

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**PAPEL DEL SISTEMA NERVIOSO ADRENÉRGICO EN EL EFECTO DEL
ESTRÉS CRÓNICO SOBRE LA EXPRESIÓN DE VEGFR-2 EN TUMOR EN EL
MODELO DEL LINFOMA MURINO L5178Y-R**

POR

ALONDRA MARÍA BRAVO ACOSTA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L. MAYO DEL 2024

**PAPEL DEL SISTEMA NERVIOSO ADRENÉRGICO EN EL EFECTO DEL
ESTRÉS CRÓNICO SOBRE LA EXPRESIÓN DE VEGFR-2 EN TUMOR EN EL
MODELO DEL LINFOMA MURINO L5178Y-R**

COMITÉ DE TESIS

DIANA
CABALLERO

Dra. Diana Elia Caballero Hernández
Directora de Tesis

Cristina Rodríguez Padilla

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretaria

Diana Zarate Triviño

Dra. Diana Zarate Triviño
1er. Vocal

Moises A. Franco Molina

Dra. Moises A. Franco Molina
2do. Vocal

Patricia Tamez Guerra

Dra. Patricia Tamez Guerra
3er. Vocal

Katiushka Arévalo Niño

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirectora de Posgrado



DERECHOS DE AUTOR

Toda la información contenida en este trabajo de investigación está protegida. No se permite la reproducción parcial o total de esta obra ni su transmisión en cualquier forma o por cualquier medio sin autorización previa. El uso de este material será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias a:

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindarme una beca económica que me permitió enfocarme en el programa y cumplir con los objetivos.

A PAICYT 2021, clave CN1560-21 y PAICYT 2022, clave 318-CN-2022.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por la infraestructura brindada para la toma de mis cursos y la realización de los trabajos realizados. En especial al M.C. Daniel Eguiarte.

A la Dra. Diana Caballero por su confianza en mi capacidad, su apoyo y paciencia constante desde el día uno y por permitirme realizar este trabajo mientras cumplía con mis compromisos deportivos. Ha sido un placer aprender bajo su tutela.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a Isaías Gutiérrez, por enseñarme y estar siempre presente, su guía y consejos fueron clave para trabajar con confianza en los experimentos y análisis.

Al Dr. Alonso Orozco, el soporte y tiempo invertido de inicio a fin durante el análisis molecular del trabajo permitió que yo pudiera cumplir con los objetivos. Le estoy profundamente agradecida.

A la Dra. Diana Zamora y la técnica Cynthia Padrón del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por permitirme hacer uso de sus instalaciones, su colaboración fue vital para terminar este trabajo.

A mi familia por confiar en mí y darme todo lo necesario para enfocarme en este trabajo.

A Mauro por ser siempre esa fuente de apoyo emocional y escucharme siempre que lo necesité.

LUGAR DE TRABAJO



Este trabajo de investigación se llevó a cabo en la Unidad de Neuroinmunomodulación del laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	8
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
ANTECEDENTES	13
SISTEMA NERVIOSO ADRENÉRGICO	13
ESTRÉS	13
CÁNCER	16
ANGIOGÉNESIS	16
RECEPTOR 2 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIO VASCULAR (VEGFR-2)	19
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
DECLARACIÓN ÉTICA	23
DECLARACIÓN DE BIOSEGURIDAD	23
MODELO MURINO L5178Y-R	23
ANIMALES	24
DISEÑO EXPERIMENTAL	24
PROTOCOLO DE ESTRÉS CRÓNICO	25
ESTRÉS POR RESTRICCIÓN DE MOVIMIENTO	25
TRATAMIENTO CON EL ANTAGONISTA ADRENÉRGICO BETA 1,2 (PROPRANOLOL)	26
EUTANASIA Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	26
INDICADORES MORFOMÉTRICOS	27
1. <i>Peso corporal</i>	27
2. <i>Índice de Masa Corporal (IMC)</i>	27
3. <i>Depósitos de tejido adiposo</i>	28
INDICADORES CONDUCTUALES	28

4. <i>Ingesta de agua y consumo de alimento</i>	28
INDICADORES DE PROGRESIÓN TUMORAL	28
5. <i>Volumen tumoral</i>	28
6. <i>Peso final del tumor</i>	28
CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VEGFR-2 EN TUMOR	29
1. <i>Extracción de ARN, retrotranscripción y síntesis de ADN complementario</i>	29
2. <i>Análisis de la expresión de VEGFR-2 mediante PCR tiempo real.</i>	29
RESULTADOS	31
PESO CORPORAL	31
ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC)	35
CONSUMO DE AGUA E INGESTA DE ALIMENTO	37
CONTENIDO DE TEJIDO ADIPOSEO EN LOS DISTINTOS DEPÓSITOS CORPORALES	41
PORCENTAJE CORPORAL DE MÚSCULO DEL CORAZÓN.	45
VOLUMEN TUMORAL	49
PESO TUMORAL FINAL	52
EXPRESIÓN RELATIVA DE VEGFR-2 EN TEJIDO TUMORAL	54
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	60
LITERATURA CITADA	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Vía molecular de la señalización beta adrenérgica en cáncer	15
Figura 2.	Protocolo de inducción de estrés	25
Figura 3.	Inducción de estrés por restricción de movimiento	26
Figura 4.	Cambios en el peso corporal en animales libres y portadores de linfoma en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico	32
Figura 5.	Cambios en el peso corporal en animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β 1-2 propranolol en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico	33
Figura 6.	Cambios en el peso corporal en animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β 2 L-748,337 en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico	34
Figura 7.	Índice de masa corporal	36
Figura 8.	Ingesta diaria de agua (ml) y cantidad de alimento (g) consumida diariamente por animales libres y portadores de linfoma en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico	38
Figura 9.	Ingesta diaria de agua (ml) y cantidad de alimento (g) consumida diariamente por animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β 1-2 propranolol en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico	39
Figura 10.	Ingesta diaria de agua (ml) y cantidad de alimento (g) consumida diariamente por animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β 2 L-748,337 en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico	40
Figura 11.	Porcentaje de grasa corporal de los depósitos interescapular, inguinal y visceral de animales libres y portadores de linfoma en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico	42

Figura 12.	Porcentaje de grasa corporal de los depósitos interescapular, inguinal y visceral de animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β 1-2 propranolol en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico	43
Figura 13.	Porcentaje de grasa corporal de los depósitos interescapular, inguinal y visceral de animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β 2 L-748,337 en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico	44
Figura 14.	Peso del músculo del corazón de animales libres y portadores de linfoma en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico	46
Figura 15.	Porcentaje del músculo del corazón de animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β 1-2 propranolol en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico	47
Figura 16.	Porcentaje del músculo del corazón de animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β 2 L-748,337 en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico	48
Figura 17.	Evolución del volumen tumoral de animales portadores de linfoma en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico, animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β 1-2 propranolol en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico	50
Figura 18.	Evolución del volumen tumoral de animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β 2 L-748,337 en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico	51
Figura 19.	Peso tumoral final de los animales portadores de tumor, animales portadores de tumor bajo estrés crónico y animales portadores de tumor tratados con propranolol con y sin estrés	52
Figura 20.	Peso tumoral final de los animales portadores de tumor, animales portadores de tumor bajo estrés crónico y animales portadores de tumor tratados con L-748,337 con y sin estrés	53

Figura 21. Expresión relativa del ARN mensajero de VEGFR-2 en el tejido tumoral de animales portadores de tumor, animales portadores de tumor bajo estrés, animales portadores de tumor bajo estrés tratados con propranolol y animales portadores de tumor bajo estrés tratados con L-748,337

54

RESUMEN

En estudios previos sobre los efectos del estrés crónico en la progresión del cáncer, se han observado cambios en la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR-2) en tejido tumoral, adiposo, muscular y cerebral. VEGFR-2 es el receptor del principal factor angiogénico, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En cáncer, la sobreexpresión de VEGFR-2 promueve tumorigénesis y metástasis por lo que se le considera un blanco molecular con potencial terapéutico.

En este trabajo se estudió el efecto del estrés crónico sobre la expresión de VEGFR-2 en tumor y el macroambiente tumoral, también evaluamos el papel del sistema nervioso adrenérgico en los efectos del estrés crónico en ratones hembra BALB/c portadoras del linfoma L5178Y-R. Para esto se utilizó un protocolo de estrés crónico por restricción de movimiento para evaluar el efecto del estrés, y los antagonistas adrenérgicos propranolol y L,748-33, que bloquean los receptores beta 1,2 y beta 3, respectivamente, para determinar la participación del sistema nervioso adrenérgico.

En tejido tumoral de animales bajo estrés crónico se observó un incremento en la expresión de VEGFR-2 de 1.82 veces. Cuando bloqueamos la vía adrenérgica beta 1,2 en animales portadores de tumor sometidos a estrés crónico, observamos que la expresión de VEGFR-2 en tumor se incrementó 22.33 veces con respecto al control y con el bloqueo de la vía adrenérgica beta 3 la expresión de VEGFR-2 incrementó 4.62 veces. Además de la expresión de VEGFR-2, analizamos indicadores morfométricos, conductuales y de progresión tumoral. Cuando analizamos el efecto del estrés crónico en animales libres de tumor encontramos que se reducen los depósitos grasos y el corazón aumenta su tamaño. En cuanto a la influencia de la carga tumoral encontramos incremento en el peso corporal, atribuible al aumento de la masa tumoral, y una reducción de los depósitos grasos. Mientras que cuando analizamos el efecto del estrés crónico en animales con tumor encontramos un menor peso corporal y una mayor reducción de los depósitos grasos.

INTRODUCCIÓN

El papel del estrés crónico en el inicio y desarrollo de enfermedades, incluido el cáncer, está bien establecido, se sabe que el estrés crónico y las hormonas del estrés son capaces de promover la aparición y desarrollo de cáncer al inducir daño al ADN, estimular la proliferación de células tumorales, incrementar la expresión de genes relacionados con la migración e invasión, regulando el microambiente y también promoviendo la angiogénesis. Sin embargo, aún se desconoce la totalidad de los blancos del estrés a nivel molecular, cuya identificación contribuiría a una mayor comprensión de los mecanismos del estrés, así como la identificación de blancos terapéuticos.

En un estudio previo de nuestro grupo enfocado al efecto del estrés crónico en la progresión del cáncer, se encontraron alteraciones específicas de tejido en la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR-2), el cual es el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) el principal factor angiogénico. VEGFR-2 ha sido identificado en cáncer como un blanco de intervención terapéutica y en la actualidad se realizan esfuerzos en identificar inhibidores de este receptor.

En este estudio nos propusimos estudiar el papel de la vía adrenérgica en la modulación por estrés crónico de la expresión de VEGFR-2 en tejido adiposo y tumor. Se utilizó un modelo de tumor trasplantable en ratones BALB/c, el linfoma L5178Y-R, se administraron antagonistas no-selectivo de receptores beta 1,2 y 3 para evaluar la participación de la vía adrenérgica. Además, se evaluaron indicadores morfométricos, conductuales, de progresión tumoral y de remodelado adiposo con el objetivo de analizar la relación entre la modulación de VEGFR-2 por estrés y la progresión tumoral.

El estudio del papel del sistema nervioso simpático en la regulación por estrés de la expresión de VEGFR-2 en tumor y tejido adiposo nos permitirá describir de una manera más detallada el papel que desempeña este receptor en la angiogénesis en tumor y tejido adiposo en condiciones patológicas. También podría aportar información sobre nuevos blancos terapéuticos que podrían potencialmente retardar o evitar los efectos del estrés y la angiogénesis.

ANTECEDENTES

Sistema nervioso adrenérgico

El sistema nervioso autónomo tiene como función obtener información del ambiente, evaluar su importancia y generar respuestas con el de mantener la homeostasis del organismo de un individuo. El sistema nervioso puede dividirse en sistema nervioso central constituido por el encéfalo y la médula espinal, y el sistema nervioso periférico, formado por nervios que se ramifican fuera del sistema nervioso central. Funcionalmente, el sistema nervioso periférico se subdivide en sistema nervioso somático y sistema nervioso autónomo. El sistema nervioso autónomo posee tres divisiones importantes: simpático o adrenérgico, parasimpático y entérico (Kandel *et al.* 2001) mediante los cuales regula procesos como la respiración, la circulación, la digestión, el metabolismo, la secreción glandular, la temperatura corporal, la reproducción, entre otras.

De manera paralela a la activación del sistema nervioso autónomo, responde el sistema adrenomedular (SAM) y el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA). El sistema nervioso simpático (SNS) está constituido por neuronas preganglionares ubicadas en el encéfalo y médula espinal, las cuales sinaptan con neuronas posganglionares ubicadas en los ganglios simpáticos transmitiendo a su vez las señales a las fibras nerviosas que inervan órganos diana (Navarro, 2002).

Numerosos estudios han demostrado el papel de los nervios en la iniciación, crecimiento y metástasis del cáncer. La eliminación de innervación conduce a una inhibición de la iniciación y progresión tumoral.

Estrés

El estrés se ha definido como un estado de alteración homeostática que genera en el organismo del individuo una respuesta para mantener esta homeostasis (Rodríguez *et al.* 2013). Cuando este estado homeostático se ve amenazado, la división simpática del sistema nervioso autónomo responde mediante una serie de reacciones coordinadas.

Existen dos tipos principales de estrés: agudo y crónico. La diferencia entre el estrés agudo y el crónico involucra la periodicidad con la que el organismo se somete al agente estresor. El estrés agudo se caracteriza por la inducción de un estímulo en una sola ocasión; mientras que, el estrés crónico se caracterizara por la inducción repetida en el tiempo independientemente si el periodo es corto o prolongado. Durante la respuesta al estrés, se activan dos circuitos en el SNC. El eje SAM prepara al individuo para afrontar la situación adversa, liberando concentraciones micromolares de epinefrina y norepinefrina (catecolaminas) de la medula suprarrenal al torrente sanguíneo. Esta respuesta rápida permite al individuo hacer frente a situaciones agudas. La respuesta generada ante un agente estresor agudo puede elevar los niveles de epinefrina y norepinefrina más de 10 veces en segundos. Por su parte el eje HPA se activará frente a situaciones de estrés agudo y crónico, mediando la adaptación. Esta activación provoca la liberación de corticosterona (corticosteroides) de la corteza suprarrenal (Cigolani y Houssay 2000). Estas hormonas se unen y activan los receptores adrenérgicos ubicados en las células que conforman órganos y sistemas e inhiben el funcionamiento de los sistemas con mayor gasto energético (digestivo, el crecimiento e inmunológico) colocando al individuo en un estado de defensa, manteniendo la integridad y garantizando su supervivencia.

Los receptores adrenérgicos pertenecen a una súper familia de receptores acoplados a proteínas G, los cuales se subdividen en α_1 , α_2 , β_1 , β_2 y β_3 . Se ha identificado que los receptores adrenérgicos muestran patrones de distribución. Los receptores adrenérgicos beta 1 se localizan principalmente en tejido cardiaco, cerebro, páncreas y tiroides; los receptores adrenérgicos beta 2 se localizan principalmente en pulmón, células inmunitarias y epiteliales bronquiales, páncreas, estómago y tiroides y los receptores adrenérgicos beta 3 en tejido adiposo pardo, colon, riñón, ganglios linfáticos, páncreas, piel y estómago (Cole y Sood 2012; Rains *et al.* 2017). Sin embargo, también se ha identificado la expresión de estos receptores en tumores cancerígenos.

Estudios han documentado que el estrés es capaz de promover la progresión de tumores. Niveles elevados de catecolaminas y glucocorticoides, resultado de estrés prolongado, participan en la iniciación y desarrollo del cáncer, incluyendo cáncer de próstata, mama, gástrico, pulmón, piel, entre otros (Dai *et al.* 2020).

