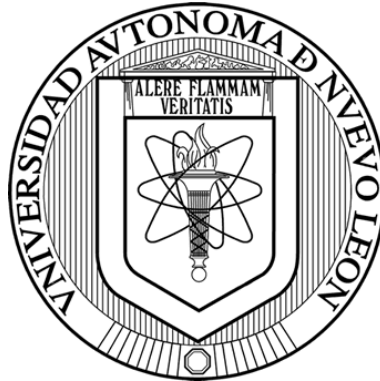


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**COMUNICACIÓN MULTIDIRECCIONAL ENTRE EL SISTEMA NERVIOSO
ADRENÉRGICO, TUMOR Y TEJIDO ADIPOSEO DURANTE LA PROGRESIÓN
TUMORAL**

Por

M. C. ISAIAS GUTIERREZ LEAL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

2026

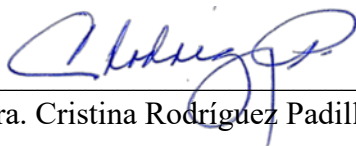
COMUNICACIÓN MULTIDIRECCIONAL ENTRE EL SISTEMA NERVIOSO
ADRENÉRGICO, TUMOR Y TEJIDO ADIPOSO DURANTE LA
PROGRESIÓN TUMORAL

COMITÉ DE TESIS

DIANA
CABALLERO

Dra. Diana Caballero Hernández

Presidente

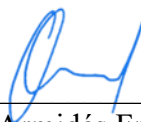


Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Secretario

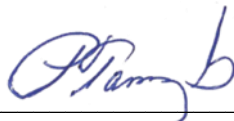


Dr. Ricardo A. Gómez Flores
1er. Vocal



Dr. Moisés Armidés Franco Molina

2do. Vocal



Dra. Patricia Tamez Guerra
3er. Vocal



Dra. Katiushka Arevalo Nino
Subdirector de Posgrado



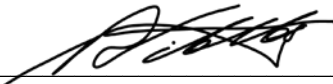
COMUNICACIÓN MULTIDIRECCIONAL ENTRE EL SISTEMA NERVIOSO
ADRENÉRGICO, TUMOR Y TEJIDO ADIPOSEO DURANTE LA PROGRESIÓN
TUMORAL

DIRECCIÓN DE TESIS

DIANA
CABALLERO

Dra. Diana Elia Caballero Hernández

Directora



Dr. Roman Vidal Tamayo Ramírez

Director Externo

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

Agradezco a la Dra. Diana Caballero Hernández por guiarme a través de toda la extensión del trabajo de investigación siendo pilar del mismo.

Agradezco al Dr. Román Vidal Tamayo por su asesoría y enseñanzas.

Agradezco a los miembros de mi comité por el apoyo con equipo técnico y observaciones para los entregables de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Deyanira Quistián Martínez por su apoyo con el equipo técnico para realizar este trabajo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de manutención durante el periodo del posgrado

Este trabajo fue posible gracias a los apoyos PAICYT clave CN1182-20 y PROACTI 9-BQ-2023.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por brindar la infraestructura para llevar a cabo el trabajo de investigación.

DEDICATORIAS

Para mis padres, Isaias Gutierrez Bravo y Eloisa Leal Rojas.

“Si he logrado ver más lejos, es porque estoy parado sobre hombros de gigantes.”

-Isaac Newton, 1675

ÍNDICE

DERECHOS DE AUTOR	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Sistema nervioso simpático: activación adrenérgica	3
Participación de la vía adrenérgica en cáncer y el uso de beta bloqueadores	4
Interacción bidireccional sistema nervioso adrenérgico- tumor	7
Deterioro cognitivo asociado a cáncer	9
Activación adrenérgica en los indicadores caquécticos: lipólisis, proteólisis e inflamación ...	10
Lipólisis y crecimiento tumoral	14
JUSTIFICACIÓN	16
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVO	18
Objetivos específicos	18
MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
Animales.....	19
Linfoma murino L5178Y-R.....	19
Diseño experimental.....	20
Simpatectomía	21
Tratamiento con Atorvastaina y Acipimox.....	21
Peso corporal e índice de masa corporal.....	21
Tejido graso interescapular, inguinal y visceral	21
Tejido muscular.....	22
Ingesta de alimento y agua	22
Activación de tejido adiposo interescapular.....	22
Volumen tumoral y peso tumoral final.....	22
Pruebas de conducta	23
Eutanasia y recolección de muestras.....	24

