

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR
2 DE VEGF EN TUMOR, CEREBRO, MÚSCULO Y TEJIDO ADIPOSO DE
RATONES BALB/C PORTADORES DEL LINFOMA L5178Y-R**

Por:

Q.B.P. GLORIA MARÍA DE JESUS ROMERO BELTRAN

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRA EN CIENCIAS
con Orientación en Inmunobiología

San Nicolás de los Garza, Julio 2019

**EFFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR
2 DE VEGF EN TUMOR, CEREBRO, MÚSCULO Y TEJIDO ADIPOSO DE
RATONES BALB/C PORTADORES DEL LINFOMA L5178Y-R**

Comité de Tesis

Dra. Diana Caballero Hernández
Presidente

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario

Dr. Ricardo A. Gómez Flores
Vocal

Dra. Patricia Tamez Guerra
Vocal

Dr. Moisés Franco Molina
Vocal

**EFFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR
2 DE VEGF EN TUMOR, CEREBRO, MÚSCULO Y TEJIDO ADIPOSO DE
RATONES BALB/C PORTADORES DEL LINFOMA L5178Y-R**

Dra. Diana Caballero Hernández
Director



Este trabajo de tesis se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del Laboratorio de Inmunología y Virología.

Agradecimientos

Reconozco y agradezco la gran ayuda otorgada por la Doctora Cristina Rodríguez Padilla que me dio la oportunidad de pertenecer al laboratorio de inmunología y virología, así como también los consejos y recursos que me brindaron todos los integrantes de mi comité: Dra. Cristina Rodríguez Padilla, Dr. Ricardo Gómez, Dr. Moisés Franco y la Dra Patricia Tamez, incluyendo a sus respectivos equipos de trabajo, gracias por prestarme sus instalaciones y animarme en el camino.

También, agradezco al todo el personal del Laboratorio de Neuroinmunología Celular y Molecular a cargo del Doctor David Pozo en Sevilla, España por la buena disposición de enseñarme y aceptarme en sus instalaciones, gracias a ellos pude mejorar todas las técnicas utilizadas en esta tesis. En especial, quiero agradecer al Dr. Jaime Muñoz por estar siempre al pendiente de mi trabajo, su revisión me impulsó a ser más autocrítica y cuidadosa. Gracias a mis compañeras de CABIMER Alba y Evie por su amistad y compañía invaluable.

Gracias por el apoyo incondicional de mi madre Gloria, mi hermana Perla, mis amigos, siempre estuvieron presentes en mis pensamientos, gracias por todo su amor y comprensión.

Gracias por los consejos y tiempo otorgado por parte de mi directora de tesis, la Dra. Diana Caballero Hernández, gracias por compartirme su conocimiento y las interesantes conversaciones en el laboratorio, por las tardes de cineclub que hacían el trabajo más ameno y divertido, gracias por su gran paciencia, además de su confianza al aceptarme en su equipo de trabajo, del cual me llevo una muy buena impresión y amistad de mis excelentes compañeros de laboratorio de Neuroinmunomodulación: Ana, Isaías, Adrián, Nancy, sobre todo al M.C. Alonso Orozco por la compañía y enseñanza. Sin ellos, en definitiva, este trabajo no se habría logrado. Muchas gracias por el apoyo que me brindaron en el Laboratorio de Inmunología y Virología, a la Doctora Carolina, la Doctora Diana Reséndez, el Doctor Pablo y a la Doctora Diana Zárate, a Queta, a mis compañeros Andrea, Luis, Ashanti, Silvia y Jorge.

Quiero agradecer, en especial, a mis amigas de la maestría: Helen, Karla, Marcela y Alely, por ayudarme a continuar enfocada y escucharme. A Vanesa por acompañarme en mis peores y mejores momentos, por estar siempre disponible y dispuesta a ayudarme.

Muchas gracias a todos los animales en ciencia que dieron su vida para la realización de éste y otros proyectos. Fue un gran honor haber trabajado con todos ellos.

Gracias a CONACYT por otorgarme el apoyo económico para seguir con mis estudios y para realizar una estancia académica en el extranjero.

Índice

Agradecimientos	5
Índice	7
Índice de figuras	9
Lista de símbolos y abreviaciones	10
Resumen	13
Abstract	14
1. Introducción	15
2. Antecedentes	17
2.1 Estrés	17
2.2 Cáncer	19
2.2.1 Angiogénesis y mimetismo vasculogénico	20
2.2.1.1 Receptor 2 del Factor de crecimiento de Endotelio Vascular (VEGFR-2)	22
3. Justificación	25
4. Hipótesis	26
5. Objetivos	27
6. Material y Métodos	28
6.1 Material	28
6.1.1 Animales:	28
6.1.2 Modelo del linfoma murino L5178Y-R	29
6.2 Métodos	30
6.2.1 Protocolo de estrés crónico	30
6.2.2 Estrés por restricción del movimiento	30
6.2.3 Evaluación de la progresión del peso corporal	31
6.2.4 Determinación de progresión tumoral <i>in vivo</i>	31
6.2.5 Sacrificio ético y recolección de muestras	32
6.2.6 Cuantificación de corticosterona y norepinefrina	32
6.2.7 Determinación del nivel de expresión de VEGFR-2	32
6.2.7.1 Extracción de ARN, retrotranscripción y síntesis de ADN complementario	32
6.2.7.2 Análisis de la expresión mediante PCR tiempo real	34
6.2.8 Cuantificación de VEGFR-2 mediante Western blot	34
6.3 Análisis estadístico	35
7. Resultados	36

I.	<i>Efecto del estrés crónico por restricción de movimiento en la activación del eje hipotalámico pituitario adrenal (HPA) y sistema adrenérgico medular (SAM) en animales portadores de tumor L5178Y-R.</i>	36
II.	<i>Efecto del estrés crónico sobre la ingesta de alimento.</i>	38
III.	<i>Efecto del estrés crónico sobre la progresión del peso corporal y tumoral.</i>	39
IV.	<i>Efecto del estrés sobre el tejido graso subcutáneo inguinal.</i>	41
V.	<i>Reducción del índice de masa corporal en ratones sometidos a estrés crónico</i>	42
VI.	<i>Efecto del estrés en la expresión de VEGFR-2 en tejido tumoral</i>	43
VII.	<i>Efecto del estrés crónico en la expresión transcripcional de VEGFR-2 en tejido adiposo</i>	44
VIII.	<i>Efecto del estrés crónico en la expresión transcripcional de VEGFR-2 en tejido muscular</i>	45
IX.	<i>Efecto del estrés crónico en la expresión transcripcional de VEGFR-2 en cerebro</i>	46
8.	<i>Discusión</i>	48
9.	<i>Conclusiones</i>	53
10.	<i>Bibliografía</i>	55

Índice de figuras

Figura 1. Protocolo de inducción de estrés.....	30
Figura 2. Inducción de estrés crónico por restricción del movimiento.	31
Figura 3 Niveles de norepinefrina en plasma (NE) de animales portadores de tumor bajo condiciones de reposo y estrés crónico	37
Figura 4 Niveles de corticosterona en plasma (CORT) de animales portadores de tumor bajo condiciones de reposo y estrés crónico.	37
Figura 5 Ingesta de alimento	38
Figura 6 Progresión del peso corporal.....	39
Figura 7 Progresión del peso tumoral.....	40
Figura 8 Peso tumoral final.....	40
Figura 9 Tejido adiposo subcutáneo inguinal total.....	41
Figura 10 Índice de masa corporal de ratones sin tumor en reposo y sometidos a condiciones de estrés crónico.	42
Figura 11 Índice de masa corporal de ratones portadores de tumor en reposo y sometidos a condiciones de estrés crónico.....	42
Figura 12 Expresión relativa del ARN mensajero en el tejido tumoral de animales en reposo y sometidos a estrés crónico.....	43
Figura 13 Expresión proteica de VEGFR-2 en tejido tumoral.	43
Figura 14 Regulación de la expresión relativa del ARN mensajero en el tejido graso	44
Figura 15 Expresión relativa del ARN mensajero de VEGFR-2 en el tejido muscular.....	45
Figura 16 Expresión relativa del ARN mensajero de VEGFR-2 en el cerebro	46

Lista de símbolos y abreviaciones

μL	Microlitro
μM	Micromolar
11b-HSDI	11β-Hydroxysteroid dehydrogenase
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADRB2	Receptor adrenérgico beta 2
Ang-1	Angiopietin 1
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
BFGF	Basic fibroblast growth factor
BMDC	Bone marrow derived cell
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
cm	Centímetro
CORT	Corticosterona
CSF1	Colony stimulating factor 1
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte antigen 4
DAB	Diaminobencidina
E	Epinefrina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ERK1/2	Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2
FGF	Fibroblast growth factor
Flk1	Fetal liver kinase 1
g	gramos
GADPH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GC	Glucocorticoides
GR	Glucocorticoid receptor
HE-EGF	Heparin-binding epidermal growth factor
HIF-1a	Hypoxic inducible factor 1 alfa
HMVE	Human microvascular endothelial
HPA	Hypothalamic pituitary adrenal
IFN-γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina gamma
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
KDR	Kinase insert domain receptor
LC-NA	Sustancias noradrenérgicas del locus cerúleo
M2	Macrophages type 2
MAP	Mitogen-activated protein
MHC	Major histocompatibility complex
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MMP9	Matrix metallopeptidase 9
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NaCl	Cloruro de sodio
NCS-1	Neuronal calcium sensor 1
NE	Norepinefrina
NK	Natural killer
nM	Nanomolar
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Buffer de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Platelet derived growth factor
PD-L1	Programmed Death-ligand 1
PHD2	Prolyl hydroxylase domain-containing protein 2

PKA	Protein kinase a
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
RT	Retro transcripción
SAM	Sistema adreno medular
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Seg	Segundos
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
STAT-3	Signal transducer and activator of transcription 3
TAM	Tumor-associated macrophage
TBS	Tris buffer solution
TFII-I	Transcription factor II-I
TGFβ	Transforming growth factor beta
Th2	T helper lymphocytes type 2
TIL	Tumor infiltrated lymphocyte
TNF-α	Tumor necrosis factor alfa
Treg	Linfocitos T reguladores
UV	Ultravioleta
V	Voltaje
VE-cadherin	Vascular endothelial-cadherin
VEGF	Vascular endothelium growth factor
VEGFR-2	Vascular endothelium growth factor receptor two
α	Alfa
β	Beta

Resumen

El estrés psicogénico tiene un papel importante en la progresión de muchas enfermedades, el cáncer incluido, esta relación es de gran interés. Por ejemplo, hay evidencia que sugiere alteraciones específicas de tejido inducidas por estrés en la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores. Debido a que la progresión del cáncer está regulada, hasta cierto punto, por la angiogénesis, el objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR-2) bajo condiciones de estrés crónico. Ratones libres y portadores de tumor fueron sujetos a estrés por restricción de movimiento, y posteriormente se analizó la expresión transcripcional del gen KDR, que codifica para la proteína VEGFR-2, en tejido tumoral, adiposo, músculo y cerebral post-mortem.

Los resultados de este estudio describen por primera vez cambios específicos de tejido en la expresión de VEGFR-2 bajo condiciones de estrés crónico. En tejido tumoral, el estrés indujo un incremento en la expresión de VEGFR-2 de 10 veces. En tejido adiposo de animales libres de tumor, el estrés incrementó la expresión de VEGFR-2 hasta 6 veces con respecto al control, esto también se observó en ratones portadores de tumor no estresados (3 veces), sin embargo, los animales portadores de tumor estresados mostraron una disminución en la expresión de VEGFR-2. En músculo de ratones libres de tumor, el estrés indujo una elevación en la expresión de VEGFR-2 de 5.65 veces, lo que también se observó en ratones portadores de tumor no estresados (3.78 veces), y fue sustancialmente más elevado en ratones portadores de tumor bajo estrés (23.81 veces). En tejido cerebral, la expresión de VEGFR-2 aumentó significativamente en ratones libres de tumor bajo estrés (10.39 veces). También se observó aumento en el cerebro de ratones portadores de tumor, estresados y en reposo. En conjunto, estos resultados sugieren que el estrés crónico puede contribuir al llamado switch angiogénico a través de la modulación de la expresión de VEGFR-2.

