

La participació del Sistema Nerviós en la producció de la sang i en el procés cancerós

Aquesta conferència d'introducció a la Reial Acadèmia de Doctors té dues parts però, com es veurà durant la presentació, les dues estan relacionades. Presenten les dues línies de recerca que he desenvolupat amb més interès en els darrers vint anys, oferint un viatge científic durant el qual, i a mesura que s'obté la informació, el vaixell ens portarà a un port o a un altre de nou. Es tracta de dos trajectes que jo he començat i que aniré seguint tot i sabent que un dia algú altre els acabarà. Tal i com deia un científic famós, en recerca, per cada pregunta que la natura ens contesta ens obre una nova porta que conté més preguntes; del què es tracta és només d'anar obrint portes que porten a altres portes i així successivament sense acabar, perquè el coneixement és infinit. Els parlaré d'un viatge en el qual la neurologia, l'hematologia i l'oncologia comparteixen camí.

I. La participació del Sistema Nerviós en la producció de la sang

La primera part d'aquest trajecte ens contestarà la pregunta de si el sistema nerviós i el sistema hematopoètic es comuniquen. Va començar quan era estudiant de tercer i de sisè a la Càtedra de Farmacologia del professor García-Valdecasas que em va introduir a la recerca d'alguns aspectes del sistema nerviós. La meva tesi doctoral, que vaig portar a terme a la *New York University Medical Center* a Manhattan tractava del paper de les encefalines en el sistema nerviós de l'ílium del conill d'índies, *el cobai* o també *conill porquí*. L'any 1984, i ja treballant als *National Institutes of Health* (NIH), amb seu Bethesda (Maryland, EEUU), el professor Oppenheim va mostrar una diapositiva d'un macròfag disfressat de Superman en una conferència a la que vaig assistir. El professor Oppenheim era un especialista mundial en macròfags, el descobridor de la IL-1 i, la raó per la qual ens

el mostrava amb disfressa era que, segons ell, el macròfag era una supercèl·lula: una que tenia de tot i que fabricava de tot: hormones, pèptids, neuropèptids i neurotransmissors. També presentava receptors de tot, incloent-hi els opiacis. A mi, que com els he dit havia treballat amb el sistema nerviós ja d'estudiant al Departament de Farmacologia, se'm van obrir els ulls i vaig parar les antenes en sentir qualificar el macròfag d'aquella manera. En aquella època jo m'estava formant en la fisiologia i en el fracàs de la producció sanguínia i ja sabia que el macròfag era imprescindible per a qualsevol reacció immunològica: és la pedra angular del sistema immunològic i és fonamental també per al sistema hematopoètic. Com que d'estudiant ja m'havia atret la neurologia i després la farmacologia del sistema nerviós, ara veia que formant-me com hematòleg-oncòleg podia unir la meva primera atracció amb la segona, el sistema nerviós amb el sistema hematològic i la diferenciació cel·lular, la clau del càncer.

Em vaig preguntar, en primer lloc, què hi feien en el macròfag receptors de neuropèptids, neurotransmisors i opiacis i, en segon lloc, per quina raó aquestes cèl·lules -de les quals ens havien dit a la Facultat de Medicina que només servien per a defensar-nos dels patògens- produïen múltiples factors del sistema nerviós.

Una de les primeres coses que hom aprèn quan es dedica a la recerca, és que la Natura és molt sabia i també molt econòmica en recursos. Per tant, és molt estalviadora i després de milions d'anys d'evolució és clar que no fa res perquè sí. Se'm va acudir doncs que havia d'existir algun tipus de comunicació -el que en anglès es diu *cross-talk*- entre els dos sistemes, el nerviós i l'hematològic. A partir d'aquest moment em vaig interessar per aquest tema i vaig començar a amagatzemar-ne informació i articles. Ja ben decidit a poder assajar aquesta hipòtesi, vaig ser testimoni d'un fet que em va fer confirmar la seva validesa. El fet en qüestió va ocórrer a Barcelona, en el transcurs del Congrés Mundial de la Societat Internacional d'Hematologia celebrat a principis dels anys 90. Allà el prestigiós hematòleg francès Jean Bernard, en la seva conferència magistral de cloenda, va oferir a l'audiència la seva visió de com seria l'hematologia del futur i

va fer, gairebé fora de lloc i d'una manera que en diríem completament gratuïta, la següent predicció: en el futur s'haurien de crear departaments d'Hematologia dedicats a l'estudi del sistema nerviós. Crec perfectament possible que l'única persona a qui la frase en qüestió va fer impacte devia ser jo, per a qui va adquirir una gran importància ja que la persona que havia acabat d'avançar la predicció havia de tenir òbviament les seves bones raons per haver-la proferit. Va representar per a mi quelcom similar a un testament intel·lectual, expressat casualment i com si fos un pressentiment basat en indicis que només ell sabia, la pura intuïció d'una persona sàvia. Personalment, aquests comentaris d'un científic tant brillant como ho era el professor Jean Bernard van ser molt reveladors.