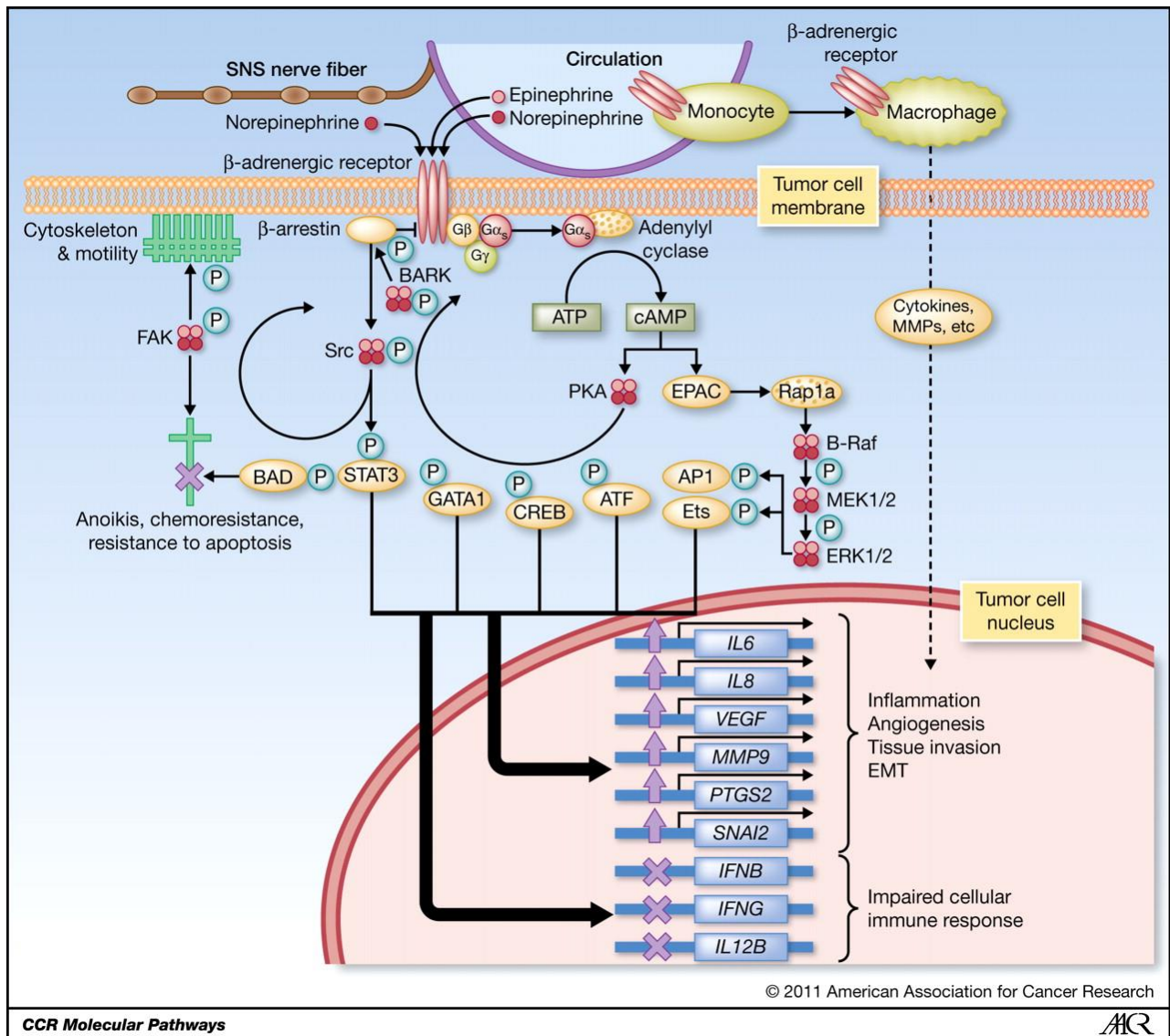


Figura 1. Vía molecular de la señalización beta adrenérgica en cáncer.

Ante una amenaza al estado homeostático, el sistema nervioso simpático libera epinefrina y norepinefrina a través de la sangre circulante y las fibras nerviosas locales del microambiente tumoral respectivamente. Una vez liberadas, pueden unirse a receptores beta adrenérgicos activando a la adenilciclase mediada por proteínas Gas y posteriormente la conversión de ATP en cAMP. El cAMP activa principalmente dos sistemas principales: el cAMP y EPAC (proteína de intercambio de nucleótidos de guanina activada por la adenilciclase). En la primera vía efectora, el cAMP activa a PKA y este fosforila múltiples proteínas, incluyendo factores de transcripción como ATF, CREB, GATA1 y BARK, este último factor inhibe la señalización beta adrenérgica y activa a la cinasa Src

activando al factor de transcripción STAT3 y cinasas como FAK. La activación de la cinasa FAK modula la motilidad y el tráfico celular mediante una dinámica citoesquelética. El resto de los factores inducirá la expresión de genes relacionados con angiogénesis, inflamación, invasión tisular, transición epitelial-mesenquimatoso, metástasis mientras que reprimirá la expresión de genes relacionados con respuestas inmunes antitumorales. En el segundo sistema efector, EPAC activa a Rap1A y efectores posteriores como B-Raf, MEK 1/2 y ERK 1/2 (Figura tomada de Cole y Sood 2012).

Cáncer

El cáncer es un gran número de enfermedades complejas, hasta cien, que se comportan de manera diferente según los tipos celulares en lo que se origina. El proceso por el cual se produce el cáncer es llamado carcinogénesis y se caracteriza por: 1) autoinsuficiencia en señales de crecimiento, 2) insensibilidad a señales anti-crecimiento, 3) apoptosis, 4) potencial replicativo sin límite, 5) angiogénesis sostenida, 6) metástasis e invasión de tejidos (Hanahan y Weinberg 2000). Cuando estas células sin patrón estructural se forman, se genera una masa de tejido conocido como tumor. El tumor es la manifestación clínica más frecuente.

Una de las principales características de los tumores malignos es su capacidad de formar nuevos vasos sanguíneos mediante un proceso llamado angiogénesis. Este proceso es mediado por la secreción de ciertas sustancias proangiogénicas, como el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF). Este factor es uno de los principales responsables de la formación de vasos sanguíneos indispensables para la nutrición de las células tumorales y la metástasis (Garza y Juárez 2013).

Angiogénesis

El proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de una vasculatura preexistente es fundamental para una serie de condiciones fisiológicas. Es un proceso complejo que involucra interacciones entre células endoteliales, factores solubles y componentes de la matriz extracelular (Shibuya 2014). Cuando una célula endotelial recibe señales angiogénicas, se activan y liberan proteasas que conducen a la degradación de la membrana basal, la migración de células endoteliales al lugar donde se desarrollara el nuevo vaso, la proliferación de células endoteliales, la adhesión

célula-célula, la generación de una nueva membrana basal con el reclutamiento de pericitos, entre otros (Abhinand *et al.* 2016).

La angiogénesis además de participar en procesos fisiológicos importantes, también se presenta en patologías como el cáncer. Durante el desarrollo de la enfermedad, las células tumorales requieren de un aporte sanguíneo que le brinde oxígeno, nutrientes y moléculas implicadas en la regulación positiva como el factor ácido de crecimiento de fibroblastos (α FGF), el FGF básico, el factor transformante alfa (TGF- α) y el TGF- β , el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la angiogenina, IL-8, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la leptina, las prostaglandinas e incluso los lípidos y principalmente factores de crecimiento. Reportes informan que el VEGF es un factor crucial en la neovascularización (Torres *et al.* 2017).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un potente factor angiogénico capaz de inducir proliferación, migración, supervivencia y permeabilidad de las células endoteliales. Es considerado como un regulador maestro de la angiogénesis durante el crecimiento y desarrollo, así como en proceso de inflamación crónica, cicatrización y patologías como la diabetes y el cáncer (Nieves *et al.* 2009). Esta familia de proteínas incluye a VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y el factor de crecimiento placentario (PIGF) (Rosales y Guzmán 2012). Este factor es capaz de ejercer su función a través de receptores tirosin cinasa ubicados en la membrana celular.

El VEGF-A se expresa en una variedad de tumores y su sobreexpresión se ha asociado con un mal pronóstico y muerte en pacientes con cáncer. En modelos *in vitro* e *in vivo*, se ha informado como un potente inductor angiogénico, capaz de prevenir la apoptosis induciendo la expresión de proteínas antiapoptóticas Bcl-1 y A1 en células endoteliales (Sa-Nguanraksa y O-Charoenrat 2012). En linfomas, cáncer de colon, cérvix y mama, VEGF-A esta sobreexpresado y aumenta durante la progresión de la enfermedad (Dvorak, 2002).

El VEGF-A exhibe una actividad proangiogénica en tejido adiposo. Schlich y colaboradores (2013) reportaron que el VEGF secretado por el tejido adiposo estimula la proliferación de células

vasculares del musculo liso y que cuando estas eran cultivadas en un medio acondicionado con adipocitos se incrementaba la expresión de VEGFR-1 y VEGFR-2. Así mismo, Elías y colaboradores (2012) informaron que la sobreexpresión de VEGF en tejido adiposo blanco y marrón condujo a un aumento del número y tamaño de vasos sanguíneos, un aumento de la sensibilidad a la insulina y una mejor tolerancia a la glucosa.

Se han reportado alteraciones específicas de tejido de VEGF y sus receptores debido al estrés crónico. Sun y colaboradores (2016) informaron una disminución en la expresión de VEGFR-2 en el hipocampo de ratas Wistar sometidas a estrés crónico por aislamiento social, asociado a alteraciones en elementos clave de la vía de señalización PI3K, AKT, mTOR, reduciendo la neurogénesis de VEGF en el hipocampo. Por otra parte, Elfving y colaboradores (2015) informaron un incremento en la expresión de VEGFR-2 y en los niveles proteicos de VEGF en la corteza prefrontal de ratas Wistar sometidos a estrés crónico. En el hipocampo no se mostraron cambios significativos.

La estimulación por catecolaminas activa la vía de señalización protein-cinasa A conduciendo a un aumento en la expresión del gen VEGF, resultando en un incremento en la vascularización del tumor y un crecimiento más agresivo. Reportes en líneas celulares carentes de receptores adrenérgicos beta, uso de agonistas beta farmacológicos y el silenciamiento de estos receptores con ARNs pequeños informan que el receptor adrenérgico beta 2 desempeña un papel funcionalmente significativo en la angiogénesis de las células tumorales mediada por estrés. El aumento en la angiogénesis se produjo en respuesta al aumento en la producción de VEGF inducida por catecolaminas por las células tumorales. Zahalka y colaboradores (2017) mediante ratones deficientes genéticamente de receptores adrenérgicos β 2-3 demostraron que los nervios adrenérgicos regulan la angiogénesis en un estadio temprano del crecimiento tumoral al mostrar una reducción significativa en el crecimiento de tumores de próstata en comparación con ratones control. Además, demostraron que el receptor adrenérgico- β 2 de células endoteliales controla el “switch angiogénico” característico entre una preneoplásica intraepitelial de bajo grado y una neoplasia intraepitelial prostática de alto grado. El uso de beta-bloqueadores, como el propranolol, han logrado bloquear los efectos inducidos por el estrés sobre la carga tumoral y la invasividad (Thaker *et al.* 2007).

Receptor 2 del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGFR-2)

El VEGFR-2 (*también llamado Flk-1 o KDR*) es uno de los dos receptores específicos para VEGF y se expresa en la mayoría de las células endoteliales. VEGFR-2 es un receptor que posee siete dominios extracelulares de unión a Ig, una región transmembranal y un dominio citoplasmático tirosin cinasa. La activación de este receptor es inducida por la unión de VEGF-A, VEGF-C y VEGF-D. Una vez unido el ligando, el receptor se heterodimeriza produciéndose la autofosforilación de residuos de tirosina ubicados en la región citoplasmática. Una vez fosforilado, el receptor inicia cascadas de señalización río abajo favorables para la angiogénesis, incluyendo MAPK, PI3-K, PKC, AKT y PLC (Abhinand *et al.* 2016; Nieves *et al.* 2009)

La estructura y función del receptor humano es idéntica al de humano, pero el de ratón carece de dos residuos en el dominio intracelular (Koch *et al.* 2011). La capacidad de autofosforilación de este receptor es diez veces mayor que la del VEGFR-1, por tal se considera que es el mayor mediador de los efectos angiogénicos (Rosales y Guzmán, 2012). Se sabe que VEGFR-2 además de distribuirse en células endoteliales vasculares, también se encuentra en células endoteliales linfáticas, células precursoras embrionarias, células T reguladoras caracterizadas por su efecto supresor de respuestas inmunes.

La desregulación del VEGF/VEGFR-2 conduce directamente a condiciones patológicas, por ejemplo: inflamación, cánceres, enfermedades oftálmicas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurológicas. Informes contundentes reportan que la deficiencia o sobreexpresión de este receptor resulta en defectos en el desarrollo de células hematopoyéticas y endoteliales. Romero Beltrán (2019) reportó un aumento en la expresión de VEGFR-2 en tejido tumoral de ratones sometidos a estrés por restricción de movimiento, un aumento de expresión en tejido muscular de ratones con tumor, un aumento de expresión en cerebro de ratones sin tumor y una disminución en tejido adiposo. Marchand y colaboradores (2002) informaron una expresión significativamente más alta de VEGF y VEGFR-2 en células tumorales y células endoteliales alrededor del tumor en comparación con tejidos normales, indicando que la inhibición de la angiogénesis tumoral mediante el bloqueo de la vía VEGF/VEGFR-2 podría ser una potencial estrategia anti-cáncer.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo. En México, cada año se estiman más de 195,599 casos, tan solo en 2020 se registraron más de 139,459 casos y se reportaron 90, 222 muertes (OMS, 2021). El cáncer, objeto de nuestro estudio, es una enfermedad multifactorial susceptible de modulación por el estrés, agudo y crónico, encuestas han demostrado que aproximadamente un millón de nuevos casos de cáncer ocurren cada año entre los jóvenes de 20 a 39 años, y se han atribuido principalmente al estrés. El estrés ejerce sus efectos a través de dos vías, la simpática o adrenérgica, y la hipotalámico-pituitaria-adrenal (HPA), ambas son mediadoras de los efectos promotores del estrés sobre el cáncer. La vía simpática es de especial interés, ya que también modula el metabolismo y la angiogénesis del tejido adiposo, el llamado “switch angio-metabólico” que contribuye en la progresión del cáncer podría confluir en VEGFR-2, investigar estas interacciones a nivel molecular es de interés para entender los procesos patológicos iniciados y promovidos por el estrés, también tiene potencial para la identificación de blancos terapéuticos con el objetivo de proponer terapias antitumorales, además de sustentar racionalmente la importancia del manejo del estrés en pacientes de esta enfermedad.

HIPÓTESIS

El efecto del estrés sobre la expresión de VEGFR-2 en tejido tumoral en el modelo del linfoma murino L5178Y-R es mediado por el sistema nervioso adrenérgico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la participación del sistema nervioso adrenérgico como mediador del efecto del estrés crónico sobre la expresión de VEGFR-2 en tejido tumoral en el modelo del linfoma murino L5178Y-R.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del estrés crónico sobre la expresión de VEGFR-2 en tumor e indicadores de progresión tumoral en el modelo de linfoma murino L5178Y-R.
2. Determinar el papel de la señalización adrenérgica beta-1,2 sobre la expresión de VEGFR-2 en tumores de individuos sujetos a estrés crónico.
3. Determinar el papel de la señalización adrenérgica beta-3 sobre la expresión de VEGFR-2 en tumores de individuos sujetos a estrés crónico.

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-2021-020. 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

Durante este proyecto se utilizó un modelo animal y una línea celular murina. Para el trabajo con animales, ratones de la cepa BALB/c, se siguió la normativa mencionada anteriormente y el trabajo con la línea celular L5178Y-R se realizó en un laboratorio de nivel 2 de seguridad biológica, ya que no representa riesgo para humanos.

Todos los procedimientos realizados a lo largo de este estudio se llevaron a cabo en un laboratorio de seguridad biológica 2. Se llevaron a cabo los entrenamientos apropiados en procedimientos de laboratorio de nivel 2 y en técnicas de manejo y cuidado animal.

Modelo murino L5178Y-R

Para este estudio se utilizó el linfoma murino L5178Y-R como modelo de cáncer *in vivo*. De origen químico, las células del linfoma murino L5178Y-R se mantienen mediante cultivo *in vitro* en medio RMPI-1640 suplementado con suero fetal bovino, o mediante trasplante intraperitoneal en ratones que posean el haplotipo h-2D/d.

Para inducir tumores sólidos en el ratón BALB/c, se inyectaron células tumorales L5178Y-R por vía subcutánea en la extremidad inferior derecha de cada animal. Durante la progresión tumoral se monitoreo la condición corporal de los animales y se utilizaron criterios de punto terminal para modelos de tumor, con el objetivo de minimizar el sufrimiento de los animales experimentales (Workman, 2010).

Animales

Para este estudio se utilizaron ratones de la cepa BALB/c, machos 10-12 semanas de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Se alojaron en el bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la FCB, donde se mantuvieron en observación dos semanas antes de comenzar los experimentos. Los animales fueron alojados en un rack ventilado, en jaulas microventiladas. Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a agua y alimento estándar para roedores. La temperatura ambiental se mantuvo entre 22 y 26 °C, la humedad relativa entre 40-45%. La iluminación de la habitación se mantenía en ciclos de 12 h de luz y 12 de oscuridad, entre 6 A.M. - 6 P.M.

Diseño experimental

Para este estudio se utilizaron 40 ratones hembra divididos en 8 grupos. Cada grupo constó de 5 animales como se muestra en la Tabla 1.

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

Grupo	Tumor	Estrés	Propranolol	L-748,337	Control y tratamientos
1	+	-	-	-	Efecto de la carga tumoral sobre el contenido adiposo
2	+	+	-	-	Efecto del estrés sobre la expresión de VEGFR-2 en tumor.
3	-	-	-	-	Control para determinar efectos de carga tumoral y/o estrés.
4	-	+	-	-	Efecto del estrés sobre el contenido adiposo
5	+	-	+	-	Efecto del estrés inducido por la carga tumoral a través de los receptores adrenérgicos $\beta_{1,2}$.

6	+	+	+	-	Participación de la vía adrenérgica $\beta_{1,2}$ en el efecto del estrés sobre VEGFR-2 en tejido tumoral.
7	+	-	-	+	Efecto del estrés inducido por la carga tumoral a través de los receptores adrenérgicos β_3 .
8	+	+	-	+	Participación de la vía adrenérgica β_3 en el efecto del estrés crónico sobre VEGFR-2 en tejido tumoral.