Extracción de ARN y obtención de cDNA.....	24
Expresión transcripcional de genes asociados a progresión tumoral y termogénesis.	25
Cuantificación de citocinas plasmáticas.....	25
Análisis metabolómico.....	26
Análisis estadístico.....	26
Efectos de la carga tumoral y el SNS sobre indicadores de composición corporal	27
Efectos de la carga tumoral y el SNS sobre la ingesta de agua y alimento.....	28
Efectos de la carga tumoral y el SNS sobre la composición de tejido adiposo y músculo.....	29
Efectos de la carga tumoral y el SNS sobre la activación del tejido adiposo interescapular ...	30
Efectos de la carga tumoral y el SNS sobre citocinas proinflamatorias.....	31
Efectos de la carga tumoral sobre la progresión tumoral	32
Efecto de la carga tumoral sobre indicadores de movilidad: Hembras.....	34
Efecto de la carga tumoral sobre indicadores de Ansiedad: Machos.....	35
Efecto de la carga tumoral sobre indicadores de ansiedad: Hembras	36
Efectos del sistema nervioso simpático y la carga tumoral sobre indicadores de movilidad: Hembras.....	38
Efectos del sistema nervioso simpático y la carga tumoral sobre indicadores de ansiedad: Hembras.....	40
Efectos del sistema nervioso simpático y la carga tumoral sobre la memoria de reconocimiento.....	41
Efectos de la carga tumoral sobre niveles de lípidos en plasma en ratones macho	42
Efecto de la carga tumoral y tratamientos con antilipidemicos en indicadores de movilidad en ratones macho	43
Efecto de la carga tumoral y tratamientos con antilipidemicos en indicadores de ansiedad en ratones macho	44
Efecto de la carga tumoral y tratamientos con antilipidemicos sobre la memoria de reconocimiento.....	45
Obtener los perfiles metabolómicos asociados a la carga tumoral y a un sistema nervioso simpático disfuncional y a su interacción: Machos	46
Obtener los perfiles metabolómicos asociados a la carga tumoral y a un sistema nervioso simpático disfuncional y a su interacción: Hembras.....	47
Análisis de PCA y PLSDA de perfiles metabolómicos asociados a la carga tumoral y a un sistema nervioso simpático disfuncional y a su interacción: Machos	48
Análisis de PCA y PLSDA de perfiles metabolómicos asociados a la carga tumoral y a un sistema nervioso simpático disfuncional y a su interacción: Hembras	50

Mapa de calor de los perfiles metabolómicos asociados a la carga tumoral y a un sistema nervioso simpático disfuncional y a su interacción: Machos.....	51
Mapa de calor de los perfiles metabolómicos asociados a la carga tumoral y a un sistema nervioso simpático disfuncional y a su interacción: Hembras.....	52
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	60
PERSPECTIVAS.....	61
REFERENCIAS.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Efectos de la carga tumoral y el SNS sobre indicadores de composición corporal	27
Figura 2	Efectos de la carga tumoral y el SNS sobre la ingesta de agua y alimento	28
Figura 3	Efectos de la carga tumoral y el SNS sobre la composición de tejido adiposo y músculo	29
Figura 4	Efectos de la carga tumoral y el SNS sobre la activación del tejido adiposo interescapular	30
Figura 5	Efectos de la carga tumoral y el SNS sobre citocinas proinflamatorias	31
Figura 6	Efectos de la carga tumoral sobre la progresión tumoral	32
Figura 7	Efectos de la carga tumoral sobre indicadores de movilidad: Machos	33
Figura 8	Efecto de la carga tumoral sobre indicadores de movilidad: Hembras	34
Figura 9	Efecto de la carga tumoral sobre indicadores de Ansiedad: Machos	35
Figura 10	Efecto de la carga tumoral sobre indicadores de Ansiedad: Hembras	36
Figura 11	Efectos del sistema nervioso simpático y la carga tumoral sobre indicadores de movilidad: Machos	37
Figura 12	Efectos del sistema nervioso simpático y la carga tumoral sobre indicadores de movilidad: Hembras	38
Figura 13	Efectos del sistema nervioso simpático y la carga tumoral sobre indicadores de ansiedad: Machos	39
Figura 14	Efectos del sistema nervioso simpático y la carga tumoral sobre indicadores de ansiedad: Hembras	40
Figura 15	Efectos del sistema nervioso simpático y la carga tumoral sobre la memoria de reconocimiento	41
Figura 16	Efectos de la carga tumoral sobre niveles de lípidos en plasma en ratones macho	42
Figura 17	Efecto de la carga tumoral y tratamientos con antilipidemicos en indicadores de movilidad en ratones macho	43
Figura 18	Efecto de la carga tumoral y tratamientos con antilipidemicos en indicadores de ansiedad en ratones macho	44
Figura 19	Efecto de la carga tumoral y tratamientos con antilipidemicos sobre la memoria de reconocimiento	45
Figura 20	Obtener los perfiles metabólicos asociados a la carga tumoral y a un sistema nervioso simpático disfuncional y a su interacción: Machos	46
Figura 21	Obtener los perfiles metabólicos asociados a la carga tumoral y a un sistema nervioso simpático disfuncional y a su interacción: Hembras	47
Figura 22	Análisis de PCA y PLSDA de perfiles metabólicos asociados a la carga tumoral y a un sistema nervioso simpático disfuncional y a su interacción: Machos	48
Figura 23	Análisis de PCA y PLSDA de perfiles metabólicos asociados a la carga tumoral y a un sistema nervioso simpático disfuncional y a su interacción: Hembras	50
Figura 24	Mapa de calor de los perfiles metabólicos asociados a la carga tumoral y a un sistema nervioso simpático disfuncional y a su interacción: Machos	51