Aquest fet inesperat va fer que la hipòtesi que el sistema nerviós pogués controlar i regular la producció hematopoètica es va reforçar de manera important. Efectivament, algun factor ha de regular un sistema tan complex, tan precís, tan refinat, tan eficient, tan treballador i, addicionalment, que ho faci d'una manera summament exquisida i perfecta. El sistema hematopoètic ha de fabricar cada dia trilions de cèl·lules: glòbuls vermells, glòbuls blancs (limfòcits), neutròfils, monòcits, les cèl·lules conegudes com *natural killer cells*, dendrítiques, basòfils i plaquetes, i això durant tota la vida d'una persona. Això vol dir que es tracta d'una fàbrica que romandrà productiva al llarg de tota la vida de l'amo, tant si viu 60 anys com si en viu 120. Tot el que l'any 2014 encara no sabem, és a dir, què hi ha darrere d'aquesta màquina tan perfecta de produir cèl·lules, és realment impressionant.

L'any 1984, quan jo encara treballava als *National Institutes of Health*, ja m'havia confegit un dossier, que encara tinc i que tenia per títol "*CNS-Blood*" on hi guardava articles on s'hi relacionava el cervell i la sang: receptors de noradrenalina als macròfags, d'opioides als limfòcits i macròfags, així com la presència de *stem cells* hematopoètiques al cervell. A poc d'arribar a la Facultat de Medicina de New Jersey, l'any 1985 vaig reclutar una tècnica pel nostre laboratori, Pranela Rameshwar. Era una persona molt intel·ligent i productiva, a qui vaig animar a fer un doctorat i, a l'hora de pensar en un projecte, va sortir per primer cop en la meua

vida professional la *Substància P* (SP). El nom el va donar von Euler per a definir la banda d'una proteïna –i d'aquí ve la *P*, de proteïna- de la família de les taquiquinines. Per qué vaig seleccionar una proteïna poc mediàtica, amb dues lletres i sense contingut massa identificable, ja la *P* només ens deia que es tractava d'una proteïna?. Doncs perquè l'SP era un neuropèptid molt petit, de només 11 aminoàcids i perquè els macròfags posseïen receptors per a aquesta molècula. Se'm va acudir que, com el macròfag participa en la regulació de la producció de la sang, bé podria ser el cas que aquest receptor de la *S* també hi participés. En aquell temps, jo ja tenia molt ben establert un assaig al laboratori per valorar la formació de colònies hematopoètiques, tant de glòbuls vermells com de glòbuls blancs a partir de moll d'os de voluntaris sans.

Ens va faltar temps per comprar la substància *P* del catàleg de SIGMA i afegir-la al nostre sistema de cultiu de teixits amb moll d'os. Als 7 dies d'afegir-la i amb gran sorpresa nostra, vam veure que aquesta molècula ens havia estimulat les cèl·lules del moll d'os de tal manera que les colònies hematopoètiques eren tan nombroses que gairebé no podíem ni comptar-les. El creixement era tan gran que pràcticament tota la superfície sota el microscopi era una catifa. Mai havíem vist aquella explosió cel·lular i tan ràpida.

Vam publicar aquests primers resultats a la revista *Blood*, que és la publicació més prestigiosa per als hematòlegs a nivell mundial. Va ser difícil convèncer la comunitat científica americana de la importància de la connexió entre el sistema nerviós i el sistema sanguini i, al principi, no podia obtenir beques per a investigar aquest nou camp. Pensaven que era un camp d'alt risc, un camp encara massa hipotètic malgrat que ja havia publicat dos treballs a la revista *Blood*. Al tercer intent, el propi secretari de la *Study Section* del NIH, el Dr. Alan Levine, que sempre em comentava els debats que suscitaven els meus projectes em va dir escaridament: “Pere, crec que finalment tindràs raó. Després de tot, tal i com tu sempre m'has dit, si el sistema nerviós ho controla tot, des de la respiració als batecs del cor, per què no hauria de regular i controlar també el sistema sanguini? Té la

seva lògica”. El finançament del Govern Federal per aquesta línia de recerca el vaig anar obtenint durant deu anys, fins que vaig retornar a l’estat espanyol.