Protocolo de estrés crónico

Existen distintos paradigmas que han sido utilizados con la finalidad de inducir estrés crónico en animales de experimentación. En este estudio se utilizó un paradigma de estrés por restricción de movimiento con duración de 2 h diarias durante 10 d.

Estrés por restricción de movimiento

Cada ratón se colocó en un tubo cónico de 50 ml con adecuada ventilación y se mantenían en estas condiciones durante 2 h diarias. Durante las sesiones de estrés los animales control (reposo) permanecían en sus jaulas sin que se perturbara su ambiente.

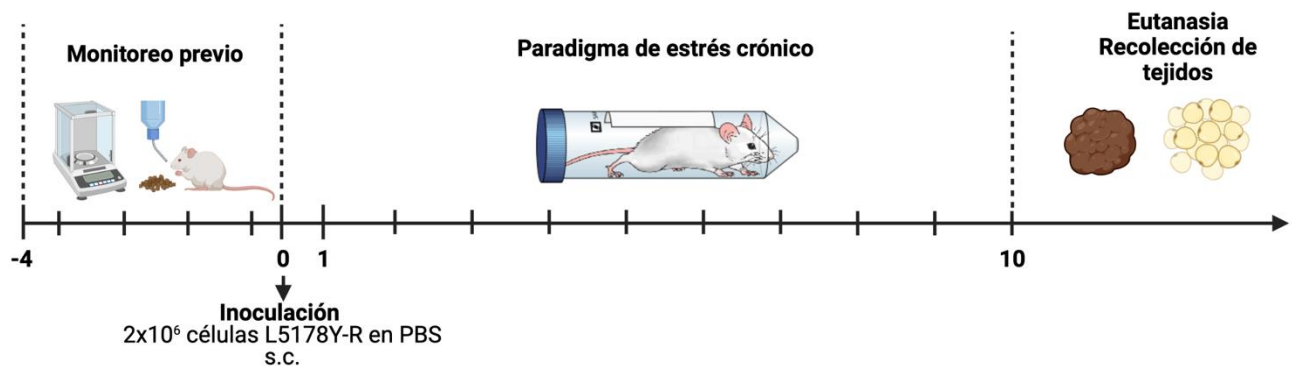


Figura 2. Protocolo de inducción de estrés



Figura 3. Inducción de estrés por restricción de movimiento

Tratamiento con el antagonista adrenérgico beta 1,2 (Propranolol)

Para bloquear la vía adrenérgica beta 1,2, se administró propranolol (Sigma-Aldrich, San Luis MO, USA), un antagonista no selectivo de los receptores adrenérgicos beta1-2, a los animales experimentales durante la inducción de estrés. El propranolol 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 la eutanasia de los animales.

Tratamiento con antagonista adrenérgico beta-3 (L-748,337)

El antagonismo de receptores adrenérgicos beta-3 se realizó usando L-748,337 (Tocris Bioscience Bristol, UK), el cual se administró a una dosis de 100 µg/kg en agua inyectable por vía intraperitoneal, cada 24 h, por un periodo comprendido desde el trasplante hasta la eutanasia de los animales.

Eutanasia y recolección de muestras

Al finalizar la última sesión del protocolo de estrés crónico, los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal con una mezcla de los agentes anestésicos zoletil™ 10 mg/kg (Virbac, Carros, France) y xilacina 100 mg/kg, se recolectó sangre por punción cardiaca terminal., y posteriormente se aseguró la eutanasia de los animales por dislocación cervical.

La sangre se recolectó en microtubos (Biologix, Jinan, Shandong, China) de 1.5 mL y se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min, al finalizar se colectó el plasma que se encontraba en la fase superior del producto, se realizaron alícuotas y se almacenaron a una temperatura de -80°C. Se colectó tumor, tejido muscular gastrocnemio, tejido adiposo inguinal, visceral e interescapular (Tabla 2). Los tejidos adiposos interescapular e inguinal se cortaron en fragmentos, se colocaron en formaldehído al 10% y se guardaron a 4 °C por al menos 72 h, al cabo de las cuales los tejidos se transfirieron a etanol al 70% por 48 h.

Tabla 2. Tejidos extraídos y condiciones de almacenamiento

Órgano	Almacenamiento
Tumor, tejido muscular gastrocnemio, tejido adiposo inguinal y visceral	-80°C
Tejido adiposo interescapular Tejido adiposo inguinal	Formaldehido 4%

Indicadores morfométricos

1. Peso corporal

Para determinar cambios en el peso corporal, los ratones fueron pesados diariamente 4 d antes de iniciar el experimento y durante el experimento utilizando una balanza digital, a la misma hora cada día.

2. Índice de Masa Corporal (IMC)

Al final del protocolo de estrés crónico se calculó el índice de masa corporal (IMC) de los animales experimentales utilizando una fórmula que requiere de la distancia ano-nasal y el peso corporal (Friedman *et al.* 1991). El cálculo se realizó con los datos del último día del protocolo de estrés.

$$\text{IMC} = \text{peso} \div \text{longitud ano-nasal}^2 \text{ (unidades } \frac{\text{g}}{\text{cm}^2}\text{)}$$

3. Depósitos de tejido adiposo

Para evaluar cambios en los depósitos de tejido adiposo de los animales, se recolectaron los depósitos de grasa interescapular, inguinal y visceral de los ratones y se pesaron en una balanza analítica. Posteriormente, se calculó el porcentaje respecto al peso total de cada animal. Para esto, el peso obtenido para el tejido adiposo respectivo se multiplicó por 100 y se dividió entre el peso total del animal.

Indicadores conductuales

4. Ingesta de agua y consumo de alimento

Se determinó la ingesta de agua y el consumo de alimento por jaula, diariamente a la misma hora, durante el periodo que comprendió los días de monitoreo hasta el sacrificio de los ratones. El agua de cada bebedero se transfirió a una probeta graduada de 100 ml, el volumen obtenido se restó al volumen restante del día anterior para calcular el volumen de agua consumido en las últimas 24 h. De la misma manera, diariamente, a una hora definida, se pesó el alimento restante en la canasta de cada jaula, la cantidad en gramos obtenida se restó a la cantidad restante del día anterior, para determinar la cantidad de alimento consumido.

Indicadores de progresión tumoral

5. Volumen tumoral

Durante el experimento se tomaron medidas de largo y ancho del tumor diariamente, utilizando un vernier digital (Fisher Scientific). La toma de medidas se realizó por la misma persona para minimizar variación en los datos. El volumen tumoral (VT) se calculó utilizando la siguiente formula (Barbieri *et al.* 2015):

$$VT = \text{altura} \left(\frac{L \cdot A^2}{2} \right)$$

6. Peso final del tumor

Cada tumor extraído se pesó en balanza analítica y el valor se expresó en miligramos.

Cuantificación de la expresión de VEGFR-2 en tumor

1. Extracción de ARN, retrotranscripción y síntesis de ADN complementario

Se colocaron 30-50g de tejido tumoral en viales que contenían 1 ml del reactivo TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) y se homogenizaron con pistilos estériles. Las muestras se incubaron 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 0.2 ml de cloroformo a cada tubo y se agitaron durante 15 s, se incubaron de 2-3 min a temperatura ambiente para después centrifugar a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Al final de la incubación se extrajo la fase acuosa y se añadieron 0.5 ml de isopropanol, las muestras se incubaron por 10 min en frío, se descartó el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol al 70% a cada vial. A continuación, se descartó el sobrenadante y se secó el pellet colocando los tubos boca abajo, sobre papel. Inmediatamente después, el pellet se resuspendió con 20ul de agua libre de nucleasas, las muestras se incubaron a 56 °C durante 15 min en un Thermomixer de Eppendorf (Edison, New Jersey, United States).

El ARN se cuantificó en un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Para la retrotranscripción de ARN a ADNc, se utilizó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de Applied Biosystems. Cada reacción tuvo un volumen final de 20ul, que consistió en 10ul con un contenido de 2ul de ARN de cada una de las muestras, 2ul de buffer RT 10x, 0.8ul de dNTP Mix 25x (100 mM), 2ul de RT *Random Primers* 10x, 1ul de *MultiScribe Reverse Transcriptase* y 4.2ul de agua libre de nucleasas. Las condiciones utilizadas para la reacción fueron las siguientes: 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min, 85 °C por 5 min y 4 °C ∞. Al finalizar la retrotranscripción el ADNc se almacenó a -20 °C para su análisis posterior.

2. Análisis de la expresión de VEGFR-2 mediante PCR tiempo real.

La expresión del gen *flk* de VEGFR-2 de las muestras se cuantificó mediante PCR tiempo real, para lo que se utilizó un equipo 7500 de Applied Biosystems, los reactivos y sondas utilizados fueron adquiridos de la misma marca. Para la reacción de qPCR se utilizó el MasterMix con las sondas TaqMan validadas para el gen *Kdr* para ratón (No. de catálogo

4453320). Como control endógeno se utilizó el gen para la Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), con número de catálogo 4453320.

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

Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de Kolmogórov-Smirnov y Shapiro-Wilk para determinar la distribución de los datos, en caso de presentar una distribución normal, se realizó la prueba paramétrica de T Student; en caso de presentar una distribución no normal se realizó la prueba no paramétrica Mann-Whitney. Para determinar la significancia de la diferencia entre muestras se consideraron valores de p mayor a 0.05. Así mismo se realizaron análisis de varianzas de una vía (ANOVA). Los análisis se realizaron usando el paquete de datos Graphpad Prism 9.

RESULTADOS

Peso corporal

La determinación del peso corporal de los animales se realizó de manera diaria durante el protocolo previo al tratamiento correspondiente utilizando una balanza analítica. El peso corporal de los ratones fue calculado en relación con su peso inicial, siendo el día 0 su 100%, esto con la finalidad de disminuir el error.

Los ratones control libres de tumor y no estresados, el valor referencia para las diferentes condiciones evaluadas, finalizaron el experimento con una media de peso corporal de 102.26% con respecto al inicio del experimento, mientras que los ratones libres de tumor estresados finalizaron con una media de peso corporal de 100.17% ($p=0.2277$).

Debido a la presencia de tumor en los ratones, independientemente si fueron sometidos a estrés crónico o no, la media del peso corporal aumentó de manera significativa. Los ratones con tumor finalizaron el experimento con una media de 117.81% ($p=0.0003$), mientras que los ratones con tumor que fueron estresados finalizaron con una media de 108.68% ($p=0.0030$) tal como se observa en la Figura 4.

El bloqueo de los receptores beta 1-2 con propranolol afectó de manera significativa la media de peso corporal de los ratones con tumor sometidos a estrés crónico, finalizando el experimento con una media de 106.61% ($p=0.0066$) tal como se observa en la Figura 5, mientras que el tratamiento con el beta bloqueador 3 L-748,337 no afectó de manera significativa la media del peso corporal de los ratones con tumor sometidos a estrés crónico, finalizando el experimento con una media de peso corporal de 110.70% ($p=0.2735$) en comparación con los ratones con tumor no estresados tal como se observa en la Figura 6.

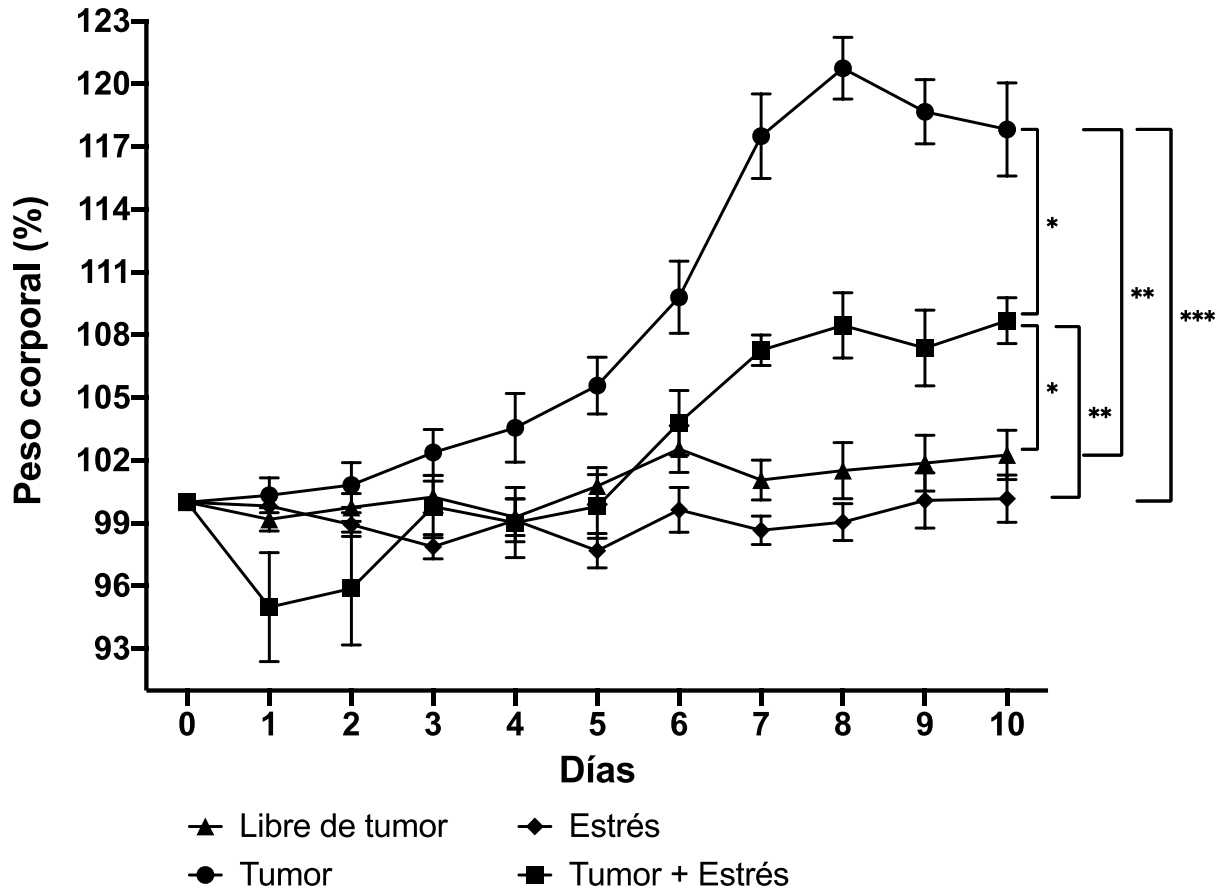


Figura 4. Cambios en el peso corporal en animales libres y portadores de linfoma en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar y se consideran como significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*).

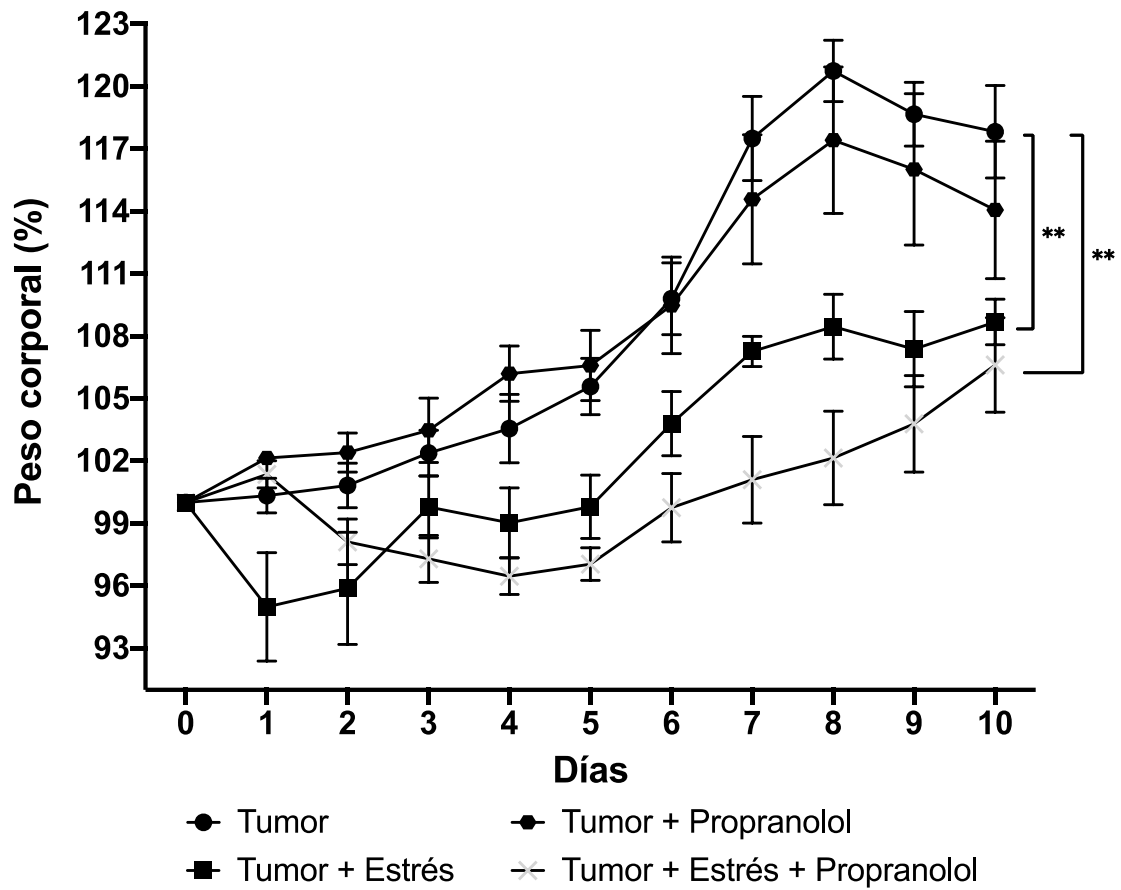


Figura 5. Cambios en el peso corporal en animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β 1-2 propranolol en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar y se consideran como significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*).

