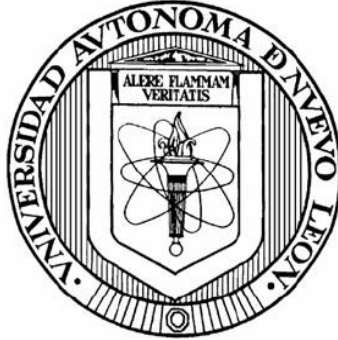


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO DEL BLOQUEO FARMACOLÓGICO DE LA VÍA ADRENÉRGICA BETA SOBRE LA PROGRESIÓN TUMORAL E INDICADORES DE CAQUEXIA EN TEJIDO ADIPOSEO EN EL MODELO DE LINFOMA L5178Y-R EN EL RATÓN BALB/C

POR

ISAÍAS GUTIÉRREZ LEAL

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
INMUNOBIOLOGÍA

ENERO, 2021

Efecto del bloqueo farmacológico de la vía adrenérgica beta sobre la progresión tumoral e indicadores de caquexia en tejido adiposo en el modelo de linfoma L5178Y-R en el ratón BALB/c

COMITÉ DE TESIS

DIANA
CASABLANCO

Dra. Diana Caballero Hernández
Presidente



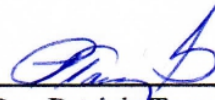
Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario



Dra. Diana Zarate Triviño
1er. Vocal



Dr. Ricardo A. Gómez Flores
2do. Vocal



Dra. Patricia Tamez Guerra
3er. Vocal

**Efecto del bloqueo farmacológico de la vía adrenérgica beta sobre la
progresión tumoral e indicadores de caquexia en tejido adiposo en el
modelo de linfoma L5178Y-R en el ratón BALB/c**

DIRECCIÓN DE TESIS

DIANA
CABALLERO

Dra. Diana Caballero Hernández
Director

RESUMEN

La activación adrenérgica en cáncer está mediada por la liberación de catecolaminas, que ejercen sus efectos a través de su unión a receptores adrenérgicos tipo beta-1, 2 y 3. Se sabe que la activación de estos receptores induce una respuesta fisiológica en las células tumorales y el microambiente tumoral promoviendo proliferación, invasión y metástasis. También se ha observado que las catecolaminas circulantes pueden inducir el pardeamiento del tejido adiposo y contribuir en la patología de caquexia asociada a cáncer. En estudios con murinos portadores del linfoma L-5178Y-R se han observado niveles altos de catecolaminas en plasma sanguíneo, indicando que hay activación del sistema simpato-adreno-medular. También se observa pérdida de peso corporal, alteraciones en la conducta alimentaria y desgaste del tejido adiposo interescapular e inguinal, todos estos eventos son signos de caquexia asociada a cáncer. En este trabajo se estudiaron los efectos de la carga tumoral y del bloqueo adrenérgico sobre indicadores de caquexia y progresión tumoral en el modelo de tumor trasplantable L-5178Y-R en ratones BALB/c de ambos sexos. Para ello empleamos el bloqueador no selectivo de receptores beta-1, 2 propanolol y el antagonista de receptores tipo beta-3 L-748,337 por vía intraperitoneal y se evaluaron indicadores asociados a cáncer y caquexia. Encontramos diferencias dependientes de sexo con respecto a la carga tumoral y al bloqueo de la señalización del sistema nervioso simpático sobre los distintos indicadores estudiados. Por una parte, la carga tumoral disminuyó el peso corporal ($p=0.004$), IMC ($p=0.031$), y la ingesta de alimento ($p=0.015$) y agua ($p=0.013$) en los ratones machos pero no en las hembras, y estos efectos se revirtieron con el bloqueo de receptores β -3 utilizando el L-748,337. Además, encontramos niveles elevados de IL-6 plasmática en ratones machos con tumor ($p=0.05$), aunque, no se observaron efectos por el bloqueo de receptores β -3. Se observó pérdida del tejido adiposo interescapular ($p=0.005$; $p=0.002$ en hembras y machos respectivamente) aunque los tratamientos no previnieron el desgaste de los depósitos de tejido adiposo. El tratamiento con los antagonistas no influyó en el volumen y peso tumoral final en ambos sexos portadores del linfoma murino.

ABSTRACT

Adrenergic activation is mediated by catecholamine release and its union with beta 1, 2 and 3 adrenergic receptors. It is well known that adrenergic activation in tumor microenvironment promotes proliferation, invasion and metastasis. Circulating catecholamines may induce fat browning and contribute to cancer cachexia. Studies in L-5178Y-R lymphoma bearing-mice have shown high plasmatic norepinephrine levels, thus indicating sympathetic adreno-medullary system activation. Mice bearing the L5178Y-R lymphoma also display weight loss, changes in food and water intake behavior, interscapular and inguinal adipose tissue depletion, all considered cancer-associated cachexia markers. In this study, we evaluated the effect of tumor burden and beta-adrenergic blockage effects on cancer and cachexia markers in BALB/c mice of both sexes bearing the L-5178Y-R tumor. To this end, we utilized the non-selective β 1-2 blocker propranolol and the β -3 selective antagonist L-748,337 via i.p. and evaluated cancer-associated cachexia indicators. We found sex-dependent effects of tumor burden and sympathetic nervous system blockage over the different markers studied. On one hand, tumor burden accentuated weight loss ($p=0.004$), BMI loss ($p=0.031$), and food ($p=0.015$) and water ($p=0.013$) intake reduction in male but not female mice. These effects were reverted by β -3 blockade with the L-748,337 treatment. We also found high plasmatic IL-6 levels in tumor bearing males ($p=0.05$), although β -3 treatment had no effect on this marker. Interscapular adipose tissue depletion was observed in both male ($p=0.005$) and female ($p=0.002$) tumor-bearing mice, although treatment with propranolol nor L-748,337 protected the adipose tissue deposit. Meanwhile, treatment with both antagonists did not influence tumor volume or tumor final weight in tumor-bearing mice of neither sex.

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
Respuesta neuroendocrina: sistema nervioso simpático.....	2
Activación adrenérgica.....	2
La carga tumoral como estresor fisiológico.....	3
Activación adrenérgica y cáncer.....	4
Activación adrenérgica y caquexia asociada a cáncer.....	5
Antagonistas adrenérgicos beta y cáncer.....	7
Antagonistas adrenérgicos caquexia asociada a cáncer.....	8
JUSTIFICACIÓN.....	10
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVO GENERAL.....	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
Declaración ética.....	13
Declaración de bioseguridad.....	13
Animales.....	13
Modelo del linfoma murino L5178Y-R.....	14
Declaración ética.....	14
Declaración de bioseguridad.....	14
Diseño experimental.....	15
Tratamiento con el bloqueador adrenérgico propanolol.....	15
Tratamiento con el bloqueador adrenérgico L-748,337.....	15
Indicadores morfométricos.....	16
Peso corporal.....	16
Índice de Masa corporal (IMC) o Índice de Lee.....	16
Tejido graso interescapular e inguinal.....	16
Indicadores conductuales.....	16
Ingesta de alimento.....	16
Ingesta de agua.....	16
Indicadores de progresión tumoral.....	16
Volumen tumoral.....	16
Peso final del tumor.....	17
Sacrificio ético y recolección de muestras.....	17
Activación de tejido adiposo interescapular.....	18
Citocinas IL-6, TNF e IFN.....	18
Expresión de los receptores beta adrenérgicos.....	18
Extracción de RNA.....	18
Obtención de ADNc por RT-PCR.....	18
Expresión de receptores adrenérgicos.....	19
Análisis estadístico.....	20

RESULTADOS.....	21
Expresión de receptores adrenérgicos en tejido tumoral.....	21
Peso corporal.....	23
Índice de masa corporal.....	24
Consumo de alimento y agua	25
Volumen tumoral.....	27
Peso tumoral final.....	28
Tejido adiposo.....	28
Análisis de imagen de tejido adiposo interescapular.....	30
Citocinas plasmáticas	32
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIÓN.....	39
REFERENCIAS.....	40
ANEXO.....	48

INTRODUCCIÓN

Datos preliminares indican que, durante el desarrollo del cáncer la carga tumoral activa el sistema simpato-adreno-medular provocando la liberación de catecolaminas, específicamente la norepinefrina. Esta observación es de interés debido a la contribución de la norepinefrina a la progresión tumoral, promoviendo los procesos de proliferación, invasión y metástasis, esto a través de su unión a los receptores adrenérgicos tipo beta 1 y 2. La norepinefrina proviene de neuronas post gangliónicas procedentes del sistema nervioso simpático o de las glándulas adrenales. Sumado a ello las catecolaminas en plasma sanguíneo pueden llegar hacia tejido adiposo y activar receptores adrenérgicos tipo beta 3 y contribuir por medio de la lipólisis al fenómeno conocido como caquexia asociada a cáncer. La caquexia es un fenómeno de importancia clínica, debido a su alta incidencia en algunos tipos de cáncer, aproximadamente el 30 por ciento de pacientes contraen esta enfermedad lo que contribuye a una tasa de mortalidad de aproximadamente 80 por ciento. Su característica es la pérdida de tejido muscular por la acción de proteólisis donde participan enzimas como MurF1 y Atrogin-1. También se presenta pérdida de tejido adiposo mediada por la acción de enzimas lipolíticas y la expresión de *Ucp1*, proteína clave de la termogénesis.

El estudio de la activación adrenérgica en un modelo tumoral caquético nos permitirá identificar el papel que desempeña cada tipo de receptor en la progresión del mismo. También aportaría nuevos blancos terapéuticos que podrían potencialmente retardar o evitar los efectos de la progresión tumoral y la caquexia asociada.

En este trabajo nos proponemos estudiar la expresión transcripcional de genes claves ligados a la progresión tumoral y caquexia. Además, evaluaremos indicadores morfométricos, conductuales y metabólicos asociados a caquexia. Para ello, emplearemos antagonistas competitivos adrenérgicos y realizaremos una ablación química de las terminaciones noradrenérgicas en un modelo de tumor trasplantable en ratones machos y hembras de la cepa BALB/c.

ANTECEDENTES

Respuesta neuroendocrina: sistema nervioso simpático

El sistema nervioso simpático pertenece al sistema nervioso autónomo, el cual, junto con el sistema nervioso parasimpático, se encargan del mantenimiento de la homeostasis de los organismos. El sistema nervioso simpático está conformado por neuronas pre ganglionares que surgen de las regiones lumbares y torácicas de la medula espinal. Estas recorren en paralelo a la medula espinal y hacen sinapsis con las neuronas post ganglionares. Las cuales son responsables de la síntesis y liberación de catecolaminas (Norepinefrina y epinefrina) hacia los tejidos inervados. De esta forma los órganos responden de manera inmediata ante algún estímulo (McCorry 2017). Además, algunas neuronas pre ganglionares pueden hacer sinapsis con células cromafines de la medula adrenal, de esta manera las catecolaminas son sintetizadas en la glándula adrenal y liberadas hacia el torrente sanguíneo para obtener una respuesta sistémica ante un estímulo como un estresor (Tortora & Derrickson 2014).

La activación neuroendocrina de la respuesta simpática o estrés se refiere como el proceso de adaptación a un insulto biológico, psicosocial o ambiental del individuo, que puede ser de una forma aguda en la respuesta de "pelea o huida". Cuando la activación de estos mecanismos que reestablecen la homeostasis es crónica (como en la presencia de un tumor) puede resultar excesiva e inadecuada por lo que altera el funcionamiento correcto del organismo (Molina & Ashman 2013).

Activación adrenérgica

La activación adrenérgica es producida por los neurotransmisores epinefrina y norepinefrina. Estas moléculas activan los receptores adrenérgicos alfa y beta para producir la respuesta clásica de "pelea o huida" modulando respuestas fisiológicas como presión arterial, cardíaca y respiratoria que preparan al individuo para responder ante un estresor (Johnson 2013). Para que la activación adrenérgica se lleve a cabo, es clave la participación de dos elementos: los receptores adrenérgicos y las catecolaminas.

Los receptores adrenérgicos son proteínas transmembranales de tipo heptahelicoidales que están acopladas a proteínas G heterotriméricas que estimulan ya sea la enzima adenilato

ciclasa o activa la fosfolipasa C para finalmente transducir una señal río abajo para inducir una respuesta ante el estrés. Estos receptores están clasificados en dos: los receptores alfa que a su vez se dividen en dos subtipos; alfa 1 (α_1A , α_1B y α_1D) y los receptores tipo alfa 2 (α_2A , α_2B y α_2C). Por otra parte, también están los receptores tipo beta, que se subdividen en β_1 , β_2 y β_3 (Cicarelli, 2017).

Las catecolaminas son moléculas conformadas por un anillo de benceno con dos grupos hidroxilos adyacentes y un grupo amino. Las neuronas incorporan el amino ácido tirosina y utilizando la enzima limitante tirosina hidroxilasa, incorporan esta tirosina a la ruta biosintética de las catecolaminas. Tras esta primera catálisis por la tirosina hidroxilasa, se produce una 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina, posteriormente está es catalizada hacia dopamina por la DOPA descarboxilasa. Luego, la dopamina es catalizada hacia Norepinefrina por la dopamina β -hidroxilasa. Y por último, la norepinefrina es transformada a epinefrina por la feniletanolamina N-metiltransferasa. (Conn &Freeman 2000).