Seguim però en la recerca. En experiments posteriors vam demostrar que l’*SP* exerceix la seva funció a través del seu propi receptor, anomenat NK-1. Si hi afegíem inhibidors d’aquest receptor, l’estimulació hematopoètica de l’*SP* desapareixia completament; un fet que en biologia és significatiu i té molt de valor per la seva especificitat. Més tard vam demostrar que l’acció de l’*SP* en l’estimulació de colònies hematopoètiques era indirecta: estimulava les cèl·lules de l’estroma del moll d’os, macròfags i fibroblasts fonamentalment, i aquests produïen una veritable cascada de factors hematopoètics que actuaven sobre la cèl·lula *stem* i progenitores del moll d’os: IL-1, IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF, SDF-1 i, el més interessant, el factor c-kit que és el factor estimulador de la cèl·lula *stem*. Més tard vam identificar receptors de l’*SP*, el NK-1, en la cèl·lula progenitora/*stem* de la sang, identificada pel marcador CD34+.

Al nostre laboratori cada dia hi havia sorpreses, entre altres raons perquè mai ningú havia estudiat l’*SP*, aquesta molècula tan petita i tan activa. Per tant, estàvem obrint un camp nou i tot el que trobàvem era òbviament nou. Una altra gran sorpresa va ser quan vam veure que la pròpia molècula de l’*SP* posseeix una part estimuladora, el fragment SP(4-11), i a la vegada un fragment inhibidor, el fragment SP(1-4) de la producció sanguínia. Curiosament és a nivell de la divisió dels dos fragments, entre els aminoàcids 4 i 5, el lloc on es produeix la ruptura enzimàtica dins del cos humà. Això podria tenir implicacions fisiològiques interessants, donat el fet que la pròpia molècula podria posseir la seva pròpia autoregulació.¹⁻²⁷

Un fet importantíssim es va produir mentre estaven abocats als experiments sobre l’*SP in vitro*. Ens faltava el pas a *in vivo* i sabíem que el sistema sanguini no es forma fins que el sistema nerviós està ja incorporat al moll d’os. Per al nostre grup de treball va ser molt important una publicació del matrimoni de patòlegs americans -els doctors Felten de la Universitat d’Albany, a l’Estat de Nova York- en la qual descrivien la presència al moll de l’os de fibres nervioses peptidínèrgiques.

Curiosament, demostraven que les fibres nervioses entren per l'orifici de la arteria nutricia de l'os i, si bé l'acompanyen a la entrada de la cavitat, es distribueixen per tot l'interior, per tot el parènquima medul·lar. Hom es podia preguntar quina podia ser la funció fisiològica d'aquest fet. Acompanyar l'arteria es podria explicar pel tràfic constant de cèl·lules del moll d'os a la sang i viceversa, tal i com es veu en el transplantament de moll d'os; però el fet que les fibres peptidinèrgiques, les pròpies dendrites, es col·loquessin com si estiguessin descansant sobre cèl·lules de l'estroma medul·lar, era una gran notícia. L'anatomia demostrava que existia un contacte físic entre el sistema nerviós i el sistema sanguini,¹⁻²⁷ per tant no era sorprenent que la cavitat del moll d'os estigués innervada. Intuïtivament ja ho havia suposat perquè cada vegada que feia un aspirat medul·lar -durant el qual s'anestesia la pell i el periosti- el malalt es queixa bastant i té dolor en tirar de la xeringa per xuclar la sang de l'interior de la cavitat òssia. Novament sorgia la pregunta: per què hi ha fibres nervioses dintre de tota la carcassa òssia? És ben segur que no són allà tota la vida esperant l'agulla del metge. Hi són perquè tenen una funció fisiològica.

Més tard, en una col·laboració que vam fer amb el Dr. Victor Chang de l'hospital *Veterans Administration* de New Jersey es va estudiar una dotzena de malalts paraplàgics. Es van fer biòpsies de moll d'ós i es va observar que en aquests malalts és totalment buit, és a dir, només hi ha greix. Aquesta troballa podria ser el fet definitiu per demostrar que la innervació nerviosa és fonamental per tal que hi hagi producció sanguínia, tot i que també podria ser que la completa inanició física de la persona provoqués una total inhibició de la formació de sang.