Abstract

Chronic psychogenic stress plays a role in the progression of many pathologies, cancer included, a relationship of great interest. For instance, there is evidence suggesting tissue-specific alterations due to chronic stress in the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. Given that cancer progression is regulated, to some extent, by angiogenesis, the aim of this work was to study the expression of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) under chronic stress conditions. Tumor-free and tumor bearing mice were subjected to restrain stress, and the transcriptional expression of VEGFR-2 in tumor, adipose, muscle and brain tissues was analyzed.

The results of this study describe for the first-time tissue-specific changes in VEGFR-2 expression under chronic stress conditions. In tumor tissue, stress induced an increase in the expression of VEGFR-2 up to 10 folds. In fat tissue of non-tumor bearing animals, stress increased the expression of VEGFR-2 up to 6 folds, this was also observed in non-stressed tumor-bearing mice (3 folds), however, stressed tumor-bearing animals showed a diminished expression of VEGFR-2 (0.09 folds). In muscle of non-tumor bearing mice, stress induced an elevation of VEGFR-2 expression (5.65 folds), this was also observed in non-stressed tumor-bearing mice (3.78 folds) and was substantially higher in tumor-bearing mice under stress (23.81 folds). In brain tissue, VEGFR-2 expression was significantly enhanced in tumor-free mice under stress (10.39 folds). Brain VEGFR-2 expression also increased in non-stressed and stressed tumor-bearing mice. Taken together, these results suggest that chronic stress could contribute to the angiogenic switch during tumorigenesis through the modulation of VEGFR-2 expression in tissues.

1. Introducción

La homeostasis se refiere al mantenimiento y estabilidad de las capacidades fisiológicas y anatómicas de los organismos, que facilita el funcionamiento adecuado para la sobrevivencia del mismo. Para mantener dicho estado es necesaria la interacción en armonía de las células, órganos e incluso sistemas de los seres vivos. Sin embargo, cuando alguno de estos factores se encuentra suprimido o alterado, se sufre un desequilibrio en la homeostasis, lo que produce un fenómeno llamado “estrés”.

Hay dos tipos principales de estrés: agudo y crónico. La diferencia entre ambos involucra el tiempo que el individuo pasa sometido al estresor, el tiempo de la respuesta y su mecanismo de acción, además de los patrones moleculares que intervienen en cada situación. Una respuesta sostenida al estrés crónico también se produce a consecuencia de eventos que afectan emocionalmente, como lo son fenómenos psicosociales; trabajo extenuante, violencia, problemas afectivos y hambrunas, entre otros, y que además desencadenan patologías tan conocidas como lo son la depresión y ansiedad, lo que se manifiesta en una disminución del bienestar personal y en una mayor incidencia de enfermedades.

Se ha comprobado ampliamente en diversos estudios clínicos y pre-clínicos que el estrés crónico participa en la iniciación y progresión del cáncer, una enfermedad en la que el paciente presenta niveles altos de estrés debido al dolor o la ansiedad que enfrenta como consecuencia de su enfermedad.

La investigación básica ha demostrado que el estrés tiene efectos a nivel celular y molecular que potencialmente facilitan la iniciación, diseminación y progresión de tumores, como son la proliferación y metástasis. Un mecanismo crítico para la supervivencia tumoral es la angiogénesis, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos, la que depende de la activación e inhibición de más de 50 genes. Un componente muy informativo de los procesos de angiogénesis es el receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR-2), que ha ido ganando interés recientemente. En estudios preliminares de este grupo de investigación se ha observado que la expresión de VEGFR-2 aumenta en respuesta al estrés.

En este estudio se buscó caracterizar la expresión de VEGFR-2 a nivel génico y proteico en distintos tejidos de interés por su alta actividad metabólica, como tumor, músculo, cerebro y tejido adiposo, bajo condiciones de estrés crónico. Se empleó un modelo *in vivo* de tumor en ratones BALB/c, los animales fueron expuestos a un paradigma de estrés crónico para posteriormente evaluar la influencia de los elementos estrés y tumor sobre la expresión de VEGFR-2. Con este estudio se profundiza en los efectos moleculares del estrés crónico que potencialmente facilitan el desarrollo y progresión del cáncer.

2. Antecedentes

2.1 Estrés

Una situación que involucra una amenaza para la sobrevivencia de los organismos conlleva una respuesta para que diversos mecanismos de defensa puedan utilizarse, e integra la capacidad de movilidad, fuerza y alerta. La respuesta al estrés ayuda al organismo a prepararse para la exploración del entorno, huida o reproducción, así como su crecimiento. El estrés se acompaña del incremento en la frecuencia cardíaca y presión sanguínea, además de la aceleración del metabolismo para la movilización de nutrientes de preferencia hacia el cerebro y músculo (Cole. 2015; Ellis *et al.* 2006).

Se han identificado diversos elementos en la respuesta al estrés que se desenvuelven en una red de conexiones o circuito en donde el eje HPA (del inglés, *Hypothalamic pituitary adrenal axis*) y la corteza adrenal son los protagonistas (Pacak y Polkovist. 2001), estos elementos interaccionan con el sistema nervioso central y participan activamente en casi todas las actividades fisiológicas. El hipotálamo es un órgano que forma parte del eje HPA donde se encuentra la hipófisis (uno de los tejidos más vascularizados en los mamíferos); ésta estructura contiene células corticotropas que secretan ACTH y glucocorticoides (GC) que también participan en la adaptación al estrés, y actúan como inmunosupresores en la autoinmunidad y la inflamación (Gardner y Shoback. 2013). La acción de los glucocorticoides se encuentra asociada a cambios conductuales, neuroquímicos y neurodegenerativos, impactando en procesos de memoria y funciones cognitivas (Adzic *et al.* 2009). Estudios corroboran que un aumento en el nivel de tales sustancias hormonales también ayuda al desarrollo del cáncer, incluyendo cáncer de mama, cáncer de ovario, linfoma y cáncer cervico uterino (Schrepf *et al.* 2013).

En la respuesta al estrés participan neuronas de la amígdala, las cuales reciben una fuerte entrada de sustancias noradrenérgicas desde el locus cerúleo (LC-NA) ubicado en el tallo cerebral, donde se integran la mayor fuente de

catecolaminas y es identificado como el centro de dicha respuesta al estrés (Ellis *et al.* 2006). Las catecolaminas epinefrina (E) y norepinefrina (NE) son hormonas que ayudan a mantener la homeostasis del cuerpo humano, transmiten señales por sinapsis química o viajan por el torrente sanguíneo (Joels y Roozendaal, 2011). Las catecolaminas participan en la regulación metabólica y el estrés causa un desequilibrio en esta regulación. En situaciones de estrés ocurre un incremento en los niveles de norepinefrina aproximadamente de diez veces y declinan a los veinte minutos, esto sucede después de la adecuada asimilación del estresor, la cual produce modificaciones en receptores adrenérgicos α y β y por ende, en las células efectoras. Los receptores β se expresan en superficies celulares de tejido muscular, cardiovascular, adiposo y respiratorio, se encuentran acoplados a proteínas G, e inducen y modifican la transducción para vías de señalización activando diversos efectos moleculares (Sarpeshkar y Bentley, 2010). Los elementos descritos son parte del sistema nervioso simpático, su inervación desde el cerebro hacia los tejidos permiten la comunicación entre lo que se percibe del ambiente y el espacio interno del cuerpo, la exacerbación de éstas señales se ha relacionado con la progresión del cáncer debido al estrés (Antoni *et al.* 2006; Hassan *et al.* 2013). En situaciones de estrés crónico, las catecolaminas NE y E se encuentran elevadas e inducen la activación de STAT-3, lo que incrementa la transcripción de genes asociados a la angiogénesis en tumores (Landen *et al.* 2007). También la interleucina 8 (IL-8) se encuentra aumentada en ratones portadores de tumor bajo estrés crónico, participando directamente en la inclusión de vasos sanguíneos con una mayor densidad; efecto que se anula con el silenciamiento del gen para IL-8 (Moreno-Smith *et al.* 2010).

La corticosterona promueve la regulación de eventos como el sueño y la vigilia, apetito e ingesta de alimentos, en procesos cognitivos como la atención selectiva, selección de respuestas e integración de información sensorial. En el modo re-activo, la corticosterona ayuda a desarrollar la habilidad del animal a lidiar, adaptarse y recuperarse del estrés, ya que promueve el aprendizaje y memoria. Un periodo breve de estrés puede ser excitante y beneficioso para la salud. Sin embargo, la falta de control al estresor y la incertidumbre puede

producir un estado crónico de “distrés”, lo que aumenta la vulnerabilidad a enfermedades, entre ellas las inflamatorias.

Los glucocorticoides modulan la vía de señalización mTOR en el hipocampo. El receptor para glucocorticoides (GR) es un factor de transcripción inducido por ligando.

2.2 Cáncer

El cáncer es una enfermedad que implica una desregulación génica ocasionada por aberraciones cromosómicas y mutaciones asociados a patrones de herencia o estimulados por el ambiente. Debido a diversas alteraciones metabólicas existe un desequilibrio en el crecimiento celular normal, lo que propicia la formación de tumores que evaden la respuesta inmunológica. Algunas señas de identidad del cáncer definidas por Weinberg se describen en la tabla 1.

Señas de identidad del cáncer
Autosuficiencia en señales de crecimiento
Insensibilidad a señales anti-crecimiento
Apoptosis
Potencial replicativo sin límite
Angiogénesis sostenida
Metástasis e invasión de tejido

Tabla 1. Señas de identidad del cáncer

De acuerdo a Hedge y colaboradores (2016), histológicamente existen tumores inflamatorios y no inflamatorios. Los tumores inflamatorios son caracterizados por la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), IFN- γ secretado por células T CD8+, la expresión de PD-L1 en células del sistema inmune, inestabilidad genómica y la respuesta antitumoral adecuada. A diferencia de lo descrito, los tumores no inflamatorios raramente expresan PD-L1 y MHC clase I, son altamente proliferativos y tienen una tasa baja de mutaciones, existe infiltración de células anti inflamatorias como macrófagos M2,

linfocitos Th2 y T reguladores que favorezcan el crecimiento y la metástasis del tumor (Green-McDonald *et al.* 2013). Esta respuesta anti-inflamatoria se ha documentado en diversos estudios clínicos, donde el progreso del cáncer está aunado a patologías como la depresión y respuestas endócrinas alteradas. También se ha comprobado la existencia de supresión de células NK y linfocitos T en pacientes sometidos a estrés debido a procedimientos quirúrgicos, así como cambios en la morfología de vasos linfáticos y aceleración de la metástasis en cáncer (Le *et al.* 2016). Guerreschi y colaboradores (2013) demostraron la activación del receptor adrenérgico β_2 en células que expresan FoxP3⁺, lo que incrementa la expresión de CTLA-4 en la superficie celular, incrementando a su vez las propiedades inmunosupresoras de linfocitos T reguladores.

Las células tumorales tienen la capacidad de proliferar de forma descontrolada, invadiendo tejidos y aumentando sus requerimientos energéticos. La capacidad oxidativa de tales células tumorales prevalece sobre el metabolismo glucolítico (Moreno-Sánchez, 2007). Hay un incremento de enzimas y transportadores de glucosa, esto le permite a las células cancerígenas seguir creciendo en el microambiente tumoral, donde las concentraciones de O₂ son muy bajas. En condiciones de hipoxia, el factor inducible de hipoxia 1 α (HIF-1 α) se encuentra estable y no es degradado como en concentraciones normales de oxígeno, este factor de transcripción también puede ser inducido por factores de crecimiento, citocinas, especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico, lactato, piruvato y oxalacetato.