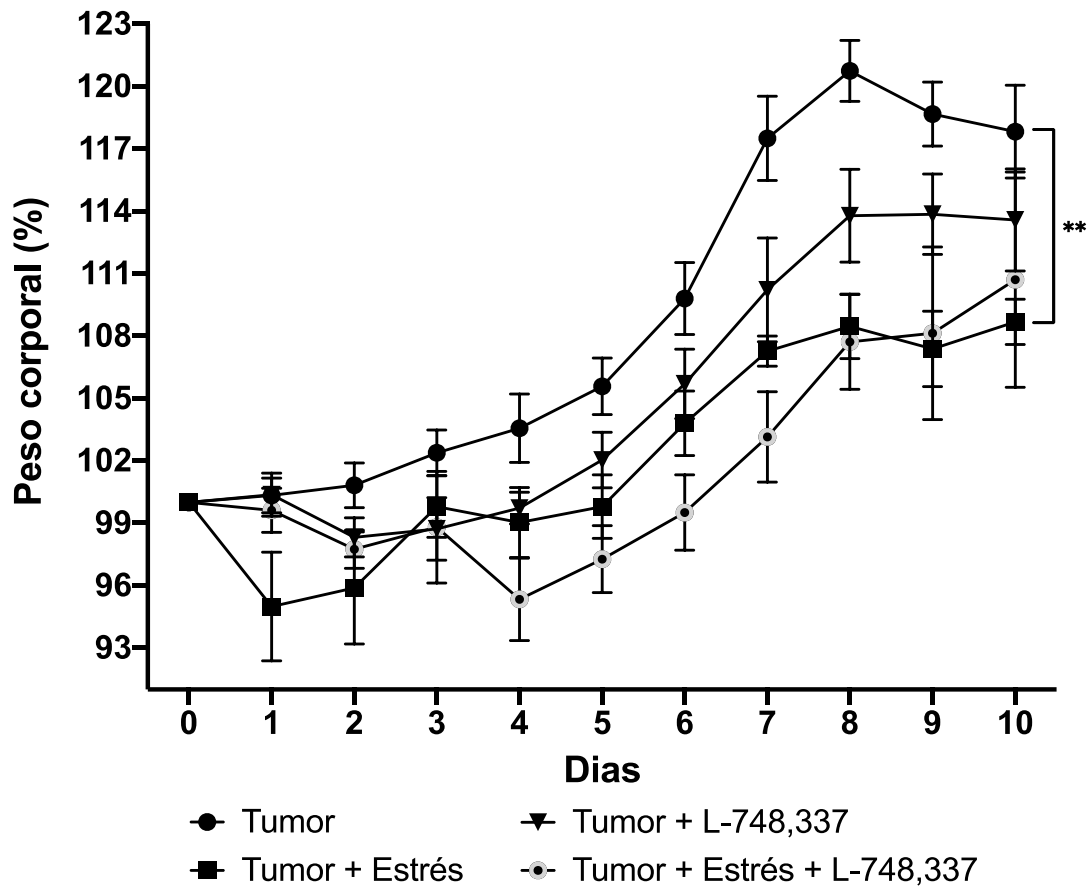


Figura 6. Cambios en el peso corporal en animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β_2 L-748,337 en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar y se consideran como significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*).

Índice de Masa Corporal (IMC)

El IMC se calculó al finalizar el protocolo utilizando el peso corporal en gramos del último día y la distancia naso-anal del ratón en centímetros. Para los ratones portadores de tumor, el IMC se calculó restando el peso del tumor obtenido al peso corporal del último día.

No se observaron diferencias en el índice de masa corporal en ratones con y sin tumor, con y sin estrés y con los tratamientos con los beta bloqueadores. Los ratones control libres de tumor no estresados mostraron una media de IMC de 0.35 g/cm², mientras que los ratones libres de tumor estresados mostraron una media de IMC de 0.33 g/cm² ($p=0.1195$), sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

No se encontraron efectos del estrés en ratones con portadores de tumor estresados y no estresados comparado con el grupo libre de tumor no estresado, la media de IMC fue de 0.36 g/cm² ($p=0.7572$ y $p=0.6293$) como se muestra en la Figura 7A. Los ratones portadores de tumor tratados con el bloqueador de receptores beta 1-2 (propranolol) mostraron una media de IMC de 0.37 g/cm² ($p=0.7704$) comparado con el grupo portador de tumor, mientras que los ratones portadores de tumor que fueron sometidos a estrés crónico y tratados con el mismo bloqueador mostraron una media de IMC de 0.35 g/cm² ($p=0.9885$) comparado con el grupo portador de tumor, tal como se muestra en la Figura 7B.

En cuanto a los ratones portadores de tumor y tratados con el beta bloqueador 3 L-748-337 mostraron una media de IMC de 0.37 g/cm² ($p=0.9346$) comparado contra los ratones portadores de tumor no tratados ni estresados. Los ratones portadores de tumor que fueron sometidos a estrés crónico y tratados con el mismo bloqueador mostraron una media de IMC de 0.35 g/cm² ($p=0.9930$) comparado con los ratones no tratados ni estresados, portadores de tumor tal como se muestra en la Figura 7C.

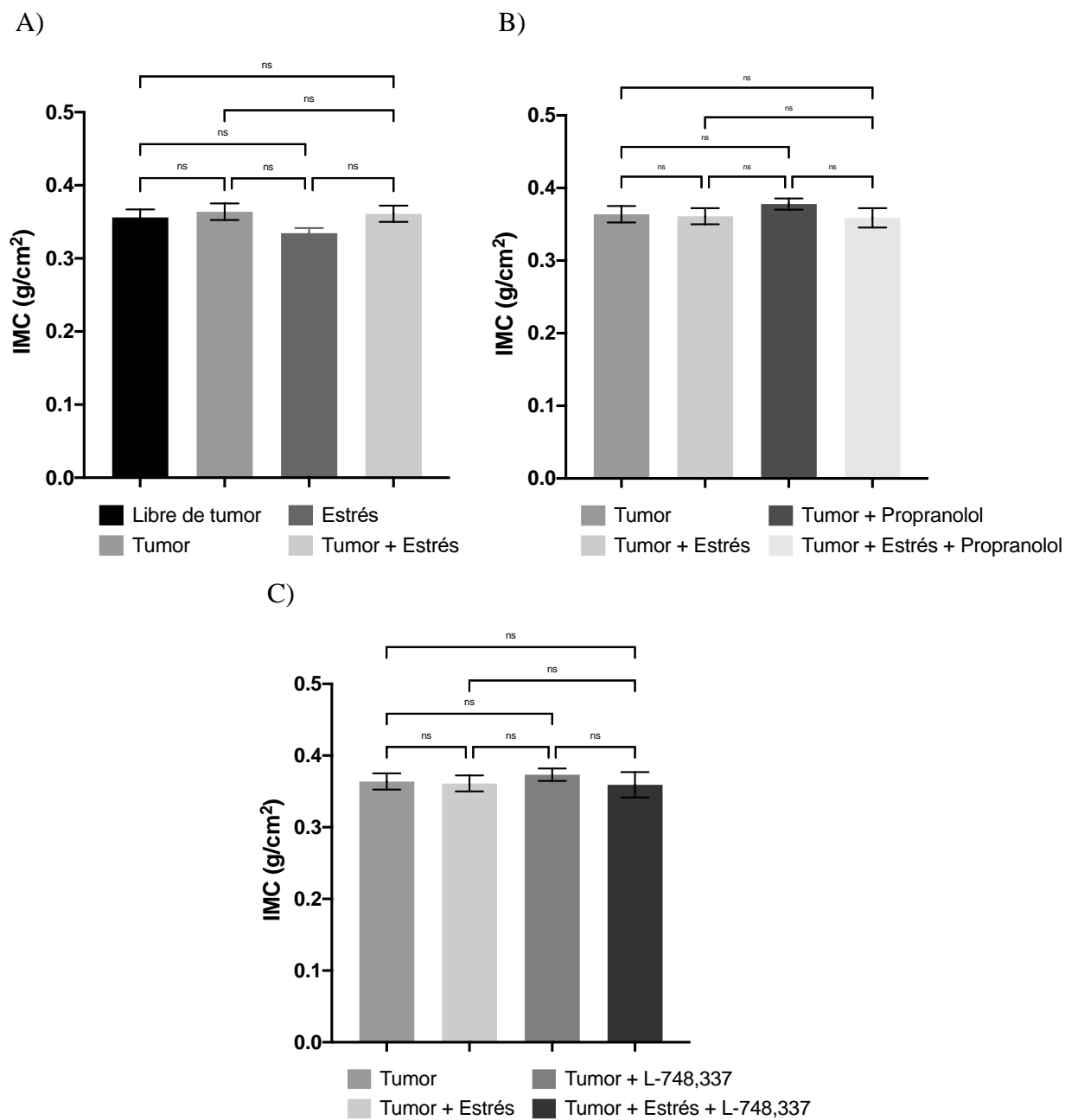


Figura 7. Índice de masa corporal. Valores de IMC de los A) animales libres y portadores de linfoma en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico, B) animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β 1-2 propranolol en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico y C) animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β 2 L-748,337 en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar y se consideran como significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*).

Consumo de agua e ingesta de alimento

El consumo de agua e ingesta de alimento durante los experimentos se realizaron de manera diaria previo al tratamiento correspondiente utilizando una probeta graduada y balanza analítica. El consumo de alimento mostrado corresponde al alimento consumo por día por ratón.

Los ratones libres de tumor y sometidos a estrés consumieron una media de 5.29 ml de agua, un volumen menor al compararse con el consumo de los ratones control libres de tumor no estresados, 5.33 ml ($p=0.8964$) de agua, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

En cuanto a los ratones portadores de tumor, estos consumieron una media de 5.41 ml ($p=>0.9999$) de agua, mientras que los ratones portadores de tumor sometidos a estrés crónico consumieron una media de 5.56 ml ($p=0.5196$) de agua, un volumen menor al compararse con el grupo libre de tumor no estresado, sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas como se observa en la Figura 8A.

Los ratones portadores de tumor tratados con el propranolol mostraron un menor consumo que los ratones portadores de tumor, tratados con propranolol y sometidos a estrés crónico de 5.48 ml ($p=0.9952$) de agua a 5.20 ml ($p=0.8981$) comparado con el grupo portador de tumor no estresado, sin embargo, los cambios no fueron significativos como se observa en la Figura 9A. Con el tratamiento L-748,337 los ratones portadores de tumor tratados mostraron un menor consumo en comparación con los ratones portadores de tumor, tratados con L-748,337 y sometidos a estrés crónico de 5.31 ml ($p=0.5926$) de agua a 4.92 ml ($p=0.1215$) comparado con el grupo con tumor no estresado tal como se observa en la Figura 10A.

En cuanto a la ingesta de alimento, el consumo de alimento fue menor de manera estadísticamente significativa en ratones sometidos a estrés crónico, de 3.98 g a 3.43 g ($p=0.0236$) al comparar con los ratones control no estresados, tal como se observa en la Figura 8B. En ratones portadores de tumor, y ratones portadores de tumor sometidos a estrés crónico, no se observaron diferencias estadísticamente significativas comparado con animales libres de tumor no estresados, la media de

ingesta fue de 3.83 g ($p=0.4727$) y 3.71 g ($p=0.2212$) respectivamente. Los ratones portadores de tumor, tratados con propranolol y estresados, mostraron una disminución de manera significativa de 3.36 g en comparación con la media de los ratones portadores de tumor 3.83 g ($p=0.0042$), lo ratones portadores de tumor estresados 3.71 g ($p=0.0291$) y los ratones portadores de tumor tratados con propranolol 3.88 g ($p=0.0351$) como lo muestra la Figura 9B. Sin embargo, al tratar con L-748,337 los ratones portadores de tumor estresados mostraron un consumo significativamente mayor de 3.83 g a 4.31 g ($p=0.0220$) en comparación con los ratones con tumor y 3.71 g ($p=0.0068$) con ratones portadores de tumor estresados tal como se observa en la Figura 10B.

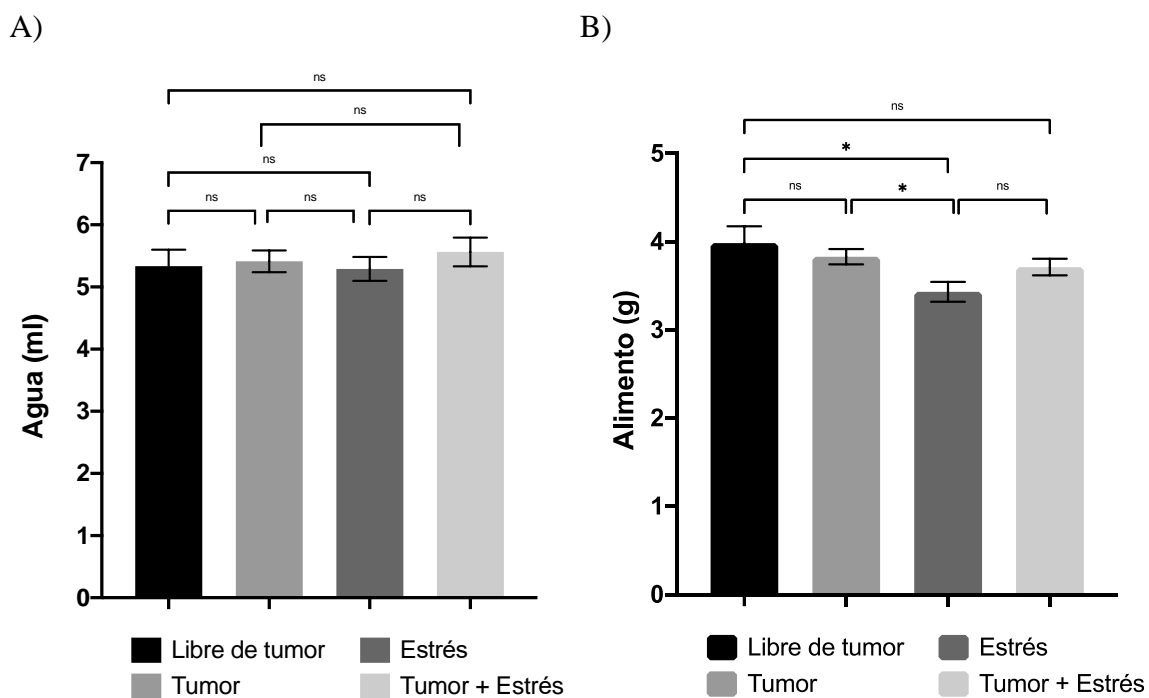
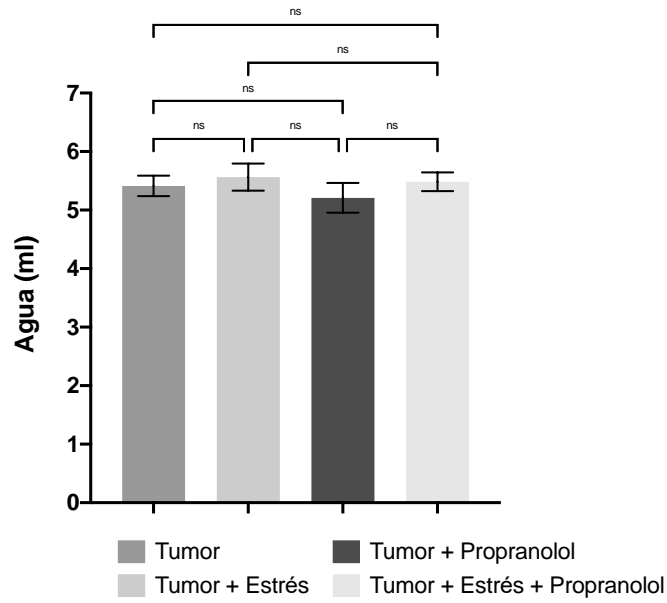


Figura 8. A) Ingesta diaria de agua (ml) consumida por animales libres y portadores de linfoma en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. B) Ingesta diaria de alimento (g) por animales libres y portadores de linfoma en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar y se consideran como significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*).