La carga tumoral como estresor fisiológico

El sistema nervioso simpático es un sensor que percibe amenazas en la homeostasis del organismo y responde con la liberación de catecolaminas en un estrés agudo y una co activación de la vía HPA (hipotálamo-pituitario-adrenal) con la liberación de cortisol. Y este efecto es reproducible en el laboratorio en modelos de estrés como la inmovilización (Ma & Morilack 2005). Estudios han observado alteraciones en el sistema nervioso debido a la carga tumoral, aunque esta no esté relacionada directamente con el sistema nervioso. Se ha observado alteraciones en cerebros de modelos murinos con cáncer pancreático, sarcoma, pulmón y tumores derivados de pacientes “PDX” en distintas rutas metabólicas celulares incluyendo elevaciones en amino ácidos precursores de neurotransmisores como el glutamato precursor de GABA, tirosina y dopamina precursores de catecolaminas (Kovalchuk et al., 2018). En otros estudios también se ha observado el aumento de la norepinefrina en ratones portadores de tumor indicando activación del sistema nervioso simpático. En un trabajo realizado por Lin y colaboradores (2013) miden los niveles de epinefrina y norepinefrina en ratones portadores del tumor HT29. Después de varios días de inmovilización, se comparó contra un grupo control portador de tumor y se encontró

que las concentraciones plasmáticas de norepinefrina y epinefrina eran similares aunque si había diferencias en los días 14 (E) y 7 (NE), donde en el caso de la NE en el día 14, se vuelve a equilibrar. Estos resultados sugieren que el tumor por si solo induce una respuesta neuroendocrina. Por otra parte, en un experimento realizado en el linfoma L5178Y-R se encontró que no había diferencia significativa en los niveles de norepinefrina en ratones portadores de tumor sometidos a estrés contra un grupo portador de tumor sin estrés. También, realizaron la comparación de estos grupos contra ratones control sin tumor ni estrés y se encontró que hay una diferencia significativa en los niveles de norepinefrina en un grupo con tumor contra uno sin tumor (Montero-Molina, 2016). En otro trabajo en el mismo modelo de linfoma, se observó un incremento del 240% de NE plasmática en ratones hembras BALB/c portadores de tumor contra un grupo sin tumor, ambos en condición de reposo (Caballero-Hernández et al., 2017). Estos resultados refuerzan la hipótesis del tumor como un estresor fisiológico capaz de activar la vía SAM.

Activación adrenérgica y cáncer

Dada la premisa que la síntesis y liberación de norepinefrina es estimulada por la carga tumoral, esta puede activar receptores en el tumor o microambiente tumoral causando diversos efectos. En una revisión realizada por Fitzgerald (2009) propone a las catecolaminas como un factor etiológico del cáncer, esto basado en información publicada de la manera en que la norepinefrina y epinefrina pueden modular el desarrollo del cáncer. In vitro Barbieri (2015) encontró que en células DU145 de cáncer de próstata tratadas con norepinefrina, incrementan la proliferación celular e incrementan la expresión de vimentina y altera la actividad de E cadherina, ambas proteínas ligadas a metástasis. Por otro lado, Palm (2006) utiliza células PC-3 procedentes del carcinoma de próstata y no encuentra una proliferación significativa sobre la aplicación de norepinefrina en las células, pero si encuentra mayor movilidad en un ensayo de migración celular. Este fenotipo metastásico inducido por la NE también se ha observado en células HONE-1 de un carcinoma nasofaríngeo, donde se ve aumentada la cantidad de proteína MMP-2, MMP-6 y VEGF en los sobrenadantes de células tratadas con NE (Yang et al., 2006). Por su parte, Bernabé (2011) trató células escamosas de carcinoma oral SCC9, SCC15 y

SCC25, y reportó un aumento en los niveles del ARN mensajero y molécula IL-6 en células tratados con NE e isoproterenol (un agonista no selectivo de receptores beta adrenérgicos) comparados contra un control. Sumado a ello, reportó el aumento en la proliferación de las células SCC9 Y SCC15 al ser tratadas con NE.

Además, se ha observado que la norepinefrina remodela el microambiente tumoral. En ensayos *in vitro*, se ha observado que las células del melanoma humano A375 expresan receptores tipo beta 3 en condiciones de hipoxia, isquemia y un medio pobre en glucosa. Este efecto también se vio reflejado en células accesorias regularmente presentes en el microambiente tumoral como fibroblastos HDF, macrófagos y líneas celulares de epitelio EPC y HUVEC (Calvani et al., 2015).

Estos efectos han sido corroborado en estudios *in vivo*, se ha reportado un aumento en la expresión de las proteínas MMP-2 y MMP-9 en ratones portadores del tumor DU145 (Barbieri 2015). Se ha reportado que la administración de NE promueve el crecimiento tumoral hasta en un 51.65% en ratones hembras C57BL6 portadoras del melanoma B16F y que atenúa la eficacia de quimioterapéuticos como el Sutinib. También, aumenta la expresión de VEGF, un factor ligado a metástasis (Deng et al., 2014).

En otro estudio en pacientes humanos con leucoplasia oral, carcinoma de células escamosas (SCC) oral u orofaríngeo se encontró una mayor cantidad de norepinefrina plasmática al compararlos con pacientes con una lesión benigna. También observaron diferencias en la cantidad media de NE plasmática (SCC oral < SCC orofaríngeo < leucoplasia). Se encontró una asociación entre niveles de catecolaminas altos con factores conductuales y ansiedad. Por ejemplo: temblor de manos, dificultad respiratoria y mala calidad del sueño (Bastos et al., 2018).

Activación adrenérgica y caquexia asociada a cáncer

La caquexia asociada a cáncer se define como un síndrome multifactorial caracterizado por la pérdida progresiva de tejido muscular que puede estar acompañado por la pérdida de tejido adiposo, no puede ser revertido por soporte nutricional convencional y conlleva hacia un deterioro funcional. Esta fisiopatología se caracteriza por un balance energético negativo en consecuencia de anorexia y un metabolismo anormal (Fearon et al., 2011). Si

bien los esfuerzos se han concentrado en el desgaste muscular, también otros han surgido en torno a la lipólisis y termogénesis. Esto debido principalmente a la presencia de receptores tipo β -3 en tejido adiposo y su capacidad termogénica que va acompañada de lipólisis, fenómeno observado en tejido adiposo tanto de roedores como en humanos utilizando un agonista tipo beta 3 (Cypess et al., 2015). Además, se ha observado tejido adiposo pardo en pacientes con tumores neuroendocrinos como feocromocitoma y paragangliomas, tumores que activamente secretan moléculas bioactivas como la norepinefrina (Dundamadappa et al., 2007; Puar et al., 2016). Incluso, la presencia de tejido adiposo pardo en pacientes con tumores neuroendocrinos se asocia con una baja prognosis de supervivencia (Abdul et al., 2020).

Por otro lado, observaciones de tejido adiposo pardo se han hecho en modelos animales tumorales. En un estudio Petruzelli et al. (2014) encontraron que el pardeamiento de tejido adiposo pardo es un hallazgo consistente en diversos modelos tumorales murinos (genéticamente modificados para cáncer pancreático, pulmonar, cáncer de piel; en un modelo de cáncer inducido por químicos con el carcinógeno dietilnitrosamina; en un modelo singénico utilizando células de melanoma B16 y en modelos xenogénico utilizando tumores de pacientes Panc42 y Panc34 en ratones inmunocomprometidos SCID). Además, encontró la expresión elevada de *Ucp-1*; un indicador de termogénesis, y que este efecto de termogénesis ocurre desde una etapa temprana pre-caquética con la presencia de *Ucp-1*, aun cuando no es evidente el deterioro adiposo ni el desgaste muscular. Sumado a ello, muestra la relevancia clínica explorando la expresión de UCP-1 en biopsias de tejido adiposo de pacientes caquéticos de diversos cánceres como sarcoma de Kaposi, melanoma, colangiocarcinoma, cáncer neuroendocrino pancreático, cáncer pleomórfico de pulmón y adenocarcinoma de pulmón, reportando resultados positivos para UCP-1 indicando termogénesis en pacientes con caquexia.

Por otra parte, se ha visto que los receptores tipo beta 3 son capaces de influir en la secreción de citocinas relevantes en caquexia, entre ellas la IL-6, la cual modifica parámetros de composición corporal y contenido lipídico (Buzelle et al., 2015). Se ha asociado IL-6 y ácidos grasos libres en pacientes con caquexia con cáncer gástrico y colorrectal. Aunado a ello, el tratamiento con anti-IL-6 protege el tejido adiposo de

desgaste y pardeamiento en ratones BALB/c portadores portadores de tumores caquéticos C26 (Han et al., 2018).

Se han hecho otros acercamientos hacia la exploración de receptores tipo beta 3 en caquexia asociada a cáncer, pero estos se han realizado de manera indirecta utilizando antagonistas de receptores adrenérgicos los cuales se expondrán en un apartado más adelante.

Antagonistas adrenérgicos beta y cáncer

Ya se ha demostrado en muchas investigaciones el rol de la norepinefrina y su efecto estimulador en la progresión tumoral a través de la activación de receptores beta adrenérgicos. Por lo que se ha explorado el bloqueo de estos receptores como un blanco potencial terapéutico.

Uno de los compuestos más estudiados es el antagonista competitivo de receptores tipo beta 1 y 2, propanolol. En estudios *in-vitro* se encontró en una línea celular de cáncer de próstata PC-3 que el tratamiento con propanolol o NE no influía en la proliferación celular, pero el tratamiento con propanolol inhibía el incremento migratorio de las células tratadas con NE (Palm et al., 2006). Se ha observado que el propanolol disminuye la proliferación celular en células de cáncer de próstata DU145 tratadas con NE, y disminuye la expresión de E-cadherina y vimentina (Barbieri et al., 2015), disminuye la invasividad en células de cáncer pancreático Miapaca-2 tratadas con NE y reduce la expresión de MMP-2, MMP-9 y VEGF (Guo., et al 2009). También reprime la proliferación de células de cáncer de hígado HepG2 y HepG2.215 e incrementa la apoptosis (Wang et al., 2018). Se ha observado que en las líneas celulares humanas de melanoma MEL270 y OMM2.5 reduce la viabilidad celular, migración y la secreción de VEGF (Bustamante et al. 2019).

Estudios *in-vivo* han reportado resultados similares, se ha observado que el propanolol reduce el volumen tumoral y disminuye la expresión de VEGF, MMP-2 y MMP-9 en un modelo de neuroblastoma BE(2)-C en ratones desnudos BALB/c (Xu et al., 2013). En otro experimento con ratones desnudos BALB/c nu/nu con un modelo de cáncer de colon HT-29, el antagonista adrenérgico no selectivo redujo la metástasis hacia el hígado y disminuyó la expresión transcripcional de IL-6, MMP-9 y VEGF (Zhao et al., 2015) y en

el adenocarcinoma mamario 66c14 en ratones hembras BALB/c (Sloan et al., 2010). Incluso el propranolol se ha utilizado en clínica, principalmente en el hemangioma infantil, se ha reportado que el uso de propranolol es seguro en fase clínica 3 y en casos de estudio en Europa y Asia (Baselga et al., 2018; Kagami et al., 2018).

La mayoría de los trabajos se han concentrado en el uso de bloqueadores para receptores beta tipo 1 y 2, sin embargo, se ha realizado poco trabajo en explorar los receptores tipo beta 3. Dal Monte y colaboradores (2013) encontraron que los antagonistas del receptor tipo beta 3, SR59230A y el L-748,337, disminuyen la proliferación celular, inducen el aumento en la expresión de Bax/Bcl-2 y citocromo-c; indicadores de apoptosis en células de melanoma B16F10. Estos resultados fueron emulados en un experimento *in-vivo* en ratones hembra C57BL/6 J con el melanoma B16F10, donde se encontró al final del experimento un menor peso tumoral, además de la expresión de la proteína Bax y Bcl-2 y la detección de caspasa 3 por inmunohistoquímica de tejido tumoral. En otro trabajo emplearon el antagonista L-748,337 en un modelo murino de neuroma, un tumor benigno de nervios periféricos encontrando que el compuesto suprime la proliferación de células perineurales y una mejora en el estado del animal (Minarelli et al 2019).

Antagonistas adrenérgicos caquexia asociada a cáncer

El uso de antagonistas adrenérgicos en caquexia asociada a cáncer no ha sido muy extenso. Sin embargo, algunos trabajos han ligado la termogénesis por activación de receptores tipo beta 3 con el desgaste de tejido adiposo en cáncer. Uno de los primeros trabajos reportados fueron los experimentos realizados por Petruzelli y colaboradores (2014), donde realizaron una denervación quirúrgica de tejido adiposo interescapular en ratones caquéticos K5-SOS con cáncer de piel. La cirugía disminuyó de manera significativa los niveles de la proteína UCP-1 en tejido adiposo. Sumado a ello, empleó el antagonista de receptores adrenérgico beta 3 SR59230A y encontró resultados similares a la denervación indicando que el antagonista disminuyó la expresión de Ucp-1 y atenuó la pérdida de tejido adiposo gonadal, inguinal, axilar y tejido musculo-esquelético. En un trabajo más reciente, Jin y colaboradores (2018) modificaron la ariloxipropanolamina (el esqueleto químico del antagonista L-748,337) y demostraron su capacidad para inhibir la lipólisis en adipocitos 3T3-L1. Así mismo, probaron el compuesto *in-vivo* en un modelo murino

de cáncer de colon c26 en machos BALB/c, encontrando que el grupo tratado perdió menos peso corporal, los tumores presentaron un menor volumen e incluso se encontraron niveles menores de glicerol comparados contra el grupo control, indicando una reducción en lipólisis. Los acercamientos al tratamiento de caquexia utilizando bloqueadores beta se ha centrado en caquexia asociada a cáncer. En un estudio realizado en humanos de caquexia asociada a fallo cardiaco crónico, utilizaron carvedilol, un bloqueador de receptores tipo beta y alfa 1, y encontraron que los pacientes ganaron peso corporal e incrementaron sus niveles de leptina. Un hecho a destacar es que, en este estudio, los pacientes caquéticos presentaron niveles de norepinefrina plasmática elevados comparados con sujetos sanos y estos niveles disminuyeron al ser tratados (Hryniewicz et al., 2003). Resultados similares han sido reportados en otros estudios humanos utilizando el antagonista carvedilol, principalmente en la protección de pérdida de peso y ayuda en la ganancia del mismo (Clark et al. 2017; Sze et al 2018).