Figura 25 Mapa de calor de los perfiles metabólicos asociados a la carga tumoral y a un sistema nervioso simpático disfuncional y a su interacción: Hembras

52

RESUMEN

El estudio del papel del sistema nervioso simpático (SNS) en cáncer se ha centrado en su acción sobre la progresión tumoral. Sin embargo, estudios apuntan a un papel más amplio de la acción del sistema adrenérgico sobre la progresión del cáncer, involucrando también al tejido adiposo. A su vez, estudios sugieren que el tumor influye sobre el sistema nervioso central. El objetivo de este trabajo fue dilucidar el papel de la comunicación entre el sistema nervioso adrenérgico, el tumor y el tejido adiposo en la progresión tumoral y el desarrollo de síndromes para neoplásicos como caquexia y deterioro cognitivo en un modelo murino de linfoma L5178Y-R. Para lograrlo, se realizó una ablación química de terminaciones nerviosas simpáticas con el compuesto 6-OHDA en ratones macho BALB/c portadores de tumor. Se observaron alteraciones en indicadores de caquexia asociados al tumor, incluyendo reducción del 10.5% en el índice de masa corporal (IMC), desgaste en los depósitos de grasa visceral del 37.17% y reducción del 12% en la ingesta de alimento. Por otro lado, la carga tumoral se asocia a un índice de reconocimiento por debajo al 50% en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso en ratones hembras y macho portadores de tumor, lo cual es un indicador de deterioro cognitivo. En cambio, al tratar con Acipimox a ratones portadores de tumor, el índice de reconocimiento se mantuvo en 63.71% en promedio. Al explorar el perfil metabólico en los ratones portadores de tumor, se observaron alteraciones principalmente en lípidos, tales como fosfatidilcolinas, ceramidas y esfingomielinas. En conclusión, el tumor L5178Y-R en ratones BALB/c se asocia con indicadores de caquexia como la movilización de lípidos con la participación del sistema nervioso simpático. La carga tumoral también se asocia con deterioro cognitivo, y este deterioro se previene con el utilizar un hipolipemiante, sugiriendo que la movilización de lípidos contribuye en el deterioro cognitivo en ratones con tumor.

ABSTRACT

The role of the sympathetic nervous system (SNS) in cancer has primarily been studied in terms of cancer progression. However, recent research has revealed a broader involvement of the sympathetic nervous system in interactions with cancer and its progression, including other cells such as adipose tissue. In addition, studies suggest that tumors influence the central nervous system. This study aims to investigate the communication between the adrenergic nervous system, tumors, and adipose tissue in tumor progression, specifically focusing on the development of paraneoplastic syndromes such as cancer cachexia and cancer-associated cognitive impairment in the murine lymphoma cancer model L5178Y-R. To achieve this, we performed a chemical sympathectomy using the neurotoxin 6-OHDA in tumor-bearing male BALB/c mice. We observed tumor associated cachexia indicators, including a 10.5% reduction in body mass index (BMI), a 37.17% visceral fat wasting, along with a 12% reduction in food intake. Furthermore, tumor burden was associated to a below 50% recognition index in the novel object recognition test in male and female-tumor bearing mice. In contrast, when tumor-bearing mice were treated with Acipimox, this recognition index remained at an average of 63.71%. When exploring the metabolomic profile in tumor-bearing mice, alterations were observed mainly in lipids, such as phosphatidylcholines, ceramides, and sphingomyelins. In conclusion, the bearing of a L5178Y-R tumor in BALB/c mice, is associated with cachectic indicators, such as lipid mobilization, with the participation of the sympathetic nervous system. Tumor burden was also associated with cognitive impairment, which was prevented with the use of a hypolipidemic agent, suggesting that lipid mobilization contributes to the cognitive impairment observed in the tumor-bearing mice.