A)



B)

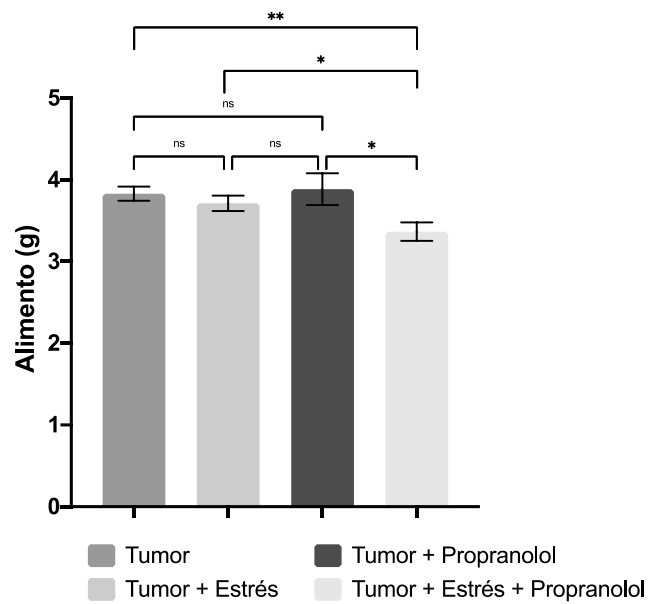
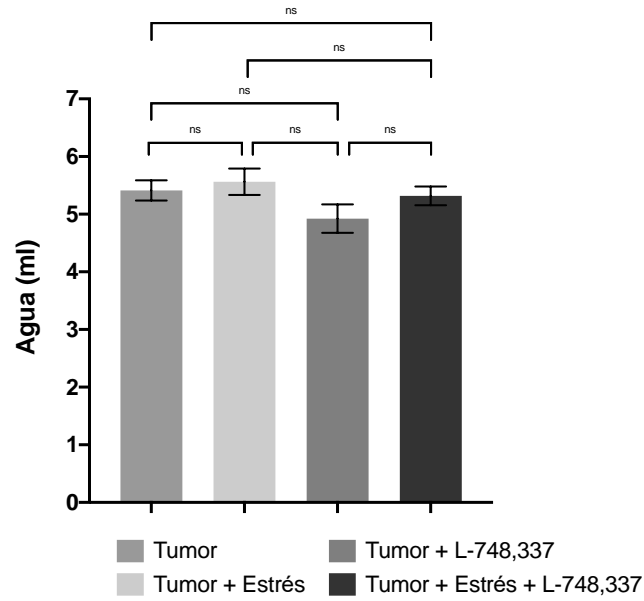


Figura 9. A) Ingesta diaria de agua (ml) consumida por animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β 1-2 propranolol en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. B) Ingesta diaria de alimento (g) por animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β 1-2 propranolol en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar y se consideran como significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*).

A)



B)

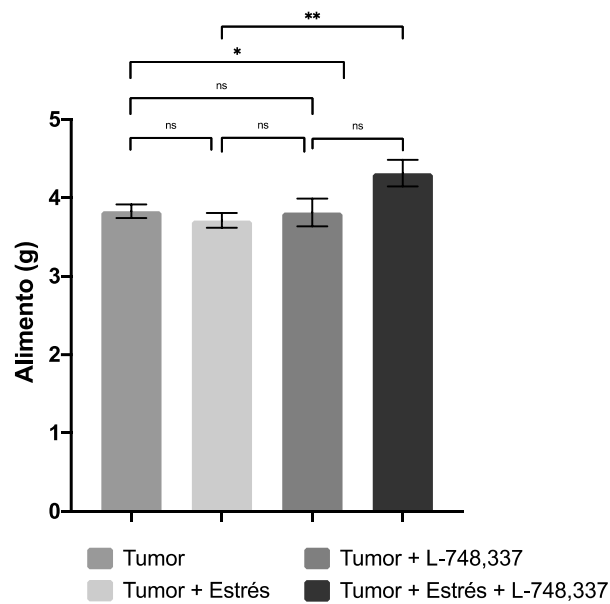


Figura 10. A) Ingesta diaria de agua (ml) consumida por animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β_2 L-748,337 en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. B) Ingesta diaria de alimento (g) por animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β_2 L-748,337 en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar y se consideran como significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*).

Contenido de tejido adiposo en los distintos depósitos corporales

El contenido de tejido adiposo interescapular disminuyó de manera significativa de una media de 1.40% de grasa en ratones libres de tumor no estresados a una media de 0.81% ($p=0.0001$) en ratones portadores de tumor, 1.04% ($p=0.0422$) en ratones sometidos a estrés crónico y 0.62% ($p=0.0001$) en ratones portadores de tumor sometidos a estrés crónico como se observa en la Figura 11.

Al tratar ratones portadores de tumor sometidos a estrés crónico con el antagonista propranolol se presentó un aumento estadísticamente significativo en la media a 1.07% ($p=0.0119$) de grasa comparado con el grupo portador de tumor sometido a estrés crónico, como se observa en la Figura 12. Mientras que el grupo tratado con L-748,337 aumentó un 53% de contenido adiposo a una media de 0.95% de grasa comparado con los ratones portadores de tumor estresados ($p=0.0059$) como se observa en la Figura 13.

Los animales portadores de tumor tratados con propranolol y con L-748,337 mostraron una media de 0.87% ($p=0.0403$) y 1.04% ($p=0.0141$) de grasa, comparado con el grupo portador de tumor sometido a estrés crónico.

El tejido adiposo inguinal de ratones portadores de tumor y de ratones sometidos a estrés crónico fue significativamente menor, de 1.02% de grasa a 0.35% ($p=0.0009$ y $p=0.0070$, respectivamente) comparado con el grupo libre de tumor no estresado. El mayor desgaste se observó en los ratones portadores de tumor sometidos a estrés crónico, en los que el contenido adiposo disminuyó a una media de 0.14% ($p=0.0001$) comparado con el grupo libre de tumor y estrés.

Tanto el propranolol como el L-748,337 no tuvieron efecto sobre el porcentaje de tejido adiposo inguinal de animales portadores de tumor y sometidos a estrés con una media de 0.52% ($p=0.4706$) y 0.41% ($p=0.6530$) respectivamente comparado con animales portadores de tumor.

Por otro lado, el tejido adiposo visceral fue significativamente menor en ratones sometidos a estrés, ratones portadores de tumor en y ratones portadores de tumor sometidos a estrés crónico de 1.61%

($p=0.0063$), 1.20% ($p=0.0001$) y 1.15% ($p=0.0011$) respectivamente, comparado con de una media de 2.06% de grasa de ratones libres de tumor no estresados.

Los tratamientos con los antagonistas propranolol y L-748,337 no afectaron de manera significativa el contenido porcentual del depósito.

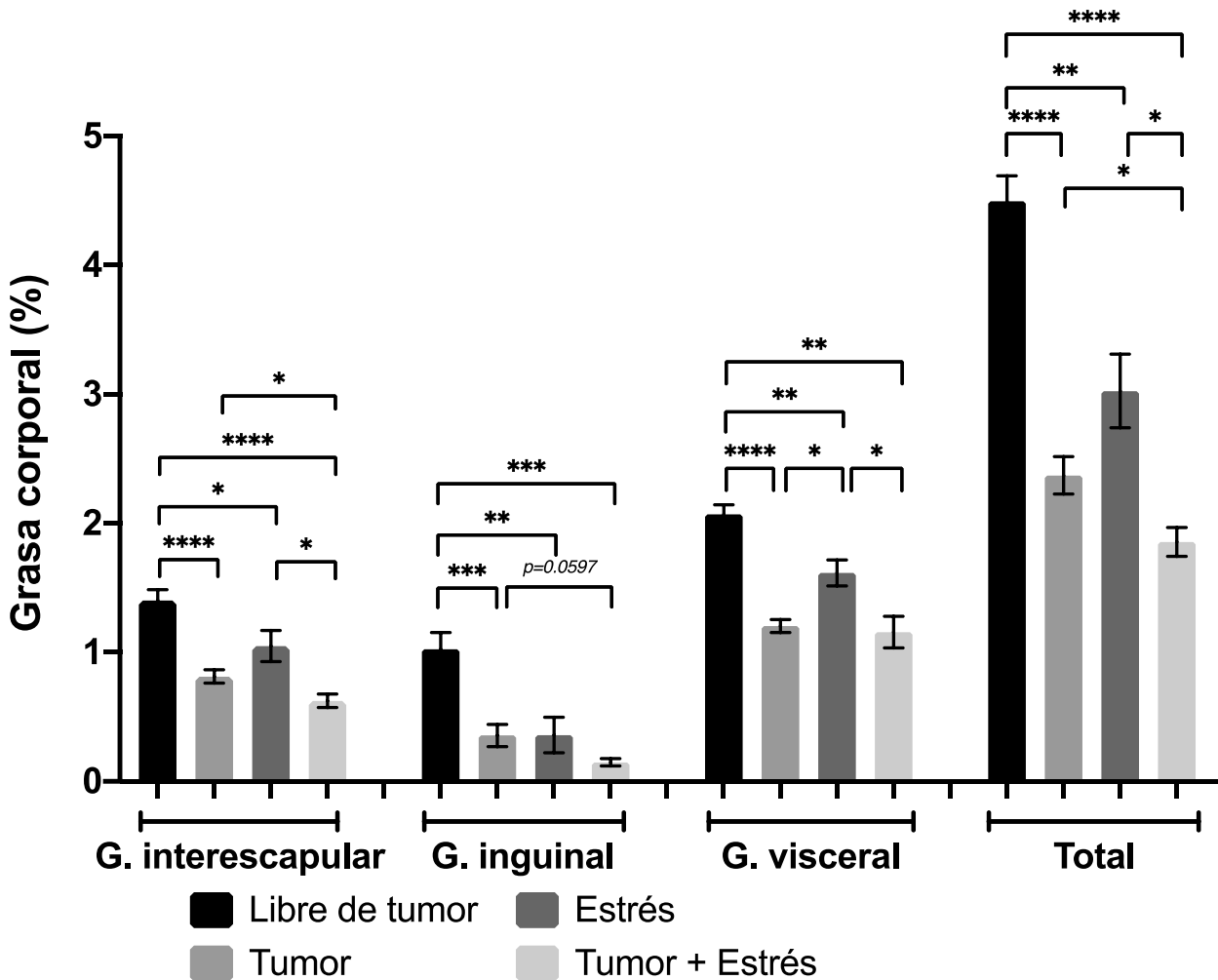


Figura 11. Porcentaje de grasa corporal de los depósitos interescapular, inguinal y visceral de animales libres y portadores de linfoma en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar y se consideran como significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*).

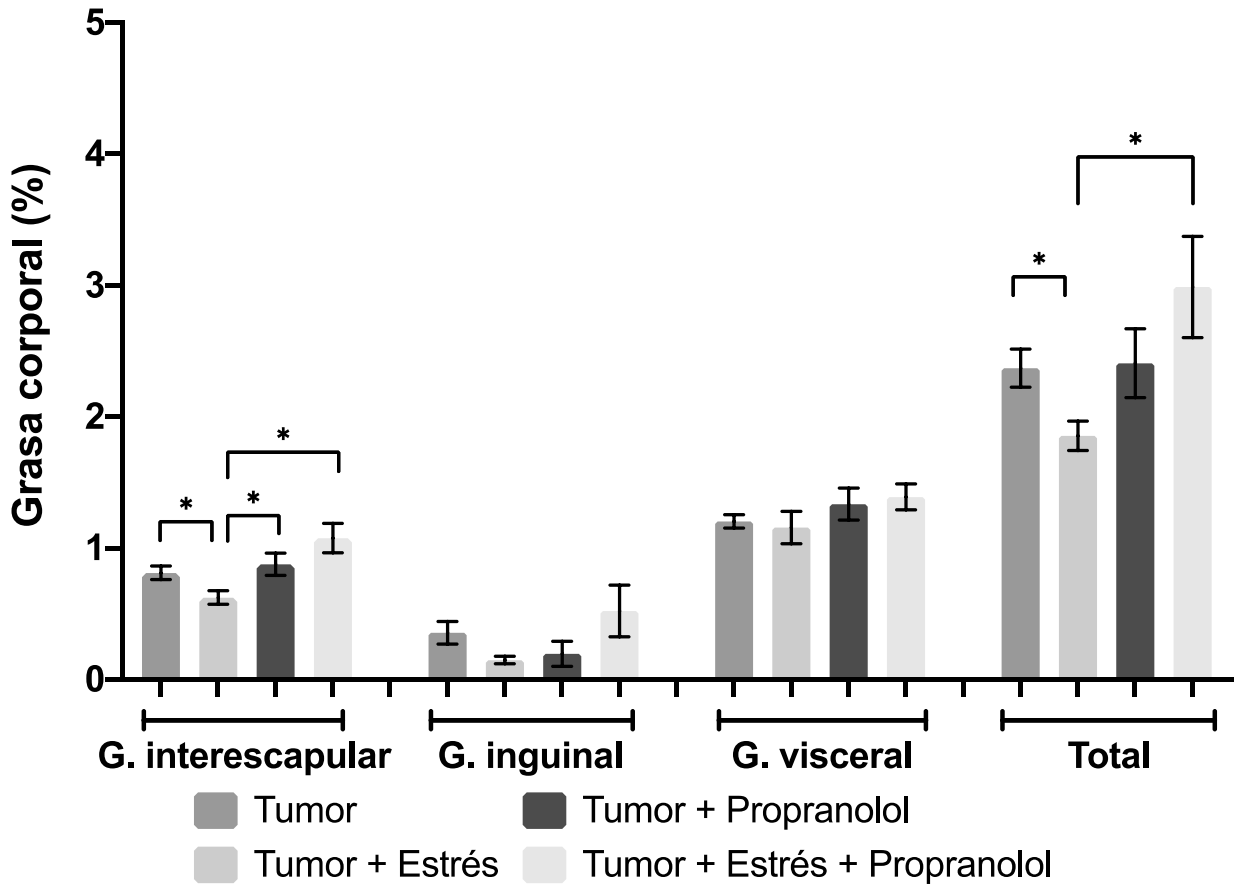


Figura 12. Porcentaje de grasa corporal de los depósitos interescapular, inguinal y visceral de animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β 1-2 propranolol en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. La grasa total hace referencia a la sumatoria de los depósitos presentados. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar y se consideran como significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*).

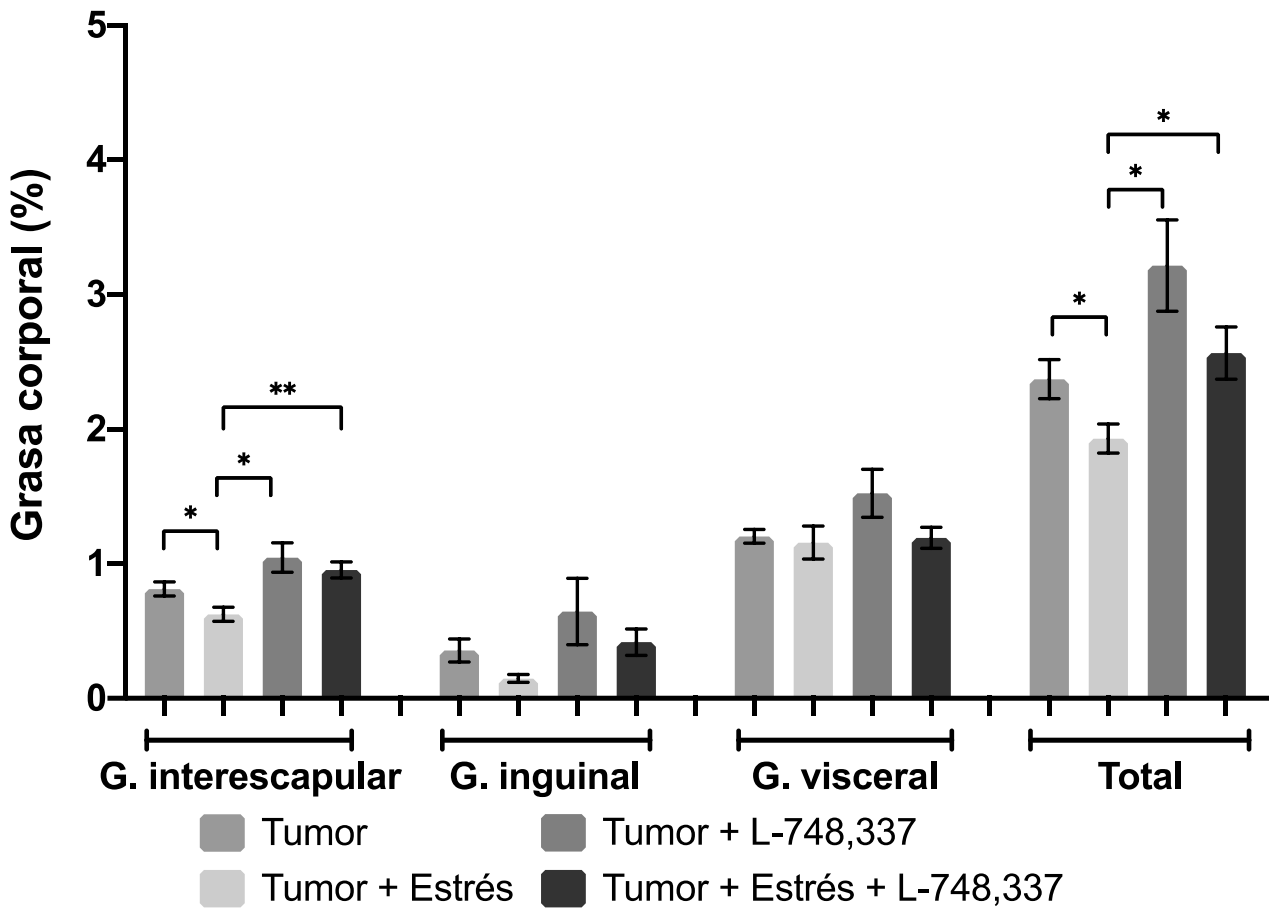


Figura 13. Porcentaje de grasa corporal de los depósitos interescapular, inguinal y visceral de animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β_2 L-748,337 en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. La grasa total hace referencia a la sumatoria de los depósitos presentados. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar y se consideran como significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*).

