa. Diversos estudios llevados a cabo en animales y humanos han encontrado una relación positiva entre estas citocinas y la presencia de síntomas depresivos (Howren et al., 2009). Lamkin et al., (2011) utilizando un modelo de cáncer de ovario en roedores, observaron que el desarrollo tumoral produce altos niveles sistémicos tanto de citocinas proinflamatorias como antiinflamatorias, a la vez que se manifiestan comportamientos anhedónicos (Lamkin et al., 2011). También se ha observado que las ratas con cáncer de mama presentan mayores niveles de citocinas proinflamatorias en el hipocampo y en la periferia, así como comportamientos de tipo ansioso-depresivo (Pyter et al., 2009). Otros autores utilizando otros modelos tumorales y/o administración de LPS, también encuentran una relación entre el aumento de estas citocinas y la manifestación de conductas de tipo depresivo. Además se ha observado que el 45% de los pacientes que reciben administración crónica de interferon-alfa (IFN- α) para el tratamiento de melanoma maligno experimentan síntomas depresivos (Musselman DL, Lawson DH, Gumnick JF, Manatunga AK, Penna S, Goodkin RS, 2001).

Existen evidencias a favor de que las citocinas podrían inducir sintomatología depresiva alterando el metabolismo de monoaminas tales como serotonina, dopamina y noradrenalina (Bonaccorso et al., 2002; Lucile Capuron et al., 2003; Loftis et al., 2013; Andrew H Miller et al., 2009).

Los resultados encontrados en el primer experimento, en el que se ha analizado la actividad monoaminérgica en diversas estructuras cerebrales, refuerzan nuestra hipótesis de que las citocinas producidas por el desarrollo tumoral de melanoma B16, podrían ser las responsables de la conducta tipo depresivo observada. Por un lado, los ratones con tumor presentaron un descenso de la actividad dopaminérgica en el estriado, reflejado en los menores niveles de DA y su metabolito DOPAC, con respecto a los controles. Este descenso de la actividad dopaminérgica coincide con el aumento de inmovilidad manifestado por estos sujetos en el TST. Existen evidencias de que alteraciones en la función de los ganglios basales y/o en la actividad dopaminérgica, pueden contribuir al desarrollo de los síntomas psicomotores y anhedónicos encontrados en pacientes deprimidos (Capuron et al., 2009; Dunlop & Nemeroff, 2007; Epstein, Preston, Stewart, & Shaham, 2006; Felger & Miller, 2012; Majer et al., 2008). Por otro lado, los ratones con tumor han mostrado menores niveles de 5-HT pero no de su metabolito 5-HIAA en el estriado, por tanto, podemos decir que no hay evidencia de una alteración de la función serotoninérgica en dicha estructura. Resulta interesante destacar que el desarrollo tumoral ha disminuido significativamente la actividad serotoninérgica en la corteza prefrontal, reflejada en el significativo descenso de los niveles 5-HT, 5-HIAA y la ratio 5-HIAA/5-HT en los ratones con tumor frente a los controles.

Diversos estudios realizados en animales han señalado el papel de las citocinas en la transmisión serotoninérgica (Anisman et al., 2005; Dunn et al., 2005; Jason C.

O'Connor, André, et al., 2009). Así mismo, se ha encontrado que la administración crónica y aguda de citocinas produce alteraciones en el metabolismo de serotonina, norepinefrina, dopamina y glutamato en regiones del cerebro esenciales para la regulación de la emoción, incluyendo el sistema límbico (amígdala, hipocampo y núcleo accumbens), así como para la regulación de la función motora y la recompensa, incluyendo los ganglios basales. El efecto de las citocinas sobre la dopamina (DA) en los ganglios basales puede ser especialmente relevante para la depresión y la fatiga, así como para el desarrollo de trastornos psicomotores y neurovegetativos (Jennifer C. Felger & Miller, 2012). Además, se ha observado que fármacos antidepresivos, tales como la paroxetina (inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina), facilitan la regulación de la liberación de citocinas proinflamatorias y aumentan la actividad del sistema serotoninérgico (Capuron et al., 2002).

En resumen, los resultados obtenidos sugieren que el desarrollo tumoral de melanoma B16 genera una respuesta inflamatoria tanto a nivel central como periférico en las cepas OF1 y C57/BL6, evidenciado por el incremento significativo de la expresión génica de diversas citocinas pro y antiinflamatorias, las cuales al alterar la transmisión monoaminérgica cerebral, podrían ser las responsables de la manifestación de las conductas de tipo depresivo observadas.

3. Desarrollo tumoral, inflamación y depresión: posibles mecanismos implicados.

Una creciente literatura ha propuesto la activación de los enzimas indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) y/o GTP-CH como posibles vías a través de las cuales las citocinas proinflamatorias pueden reducir la disponibilidad monoaminérgica.

Por un lado, las citocinas proinflamatorias activan el enzima IDO, que induce la conversión de triptófano (Trp), aminoácido precursor de serotonina (5-HT), en quinurenina (Kyn) y sus derivados (Aye Mu Myint et al., 2012; B Widner, Ledochowki, & Fuchs, 2000) (Kohl y Sperner-Unterweger, 2007). Al activar la conversión de triptófano en quinurenina, la IDO limita la síntesis de 5-HT, contribuyendo de esta forma al desarrollo de depresión (Bernhard Widner et al., 2002) . Por otro lado, se ha observado que la inflamación crónica activa el enzima GTP-CH y conduce a una pérdida oxidativa de tetrahidrobiopterina (BH₄), cofactor necesario para la síntesis de DA, epinefrina y norepinefrina (Celik et al., 2010; Hashimoto et al., 2004; Kim et al., 2007; Aye M. Myint et al., 2007).

Nuestros resultados indican que ambas vías podrían estar implicadas en la relación encontrada entre el aumento de la expresión de citocinas proinflamatorias, la alteración de la transmisión monoaminérgica, y la manifestación de conductas depresivas.

En aquellos experimentos en los que se determinó la expresión génica del enzima IDO (segundo y tercer experimento), los sujetos con tumor mostraron un incremento significativo de la expresión de la misma, que se correspondió con la manifestación de conductas de tipo depresivo. Otros autores, han observado que cuando se bloquea esta enzima, no se produce la manifestación de este tipo de

conductas (Jason C O'Connor et al., 2009b). También se ha observado que ratones deficientes en IDO no manifiestan conductas de tipo depresivo ante estímulos inflamatorios. Por otro lado, se analizó la ratio Kyn/Trp en plasma, la cual ha sido considerada en gran cantidad de estudios en animales, pero sobre todo en humanos, como una medida indirecta de la activación del enzima IDO. Se ha observado que los pacientes deprimidos presentan una mayor ratio Kyn/Trp en relación a los sujetos control. No obstante, existen estudios que no han encontrado esta relación. (Aye M. Myint et al., 2007) estudiando la posible implicación del metabolismo de la Kyn en la manifestación de depresión mayor, no encontraron diferencias significativas en los niveles de Kyn ni en los de Trp entre los pacientes deprimidos y los controles. Estos mismos autores, sugieren que el hecho de que no se aprecie un incremento de los niveles de quinurenina, puede deberse a que ésta es metabolizada más intensamente en los pacientes deprimidos.

Por otro lado, (Jason C O'Connor, Andre, et al., 2009), induciendo inflamación crónica a través de Bacillus Calmette-Guérin (BCG), encontraron una clara relación entre la conducta depresiva manifestada por los sujetos infectados y la activación del enzima IDO, lo que no supuso un aumento significativo de la ratio Kyn/Trp a nivel central. Este mismo grupo ha mostrado que la activación del enzima IDO fue acompañada de la activación del enzima 3 hidroxiantranílico oxidasa (HAAO), la cual aumenta la degradación de 3 hidroxiantranita (3HAA), pudiendo así dar lugar a la formación del neurotóxico ácido quinolínico. Estos trabajos indican que es necesario considerar una posible vía adicional a la falta de disponibilidad de serotonina, mediante la cual la activación de IDO podría alterar la neurotransmisión y generar conducta depresiva.

Como se ha indicado anteriormente, en nuestro caso los sujetos con tumor presentan un aumento de la expresión de IDO a la vez que manifiestan conductas de tipo depresivo. Sin embargo, estos mismos sujetos muestran una menor ratio Kyn/Trp en relación a los sujetos control. A pesar de ello, los elevados niveles de 3 hidroxiquinurenina (3HK) encontrados en estos, nos permite hipotetizar que los bajos niveles de Kyn no son debidos a una menor conversión de Trp en Kyn inducida por el enzima IDO, sino a una metabolización más intensa y rápida de la misma. Ahora bien, al no haber cuantificado el ácido quinurénico (AK), derivado también de la Kyn por una vía alternativa y que tiene efecto neuroprotector, no podemos determinar la posible implicación de la vía glutamatérgica en la conducta depresiva observada.

La otra vía mediante la cual las citocinas proinflamatorias pueden alterar la neurotransmisión y la conducta, es activando el enzima GTP-CH y reduciendo la disponibilidad del cofactor BH₄, en presencia del cual, el enzima fenilalanina hidroxilasa (PAH) convierte la fenilalanina (Phe) en tirosina (Tyr), aminoácido esencial para la síntesis de DA, adrenalina, NA y 5HT (Shintaku, 2002). Se considera que la ratio Phe/Tyr es una medida indirecta de la disponibilidad de BH₄ (Miller & Raison, 2016). Los resultados obtenidos en este sentido, revelan un incremento significativo de la ratio Phe/Tyr en sujetos con tumor en relación a los controles en todos los experimentos en los que se ha analizado dicha ratio (segundo y tercer experimento). Así mismo, otros autores han observado concentraciones elevadas de fenilalanina sérica así como de la ratio Phe/Tyr en diversas enfermedades inflamatorias y oncológicas (Neurauter et al., 2008).

Un estudio realizado por Capuron, Schroecksnadel, et al., (2011) en población de edad avanzada, ha puesto de manifiesto una relación positiva entre el aumento de

inflamación, los ratios Kyn/Trp y Phe/Tyr, así como diversos síntomas neuropsiquiátricos, incluida la depresión. Curiosamente, el aumento del catabolismo del triptófano se relacionó con falta de motivación y pesimismo, mientras que la reducción en la actividad de PAH se asoció a síntomas neurovegetativos y motores (Lucile Capuron et al., 2011).

En resumen, los resultados obtenidos sugieren que las conductas de tipo depresivo observadas podrían ser consecuencia de la activación por parte de las citocinas proinflamatorias de los enzimas IDO y GTP-CH. Este aumento de actividad tendría como consecuencia la alteración de la actividad monominérgica y posiblemente también la glutamaérgica.