2.2.1 Angiogénesis y mimetismo vasculogénico

La formación de nuevos vasos sanguíneos a través de la vasculatura pre existente es llamada angiogénesis, es un fenómeno complejo involucrado en la embriogénesis y la reparación de heridas tisulares hasta patologías como la tumorigénesis. Su propósito es intercambiar componentes moleculares a los tejidos circundantes y del retorno de éstos componentes a través de vasos linfáticos, los cuales acarrean células a los ganglios linfáticos para permitir el reconocimiento de partículas extrañas (Alitalo *et al.* 2005). Contrario a la angiogénesis, la vasculogénesis se refiere a la formación de vasos sanguíneos

por el reclutamiento de células de médula ósea circulantes (BMDC). Por otro lado, el mimetismo vasculogénico es cuando las células tumorales adquieren propiedades de las células endoteliales y se alinean para asemejarse a estructuras como los capilares para llevar nutrientes al interior del tumor, esto sucede en ciertos tipos de cáncer muy malignos.

En el microambiente tumoral, la formación de nuevos vasos y capilares sanguíneos se ve favorecida por células endoteliales que ayudan a moldear y regular el crecimiento del tumor mediante la liberación de factores de crecimiento específicos. Además, la invasión de células endoteliales promueven la proliferación de otras células infiltrantes, que también permiten el crecimiento del tumor (Butler *et al.* 2010).

Algunos de los factores angiogénicos que participan en la formación de nuevos capilares son: PDGF y HE-EGF, estos factores atraen células llamadas pericitos que junto con células vasculares del músculo liso, fabrican una red de capilares que liberan factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) y angiopoyetina-1 (Ang-1), el conjunto de células presentes moldean un soporte estromal protector que da lugar al desarrollo de carcinomas (Weinberg, 2014). Los capilares sanguíneos responden a sensores que detectan la falta de oxígeno en tejidos como son PHD2 y HIF-1 α , para ajustar el tamaño de los vasos y dar suficiente abasto a la demanda de oxígeno. En pacientes con cáncer, la presencia aumentada de VEGF-A es un signo de mala prognosis. En linfomas, cáncer de mama, cervix y colon, VEGF-A está sobreexpresado y aumenta conforme la progresión de la enfermedad maligna (Dvorak,2002). En condiciones fisiológicas de estrés, también se amplifica la liberación de estos factores angiogénicos (Rafii. 2016). Estudios con ratones sometidos a condiciones de estrés crónico presentan una enfermedad más invasiva, asociada a un alto nivel de catecolaminas en sangre, en comparación con los ratones no estresados. La norepinefrina actúa como estimuladora de altos niveles de VEGF a través del eje de señalización ADRB2/cAMP/PKA, y este efecto puede abolirse con el uso de bloqueadores β (Thaker *et al.* 2006). La señalización β -adrenérgica amplifica el reclutamiento de macrófagos en el parénquima tumoral con la producción de quimiocinas, CSF1 y el aumento de la densidad vascular debido a la secreción

de VEGF, TGF β , IL-6, MMP9 y PTGS2, inducidas por la estimulación de precursores mielopoyéticos (Armaiz-Pena *et al.* 2013).

En tejido adiposo, el reclutamiento de células y moléculas pro-inflamatorias es continuo. Estudios indican que la sobreexpresión de VEGF-A en tejido adiposo promueve un fenotipo anti-inflamatorio para prevenir la resistencia a insulina (Xu *et al.* 2003; Lu *et al.* 2012). También se observa un incremento paralelo de VEGF-A y macrófagos M2 en tejido adiposo. Los macrófagos con el fenotipo M2 están asociados a macrófagos asociados a tumores (TAM, del inglés *Tumor Associated Macrophages*), quienes producen factores de crecimiento (entre ellos, TGF- β y VEGF) que pueden estimular la proliferación de tumores y a la angiogénesis (Elias *et al.* 2012).

2.2.1.1 Receptor 2 del Factor de crecimiento de Endotelio Vascular (VEGFR-2)

El VEGF-R2, identificado como Flk1 en ratón y como KDR en humanos, es un receptor tirosin-cinasa; su ligando es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A), el principal componente que estimula la angiogénesis bajo condiciones normales y de enfermedad. Las neuropilinas 1 y 2, VE-cadherina e integrina $\alpha\beta 3$ son co-receptores de VEGF-R2 que favorecen su señalización río abajo y permiten el crecimiento de células endoteliales y su migración (Matsumoto y Claesson-Welsh, 2001). Además de VEGF-A, la unión de VEGF-C y VEGF-D al receptor VEGFR-2 produce su homodimerización y la activación cinasa, que da entrada a las funciones biológicas de VEGF en las células.

La liberación paracrina de VEGF desde células estromales, células derivadas de precursores mielopoyéticos o del tumor, tiene la función de mantener la homeostasis vascular (Carmeliet y Jain, 2011). Stockmann y colaboradores reportan un aumento de fosforilación de VEGF-R2 en presencia de células derivadas de precursores mielopoyéticos en tumor que secretan VEGF-A (Stockmann *et al.* 2008).

Se han demostrado alteraciones específicas de tejido de VEGF y sus receptores debido al estrés crónico. Sun y colaboradores (2016), reportan una inhibición de VEGFR-2 en el hipocampo de ratas sometidas a estrés inducido por ira, asociado a desorden en la vía de señalización PI3k/AKT/mTOR, la cual está involucrada en procesos celulares importantes como lo son la diferenciación, crecimiento y metabolismo celular, lo que reduce la neurogénesis de VEGF en el hipocampo (Sun *et al.* 2016). En contraste, en condiciones de estrés crónico por restricción de movimiento, se presenta un incremento en los niveles proteicos de VEGF y en la expresión de VEGFR-2 en la corteza prefrontal de ratones. Estos resultados están asociados al efecto neuroprotector de VEGF en el cerebro como resultado del estrés inducido (Elfving *et al.* 2015).

También se ha demostrado el incremento de VEGF inducido por NE en tumores linfoides, tales como mieloma múltiple, lo que sugiere que la habilidad de la NE de regular la expresión de VEGF no es exclusiva para carcinomas (Yang *et al.* 2008). En experimentos *in vitro* en células corticales e *in vivo* en la corteza pre frontal de ratones, la exposición a largo plazo a corticosterona (CORT) altera la expresión de *flk1*, impactando en la señalización VEGF/*flk1*, también se presenta una sobreexpresión en el sensor de calcio neural 1 (NCS-1, del inglés, *Neural Calcium Sensor 1*) que promueve la sobrevivencia celular en las neuronas, actuando como una respuesta adaptativa frente al estrés. Además, los animales tratados con corticosterona presentan comportamientos depresivos y de ansiedad (Howell *et al.* 2011).

En tumores de cerebro (gliomas) de pacientes que tienen una baja sobrevivencia, se presenta la sobreexpresión de los genes FLT1, KDR y VEGFA, que codifican para VEGFR-1, VEGFR-2 y su ligando VEGF-A, respectivamente (Zhang *et al.* 2015). Wu y colaboradores (2014), reportan que ratones sujetos a un paradigma de estrés por aislamiento, presentaron tumores más grandes, así como un número mayor de nódulos metastásicos, en comparación con los ratones en reposo.

Se conoce que VEGFR-2 se expresa en forma basal en células endoteliales, sin embargo, no se limita a éstas. Suzuki y colaboradores (2010)

encontraron que VEGFR-2 se expresa selectivamente en células T CD4+ CD25+ FOXP3high+ (Treg) caracterizadas por tener un efecto altamente supresor de la respuesta inmune.

Se deduce así, que existe una relación potencial entre el cáncer y el estrés crónico, la cual parcialmente se deriva de la angiogénesis inducida por estrés.

3. Justificación

La angiogénesis y el estrés tienen diferentes papeles en la fisiología de la homeostasis y la inflamación. Gracias al estudio en modelos de estrés crónico se ha encontrado un fuerte sustento entre la relación del estrés, la angiogénesis y la relevancia de estos factores en la progresión del cáncer. Esta relación se profundiza en este trabajo al analizar la expresión de VEGFR-2 en tejidos con gran actividad metabólica en el organismo y así tener una mayor comprensión de los mecanismos que son favorables a la progresión tumoral.

4. Hipótesis

El estrés crónico altera la expresión del receptor 2 de VEGF en diversos tejidos de ratones sanos y portadores del linfoma murino L5178Y-R.

5. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto del estrés crónico sobre la expresión de VEGFR-2 en diversos tejidos de ratones BALB/c sanos y portadores de tumor.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto del protocolo de estrés crónico empleado en este estudio sobre activación de la vía HPA y del sistema adrenérgico.
2. Evaluar el efecto del estrés crónico sobre la expresión génica de VEGFR-2 en tejido tumoral, adiposo, músculo y cerebro.
3. Evaluar el efecto del estrés crónico sobre la expresión a nivel proteína de VEGFR-2 en tejido tumoral.

6. Material y Métodos

6.1 Material

6.1.1 Animales:

Se emplearon 15 ratones hembra BALB/c de aproximadamente 10-12 semanas de edad, proporcionados por el bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas (U.A.N.L.). Los ratones se mantuvieron en jaulas microventiladas con acceso a agua y alimento *ad libitum* con un ciclo luz/oscuridad de 12 h (6AM-6PM), una temperatura ambiental controlada de 22°C y humedad relativa de 45%. Cuidando de mantener un ambiente tranquilo hasta su utilización en el protocolo.

Los grupos experimentales se determinaron en función de la presencia o no del tumor y a la exposición del estrés crónico o reposo, de la siguiente manera:

1. Ratones control sin tumor

1.1 Condiciones normales de alojamiento (n=3)

1.2 Condiciones de estrés crónico (n=4)

2. Ratones portadores del linfoma

2.1 Condiciones normales de alojamiento (n=4)

2.2 Condiciones de estrés crónico (n=4)

Todos los procedimientos de trabajo con los animales fueron aprobados por el Comité Interno de Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Departamento de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

6.1.2 Modelo del linfoma murino L5178Y-R

El modelo murino del linfoma L5178Y-R fue utilizado como modelo de cáncer *in vivo*. El linfoma murino L5178Y-R fue obtenido originalmente en ratones de la cepa DBA/2 y ha sido utilizado ampliamente en ratones BALB/c puesto que esta cepa posee 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). En cuanto al tipo celular, presentan una 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 lleva 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 (5×10^6 células/ratón) en ratones hembras BALB/c de 8 a 10 semanas de edad. Trece días después de la inoculación se colecta 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 lava dos veces en PBS, por centrifugación a 2000 rpm/10 min, y se ajusta a una densidad de 2×10^7 células/mL en medio RPMI completo. Para la forma sólida del tumor, se inoculan 0.2 mL de la suspensión ajustada en la extremidad posterior derecha de los ratones 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 emplearán una serie de criterios para un sacrificio ético, de tal forma que se minimice el sufrimiento de los animales experimentales.

6.2 Métodos

6.2.1 Protocolo de estrés crónico

Existen distintos paradigmas que han sido utilizados con la finalidad de inducir un estrés crónico en los animales de experimentación. En este trabajo se utilizó un paradigma por restricción de movimiento con duración de 2 horas diarias, durante 19 días en un horario entre 8-12 hrs.