Porcentaje corporal de músculo del corazón.

Una vez realizada la eutanasia, se evaluó el peso en miligramos del músculo del corazón, esto como un factor más para evaluar los efectos del estrés en los diferentes grupos experimentales.

En los ratones sometidos a estrés crónico se encontró un aumento significativo en el peso del músculo del corazón con una media de 0.50% comparado con los ratones libres de tumor no estresados 0.43% ($p=0.0047$) y los ratones portadores de tumor 0.40% ($p=0.0068$) como se observa en la Figura 14.

Los tratamientos con los antagonistas propranolol y L-748,337 no afectaron de forma significativa el peso del músculo cardíaco de los diferentes grupos tratados y comparados con los ratones portadores de tumor; con excepción del grupo portador de tumor tratado con propranolol el cual disminuyó de manera significativa en su media de 0.43% a 0.36% ($p=0.0213$) comparado con los ratones portadores de tumor sometidos a estrés crónico.

En los ratones portadores de tumor, sometidos a estrés crónico y tratados con propranolol el músculo cardíaco aumentó de manera no significativa a una media de 0.40% ($p=0.9305$). Por su parte, el grupo portador de tumor tratado con L-748,337 mostró una media de 0.44% ($p=0.4316$) y el grupo portador de tumor, sometido a estrés crónico y tratado con L-748,337 una media de 0.41% ($p=0.6919$) como se observa en las Figuras 15 y 16.

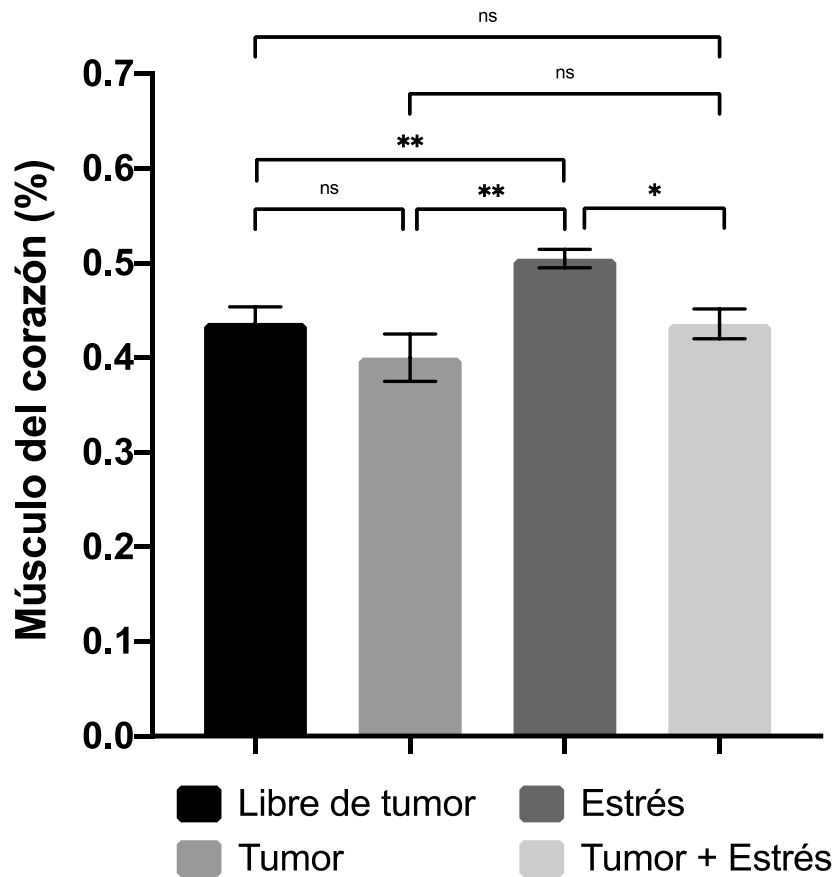


Figura 14. Porcentaje corporal del músculo del corazón de animales libres y portadores de linfoma en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. El peso del músculo se calculó como porcentaje del peso total de cada individuo. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar y se consideran como significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*).

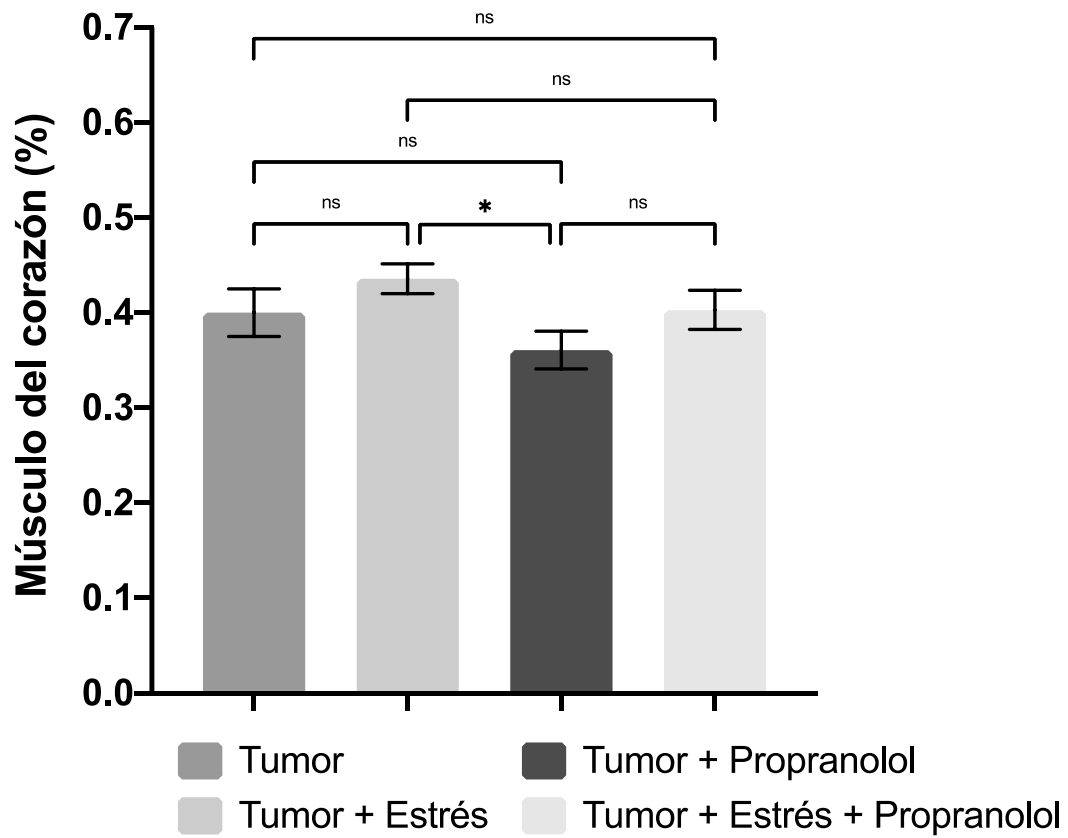


Figura 15. Porcentaje corporal del músculo del corazón de animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β 1-2 propranolol en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar y se consideran como significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*).

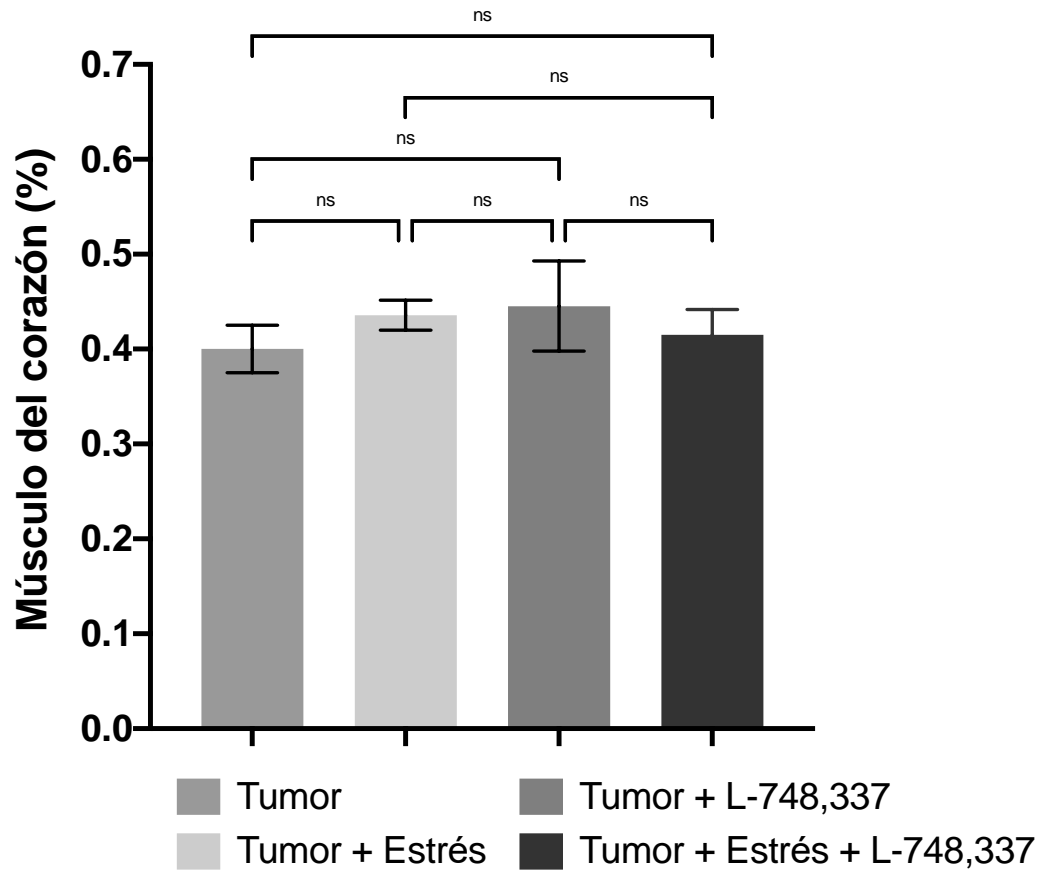


Figura 16. Porcentaje corporal del músculo del corazón de animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β_2 L-748,337 en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar y se consideran como significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*).

Volumen tumoral

Para calcular el volumen tumoral se tomaron medidas de largo y ancho de la extremidad posterior derecha del animal donde se había inoculado el tumor. El registro del volumen tumoral se realizó en los días 7, 8, 9 y 10 del protocolo, cuando el tumor fue palpable en los animales.

En el primer día de lectura, día 7 de protocolo, los ratones portadores de tumor obtuvieron una media de volumen tumoral de 379.75 mm³, los ratones portadores de tumor sometidos a estrés crónico una media de 347.00 mm³, los ratones portadores de tumor y tratados con propranolol una media de 607.47 mm³ y los ratones portadores de tumor sometidos a estrés crónico y tratados con propranolol una media de 62 mm³. Al día 10 del protocolo, los ratones portadores de tumor aumentaron de manera significativa la media de un volumen a 1780.23 mm³ comparado con 497.76 mm³ ($p=0.0001$) de los ratones portadores de tumor, sometidos a estrés crónico y tratados con propranolol.

Los ratones portadores de tumor sometidos a estrés crónico y los ratones portadores de tumor tratados con propranolol desarrollaron tumores de 1748.82 mm³ ($p=0.1508$) y 1620.96 mm³ ($p=0.0747$), sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al compararse con ratones portadores de tumor como se observa en la Figura 17.

Por su parte, los ratones portadores de tumor tratados con L-748,337 iniciaron con una media 110.93 mm³ mientras que los ratones portadores de tumor, sometidos a estrés crónico y tratados con L-748,337 con una media de 0 mm³. En el día 10, los ratones portadores de tumor tratados con L-748,337 y los ratones portadores de tumor, sometidos a estrés crónico y tratados con L-748,337 disminuyeron de manera significativa la progresión del volumen tumoral a una media de 824.68 mm³ ($p=0.0001$) y 889.97 mm³ ($p<0.0001$), respectivamente, comparado con el grupo portador de tumor como se observa en la Figura 18.

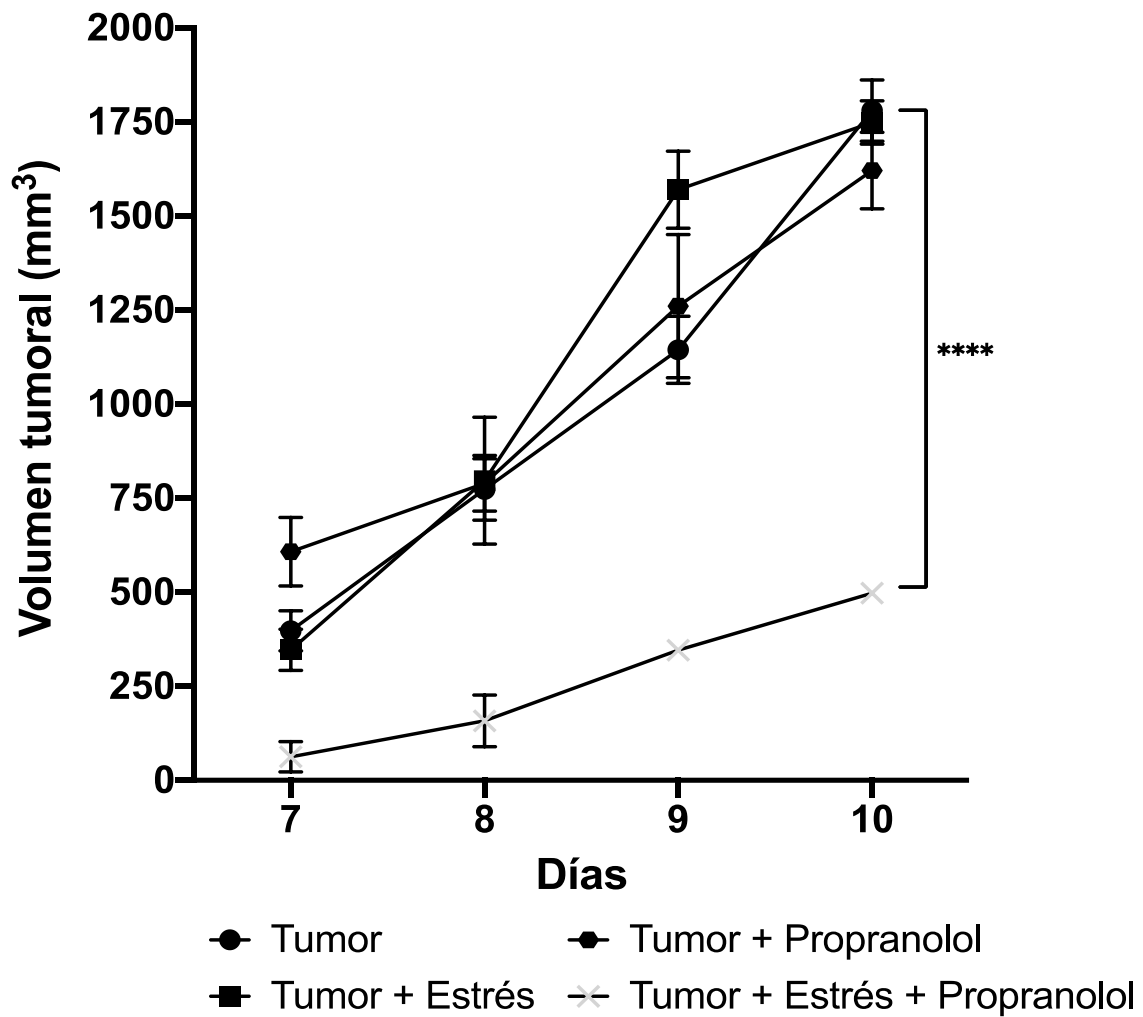


Figura 17. Evolución del volumen tumoral de animales portadores de linfoma en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico, animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β 1-2 propranolol en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar y se consideran como significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*).