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una enfermedad de alta incidencia, tan solo en México se registraron 190,000 casos y se reportaron poco más de 83,000 muertes en el año 2018 (Iarc.fr, 2019). Por otra parte, la prevalencia de caquexia en pacientes con cáncer es de un 30% y con una mortalidad de hasta un 80% (Haehling et al., 2016). Si bien una enfermedad de tal magnitud es acompañada por estresores psicológicos que contribuyen a una mala prognosis en el desarrollo de la enfermedad, el tumor mismo es un estresor capaz de inducir activación adrenérgica y contribuir en la patología de cáncer y caquexia asociada. El estudio de la activación adrenérgica durante la progresión tumoral con el empleo de moléculas antagonistas nos podría ayudar a identificar blancos terapéuticos que podrían prevenir o retardar el desarrollo del cáncer y los efectos caquéticos que lo acompañan.

HIPÓTESIS

La activación adrenérgica promueve la progresión tumoral y está implicada también en el desarrollo de caquexia asociada a cáncer, fenómenos que se pueden revertir mediante el bloqueo con antagonistas de receptores adrenérgicos en ratones BALB/c.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel de la activación adrenérgica sobre la progresión tumoral y de caquexia asociada a cáncer en un modelo murino de tumor trasplantable.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la expresión de receptores adrenérgicos en tumor, músculo y tejido adiposo en ratones portadores del linfoma L5178Y-R.
2. Evaluar el efecto de los antagonistas adrenérgicos beta, propanolol y L 748, 337 sobre indicadores morfométricos, conductuales, y moleculares de progresión tumoral y de caquexia asociada a cáncer en un modelo *in vivo*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Declaración ética

Este trabajo incluye el uso de animales de experimentación, por lo que fue sometido para su aprobación por el Comité Interno de Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Departamento de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL con clave de registro CEIBA-2020-001. Todos los procedimientos de trabajo con los animales cumplieron con la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*.

Declaración de bioseguridad

Este proyecto involucró experimentación con animales y trabajo con una línea celular. Para el trabajo con animales, ratones, se siguió la normativa pertinente como se declaró previamente. El uso de la línea celular L5178Y-R requiere del manejo en un laboratorio nivel uno de bioseguridad, ya que no representa riesgo para el humano. Por lo que se recomienda su manipulación en un laboratorio nivel dos como precaución extra (ATCC, 2019).

Todos los procedimientos se llevaron a cabo en un laboratorio de bioseguridad, nivel 2 realizando los procedimientos operacionales estándar apropiados de acuerdo al Manual de Bioseguridad de la Organización Mundial de Salud (OMS, 2005). Se llevó a cabo el entrenamiento apropiado en procedimientos de laboratorio nivel 2 y en técnicas de manejo y cuidado animal.

Animales

Se emplearon ratones BALB/c de ambos sexos, de 10-12 semanas de edad al inicio de los experimentos, los cuales fueron proporcionados por el bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la UANL. Se mantuvieron en jaulas microventiladas con acceso a agua y alimento ad libitum con un ciclo luz/oscuridad de 12 h (6 A.M. - 6 P.M.), a una temperatura ambiental controlada de 22 °C y humedad relativa de 45%. Los animales se agruparon 6 por jaula para evitar estrés por aislamiento y se enriqueció su ambiente con tubos de cartón para formación de nidos y exploración del animal.

Modelo del linfoma murino L5178Y-R

Se utilizó el linfoma murino L5178Y-R como modelo de cáncer in vivo. El linfoma L5178YR se obtuvo originalmente en ratones de la cepa DBA/2 y ha sido utilizado ampliamente en ratones BALB/c puesto que poseen el mismo haplotipo (H-2d) que la cepa DBA/2. Las células L5178Y-R originales se obtuvieron a partir de un linfoma inducido con metilcolantreno en ratones DBA/2 el 8 de julio de 1951 en la Universidad de Yale (USA) (Szumiel et al., 2005 a, b). En cuanto al tipo celular, presentan morfología de linfoblastos (origen tímico) que presenta la característica de ser resistente a rayos X y sensible a radiación ultravioleta (UV-C).

El mantenimiento de este linfoma se llevó a cabo por trasplante de ratón a ratón mediante la inyección i.p. de un volumen de 0.2 mL de una suspensión de células tumorales L5178Y-R (5×10^6 células/ratón) en ratones hembras BALB/c de 8 a 10 semanas de edad. Trece días después de la inoculación se colectó el líquido ascítico de la cavidad peritoneal del ratón (previamente sacrificado por dislocación cervical) en tubos cónicos de 50 mL con 10 mL de PBS. La suspensión celular se lavó dos veces en PBS, por centrifugación a 2000 rpm/10 min, y se ajustó a una densidad de 2×10^7 células/mL en medio RPMI completo.

Para la formación sólida del tumor, se inocularon 0.2 mL de la suspensión de células ajustadas en la extremidad posterior derecha de ratones BALB/c de 10-11 semanas por vía subcutánea (Gómez-Flores et al., 2005). La inoculación de células tumorales induce la formación y crecimiento de una masa tumoral en los animales, estos tumores afectan su bienestar, por lo que se emplearan una serie de criterios de punto terminal (Anexo I) para minimizar el sufrimiento de los animales experimentales (Workman, 2010).

Diseño experimental

Se emplearon ratones de hembras y machos divididos por sexo en 5 grupos; control sin tumor, control con tumor, tumor + propanolol, tumor + L-748,337. Cada grupo constará de 6 animales (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de los ratones en los distintos tratamientos, por sexo y grupos.

Tratamiento	Hembras	Machos
Control sin tumor	4	4
Control con tumor	6	6
Tumor propanolol	6	6
Tumor L-748,337	6	6

Tratamiento con el bloqueador adrenérgico propanolol

El antagonista no selectivo para receptores adrenérgicos tipo beta 1-2, propanolol (Sigma-Aldrich, San Luis MO, USA), se administró diariamente a una dosis de 10 mg/kg en solución salina por vía intraperitoneal, por un periodo comprendido desde el trasplante del tumor hasta su sacrificio ético.

Tratamiento con el bloqueador adrenérgico L-748,337

El antagonista de receptores adrenérgicos tipo beta 3, L-748,337 (Tocris Bioscience Bristol, UK), se administró a una dosis de 50 µg/kg en solución salina por vía intraperitoneal, cada 24 h, por un periodo comprendido desde el trasplante del tumor hasta su sacrificio ético.

Indicadores morfométricos

a) Peso corporal

Se determinó el peso de cada ratón cada dos días hasta finalizar el experimento; para ello se utilizó una balanza analítica y se registraron los datos en la bitácora

b) Índice de Masa corporal (IMC) o Índice de Lee

El índice de Lee o índice de masa corporal (IMC) se obtuvo al finalizar el experimento, dividiendo el peso final del animal entre el cuadrado de la longitud nariz-ano (Friedman et al., 1991).

c) Tejido graso interescapular e inguinal

Una vez pesadas las muestras de grasa, se calculó el porcentaje respecto al peso total. Se multiplicó por 100 el peso del tejido y se dividió entre el peso total del animal.

Indicadores conductuales

a) Ingesta de alimento

Se registró el consumo de alimento en gramos, utilizando una balanza analítica, se preparó una tabla donde muestra el alimento disponible, consumido y la diferencia por jaula, este número resultante se dividió entre el número de individuos por jaula para obtener la cantidad promedio de alimento consumida por ratón. El monitoreo se realizó pre- y post-inoculación del tumor, cada tres días hasta finalizar el experimento.

b) Ingesta de agua

Se midió el consumo de agua por jaula cada tres días hasta finalizar el experimento, utilizando una probeta graduada de 100 mL.

Indicadores de progresión tumoral

a) Volumen tumoral

Se tomaron medidas del largo y ancho del tumor durante el tratamiento, cada tres días, utilizando un vernier digital modelo Fisher Scientific. Las medidas fueron tomadas por la misma persona para evitar variaciones en el registro. De acuerdo a las medidas se calculó el volumen tumoral (VT) mediante la siguiente fórmula, donde L= largo y A= ancho (Barbieri et al., 2015):

$$VT = \frac{L * A^2}{2}$$

b) Peso final del tumor

Al finalizar el experimento, los ratones se sacrificaron y se extrajeron los tumores y se pesaron en una balanza analítica.

Sacrificio ético y recolección de muestras

Los animales se sacrificaron por punción cardiaca terminal al finalizar cada tratamiento, se empleó una mezcla de ketamina/xilacina como anestésico a una concentración de 100 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilacina. En cada animal se llevó a cabo la punción cardíaca terminal utilizando jeringas de 1 mL, con aguja Luer Lock de 27Gx13 mm, con trazas de anticoagulante EDTA. La sangre se recolectó en microtubos de 1.5 mL y se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos, al finalizar se colectó el plasma, se alicuotó y se almacenó a -80 °C.

Después de la punción cardiaca, se aseguró el sacrificio de los animales con dislocación cervical, y se llevó a cabo disección para coleccionar tumor, grasa interescapular y grasa inguinal. El tumor y la grasa se pesaron en una balanza analítica y se almacenó a -80°C para su uso posterior.

Activación de tejido adiposo interescapular (histología)

Para evaluar la activación del tejido adiposo pardo se extrajo la grasa parda interescapular después del sacrificio ético, se fijó en formaldehído al 10% por 24 horas, se prepararon cortes histológicos y se tiñeron con hematoxilina-eosina para su análisis por microscopía.

Se tomaron fotografías de los cortes histológicos en un microscopio Primo Star Zeiss (Oberkochen, DE) con un objetivo al 40X/0,65. Las imágenes fueron ajustadas a un tamaño de 3289 X 3289 pixeles y se guardaron en el formato PNG. Posteriormente, se analizaron utilizando el software libre Image J (NIH) y el plugin Adiposoft para calcular número de células y área celular. Del tejido adiposo interescapular de cada individuo se analizaron como mínimo dos fotografías de distintas locaciones del mismo corte. Para el grupo control de machos y grupo tumor de hembras se analizaron tres repeticiones de dos individuos por grupo.

Citocinas IL-6, TNF e IFN

Se cuantificó el contenido de citocinas plasmáticas asociadas a caquexia en plasma de ratones sanos, con tumor y tratados con el L-748,337 utilizando el kit mouse Th1/Th2/Th17 cytokine BD Cytometric Bead Array (CBA; BD Biosciences Ann Arbor, MI, USA). Y se utilizó el programa FCAP Array para analizar los datos.

Expresión de los receptores beta adrenérgicos en tumor y tejido adiposo

a) Extracción de ARN

Se extrajo ARN total (ácido ribonucleico) de tejido adiposo interescapular, musculo y tumor por el método del TRIzol® Reagent (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

b) Obtención de ADNc por RT-PCR

Para la retrotranscripción de ARN a ADNc, se empleó el kit High Capacity ADNc Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). En cada reacción de un volumen final de 20 µL se cargaron 2 µg de ARN de cada una de las muestras (en un volumen final de 10 µL), 2 µL de 10X RT buffer, 0.8 µL de 25x dNTP Mix (100 mM), 2 µL de 10X RT Random

Primers, 1 μ L de MultiScribe Reverse Transcriptase, y 4.2 μ L de agua libre de nucleasas. Las condiciones de reacción utilizadas fueron las siguientes: 25 °C (10 minutos), 37 °C (120 minutos), 85 °C (5 minutos) y 4 °C (∞). Una vez finalizada la retrotranscripción, el ADNc se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

c) Expresión de receptores adrenérgicos

Se comparó de manera semi cuantitativa la expresión de los genes β -1, β -2 y β -3, en tejido tumoral a partir de la densidad de las bandas productos de PCR punto final en un gel de agarosa al 1% en tejido tumoral, grasa interescapular y músculo. Se utilizó el gen endógeno beta-actina (ACTB) para normalizar la expresión. En tejido adiposo se observó la presencia de las bandas de los receptores tipo β -3, las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados y el tamaño de amplicón

Gen	Primers	Tamaño (Pb)
	F (Forward) R (Reverse)	
<i>Adrb1</i>	F: 5' - ACGCCGCTCCCCATAGTCC -3' R: 5' - TCGGTCCGGGGCTTTTCTGTA -3'	191
<i>Adrb2</i>	F: 5'-GTTTGGGGCCAGTCACATCCTTAT-3' R: 5'-CACTCGGGCCTTATTCTTGGTCA -3'	148
<i>Adrb3</i>	F: 5' - CCAGGCGCCACACGAGATG -3' R: 5' - TGCGGGCGATGGCTATGATTA -3'	200

Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: Fase I; Iniciación 95°C durante 5 min; Fase II: Desnaturalización 95°C (30 segundos), hibridación 59°C (30 segundos); Elongación 72°C dura (40 segundos; 30 ciclos); Fase III Terminación/elongación 72°C (5 minutos). La preparación de los reactivos se expone en la siguiente tabla:

Tabla 3. Reactivos y concentración de la reacción de PCR punto final.

Reactivo	μL
GoTaq® Master mix 2X	5
Primer F' (10 μM)	0.3
Primer R' (10 μM)	0.3
cDNA (20 ng)	4
Agua miliQ	0.4
Reacción final	10

La electroforesis se llevó a cabo en una cámara a 100v por 40 minutos, el gel fue teñido en una solución de bromuro de etidio durante 20 minutos y se reveló en luz UV. Se tomó fotografía utilizando un foto-documentador y se realizaron los análisis de densitometría con el software Image Lab™ Versión 6.0.1

Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de Kolmogorov-Smirnov para determinar la distribución de los datos, en caso de presentar una distribución normal, considerando valores de p mayor a 0.05, se realizó la prueba paramétrica T de Student y para datos sin una distribución normal, se realizaron pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney. En todos los casos se consideró una $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativa. Los análisis se realizaron usando el paquete de datos estadístico SPSS (versión 21).