Fins aquí hem demostrat que l'SP és un neuropèptid i un neurotransmissor, que es comporta també com una citocina, que el moll d'os està innervat per fibres peptidinèrgiques -entre elles l'SP, una taquiquinina- i que s'estableix un contacte físic entre el sistema nerviós i les cèl·lules del moll d'os. Hi ha d'haver anatòmicament doncs una comunicació entre els dos sistemes: el nerviós i l'hematopoètic. Amb els estudis *in vitro* vam demostrar que l'SP induïa en les cèl·lules de l'estroma la producció d'una infinitat de factors hematopoètics. Vam

demostrar també que la cèl·lula progenitora CD34+ expressava el receptor d'*SP* (NK1R). Per això, al nostre article i en d'altres posteriors vam encunyar el terme *neurohematopoesi* per primera vegada a la literatura mèdica, l'any 1993. L'edició del famós volum d'hematologia *Wintrobe*, de finals dels 90, citava en el primer capítol el nostre treball com una de les noves hipòtesis de la formació sanguínia.

Tot i així, tan important és fer un descobriment com que aquest pugui ser confirmat per un altre laboratori independent. La majoria de vegades és necessari que es produeixi aquest fet per tal que la comunitat científica hi atorgui credibilitat. La confirmació de que el sistema nerviós regula la producció sanguínia ha arribat fa un parell d'anys de la mà de dos laboratoris. Un d'ells, el del grup del Dr. Paul Frenette de l'hospital Mount Sinai de Nova York en demostrar que el sistema nerviós regula el *niche* o niu de la cèl·lula mare hematopoètica en el moll d'os^{30,31} i l'altre el grup del Dr. Tsvee Lapidot del Weizmann Institute a Israel que va presentar les seves dades en el transcurs del Congrés Americà de Sang (ASH) del 2011 en lliurar la Ham-Wasserman Lecture de títol: *The Brain-Bone-Blood Triad: Traffic Lights for Stem-Cell Homing and Mobilization* ('La Tríada Cerebell-Òs-Sang: Semàfors per a l'aniuament i la mobilització de la cèl·lula mare'). Va dir -i va ser recollit al volum educatiu de la societat- que "*hi ha impulsos neuronals que actuarien com un marcapasses extern per a sincronitzar la migració de la cèl·lula mare hematopoètica per tal d'encarregar-se de la producció de cèl·lules de la sang i del sistema immunològic que necessita el cos [.....] hi ha indicis per a pensar que la cèl·lula mare hematopoètica està regulada per la tríada Cerebell-Òs-Sang*"²⁸⁻³¹. Aquest concepte va arribar 17 anys després del meu postulat publicat a la revista *Blood* com a neurohematopoesi i, en certa manera, confirma aquella intuïció que vaig tenir fa més de 25 anys.

Fins aquí la relació entre el sistema nerviós i el sistema sanguini i a continuació els parlaré de la segona part d'aquest viatge científic pel cos humà que els explicarà com es realitza l'altra connexió entre el sistema nerviós i el procés cancerós.

II. La participació del Sistema Nerviós en el procés cancerós

El Servei que jo dirigia als EEUU era d'Hematologia i d'Oncologia. Sempre ens havia intrigat per què les cèl·lules del càncer de mama tenen una inclinació a formar metàstasi a l'os i per això vam suggerir la possibilitat que podria existir una relació entre la capacitat metastitzadora del càncer de mama al moll d'os en funció de les taquiquinines-SP. La hipòtesi -en els seus inicis totalment intuïtiva- va resultar molt fructífera i biològicament important ja que vam demostrar, en el primer experiment que es va portar a terme, que les cèl·lules de càncer de mama expressaven el receptor d'SP i, de manera sorprenent, vam també demostrar que les cèl·lules del càncer de mama també produïen SP. La proliferació d'aquestes s'inhibia completament en introduir antagonistes del receptor de l'SP. Sense gairebé poder-nos-ho creure, acabàvem de demostrar que les cèl·lules de càncer de mama tenien un sistema autocrí propi d'estimulació. En altres paraules eren autosuficients. Posteriorment vam veure que, en un article publicat a *Nature* per Müller *et al.* en 2001, es demostrava que les cèl·lules del càncer de mama presentaven receptors de SDF-1 i que les cèl·lules canceroses entraven justament en aquells òrgans que presentaven gran concentració de SDF-1, factor que -com s'ha explicat anteriorment- és induït per l'SP. Per tant, les cèl·lules de càncer de mama tindrien dos quimoquines que n'afavoririen l'extravassament: sortida de la sang i posterior colonització a òrgans específics, rics en SP i rics en SDF-1; el sistema SP-NK1R i SDF-1 i CXCR4. D'aquí el nostre postulat de caracteritzar a l'SP com una quimoquina en el procés metastàtic. Aquells teixits amb gran concentració tant d'SP com de SDF1 atraurien, per concentració de gradients, les cèl·lules canceroses ja que aquestes n'expressen en les membranes els receptors específics, NK1 i CXCR4, per aquestes dues "quimoquines".³²⁻⁴³