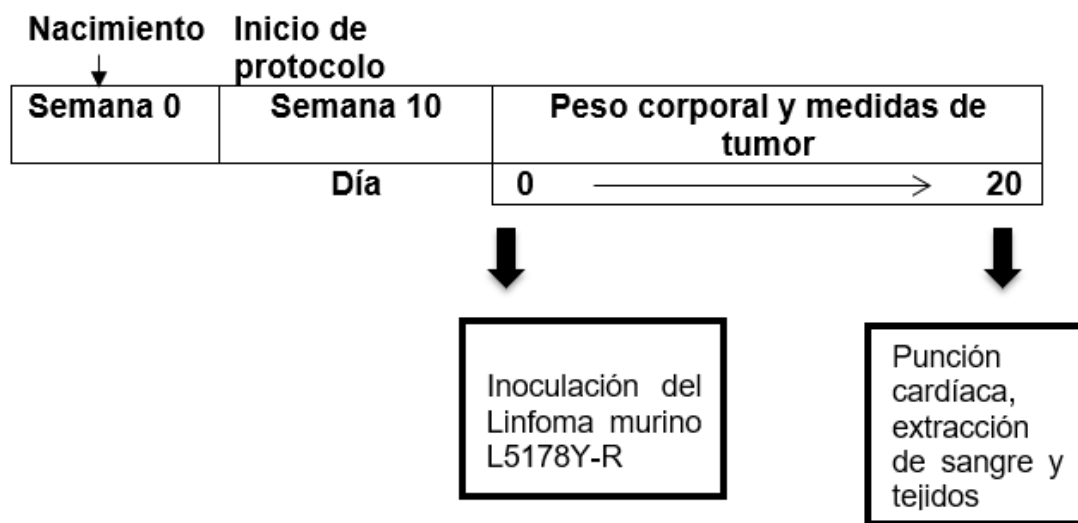


Figura 1. Protocolo de inducción de estrés

6.2.2 Estrés por restricción del movimiento

Los ratones fueron colocados de forma individual en un tubo cónico de 50 mL con adecuada ventilación (figura 1). Los animales se mantuvieron en estas condiciones durante 2 horas diarias. Durante este tiempo, los animales control (reposo) permanecieron en sus jaulas sin que se perturbara su ambiente.



Figura 2. Inducción de estrés crónico por restricción del movimiento.

6.2.3 Evaluación de la progresión del peso corporal

Para determinar la evolución del peso corporal, los ratones fueron pesados diariamente durante el protocolo, siempre tras la inducción de estrés crónico. Además, se realizó el cálculo del índice de masa corporal (IMC) de los distintos grupos experimentales. Esto se llevó a cabo al final del protocolo y para ello, se midió la distancia ano-nasal y el peso corporal final del animal, calculándose el IMC siguiendo la siguiente fórmula de acuerdo a Friedman (1999):

$$\text{IMC} = \text{Peso} \div \text{Altura} \left(\text{unidades} \frac{\text{g}}{\text{cm}^2} \right).$$

6.2.4 Determinación de progresión tumoral *in vivo*

Peso tumoral: Su estimación fue dada por la medición calibrada del largo (A) y del ancho (B), para lo que se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{A(\text{mm}) * B(\text{mm})^2}{2}$$

Para llevar a cabo las medición del largo y ancho del tumor se utilizó un vernier digital modelo Fisher Scientific. Las mediciones siempre fueron tomadas por la misma persona, esto con el fin de evitar variaciones en la medición y reducir la variación en los datos obtenidos.

6.2.5 Sacrificio ético y recolección de muestras

Los animales fueron anesteciados para su sacrificio ético con una concentración de 100mg/kg de ketamina y 10mg/kg de xilacina. En cada animal se llevó a cabo punción cardiaca terminal utilizando jeringas de 1mL, aguja Luer Lock de 27Gx13mm, 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 el suero fue recolectado y almacenado en alícuotas de 150-300 μ l a -20°C para la posterior determinación de niveles plasmáticos de corticosterona y norepinefrina. Después de la punción cardiaca, se aseguró el sacrificio de los animales con dislocación cervical.

6.2.6 Cuantificación de corticosterona y norepinefrina

Los niveles plasmáticos de la corticosterona y norepinefrina se cuantificaron en muestras del suero almacenado a -20°C obtenido después de la punción cardiaca, al final del protocolo de estrés. Se emplearon kits ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles de corticosterona se determinaron con un kit de la marca Enzo Life Sciences (Farmingdale, New York), y la norepinefrina con un kit de la marca MyBiosource (San Diego, California, United States).

6.2.7 Determinación del nivel de expresión de VEGFR-2

6.2.7.1 Extracción de ARN, retrotranscripción y síntesis de ADN complementario

Después de realizar la punción cardiaca terminal, se extrajeron los diversos tejidos que se presentan en la Tabla 2, los tumores se pesaron, se cortaron en fragmentos y se lavaron en PBS. Los órganos como bazo, ganglios y grasa interescapular se colectaron en formaldehído al 10% para futuro análisis histológico. Las muestras se congelaron y almacenaron a -80° C en viales de 1.5 mL para su posterior análisis.

Órgano	Almacenamiento
Tumor, tejido muscular, tejido adiposo inguinal y visceral	-80°C
Tejido adiposo escapular, tumor, bazo, y ganglios	FORMALDEHÍDO 10%

Tabla 2. Tejidos extraídos y condiciones de almacenamiento

La extracción de ARN del tejido tumoral se realizó utilizando la técnica descrita por Chomczynski y Sacchi (1987). Se colocaron en viales con 1 mL de TRIzol (Thermo Fisher Scientific), 30-50mg de tejido tumoral y se homogenizó con pistilos estériles. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente se añadieron 0.2 mL de cloroformo. Los viales se agitaron durante aproximadamente 15 segundos y se dejaron incubar de 2-3 minutos a temperatura ambiente, después, se realizó una centrifugación a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4° C. A continuación, se extrajo la fase acuosa y se añadieron 0.5 mL de isopropanol, seguido de una incubación por 10 minutos en frío, después se descartó el sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol al 70 % en cada vial. A continuación se realizó una última centrifugación durante 5 minutos a 7,500 rpm a 4° C, luego se descartó el sobrenadante para secar los tubos boca abajo, sobre un papel. Inmediatamente después, el pellet se resuspendió agregando 20 µL de agua libre de nucleasas, se incubaron las muestras a 56° C durante 15 minutos en un Thermomixer de la marca Eppendorf (Edison, New Jersey, United States).

Después, se cuantificó la concentración de ARN obtenido utilizando un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Las muestras se diluyeron 1:10 y dependiendo de la concentración de ARN, se ajustó la cantidad necesaria para la reacción de retrotranscripción.

Para la retrotranscripción de ARN a ADNc, se empleó el kit *High Capacity cDNA 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 µL de *MultiScribe Reverse Transcriptase*, y 4.2 µL 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 almacenado a -20 °C para su posterior análisis.

6.2.7.2 Análisis de la expresión mediante PCR tiempo real

La expresión del gen *flk* de VEGFR-2 de las muestras se analizó mediante PCR tiempo real en el equipo 7500 de Applied Biosystems. Para la reacción de q-PCR se utilizó el MasterMix (Applied Biosystems) con las sondas TaqMan™ de Applied Biosystems (No. catálogo 4331182) validadas para el gen Kdr para ratón, y como gen endógeno se utilizó el gen para la Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de la misma marca (No. catálogo 4331182).

El número de copias relativas del control se normalizó con la media del control endógeno GAPDH y los datos fueron analizados por el método $\Delta\Delta C_t$ (Bernard y Wittwer, 2002).

6.2.8 Cuantificación de VEGFR-2 mediante Western blot

Se determinó la presencia de la proteína VEGFR-2 en tejido tumoral, utilizando como control endógeno la β -actina. Se fragmentó el tejido previamente congelado y se transfirieron alrededor de 25 mg a un vial de 1.5 mL, después, se le añadió un volumen de 0.600 mL de buffer de lisis hasta homogeneizar la muestra (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0.1 %, SDS al 0.1 %, EDTA 1 mM, PMSF 100mM). Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm por 20 minutos a 4° C, se colectó el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteína utilizando el reactivo de Bradford. Se cargaron 30 μ g de proteína por carril en un gel de acrilamida para efectuar una electroforesis en condiciones desnaturizante (SDS-PAGE) en geles discontinuos de poliacrilamida (gel concentrador 4%; gel separador al 10%) utilizando las siguientes condiciones: 70 V por 30 minutos y 100 V por 2 horas. El gel se transfirió en una membrana de nitrocelulosa en un módulo de

transferencia húmedo con amortiguador Tris-Glicina-SDS pH 8.3 a 70 V durante dos horas o a 15 V durante 14 horas.

Para la hibridización, se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos incubando las membranas con solución (leche descremada en polvo al 5% y Tween 20 al 0.1%, en TBS) durante 1 h, se lavaron 3 veces con TBS-Tween y a continuación se incubaron con anticuerpos policlonales específicos para *Fik-1* y β -actina obtenidos en conejo. Después de 3 lavados con solución de lavado, las membranas se incubarán con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa, dilución 1:2000, durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron en tres ocasiones con TBS-Tween, se incubaron durante un minuto con sustrato de quimioluminiscencia y se expusieron con película radiográfica por 15-30 min.

6.3 Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para la diferencia de peso del tejido adiposo subcutáneo entre grupos. Se utilizó la prueba *t-student* para la determinación en la diferencia de medias de norepinefrina, corticosterona, consumo de alimento, peso tumoral final y progresión del tumor.

7. Resultados

I. Efecto del estrés crónico por restricción de movimiento en la activación del eje hipotalámico pituitario adrenal (HPA) y sistema adrenérgico medular (SAM) en animales portadores de tumor L5178Y-R.

Una de las características de la activación del eje hipotalámico pituitario adrenal es el aumento de niveles plasmáticos de norepinefrina y corticosterona en animales sometidos a estrés. Para el análisis de estas diferencias, en la figura 1 y 2 se observan los niveles plasmáticos de norepinefrina y corticosterona, respectivamente, solo en los ratones que portaban tumor. Los resultados mostraron la activación de las vías involucradas en la respuesta frente al estrés, como lo son la presencia elevada de norepinefrina por la activación del sistema adrenérgico medular y corticosterona como característica de la activación del eje hipotalámico pituitario adrenal en plasma sanguíneo.

Estudios previos en este laboratorio indicaron una diferencia significativa (Montero-Molino, 2016) entre animales sometidos a estrés frente a los animales en reposo, además, los valores de estas hormonas aumentaban en animales portadores de tumor. Sin embargo, la inducción de estrés crónico no produjo una diferencia significativa en los niveles de estas de norepinefrina (*t-test*: $p=0.83$) y corticosterona (*t-test* $p=0.74$) entre el grupo bajo condiciones de reposo y estrés crónico de los ratones portadores de tumor.