INTRODUCCIÓN

Durante el cáncer, el tumor interactúa no solo con su microambiente, sino también con su macro-ambiente, es decir órganos y sistemas con los que convive. El tumor es un tejido activo que secreta factores que pueden irrumpir el funcionamiento normal de estos tejidos lejanos. Y esta comunicación es multidireccional. Por una parte, es conocido que el sistema nervioso simpático (SNS) se comunica y promueve el crecimiento tumoral a través de la norepinefrina. Sin embargo, en el sentido contrario hablando de tumor hacia SNS ha sido menos estudio y también los efectos que pudieran ejercer sobre el sistema nervioso central. Algunos trabajos han observado alteraciones a nivel SNS y central en modelos murinos portadores de tumores periféricos, por otro lado, en algunos estudios en humanos se ha observado niveles elevados de norepinefrina en pacientes con cáncer comparado contra individuos con lesiones benignas. Esto sugiere que el tumor podría funcionar como un estresor.

Aunado a ello, esta NE además de promover la progresión tumoral a través de la activación de receptores adrenérgicos en el microambiente tumoral, también actúa sobre receptores adrenérgicos dispuestos en tejido adiposo activando lipólisis, y también activa el pardeamiento de tejido adiposo pardo en el fenómeno de termogénesis. Esto contribuye al desgaste energético y de tejido adiposo que caracteriza a la caquexia asociada a cáncer. Además, los ácidos grasos provenientes de esta lipólisis podrían contribuir en la dislipidemia asociada a cáncer, la dislipidemia se caracteriza por ratios alterados de colesterol y ácidos grasos libres, y se asocia a déficits cognitivos en enfermedades metabólicas como diabetes y obesidad, por lo que la dislipidemia también podría contribuir en deterioro cognitivo asociado a cáncer.

En este trabajo estudiamos la interacción multidireccional tumor SNS y tejido adiposo, para ello se realizó una simpatectomía en ratones macho BALB/c portadores del linfoma murino L5178Y-R y observamos indicadores moleculares y morfométricos de progresión tumoral y catabolismo de lípidos y proteico en caquexia. También, empleamos pruebas de conducta para evaluar memoria y ansiedad en los ratones, con el fin de evaluar los efectos del tumor sobre el sistema nervioso central. Para evaluar el papel de lipólisis sobre cognición se emplearon estatinas y un fármaco inhibidor de lipólisis en los ratones con

tumor y se realizaron pruebas para evaluar la memoria. Asimismo, se llevó a cabo un análisis de perfil metabólico en ratones portadores de tumor para identificar cambios biológicos asociados al tumor.

ANTECEDENTES

Sistema nervioso simpático: activación adrenérgica

El sistema nervioso simpático (SNS) en conjunto con el sistema nervioso parasimpático componen al sistema nervioso autónomo, los cuales regulan actividades fisiológicas de diversos tejidos. El SNS se activa durante situaciones de estrés en el fenómeno de "pelea o huida" al enfrentarse con un estresor. Incremento en el flujo sanguíneo hacia tejidos como el músculo esquelético y así prepara al cuerpo para una actividad física ardua. En contraste, el sistema nervioso parasimpático predomina durante condiciones de reposo con la finalidad de conservar y almacenar energía (McCorry 2007). En su estructura, el SNS se compone de neuronas pregangliónicas procedentes de las regiones torácicas y lumbares de la medula espinal distribuidas de manera bilateral y simétrica. Estas neuronas se comunican con neuronas postgangliónicas por medio del neurotransmisor acetilcolina el cual activa receptores nicotínicos. Las neuronas postgangliónicas activadas se distribuyen en órganos y tejidos efectores donde liberan las catecolaminas epinefrina y norepinefrina (NE) las cuales activan receptores alfa y beta-adrenérgicos con efectos que pueden o no contrastar al sistema nervioso parasimpático (Alshak y Das 2020). Además, estas neuronas pregangliónicas pueden hacer sinapsis con células cromafines de la medula adrenal las cuales sintetizan y liberan catecolaminas hacia el torrente sanguíneo como una respuesta sistémica (Tortora y Derrickson 2014). Los receptores beta-adrenérgicos son receptores heptahelicoidales transmembranales que activan proteínas G heterotriméricas en consecuencia a la unión de un ligando y activan la enzima adenilato ciclasa. Los receptores beta-adrenérgicos se clasifican en tres subtipos; β 1-2 y 3, donde los receptores β -1 se encuentran principalmente en tejido cardíaco, los β -2 se distribuyen extensivamente por el cuerpo y los receptores β -3 se distribuyen principalmente en tejido adiposo blanco y pardo (Cicarelli et al. 2019).

La interacción de las catecolaminas con los receptores adrenérgicos en respuesta a un estresor se conoce como "activación adrenérgica" y forma parte de un sistema adaptativo en el contexto de eventos estresantes agudos en la respuesta de pelea o huida. Un estrés prolongado puede producir una sobre activación crónica del sistema adrenérgico y es

detrimental en la salud (Johnson 2013). Existen tumores procedentes de las células cromafines de la medula adrenal y células paraganglionares que secretan cantidades excesivas de catecolaminas, y debido a esta secreción excesiva causan problemas adicionales como hipertensión, taquicardia, hiperglicemia y diaforesis (Alshak y Das 2020).