4. Cáncer, estrés y depresión

En el tercer experimento estudiamos además, la posible influencia del estrés social en los efectos producidos por el desarrollo tumoral de melanoma B16. No se han encontrado diferencias significativas entre sujetos estresados y no estresados en cuanto a conducta, parámetros inflamatorios analizados, ni mediadores posiblemente implicados. Sin embargo, la aplicación del modelo de estrés social por contacto sensorial, si ha producido la respuesta fisiológica de estrés, evidenciada por el incremento de la secreción de corticosterona en sujetos tanto inoculados como no inoculados.

Diversos estudios que utilizan fundamentalmente estrés crónico o físico severo, han demostrado que uno de los mecanismos mediante el cual el estrés produce conducta depresiva, es aumentando la secreción de citocinas proinflamatorias. En otros trabajos realizados en nuestro laboratorio con la cepa OF1 y utilizando el mismo modelo de estrés social utilizado en este trabajo, también encontramos que el estrés produce un aumento de citocinas proinflamatorias a nivel central (IL-1 β) acompañado de un aumento del desarrollo tumoral (De Miguel et al., 2011). La discrepancia encontrada con respecto a los resultados de este trabajo, puede ser debida a que en esta ocasión hemos utilizado una cepa diferente (C57/BL6). Es posible que en esta cepa sea necesario aplicar un estrés crónico y/o evaluar las estrategias de afrontamiento de los sujetos estresados, para observar los efectos producidos por el estrés. La evaluación de dichas estrategias, en nuestro caso no se ha podido llevar a cabo debido a que el número de animales utilizado era insuficiente para realizar estos análisis. Datos obtenidos en nuestro laboratorio, ponen de manifiesto que las diferentes estrategias de afrontamiento de estrés (activa y pasiva) se asocian a diferentes perfiles neuroendocrinos e inmunitarios (A

Bartolomucci et al., 2001; De Miguel et al., 2011). De hecho, utilizando un modelo de estrés crónico, hemos encontrado que el estrés produce un incremento de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) sólo en aquellos sujetos que manifestaron una estrategia de afrontamiento pasiva (Gómez-Lázaro et al., 2011; Pérez-Tejada et al., 2016).

En resumen, los resultados encontrados indican que este modelo de estrés social agudo no ha ejercido ninguna influencia en los efectos inmunitarios, neuroquímicos y conductuales producidos por el desarrollo tumoral de melanoma B16 en la cepa C57BL6.

Bloque VI

CONCLUSIONES

En las siguientes líneas se presentan las principales conclusiones que podemos extraer de los datos presentados en este trabajo de investigación:

- 1.- El desarrollo tumoral de melanoma B16 produce conductas de tipo depresivo en las dos cepas utilizadas (OF1 y C57BL6) independientemente de la vía de inoculación del tumor (I.V. o S.C.).
- 2.- El desarrollo tumoral de melanoma B16 produce una respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central, caracterizada por un incremento de la expresión de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IFN- γ así como por un aumento de la ratio IL6/IL10.
- 3.- Las conductas de tipo depresivo observadas en sujetos con desarrollo tumoral pueden ser causadas por el aumento de actividad de citocinas.
- 4.- El desarrollo tumoral de melanoma B16 produce un descenso en la actividad monoaminérgica central manifestado por un descenso en la actividad serotoninérgica en el córtex prefrontal y de actividad dopaminérgica en el estriado.
- 5.- El desarrollo tumoral de melanoma B16 produce un aumento de la ratio Phe/Tyr en plasma, lo que indica una menor disponibilidad de BH4 y por tanto un descenso en la síntesis de monoaminas (DA, adrenalina, NA y 5HT).
- 6.- El desarrollo tumoral de melanoma B16 incrementa la expresión del enzimaIDO en cerebro.
- 7.- El desarrollo tumoral de melanoma B16 produce un aumento de la vía de metabolización de la Kyn hacia ácido quinolínico, lo que podría dar lugar a un aumento de la activación glutamaérgica.

8-. La conducta depresiva producida por el desarrollo tumoral de melanoma B16 puede ser consecuencia del aumento de la secreción de citocinas proinflamatorias, que a través de la activación del enzima IDO y/o GTP-CH, producen una alteración de la actividad monoaminérgica y posiblemente también de la glutamérgica.

FUTUROS ESTUDIOS

Este trabajo aporta datos que contribuyen al conocimiento de los mecanismos a través de los cuales el cáncer puede producir depresión. Así mismo, contribuye a afianzar la hipótesis de que las citocinas proinflamatorias pueden intervenir en la aparición de los síntomas depresivos observados en estos pacientes. Este trabajo además pone de manifiesto la posible implicación de los mecanismos postulados hoy en día como posibles mediadores, aunque presenta la limitación de no poder establecer relaciones causales. Entender estos mecanismos puede ofrecer nuevas perspectivas para el tratamiento profiláctico y terapéutico efectivo de la depresión. Sería por tanto interesante estudiar en futuras investigaciones, en qué medida la activación del enzima IDO y/o GTP-CH contribuyen a la aparición de la sintomatología depresiva, mediante la utilización de sustancias bloqueadoras específicas de estos enzimas. También sería interesante realizar experimentos en los cuales se administren fármacos antidepresivos, para poder determinar las vías de neurotransmisión implicadas en la conducta depresiva producida por el desarrollo tumoral.

En relación al estrés social, sería interesante realizar nuevos experimentos en los que se pudieran analizar las estrategias de afrontamiento, así como analizar los efectos de un estrés crónico.

La hipótesis inflamatoria es ciertamente atractiva en un campo como el de la depresión, con pocas innovaciones recientes en cuanto a efectividad de los fármacos. Sin embargo, la identificación de los mecanismos moleculares intracelulares que están en el origen de la asociación entre inflamación y depresión, podría proporcionar valiosas dianas para el descubrimiento de nuevas drogas antidepresivas. Así mismo puede proporcionar información para ajustar los tratamientos anticancerosos, sobre todo los relativos a la administración de citocinas, con objeto de prevenir en estos pacientes el desarrollo de depresión y otras enfermedades neuropsiquiátricas. También pone de manifiesto la necesidad de intervención psicológica como una posible alternativa eficaz para prevenir o paliar la depresión en diversos procesos inflamatorios.

Bloque VII

REFERENCIAS

- A. T. Evers, E., M. van der Veen, F., Jolles, J., E. P. Deutz, N., & A. J. Schmitt, J. (2009). The effect of acute tryptophan depletion on performance and the BOLD response during a Stroop task in healthy first-degree relatives of patients with unipolar depression. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, *173*(1), 52–58. <http://doi.org/10.1016/j.psychresns.2008.09.006>
- Ader, R., & Kelley, K. W. (2007). A global view of twenty years of Brain, Behavior, and Immunity. *Brain, Behavior, and Immunity*, *21*(1), 20–22. [http://doi.org/S0889-1591\(06\)00285-6](http://doi.org/S0889-1591(06)00285-6) [pii] 10.1016/j.bbi.2006.07.003
- Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*, *6*(September), 203–208. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.003>
- Almeida, R. F., Thomazi, A. P., Godinho, G. F., Saute, J. A. M., Wofchuk, S. T., Souza, D. O., & Ganzella, M. (2010). Effects of depressive-like behavior of rats on brain glutamate uptake. *Neurochemical Research*, *35*(8), 1164–1171. <http://doi.org/10.1007/s11064-010-0169-4>
- Anisman, H., Merali, Z., Poulter, M. O., & Hayley, S. (2005). Cytokines as a precipitant of depressive illness: animal and human studies. *Current Pharmaceutical Design*, *11*(8), 963–72. <http://doi.org/10.2174/1381612053381701>
- Arborelius, L., Owens, M. J., Plotsky, P. M., & Nemeroff, C. B. (1999). The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *The Journal of Endocrinology*, *160*, 1–12. <http://doi.org/10.1677/joe.0.1600001>
- Arrieta, O., Angulo, L. P., Núñez-Valencia, C., Dorantes-Gallareta, Y., Macedo, E. O., Martínez-López, D., ... Oñate-Ocaña, L. F. (2013). Association of depression and anxiety on quality of life, treatment adherence, and prognosis in patients with

advanced non-small cell lung cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 20(6), 1941–8. <http://doi.org/10.1245/s10434-012-2793-5>

Azpiroz, A., De Miguel, Z., Fano, E., & Vegas, O. (2008). Relations between different coping strategies for social stress, tumor development and neuroendocrine and immune activity in male mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(5), 690–698. [http://doi.org/S0889-1591\(07\)00262-0](http://doi.org/S0889-1591(07)00262-0) [pii]10.1016/j.bbi.2007.10.007

Baltgalvis, K. A., Berger, F. G., Peña, M. M. O., Mark, J., White, J. P., Carson, J. A., ... Carson, J. A. (2010). Activity level , apoptosis , and development of cachexia in Apc Min / + mice Activity level , apoptosis , and development of cachexia in Apc Min / z mice, (July), 1155–1161. <http://doi.org/10.1152/japplphysiol.00442.2010>

Bartolomucci, A. (2007). Social stress, immune functions and disease in rodents. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 28(1), 28–49. <http://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.02.001>

Bartolomucci, A., Palanza, P., Gaspani, L., Limiroli, E., Panerai, A. E., Ceresini, G., ... Parmigiani, S. (2001). Social status in mice: behavioral, endocrine and immune changes are context dependent. *Physiology and Behavior*, 73(3), 401–410. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11438368

Bell, C., Abrams, J., & Nutt, D. (2001). Tryptophan depletion and its implications for psychiatry. *Depression*, 8.

Bellingrath, S., Rohleder, N., & Kudielka, B. M. (2013). Effort-reward-imbalance in healthy teachers is associated with higher LPS-stimulated production and

lower glucocorticoid sensitivity of interleukin-6 in vitro. *Biological Psychology*, 92(2), 403–409. <http://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2012.12.003>

Belmaker, R. H., & Agam, G. (2008). Major depressive disorder. *The New England Journal of Medicine*, 358(1), 55–68. <http://doi.org/10.1056/NEJMra073096>

Benschop, R. J., Schedlowski, M., Wienecke, H., Jacobs, R., & Schmidt, R. E. (1997). Adrenergic control of natural killer cell circulation and adhesion. *Brain, Behavior, and Immunity*, 11(4), 321–332. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9512818

Berger, M. F., Hodis, E., Heffernan, T. P., Deribe, Y. L., Lawrence, M. S., Protopopov, A., ... Garraway, L. a. (2012). Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature*, 485(7399), 502–506. <http://doi.org/10.1038/nature11071>

Berton, O., McClung, C. a, Dileone, R. J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S. J., ... Nestler, E. J. (2006). Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5762), 864–8. <http://doi.org/10.1126/science.1120972>

Besedovsky, H. O., & Del Rey, A. (2002). Introduction: immune-neuroendocrine network. *Frontiers of Hormone Research*, 29, 1–14. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11789344

Besedovsky, H. O., & del Rey, A. (2007). Physiology of psychoneuroimmunology: A personal view. *Brain Behavior and Immunity*, 21(1), 34–44. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.09.008>

- Bierhaus, A., Wolf, J., Andrassy, M., Rohleder, N., Humpert, P. M., Petrov, D., ... Nawroth, P. P. (2003). A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(4), 1920–1925.
- Bonaccorso, S., Marino, V., Puzella, A., Pasquini, M., Biondi, M., Artini, M., ... Maes, M. (2002). Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon-alpha-based immunotherapy are related to interferon-alpha-induced changes in the serotonergic system. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, *22*(1), 86–90. <http://doi.org/10.1097/00004714-200202000-00014>
- Booij, L., Van Der Does, A. J. W., Haffmans, P. M. J., & Riedel, W. J. (2005). Acute tryptophan depletion in depressed patients treated with a selective serotonin-noradrenalin reuptake inhibitor: Augmentation of antidepressant response? *Journal of Affective Disorders*, *86*(2-3), 305–311. <http://doi.org/10.1016/j.jad.2005.01.012>
- Boon, T. (1993). Teaching the immune system to fight cancer. *Scientific American*, *268*(3), 82–89. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8316825
- Boon, T., & Van den Eynde, B. (2003). Tumour immunology. *Current Opinion in Immunology*, *15*(2), 129–130. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12633660
- Bowers, S. L., Bilbo, S. D., Dhabhar, F. S., & Nelson, R. J. (2008). Stressor-specific

alterations in corticosterone and immune responses in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(1), 105–113. [http://doi.org/S0889-1591\(07\)00161-4](http://doi.org/S0889-1591(07)00161-4)
[pii]10.1016/j.bbi.2007.07.012

Brain, P. F. (1972). Endocrine and behavioural differences between dominant and subordinate male house mice in pairs. *Psychonomic Science*, 28, 260–262.