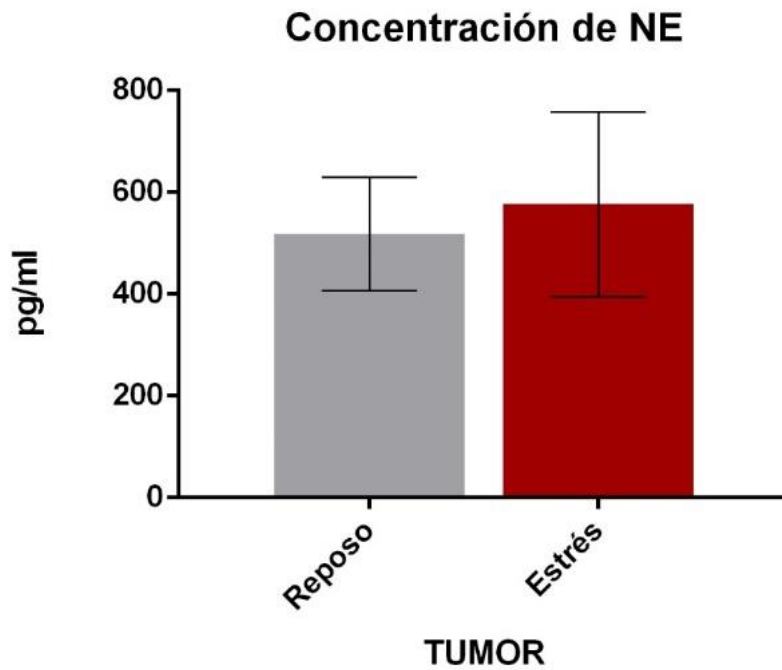


Figura 3 Niveles de norepinefrina en plasma (NE) de animales portadores de tumor bajo condiciones de reposo y estrés crónico. *T-test NS* $p= 0.83$

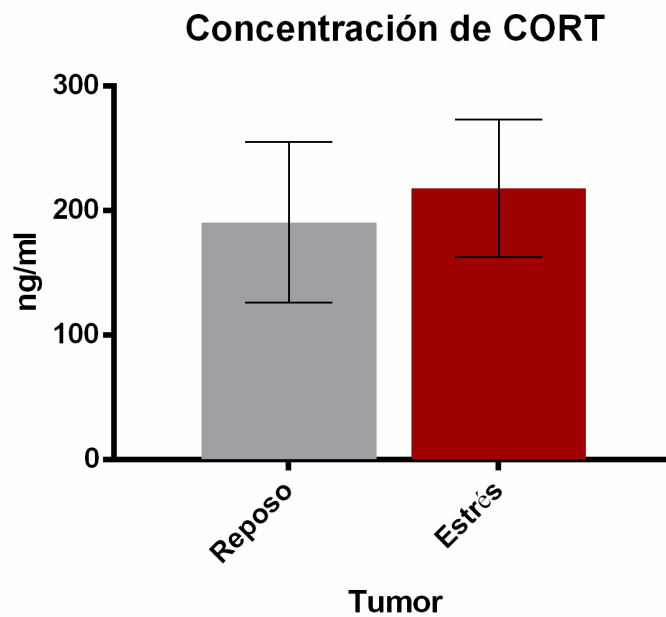


Figura 4 Niveles de corticosterona en plasma (CORT) de animales portadores de tumor bajo condiciones de reposo y estrés crónico. *T-test NS* $p= 0.74$.

II. Efecto del estrés crónico sobre la ingesta de alimento.

Además de medir los niveles en sangre de hormonas involucradas en el estrés, también decidimos observar la conducta de alimentación de los ratones, como indicador conductual en la respuesta frente al estrés.

Para corroborar la influencia ejercida por el estrés en la pérdida de apetito, registramos la cantidad de alimento consumido en cada jaula, de los grupos en reposo y sometidos a estrés crónico, ambos portadores de tumor. En la figura 5 podemos apreciar una reducción en la ingesta de alimento en los animales durante el protocolo. Debido a que este es un patrón asociado a la sintomatología anorexigénica ejercida por el estrés, la pérdida de peso corporal que se describirá a continuación puede ser, en cierta medida, conductual, como resultado de una disminución en la ingesta de alimento. En el grupo bajo condiciones de estrés crónico se observa una reducción significativa en la ingesta diaria de alimento ($p= 0.01$), a partir del quinto día esta reducción es más pronunciada y al día 9 la ingesta se reduce drásticamente a la mitad.

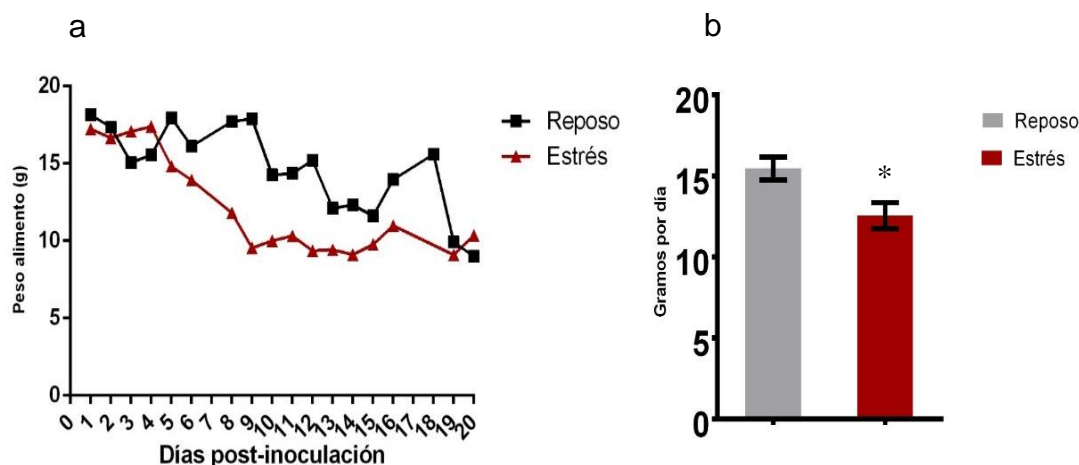


Figura 5 Ingesta de alimento a) Durante la inducción de estrés de los grupos portadores de tumor bajo condiciones de reposo y estrés crónico. Representación de la media de gramos de alimento consumido por jaula. b) Representación de la media del peso de alimento en gramos consumido cada día por los animales portadores de tumor bajo condiciones de estrés crónico y reposo. Alimento consumido por jaula. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media. *T. test.* $*p=0.01$.

III. Efecto del estrés crónico sobre la progresión del peso corporal y tumoral.

En la figura 6 se observa que la progresión del peso corporal de los ratones portadores de tumor bajo condiciones de estrés crónico fue significativamente menor (t -test: $p=0.001$), como parte de la activación adrenérgica. Las líneas punteadas muestran el día cuando el tumor fue palpable en los animales bajo condiciones de reposo y estrés.

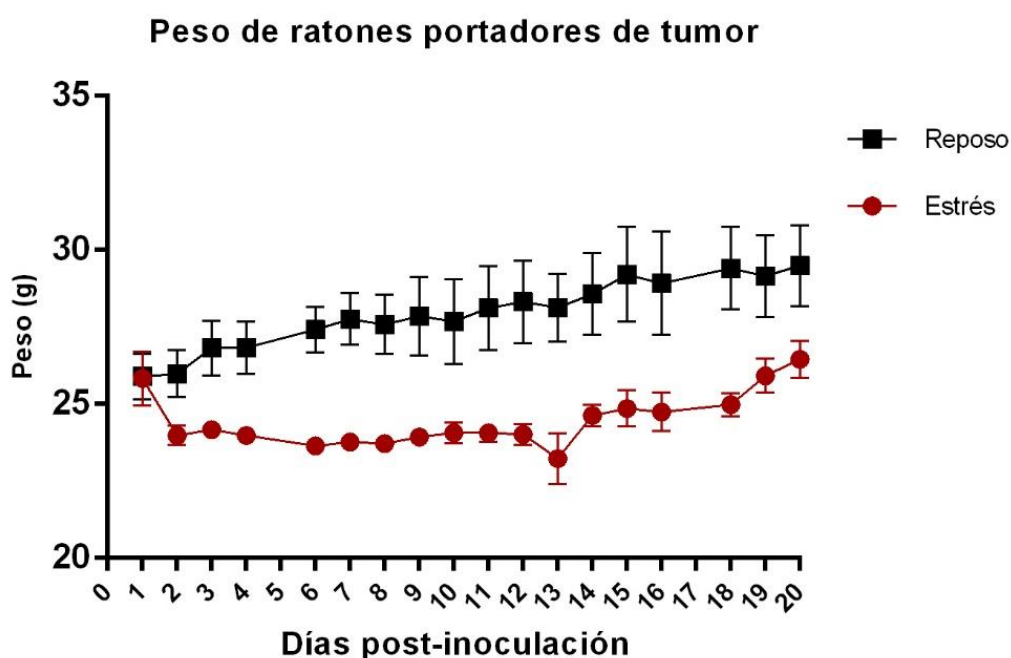


Figura 6 Progresión del peso corporal de los animales portadores de tumor bajo condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. El peso corporal de los ratones portadores de tumor se registró diariamente a partir del primer día de inducción de estrés crónico hasta el día del sacrificio (Días: 1-20) t -test: $*p=0.001$.

Las siguientes figuras muestran tanto la progresión del tumor como su peso final, se observa que los animales bajo condiciones de estrés crónico tuvieron una progresión menos pronunciada que los animales en condiciones normales de

alojamiento (t -test: $p=0.02$). Sin embargo, el peso final del tumor no fue significativamente diferente entre los grupos estrés y reposo (t -test: $p=0.2$)

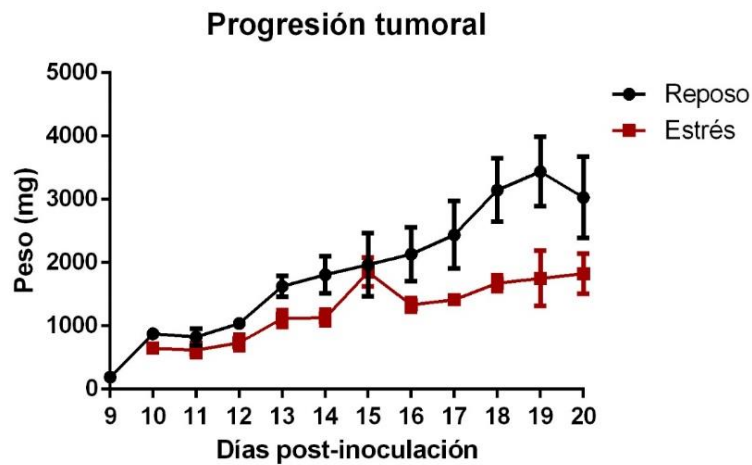


Figura 7 Progresión del peso tumoral durante el protocolo de inducción de estrés. Se muestran los valores del peso del tumor a partir del primer día que fue palpable en los animales bajo condiciones de reposo y sometidos a condiciones de estrés crónico. T -test: $p=0.02$.

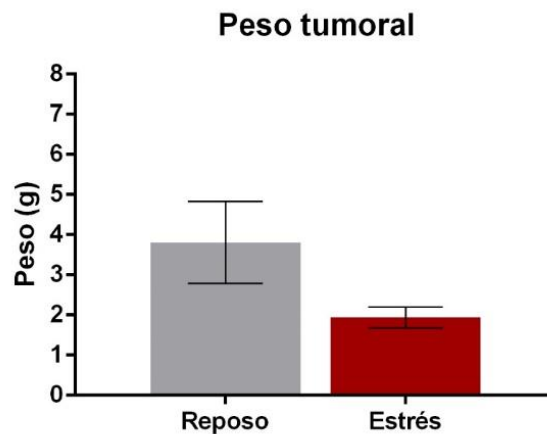


Figura 8 Peso tumoral final de los animales bajo condiciones de estrés crónico y condiciones normales de alojamiento. Se muestran los valores de la media \pm error estándar del peso final del tumor después de que los animales en condiciones de reposo y estrés crónico fueron sacrificados.

IV. Efecto del estrés sobre el tejido graso subcutáneo inguinal.

En la figura 9 se observa una disminución estadísticamente significativa en el tejido graso subcutáneo inguinal total de los animales libres de tumor sometidos a estrés crónico, así como en los animales portadores de tumor, independientemente del estrés.