Darrerament hem demostrat que l'exposició constant de cèl·lules de càncer de mama a SP, un factor també proinflamatori, feia que les cèl·lules canceroses adoptessin un fenotip molt més agressiu. Les cèl·lules canceroses negatives per a la

proteïna oncogènica de membrana HER2, es converteix en HER2 altament positives (3+), expressió que confereix un gran grau d'agressivitat a les cèl·lules. Ja *in vivo* vam demostrar que aquestes cèl·lules manipulades *in vitro*, mitjançant l'exposició crònica d'SP, les feia canviar de fenotip, fent-les molt més proliferatives. Quan eren injectades a ratolins nus, aquests desenvolupaven tumors amb molta més rapidesa que les cèl·lules canceroses control. Acabàvem de demostrar que les cèl·lules canceroses de baix perfil invasiu es poden transformar en altament agressives per efecte d'un neurotransmissor present en tot procés inflamatori com és l'SP. Això estaria d'acord amb el nou corpus de coneixement que implica els fenòmens inflamatoris crònics, com els processos procarcinogènesi.⁴⁴

Fa tot just mig any, hem publicat en la revista *Cancer Research* els resultats obtinguts en xeno-empelts de ratolins. Hem administrat a un ratolí al que hem originat un càncer de mama humà un anticòs monoclonal capaç d'aturar el creixement de tumor obtingut pel Dr. Engel (un dels nostres col·laboradors). Hem demostrat així l'autonomia de les cèl·lules canceroses a proliferar mitjançant el circuit autocrí: SP i el seu receptor (SP-NK1R) i el seu paper epigenètic per a modular la transformació del procés cancerós.³²⁻⁴³

No fa gaire temps hem trobat al nostre laboratori amb estudis genètics una quantitat molt important de gens de neurotransmissors i neuropèptids altament expressats en tumors de càncer de mama humans. Hem vist també que la majoria d'aquests neurogens es troben també sobreexpressats en les cèl·lules mare o *stem cells* canceroses. No fa tampoc molt de temps, s'ha publicat que les cèl·lules de càncer de mama expressen el receptor beta-adrenèrgic. Què hi fan receptors de neuropèptids i neurotransmissors en les cèl·lules canceroses? Si hi són és per una raó de la natura: perquè esperen ser activats per la substància complementària, els neuropèptids i els neurotransmissors. Per tant, la connexió entre el sistema nerviós i el procés cancerós existeix. Podríem pensar que els efectes de la progressió del càncer de mama causat per aquests factors es produeixen per modulació de les cèl·lules mare del càncer de mama.⁴⁵

Podríem atrevir-nos a dir que estem possiblement escrivint les primeres pàgines de un nou capítol de la biologia del càncer, que volem anomenar el de la Neuro-Carcinogènesi o el de la Neuro-Oncogènesi.

Com els deia en finalitzar la primera travessa del viatge, per tal que la comunitat científica avaluï un descobriment és gairebé sempre necessari que algun altre laboratori en confirmi els resultats. Igual que ens va passar en el viatge per el sistema sanguini, en aquest cas hem estat també afortunats per partida doble. En el primer cas, la confirmació va venir després de nou anys de la nostra descoberta pel grup del Dr. Miquel Muñoz de Sevilla que va demostrar en una gran quantitat de tumors humans la presència de receptors de l'SP i que la proliferació de les cèl·lules canceroses es bloqueja completament quan s'administra un inhibidor del receptor de l'SP, concretament el *Aprepitant*. També han demostrat recentment que el creixement de tumors de càncer de mama implantats en ratolins queda completament bloquejat en administrar als animals l'inhibidor del receptor de l'SP.

En el segon cas, el grup del Dr. Paul Frenette ha demostrat que en el càncer de pròstata, la formació de fibres nervioses del sistema nerviós autònom regulen el desenvolupament i la disseminació del càncer en ratolins^{46,47}. Les fases primerenques del desenvolupament tumoral es poden prevenir mitjançant la simpatectomia química o quirúrgica o per l'eliminació genètica dels receptors adrenèrgics beta 2 i beta 3. Van observar que si als tumors se'ls infiltrava de fibres colinèrgiques parasimpatètiques es produïa una disseminació del tumor amb formació de metàstasi. Tot aquests fets es poden inhibir mitjançant tractament farmacològic o, com en el cas anterior, per eliminació genètica del receptor muscarínic estromal tipus 1. Amb aquests resultats, els investigadors van passar a estudiar mostres de càncer de pròstata en 43 homes i van demostrar que una presència important de fibres simpatètiques o parasimpatètiques, en el tumor i en els voltants del tumor respectivament, s'associava a una mala prognosi. Amb totes aquestes dades, crec que queda clara una participació important del sistema nerviós en el desenvolupament del càncer i en el procés metastàtic.