RESULTADOS

Expresión de receptores adrenérgicos en tejido tumoral

Se encontró expresión de los mensajeros de RNA para los receptores beta adrenérgicos 1, 2 y 3 en tejido tumoral de ratones hembras y machos sin tratamiento. En hembras, para los receptores beta-1 se encontró una expresión de 1.69 de cuantificación relativa comparada contra el mensajero endógeno mientras que los receptores tipo beta-2 se expresaron 2 veces más con una cuantificación relativa de 2.03 para los receptores tipo beta 3 se encontró una expresión de 1.63 de cuantificación relativa (Figura 1a). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la expresión relativa entre los grupos, los valores de p fueron los siguientes: β -1 y β -2 ($p=0.752$), β -2 y β -3 ($p=0.759$), y β -1 y β -3 ($p=0.953$).

Por otro lado, en ratones machos los receptores beta 1 tuvieron una mayor expresión con una media de 0.93 de cuantificación relativa comparada contra el endógeno b-actina ($p=0.405$). Los receptores tipo β -2 se expresaron 2.2 veces menos con una media de cuantificación relativa de 0.44 mientras que para los receptores tipo b-3 se encontró una expresión 2.3 veces menor con una media de cuantificación relativa, ningún valor resultó estadísticamente significativo (Figura 1a). No se encontraron diferencias estadísticas al comparar los grupos dando los siguientes valores de significancia: β -1 y β -2 ($p=0.405$), β -2 y β -3 ($p=0.960$), y β -1 y β -3 ($p=0.408$).

Después, observamos la presencia de bandas que confirman la presencia de mRNA para los receptores tipo β -3 por PCR punto final de tejido adiposo interescapular de ratones hembras y machos, control sanos y portadores de tumor (Figura 1c).

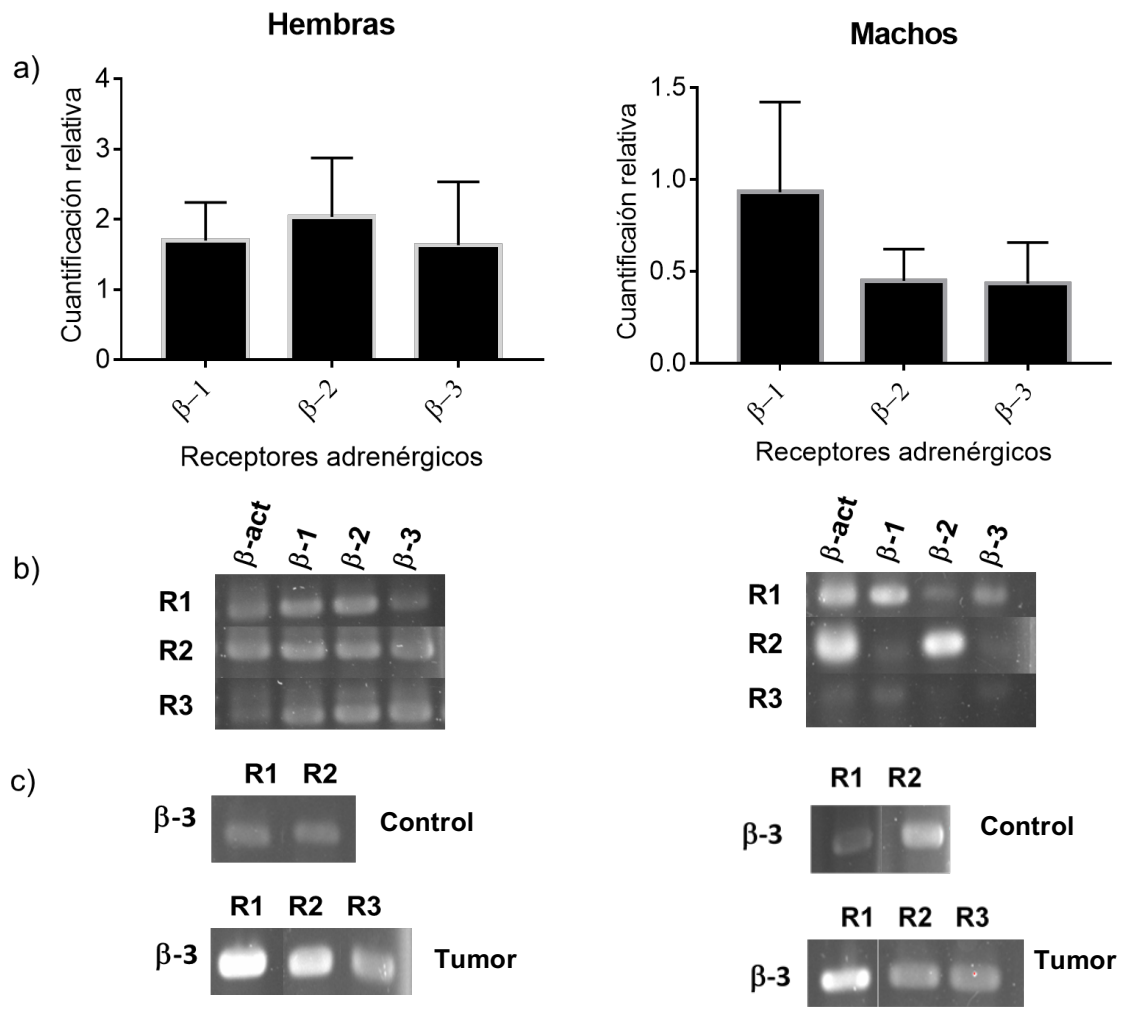


Figura 1. a) Cuantificación relativa según los análisis densimétricos de la expresión de los mensajeros para receptores beta adrenérgicos en tejido tumoral en hembras y machos portadores del linfoma murino (n=3). **b)** fotografías de las bandas para los receptores adrenérgicos en geles de agarosa al 1.2% **c)** Bandas de DNA producto de la amplificación de los mensajeros para receptores $\beta-3$ en tejido adiposo interescapular en ratones hembras y machos.

Peso corporal

En ratones hembra la carga tumoral no afectó el peso corporal durante el experimento. Los ratones del grupo tumor no tratados iniciaron con una media de peso corporal de 22.55 g y finalizaron con una media de 23.74 g comparados contra el grupo control sano que inició con una media de peso corporal de 22.91 g y finalizaron con una media de peso corporal de 23.16 g ($p=0.724$). El tratamiento con los beta bloqueadores no afectó significativamente el peso corporal de los ratones portadores de tumor, el grupo tratado con el L-748,337 inició con una media de peso corporal de 19.41 g y finalizó con una media de 22.03 g de peso corporal ($p=0.995$). Mientras que los tratados con el bloqueador no selectivo propanolol inicio con una media de 14.99 g y finalizaron con una media de 17.82 g ($p=0.086$) tal como se observa en la Figura 2a.

En ratones machos la carga tumoral redujo de manera estadísticamente significativa el peso corporal iniciando con una media de 31.01 g y finalizando con 30.57 g de peso corporal en un 1.4% durante el experimento comparado contra el grupo control sin tumor el cual inició con una media de 36.7 g y finalizó con 36.68 g de peso corporal ($p=0.004$). El grupo tratado con el antagonista beta-3 L-748,337 recuperó de manera significativa el peso corporal en un 3.8 % que inició con una media de 37.72 g y finalizó con una media de 39.18 g de peso corporal ($p=0.001$). En contraste, el tratamiento con el propanolol no afectó el peso corporal del grupo, el cual inició con una media de 32.53 g y finalizó con una media de 32.36 g ($p=0.347$) como se observa en la Figura 2b.

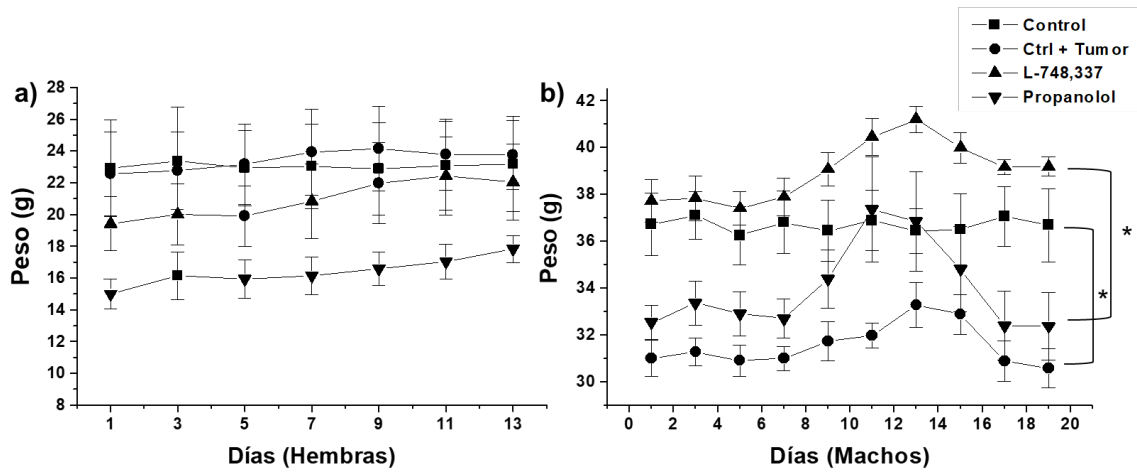


Figura 2. Evolución del peso corporal durante el tratamiento con los antagonistas adrenérgicos β 1-2 propanolol y β 3, L-748,337 en A) ratones hembras y B) ratones machos. Se representa la media y su EE, los valores de $p \leq 0.05$ (*) se consideran como significativos.

Índice de Masa Corporal

Se observaron diferencias en el índice de masa corporal en ratones portadores de tumor en forma dependiente de sexo. Los ratones hembras perdieron un 6.6 % de IMC 0.29 g/cm^2 contra 0.33 g/cm^2 ($p=0.187$) comparado contra el grupo sano, si bien esta diferencia no fue significativa. Cuando se comparó el grupo tratado con el antagonista L-748,337 contra los ratones no tratados portadores de tumor, hubo un incremento no significativo del 10 % con un IMC de 0.28 g/cm^2 ($p=0.657$). No se encontraron efectos del tratamiento con el propanolol comparado contra el grupo no tratado, aunque hubo una pérdida del 24 %, el valor del IMC fue de 0.22 g/cm^2 con un valor de $p=0.079$ (Figura 3.a). Por otro lado, el índice de masa corporal en machos portadores de tumor no tratados disminuyó de manera significativa en un 7.5 % ($p=0.031$) comparado contra los ratones control libres de tumor, de 0.36 g/cm^2 a 0.34 g/cm^2 respectivamente. Mientras tanto, en los ratones tratados con el L-748,337 se observó un incremento significativo del 10 por ciento en su IMC, con una media de 0.37 g/cm^2 en comparación con los ratones portadores de tumor no tratados ($p=0.043$). En cambio, en los ratones tratados con el bloqueador no selectivo propanolol no se observó ningún efecto comparado con los ratones no tratados portadores de tumor ($p=0.338$), aunque hubo un incremento del 3% en la media de IMC de 0.35 g/cm^2 (Figura 3b).

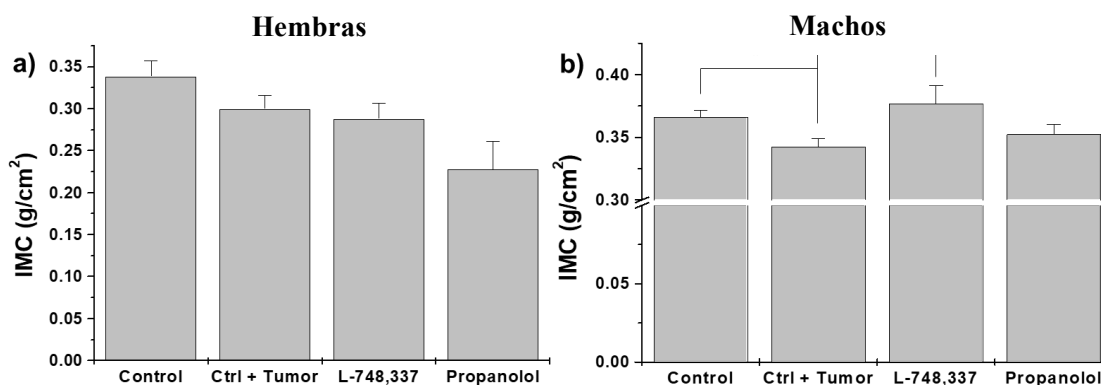


Figura 3. Valores de IMC expresado en g/cm², de ratones a) hembras y b) machos BALB/c de los distintos grupos. Se representa la media y su error estándar, se considera como significativo los valores de $p \leq 0.05$

Consumo de alimento y agua

Los ratones hembra con carga tumoral disminuyeron la ingesta de alimento en un 5.4 % de 2.7 g a 2.6 g comparado contra ratones sanos, aunque no fue estadísticamente significativa. Y, cuando fueron tratados con L-748,337 y propanolol incrementaron su consumo de manera no significativa en un 12.7 % ($p=0.341$) y 8.3% ($p=0.459$) respectivamente comparado contra ratones no tratados portadores de tumor, el consumo fue el siguiente: L-748,337 2.9 g y propanolol 2.8 g como se observa en la figura 4a. El consumo de alimento en ratones machos portadores de tumor no tratados disminuyó significativamente un 17%, de una media de 5.14 g a 4.26 g ($p=0.015$) comparado contra los controles libres de tumor. Con el tratamiento con L-748,337 se observó un aumento significativo en el consumo de alimento con una media 5.06 g de consumo, un aumento del 18 % con respecto al control no tratado ($P=0.013$), mientras que en el grupo tratado con propanolol no se observaron cambios significativos ($p=0.129$) como se observa en la Figura 4b.