Breitenstein, B., Scheuer, S., & Holsboer, F. (2014). Are there meaningful biomarkers of treatment response for depression? *Drug Discovery Today*, 19(5), 539–561. <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.02.002>

Bremers, A. J., & Parmiani, G. (2000). Immunology and immunotherapy of human cancer: present concepts and clinical developments. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 34(1), 1–25. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10781746

Bressac-de-Paillerets, B. (2002). Genetic and environmental factors in cutaneous malignant melanoma.

Brown, K. W., Levy, A. R., Rosberger, Z., & Edgar, L. (2003). Psychological Distress and Cancer Survival: A Follow-Up 10 Years After Diagnosis. *Psychosomatic Medicine*, 65, 636–643. <http://doi.org/10.1097/01.PSY.0000077503.96903.A6>

Burke, F., Relf, M., Negus, R., & Balkwill, F. (1996). A cytokine profile of normal and malignant ovary. *Cytokine*, 8(7), 578–85. <http://doi.org/10.1006/cyto.1996.0077>

Cacho, R., et al., 2008. (2008). Effects of social stress on tumor development in dominant male mice with diverse behavioral activity profiles, 20, 818–824.

- Cahlin, C., Körner, A., Axelsson, H., Necrosis, T., Evaluated, F., Cachexia, E., ... Svanberg, E. (2000). Experimental Cancer Cachexia: The Role of Host-derived Cytokines Interleukin (IL)-6, IL-12, Interferon- γ , and Tumor Necrosis Factor α Evaluated in Gene Knockout, Tumor-bearing Mice on C57 Bl Background and Eicosanoid-dependent Cachexia, (II), 5488–5493.
- Capuron, L., Fornwalt, F. B., Knight, B. T., Harvey, P. D., Ninan, P. T., & Miller, A. H. (2009). Does cytokine-induced depression differ from idiopathic major depression in medically healthy individuals? *Journal of Affective Disorders*, 119(1-3), 181–185. <http://doi.org/10.1016/j.jad.2009.02.017>
- Capuron, L., & Miller, A. H. (2004a). Cytokines and psychopathology: Lessons from interferon- γ ? *Biological Psychiatry*, 56(11), 819–824. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.02.009>
- Capuron, L., & Miller, A. H. (2004b). Cytokines and psychopathology: lessons from interferon-alpha. *Biological Psychiatry*, 56(11), 819–824. <http://doi.org/S0006322304001878> [pii] 10.1016/j.biopsych.2004.02.009
- Capuron, L., & Miller, A. H. (2011). Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacology and Therapeutics*, 130(2), 226–238. [http://doi.org/S0163-7258\(11\)00047-7](http://doi.org/S0163-7258(11)00047-7) [pii]10.1016/j.pharmthera.2011.01.014
- Capuron, L., & Miller, A. H. (2011). Immune system to brain signaling: Neuropsychopharmacological implications. *Pharmacology and Therapeutics*, 130(2), 226–238. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.014>
- Capuron, L., Neurauter, G., Musselman, D. L., Lawson, D. H., Nemeroff, C. B., Fuchs, D., & Miller, A. H. (2003). Interferon-alpha-induced changes in tryptophan

metabolism. relationship to depression and paroxetine treatment. *Biological Psychiatry*, 54(9), 906–914. <http://doi.org/S0006322303001732> [pii]

Capuron, L., Neurauter, G., Musselman, D. L., Lawson, D. H., Nemeroff, C. B., Fuchs, D., & Miller, A. H. (2003). Interferon-alpha-induced changes in tryptophan metabolism: Relationship to depression and paroxetine treatment. *Biological Psychiatry*, 54(9), 906–914. [http://doi.org/10.1016/S0006-3223\(03\)00173-2](http://doi.org/10.1016/S0006-3223(03)00173-2)

Capuron, L., Pagnoni, G., Demetrashvili, M. F., Lawson, D. H., Fornwalt, F. B., Woolwine, B., ... Miller, A. H. (2007). Basal ganglia hypermetabolism and symptoms of fatigue during interferon-alpha therapy. *Neuropsychopharmacology*, 32(11), 2384–2392. <http://doi.org/1301362> [pii] 10.1038/sj.npp.1301362

Capuron, L., Pagnoni, G., Drake, D. F., Woolwine, B. J., Spivey, J. R., Crowe, R. J., ... Miller, A. H. (2012). Dopaminergic mechanisms of reduced basal ganglia responses to hedonic reward during interferon alfa administration. *Archives of General Psychiatry*, 69(10), 1044–53. <http://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.2094>

Capuron, L., Poitou, C., Machaux-Tholliez, D., Frochot, V., Bouillot, J. L., Basdevant, A., ... Clement, K. (2011). Relationship between adiposity, emotional status and eating behaviour in obese women: role of inflammation. *Psychological Medicine*, 41(7), 1517–1528. <http://doi.org/S0033291710001984> [pii] 10.1017/S0033291710001984

Capuron, L., Ravaud, A., Neveu, P. J., Miller, A. H., Maes, M., & Dantzer, R. (2002). Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy.

Molecular Psychiatry, 7(5), 468–473. <http://doi.org/10.1038/sj.mp.4000995>

Capuron, L., Schroecksnadel, S., F?art, C., Aubert, A., Higuere, D., Barberger-Gateau, P., ... Fuchs, D. (2011). Chronic low-grade inflammation in elderly persons is associated with altered tryptophan and tyrosine metabolism: Role in neuropsychiatric symptoms. *Biological Psychiatry*, 70(2), 175–182. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.12.006>

Capuron, L., Schroecksnadel, S., Feart, C., Aubert, A., Higuere, D., Barberger-Gateau, P., ... Fuchs, D. (2011). Chronic low-grade inflammation in elderly persons is associated with altered tryptophan and tyrosine metabolism: role in neuropsychiatric symptoms. *Biological Psychiatry*, 70(2), 175–182. [http://doi.org/S0006-3223\(10\)01278-3](http://doi.org/S0006-3223(10)01278-3) [pii] 10.1016/j.biopsych.2010.12.006

Carlson, L. E., Speca, M., Patel, K. D., & Goodey, E. (2003). Mindfulness-based stress reduction in relation to quality of life, mood, symptoms of stress, and immune parameters in breast and prostate cancer outpatients. *Psychosomatic Medicine*, 65(4), 571–581. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12883107

Casadevall, A., & Pirofski, L. A. (2003). Antibody-mediated regulation of cellular immunity and the inflammatory response. *Trends Immunol*, 24(9), 474–478. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12967670

Celik, C., Erdem, M., Cayci, T., Ozdemir, B., Ozgur Akgul, E., Kurt, Y. G., ... Ozsahin, A. (2010). The association between serum levels of neopterin and number of

depressive episodes of major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(2), 372–375.

<http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.01.002>

Chance, W. T., Sheriff, S., Dayal, R., & Balasubramaniam, A. (2003). Refractory hypothalamic alpha-mSH satiety and AGRP feeding systems in rats bearing MCA sarcomas. *Peptides*, 24(12), 1909–1919. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15127942

Chizzonite, R., Truitt, T., Podlaski, F. J., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M., Nunes, P., ... Gately, M. K. (1991). IL-12: monoclonal antibodies specific for the 40-kDa subunit block receptor binding and biologic activity on activated human lymphoblasts. *Journal of Immunology*, 147(5), 1548–1556. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1715362

Cole, S. W., Conti, G., Arevalo, J. M. G., Ruggiero, A. M., Heckman, J. J., & Suomi, S. J. (2012). Transcriptional modulation of the developing immune system by early life social adversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50), 20578–83.

<http://doi.org/10.1073/pnas.1218253109>

Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7), 1073–1081.

<http://doi.org/10.1093/carcin/bgp127>

Conversano, C., Carmassi, C., Carlini, M., Casu, G., Gremigni, P., & Dell’Osso, L.

(2015). Interferon ?? therapy in patients with chronic hepatitis C infection: Quality of life and depression. *Hematology Reports*, 7(1), 5–8.
<http://doi.org/10.4081/hr.2015.5632>

Courtier, N., Gambling, T., Enright, S., Barrett-Lee, P., Abraham, J., & Mason, M. D. (2013). Psychological and immunological characteristics of fatigued women undergoing radiotherapy for early-stage breast cancer. *Supportive Care in Cancer*, 21(1), 173–181. <http://doi.org/10.1007/s00520-012-1508-6>

Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860–7. <http://doi.org/10.1038/nature01322>

Cunha, A. B. M., Frey, B. N., Andrezza, A. C., Goi, J. D., Rosa, A. R., Gonçalves, C. A., ... Kapczinski, F. (2006). Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neuroscience Letters*, 398(3), 215–219. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.12.085>

Dadomo, H., Sanghez, V., Di Cristo, L., Lori, A., Ceresini, G., Malinge, I., ... Di, L. (2011). Vulnerability to chronic subordination stress-induced depression-like disorders in adult 129SvEv male mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35(6), 1461–71.
<http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.016>

Dadomo, H., Sanghez, V., Di, L., Lori, A., Ceresini, G., Malinge, I., ... Bartolomucci, A. (2010). Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry Vulnerability to chronic subordination stress-induced depression-like disorders in adult 129SvEv male mice. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.016>

Dantzer, R. (2001). Cytokine-Induced Sickness Behavior: Where Do We Stand? *Brain*,

- Behavior, and Immunity*, 15(1), 7–24. <http://doi.org/10.1006/brbi.2000.0613>
- Dantzer, R. (2004). Innate immunity at the forefront of psychoneuroimmunology. *Brain, Behavior, and Immunity*, 18(1), 1–6. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14651940
- Dantzer, R., Aubert, A., Bluthé, R. M., Gheusi, G., Cremona, S., Layé, S., ... Kelley, K. W. (1999). Mechanisms of the behavioural effects of cytokines. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 461, 83–105. <http://doi.org/10.1097/00008877-199605001-00052>
- Dantzer, R., Bluthé, R. M., Gheusi, G., Cremona, S., Layé, S., Parnet, P., & Kelley, K. W. (1998). Molecular basis of sickness behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 856, 132–138. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9917873
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, 9(1), 46–56. <http://doi.org/nrn2297> [pii]10.1038/nrn2297
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(1), 46–56. <http://doi.org/10.1038/nrn2297>
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Lawson, M. a, & Kelley, K. W. (2011). Inflammation-associated depression: from serotonin to kynurenine.