Fa poc vaig llegir la biografia de la premi Nobel italiana Rita Levi-Montalcini. A ella i al Dr. Stanley Cohen se'ls va concedir el Nobel pel descobriment del factor de creixement del sistema nerviós (NGF) mentre treballaven a la Washington University de Saint Louis. Els confesso que gairebé no podia donar crèdit al que estava llegint. A l'any 1952 la Dra. Levi-Montalcini va publicar un treball que portava per títol: "Effects of mouse tumor transplantation on the nerve system"⁴⁸. Ella havia ja fet 48 anys abans alguns experiments en la mateixa línia que nosaltres vam fer l'any 2000, la qual cosa ens demostra que molt del que descobrim ara potser algú ho havia pensat amb antelació. En el cas de la Dra. Levi-Montalcini la connexió tumor-sistema nerviós li va servir per identificar un factor que es produïa d'aquesta interacció. Ella ho va enfocar com un factor estimulador del sistema nerviós i no va pensar en un potencial efecte sobre procés cancerós.

Queda però molt de camí per a investigar, molt de camí per a cobrir. No hi ha dubte que alguna musa amable m'hauria inspirat dues curiositats en els meus inicis de treballar al laboratori. Una primera, la que unia el sistema nerviós amb la producció de la sang -que després vaig anomenar Neuro-Hematopoesi-, la qual em va portar a una segona, la interacció del sistema nerviós amb el procés cancerós i en la capacitat de metastitzar que hem anomenat Neuro-Oncogènesi.

Podríem dir que en el transcurs d'aquests 35 anys de trajecte, i després de tot el que els he exposat, s'han obert moltes portes i s'han posat les primeres llavors de dos capítols nous de la biologia: el de la Neuro-Hematopoesi i el de la Neuro-Oncogènesi. Només el temps ens dirà la veritable rellevància biològica i la importància que per a l'ésser humà han tingut aquestes descobertes. És un gran honor dirigir-me a tot vostès per poder-ho explicar.

Els resto molt agraït per la gentilesa d'acompanyar-me en tot aquest acte.

Referències

1. Puig MM, Gascon P, Craviso GL, Bjur RA, Matsueda G, Stewart JM, Musacchio JM: The effect of enkephalin analog on the guinea pig ileum and rat brain opiate receptor. *Arch Int Pharmacodyn* 225:69-80, 1977
2. Puig MM, Gascon P, Craviso GL, Musacchio JM: Endogenous opiate receptor ligand: Electrically induced release in the guinea pig ileum. *Science* 195:419-420, 1977.
3. Puig MM, Gascon P, Musacchio JM: Endorphin release: Cross tolerance to morphine. *Eur J Pharmacol* 45:205-206, 1977.
4. Puig MM, Gascon P, Musacchio JM: Electrically induced opiate-like inhibition on the guinea pig ileum: Cross tolerance to morphine. *J. Pharm Exp Therapy* 206:298-302, 1978.
5. Doversen M, Gascon P, Trost S, Hammer J, Goodman S, Noronha A, O'Shannessy D, Brady R, Quarles R: Murine monoclonal antibodies to the myelin associated glycoprotein react with large granular lymphocytes of human blood. *Proc Natl Acad Sci* 82:552-555, 1985.
6. Rameshwar P, Gascon P, Ganea D: Stimulation of IL-2 production in murine lymphocytes by substance P and related tachykinins. *J Immunol* 151:2484-2496, 1993.
7. Rameshwar P, Ganea D, Gascon P: In vitro stimulatory effect of substance P on hematopoiesis. *Blood* 81:391-398, 1993.
8. Rameshwar P, Gascon P: Induction of IL-3 and GM-CSF by substance P on bone marrow cells is partially mediated through the release of IL-1 and IL-6. *J Immunol* 152:4044-4054, 1994.
9. Rameshwar P, Gascon P: Induction of the neuropeptide Substance P (SP) and its receptor by c-kit ligand in bone marrow stroma. Implication for neuro-hematopoietic regulation. *Blood* 86:482-490, 1995.
10. Rameshwar P, Gascon P: Neurokinin-A inhibits granulocyte-macrophage colony formation mostly through the release of soluble factor(s) in bone marrow stroma. *Blood* 88:98-106, 1996.
11. Rameshwar P, Poddar A, Zhu G, Gascon P: Receptor induction regulates the synergistic effects of substance P with IL-1 and PDGF on the proliferation of bone marrow fibroblasts. *J Immunol* 158:3417-3424, 1997.
12. Rameshwar P, Gascon P.: Hematopoietic Modulation by the Tachykinins. *Acta Haematol* 98:59-64, 1997.
13. Rameshwar P, Poddar A, Gascon P. Hematopoietic regulation mediated by interactions among the neurokinins and cytokines. *Leukemia Lymphoma* 28:1-10, 1997
14. Qian J, Haider A, Teli T, Tuan T, Gascon P, Rameshwar P. Effects of SP(1-4) on cobblestone-forming cells. Implications for endopeptidases as hematopoietic regulators. *Proceedings 10th International Congress of Immunology*. Talwar GP, Nath I, Ganguly NK and Rao KVS editors. Monduzzi Editore, Bologna, Italy, p.575-581, 1998
15. Gascon P, Qian J, Joshi DD, Teli T, Haider A, Rameshwar P. Effects of Preprotachykinin-I peptides on hematopoietic homeostasis. Implications for bone marrow endopeptidases. *Ann NY Acad Sci* 917:416-423, 2000