En hembras con carga tumoral el consumo de agua disminuyó de manera no estadísticamente significativa en un 13.9% ($p=0.186$) mientras que el grupo tratado con el L-748,337 incrementó de forma no significativa la ingesta de agua en un 0.8% comparado contra ratones no tratados portadores de tumor ($p=0.916$). En los ratones tratados con propanolol la ingesta de agua disminuyó en un 21.7% de forma

estadísticamente significativa con un valor de $p=0.044$ (Figura 4c). En los ratones machos portadores de tumor no tratados la media de consumo de agua disminuyó en un 22% de forma significativa ($p=0.013$) comparado contra ratones sanos y cuando fueron tratados con el L-748,337 su consumo de agua se incrementó en un 34% comparado contra el grupo de ratones control no tratados ($p=0.001$). Por otro lado, el tratamiento con propanolol incrementó en los ratones con tumor el consumo de agua de manera significativa en un 44.8% ($p=0.001$) como se observa en la Figura 4d.

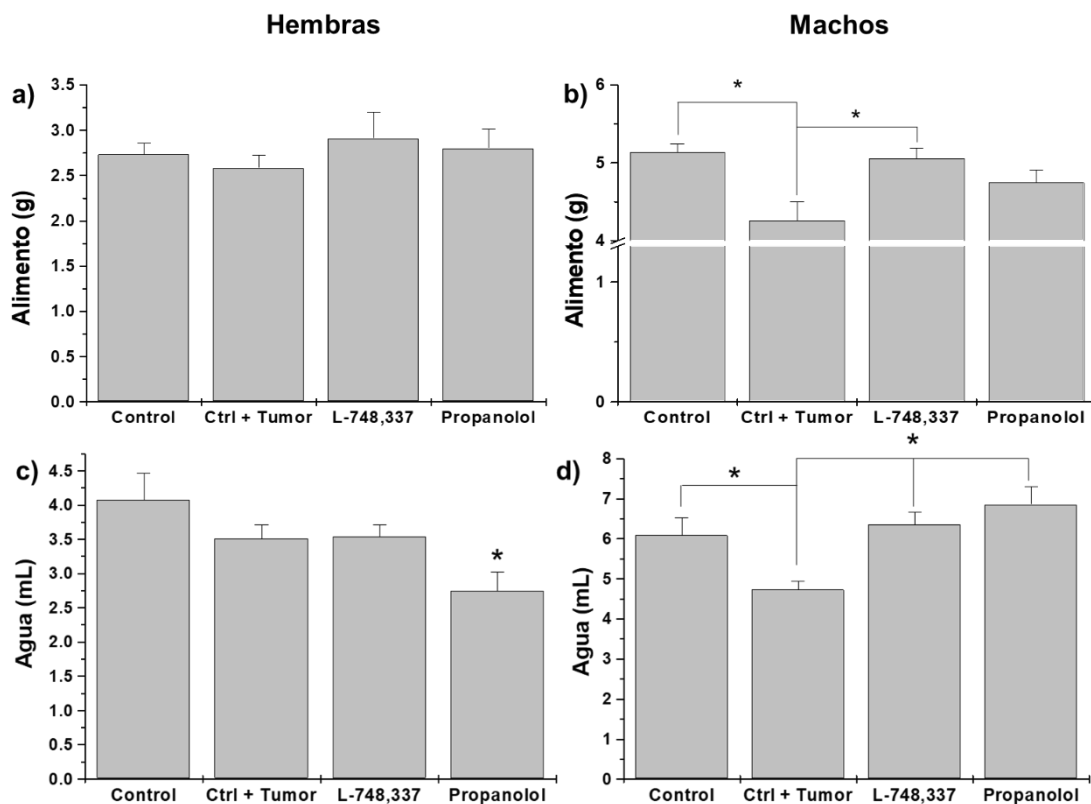


Figura 4. Conducta alimentaria durante el tratamiento con los antagonistas adrenérgicos β 1-2, propanolol y β 3, L-748,337 en ratones a-b) hembras y c-d) machos, se consideran como significativos valores de $p \leq 0.05$ (*).

Volumen tumoral

El volumen tumoral se empezó a registrar desde que el tumor era palpable, en la Figura 5a se observa la evolución del volumen tumoral en hembras. Este inició en el día 8 con una media de volumen tumoral de 267.26 mm^3 en ratones control sin tratamiento y finalizó en el día 12 con una media de volumen tumoral de 652.85 mm^3 . Por otro lado, los ratones tratados con el L-748,337 iniciaron con una media de volumen tumoral de 484.60 mm^3 y finalizaron con 630.93 mm^3 de volumen tumoral. Los ratones tratados con propanolol iniciaron con una media de volumen tumoral de 261.46 mm^3 y finalizaron con 594.09 mm^3 . Durante la evolución del volumen tumoral no se encontró ninguna diferencia significativa entre los tratamientos comparados contra el control.

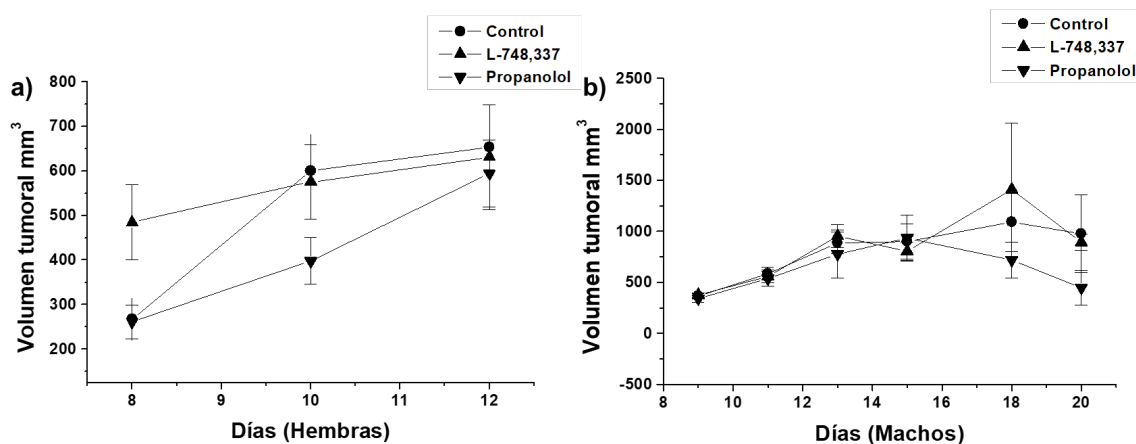


Figura 5. Evolución del volumen tumoral en ratones a) hembras y b) machos, tratados con los antagonistas de receptores adrenérgicos b 1-2, propanolol y β_3 , L-748,337 a lo largo de los días de tratamiento. Se consideran como significativos valores de $p \leq 0.05$.

Los ratones machos controles no tratados iniciaron con una media tumoral de 364.76 mm^3 en el día 9 y finalizaron con una media tumoral de 975 mm^3 en el día 20, mientras que el grupo de ratones tratados con el antagonista L-748,337 iniciaron con una media tumoral de 375.62 mm^3 y finalizaron con una media tumoral de 891.30 mm^3 . Los ratones tratados con propanolol iniciaron con una media tumoral de 341.45 mm^3 y finalizaron con una media tumoral de 445 mm^3 (Figura 5b).

Peso tumoral final

En hembras, para el grupo con carga tumoral, no tratado, se observó una media de peso tumoral de 1982.38 mg mientras que el tratamiento con el antagonista L-748,337 fue de una media de peso tumoral de 1860.18 mg mostrando una reducción no significativa ($p=0.821$) tal como se muestra en la figura 6a. El tratamiento con propanolol redujo de manera no significativa la media de peso tumoral final a una media de 1298.8 mg ($p=0.260$). Por otro lado, en ratones machos (Figura 6b) los tratamientos no tuvieron efecto sobre el peso tumoral final. En el grupo de machos con carga tumoral no tratado, la media de peso tumoral final fue de 2420 mg mientras que en el grupo tratado con el L-748,337 fue de 2538.3 mg ($p=0.722$) por otro lado el grupo tratado con propanolol presentó una media de peso tumoral final de 2737.11 mg ($p=0.691$).

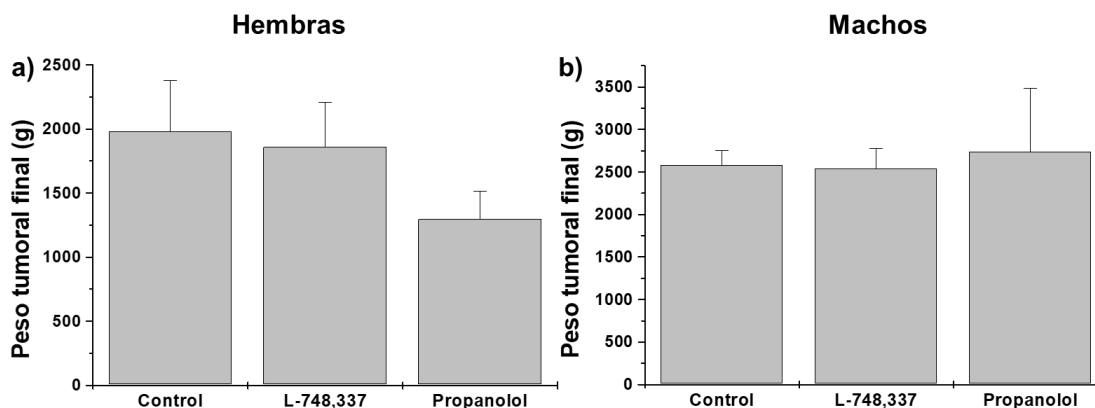


Figura 6. Peso tumoral final de los diferentes grupos tratados con los antagonistas adrenérgicos en ratones a) machos y b) hembras portadoras de linfoma murino. Expresado como la media \pm el error estándar de la media. Se consideran como estadísticamente significativos valores de $p \leq 0.05$ (*).

Contenido de tejido adiposo en los distintos depósitos

En hembras, el depósito de tejido adiposo interescapular disminuyó de manera significativa de una media de 1.2 % de grasa en ratones libres de tumor, no tratados, a una media de 0.63 % en ratones control portadores de tumor representando una disminución en un 47.7 % de contenido adiposo ($p=0.005$). Mientras que el grupo tratado con L-748,337 presentó una disminución no estadísticamente significativa del 16 % ($p=0.607$).

de grasa interescapular con una media de 0.53 % mientras que el propanolol con una media de 0.65 % aumentó en un 1.1 % comparado contra el grupo control no tratado ($p=0.870$). El tejido adiposo inguinal de ratones control portadores de tumor disminuyó de una media de porcentaje de grasa corporal de 1.2 % a 0.79 % representando un desgaste de depósito en un 38.3 % aunque el valor no fue estadísticamente significativo ($p=0.183$). Para el grupo tratado con el L-748,337 la media de porcentaje de tejido adiposo inguinal fue de 0.49 % disminuyendo en comparación contra el grupo portador de tumor no tratado ($p=0.306$), por otra parte, en los ratones tratados con propanolol el porcentaje de tejido adiposo inguinal fue un 0.18 % menor, si bien no fue significativo ($p=0.641$). El tejido adiposo visceral significativamente disminuyó en un 68% de una media de 2.14% en ratones sanos a una media de 0.68 % en ratones portadores de tumor ($p=0.000$), mientras que al ser tratados con el L-748,337 los ratones aumentaron en un 45.7% su porcentaje de tejido adiposo con una media de 0.99 %. ($p=0.242$). En cuanto a porcentaje de tejido adiposo total encontramos que disminuyó significativamente en un 46 % de una media porcentaje de grasa corporal de 4.54 % a 2.1 % ($p=0.001$). Al ser tratados con L-748,337 la media de porcentaje de tejido adiposo fue de 2.04 % ($p=0.926$) tal como se representa en la Figura 7.

Por otro lado, en ratones machos (Figura 7), el tejido adiposo interescapular significativamente disminuyó en un 32% de una media de porcentaje de tejido adiposo interescapular de 1.54 % a un 1.04 % ($p=0.002$). Y el tratamiento con el L-748,337 no afectó el contenido porcentual de tejido adiposo con una media de 0.94% ($p=0.516$) y tampoco el tratamiento con propanolol con una media de 0.84 % ($p=0.059$). El contenido de tejido adiposo inguinal disminuyó de manera significativa de una media de 2.54 % a 1.69 % disminuyendo en un 33.5 %. Y el tratamiento con el L-748,337 no protegió del desgaste de tejido adiposo inguinal, disminuyendo significativamente en un 1.01 % con respecto al grupo control portador de tumor ($p=0.001$). El propanolol no tuvo efecto sobre el porcentaje de tejido adiposo inguinal con una media de 1.36 % ($p=0.160$). El porcentaje de tejido adiposo visceral disminuyó en un 30.6 % de un contenido porcentual de 2.51 % a 1.74 % ($p=0.058$). El tratamiento con el L-748,337 no afectó el contenido de tejido adiposo visceral con una media de 1.38 % ($p=0.189$) y tampoco el propanolol con una media de 1.36 % ($p=2.13$). Por otro lado, el contenido de tejido adiposo total disminuyó

significativamente en un 32 %, de una media de tejido adiposo de 6.59 % en ratones sanos contra 4.47 % en ratones que portan un tumor no tratados. El tratamiento con los antagonistas disminuyó el porcentaje de tejido adiposo total comparados contra ratones portadores de tumor no tratados presentando medias de porcentaje corporal de 3.33 ($p=0.005$) y 3.58 ($p=0.038$) respectivamente.