Psychoneuroendocrinology, 36(3), 426–36.

<http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.09.012>

Das, P. K., van den Wijngaard, R. M., Wankowicz-Kalinska, a, & Le Poole, I. C. (2001). A symbiotic concept of autoimmunity and tumour immunity: lessons from vitiligo. *Trends in Immunology*, 22(3), 130–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11286727>

De La Garza, R. (2005). Endotoxin- or pro-inflammatory cytokine-induced sickness behavior as an animal model of depression: focus on anhedonia . *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 761–770. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.016>

De Miguel, Z., Vegas, O., Garmendia, L., Arregi, A., Beitia, G., & Azpiroz, A. (2011). Behavioral coping strategies in response to social stress are associated with distinct neuroendocrine, monoaminergic and immune response profiles in mice. *Behavioural Brain Research*, 225(2), 554–61. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.08.011>

De Raedt, R. (2006). Does neuroscience hold promise for the further development of behavior therapy? The case of emotional change after exposure in anxiety and depression. *Scandinavian Journal of Psychology*, 47(3), 225–236. <http://doi.org/SJOP511> [pii] 10.1111/j.1467-9450.2006.00511.x

Demetrikopoulos, M. K., Keller, S. E., & Schleifer, S. J. (1999). Stress effects on immune function in rodents. In *Psychoneuroimmunology: an interdisciplinary approach* (pp. 259–275). Nueva York: Plenum Press. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10868697

- Dhabhar, F. S. (2009). Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation*, *16*(5), 300–317. <http://doi.org/000216188> [pii]10.1159/000216188
- Dhabhar, F. S., Saul, A. N., Daugherty, C., Holmes, T. H., Bouley, D. M., & Oberszyn, T. M. (2010). Short-term stress enhances cellular immunity and increases early resistance to squamous cell carcinoma. *Brain, Behavior, and Immunity*, *24*(1), 127–37. [http://doi.org/S0889-1591\(09\)00426-7](http://doi.org/S0889-1591(09)00426-7) [pii]10.1016/j.bbi.2009.09.004
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K., & Lanctot, K. L. (2010). A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biological Psychiatry*, *67*(5), 446–457. [http://doi.org/S0006-3223\(09\)01229-3](http://doi.org/S0006-3223(09)01229-3) [pii] 10.1016/j.biopsych.2009.09.033
- Duarte, F. S., Andrade Eda, S., Vieira, R. A., Uieara, M., Nunes, R. J., & de Lima, T. C. (2006). Synthesis and antidepressant-like action of stereoisomers of imidobenzenesulfonylaziridines in mice evaluated in the forced swimming test. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *14*(15), 5397–5401.
- Duman, R. S., Heninger, G. R., & Nestler, E. J. (1997). A molecular and cellular theory of depression. *Archives of General Psychiatry*, *54*(7), 597–606.
- Duman, R. S., & Monteggia, L. M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological Psychiatry*, *59*(12), 1116–27. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.02.013>
- Dunlop BW, & Nemeroff CB. (2007). The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Archives of General Psychiatry*, *64*(3), 327–337. <http://doi.org/10.1001/archpsyc.64.3.327>

- Dunn, A. J., Swiergiel, A. H., de Beaufrepaire, R., & Beaufrepaire, R. de. (2005). Cytokines as mediators of depression: What can we learn from animal studies? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 891–909. [http://doi.org/S0149-7634\(05\)00053-9](http://doi.org/S0149-7634(05)00053-9) [pii]10.1016/j.neubiorev.2005.03.023
- Duval, F., Mokrani, M., Champeval, C., Schulz, P., & Macher, J. (2006). Cortisol hypersecretion in unipolar major depression with melancholic and psychotic features : Dopaminergic , noradrenergic and thyroid correlates, 876–888. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2006.04.003>
- Eisenthal, A., Cameron, R. B., & Rosenberg, S. A. (1990). Induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity in vivo by IFN-alpha and its antitumor efficacy against established B16 melanoma liver metastases when combined with specific anti-B16 monoclonal antibody. *Journal of Immunology*, 144(11), 4463–4471. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2111349
- Elizalde, N., Gil-Bea, F. J., Ramírez, M. J., Aisa, B., Lasheras, B., Del Rio, J., & Tordera, R. M. (2008). Long-lasting behavioral effects and recognition memory deficit induced by chronic mild stress in mice: Effect of antidepressant treatment. *Psychopharmacology*, 199(1), 1–14. <http://doi.org/10.1007/s00213-007-1035-1>
- Epstein, D. H., Preston, K. L., Stewart, J., & Shaham, Y. (2006). Toward a model of drug relapse: An assessment of the validity of the reinstatement procedure. *Psychopharmacology*, 189(1), 1–16. <http://doi.org/10.1007/s00213-006-0529-6>

- Evans, D. L., Charney, D. S., Lewis, L., Golden, R. N., Gorman, J. M., Krishnan, K. R., ... Tibbits Jr., P. (2005). Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biological Psychiatry*, *58*(3), 175–189. [http://doi.org/S0006-3223\(05\)00574-3](http://doi.org/S0006-3223(05)00574-3) [pii]10.1016/j.biopsych.2005.05.001
- Felger, J. C., & Lotrich, F. E. (2013). Inflammatory cytokines in depression: Neurobiological mechanisms and therapeutic implications. *Neuroscience*, *246*, 199–229. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.060>
- Felger, J. C., & Miller, A. H. (2012). Cytokine effects on the basal ganglia and dopamine function: The subcortical source of inflammatory malaise. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *33*(3), 315–327. <http://doi.org/10.1016/j.yfrne.2012.09.003>
- Felten, D. L., Felten, S. Y., Carlson, S. L., Olschowka, J. A., & Livnat, S. (1985). Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *Journal of Immunology*, *135*(2 Suppl), 755s–765s. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2861231
- Frank, M. G., Miguel, Z. D., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2010). Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to E. coli lipopolysaccharide. *Brain, Behavior, and Immunity*, *24*(1), 19–30. [http://doi.org/S0889-1591\(09\)00386-9](http://doi.org/S0889-1591(09)00386-9) [pii] 10.1016/j.bbi.2009.07.008
- Frenois, F., Moreau, M., O'Connor, J., Lawson, M., Micon, C., Lestage, J., ... Castanon, N. (2007). Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior.

Psychoneuroendocrinology, 32(5), 516–31.

<http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.03.005>

Garsen, B., & Goodkin, K. (1999). On the role of immunological factors as mediators between psychosocial factors and cancer progression. *Psychiatry Research*, 85(1), 51–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10195316>

Gately, M. K., Desai, B. B., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M., Dwyer, C. M., Podlaski, F. J., ... al., E. (1991). Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *Journal of Immunology*, 147(3), 874–882. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1713608

Gazal, M., Souza, L. D., Fucolo, B. A., Wiener, C. D., Silva, R. A., Pinheiro, R. T., ... Kaster, M. P. (2013). The impact of cognitive behavioral therapy on IL-6 levels in unmedicated women experiencing the first episode of depression: A pilot study. *Psychiatry Research*, 209(3), 742–745. <http://doi.org/10.1016/j.psychres.2013.03.002>

Geller, A. C., Annas, G. D., & Geller, A. C. (2003). Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Seminars in Oncology Nursing*, 19(1), 2–11. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12638376

Glaser, R., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2005). Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol*, 5(3), 243–251.

<http://doi.org/nri1571> [pii]10.1038/nri1571

Golde, W. T., Gollobin, P., & Rodriguez, L. L. (2005). TECHNIQUE A rapid , simple , and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim (NY)*, *34*(9), 39–43. <http://doi.org/labani005-39> [pii] 10.1038/labani005-39

Golden, J., O'Dwyer, A. M., & Conroy, R. M. (2005). Depression and anxiety in patients with hepatitis C: Prevalence, detection rates and risk factors. *General Hospital Psychiatry*, *27*(6), 431–438.
<http://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2005.06.006>

Gómez de la Concha, E., Puch, C., Viñuela, J., & Subiza, J. L. (1987). Mecanismos inmunológicos en la destrucción tumoral. *Rev Cancer*, *1*, 97–101.

Gómez-Lázaro, E., Arregi, A., Beitia, G., Vegas, O., Azpiroz, A., Garmendia, L., & Gomez-Lazaro, E. (2011). Individual differences in chronically defeated male mice: Behavioral, endocrine, immune, and neurotrophic changes as markers of vulnerability to the effects of stress. *Stress*, *14*(5), 537–548.
<http://doi.org/10.3109/10253890.2011.562939>

Gomez-Lazaro, R., del Romero, J., Castilla, J., Rodriguez, C., Garcia, S., Clavo, P., & Ballesteros, J. (2001). [HIV seroprevalence and exposure categories among adolescents tested at a sexually transmitted clinic diseases. Madrid, 1986-2000]. *Gaceta Sanitaria*, *15*(3), 202–208. Retrieved from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11423023

Gong, J., Chen, D., Kashiwaba, M., & Kufe, D. (1997). Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nature*

Medicine, 3(5), 558–561. Retrieved from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9142127

Gosselin, R. D., Gibney, S., O'Malley, D., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2009). Region specific decrease in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the brain of a rat model of depression. *Neuroscience*, 159(2), 915–925.

<http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.10.018>

Haddad, J. J. (2008). On the mechanisms and putative pathways involving neuroimmune interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 370(4), 531–5.

<http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.012>

Hammen, C., Kim, E. Y., Eberhart, N. K., & Brennan, P. A. (2009). Chronic and acute stress and the prediction of major depression in women. *Depression and Anxiety*, 26(8), 718–723.

<http://doi.org/10.1002/da.20571>

Hardingham, G. E., & Bading, H. (2002). Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1600(1-2), 148–153.

[http://doi.org/10.1016/S1570-9639\(02\)00455-7](http://doi.org/10.1016/S1570-9639(02)00455-7)

Hashimoto, R., Nagatsu, T., Ohta, T., Mizutani, M., & Omura, I. (2004). Changes in the concentrations of tetrahydrobiopterin, the cofactor of tyrosine hydroxylase, in blood under physical stress and in depression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1018, 378–386.