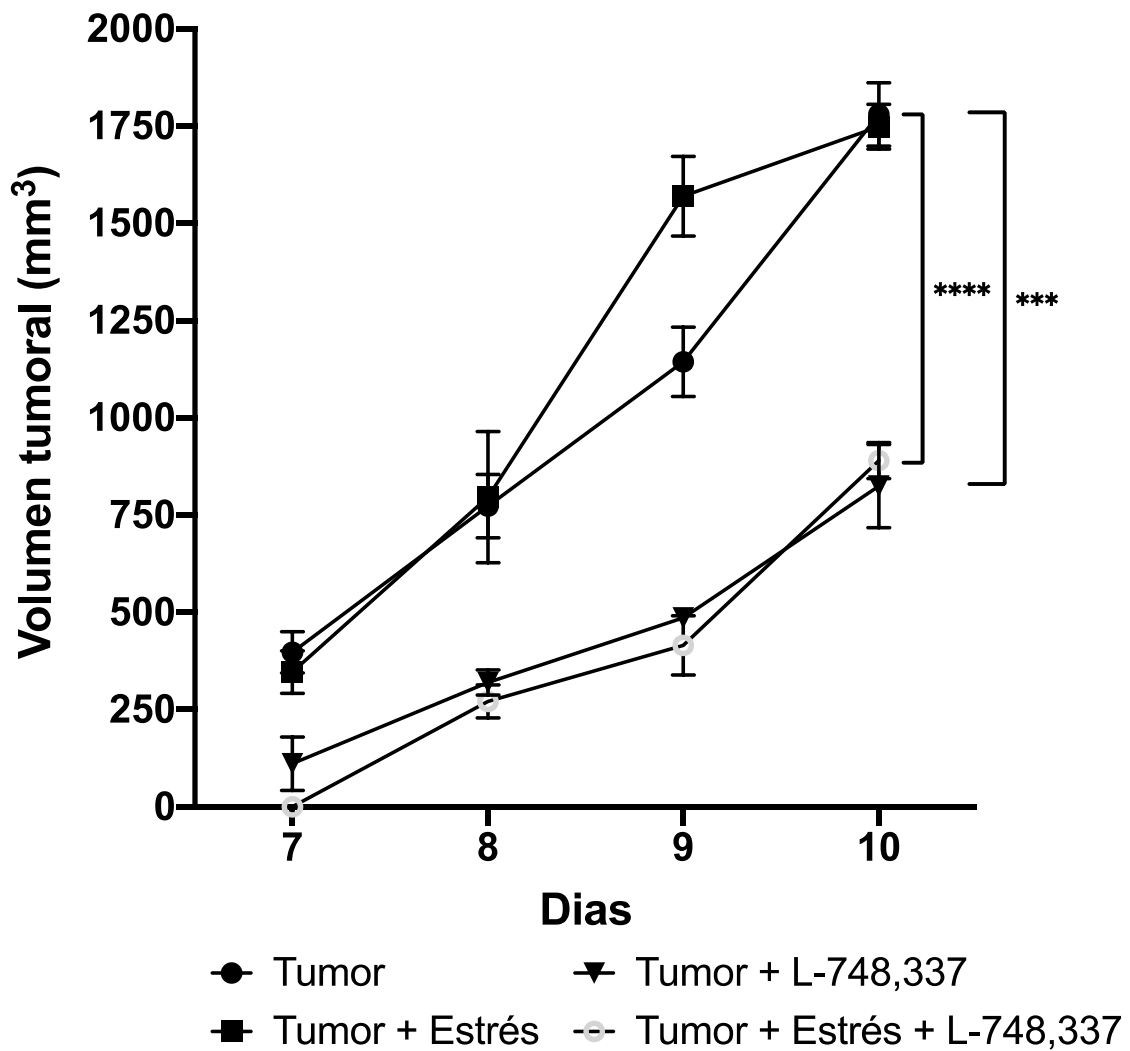


Figura 18. Evolución del volumen tumoral de animales portadores de tumor tratados con el antagonista adrenérgico β_2 L-748,337 en condiciones de reposo y sometidos a estrés crónico. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar y se consideran como significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*).

Peso tumoral final

Para el grupo portador de tumor se observó una media de peso tumoral de 2952.22 mg mientras que el grupo portador de tumor sometido a estrés crónico fue de 2829.85 mg ($p=<0.8637$). El tratamiento con propranolol en animales portadores de tumor redujo de manera no significativa el peso tumoral un 21% a 2319.04 mg ($p=<0.2468$) comparado con el grupo portador de tumor. En los ratones portadores de tumor, sometidos a estrés crónico y tratados con propranolol se observó una disminución significativa del 30% en el peso tumoral a una media 2048.06 mg ($p=<0.0189$) comparado con los ratones portadores de tumor como se observa en la Figura 19. En el grupo portador de tumor tratado con L-748,337 disminuyó de manera significativa el peso tumoral un 21% a una media de 2329.04 mg ($p=<0.0538$), mientras que el grupo portador de tumor, sometido a estrés crónico y tratado con el L-748,337 disminuyó un 17% a una media de 2440.28 mg ($p=<0.0710$) comparado con los ratones portadores de tumor como se observa en la Figura 20.

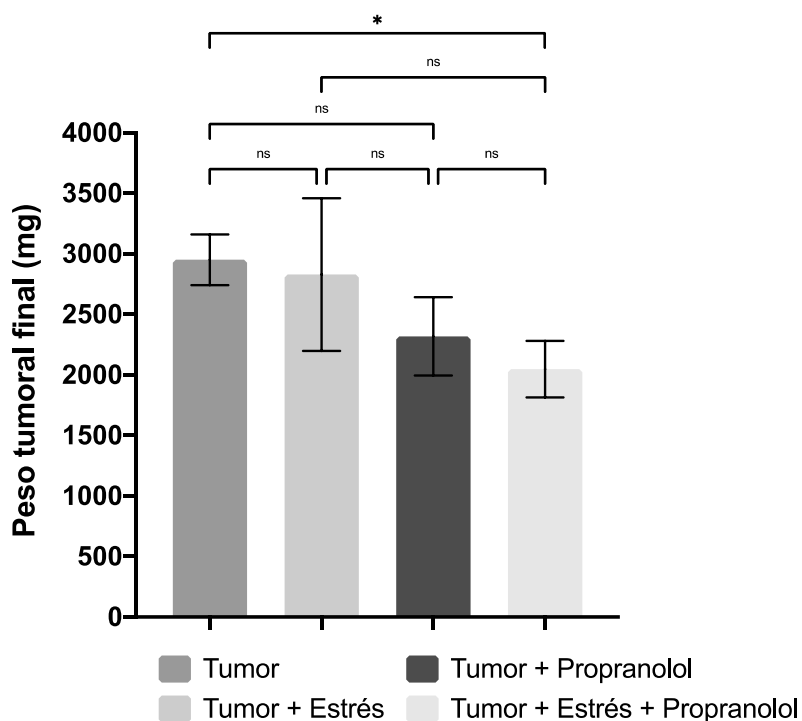


Figura 19. Peso tumoral final de los animales portadores de tumor, animales portadores de tumor bajo estrés crónico y animales portadores de tumor tratados con propranolol con y sin estrés. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar y se consideran como significativos los valores de $p \leq 0.05$.

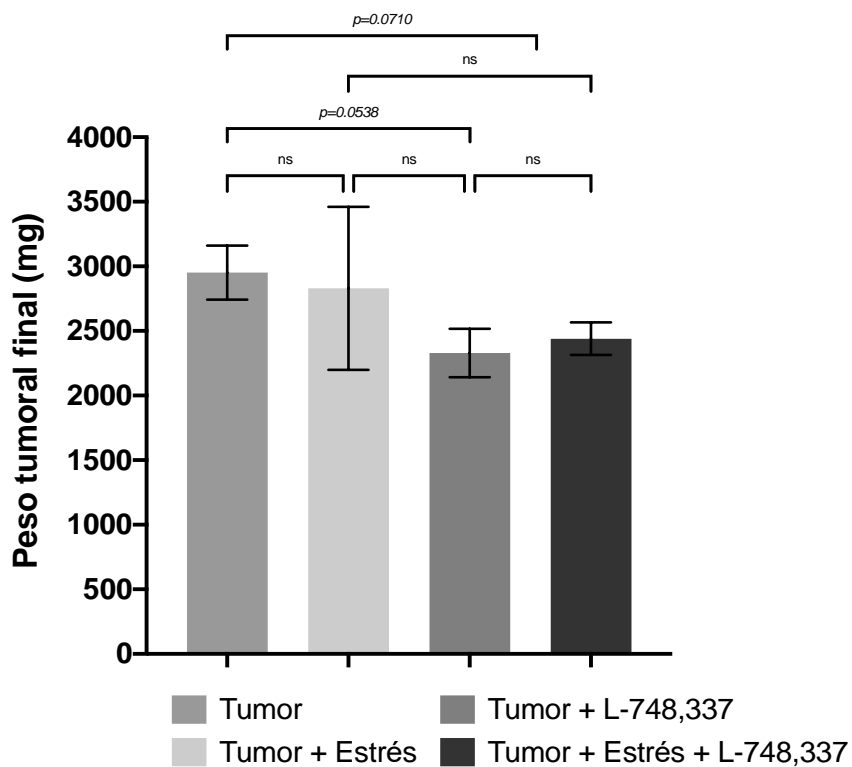


Figura 20. Peso tumoral final de los animales portadores de tumor, animales portadores de tumor bajo estrés crónico y animales portadores de tumor tratados con L-748,337 con y sin estrés. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar y se consideran como significativos los valores de $p \leq 0.05$.

Expresión relativa de VEGFR-2 en tejido tumoral

En tejido tumoral de animales bajo estrés crónico se observó un incremento en la expresión de VEGFR-2 de 1.82 veces, al comparar con el tejido tumoral en ratones sin estrés. Cuando bloqueamos la vía adrenérgica beta 1,2 en animales portadores de tumor sometidos a estrés crónico, observamos que la expresión de VEGFR-2 se incrementó 22.33 veces con respecto al control y con el bloqueo de la vía adrenérgica beta-3 la expresión de VEGFR-2 aumentó 4.62 veces.

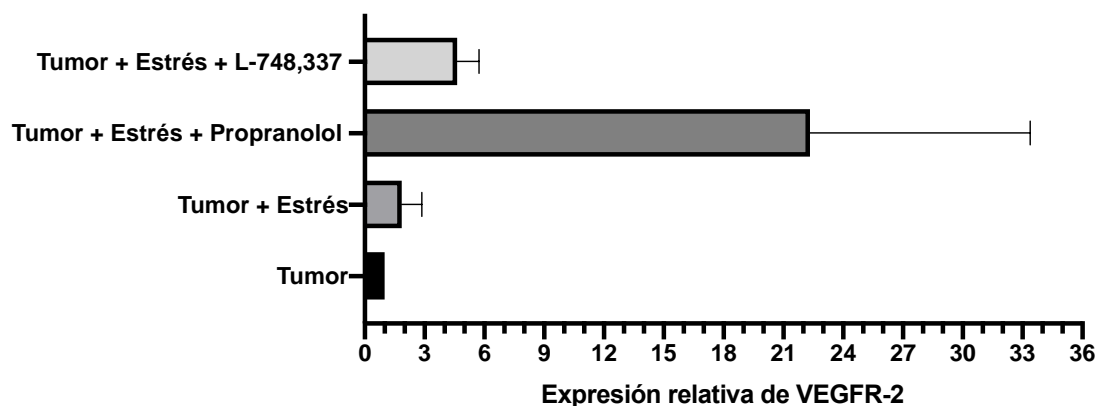


Figura 21. Expresión relativa del ARN mensajero de VEGFR-2 en el tejido tumoral de animales portadores de tumor, animales portadores de tumor bajo estrés, animales portadores de tumor bajo estrés tratados con propranolol y animales portadores de tumor bajo estrés tratados con L-748,337. Los datos se presentan como los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de las muestras, normalizados con la media del gen constitutivo GAPDH.

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos del análisis de expresión transcripcional de VEGFR-2.

Grupo	Expresión VEGFR-2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
	Tejido tumoral
Tumor	1
Tumor + Estrés	1.8590
Tumor + Estrés + Propranolol	22.3308
Tumor + Estrés – L-748,337	4.6262

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

DISCUSIÓN

Estudios recientes han demostrado que el estrés crónico es capaz de promover el desarrollo del cáncer acompañado de una serie de cambios fisiológicos y metabólicos, los cuales alteran la homeostasis de un organismo. Estos cambios pueden analizarse enfocándose en un indicador molecular de interés, a nivel transcripcional o proteico. Este estudio está enfocado en el receptor celular, el VEGFR-2, receptor del principal factor angiogénico VEGF, el cual se ha descrito como un receptor susceptible de modulación por estrés crónico en algunos tejidos, como el nervioso. Para estudiar de manera más detallada el papel de este receptor en condiciones patológicas, su modulación por estrés crónico y su relación con la modulación de la masa y la progresión tumoral, utilizamos fármacos antagonistas de receptores adrenérgicos $\beta_{1,2}$ y β_3 .

Primero evaluamos los efectos del estrés crónico en animales libres de tumor. En cuanto a indicadores de composición corporal, no se encontraron cambios en el peso corporal. Schmidt et al., (2010) no encontraron cambios en el peso corporal de ratones hembra CD1 sometidos a estrés crónico social. A pesar de no observar cambios significativos en el peso corporal, al evaluar los depósitos grasos, encontramos reducción significativa en el porcentaje de los tres depósitos analizados. En un estudio realizado por Vázquez-Cruz (2020) se encontraron efectos similares debidos al estrés sobre la composición adiposa de hembras sometidas a estrés por restricción de movimiento. Estudios han demostrado que el estrés por restricción de movilidad es un inductor de hormonas del estrés como la norepinefrina, la cual puede estimular lipólisis de depósitos grasos.

Otro indicador de interés fue la masa del músculo del corazón. Encontramos un aumento significativo de la masa del músculo del corazón en animales estresados con respecto al músculo de animales libres de estrés. Se ha reportado que la hipertrofia cardiaca es un proceso fundamental de adaptación a factores tanto fisiológicos como patológicos donde se presenta una mayor carga hemodinámica inducida por el estrés (Ruwhof & van der Laarse 2000; Evangelista et al., 2003).

Cuando evaluamos indicadores conductuales, encontramos una reducción significativa en la ingesta de alimento en las hembras sometidas a estrés crónico. Este resultado contrasta con lo reportado en las cepas de ratones C57B1/6J y CRFR2 KO (Pankevich et al. 2011; Teegarden y Bale

2009) en las cuales se ha observado aumento en la ingesta de alimento y la preferencia por dietas ricas en grasas. Zeeni et al. (2012), por su parte, respaldan que la exposición a alimentos estándar o no apetecibles, como la utilizada en este trabajo, podrían estar influyendo en una menor ingesta de comida. Petrovich & Lougee (2011) encontraron que ratas hembra mostraban una inhibición de la ingesta de alimentos inducida por el miedo, efecto no observado en machos.

Después, evaluamos los efectos del estrés crónico en hembras portadoras de linfoma y encontramos una reducción significativa de peso corporal cuando se les expuso a estrés. Esta atenuación de peso podría deberse a la presencia del tumor, el cual podría estar intensificando los efectos del estrés. En cuanto a la grasa corporal, observamos en este mismo grupo un desgaste de los depósitos de grasa interescapular, inguinal y total. Se ha reportado la reducción de tejido adiposo como una respuesta al aumento en la actividad del sistema nervioso adrenérgico beta (Zigman & Lutter 2010) y que dicho tejido, incluso células adiposas circulantes como preadipocitos y adipocitos maduros, es susceptible a reprogramación metabólica cuando se encuentra cerca de tumores, con el propósito de su propio desarrollo (Trivanović et al., 2020). En nuestro grupo de investigación hemos observado, repetidamente, la reducción altamente significativa de los depósitos de grasa, incluso pérdidas totales en ratones portadores de linfoma sometidos a estrés crónico. Por ejemplo, Vázquez-Cruz (2020) observó una disminución significativa del contenido de tejido adiposo en hembras sometidas a estrés crónico.

En cuanto a la conducta de los animales, no observamos cambios significativos en el consumo de agua e ingesta de alimento debido al estrés crónico en hembras portadoras de linfoma. En cuanto a la progresión del volumen tumoral y el peso tumoral final, reportes han señalado efectos positivos del estrés crónico sobre estos. Wu et al. (2015) observaron una mayor progresión del volumen tumoral, y un mayor peso tumoral final, en ratones C57BL/6 portadores de carcinoma de pulmón de Lewis sometido a estrés por derrota social, en comparación con el grupo portador de carcinoma de pulmón de Lewis. Zhou et al., (2020) reportaron una mayor progresión del volumen tumoral en ratones portadores de cáncer de vejiga sometidos a estrés crónico impredecible en comparación con el control, así como un mayor peso tumoral. Quin et al., (2015) observaron un crecimiento más rápido del tumor en los animales portadores de cáncer de mama 4T1 después de estrés crónico, así como un aumento

del peso del tumor en comparación con el grupo control. Sin embargo, en este trabajo no encontramos diferencias estadísticamente significativas en ambos indicadores, esto podría deberse a que el periodo de restricción de movilidad no fue suficiente para promover crecimiento tumoral, o a la localización de implantación del tumor, al ser una extremidad podría suponer una limitante al crecimiento del propio tumor, diferencia crucial con antecedentes mencionados anteriormente. Du et al. (2020) no observaron ninguna diferencia significativa en la progresión del volumen tumoral de ratones portadores de cáncer de mama 4T1 sometidos a estrés crónico por restricción de movilidad.