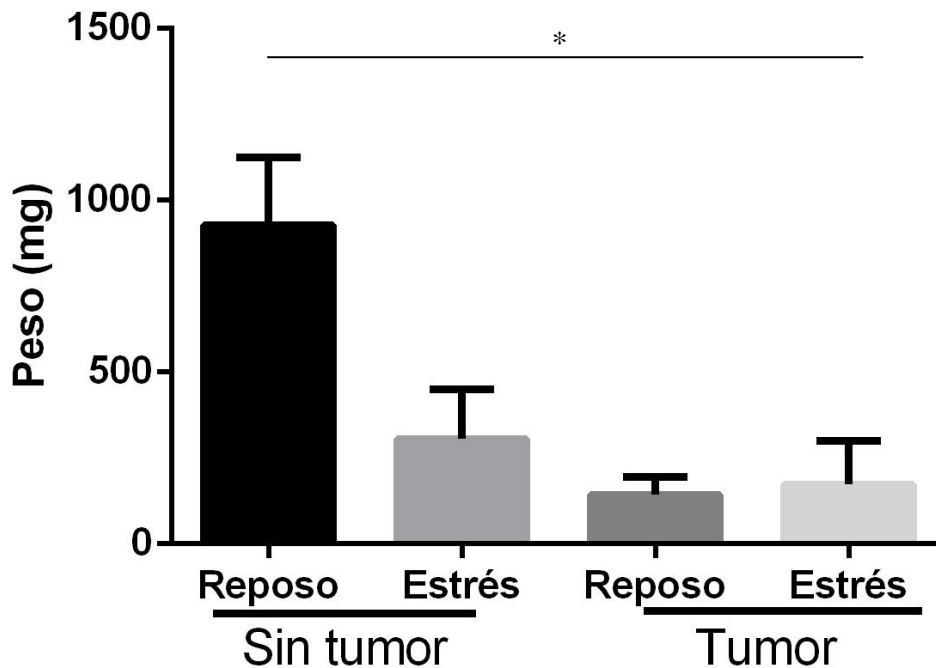


Figura 9 Tejido adiposo subcutáneo inguinal total de los animales en condiciones de estrés crónico y portadores de tumor. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media. ANOVA $P=0.0001$

V. Reducción del índice de masa corporal en ratones sometidos a estrés crónico

El índice de masa corporal nos indica la relación entre el peso corporal y la talla del animal, es un indicador más eficiente de las fluctuaciones de ganancia de peso. En este experimento observamos que el grupo control sin tumor presenta una reducción del IMC en condiciones de estrés crónico (figura 10), mientras que no hay diferencias estadísticamente significativas en el IMC entre los animales portadores de tumor por efecto del estrés (figura 11).

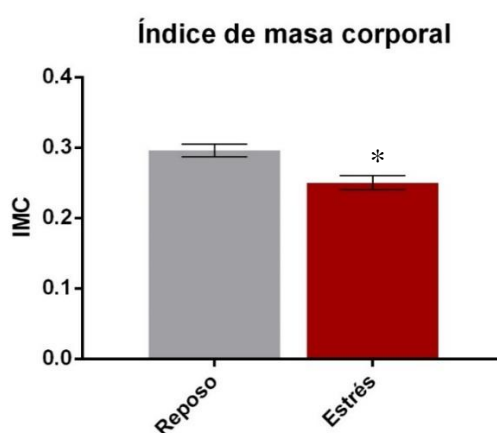


Figura 10 Índice de masa corporal de ratones sin tumor en reposo y sometidos a condiciones de estrés crónico. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media. (*T-test*: * $p= 0.01$)

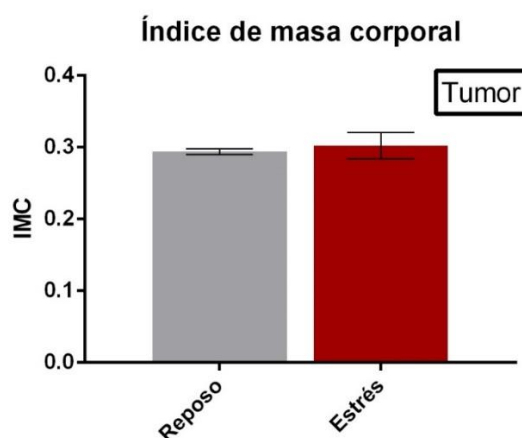


Figura 11 Índice de masa corporal de ratones portadores de tumor en reposo y sometidos a condiciones de estrés crónico.

VI. Efecto del estrés en la expresión de VEGFR-2 en tejido tumoral

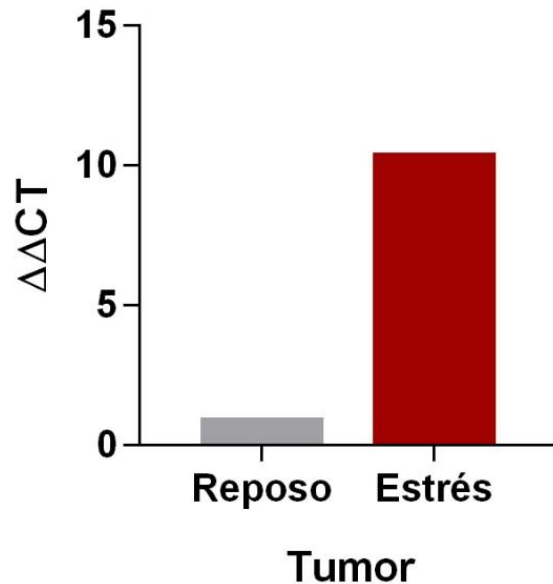


Figura 12 Expresión relativa del ARN mensajero de VEGFR-2 en el tejido tumoral de animales en reposo y sometidos a estrés crónico. Los datos se presentan como los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de las muestras normalizados con la media del gen constitutivo GAPDH.

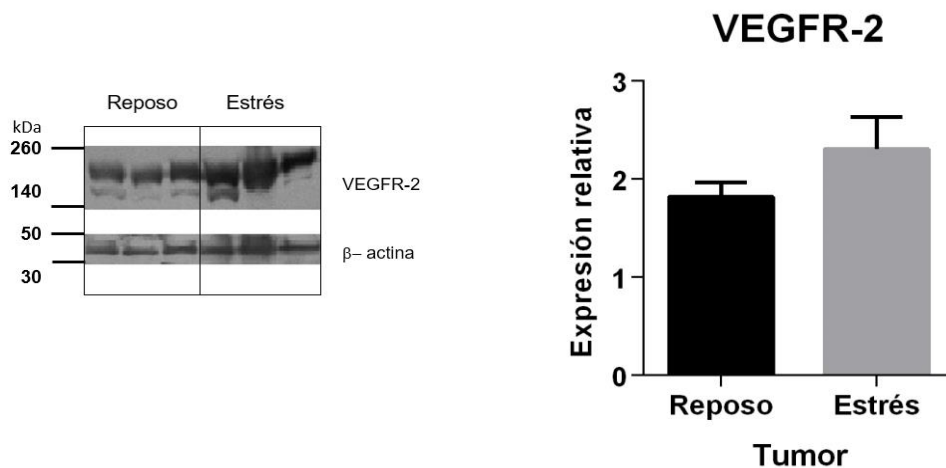


Figura 13 Expresión proteica de VEGFR-2. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media. t-test: $p=0.27$

VII. Efecto del estrés crónico en la expresión transcripcional de VEGFR-2 en tejido adiposo

En el tejido adiposo se observa un efecto contrario a lo encontrado en tejido tumoral. En ratones portadores de tumor sujetos a estrés crónico se encontró una disminución en la transcripción de VEGFR-2. Mientras que en el tejido adiposo de ratones portadores de tumor no estresados se encontró sobreexpresión del gen para VEGFR-2, así como en los ratones sin tumor sometidos a estrés crónico.

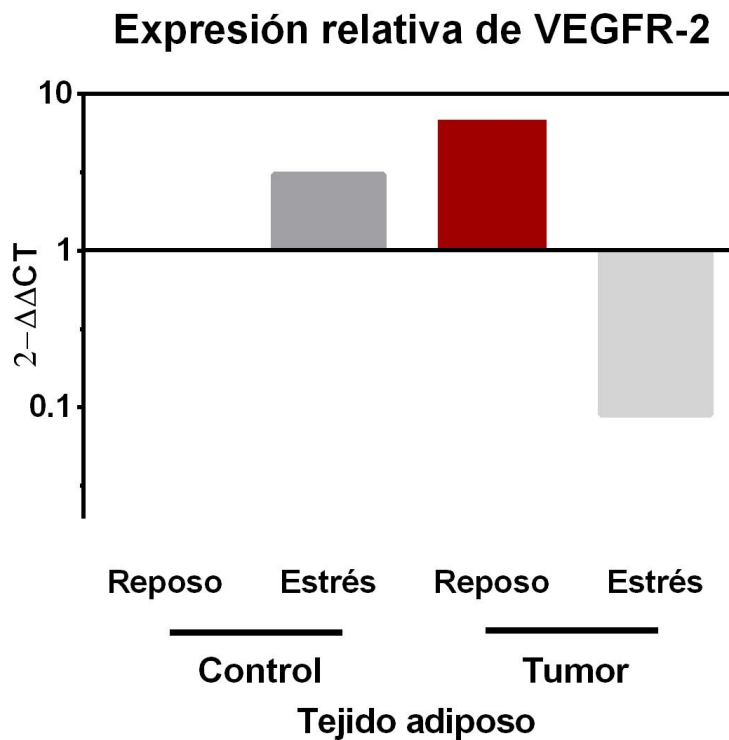


Figura 14 Expresión relativa del ARN mensajero de VEGFR-2 en el tejido graso subcutáneo de animales sin tumor y portadores de tumor, bajo condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. Se muestran los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de las muestras normalizados con la media del gen constitutivo GAPDH.

VIII. Efecto del estrés crónico en la expresión transcripcional de VEGFR-2 en tejido muscular

En la figura 15 se observa que bajo estrés crónico aumentó la expresión de VEGFR-2 en tejido muscular de animales portadores de tumor L5178Y-R.

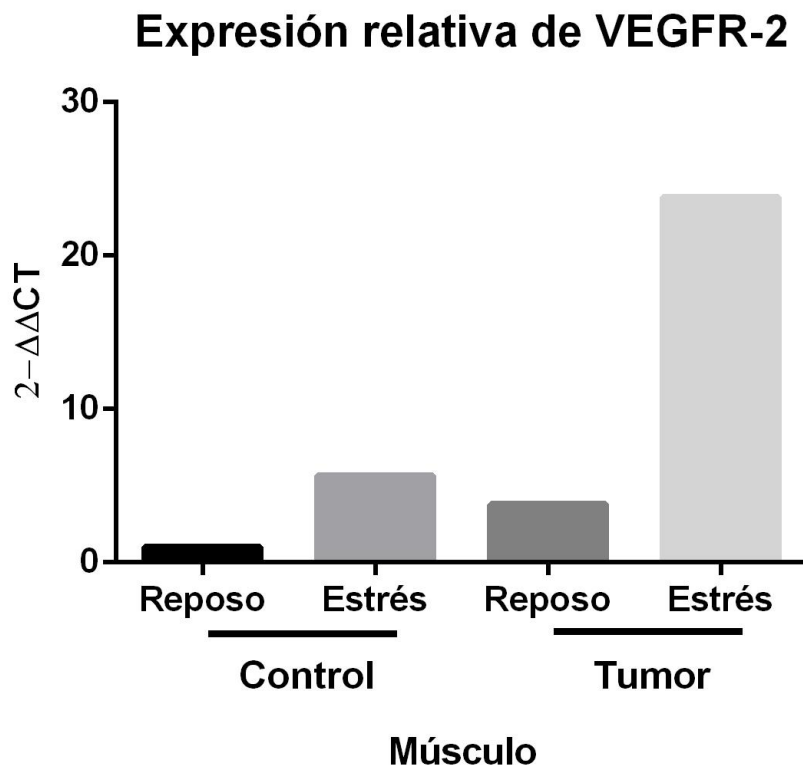


Figura 15 Expresión relativa del ARN mensajero de VEGFR-2 en el tejido muscular de animales sin tumor y portadores de tumor en reposo y sometidos a condiciones de estrés crónico. Se muestran los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de las muestras normalizados con la media del gen constitutivo GAPDH.

IX. Efecto del estrés crónico en la expresión transcripcional de VEGFR-2 en cerebro

En la figura 16 se observa que bajo estrés crónico aumentó la expresión de VEGFR-2 en tejido cerebral de animales sin tumor, pero no se observaron diferencias en los animales portadores de tumor.