<http://doi.org/10.1196/annals.1296.047>

Hayley, S., Poulter, M. O., Merali, Z., & Anisman, H. (2005). The pathogenesis of clinical depression: stressor- and cytokine-induced alterations of

neuroplasticity. *Neuroscience*, 135(3), 659–78.

<http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.03.051>

Heffner, K. L., Loving, T. J., Robles, T. F., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2003). Examining psychosocial factors related to cancer incidence and progression: in search of the silver lining. *Brain, Behavior, and Immunity*, 17, S109–11. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12615195

Hiles, S. a, Baker, A. L., de Malmanche, T., & Attia, J. (2012). A meta-analysis of differences in IL-6 and IL-10 between people with and without depression: exploring the causes of heterogeneity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(7), 1180–8. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.06.001>

Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., ... Kishimoto, T. (1985). Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(16), 5490–5494. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2410927

Hofbauer, G. F., Schaefer, C., Noppen, C., Boni, R., Kamarashev, J., Nestle, F. O., ... Dummer, R. (1997). MAGE-3 immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *American Journal of Pathology*, 151(6), 1549–1553. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9403705

- Holsboer, F. (2000). The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 23(5), 477–501. [http://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00159-7](http://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00159-7)
- Houghton, A. N., Gold, J. S., & Blachere, N. E. (2001). Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Current Opinion in Immunology*, 13, 134–140.
- Howren, M. B., Lamkin, D. M., & Suls, J. (2009). Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosomatic Medicine*, 71(2), 171–186. <http://doi.org/10.1097/PSY.0b013e3181907c1b>
- Hsu, D. T., Langenecker, S. A., Kennedy, S. E., Zubieta, J. K., & Heitzeg, M. M. (2010). FMRI BOLD responses to negative stimuli in the prefrontal cortex are dependent on levels of recent negative life stress in major depressive disorder. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, 183(3), 202–208. <http://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2009.12.002>
- Jafari, P., & Khansari, D. N. (1990). Detection of somatotropin receptors on human monocytes. *Immunology Letters*, 24(3), 199–202. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2384262
- Jessop, D. S. (2002). Neuropeptides in the immune system: functional roles in health and disease. *Frontiers of Hormone Research*, 29, 50–68. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11789348
- Jick, H., Kaye, J. a, & Jick, S. S. (2004). Antidepressants and the Risk of Suicidal Behaviors. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 292(3), 1–

6. <http://doi.org/10.1001/jama.292.3.338>

Joana, P. T., Amaia, A., Arantza, A., Garikoitz, B., Eneritz, G. L., & Larraitz, G. (2016). Central immune alterations in passive strategy following chronic defeat stress. *Behavioural Brain Research*, *298*, 291–300.
<http://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.11.015>

Kara, S., Yazici, K. M., Güleç, C., & Ünsal, I. (2000). Mixed anxiety-depressive disorder and major depressive disorder: Comparison of the severity of illness and biological variables. *Psychiatry Research*, *94*(1), 59–66.
[http://doi.org/10.1016/S0165-1781\(00\)00131-1](http://doi.org/10.1016/S0165-1781(00)00131-1)

Karege, F., Bondolfi, G., Gervasoni, N., Schwald, M., Aubry, J. M., & Bertschy, G. (2005). Low Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biological Psychiatry*, *57*(9), 1068–1072.
<http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.01.008>

Karlović, D., Serretti, A., Vrkić, N., Martinac, M., & Marčinko, D. (2012). Serum concentrations of CRP, IL-6, TNF- α and cortisol in major depressive disorder with melancholic or atypical features. *Psychiatry Research*, *198*(1), 74–80.
<http://doi.org/10.1016/j.psychres.2011.12.007>

Kaster, M. P., Gadotti, V. M., Calixto, J. B., Santos, A. R. S., & Rodrigues, A. L. S. (2012). Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- α in mice. *Neuropharmacology*, *62*(1), 419–426.
<http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.018>

Kawamura, I., Morishita, R., Tomita, N., Lacey, E., Aketa, M., Tsujimoto, S., ... Oghihara, T. (1999). Intratumoral injection of oligonucleotides to the NF kappa B

binding site inhibits cachexia in a mouse tumor model. *Gene Ther*, 6(1), 91–97.
<http://doi.org/10.1038/sj.gt.3300819>

Kessler, R. C., Aguilar-Gaxiola, S., Alonso, J., Chatterji, S., Lee, S., Ormel, J., ... Wang, P. S. (2009). The global burden of mental disorders: an update from the WHO World Mental Health (WMH) surveys. *Epidemiologia E Psichiatria Sociale*, 18(1), 23–33. <http://doi.org/10.1017/S1121189X00001421>

Khandaker, G. M., Pearson, R. M., Zammit, S., Lewis, G., & Jones, P. B. (2014). Association of serum interleukin 6 and C-reactive protein in childhood with depression and psychosis in young adult life. *JAMA Psychiatry*, 71(10), 1121–1128. <http://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.1332>

Kiecolt-Glaser, J. K., Preacher, K. J., MacCallum, R. C., Atkinson, C., Malarkey, W. B., & Glaser, R. (2003). Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 9090–9095.
<http://doi.org/10.1073/pnas.15319031001531903100> [pii]

Kim, Y. K., Na, K. S., Shin, K. H., Jung, H. Y., Choi, S. H., & Kim, J. B. (2007). Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 31(5), 1044–1053.
<http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.03.004>

King, M., Spooner, D., & Rowlands, D. C. (2001). Spontaneous regression of metastatic malignant melanoma of the parotid gland and neck lymph nodes: a case report and a review of the literature. *Clinical Oncology (Royal College of Radiologists)*, 13(6), 466–469. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&>

dopt=Citation&list_uids=11824888

Kleinsmith, J. L., Kerrigan, D., & Spangler, S. (2003). Understanding Cancer.

Retrieved from <http://press2.nci.nih.gov/sciencebehind/cancer/cancer01.htm>

Konsman, J. P., Parnet, P., & Dantzer, R. (2002). Cytokine-induced sickness

behaviour: Mechanisms and implications. *Trends in Neurosciences*, 25(3), 154–159. [http://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)02088-9](http://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)02088-9)

Krishnan, V., & Nestler, E. J. (2008). The molecular neurobiology of depression.

Nature, 455(7215), 894–902. <http://doi.org/10.1038/nature07455>

Kudryavtseva, N. N., Bakshantovskaya, I. V., & Koryakina, L. A. (1991). Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 38(2), 315–320. Retrieved from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2057501

Lamkin, D. M., Lutgendorf, S. K., Lubaroff, D., Sood, A. K., Beltz, T. G., & Johnson, A.

K. (2011). Cancer induces inflammation and depressive-like behavior in the mouse: modulation by social housing. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(3), 555–64. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.12.010>

LAVIANO, A., MEGUID, M. M., YANG, Z., GLEASON, J. R., CANGIANO, C., & FANELLI, F. R. (1996). Cracking the riddle of cancer anorexia, 12(10).

Lazar-Molnar, E., Hegyesi, H., Toth, S., Falus, A., Lázár-Molnár, E., & Tóth, S. (2000).

Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine*, 12(6), 547–554. <http://doi.org/10.1006/cyto.1999.0614>

Lee, B. N., Dantzer, R., Langley, K. E., Bennett, G. J., Payne, R., Dougherty, P. M., ...

- Cleeland, C. S. (2004). A cytokine-based neuroimmunologic mechanism of cancer-related symptoms.
- Lindh, B., Lundberg, J. M., & Hokfelt, T. (1989). NPY-, galanin-, VIP/PHI-, CGRP- and substance P-immunoreactive neuronal subpopulations in cat autonomic and sensory ganglia and their projections. *Cell and Tissue Research*, 256(2), 259–273. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2471596
- Liu, Y., Ho, R. C. M., & Mak, A. (2012). Interleukin (IL)-6, tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) are elevated in patients with major depressive disorder: A meta-analysis and meta-regression. *Journal of Affective Disorders*, 139(3), 230–239. <http://doi.org/10.1016/j.jad.2011.08.003>
- Loftis, J. M., Patterson, A. L., Wilhelm, C. J., McNett, H., Morasco, B. J., Huckans, M., ... Hauser, P. (2013). Vulnerability to somatic symptoms of depression during interferon-alpha therapy for hepatitis C: A 16-week prospective study. *Journal of Psychosomatic Research*, 74(1), 57–63. <http://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2012.10.012>
- Low, C. A., Bovbjerg, D. H., Jenkins, F. J., Ahrendt, S. A., Choudry, H. A., Holtzman, M. P., ... Bartlett, D. L. (2014). Preoperative inflammatory biomarkers and neurovegetative symptoms in peritoneal carcinomatosis patients. *Brain, Behavior, and Immunity*, 42, 65–68. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.06.019>
- Lutgendorf, S. K., Weinrib, A. Z., Penedo, F., Russell, D., DeGeest, K., Costanzo, E. S., ... Lubaroff, D. M. (2008). Interleukin-6, cortisol, and depressive symptoms in

ovarian cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, 26(29), 4820–4827.
<http://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.1978>

Maes, M. (1995). Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 19(1), 11–38. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7708925>

Maes, M., Berk, M., Goehler, L., Song, C., Anderson, G., Gałeczki, P., & Leonard, B. (2012). Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. *BMC Medicine*, 10(December), 66.
<http://doi.org/10.1186/1741-7015-10-66>

Maier, S. F., & Watkins, L. R. (2003). Immune-to-central nervous system communication and its role in modulating pain and cognition: Implications for cancer and cancer treatment. *Brain, Behavior, and Immunity*, 17, S125–31. Retrieved from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12615198

Majer, M., Welberg, L. A. M., Capuron, L., Pagnoni, G., Raison, C. L., & Miller, A. H. (2008). IFN-alpha-induced motor slowing is associated with increased depression and fatigue in patients with chronic hepatitis C. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(6), 870–880. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.12.009>

Mamounas, L. a, Altar, C. a, Blue, M. E., Kaplan, D. R., Tessarollo, L., & Lyons, W. E. (2000). BDNF promotes the regenerative sprouting, but not survival, of injured serotonergic axons in the adult rat brain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(2), 771–782.