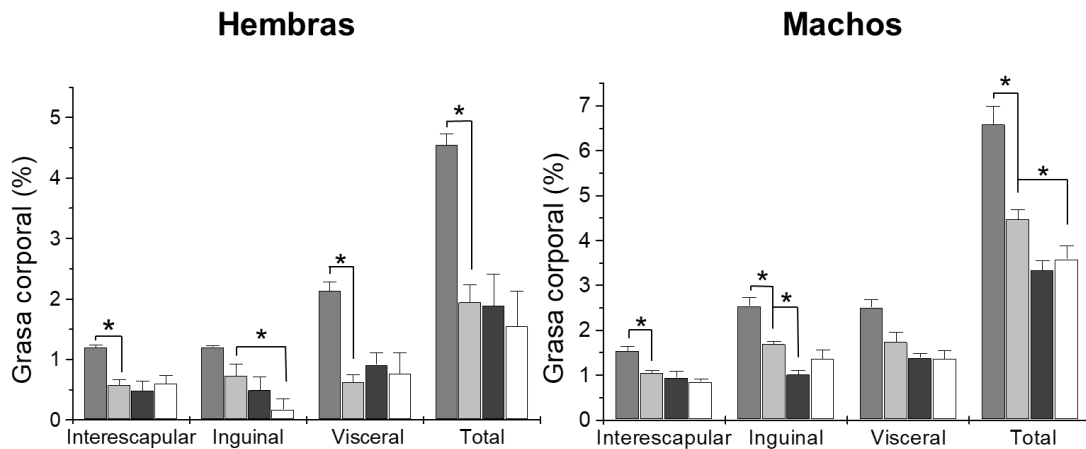


Figura 7. Porcentaje de grasa corporal en tres depósitos de tejido adiposo, en los diferentes grupos de ratones hembra y macho portadores de tumor, se representa la media y el error estándar. Valores con una $p \leq 0.05$ se consideran como significativos.

Análisis de imagen de tejido adiposo interescapular

El área en píxeles de las diferentes imágenes histológicas de tejido adiposo interescapular en el grupo de hembras control sin tumor fue de 5755.8 px^2 mientras que para los ratones hembras con carga tumoral fue de 6489.48 px^2 ($p=0.573$). Por otro lado, en los ratones hembra tratados con el antagonista L-748,337 la media del área de píxeles fue de 5085.26 px^2 con valor de p de 0.076 comparado contra los ratones tratados con el L-748,337.

Para los grupos de ratones machos el área en píxeles del tejido adiposo para ratones control sin tumor fue de una media de 17555.9 px^2 mientras que los ratones portadores de tumor sin tratamiento fueron de 4901.12 px^2 representando una disminución estadísticamente significativa del área en un 72 % con un valor de p de 0.002 como se visualiza en la Figura 8a. Mientras que el grupo de ratones con carga tumoral tratados con el L-748,337 fue de 10535.6 representando un aumento en un 114 % comparado contra los ratones con tumor

no tratados, aunque este aumento no fue significativo ($p=0.067$) tal como se ilustra en la Figura 8a.

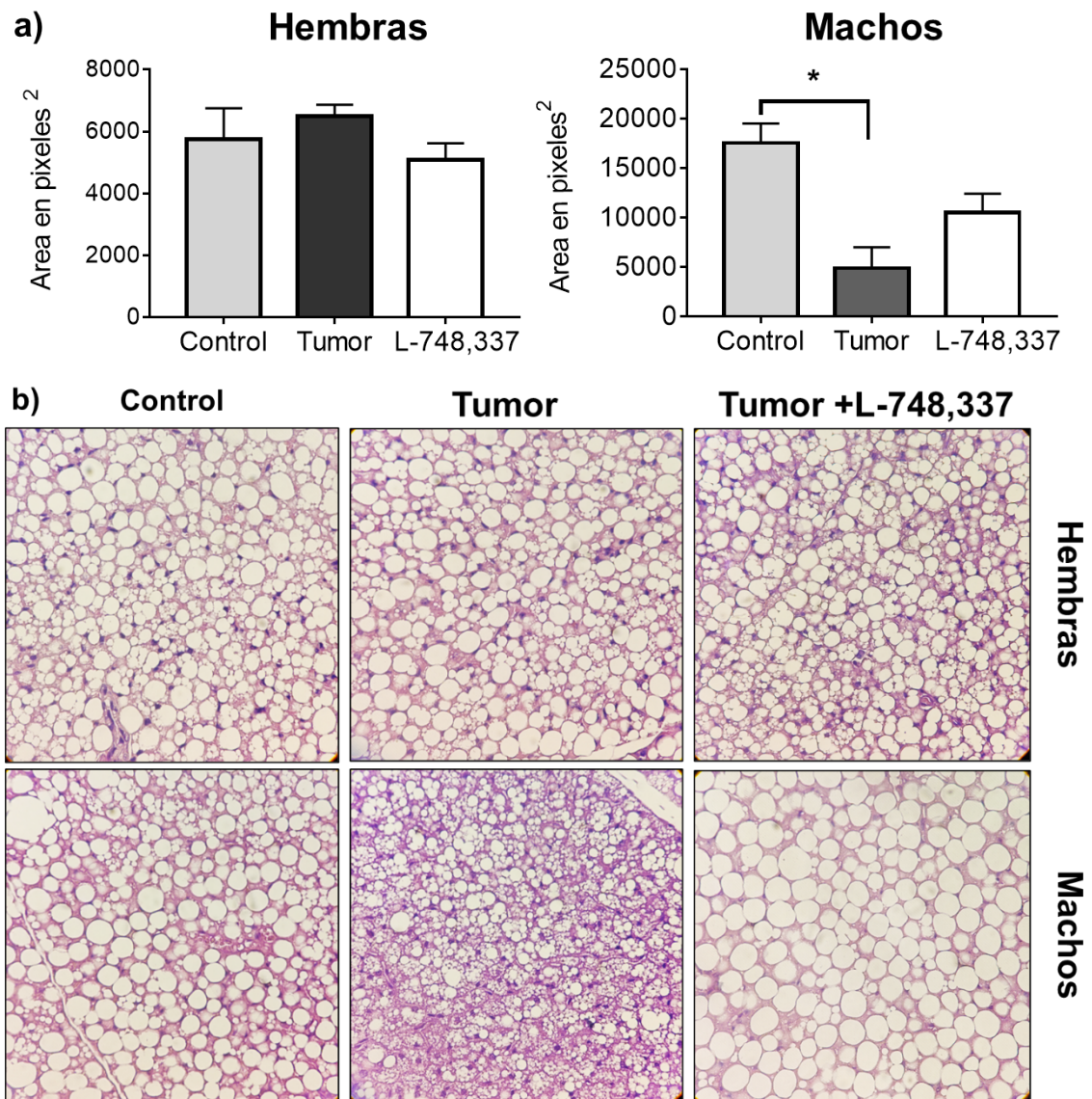


Figura 8. Cuantificación del área celular de los adipocitos en imágenes histológicas de tejido interescapular de los diferentes grupos de ratones a) machos y hembras. b) Imágenes representativas del tejido adiposo interescapular teñidos con hematoxilina-eosina, de ratones control libres de tumor (control), ratones portadores de tumor sin tratamientos (tumor) y ratones con tumor tratados con el L-748,337 (L-748,337), de hembras y machos de la cepa BALB/c.

Citocinas plasmáticas

En ratones hembras portadoras de tumor, no se observó diferencia en la cuantificación de IL-6, TNF o IFN en suero comparado contra los ratones control. La media de los valores de IL-6 fue de 4.47 pg/mL para ratones con tumor comparado contra 1.2 pg/mL en ratones sanos ($p=0.142$), mientras que en el grupo tratado con L-748,337 fue de 3.06 pg/mL comparado contra el grupo no tratado portador de tumor ($p=0.471$). La media de los valores de TNF para el grupo con tumor no tratado fue de 25.04 pg/mL comparado contra 5.77 pg/mL en el grupo sano ($p=0.133$), mientras que el grupo tratado con L-748,337 presento una media de 24.71 pg/mL comparado contra el grupo no tratado con 25.04 pg/mL ($p=0.978$). Por otro lado, el IFN presentó un valor de 1.58 pg/mL en ratones con tumor comparado contra 1.29 pg/mL en ratones sanos ($p=0.827$), mientras que los ratones tratados con el L-748,337 presentaron una media de 8.02 pg/mL ($p=0.275$).

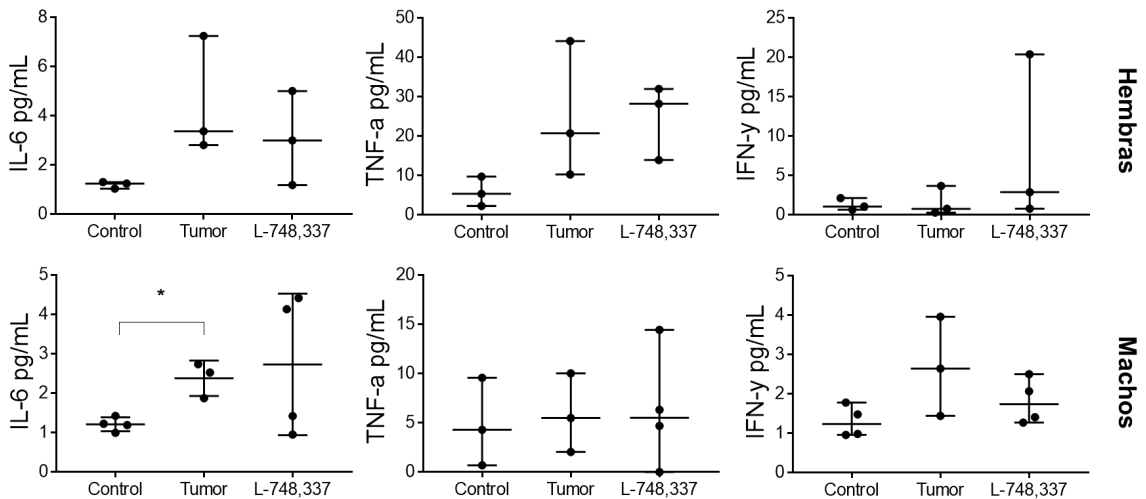


Figura 9. Citocinas en plasma de los diferentes grupos de ratones sanos, portadores de tumor y tratados con L-748,337 en hembras y machos BALB/c. Se representa la mediana y el rango de cada grupo. Los valores con una $p \leq 0.05$ se consideran como significativos.

En contraste, los ratones machos portadores de tumor presentaron una elevación estadísticamente significativa de IL-6 en plasma con una media de 2.38 pg/mL comparado contra 1.21 pg/mL en ratones sanos ($p=0.05$), mientras que en ratones tratados con L-748,337 la media de IL-6 en suero fue de 2.73 pg/mL ($p= 1.00$). Los valores de TNF en

suero de los distintos grupos no presentó ningún valor estadísticamente significativo con 5.85 pg/mL, 4.85 pg/mL y 6.36 pg/mL para el grupo control, portador de tumor sin tratamiento y tratado con el L-748,337 respectivamente con valores estadísticos de $p=0.787$ para grupo tumor contra sano y $p=0.905$ para el grupo L-748,337 contra el no tratado portador de tumor. Mientras que los valores de IFN en ratones con tumor aumentó de manera no estadísticamente significativa con una media de 2.68 pg/mL en suero de ratones machos portadores de tumor comparado contra 1.41 pg/mL en ratones sanos ($p=0.275$). Por otro lado, los ratones tratados con el L-748,337 presentaron una media de 1.81 pg/mL en suero con un valor de p de 0.157 comparado contra ratones no tratados portadores de tumor (Figura 9).

DISCUSIÓN

La activación adrenérgica en cáncer promueve la progresión tumoral activando vías de proliferación, invasión y metástasis. Aunado a ello, estudios han sugerido que la activación adrenérgica en tejido adiposo pardo contribuye en el desgaste de tejido adiposo en la patología de caquexia asociada a cáncer (Cole & Sood 2012). Para estudiar la activación adrenérgica en cáncer y caquexia asociada utilizamos bloqueadores adrenérgicos de los receptores β -1, 2 y 3.

Para ello, primero confirmamos la expresión del RNA mensajero para los receptores adrenérgicos β -1, 2 y 3 en tejido tumoral en ambos sexos. Los receptores adrenérgicos forman parte del sistema nervioso simpático por lo que están distribuidos ampliamente por el organismo. Un estudio reciente evaluó la presencia de los tres receptores adrenérgicos en 39 tipos diferentes de cáncer incluyendo linfomas y nódulos linfáticos sanos (Rain et al., 2017). También, confirmamos la presencia de mensajeros de RNA para receptores adrenérgicos β -3 en tejido adiposo interescapular de nuestro modelo murino, dado la importancia de este receptor en termogénesis y lipólisis (Michel & Ochodnický, 2010).

Después, analizamos indicadores de composición corporal y conductuales asociados a caquexia, en ratones con carga tumoral comparados contra ratones sanos. En hembras no se encontró ningún efecto debido a la carga tumoral en los indicadores ya mencionados. En contraste, en los ratones machos portadores de tumor disminuyó su peso e índice de masa corporal además de su ingesta de alimento y agua. Estos signos concuerdan con las características asociadas a caquexia como pérdida de peso, índice de masa corporal y anorexia (Fearon et al, 2011). Los resultados en hembras concuerdan con observaciones previas que indican una menor pérdida de peso en ratones hembras comparadas contra machos. Estudios en este contexto han asociado a los estrógenos en hembras un efecto musculo-protectivo. De esta manera protegiendo indicadores clave como la pérdida de peso en hembra y una menor severidad general en la progresión de la patología. Por ejemplo, se ha observado que este efecto puede ser revertido con la administración del antagonista de receptores a estrógeno Fulvestrant en ratones de la cepa CD2F1, una cruce entre BALB/c y DBA (Cosper & Leinwand 2010). En otro estudio utilizando hembras

APC^{min/+} encontraron que en hembras acíclicas la caquexia es más severa comparada contra hembras cíclicas (Hetzler et al., 2016). Algunos estudios humanos también han asociado atrofia muscular más severa, una mayor progresión de la enfermedad y menor supervivencia en hombres comparado contra mujeres con caquexia asociada a cáncer (Wallengren et al., 2014; Nakamura et al., 2015). Aunado a ello, en nuestro laboratorio hemos observado diferencias por sexo en la ganancia de peso en ratones estresados de la cepa BALB/c, así como diferencias en perfiles de citocinas del sistema inmune especialmente en los niveles de IL-6. Se ha demostrado que esta citocina tiene efectos anoréxicos (Hunschede et al 2018), y también promueve termogénesis y lipólisis en caquexia (Han, 2018). Por este motivo, medimos niveles plasmáticos de IL-6, junto con IFN y TNF, observando niveles elevados de IL-6 en ratones machos con carga tumoral comparado contra ratones sanos, mientras que en hembras solo se encontró una tendencia no significativa. Lo que podría explicar los efectos anoréxicos y de pérdida de peso en los ratones machos.