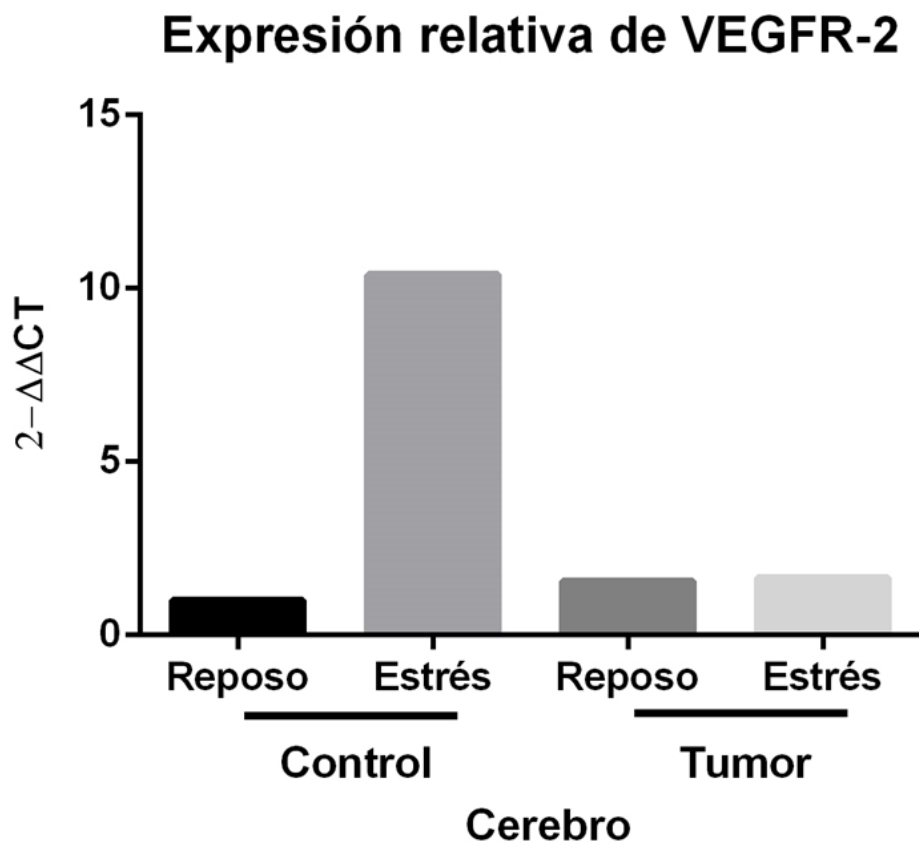


Figura 16 Expresión relativa del ARN mensajero de VEGFR-2 en el cerebro de animales portadores de tumor en reposo y sometidos a condiciones de estrés crónico. Se muestran los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de las muestras normalizados con la media del gen constitutivo GAPDH.

En la siguiente tabla se muestra el resumen de los resultados obtenidos dadas las diferencias de expresión transcripcional de VEGFR-2, en animales bajo condiciones de estrés crónico y portadores de tumor.

Grupos			Expresión VEGFR-2 ($2^{\Delta\Delta Ct}$)			
#	Tumor	Estrés	Tejido tumoral	Tejido adiposo	Tejido cerebral	Tejido muscular
1	-	-	1	3.07	1.35	3.78
2	-	+		1	1	1
3	+	-		6.88	10.39	5.65
4	+	+	10.47	0.09	1.56	23.81

Tabla 3. Tabla comparativa de la expresión relativa de VEGFR-2 en tejidos.

8. Discusión

El estrés como una respuesta adaptativa, activa múltiples vías neuronales y endócrinas para preparar al organismo a enfrentar una situación adversa, es un gran reto metabólico que origina diversos cambios en el animal bajo condiciones estresantes; entre ellos, la pérdida de peso, acompañada de la reducción en la ingesta de comida, incremento del calor corporal y reactividad en la vía HPA, aumentando los niveles de corticosterona en circulación y la activación del sistema adreno-medular para la liberación de catecolaminas, una respuesta de tipo “lucha o huida” (Harris, 2014). En este trabajo, el paradigma de estrés crónico utilizado no indujo un incremento significativo en los niveles plasmáticos de corticosterona después de 20 días, hallazgo similar al mencionado por Bowman y colaboradores (2006) que aunque reportan diferencias en los niveles plasmáticos de corticosterona entre sexos, no encontraron un efecto significativo debido al estrés. Además, observaron que el incremento en los niveles de corticosterona en ratones estresados disminuye conforme aumentan de edad, tal como lo demostraron Bodnof y colaboradores en 1995.

En estudios previos de este equipo de trabajo, observamos que las diferencias en los niveles plasmáticos de corticosterona sí son significativas para hembras BALB/c de 11 semanas de edad portadoras de tumor, cuando la duración de la restricción de movimiento tiene una duración de 30 minutos (Tesis: Montero-Molina, 2016). Se conoce que la corticosterona es un glucocorticoide auto-regulador de su producción, al viajar por el torrente sanguíneo hacia el cerebro, inhibe la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la vasopresina (AVP) en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, así como de la ACTH en la en la pituitaria, previniendo la excesiva liberación de GCs. Es decir, al no mostrar diferencias en la concentración de corticosterona debido al estrés, los ratones portadores de tumor mantuvieron una adecuada regulación en el mecanismo de retroalimentación negativa de la vía HPA. Sin embargo, fuera del hipotálamo, los GCs tienen efectos moduladores. Por ejemplo, la acción de los GCs en el hipocampo y en la pituitaria está asociada con la inhibición de la actividad HPA (Schmidt, 2009), mientras que la acción de los GCs en la

amígdala, se encuentra asociada con la activación de HPA. Bajo condiciones de estrés elevado, la actividad HPA se ve desequilibrada, lo que resulta en una señalización dañada de GC. Se ha demostrado que la disminución de los receptores de glucocorticoides (GR) en el PVN del hipotálamo se asocia al incremento de corticosterona y ACTH en plasma, indicando que la disminución de GR en esa área induce la regulación de la hormona liberadora de corticotropina que impide el mantenimiento de la función normal de la actividad HPA. Por otro lado, Laryea y colaboradores (2013) no observaron diferencias en las concentraciones plasmáticas de corticosterona y ACTH cuando la expresión de GR en el hipotálamo disminuye a la mitad en ratones transgénicos bajo condiciones basales o de estrés. En otro estudio, los niveles de corticosterona en plasma se midieron en cada fase del ciclo estral, no observando diferencias significativas en la concentración plasmática de corticosterona en ratones hembra bajo condiciones de estrés crónico y agudo (Gong *et al*, 2015).

Se ha demostrado que la influencia de los glucocorticoides no solo es sistémico, también es específico de tejido. Por ejemplo, ratones transgénicos que sobreexpresan en tejido adiposo el gen que codifica para la enzima 11β -HSDI que convierte la cortisona inactiva en cortisol activo, muestran un aumento en la producción de corticosterona a nivel local y desarrollan síndrome metabólico. Esto demuestra que un incremento local y no necesariamente plasmático de glucocorticoides puede afectar a toda la fisiología del organismo (Masuzaki *et al*, 2001). Adzic y colaboradores (2009) demostraron que en ratas sometidas a un paradigma de estrés crónico por aislamiento social, la fosforilación del receptor de glucocorticoides en el cerebro regula la actividad transcripcional del receptor de forma independiente a los niveles de corticosterona en suero. Es decir, los niveles de corticosterona obtenidos en suero no son indicativos de los efectos del estrés crónico sobre esta hormona específicos para cada tejido.

Caso similar, no encontramos diferencias significativas en la determinación de norepinefrina en plasma de animales portadores de tumor, esta hormona es liberada desde la médula adrenal como de las terminaciones simpáticas nerviosas. Se conoce que la norepinefrina moviliza los recursos metabólicos del cuerpo para enfrentarse a una situación adversa que activa vías involucradas en el mantenimiento energético de los órganos internos. La elevada

tasa metabólica también está relacionada con un aumento en el gasto cardíaco que pudiera estar influenciado por la estimulación adrenérgica (Hyltander *et al*, 1991), incitada por la inducción de estrés crónico. Además, los animales portadores de tumor tienden a consumir menos alimento, ocasionado por la anorexia y la depresión que presentan típicamente, lo que podría estar relacionada con la ganancia de peso corporal (Vallés *et al*, 2000; Harris *et al*, 2006, Rybkin II *et al*, 1997). En este experimento, observamos que hay una reducción drástica en la ganancia de peso en los ratones portadores de tumor bajo restricción de movimiento a partir del segundo día del protocolo. En los resultados podemos apreciar también que el consumo de alimento de ratones sometidos a estrés crónico es mucho menor que los ratones bajo condiciones en reposo. Numerosos estudios indican que el impacto del estrés crónico en el peso corporal es más pronunciado durante los primeros 3 días del protocolo de inducción de estrés, seguido de una meseta (Tamashiro *et al*, 2007).

Por otro lado, los ratones presentaron un tumor palpable a partir del noveno día (reposo) y el décimo día (estrés), el consumo de alimento se redujo a la mitad en los animales bajo estrés a partir de ese mismo día, hay un efecto anorexigénico que se intensifica debido al estrés y el tumor en conjunto.

También observamos que el tejido adiposo inguinal disminuye en condiciones de estrés crónico y en animales portadores de tumor, lo que puede ser un indicativo de caquexia, este fenómeno es un signo típico del cáncer caracterizado por la pérdida de tejido muscular debido al catabolismo proteico, en forma secundaria se presenta pérdida de tejido graso (Tisdale, 2003). El cáncer es una enfermedad crónica inflamatoria que tiene la característica de inducir la elevación de citocinas pro-inflamatorias, actuando en todo el cuerpo de manera paracrina o endocrina para mantener el comportamiento en respuesta a la enfermedad, por ejemplo; fatiga, fiebre, letargo, etc (Grossberg *et al*, 2010). La caquexia en cáncer es provocada por el aumento en liberación de interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa TNF- α , estas citocinas aumentan el estrés en el retículo endoplásmico, alteran la señalización del calcio y la traducción de proteínas en el músculo esquelético (Isaac *et al*, 2015).

Strassmann y colaboradores (1992) reportaron que el tamaño del tumor no está directamente ligado a la pérdida de grasa y músculo en un modelo de caquexia en cáncer, la IL-6 parece ser el factor caquético predominante. En

pacientes con cáncer, la caquexia es originada por un alto gasto energético favorecido por el ciclo de Cori (i.e. catabolismo del ácido láctico en glucosa) y gluconeogénesis.

En los resultados, también podemos apreciar que VEGFR-2 se sobreexpresa en tumor de ratones bajo condiciones de estrés crónico en comparación a los niveles de ratones en condiciones normales de alojamiento. En situaciones patológicas como el cáncer, las células endoteliales sobreexpresan VEGFR-2 para fomentar la angiogénesis, crecimiento y diseminación de tumores, estimuladas por factores de crecimiento liberados por células tumorales. Muchos factores regulan la expresión de VEGF y otros factores de crecimiento pro-angiogénicos, tales como: citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-13, factores de crecimiento: FGF, TGF, TNF- α , gonadotropinas, óxido nítrico e hipoxia (Tonini, 2003). Este estudio se limita solo a la expresión del receptor, pero sería interesante conocer si este aumento estuvo influenciado por algún factor angiogénico del tumor o de tejidos adyacentes.

Estudios pre clínicos han demostrado que la exposición a altos niveles de glucocorticoides o estrés crónico pueden inducir atrofia neuronal en el hipocampo y disminución de la neurogénesis (Lucassens et al, 2016). En nuestro trabajo, se observó aumento en la expresión de VEGFR-2 en el cerebro de animales libres de tumor sometidos a condiciones de estrés crónico. El silenciamiento de la expresión de este receptor en el cerebro puede afectar, entre otras cosas, la consolidación de la memoria emocional, la señalización VEGF-VEGFR-2 en células neuronales está implicada también en el funcionamiento sináptico apropiado del hipocampo (De Rossi et al, 2016). Debido a que el estrés crónico desencadena el desarrollo de la depresión, algunas maneras de reducir el efecto depresivo propiciado por el estrés, son mediante el ejercicio físico voluntario y el uso de antidepresivos, sin embargo, la administración de un inhibidor de VEGFR2 (SU1498) cancela tal efecto antidepresivo (Kiuchi et al, 2012). Es probable que la expresión de VEGFR2 aumente como un mecanismo de protección ante el estrés que solo actúa en situaciones no patológicas. Mientras que la expresión de este receptor se eleva drásticamente en el cerebro de ratones bajo restricción de movimiento, no observamos este efecto en ratones portadores de tumor sometidos a estrés, lo que podría estar anulando tal mecanismo de protección descrito anteriormente.