Participación de la vía adrenérgica en cáncer y el uso de beta bloqueadores

Diversos trabajos han estudiado el efecto del sistema nervioso simpático o adreno-medular sobre el desarrollo de patologías como el cáncer. En un estudio retrospectivo realizado por Fitzgerald (2009) pone al frente la hipótesis que propone a la norepinefrina como un factor etiológico del cáncer dado a distintas líneas de evidencia donde se asocia al uso de fármacos que pueden elevar los niveles extracelulares de norepinefrina, así como a estudios epidemiológicos que asocian a eventos estresantes y condiciones psicológicas con el desarrollo y progresión del cáncer. A la par, estudios epidemiológicos asocian el uso de bloqueadores de vía adrenérgica beta sobre los índices y progresión de cáncer. En un artículo de casos médicos reportan que el uso del bloqueador de receptores adrenérgicos no selectivo propanolol promueve la remisión del hemangioma infantil en once infantes, sin regresión en un periodo de hasta catorce meses (Léauté-Labrèze et al. 2008). Estudios en años más recientes encuentran que el uso de propanolol es seguro en fases clínicas con índices de recuperación altos y baja recurrencia en hemangioma infantil (Aletaha et al. 2012; Baselga et al. 2018; Kagami et al. 2018). Mientras tanto, en un análisis de una base de datos de seguros médicos de una población de Taiwán, en 24,238 pacientes comparan a 12,119 pacientes que consumían y a otros 12,119 que no consumían propanolol. Después de un seguimiento de doce años, encontraron que el uso de propanolol reduce los riesgos de cánceres tales como cabeza y cuello, esófago, estómago, colon y próstata (Chang et al. 2015) En un estudio más reciente, encuentran que el uso de propanolol se asocia a una menor incidencia de carcinoma hepatocelular en pacientes con cirrosis alcohólica (Li et al. 2020).

Tras el cúmulo de trabajos que evidencian que la norepinefrina, la cual es secretada por acción de un estresor, es capaz de promover el cáncer, algunos estudios se empiezan a enfocar en los efectos de la administración de la NE sobre modelos tumorales tanto *in-*

vitro como *in-vivo* con indicadores moleculares y celulares de progresión tumoral, así como el uso de antagonistas adrenérgicos para la prevención en el desarrollo de la enfermedad. En un trabajo *in vitro* trataron células de carcinoma nasofaríngeo HONE-1 con NE en un rango de concentraciones de 0 a 10 mM y encuentran que esta aumenta los niveles proteicos de MMP-2, MMP-9 y VEGF, así como la capacidad invasiva comparada contra células no tratadas con NE (Yang et al. 2006). En un trabajo realizado por Bernabé (2011) administra NE a 10 μ M e isoproterenol un agonista de receptores adrenérgicos a células escamosas de carcinoma oral SCC9 Y SCC15 y observa un incremento en la viabilidad celular y que este efecto es atenuado por el uso del antagonista propanolol. Además, encuentra niveles de IL-6 elevados en el sobrenadante celular comparado contra las células control. En otro trabajo, en células de cáncer de próstata DU145 encuentran que el tratamiento con NE a 10 μ M incrementa la proliferación celular, así como el potencial migratorio, y que afecta la expresión de marcadores moleculares de transición de epitelio mesenquimal como E-cadherina y vimentina, y que todos estos efectos son antagonizados con el uso de propanolol. Utilizando el ratón Fox *nu/nu* encontraron que la NE no afectaba el volumen tumoral pero sí incrementaba los niveles proteicos de MMP-2 y MMP-9 indicadores de progresión tumoral y de transición epitelio mesenquimal en tejido tumoral y este efecto era antagonizado por el propanolol (Barbieri et al. 2015). Otro trabajo en el modelo humano de cáncer de próstata PC-3 encuentran que la administración de NE a 10 mM no aumenta la proliferación celular, pero sí la capacidad migratoria en esta línea tumoral. Asimismo, en el modelo animal utilizando ratones hembra BALB/c *nu/nu* encuentra que la NE y el propanolol no tienen efecto sobre el volumen tumoral pero que el tratamiento con NE incrementa la metástasis a nódulos linfáticos y que este efecto era inhibido por el uso de propanolol (Palm et al. 2006). En el cáncer pancreático Guo (2009) observó que al tratar células tumorales pancreáticas Mia-pca-2, Bxpc-3 y PC-2 con NE en un rango de 0.1 a 10 mM incrementaba la migración celular, así como los niveles transcripcionales y proteicos de MMP-2, MMP-9 y VEGF y estos efectos son inhibidos por el uso de propanolol.