16. Maloof PB, Joshi DD, Qian J, Gascon P, Singh D, Rameshwar P. Induction of PPT-1 and NK-1 by neurohormones in bone marrow stroma. Implications for neuroendocrine-hematopoietic connection J Neuroimmunol 112:188-196, 2000
17. Qian J, Yehia G, Molina C, Fernandes A, Donnelly RJ, Anjaria DJ, Gascón P, Rameshwar P: Cloning of human preprotachykinin-I promoter and the role of cAMP response elements in its expression by IL-1 and stem cell factor. J Immunol, 166: 2553-2561, 2001
18. Rameshwar P, Joshi DD, Yadav P, Qian J, Gascón P, Chang VT, Anjaria A, Harrison JS, Song X: Mimicry between neurokinin-1 and fibronectin may explain the transport and stability of increased substance P-immunoreactivity in patients with bone marrow fibrosis. Blood, 97: 3025-3031, 2001
19. Rameshwar P, Zhu G, Poddar A, Donnelly RJ, Qian J, Ge H, Gascón P: The dynamics of bone marrow stromal cells in the proliferation of multipotent hematopoietic progenitors by substance P: An understanding of the effects of a neurotransmitter on the differentiating hematopoietic stem cell. J Neuroimmunol 121:22-31, 2001
20. Joshi DD, Dang A, Yadav P, Qian J, Bandari PS, Chen K, Donnelly R, Castro T, Gascón P, Haider A, Rameshwar P: Negative feedback on the effects of stem cell factor on hematopoiesis is partly mediated through neutral endopeptidase activity on substance P: a combined functional and proteomic study. Blood 98:2697-2706, 2001.
21. Rameshwar R, Gascón P, Bandari PS, Joshi DD, Fernandes A, Dang A. Structural similarity between the bone marrow extracellular matrix protein and neurokinin I could be the limiting factor in the hematopoietic effects of substance P. Can J Phys Pharm. 80: 475-481, 2002
22. Rameshwar P, Gascón P, Oh H, Denny T, Zhu G, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide (VIP) inhibits the proliferation of bone marrow progenitors through the VPAC1 receptor. Experimental Haematol 30:1-9, 2002
23. Bandari PS, Qian J, Yehia G, Seegopaul HP, Harrison JS, Gascón P, Fernandes H, Rameshwar P. Differences in the expression of neurokinin receptor in neural and bone marrow mesenchymal cells: implications for neuronal expansion from bone marrow cells. Neuropeptides 35:1-9, 2002
24. Bandari P, Qian J, Yehia G, Joshi D, Maloof P, Potian J, Oh H, Gascon P, Harrison J, Rameshwar P. Hematopoietic growth factor inducible neurokinin-1 type (HGFIN): a transmembrane protein that is similar to neurokinin-1 interacts with substance P. Regulatory Peptides Mar 28;111(1-3):169-78, 2003
25. Bandari PS, Qian J, Oh HS, Potian JA, Yehia G, Harrison JS, Rameshwar P. Crosstalk between neurokinin receptors is relevant to hematopoietic regulation: Cloning and characterization of neurokinin-2 promoter. J. Neuroimmunol 138: 65-75, 2003
26. Corcoran KE, Patel N, Rameshwar P. Stromal Derived Growth Factor-1 α : Another mediator in neural-emerging immune system through *Tac1* expression in bone marrow stromal cells. J Immunol 178:2075-2082, 2007
27. Murthy RG, Greco SJ, Taborga M, Patel N, Rameshwar P. *Tac1* regulation by RNA-binding protein and miRNA in bone marrow stroma: Implication for hematopoietic activity. Brain Behav Immunity 22:442-450, 2008
28. Raaijmakers M, Scadden D. Evolving concepts on the microenvironmental niche for hematopoietic stem cells. Curr Opin Hematol 15: 301-306, 2008
29. Lapidot T, Kollet O. The brain-bone-blood triad: traffic lights for stem-cell homing and mobilization. Blood. American Society of Hematology. Education Program Book, 2010.
30. Larsson J, Scadden D. Nervous Activity in a Stem Cell Niche. Cell 124: 253-256, 2006
31. Katayama Y, Battista M, Kao W, Hidalgo A, Peired A, Thomas S, Frenette P. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. Cell 124: 407-421, 2006