Enseguida nos propusimos a explorar el papel del sistema nervioso simpático y la carga tumoral sobre estos indicadores de composición corporal y conductuales. Para ello, bloqueamos la vía adrenérgica beta con los antagonistas L-748,337 y propanolol. El bloqueo de los receptores β -3 con el L-748,337 recuperó el IMC y peso corporal en ratones machos con tumor, junto con la ingesta de alimento y agua. Los receptores β -3 están ubicados principalmente en tejido adiposo y son responsables del desgaste energético mediado por termogénesis acompañado de lipólisis por acción de la proteína desacopladora de la oxidación fosforilativa Ucp-1 (Fedorenko, Lishko & Kirichok, 2012). Sin embargo, no observamos inhibición de lipólisis en los distintos depósitos de tejido adiposo incluyendo el interescapular, uno de los principales depósitos de tejido pardo en ratón (Zhang et al, 2019). Por el contrario, observamos una disminución en tejido inguinal cuando comparamos los ratones tratados con el L-748,337 contra los ratones control portadores de tumor. Nosotros hemos observado en repetidas ocasiones una pérdida incluso total de este depósito en ratones con tumor en el flanco derecho posterior. Dado que encontramos un resultado similar en hembras tratadas con propanolol, esta observación nos sugiere que el tumor podría interferir en este parámetro. Es sabido que los tumores pueden internalizar ácidos grasos del medio a través de la molécula

“carroñera” CD36 para obtener la energía necesaria que sustente su crecimiento (Wang & Li, 2019). Son pocos los antecedentes directos utilizando antagonistas tipo beta 3 en caquexia donde miden lipólisis. Un trabajo destacado en este contexto es el de Petruzelli et al., con su grupo administraron el bloqueador β -3 SR59230A y observaron protección en los depósitos de tejido adiposo gonadal, inguinal, axilar y adicionalmente protección del músculo esquelético. En otro trabajo, utilizaron ratones caquéticos portadores de cáncer de colon C26 y los trataron con un compuesto derivado del L-748,337 y encontraron una reducción en las cantidades de glicerol plasmático comparado contra un grupo control (Jin et al., 2018). La falta de protección del tejido interescapular podría deberse a la dosis del compuesto, en el trabajo de Jin (2018), utilizan hasta 1 mg/kg mientras en nuestro trabajo utilizamos 50 μ g/kg.

Una posible explicación hacia el efecto protector de peso e IMC debido al tratamiento con L-748,337, a pesar de no haber observado protección en lipólisis es la inhibición de la anorexia. Nosotros observamos un consumo de alimento 18% mayor en ratones tratados con el antagonista β -3. Experimentos han demostrado que la activación adrenérgica de receptores tipo β -3 está involucrada en la inhibición del apetito (Kanzar et al., 2011; Richard et al., 2017). Por lo que el bloqueo de este receptor previno la disminución de la ingesta de alimento y agua. Por otra parte, se ha observado la modulación en la liberación de IL-6 por adipocitos a través de la activación de receptores tipo beta 3 (Mohamed et al., 2001; Tchivileva et al., 2019). Nosotros observamos una elevación en los niveles de IL-6 en ratones con carga tumoral comparado contra ratones sano, sin embargo, no observamos diferencias cuando medimos esta citocina en plasma de ratones tratados con el L-748,337. Esto es debido a una alta variación en los datos, por lo que consideramos importante incluir un tamaño de muestra mayor al realizar este ensayo debido a la importancia de esta citocina en el contexto de anorexia y caquexia asociada a cáncer. Otra hipótesis que podría explicar los resultados es la protección de la atrofia muscular, por lo que nos planteamos como perspectiva medir genes asociados a proteólisis como MurF-1, Atrogin-1 y observar si el bloqueo de receptores tipo beta 3 podrían influir en este parámetro.

Por otra parte, evaluamos si el propanolol tendría algún efecto sobre indicadores de caquexia debido a que se ha reportado la presencia y actividad de receptores tipo β -1 en

tejido adiposo (Cao et al., 2010). Pero no observamos mejoras en los indicadores de composición corporal o en el desgaste de los depósitos de tejido adiposo. Aunque, sí observamos una ingesta de agua más alta en los ratones machos tratados. A la fecha, no se han reportado estudios de caquexia asociada a cáncer utilizando propanolol o algún otro antagonistas tipo beta 1 o 2. Además, reportes de indicadores de composición corporal como el peso son escasos al administrar propanolol en ratones con carga tumoral, dado que el principal objetivo es observar efectos antitumorales. En un estudio realizado por Palm y colaboradores (2005) en ratones con tumores PC-3 cáncer de próstata, reportan el peso corporal y no encuentran efecto del tratamiento con propanolol sobre este parámetro. Pero, sí se han estudiado estos antagonistas en caquexia asociada a fallo cardiaco con resultados positivos en la ganancia de peso (Hryniewicz et al., 2003; Clark 2017). Estos resultados nos sugieren que la activación de receptores tipo beta 3 y no los β 1 y 2, son los principales implicados en caquexia asociada a cáncer.

Al observar el tratamiento con el L-748,337 sobre indicadores de progresión tumoral como el volumen y peso tumoral final en ratones machos y hembras, no encontramos ningún efecto. Esto contrasta con otros experimentos realizados en el modelo de melanoma B16F10 y cáncer de colón C26 donde se han observado efectos antitumorales como la reducción de volumen, y peso tumoral final, además de la elevación de marcadores apoptóticos como caspasa 3 (Dal Monte et al, 2013; Lin et al, 2018). Esta discrepancia podría deberse a las dosis y vías de administración, en nuestro trabajo administramos 50 ug/kg de peso animal por vía intraperitoneal, mientras que Dal monte y colaboradores utilizan 5mg/kg por vía intratumoral, en cambio Lin y colaboradores administran 1 mg/kg por vía intraperitoneal. Esto sugiere que el administrar el L-748,337 a una dosis mayor podría tener mayores resultados benéficos tanto como en efecto antitumoral como en lipolisis. Asimismo, podría explicar el por qué no observamos protección de los depósitos de tejido adiposo como se ha reportado en otros trabajos (Petruzelli et al, 2014; Lin 2018).

En cuanto a efectos antitumorales, el propanolol está descrito como antitumoral en varios modelos de cáncer, y está en fases clínicas como co-tratamiento en cáncer de mama, melanoma y ovárico NCT02013492. Nosotros no encontramos efectos sobre el peso o

volumen tumoral final ya sea en ratones hembras o machos portadores del linfoma murino. Sin embargo, los efectos del propanolol se han atribuido principalmente a su actividad anti-angiogénica y anti-metastásica disminuyendo la expresión de VEGF, Mmp-2 Y Mmp-9 en diferentes modelos tumorales (Wang et al., 2018; Guo., et al 2009; Barbieri et al., 2015). Nuestros resultados podrían ser explicados por las dosis empleadas, ya que los rangos son amplios considerando de 2 mg/kg de peso animal hasta 60 mg/kg con resultados muy variables. En un estudio del carcinoma sólido de Ehrlich, Abdin (2014) compara dos dosis por vía i.p , una de 5mg/kg y otra de 10 mg/kg encontrando que ambas reducen el volumen tumoral de manera significativa comparada contra el vehículo donde 10mg/kg la misma dosis utilizada por nosotros es la más efectiva. En contraste Xu (2018) utiliza el propanolol por vía ip a 2, 5 y 10 mg/kg encontrando que las dosis 2 y 5 reducen el volumen tumoral de manera significativa en comparación que la dosis a 10 mg/kg. Sin embargo, al comparar la expresión de VEGF, MMP-2 y MMP-9 por Western Blot, encuentra un efecto dosis respuesta donde a 10 mg/kg muestra una mayor reducción en la expresión de estas proteínas en un modelo de neuroblastoma. Mientras tanto en un modelo de melanoma, comparan una dosis de 2mg/kg solo o en combinación con un inhibidor de tirosina quinasa, encontrando que por si solo el propanolol no reduce el volumen tumoral, el peso tumoral final, ni detiene el ciclo celular pero sí en combinación con el inhibidor de tirosina quinasa (Kuang et al., 2018). Estos resultados nos muestran una complejidad en la determinación de una dosis correcta y nos cuestionan que tan robusto es considerar solamente las dimensiones del tumor como un indicador de progresión. Por esto mismo nos planteamos como perspectivas medir la expresión de genes asociados a progresión tumoral como Mmp-2 y Mmp-9 en tumor. Debido a que un punto clave en el desarrollo tumoral es su comunicación con los otros sistemas como el nervioso e inmune y su capacidad para invadir otros tejidos, independientemente de su tamaño. La vía adrenérgica beta influye en indicadores de composición corporal en caquexia asociada a cáncer y es un blanco terapéutico que podría mejorar la condición del paciente. Con nuestro trabajo ampliamos el marco de conocimiento sobre el papel del sistema nervioso simpático en el desarrollo de caquexia y cáncer.

CONCLUSIONES

La carga tumoral y el tratamiento con antagonistas adrenérgicos tipo β -1,2 y 3 afecta indicadores de composición corporal y alimenticios en ratones BALB/c de forma dependiente de sexo de la forma siguiente:

- En presencia de carga tumoral se presenta disminución en el peso, índice de masa corporal, la ingesta de alimento y agua e incremento de los niveles de IL-6 en ratones machos pero no en hembras
- El tratamiento con el L-748,337 restaura estos parámetros a niveles de animales libres de tumor, pero no así con el tratamiento de propanolol.

El tratamiento con los antagonistas L-748,337 y propanolol no afecta el volumen ni el peso tumoral final en ratones hembras y machos portadores del linfoma murino L5178Y-R.

REFERENCIAS

Atcc.org. (2019). *L5178-R (LY-R) ATCC® CRL-1722™ Mus musculus thymus lymphom.* [online] Available at: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-1722.aspx#generalinformation> [Accessed 17 Sep. 2019].

Abdin, A., Soliman, N. and Saied, E., 2014. Effect of propranolol on IL-10, visfatin, Hsp70, iNOS, TLR2, and survivin in amelioration of tumor progression and survival in Solid Ehrlich Carcinoma-bearing mice. *Pharmacological Reports*, 66(6), pp.1114-1121.

Barbieri, A., Bimonte, S., Palma, G., Luciano, A., Rea, D., Giudice, A., Scognamiglio, G., la Mantia, E., Franco, R., Perdonà, S., de Cobelli, O., Ferro, M., Zappavigna, S., Stiuso, P., Caraglia, M. And Arra, C. 2015. The stress hormone norepinephrine increases migration of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *International Journal of Oncology*, 47(2), pp.527-534

Baselga, E., Dembowska-Baginska, B., Przewratil, P., González-Enseñat, M., Wyrzykowski, D., Torrelo, A., López Gutiérrez, J., Rychłowska-Pruszyńska, M., de Lucas-Laguna, R., Esteve-Martinez, A., Roé, E., Zaim, M., Menon, Y., Gautier, S., Lebbé, G., Bouroubi, A., Delarue, A. and Voisard, J. (2018). Efficacy of Propranolol Between 6 and 12 Months of Age in High-Risk Infantile Hemangioma. *Pediatrics*, 142(3), p.e20173866.

Bastos, D., Sarafim-Silva, B., Sundefeld, M., Ribeiro, A., Brandão, J., Biasoli, É., Miyahara, G., Casarini, D. and Bernabé, D. (2018). Circulating catecholamines are associated with biobehavioral factors and anxiety symptoms in head and neck cancer patients. *PLOS ONE*, 13(8), p.e0202515.

Bernabé, D., Tamae, A., Biasoli, É. and Oliveira, S. (2011). Stress hormones increase cell proliferation and regulates interleukin-6 secretion in human oral squamous cell carcinoma cells. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(3), pp.574-583.

Buzelle, S., MacPherson, R., Peppler, W., Castellani, L. and Wright, D., 2015. The contribution of IL-6 to beta 3 adrenergic receptor mediated adipose tissue remodeling. *Physiological Reports*, 3(2), p.e12312.

Caballero-Hernandez, D., Najera-Valderrabano, D., Valadez-Lira, A., Franco-Molina, M., Gomez-Flores, R., Tamez-Guerra, P., Tamez-Guerra, R. and Rodríguez-Padilla, C. (2017). Alterations of antitumor and metabolic responses in 15178y-r lymphoma-bearing mice after only 30-minute daily chronic stress exposure. *Experimental Oncology*, 39(4), pp.276-280.

Calvani, M., Pelon, F., Comito, G., Taddei, M., Moretti, S., Innocenti, S., Nassini, R., Gerlini, G., Borgognoni, L., Bambi, F., Giannoni, E., Filippi, L. and Chiarugi, P. 2015. Norepinephrine promotes tumor microenvironment reactivity through β -3 adrenoreceptors during melanoma progression. *Oncotarget*, 6(7), pp.4615-4632.