Los estudios en este contexto son amplios donde la NE y el propanolol son herramientas para estudiar los efectos del SNS sobre la progresión tumoral. Y como consecuencia, también se estudia el propanolol como un potencial tratamiento en cáncer. Sumado a los

trabajos anteriores ya citados, se ha comprobado también el efecto antitumoral del propanolol. Por ejemplo, en el melanoma uveal y cutáneo en las líneas celulares MEL270, OMM2.5, MP41, MP46, WM115 y WM266.4, se observó que el tratamiento con el propanolol reduce la migración celular, y los niveles proteicos de VEGF en sobrenadante y un efecto citotóxico por medio de inducción de apoptosis y arresto celular (Bustamante et al., 2019). En cáncer de hígado, se ha observado que el tratamiento con propanolol a en las líneas tumorales HepG2, HepG2.2.15 inhibe la proliferación celular en todas las líneas celulares y se observó también apoptosis en estas células por medio del método de anexina V-FITC (Wang et al. 2018). Algo a destacar es que en todos los trabajos anteriores mencionados se comprobó la expresión ya sea transcripcional o proteica de los receptores adrenérgicos en las líneas celulares donde los principales protagonistas son los receptores beta-adrenérgicos tipo β 1 y 2.

El estudio de los receptores tipo β -3 ha sido poco explorado, aunque algunos antecedentes han evidenciado su participación en la progresión tumoral y sugieren su bloqueo como un blanco terapéutico. Un antecedente directo es el trabajo realizado por Dal Monte (2013) donde observa que los receptores adrenérgicos tipo β -3 se expresan en células de melanoma B16F10 por inmunohistoquímica, posteriormente utiliza los antagonistas selectivos beta 3 SR59230A y el L-748,337 a 1, 2 y 10 μ M encontrando una reducción en la proliferación celular dosis dependiente. Aunado, observó que los tratamientos ejercían un efecto apoptótico en las células donde se alteraba el rating de Bax/BCL. Utilizando siRNAs específicos para los 3 receptores adrenérgicos encontró mayor participación de la vía beta 2 y 3 en estos efectos. También, observó un menor peso y volumen tumoral en el experimento *in-vivo* utilizando ratones C57BL/J. Otro trabajo realizado en melanoma en células tumorales humanas A375 encontró la expresión de receptores β -3 en células tumorales y su sobre expresión proteica en condiciones de hipoxia, observando efectos similares en células que componen el microambiente celular utilizando líneas celulares epiteliales como HUVEC y EPC. Además de un incremento en la migración celular en estas células por norepinefrina y su inhibición utilizando el antagonista beta 3 SR59230A (Calvani et al. 2015). En un trabajo reciente Minarelli et al. (2019) observa la presencia de receptores β -3 en neuroma y nervios periféricos en un modelo murino, y encuentra que

el tratamiento con el antagonista β -3 L-748,337 suprime la expansión de células perineurales reduce el tamaño del neuroma y mejora significativamente el estado del animal. En un trabajo más reciente, exploraron el papel de β -3 utilizando el agonista BRL37344 en la línea celular tumorigénica de neuroblastoma BE(2)C encontrando un incremento en la proliferación y que este efecto era inhibido por el antagonista beta 3 SR59230A. Estos resultados fueron confirmados en el modelo murino singénico NCI A/JCR portando células Nuero-2A, donde el SR59230A inhibe el crecimiento tumoral (Bruno et al. 2019). También, se ha encontrado la presencia de receptores adrenérgicos beta 3 en carcinoma de pulmón de células no pequeñas por inmunohistoquímica, y que su presencia es predominante en tejido canceroso y displásico comparado contra tejido adyacente. Y, que entre mayor el grado de malignidad y el estadio mayor es la expresión de β -3, esto analizado en un arreglo de tejido pulmonar de pacientes con cáncer pulmonar primario no metastásico sin tratamiento previo de quimioterapia o radioterapia. El mismo equipo estudió el efecto del silenciamiento del receptor con un siRNA, así como el uso del SR59230A y un anticuerpo monoclonal encontrando una disminución en la proliferación celular. *In vivo*, probaron con ratones C57BL/6 ADRB3^{-/-} y un ADRB3^{+/+} portadores del carcinoma pulmonar LLC encontrando regresión tumoral en el ratón knockout. También, al utilizar el anticuerpo anti-ADRB3 encontraron una reducción en el tamaño tumoral (Zheng et al. 2020).