Para descartar el efecto de la carga tumoral en la respuesta al estrés crónico, comparamos los indicadores de hembras libres y portadoras de tumor. Encontramos un incremento de peso corporal significativa en hembras portadoras de linfoma, la cual puede atribuirse a la presencia y crecimiento del tumor. En cuanto a los depósitos de grasa analizados, encontramos efectos altamente significativos de la carga tumoral sobre el tejido graso de hembras portadoras de linfoma. Gutiérrez-Leal (2021) reportó reducción de los depósitos de grasa interescapular, inguinal, visceral y total en hembras portadoras de este tumor. Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar este remodelado del tejido graso, entre ellos el aumento de la actividad lipolítica por factores u hormonas lipolíticas, como las catecolaminas (Henriques & Júnior, 2020). Estudios en animales señalan que ratones portadores de tumores presentan altas tasas metabólicas de tejidos adiposos (Brooks et al., 1981), en especial la presencia y activación del tejido adiposo pardo puede resultar en un estado hipermetabólico de la grasa (Shellock & Fishbein, 1986).

Posteriormente evaluamos el papel de la señalización adrenérgica beta 1,2 y beta 3, para ello se bloquearon los receptores respectivos con los antagonistas propranolol y L-748,337. El bloqueo de los adrenoreceptores 1,2 y 3 se asoció a un menor desgaste del depósito de grasa interescapular en un contexto tumoral de hembras libres y bajo estrés comparado con hembras portadoras de linfoma bajo estrés. Se ha informado que la adipocina ZAG (α 2-glicoproteína de zinc) es capaz de inducir su propia expresión a través de receptores adrenérgicos. Esto podría explicar que al administrar los antagonistas adrenérgicos se recupere o rescate el depósito de grasa interescapular en ratones portadores de tumor, en forma independiente del estrés.

En lo que corresponde a indicadores de progresión tumoral, encontramos menor progresión del volumen tumoral con ambos tratamientos, así como un menor peso tumoral final en el caso del tratamiento con propranolol. Estudios realizados en murinos con antagonistas de receptores adrenérgicos concuerdan en una reducción del volumen y peso tumoral final al tratar con antagonistas de adrenoreceptores (Bruno et al. 2020).

En cuanto al análisis transcripcional de VEGFR-2 encontramos que el estrés crónico incrementó casi 2 veces la expresión del receptor en tumor. Cuando se administró propranolol a animales portadores de tumor bajo condiciones de estrés crónico, encontramos que la expresión del receptor se incrementó 22 veces. Si bien se ha reportado que la expresión de VEGFR-2 es elevada en la mayoría de los tumores sólidos, hay reportes que apoyan la idea de que VEGFR-1 es un regulador negativo de VEGFR-2. Por lo que una perspectiva de interés es analizar la expresión del receptor VEGFR-1 bajo las diferentes condiciones experimentales de este estudio.

Fong et al. (1995) informaron que ratones con deficiencias de VEGFR-1 morían en el útero debido a una sobreabundancia de células endoteliales, mientras que los ratones que únicamente expresaban el dominio extracelular sobrevivían. Roberts et al. (2004) demostraron que el fenotipo mutante de VEGFR-1 en vasos sanguíneos podía compensarse si estos se incubaban con inhibidores de VEGFR-2. En cuanto al propranolol, este fármaco antagonista no selectivo, ampliamente estudiado por su potencial como inhibidor de la angiogénesis, ha demostrado reducir significativamente la expresión de VEGFR-1 (Przewratil et al. 2016). Es probable que en este modelo el propranolol esté disminuyendo la expresión del inhibidor de VEGFR-2 lo que plantea la posibilidad de que VEGFR-1 y VEGFR-2, dos receptores de la misma familia, presenten efectos opuestos.

Si bien es probable que el propranolol esté ejerciendo su actividad antitumoral en los indicadores de progresión tumoral de animales portadores de tumor sometidos a estrés crónico, como se describió anteriormente, también es posible que en estos animales el macroambiente tumoral no es capaz de responder de forma óptima al estresor, lo que altera la respuesta homeostática, incluyendo la expresión de nuestro gen blanco. Aún más, es posible que la propia naturaleza del receptor esté participando.

Ya ha sido reportado que la expresión de VEGFR-2 es altamente heterogénea entre modelos animales y modelos tumorales, e incluso varía entre las zonas anatómicas donde se implantan las células. Chalothorn et al. (2007) reportaron diferencias importantes en los niveles de VEGFR-1 y VEGFR-2 en células endoteliales aisladas de ratones C57BL/6 y BALB/c del músculo gastrocnemio y los músculos tibiales de las extremidades traseras del ratón. De manera general, reportaron una mayor expresión de VEGFR-1 que de VEGFR-2; 30% más de receptores VEGFR-1 en células endoteliales tibiales comparado con el gastrocnemio. Por su parte, también hay variabilidad de acuerdo a la cepa de ratones o la línea celular estudiada. Los ratones BALB/c tienen 17% más receptores VEGFR-1 que los ratones C57BL/6; en fibroblastos *in vitro* se observan niveles altos de VEGFR-1 y niveles muy bajos de VEGFR-2 y en células endoteliales humanas *in vitro* el equilibrio se invierte.

CONCLUSIONES

En el modelo del linfoma murino L5178Y-R, tanto el estrés crónico como la carga tumoral afectan indicadores morfométricos y conductuales.

1. En el modelo murino de linfoma L5178Y-R, el estrés crónico estimula marginalmente la expresión del receptor VEGFR-2.
2. La señalización a través de los receptores adrenérgicos beta 1,2 inhibe la expresión de VEGFR-2 durante estrés.
3. En el modelo de linfoma L5178Y-R la exposición a estrés crónico no influye sobre el peso o volumen tumoral.
4. Bajo condiciones de estrés crónico el bloqueo de la señalización beta-1,2 tiene efecto antitumoral.
5. El bloqueo del receptor adrenérgico beta-3 tiene efecto antitumoral.
6. El paradigma de estrés por restricción de movimiento es útil para indagar los efectos del estrés crónico en el modelo de ratón BALB/c.

LITERATURA CITADA

- Abhinand, C. S., Raju, R., Soumya, S. J., Arya, P. S., & Sudhakaran, P. R. (2016). VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *Journal of cell communication and signaling*, 10(4), 347–354. <https://doi.org/10.1007/s12079-016-0352-8>
- Barbieri, A., Bimonte, S., Palma, G., Luciano, A., Rea, D., Giudice, A., ... & Arra, C. (2015). The stress hormone norepinephrine increases migration of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *International journal of oncology*, 47(2), 527-534.
- Bagchi, M., Kim, L. A., Boucher, J., Walshe, T. E., Kahn, C. R., & D'Amore, P. A. (2013). Vascular endothelial growth factor is important for brown adipose tissue development and maintenance. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(8), 3257–3271. <https://doi.org/10.1096/fj.12-221812>
- Bernard, P. S., & Wittwer, C. T. (2002). Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clinical chemistry*, 48(8), 1178-1185.
- Brooks, S. L., Neville, A. M., Rothwell, N. J., Stock, M. J., & Wilson, S. (1981). Sympathetic activation of brown-adipose-tissue thermogenesis in cachexia. *Bioscience reports*, 1(6), 509-517.
- Bruno, G., Cencetti, F., Pini, A., Tondo, A., Cuzzubbo, D., Fontani, F., ... & Calvani, M. (2020). β 3-adrenoreceptor blockade reduces tumor growth and increases neuronal differentiation in neuroblastoma via SK2/S1P2 modulation. *Oncogene*, 39(2), 368-384.
- Cao, Y. (2010). Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nature reviews Drug discovery*, 9(2), 107-115.
- Camps, C., Sánchez, P. T., & Sirera, R. (2006). Inmunología, estrés, depresión y cáncer. *Psicooncología*, 3(1), 35-48.
- Cigolani, H. y Houssay, B. (2000) *Fisiología Humana*, 7a Edición. Buenos Aires El Ateneo.
- Cole, S. W., & Sood, A. K. (2012). Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer. *Clinical cancer research*, 18(5), 1201-1206.
- Corrêa, L. H., Heyn, G. S., & Magalhaes, K. G. (2019). The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. *Cells*, 8(7), 662. <https://doi.org/10.3390/cells8070662>

- Chalothorn D, Clayton JA, Zhang H, Pomp D, Faber JE. Collateral density, remodeling, and VEGF-A expression differ widely between mouse strains. *Physiol Genomics*. 2007 Jul 18;30(2):179-91. doi: 10.1152/physiolgenomics.00047.2007. Epub 2007 Apr 10. PMID: 17426116.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), 156-159.
- Chuang JC, Cui H, Mason BL, Mahgoub M, Bookout AL, Yu HG, Perello M, Elmquist JK, Repa JJ, Zigman JM, Lutter M. Chronic social defeat stress disrupts regulation of lipid synthesis. *J Lipid Res*. 2010 Jun;51(6):1344-53. doi: 10.1194/jlr.M002196. Epub 2010 Feb 2. PMID: 20129912; PMCID: PMC3035497.
- Dai, S., Mo, Y., Wang, Y., Xiang, B., Liao, Q., Zhou, M., Li, X., Li, Y., Xiong, W., Li, G., Guo, C., & Zeng, Z. (2020). Chronic Stress Promotes Cancer Development. *Frontiers in oncology*, 10, 1492. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01492>
- Dal Monte, M., Casini, G., Filippi, L., Nicchia, G. P., Svelto, M., & Bagnoli, P. (2013). Functional involvement of β 3-adrenergic receptors in melanoma growth and vascularization. *Journal of molecular medicine*, 91(12), 1407-1419.
- Deacon, S. P. (1978). The effects of atenolol and propranolol upon lipolysis. *British journal of clinical pharmacology*, 5(2), 123-125.
- Dvorak, H. F. (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.
- Elias, I., Franckhauser, S., Ferré, T., Vilà, L., Tafuro, S., Muñoz, S., ... & Bosch, F. (2012). Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 61(7), 1801-1813.
- Elfving, B., Jakobsen, J. L., Madsen, J. C. B., Wegener, G., & Müller, H. K. (2015). Chronic restraint stress increases the protein expression of VEGF and its receptor VEGFR-2 in the prefrontal cortex. *Synapse*, 69(4), 190-194.
- Evangelista, F. S., Brum, P. C., & Krieger, J. E. (2003). Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(12), 1751-1759.

- Felten, D. L. (2000). Neural influence on immune responses: underlying suppositions and basic principles of neural-immune signaling. *Progress in brain research*, 122, 381-389.
- Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M., & Breitman, M. L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376(6535), 66-70.
- 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.
- Galarraga, M., Campión, J., Muñoz-Barrutia, A., Boqué, N., Moreno, H., Martínez, J. A., ... & Ortiz-de-Solórzano, C. (2012). Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *Journal of lipid research*, 53(12), 2791-2796.
- Garza Salazar, J. G., & Juárez Sánchez, P. (2013). El cáncer.
- Gomez-Flores, R., Caballero-Hernández, D., Tamez-Guerra, R., Rodríguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, P., Rice, K. C., ... & Weber, R. J. (2005). Increased survival of tumor-bearing mice by the delta opioid SNC 80. *Anticancer research*, 25(6C), 4563-4567.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
- Henriques, F., & Júnior, M. L. B. (2020). Adipose tissue remodeling during cancer-associated cachexia: translational features from adipose tissue dysfunction. *Immunometabolism*, 4(3).
- Herold, J., & Kalucka, J. (2020). Angiogenesis in Adipose Tissue: the interplay between adipose and endothelial cells. *Frontiers in Physiology*, 11.
- Kandel, E., Schwartz, J.H. y Jessell, T.M. (2001). *Principios de Neurociencia*. McGraw-Hill/ Interamericana de España S.A.U., Madrid.
- Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., and Claesson-Welsh, L. (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J* 437, 169-183.
- Knights, A. J., Wu, J., & Tseng, Y. H. (2020). The Heating Microenvironment: Intercellular Cross Talk Within Thermogenic Adipose Tissue. *Diabetes*, 69(8), 1599–1604. <https://doi.org/10.2337/db20-0303>
- Lee, Y. J., Karl, D. L., Maduekwe, U. N., Rothrock, C., Ryeom, S., D'Amore, P. A., & Yoon, S. S. (2010). Differential effects of VEGFR-1 and VEGFR-2 inhibition on tumor metastases based on host organ environment. *Cancer research*, 70(21), 8357-8367.
- Moscoso, M. (2014). El estudio científico del estrés crónico en neurociencias y psicooncología. *Persona*, (17), 53-70.

- Navarro, X. (2002). Fisiología del sistema nervioso autónomo. *Revista Neurológica*, 35(6), 553-562.
- Nieves, B. J., D'Amore, P. A., & Bryan, B. A. (2009). The function of vascular endothelial growth factor. *BioFactors (Oxford, England)*, 35(4), 332–337. <https://doi.org/10.1002/biof.46>
- Petrovich GD, Lougee MA. Sex differences in fear-induced feeding cessation: prolonged effect in female rats. *Physiol Behav*. 2011 Oct 24;104(5):996-1001. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.06.020. Epub 2011 Jul 1. PMID: 21745485.
- Population fact sheets [Internet]. Mexico: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer Global Cancer Observatory, Cancer Today;2021. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>
- Przewratil, P., Kobos, J., Wnęk, A., Szemraj, J., Wyrzykowski, D., Chrzanowska, B., ... & Taran, K. (2016). Serum and tissue profile of VEGF and its receptors VEGFR1/R2 in children with infantile hemangiomas on systemic propranolol treatment. *Immunology Letters*, 175, 44-49.
- Qin, J., Jin, F., Li, N., Guan, H., Lan, L., Ni, H., & Wang, Y. (2015, May 31). Adrenergic receptor β 2 activation by stress promotes breast cancer progression through macrophages M2 polarization in tumor microenvironment. *BMB Reports. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology - BMB Reports*. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2015.48.5.008>
- Rains, S. L., Amaya, C. N., & Bryan, B. A. (2017). Beta-adrenergic receptors are expressed across diverse cancers. *Oncoscience*, 4(7-8), 95–105. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.357>
- Roberts, D. M., Kearney, J. B., Johnson, J. H., Rosenberg, M. P., Kumar, R., & Bautch, V. L. (2004). The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flt-1 (VEGFR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation. *The American journal of pathology*, 164(5), 1531-1535.
- Rodríguez-Fernández, J. M., García-Acero, M., & Franco, P. (2013). Neurobiología del estrés agudo y crónico: su efecto en el eje hipotálamohipófisis-adrenal y la memoria. *Universitas médica*, 54(4), 472-494.
- Russell, S. T., & Tisdale, M. J. (2012). Role of β -adrenergic receptors in the oral activity of zinc- α 2-glycoprotein (ZAG). *Endocrinology*, 153(10), 4696-4704.
- Ruwhof, C., & van der Laarse, A. (2000). Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovascular research*, 47(1), 23-37.

- Sa-Nguanraksa, D., & O-Charoenrat, P. (2012). The role of vascular endothelial growth factor a polymorphisms in breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 13(11), 14845–14864. <https://doi.org/10.3390/ijms131114845>
- Shellock, F. G., Riedinger, M. S., & Fishbein, M. C. (1986). Brown adipose tissue in cancer patients: possible cause of cancer-induced cachexia. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 111(1), 82-85.
- Schlich, R., Willems, M., Greulich, S., Ruppe, F., Knoefel, W. T., Ouwens, D. M., ... & Sell, H. (2013). VEGF in the crosstalk between human adipocytes and smooth muscle cells: depot-specific release from visceral and perivascular adipose tissue. *Mediators of inflammation*, 2013.
- Schmidt, M. V., Scharf, S. H., Liebl, C., Harbich, D., Mayer, B., Holsboer, F., & Müller, M. B. (2010). A novel chronic social stress paradigm in female mice. *Hormones and Behavior*, 57(4–5), 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.01.010>
- Shibuya M. (2014). VEGF-VEGFR Signals in Health and Disease. *Biomolecules & therapeutics*, 22(1), 1–9. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2013.113>
- Szumiel, I. (2005). L5178Y sublines: a look back from 40 years. Part 1: General characteristics. *International journal of radiation biology*, 81(5), 339-352.
- Thaker, P. H., Lutgendorf, S. K., & Sood, A. K. (2007). The neuroendocrine impact of chronic stress on cancer. *Cell cycle*, 6(4), 430-433.
- Torres, J. S. S., Cerón, L. F. Z., Bernal, S. I. F., Ordoñez, G. W. M., & Salguero, C. (2017). El rol de VEGF en la Angiogénesis fisiológica y tumoral. *Medicina*, 39(3), 190-209.
- Zahalka, A. H., Arnal-Estapé, A., Maryanovich, M., Nakahara, F., Cruz, C. D., Finley, L. W., & Frenette, P. S. (2017). Adrenergic nerves activate an angio-metabolic switch in prostate cancer. *Science*, 358(6361), 321-326.
- Zeeni N, Daher C, Fromentin G, Tome D, Darcel N, Chaumontet C. A cafeteria diet modifies the response to chronic variable stress in rats. *Stress*. 2013 Mar;16(2):211-9. doi: 10.3109/10253890.2012.708952. Epub 2012 Aug 10. PMID: 22775984.