Cao, L., Liu, X., Lin, E., Wang, C., Choi, E., Riban, V., Lin, B. and During, M., 2010. Environmental and Genetic Activation of a Brain-Adipocyte BDNF/Leptin Axis Causes Cancer Remission and Inhibition. *Cell*, 142(1), pp.52-64.

Ciccarelli, M., Sorriento, D., Coscioni, E., Iaccarino, G. and Santulli, G. (2019). *Adrenergic Receptors*. In: *Endocrinology of the Heart in Health and Disease*. Academic Press El sevier. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-04170-6> p.285-286

Clark, A., Coats, A., Krum, H., Katus, H., Mohacsi, P., Salekin, D., Schultz, M., Packer, M. and Anker, S., 2017. Effect of beta-adrenergic blockade with carvedilol on cachexia in severe chronic heart failure: results from the COPERNICUS trial. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 8(4), pp.549-556.

Cole, S. and Sood, A., 2011. Molecular Pathways: Beta-Adrenergic Signaling in Cancer: Figure 1. *Clinical Cancer Research*, 18(5), pp.1201-1206.

Conn, P. and Freeman, M. (2000). *Neuroendocrinology in physiology and medicine*. 1st ed. Totowa, New Jersey: Humana Press, pp.60-61.

Cosper, P. and Leinwand, L., 2010. Cancer Causes Cardiac Atrophy and Autophagy in a Sexually Dimorphic Manner. *Cancer Research*, 71(5), pp.1710-1720.

Cypess, A., Weiner, L., Roberts-Toler, C., Elía, E., Kessler, S., Kahn, P., English, J., Chatman, K., Trauger, S., Doria, A. and Kolodny, G., 2015. Activation of Human

Brown Adipose Tissue by a β 3-Adrenergic Receptor Agonist. *Cell Metabolism*, 21(1), pp.33-38.

Dal Monte, M., Casini, G., Filippi, L., Nicchia, G., Svelto, M. and Bagnoli, P. 2013. Functional involvement of β 3-adrenergic receptors in melanoma growth and vascularization. *Journal of Molecular Medicine*, 91(12), pp.1407-1419.

Deng, G., Liu, J., Zhang, J., Wang, Y., Peng, X., Wei, Y. and Jiang, Y. (2014). Exogenous norepinephrine attenuates the efficacy of sunitinib in a mouse cancer model. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 33(1), p.21.

Dundamadappa, S., Shankar, S., Danrad, R., Singh, A., Vijayaraghavan, G., Kim, Y. and Perugini, R., 2007. Imaging of brown fat associated with adrenal pheochromocytoma. *Acta Radiologica*, 48(4), pp.468-472.

Fedorenko, A., Lishko, P., & Kirichok, Y. (2012). Mechanism of Fatty-Acid-Dependent UCP1 Uncoupling in Brown Fat Mitochondria. *Cell*, 151(2), 400-413. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.010

Fitzgerald, P.J., 2009. Is norepinephrine an etiological factor in some types of cancer? *International Journal of Cancer*, 124(2), pp.257–263.

Friedman, J. M., Leibel, R. L., Siegel, D. S., Walsh, J. and Bahary, N. (1991) 'Molecular mapping of the mouse ob mutation', *Genomics*, 11(4), pp. 1054–1062.

Gomez-Flores R, et al. 2005. Increased survival of tumor-bearing mice by delta opioid SNC. *Anticancer Research* 25 (6):4563-4567

Guo, W., Zhang, S., Chen, Y., Zhang, D., Yuan, L., Cong, H., & Liu, S. (2015). An important role of the hepcidin–ferroportin signaling in affecting tumor growth and metastasis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 47(9), 703-715.

Han, J., Meng, Q., Shen, L. and Wu, G., 2018. Interleukin-6 induces fat loss in cancer cachexia by promoting white adipose tissue lipolysis and browning. *Lipids in Health and Disease*, 17(1).

Hetzler, K., Hardee, J., LaVoie, H., Murphy, E. and Carson, J., 2017. Ovarian function's role during cancer cachexia progression in the female mouse. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 312(5), pp.E447-E459.

Horvathova, L., Padova, A., Tillinger, A., Osacka, J., Bizik, J. and Mravec, B. 2016a. Sympathectomy reduces tumor weight and affects expression of tumor-related genes in melanoma tissue in the mouse. *Stress*, 19(5), pp.528-534.

Hryniewicz, K., Androne, A., Hudaihed, A. and Katz, S. 2003. Partial reversal of Cachexia by β -adrenergic receptor blocker therapy in patients with chronic heart failure. *Journal of Cardiac Failure*, 9(6), pp.464-468.

Hunschede, S., Schwartz, A., Kubant, R., Thomas, S. and Anderson, G., 2018. The role of IL-6 in exercise-induced anorexia in normal-weight boys. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 43(10), pp.979-987.

Iarc.fr. (2019). IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. [online] Available at: <https://www.iarc.fr/> [Accessed 20 Sep. 2019].

Jin, J., Miao, C., Wang, Z., Zhang, W., Zhang, X., Xie, X. and Lu, W. (2018). Design and synthesis of aryloxypropranolamine as β 3-adrenergic receptor antagonist in cancer and lipolysis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 150, pp.757-770.

Johnson D. (2013) Adrenergic Activation. In: Gellman M.D., Turner J.R. (eds) *Encyclopedia of Behavioral Medicine*. Springer, New York, NY DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1005-9_1204

Kagami, S., Kaneko, M. and Katori, T. (2018). Thirty-two Japanese cases of infantile hemangiomas treated with oral propranolol. *The Journal of Dermatology*, 45(6), pp.719-722.

Kanzler, S., Januario, A. and Paschoalini, M., 2011. Involvement of β 3-adrenergic receptors in the control of food intake in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(11), pp.1141-1147.

Kovalchuk, A., Nersisyan, L., Mandal, R., Wishart, D., Mancini, M., Sidransky, D., Kolb, B. and Kovalchuk, O., 2018. Growth of Malignant Non-CNS Tumors Alters Brain Metabolome. *Frontiers in Genetics*, 9.

Lin, Q., Wang, F., Yang, R., Zheng, X., Gao, H. and Zhang, P. 2013. Effect of Chronic Restraint Stress on Human Colorectal Carcinoma Growth in Mice. *PLoS ONE*, 8(4), p.e61435.

Ma, S. and Morilak, D. (2005). Norepinephrine Release in Medial Amygdala Facilitates Activation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Response to Acute Immobilisation Stress. *Journal of Neuroendocrinology*, 17(1), pp.22-28.

Manual de bioseguridad en el laboratorio (2005). 3rd ed. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.

McCorry, L. (2017). Physiology of the Autonomic Nervous System. *Am J Pharm Educ*. 71(4), 78. doi:10.5688/aj710478

Michel, M., Ochodnický, P. and Summers, R., 2010. Tissue functions mediated by β_3 -adrenoceptors—findings and challenges. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 382(2), pp.103-108.

Mohamed-Ali, V., 2001. -Adrenergic Regulation of IL-6 Release from Adipose Tissue: In Vivo and in Vitro Studies. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(12), pp.5864-5869.

Molina, P. and Ashman, R. (2013). *Endocrine Physiology, Fourth Edition*. 4th ed. New York, N.Y.: McGraw-Hill Medical, p.275.

Molina-Montero, S. 2016. EFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE EL LINFOMA MURINO L5178YR. Maestría en ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Nakamura, N., Hara, T., Shibata, Y., Matsumoto, T., Nakamura, H., Ninomiya, S., Kito, Y., Kitagawa, J., Kanemura, N., Goto, N., Shiraki, M., Miyazaki, T., Takeuchi, T., Shimizu, M. and Tsurumi, H., 2015. Sarcopenia is an independent prognostic factor in

male patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Annals of Hematology*, 94(12), pp.2043-2053.

Palm, D., Lang, K., Niggemann, B., Drell, T., Masur, K., Zaenker, K. and Entschladen, F. 2006. The norepinephrine-driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by β -blockers. *International Journal of Cancer*, 118(11), pp.2744-2749.

Petruzzelli, M., Schweiger, M., Schreiber, R., Campos-Olivas, R., Tsoli, M., Allen, J., Swarbrick, M., Rose-John, S., Rincon, M., Robertson, G., Zechner, R. and Wagner, E. 2014. A Switch from White to Brown Fat Increases Energy Expenditure in Cancer-Associated Cachexia. *Cell Metabolism*, 20(3), pp.433-447.

Puar, T., van Berkel, A., Gotthardt, M., Havekes, B., Hermus, A., Lenders, J., van Marken Lichtenbelt, W., Xu, Y., Brans, B. and Timmers, H., 2016. Genotype-Dependent Brown Adipose Tissue Activation in Patients With Pheochromocytoma and Paraganglioma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(1), pp.224-232.

Rains, S., Amaya, C. and Bryan, B., 2017. Beta-adrenergic receptors are expressed across diverse cancers. *Oncoscience*, 4(7-8), pp.95-105.

Sigma-Aldrich. (2019). *6-Hydroxydopamine hydrochloride*. [online] Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h4381?lang=es®ion=MX> [Accessed 17 Sep. 2019].

Sloan, E., Priceman, S., Cox, B., Yu, S., Pimentel, M., Tangkanangnukul, V., Arevalo, J., Morizono, K., Karanikolas, B., Wu, L., Sood, A. and Cole, S. 2010. The Sympathetic Nervous System Induces a Metastatic Switch in Primary Breast Cancer. *Cancer Research*, 70(18), pp.7042-7052.

Szumiel I. 2005a. L5178Y sublines: a look back from 40 years. Part 1: General characteristics. *International Journal of Radiation Biology* 81: 339-352.

Szumiel I. 2005b. LR178Y sublines: a look back from 40 years. Part 2: Response to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology* 81: 353-365.

Tchivileva, I., Tan, K., Gambarian, M., Nackley, A., Medvedev, A., Romanov, S., Flood, P., Maixner, W., Makarov, S. and Diatchenko, L., 2009. Signaling pathways mediating β 3-adrenergic receptor-induced production of interleukin-6 in adipocytes. *Molecular Immunology*, 46(11-12), pp.2256-2266.

Tortora, G. and Derrickson, B. (2014). *Principles of anatomy and physiology*. 14th ed. Hoboken: Wiley, pp.524-525.

Wallengren, O., Iresjö, B., Lundholm, K. and Bosaeus, I., 2014. Loss of muscle mass in the end of life in patients with advanced cancer. *Supportive Care in Cancer*, 23(1), pp.79-86.

Wang, F., Liu, H., Wang, F., Xu, R., Wang, P., Tang, F., Zhang, X., Zhu, Z., Lv, H. and Han, T. (2018). Propranolol suppresses the proliferation and induces the apoptosis of liver cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 17(4), pp.5213-5221.

Wang, J. and Li, Y., 2019. CD36 tango in cancer: signaling pathways and functions. *Theranostics*, 9(17), pp.4893-4908.

Workman, P., Aboagye, E., Balkwill, F., Balmain, A., Bruder, G., Chaplin, D., Double, J., Everitt, J., Farningham, D., Glennie, M., Kelland, L., Robinson, V., Stratford, I., Tozer, G., Watson, S., Wedge, S. and Eccles, S. 2010. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer*, 102(11), pp.1555-1577.

Xu, T., Xiao, X., Zheng, S., Zheng, J., Zhu, H., Ji, Y. and Yang, S. 2013. Antiangiogenic effect of propranolol on the growth of the neuroblastoma xenografts in nude mice. *Journal of Pediatric Surgery*, 48(12), pp.2460-2465.

Yang, E., Sood, A., Chen, M., Li, Y., Eubank, T., Marsh, C., Jewell, S., Flavahan, N., Morrison, C., Yeh, P., Lemeshow, S. and Glaser, R. (2006). Norepinephrine Up-regulates the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, Matrix Metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in Nasopharyngeal Carcinoma Tumor Cells. *Cancer Research*, 66(21), pp.10357-10364.

von Haehling, S., Anker, M. and Anker, S. (2016). Prevalence and clinical impact of cachexia in chronic illness in Europe, USA, and Japan: facts and numbers update 2016. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 7(5), pp.507-509.

Zhao, L., Xu, J., Liang, F., Li, A., Zhang, Y. and Sun, J. (2015). Effect of Chronic Psychological Stress on Liver Metastasis of Colon Cancer in Mice. *PLOS ONE*, 10(10), p.e0139978

Zhang, F., Hao, G., Shao, M., Nham, K., An, Y., Wang, Q., Zhu, Y., Kusminski, C., Hassan, G., Gupta, R., Zhai, Q., Sun, X., Scherer, P. and Oz, O., 2018. An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. *Cell Metabolism*, 27(1), pp.252-262.e3.

ANEXO I

CRITERIOS DE PUNTO TERMINAL PARA EL MODELO IN VIVO

Dado que la inoculación de células tumorales induce la formación y crecimiento de una masa tumoral en los animales que afecta su bienestar, se empleará una serie de criterios para el sacrificio ético de los animales, de forma tal que minimice el sufrimiento de los animales experimentales, estos criterios se pueden encontrar en el anexo I de este documento.

INDICADORES FÍSICOS

- 1) El tumor no debe exceder un máximo de 20 mm, si son varios tumores en su conjunto no deberán exceder los 20 mm permitidos.
- 2) Una pérdida de peso mayor a 15%, este porcentaje se determinará a partir de un animal conspecífico del grupo control sin tumor.
- 3) El animal presenta dificultades respiratorias
- 4) El animal presente heces secas en el ano, indicativas de dificultades para la evacuación
- 5) El animal presenta vientre con un color oscuro
- 6) El tumor presenta ulceraciones o necrosis
- 7) La palpación del tumor provoca una respuesta de dolor en el animal
- 8) El animal presenta escoliosis (lomo jorobado)
- 9) El animal parece deshidratado
- 10) El animal presenta pelaje erizado

INDICADORES CONDUCTUALES

- 1) Trauma auto-inducido persistente
- 2) Vocalización