32. Singh D, Joshi D, Hameed M, Qian J, Gascon P, Maloof PB, Rameshwar P: Constitutive expression of the preprotachykinin-I and neurokinin receptors in human breast cancer cells. Implications for therapeutic intervention. *Proc Natl Acad Sci* 97:388-393, 2000
33. Rao G, Patel PS, Idler SP, Maloof P, Gascon P, Potian J, Rameshwar P. Facilitating role of preprotachykinin-I gene in the integration of breast cancer cells within the stromal compartment of the bone marrow: A model of early cancer progression. *Cancer Res* 64: 2874-2881, 2004
34. Oh HS, Moharita A, Potian JG, Whitehead IP, Livingston JC, Castro TA, Patel PS, Rameshwar P. Bone marrow stroma influences TGF- β production in breast cancer cells to regulate c-myc activation of the preprotachykinin-I gene in breast cancer cells. *Cancer Res* 64: 6327-6336, 2004
35. Mukerji I, Ramkissoon SH, Reddy KKR, Rameshwar P. Autocrine proliferation of neuroblastoma cells is partly mediated through neurokinin receptors: Relevance to bone metastasis. *J Neuro-Oncology* 71:91-98, 2005
36. Patel H, Ramkissoon SH, Patel PS, Rameshwar P. Transformation of breast cells by truncated neurokinin-1 receptor is secondary to activation by preprotachykinin-I peptides. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102:17436-17441, 2005
37. Castro TA, Cohen MC, Rameshwar P. The expression of neurokinin-1 and preprotachykinin-1 in breast cancer cells depends on the relative degree of invasive and metastatic potential. *Clin Exp Metastasis* 22: 621-628, 2005
38. Moharita AL, Taborga M, Corcoran KE, Bryan M, Patel PS, Rameshwar P. SDF-1 α regulation in breast cancer cells contacting bone marrow stroma is critical for normal hematopoiesis. *Blood* 108:3245-3252, 2006
39. Ramkissoon SH, Patel PS, Taborga M, Rameshwar P. NF κ B is central to the expression of truncated neurokinin-1 receptor in breast cancer: Implication for breast cancer cell quiescence within bone marrow stroma. *Cancer Res* 67:1653-1659, 2007
40. Rameshwar P. Is substance P central to the biology of acute lymphoblastic leukemia? *Leuk Res* 32:3-4, 2008
41. Corcoran KE, Malhotra A, Molina CA, Rameshwar P. SDF-1 α induces a non-canonical pathway to activate the endocrine-linked *Tac1* gene in non-tumorigenic breast cells. *J Mol Endocrinol* 40:113-123, 2008
42. Reddy BY, Greco SJ, Patel PS, Trzaska KA, Rameshwar P. RE-1 silencing transcription factor shows tumor suppressor functions and negatively regulates the oncogenic *TAC1* in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:4408-4413, 2009
43. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001 ;410(6824):50-6.
44. Mayordomo C, Garcia-Recio S, Ametller E, Fernandez-Nogueira P, Casas I, Pastor-Arroyo E, Gascón P, Almendro V. Targeting of Substance P induces cancer cell death and decreases the steady-state of EGFR and Her2 *J Cell Physiol* (accepted for publication)
45. Mancino M, Ametller E, Gascon P, Almendro V. The neuronal influence on tumor progresión. *BBA reviews on Cancer* (accepted for publication)
46. Magnon C, Hall SJ, Lin J, et al. Autonomic Nerve Development contributes to prostate cancer progression. *Science* 2012;341(6142):1236361
47. Isaacs JT. Prostate Cancer Takes Nerve. *Science* 2012;341
48. Levi-Montalcini, R. " Effects of mouse tumor transplantation on the nerve system" en D.A. Karnosfky 8ed.), "The chick embryo in biological research" *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1952;55: 330-342