Interacción bidireccional sistema nervioso adrenérgico- tumor

Un amplio rango de trabajos ha demostrado que el SNS influye la progresión tumoral, pero ha habido un acercamiento escaso en explicar una comunicación bidireccional, es decir: ¿El tumor es capaz de activar al sistema nervioso? Se ha observado que algunos tumores son capaces de secretar factores neurotróficos y neuropéptidos que promueven su propio crecimiento, así como el crecimiento de terminales nerviosas que lo sustentan de señales proliferativas, inmunosupresoras y de sobrevivencia (Cervantes-Villagrana y García-Acevez 2020). También, se ha asociado una mayor densidad de nervios con un mal pronóstico en la sobrevida de pacientes con carcinoma colorrectal (Albo et al. 2011). Se ha observado que algunas células tumorales tienen la facultad de migrar hacia tejido nervioso próximo en un fenómeno llamado "invasión perineural" como en el

estudiado por Bapat et al. (2016) donde en un modelo *in-vitro* utilizando células de cáncer pancreático Mia PaCa2 y BxPC-3 disertan el potencial invasivo a través de la señalización del factor de crecimiento nervioso. En otro trabajo encuentran que la secreción del factor de crecimiento nervioso es dada a través de señalización simpática β -2 en los tumores pancreáticos de ratones KPC y que el desarrollo del cáncer pancreático en este modelo se da por desarrollo de densidad neuronal, así como invasión perineuro de las células tumorigénicas y que este efecto es bloqueado al utilizar el antagonista β -2 selectivo ICI-118,551 (Renz et al. 2018). Estos antecedentes señalan la importancia de la inervación en el microambiente tumoral y los efectos de la secreción de neuropéptidos. Recientemente se publicaron los resultados de un estudio donde observan el metaboloma cerebral en ratones portadores de tumores derivados de pacientes PDX como cáncer pancreático, sarcoma y pulmonar. Observaron que estos tumores no directamente relacionados con el sistema nervioso central causan alteraciones en vías de biosíntesis proteica, de catecolaminas, metabolismo de aminoácidos, esfingolípidos entre otros (Kovalchuk et al. 2018). Otro trabajo importante en el área es uno realizado por Mravek et al., (2009) donde observa la activación de neuronas noradrenérgicas y oxitocinérgicas en cerebro por medio de Fos-tirosina hidroxilasa (una enzima limitante en la síntesis de catecolaminas) y Fos-oxitocina en ratas inoculadas con una inyección peritoneal del fibrosarcoma BP6-TU2. Observaron la activación de neuronas en el núcleo parabraquial área relevante en la activación ante un reto inmunológico, en un centro neuroendócrino hipotalámico como el paraventricular y la amígdala como un centro importante de eventos emocionales. Encontraron que, en comparación con ratas inoculadas con solución salina, Fos se expresaba en la amígdala, hipotálamo y núcleo parabraquial. Mientras, FOS/OXY se expresaba en el núcleo hipotalámico paraventricular y FOS/TH se expresaba en centros noradrenérgicos, tracto solitario nuclear y locus coeruleus. Esto evidencia la activación del sistema nervioso por presencia de un tumor. Nuestro grupo de trabajo ha observado de manera constante niveles elevados de norepinefrina plasmática en ratones hembras BALB/c portadores del linfoma murino L5178Y-R. En donde, se comparan grupos de ratones libres y portadores de tumor sujetos a un protocolo de estrés por restricción de movimiento contra ratones en reposo. Se ha observado que independientemente del protocolo de estrés, los niveles de norepinefrina son elevados comparado contra los

ratones libre de tumor, esto nos dice que la carga tumoral actúa como un estresor fisiológico activando al sistema nervioso simpático (Montero-Molina 2016; Caballero-Hernández 2017). En humanos se ha observado también la presencia de norepinefrina plasmática y glucocorticoides elevados en personas con lesiones benignas comparada contra personas con cánceres orales (Xie et al. 2014), así como en personas con cánceres de cabeza cuello (Bastos et al. 2018).

Deterioro cognitivo asociado a cáncer

Un resultado de esta comunicación del tumor con el sistema nervioso simpático y central es el deterioro cognitivo asociado a cáncer. Aunque su principal asociación es con los tratamientos anticáncer, algunas observaciones reportaron que en pacientes humanos con cáncer previo a tratamiento ya presentan deterioro cognitivo como es el caso en pacientes con cáncer de mama (Ahles et al. 2008). Al momento, es el tipo de cáncer que más ha reportado deterioro cognitivo que no es atribuido a quimioterapias, también ha habido reportes en cáncer de pulmón de células no pequeñas (Simo et al. 2015). Sin embargo, el estudio se ha centrado en quimioterapia.

Una revisión sistemática analizó la información en pacientes con cáncer de mama con y sin quimioterapia post cirugía e individuos sanos y encontró una disminución de materia gris en el cíngulo derecho y alteraciones en la integridad de la materia blanca en pacientes con cáncer previo a tratamiento con quimioterapia. También se observó hiperactivación parietal durante pruebas de memoria de trabajo en los individuos con cáncer (Sousa et al. 2015) Otro estudio en encontró una disminución en la densidad de materia blanca y un desempeño cognitivo bajo en el grupo con cáncer de pulmón de células no pequeñas (Simo et al. 2015)

Por otro lado, en ratones hembras BALB/c portadores del cáncer de colon CT26 encontró que el grupo portador de tumor presentaba niveles elevados de corticosterona plasmática y un aumento en el peso de glándula adrenal, además encontraron disminución en marcadores de neurogénesis en hipocampo tales como KI69 y DCX, y comportamientos asociados a depresión en la prueba de suspensión de cola (Yang et al. 2014).