- Martinez, M., Calvo-torrent, A., & Pico-alfonso, M. A. (1998). Social Defeat and Subordination as Models of Social Stress in Laboratory Rodents : A Review, *24*(November 1997), 241–256.
- Mayorga, A. J., & Lucki, I. (2001). Limitations on the use of the C57BL/6 mouse in the tail suspension test. *Psychopharmacology*, *155*(1), 110–112.
<http://doi.org/10.1007/s002130100687>
- McCarthy, W. H., Shaw, H. M., & Milton, G. W. (1978). Spontaneous regression of metastatic malignant melanoma. *Clinical Oncology*, *4*(3), 203–207. Retrieved from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=750122
- McEwen, B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological Reviews*, *87*(3), 873–904.
<http://doi.org/87/3/873> [pii] 10.1152/physrev.00041.2006
- Meichenbaum, D. (2007). Stress inoculation training: a preventative and treatment approach. In R. L. W. & W. S. S. P. M. Lehrer (Ed.), *Principles and Practice of Stress Management* (3rd ed., pp. 497–518). New York: Guilford Press.
- Merali, Z., Levac, C., & Anisman, H. (2003). Validation of a simple, ethologically relevant paradigm for assessing anxiety in mice. *Biological Psychiatry*, *54*(5), 552–565. <http://doi.org/S0006322302018279> [pii]
- Miller, A. H. (2003). Cytokines and sickness behavior: implications for cancer care and control. *Brain, Behavior, and Immunity*, *17*, S132–4. Retrieved from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12615199

- Miller, A. H. (2009). Norman Cousins Lecture. Mechanisms of cytokine-induced behavioral changes: psychoneuroimmunology at the translational interface. *Brain, Behavior, and Immunity*, *23*(2), 149–58. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.08.006>
- Miller, A. H., Maletic, V., & Raison, C. L. (2009). Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biological Psychiatry*, *65*(9), 732–41. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.11.029>
- Miller, A. H., & Raison, C. L. (2016). The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nature Reviews Immunology*, *16*(1), 22–34. <http://doi.org/10.1038/nri.2015.5>
- Monteggia, L. M., Barrot, M., Powell, C. M., Berton, O., Galanis, V., Gemelli, T., ... Nestler, E. J. (2004). Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(29), 10827–32. <http://doi.org/10.1073/pnas.0402141101>
- Monteleone, P., Serritella, C., Martiadis, V., & Maj, M. (2008). Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in both depressed and euthymic patients with unipolar depression and in euthymic patients with bipolar I and II disorders. *Bipolar Disorders*, *10*(1), 95–100. <http://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2008.00459.x>
- Moreno, F. a, Parkinson, D., Palmer, C., Lesley, W., Ph, D., Misiaszek, J., ... Delgado, P. L. (2010). CSF Neurochemicals During Tryptophan Depletion in Individuals with Remitted Depression and Healthy Controls, *20*(1), 18–24. <http://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2009.10.003.CSF>

- Moretti, S., Chiarugi, A., Semplici, F., Salvi, A., De Giorgi, V., Fabbri, P., & Mazzoli, S. (2001). Serum imbalance of cytokines in melanoma patients.
- Moynihan, J. A. (2003). Mechanisms of stress-induced modulation of immunity. *Brain, Behavior, and Immunity*, *17*(1 SUPPL.), 11–16.
[http://doi.org/10.1016/S0889-1591\(02\)00060-0](http://doi.org/10.1016/S0889-1591(02)00060-0)
- Müller, N., & Schwarz, M. J. (2007). The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. *Molecular Psychiatry*, *12*(11), 988–1000. <http://doi.org/10.1038/sj.mp.4002006>
- Munn, D. H., & Mellor, A. L. (2013). Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends in Immunology*, *34*(3), 137–143.
<http://doi.org/10.1016/j.it.2012.10.001>
- Murphy, F., Smith, K., Cowen, P., Robbins, T., & Sahakian, B. (2002). The effects of tryptophan depletion on cognitive and affective processing in healthy volunteers. *Psychopharmacology*, *163*(1), 42–53.
<http://doi.org/10.1007/s00213-002-1128-9>
- Musselman DL, Lawson DH, Gumnick JF, Manatunga AK, Penna S, Goodkin RS, et al. (2001). Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa, *344*(13), 961–966.
- Myint, A. M., Kim, Y. K., Verkerk, R., Scharpé, S., Steinbusch, H., & Leonard, B. (2007). Kynurenine pathway in major depression: Evidence of impaired neuroprotection. *Journal of Affective Disorders*, *98*(1-2), 143–151.
<http://doi.org/10.1016/j.jad.2006.07.013>
- Myint, A. M., Schwarz, M. J., & Müller, N. (2012). The role of the kynurenine metabolism in major depression. *Journal of Neural Transmission*, *119*(2), 245–

251. <http://doi.org/10.1007/s00702-011-0741-3>

Naylor, M. S., Stamp, G. W., Foulkes, W. D., Eccles, D., & Balkwill, F. R. (1993).

Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. *The Journal of Clinical Investigation*, *91*(5), 2194–206.

<http://doi.org/10.1172/JCI116446>

Nemeroff, C. B. (1996). Augmentation strategies in patients with refractory depression. *Depression and Anxiety*, *4*(4), 169–181.

[http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6394\(1996\)4:4<169::AID-DA3>3.0.CO;2-A](http://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6394(1996)4:4<169::AID-DA3>3.0.CO;2-A)

Nestle, F. O., Burg, G., & Dummer, R. (1999). New perspectives on immunobiology and immunotherapy of melanoma. *Immunology Today*, *20*(1), 5–7. Retrieved from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10081221

Nestler, E. J., Gould, E., Manji, H., Buncan, M., Duman, R. S., Greshenfeld, H. K., ... Zalcman, S. (2002). Preclinical models: status of basic research in depression. *Biological Psychiatry*, *52*(6), 503–528.

Neumeister, A., Yuan, P., Young, T. A., Bonne, O., Luckenbaugh, D. A., Charney, D. S., & Manji, H. (2005). Effects of tryptophan depletion on serum levels of brain-derived neurotrophic factor in unmedicated patients with remitted depression and healthy subjects. *American Journal of Psychiatry*, *162*(4), 805–807.

<http://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.4.805>

Neurauter, G., Grahmann, A. V., Klieber, M., Zeimet, A., Ledochowski, M., Sperner-Unterweger, B., & Fuchs, D. (2008). Serum phenylalanine concentrations in patients with ovarian carcinoma correlate with concentrations of immune

activation markers and of isoprostane-8. *Cancer Letters*, 272(1), 141–147.
<http://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.07.002>

Norden, D. M., Bicer, S., Clark, Y., Jing, R., Henry, C. J., Wold, L. E., ... McCarthy, D. O. (2015). Tumor growth increases neuroinflammation, fatigue and depressive-like behavior prior to alterations in muscle function. *Brain, Behavior, and Immunity*, 43, 76–85. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.07.013>

O'Connor, J. C., Andre, C., Wang, Y., Lawson, M. A., Szegedi, S. S., Lestage, J., ... Connor, J. C. O. (2009). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. *Journal of Neuroscience*, 29(13), 4200–4209. <http://doi.org/29/13/4200> [pii]10.1523/JNEUROSCI.5032-08.2009

O'Connor, J. C., André, C., Wang, Y., Lawson, M. A., Szegedi, S. S., Lestage, J., ... Dantzer, R. (2009). Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Mediate the Upregulation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and the Induction of Depressive-Like Behavior in Mice in Response to Bacillus Calmette-Guérin. *The Journal of Neuroscience*, 29(13), 4200–4209. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5032-08.2009>

O'Connor, J. C., Lawson, M. a, André, C., Briley, E. M., Szegedi, S. S., Lestage, J., ... Andre, C. (2009). Induction of IDO by bacille Calmette-Guerin is responsible for development of murine depressive-like behavior. *Journal of Immunology*, 182(5), 3202–3212. <http://doi.org/182/5/3202> [pii] 10.4049/jimmunol.0802722

O'Connor, J. C., Lawson, M. A., Andre, C., Moreau, M., Lestage, J., Castanon, N., ...

Lestaje, J. (2009). Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Molecular Psychiatry*, 14(5), 511–522. <http://doi.org/4002148>
[pii]10.1038/sj.mp.4002148

O'Connor, S. S., Beebe, T. J., Lineberry, T. W., Jobes, D. A., & Conrad, A. K. (2012). The association between the Kessler 10 and suicidality: a cross-sectional analysis. *Comprehensive Psychiatry*, 53(1), 48–53. [http://doi.org/S0010-440X\(11\)00024-1](http://doi.org/S0010-440X(11)00024-1) [pii] 10.1016/j.comppsy.2011.02.006

Oberbeck, R. (2006). Catecholamines: physiological immunomodulators during health and illness. *Current Medicinal Chemistry*, 13(17), 1979–1989. Retrieved from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16842192

Old, L. J. (1996). Immunotherapy for cancer. *Scientific American*, 275(3), 136–143. Retrieved from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8701283

Ormstad, H., Verkerk, R., Aass, H. C. D., Amthor, K. F., & Sandvik, L. (2013). Inflammation-induced catabolism of tryptophan and tyrosine in acute ischemic stroke. *Journal of Molecular Neuroscience*, 51(3), 893–902.
<http://doi.org/10.1007/s12031-013-0097-2>

Pace, T. W., Mletzko, T. C., Alagbe, O., Musselman, D. L., Nemeroff, C. B., Miller, A. H., & Heim, C. M. (2006). Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress. *American*

Journal of Psychiatry, 163(9), 1630–1633. <http://doi.org/10.1176/appi.ajp.163.9.1630>

- Parker, K. J., Schatzberg, A. F., & Lyons, D. M. (2003). Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. *Hormones and Behavior*, 43(1), 60–66. [http://doi.org/10.1016/S0018-506X\(02\)00016-8](http://doi.org/10.1016/S0018-506X(02)00016-8)
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global Cancer Statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(2), 74–108. <http://doi.org/10.3322/canjclin.55.2.74>
- Pawlik, T. M., & Sondak, V. K. (2003). Malignant melanoma: current state of primary and adjuvant treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 45(3), 245–264. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T5S-47S7003-2/2/2d3dfb8c580d5478e83be2969b8c1f9d>
- Pertl, M. M., Hevey, D., Boyle, N. T., Hughes, M. M., Collier, S., O’Dwyer, A. M., ... Connor, T. J. (2013). C-reactive protein predicts fatigue independently of depression in breast cancer patients prior to chemotherapy. *Brain, Behavior, and Immunity*, 34, 108–119. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.07.177>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11328886
- Piccinni, A., Marazziti, D., Catena, M., Domenici, L., Del Debbio, A., Bianchi, C., ... Dell’Osso, L. (2008). Plasma and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients during 1??year of antidepressant treatments. *Journal of Affective Disorders*, 105(1-3), 279–283.

<http://doi.org/10.1016/j.jad.2007.05.005>

Plata-salama, C. R. (2000). Central Nervous System Mechanisms Contributing to the Cachexia – Anorexia Syndrome, *9007(00)*.

Posternak, M. A., & Zimmerman, M. (2005). Dual reuptake inhibitors incur lower rates of tachyphylaxis than selective serotonin reuptake inhibitors: A retrospective study. *Journal of Clinical Psychiatry*, *66(6)*, 705–707.

<http://doi.org/10.4088/JCP.v66n0605>

Pyter, L. M., Cochrane, S. F., Ouwenga, R. L., Patel, P. N., Pineros, V., & Prendergast, B. J. (2010). Mammary tumors induce select cognitive impairments. *Brain, Behavior, and Immunity*, *24(6)*, 903–907.