El incremento de hasta 26 veces en la expresión de VEGFR-2 en músculo podría asociarse con una adaptación del músculo para hacer frente a la carga tumoral bajo condiciones de estrés psicogénico como en presencia de tumor. Es probable que haya un mayor flujo sanguíneo localmente en estos animales, aunado a un mayor consumo de oxígeno (Joyner & Casey, 2015). Es por ello que la determinación del consumo de oxígeno, niveles de glucosa y lactato sería importante en futuras investigaciones.

9. Conclusiones

1. El protocolo de inducción de estrés crónico por restricción del movimiento no activa la respuesta adaptativa al estrés, reduce la ingesta de alimento, y se acompaña de disminución peso y grasa corporal.
2. El estrés crónico modula la expresión de VEGFR-2 en tumor, tejido adiposo subcutáneo, muscular y cerebral.
3. El estrés crónico no afecta la expresión proteica de VEGFR-2 en tumor

Perspectivas

Nuestros resultados presentan una contribución importante a la literatura del estrés que puede tener una sustancial implicación para futuras investigaciones en el área.

10. Bibliografía

1. Adzic M, Djordjevic J, Djordjevic A, Niciforovic A, Demonacos C, Radojcic M, Krstic-Demonacos M. 2009. Acute or chronic stress induce cell compartment-specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alter its transcriptional activity in Wistar rat brain. *Journal of Endocrinology*. 202(1):87–97.
2. Alitalo K, Tammela T, Petrova T. 2005. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 438(7070):946–953.
3. Antoni MH, Lutgendorf SK, Cole SW, Dhabhar FS, Sephton SE, McDonald PG, Sood AK. 2006. The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. *Nature Reviews. Cancer*. 6(3):240–8.
4. Armaiz-Pena GM. et al. 2013. Src activation by beta-adrenoreceptors is a key switch for tumour metastasis. *Nature communications*. 4:1403
5. Bernard P, Wittwer C. 2002. Real-Time PCR Technology for Cancer Diagnostics. *Clinical Chemistry*. 48:8 1178–1185.
6. Butler JM, Kobayashi H, Rafii S. 2010. Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. *Nature Reviews. Cancer*. 10(2):138–46.
7. Carmeliet P, Jain RK. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473(7347):298–307.
8. Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162(1): 156-9.
9. Cole SW, Nagaraja AS, Lutgendorf SK, Green PA. 2015. Sympathetic nervous system regulation of the tumour microenvironment. *Nature Reviews. Cancer*. 15(9):563–572.
10. Dvorak HF. 2002. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 20(21):4368–4380.

11. Elfving B, Lerche J, Bredahl J. C, Wegener G, Kaastrup H. 2015. Chronic Restraint Stress Increases the Protein Expression of VEGF and its Receptor VEGFR-2 in the Prefrontal Cortex. *Synapse*. 69:190–194.
12. Elias I, Franckhauser S, Ferré T, Vilá L, Tafuro S, Muñoz S, Roca C, Ramos D, Pujol A, Riu E, Ruberte J, Bosch F. 2012. Adipose Tissue Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor Protects Against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*. 61(7):1801-1813.
13. Ellis BJ, Jackson JJ, Boyce WT. 2006. The stress response systems: Universality and adaptive individual differences. *Developmental Review* 26(2):175–212.
14. Gardner D, Shoback D. 2013 *Endocrinología básica y clínica*. 9ª Edición Idioma Español. Editorial MCGRAW HILL.
15. Gomez-Flores R, et al. 2005. Increased survival of tumor-bearing mice by delta opioid SNC. *Anticancer Research*. 25(6):4563-4567.
16. Green-McDonald P, O'Connell M, Lutgendorf SK. 2013. Psychoneuroimmunology and cancer: A decade of discovery, paradigm shifts, and methodological innovations. *Brain, Behavior, and Immunity*, 30(SUPPL.):S1–S9.
17. Grossberg AJ, Scarlett JM, Zhu X, Bowe DD, Batra AK, Braun TP, Marks DL. Arcuate Nucleus Proopiomelanocortin Neurons Mediate the Acute Anorectic Actions of Leukemia Inhibitory Factor via gp130. *Endocrinology*. 2010;151:606–616.
18. Guerreschi M, Araujo L, Maricato J, Takenaka M, Nascimento V, Vivanco B, Reis V, Keller A, Brum P, Basso A. 2013. Beta2-adrenergic receptor signaling in CD4+ Foxp3+ regulatory T cells enhances their suppressive function in a PKA-dependent manner. *European Journal of Immunology*. 43(4):1001-12.
19. Hassan S, Karpova Y, Baiz D, Yancey D, Pullikuth A, Flores A, Kulik G. 2013. Behavioral stress accelerates prostate cancer development in mice. *Journal of Clinical Investigation* 123(2):874–886.
20. Hegde PS, Karanikas V, Evers S. 2016. The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition. *Clinical Cancer Research*. 22(8):1865–1874.

21. Howell K, Kutiyawalla A, Pillai A. 2011. Long-Term Continuous Corticosterone Treatment Decreases VEGF Receptor-2 Expression in Frontal Cortex. *PLoS ONE*. 6: e20198.
22. Hyltander A, Drott C, Körner U, Sandström R & Lundholm K (1991) Elevated energy expenditure in cancer patients with solid tumours. *Eur J Cancer* **27**: 9–15
23. Joels M, Fernandez G, Roozendaal B. 2011. Stress and emotional memory: A matter of timing. *Trends in Cognitive Sciences*. 15(6):280–288.
24. Landen Jr C.N, et al.. 2007. Neuroendocrine modulation of signal transducer and activator of transcription-3 in ovarian cancer. *Cancer Res*. 67:10389–10396.
25. Le CP, Nowell CJ, Kim-Fuchs C, Botteri E, Hiller JG, Ismail H, Sloan EK. 2016. Chronic stress in mice remodels lymph vasculature to promote tumour cell dissemination. *Nature Communications*. 7:10634.
26. Liu Yansheng, Beyer Andreas & Aebersold Ruedi. 2016. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* 165.
27. Lucassen, P. J., Oomen, C. A., Schouten, M., Encinas, J. M., & Fitzsimons, C. P. (2016). Adult Neurogenesis, Chronic Stress and Depression. *Adult Neurogenesis in the Hippocampus: Health, Psychopathology, and Brain Disease*.
28. Lu X, Ji Y, Zhang L, Zhang Y, Zhang S, An Y, Liu P, Zheng Y. 2012. Resistance to Obesity by Repression of VEGF Gene Expression through Induction of Brown-Like Adipocyte Differentiation. *Endocrinology*. 153(7):3123–3132.
29. Mammoto, A., Connor, K. M., Mammoto, T., Yung, C. W., Aderman, C. M., Mostoslavsky, G., ... Donald, E. (2009). *NIH Public Access*, 457(7233), 1103–1108.
30. Meng, Q., Ren, C., Wang, L., Zhao, Y., & Wang, S. (2015). Knockdown of ST6Gal-I inhibits the growth and invasion of osteosarcoma MG-63 cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 72, 172–178.
31. Masuzaki, H., Paterson, J., Shinyama, H., Morton, N.M., Mullins, J.J., Seckl, J.R., Flier, J.S., 2001. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294, 2166–2170.

32. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. 2001. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*. 112:21.
33. Moreno-Sánchez R, Rodríguez Enriquez S, Marín-Hernández A. 2007. Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS journal* 274:1393-1418.
34. Moreno-Smith M, Lu C, Shahzad MM, Pena GN, Allen JK, Stone RL, Mangala LS, Han HD, Kim HS, Farley D, Berestein GL, Cole SW, Lutgendorf SK, Sood AK. 2011. Dopamine blocks stress-mediated ovarian carcinoma growth. *Clinical Cancer Res*. 17:3649–3659.
35. Pacák K, Polkovits M. 2001. Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. *Endocrine Reviews*, 22:502–548.
36. Rafii S, Butler J. M, Ding B.-S. 2016. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature*. 529(7586):316–325.
37. Sarpeshkar V, Bentley D. 2010. Adrenergic- β 2 receptor polymorphism and athletic performance. *Nature. Journal of Human Genetics*. 55:479–485.
38. Schrepf A, Clevenger L, Christensen D, DeGeest K, Bender D, Ahmed A, Lutgendorf S. K. 2013. Cortisol and inflammatory processes in ovarian cancer patients following primary treatment: Relationships with depression, fatigue, and disability. *Brain, Behavior, and Immunity*. 30:S126–S134.
39. Stockmann C, Doedens A, Weidemann A, Zhang N, Takeda N, Greenberg J. I, Johnson R. S. 2008. Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature*. 456:814–818.
40. Sun P, Wei S, Wei X, Wan J, Zhang Y, Quiao M, Wu J. 2016. Anger Emotional Stress Influences VEGF/VEGFR2 and Its Induced PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway. *Neural plasticity* 4129015.
41. Suzuki H, Onishi H, Wada J, Yamasaki A. 2010. VEGFR2 is selectively expressed by FOXP3^{high} CD41 Treg. *Eur. J. Immunol*. 2010. 40: 197–203
42. Szumiel I. 2005. L5178Y sublines: a look back from 40 years. Part 1: General characteristics. *International Journal of Radiation Biology* 81: 339-352.
43. Tamashiro KL, Hegeman MA, Nguyen MM, Melhorn SJ, Ma LY, Woods SC, Sakai RR. 2007a. Dynamic body weight and body composition changes in response to subordination stress. *PhysiolBehav* 91(4):440– 448.

44. Tamashiro, K. L., Sakai, R. R., Shively, C. A., Karatsoreos, I. N., and Reagan, L. P. (2011). Chronic stress, metabolism, and metabolic syndrome. *Stress* 14, 468–474. doi: 10.3109/10253890.2011.606341
45. Thaker PH, et al.. 2006. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nature Med.* 12(8):939-44.
46. Tonini T1, Rossi F, Claudio PP, Storer et al. 1997 Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene.* 22(42):6549-56.
47. Weinberg, Robert Allan. 2014. *The Biology of cancer* 2da edición. Garland Science, New York. EUA.
48. Wu X, Liu B, Ji S, Xu Ch, Du Y, You X, Li B, Le J, Xu H, Duan X, Dong J. 2015. Social defeat stress promotes tumor growth and angiogenesis by upregulating vascular endothelial growth factor/extracellular signal-regulated kinase/matrix metalloproteinase signaling in a mouse model of lung carcinoma. *Molecular medicine reports.* 12:1405-1412.
49. Xu H, Barnes GT, Yang Q. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 2003;112:1821–183.
50. Yam C. S, Hajjar A. M. 2013. Whole Spleen Flow Cytometry Assay. *Bio-protocol* 3(15): e834. Disponible en: <http://www.bio-protocol.org/e834>
51. Yang E. V, Donovan E. Benson D. Glaser R. 2008. VEGF is differentially regulated in multiple myeloma-derived cell lines by norepinephrine. *Brain, Behavioral and Immunology.* 22(3): 318–323.
52. Zhang SD, Leung KL, McCrudden CM, Kwok HF. 2015. The prognostic significance of combining VEGFA, FLT1 and KDR mRNA expressions in brain tumors. *Journal of Cancer.* 6(9):812–818.