<http://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.02.004>

Pyter, L. M., El Mouatassim Bih, S., Sattar, H., & Prendergast, B. J. (2014). Peripheral tumors alter neuroinflammatory responses to lipopolysaccharide in female rats. *Brain Research*, *1552*, 55–63.

<http://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.01.012>

Pyter, L. M., Pineros, V., Galang, J. a, McClintock, M. K., & Prendergast, B. J. (2009). Peripheral tumors induce depressive-like behaviors and cytokine production and alter hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106(22)*, 9069–74.

<http://doi.org/10.1073/pnas.0811949106>

Rabin, B. S. (1999). *Stress, Immune Function, and Health: The Connection*. Nueva York: John Wiley & Sons Inc.

Raison, C. L., Capuron, L., & Miller, A. H. (2006). Cytokines sing the blues:

Inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends in Immunology*,

27(1), 24–31. <http://doi.org/10.1016/j.it.2005.11.006>

Raison, C. L., Capuron, L., & Miller, A. H. (2006). Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol*, 27(1), 24–31. [http://doi.org/S1471-4906\(05\)00288-7](http://doi.org/S1471-4906(05)00288-7) [pii] 10.1016/j.it.2005.11.006

Raison, C. L., Dantzer, R., Kelley, K. W., Lawson, M. a, Woolwine, B. J., Vogt, G., ... Miller, a H. (2010). CSF concentrations of brain tryptophan and kynurenines during immune stimulation with IFN-alpha: relationship to CNS immune responses and depression. *Molecular Psychiatry*, 15(4), 393–403. <http://doi.org/10.1038/mp.2009.116>

Raison, C. L., Dantzer, R., Kelley, K. W., Lawson, M. A., Woolwine, B. J., Vogt, G., ... Miller, A. H. (n.d.). CSF concentrations of brain tryptophan and kynurenines during immune stimulation with IFN-alpha: relationship to CNS immune responses and depression. *Molecular Psychiatry*, 15(4), 393–403.

Raison, C. L., & Miller, A. H. (2003). Depression in cancer: New developments regarding diagnosis and treatment. *Biological Psychiatry*, 54(3), 283–294. [http://doi.org/10.1016/S0006-3223\(03\)00413-X](http://doi.org/10.1016/S0006-3223(03)00413-X)

Rajkowska, G., & Miguel-Hidalgo, J. J. (2007). Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 6(3), 219–33. <http://doi.org/10.2174/187152707780619326>

Rebeca, R., Bracht, L., Martinez, G. R. N. G. R., Cadena, S. M. S. C., & Oliveira, E. G. S. C. M. E. M. R. M. B. M. de. (2008). Production of cachexia mediators by Walker 256 cells from ascitic tumors. *Cell Biochemistry and Function*, 26(April 2007), 320–328. <http://doi.org/10.1002/cbf>

Report, C., & Sroujeh, A. S. (1988). Spontaneous regression of intestinal malignant

melanoma from an occult primary site. *Cancer*, 62(6), 1247–1250. Retrieved from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3409191

Rice, P. A., Boehm, G. W., Moynihan, J. A., Bellinger, D. L., & Stevens, S. Y. (2002). Chemical sympathectomy alters numbers of splenic and peritoneal leukocytes. *Brain, Behavior, and Immunity*, 16(1), 62–73. Retrieved from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11846441

Roitt, I., Brostoff, J., & Male, D. (1997). *Inmunología*. Madrid: Hartcourt Brace.

Rosenberg, S. A., Packard, B. S., Aebersold, P. M., Solomon, D., Topalian, S. L., Toy, S. T., ... al., E. (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *New England Journal of Medicine*, 319(25), 1676–1680. Retrieved from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3264384

Sanacora, G., Gueorguieva, R., Epperson, C. N., Wu, Y.-T., Appel, M., Rothman, D. L., ... Mason, G. F. (2004). Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Archives of General Psychiatry*, 61(7), 705–13. <http://doi.org/10.1001/archpsyc.61.7.705>

Schiepers, O. J. G., Wichers, M. C., & Maes, M. (2005). Cytokines and major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(2), 201–217. [http://doi.org/S0278-5846\(04\)00245-3](http://doi.org/S0278-5846(04)00245-3) [pii] 10.1016/j.pnpbp.2004.11.003

- Schultze-Florey, C. R., Martínez-Maza, O., Magpantay, L., Breen, E. C., Irwin, M. R., Gündel, H., & O'Connor, M. F. (2012). When grief makes you sick: Bereavement induced systemic inflammation is a question of genotype. *Brain, Behavior, and Immunity, 26*(7), 1066–1071. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.06.009>
- Scortegagna, M., Lau, E., Zhang, T., Feng, Y., Sereduk, C., Yin, H., ... Ronai, Z. A. (2015). PDK1 and SGK3 contribute to the growth of BRAF-mutant melanomas and are potential therapeutic targets. *Cancer Research, 75*(7), 1399–1412. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2785>
- Sheridan, J. (2003). The HPA axis, SNS, and immunity: a commentary. *Brain, Behavior, and Immunity, 17*, S17. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12688290
- Shi, Y., Devadas, S., Greenelch, K. M., Yin, D., Allan Mufson, R., & Zhou, J. N. (2003). Stressed to death: implication of lymphocyte apoptosis for psychoneuroimmunology. *Brain, Behavior, and Immunity, 17*, S18–26. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12615182
- Shirayama, Y., Chen, A. C.-H., Nakagawa, S., Russell, D. S., & Duman, R. S. (2002). Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, 22*(8), 3251–61. <http://doi.org/20026292>
- Sibille, E., & French, B. (2013). Biological substrates underpinning diagnosis of major

depression. *Biophysical Chemistry*, 257(5), 2432–2437.

<http://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.017>.Two-stage

Siuciak, J. A., Clark, M. S., Rind, H. B., Whittemore, S. R., & Russo, A. F. (1998). BDNF induction of tryptophan hydroxylase mRNA levels in the rat brain. *J Neurosci Res*, 52(2), 149–158. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19980415\)52:2<149::AID-JNR3>3.0.CO;2-A](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19980415)52:2<149::AID-JNR3>3.0.CO;2-A) [pii]

Slopen, N., Kubzansky, L. D., McLaughlin, K. A., & Koenen, K. C. (2013). Childhood adversity and inflammatory processes in youth: A prospective study. *Psychoneuroendocrinology*, 38(2), 188–200.

<http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.05.013>

Smith, R. S. (1991). The macrophage theory of depression. *Medical Hypotheses*, 35(4), 298–306. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1943879>

Sonino, N., & Fava, G. A. (2002). Erratum to “CNS drugs in Cushing’s disease: pathophysiological and therapeutic implications for mood disorders” [Prog. Neuro-Psychol. Biol. Psychiatry, 26, 763 (2002)]. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 26(5), 1011–1018.

Sorrells, S. F., & Sapolsky, R. M. (2007). An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(3), 259–272.

<http://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.11.006>

Sotelo, J. L., Musselman, D., & Nemeroff, C. (2014). The biology of depression in cancer and the relationship between depression and cancer progression. *International Review of Psychiatry*, 26(1), 16–30.

<http://doi.org/doi:10.3109/09540261.2013.875891>

- Soygur, H., Palaoglu, O., Akarsu, E. S., Cankurtaran, E. S., Ozalp, E., Turhan, L., & Ayhan, I. H. (2007). Interleukin-6 levels and HPA axis activation in breast cancer patients with major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 31(6), 1242–1247. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.05.001>
- Sperner-Unterweger, B., Neurauter, G., Klieber, M., Kurz, K., Meraner, V., Zeimet, A., & Fuchs, D. (2011). Enhanced tryptophan degradation in patients with ovarian carcinoma correlates with several serum soluble immune activation markers. *Immunobiology*, 216(3), 296–301. <http://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.07.010>
- Spijker, S. (2011). Dissection of Rodent Brain Regions.
- Steiner, J., Walter, M., Gos, T., Guillemin, G. J., Bernstein, H.-G., Sarnyai, Z., ... Myint, A.-M. (2011). Severe depression is associated with increased microglial quinolinic acid in subregions of the anterior cingulate gyrus: evidence for an immune-modulated glutamatergic neurotransmission? *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), 94. <http://doi.org/10.1186/1742-2094-8-94>
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3), 367–370. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3923523
- Tausk, F., Elenkov, I., & Moynihan, J. (2008). Psychoneuroimmunology. *Dermatol Ther*, 21(1), 22–31. <http://doi.org/DTH166> [pii] 10.1111/j.1529-8019.2008.00166.x

- Tursich, M., Neufeld, R. W. J., Frewen, P. A., Harricharan, S., Kibler, J. L., Rhind, S. G., & Lanius, R. A. (2014). Association of trauma exposure with proinflammatory activity: a transdiagnostic meta-analysis. *Translational Psychiatry, 4*(7), e413. <http://doi.org/10.1038/tp.2014.56>
- Unanue, E. R. (1981). The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation. Part Two: symbiotic relationship between lymphocytes and macrophages. *Advances in Immunology, 31*, 1–136. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6797272
- Valles, S. L., Benlloch, M., Rodriguez, M. L., Mena, S., Pellicer, J. A., Asensi, M., ... Estrela, J. M. (2013). Stress hormones promote growth of B16-F10 melanoma metastases: an interleukin 6- and glutathione-dependent mechanism. *Journal of Translational Medicine, 11*, 72. <http://doi.org/10.1186/1479-5876-11-72>
- van der Veen, F. M., Evers, E. A. T., Deutz, N. E. P., & Schmitt, J. A. J. (2007). Effects of acute tryptophan depletion on mood and facial emotion perception related brain activation and performance in healthy women with and without a family history of depression. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 32*(1), 216–224. <http://doi.org/10.1038/sj.npp.1301212>
- van Donkelaar, E. L., van den Hove, D. L. A., Blokland, A., Steinbusch, H. W. M., & Prickaerts, J. (2009). Stress-mediated decreases in brain-derived neurotrophic factor as potential confounding factor for acute tryptophan depletion-induced neurochemical effects. *European Neuropsychopharmacology, 19*(11), 812–821. <http://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2009.06.012>

- Vegas, O., et al., 2004. (2004). Behavioral and neurochemical responses in mice bearing tumors submitted to social stress. *Behavioural Brain Research*, *155*(1), 125–134. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.04.006>
- Vegas, O., et al., 2006. (2006). Social stress, coping strategies and tumor development in male mice: Behavioral, neuroendocrine and immunological implications. *Psychoneuroendocrinology*, *31*(1), 69–79. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2005.05.013>
- Vegas, O., Beitia, G., Sanchez-Martin, J. R., Arregi, A., Azpiroz, A., & Sánchez-Martin, J. R. (2004). Behavioral and neurochemical responses in mice bearing tumors submitted to social stress. *Behavioural Brain Research*, *155*(1), 125–134. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.04.006> S0166432804001342 [pii]
- Vegas, O., Garmendia, L., & Azpiroz, A. (2006). Social stress increases tumor development: Effects of antalarmin, a CRF type 1 receptor antagonist, and nadolol, a beta-adrenergic antagonist. *Brain, Behavior, and Immunity*, *20*(3, Supplement 1), 73. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WC1-4JXY3PH-4S/2/f604067b6411e60fa0b8c2bcecdff015>
- Villanueva, R. (2013). Neurobiology of Major Depressive Disorder, *2013*(2013), 1–8.
- Wang, H. Y., Matsui, M., Araya, S., Onai, N., Matsushima, K., & Saida, T. (2002). Chemokine receptors associated with immunity within and outside the central nervous system in early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, *133*(1-2), 184–192. <http://doi.org/S0165572802003521> [pii]
- Wang, W., Lönnroth, C., Svanberg, E., Anorexia, P., Lo, C., & Lundholm, K. (2001).

Cytokine and Cyclooxygenase-2 Protein in Brain Areas of Tumor-bearing Mice with Prostanoid-related Anorexia Cytokine and Cyclooxygenase-2 Protein in Brain Areas of Tumor-bearing Mice with, 4707–4715.

- Webster, E. L., Tracey, D. E., Jutila, M. A., Wolfe, S. A., & De Souza, E. B. (1990). Corticotropin-releasing factor receptors in mouse spleen: identification of receptor-bearing cells as resident macrophages. *Endocrinology*, *127*(1), 440–452. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2163323
- Weinberg, R. A., & Weinberg, R. A. (1996). Así se produce el cancer. *Investigación Y Ciencia*, 10–18. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8701295
- Widner, B., Laich, A., Sperner-Unterweger, B., Ledochowski, M., & Fuchs, D. (2002). Neopterin production, tryptophan degradation, and mental depression - What is the link? *Brain, Behavior, and Immunity*, *16*(5), 590–595. [http://doi.org/10.1016/S0889-1591\(02\)00006-5](http://doi.org/10.1016/S0889-1591(02)00006-5)
- Widner, B., Ledochowki, M., & Fuchs, D. (2000). Interferon- γ -induced Tryptophan Degradation: Neuropsychiatric and Immunological Consequences.
- Willis, R. (1952). *The spread of tumours in the human body*. Londres: Butterworth & Co.
- Wu, T. Y., & Fleischmann, W. R. (2001). Murine B16 melanoma vaccination-induced tumor immunity: identification of specific immune cells and functions involved. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, *21*(12), 1117–1127. Retrieved

from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11798470

Wu, W., Yamaura, T., Murakami, K., Murata, J., Matsumoto, K., Watanabe, H., & Saiki, I. (2000). Social isolation stress enhanced liver metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells by suppressing immune responses in mice. *Life Sciences*, 66(19), 1827–1838. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10809180

Wu, X. Z., Wei, H. M., Zheng, X. D., Jin, T. C., & Tian, Z. G. (2007). [Induction and mechanism study of anti-melanoma immune response by M. tuberculosis Ag85B]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 23(1), 36–38. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17210103

Xiu, L.-J., Lin, H.-M., & Wei, P.-K. (2010). The effect of chronic mild stress on tumor-bearing rats' behavior and its mechanism. *Neuroscience Letters*, 473(1), 1–4. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.06.031>

Yang, M., Kim, J., Kim, J. S., Kim, S. H., Kim, J. C., Kang, M. J., ... Moon, C. (2014). Hippocampal dysfunctions in tumor-bearing mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 36, 147–155. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.10.022>

Yang, M., Kim, J. S., Kim, J., Jang, S., Kim, S. H., Kim, J. C., ... Moon, C. (2012). Acute treatment with methotrexate induces hippocampal dysfunction in a mouse model of breast cancer. *Brain Research Bulletin*, 89(1-2), 50–56. <http://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.07.003>

- Yi, B., Rykova, M., Feuerecker, M., Jäger, B., Ladinig, C., Basner, M., ... Choukèr, A. (2014). 520-d Isolation and confinement simulating a flight to Mars reveals heightened immune responses and alterations of leukocyte phenotype. *Brain, Behavior, and Immunity, 40*, 203–210.
<http://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.03.018>
- Young, S. ., Smith, S. E., Pihl, R. O., & Ervin, F. R. (1985). Tryptophan depletion causes a rapid lowering of mood in normal males. *Psychopharmacology, 87*(2), 173–177. <http://doi.org/10.1007/BF00431803>
- Yu, H., & Chen, Z. (2011). The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. *Acta Pharmacologica Sinica, 32*(1), 3–11.
<http://doi.org/10.1038/aps.2010.184>

Bloque VIII

ANEXO

ANEXO I. CATEGORIAS CONDUCTUALES

A continuación se especifican las características que definen a cada una de las pautas conductuales del ratón (Martínez y cols., 1986):

1. CUIDADO CORPORAL:

a) *Aseo abreviado*. El animal pasa las patas delanteras desde la parte posterior de la cabeza a la nariz.

b) *Autoaseo*. El animal se lame la piel de los flancos, del abdomen y el rabo.

c) *Lavado*. El animal se lame las patas delanteras y a continuación las pasa desde las orejas a la nariz.

d) *Sacudida*. Un breve y ligero estremecimiento de todo el cuerpo.

e) *Rascarse*. El animal se rasca con las patas traseras los flancos y la cabeza.

2. ESCARBAR:

a) *Escarbar*. El animal remueve el serrín utilizando las patas delanteras.

b) *Escarbar hacia atrás*. El animal tira el serrín hacia atrás utilizando para ello las patas traseras.

c) *Escarbar hacia adelante*. El animal tira el serrín hacia adelante utilizando para ello las patas delanteras.

3. EXPLORACIÓN NO SOCIAL:

a) *Exploración*. El animal deambula dirigiendo su atención, aparentemente, hacia el ambiente físico.

b) *Salto*. El animal salta con las cuatro patas.

c) *Erguido*. El animal explora el ambiente en postura bípeda.

d) *Erguido apoyándose en la pared*. Postura similar a la anterior, excepto en que las patas delanteras las apoya en la pared de la jaula.

e) *Ojear*. El animal en posición cuadrúpeda, mueve la cabeza de un lado a otro, dirigiendo su atención al ambiente y no hacia el oponente.

4. EXPLORACIÓN A DISTANCIA:

a) *Aproximación*. El animal anda hacia el oponente dirigiendo su atención hacia éste.

b) *Atención*. El animal dirige su atención hacia el oponente desde una distancia.

c) *Círculo*. El animal hace un recorrido, acercándose y alejándose del oponente sin detenerse.

d) *Atención extrema*. Postura similar a la atención, excepto en que el animal se inclina hacia delante estirando la cabeza y el cuello.

e) *Cabeza orientada*. El animal gira la cabeza hacia el oponente.

5. EXPLORACIÓN SOCIAL:

a) *Andando encima*. El animal pasa por encima del oponente, apoyando las patas delanteras sobre su lomo.

b) *Andando debajo*. El animal mete la cabeza y parte anterior del cuerpo debajo del oponente.

c) *Andando alrededor*. El animal se mueve alrededor del oponente con la cabeza dirigida hacia éste.

d) *Seguimiento*. El animal camina detrás del oponente que se aleja.

e) *Empujando*. Los dos animales, en un momento del recorrido, llegan a contactar lateralmente.

f) *Aseo corporal*. El animal, usando la boca, asea al oponente en alguna región del cuerpo, excepto la cabeza.

g) *Aseo de la cabeza*. El animal asea la cabeza del oponente.

h) *Olfateo corporal*. El animal olfatea alguna región del cuerpo del oponente, excepto la cabeza.

i) *Olfateo de la nariz*. El animal olfatea la cabeza o la nariz del oponente.

j) *Olfateo ano-genital*. El animal olfatea la región ano-genital del oponente.

6. AMENAZA:

a) *Aseo agresivo*. El animal asea rigurosamente al oponente, desde una posición lateral, con los dientes y patas delanteras.

b) *Ofensa vertical*. El animal junto al oponente, en una postura bípeda y con el lomo encorvado e inclinado hacia éste, presenta los ojos entreabiertos y las orejas gachas, y a menudo el pelo erizado.

c) *Ofensa lateral*. El animal amenaza al oponente, en una postura tripedal, desde una posición lateral, con los ojos entreabiertos y las orejas agachadas, presenta a menudo el pelo erizado

d) *Golpeteo con el rabo*. El animal realiza rápidos movimientos con el rabo.

7. ATAQUE:

a) *Ataque mordaz*. El animal muerde al oponente.

b) *Persecución*. El animal corre detrás del oponente que huye.

c) *Carga*. El animal corre hacia el oponente.

d) *Embestida*. El animal se abalanza sobre el oponente, como si fuera a morderle, pero llegando solo a contacto lateral.

8. EVITACIÓN-HUIDA:

a) *Alejamiento*. El animal deambula lejos del oponente.

b) *Retirada*. El animal se aleja corriendo al aproximarse el oponente.

c) *Salto*. El animal salta al acercarse el oponente

d) *Rebote*. El animal salta apoyándose en las paredes de la jaula.

e) *Sobresalto*. El animal realiza un súbito movimiento al acercarse el oponente.

f) *Apretado contra la pared*. El animal en posición bípeda, se aprieta contra la pared de la jaula, con la superficie ventral de su cuerpo extendiendo los miembros delanteros.

g) *Retroceso*. El animal retira rápidamente la cabeza ante el oponente.

h) *Escape*. El animal mueve lentamente la parte anterior del cuerpo y/o cabeza, para evitar al oponente.

i) *Girar*. El animal se vuelve de espaldas al acercarse el oponente.

9. DEFENSA-SUMISIÓN:

a) *Defensa lateral*. El animal ante la cercanía del oponente, adopta una posición tripedal lateral a éste, con los ojos abiertos y las orejas extendidas.

b) *Defensa vertical*. El animal ante la cercanía del oponente, adopta una posición bípeda, con los ojos abiertos y las orejas extendidas.

c) *Sumisión vertical*. Es una forma extrema de “defensa vertical”, en la que el animal retira la cabeza hacia atrás.

10. CONDUCTA SEXUAL:

a) *Intento de monta*. El animal intenta montar dorsalmente al oponente, pero de forma incompleta.

b) *Monta*. El animal, situado encima del oponente y agarrado a los flancos de éste, realiza movimientos pélvicos.

11. INMOVILIDAD:

a) *Agachado*. El animal permanece en completa inmovilidad, con las cuatro patas apoyadas en el suelo.

b) *Arrastrarse*. Postura similar a la anterior, excepto en que el animal se apoya en las paredes de la jaula y se arrastra lejos del oponente.

Departamento Procesos Psicológicos Básicos y su Desarrollo
Facultad de Psicología



PSIKOLOGIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE PSICOLOGÍA