Otro estudio realizado en ratas hembra Wistar que desarrollaba tumores mamarios después de ser expuestas a un carcinógeno encontró una elevación de IL-1 β plasmática elevado y una bajo desempeño en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (Pyter et al 2010). Otro estudio más reciente realizado por Walker et al., utilizó ratones BALB/c portadores de cáncer de mama 4T1 y EO771.lmb y observó un perfil inflamatorio en citocinas plasmáticas y un desempeño bajo en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso. Además, trató a ratones con medios condicionados y encontró un perfil inflamatorio similar a los ratones portadores de tumor y alteraciones en memoria (Walker et al. 2018).

Activación adrenérgica en los indicadores caquéuticos: lipólisis, proteólisis e inflamación

Las catecolaminas circulantes pueden contribuir en la progresión de caquexia asociada a cáncer. Síndrome multifactorial caracterizado por la pérdida progresiva de tejido musculoesquelético que puede estar acompañado por la pérdida de tejido adiposo, no puede ser revertido por un soporte nutricional convencional y conlleva hacia un deterioro funcional. Esta fisiopatología se caracteriza por un balance energético y proteico negativo conducido por una reducción en la ingesta de alimento y un metabolismo alterado (Fearon et al. 2011). A través de la activación de los receptores adrenérgicos tipo 3 los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el tejido adiposo, que inducen el fenómeno de termogénesis por medio del desacople del gradiente de protones en la membrana mitocondrial, que disrumpe la formación de ATP y genera calor por medio de la acción de la proteína desacopladora Ucp-1. En consecuencia, se disipa el tejido adiposo para generar calor (Fedorenko et al. 2015).

El fenómeno de pardeamiento del tejido adiposo ha sido estudiado en ratones tanto como en humanos. En ratones machos de la cepa BALB/c portadores del cáncer de colon c26 se ha descrito ya como dado la implantación tumoral hay alteraciones en el tejido adiposo y consumo energético del animal. Por un lado, se observa pérdida de peso, reducción en la ingesta de alimento, contenido del tejido adiposo interescapular y alteraciones en el intercambio respiratorio. También se observan niveles elevados de *Ucp-1* e *Il-6* (Tsoli et al. 2012). En un trabajo extensivo se encontró que la activación del tejido pardo es consistente en varios modelos tumorales murinos: Por ejemplo, en los genéticamente

modificados para cáncer pancreático, pulmonar, cáncer de piel; en un modelo de cáncer inducido químicamente con dietilnitrosamina, en un modelo singénico de cáncer de melanoma B16 y en modelos xenogénicos utilizando tumores derivados de pacientes Panc42 y Pan34 en ratones inmunocomprometidos SCID. El grupo de trabajo observó niveles elevados de *Ucp-1* y que esta elevación se da aun antes de que sea evidente el deterioro en el tejido adiposo y que empiece el desgaste muscular (Petruzelli et al. 2014). Estos dos trabajos mencionados demuestran que existen alteraciones metabólicas que se traducen en afectaciones del tejido adiposo por la carga tumoral. Por el lado humano se ha observado en preparaciones histológicas de tejido adiposo peri adrenal de pacientes con caquexia una mayor activación comparado contra tejido peri adrenal de pacientes que hayan fallecido por otras razones (Shellock et al. 1986). Estudios más recientes empleando tecnología como PET/CT han encontrado activación de tejido adiposo en pacientes con tumores neuroendocrinos como feocromocitomas y paragangliomas, los cuales secretan sustancias bioactivas como catecolaminas (Dundamadappa et al. 2007; Puar et al. 2016). Pero, también se ha observado la activación de tejido adiposo pardo en otros tipos de cáncer como linfomas, cáncer mamario y de colon. Se ha asociado la presencia de tejido adiposo pardo con una mala prognosis, una reducida sobrevivencia y con niveles elevados de norepinefrina plasmática (Cao et al. 2014; Dundamadappa et al. 2007; Brendle et al. 2020). El desarrollo generalizado de la movilización de lípidos tanto en tejido adiposo pardo como en el blanco se sintetiza a continuación:

Durante un evento que demanda una alta cantidad de energía como ayuno o ejercicio, los triglicéridos se movilizan para liberar ácidos grasos los cuales son liberados hacia tejidos periféricos para la beta oxidación y producción de ATP. La lipólisis se lleva a cabo por tres lipasas, la lipasa adipocítica de triglicéridos (ATGL), la lipasa sensible a hormonas (HSL) y la lipasa de monoacilglicerol que de manera consecutiva rompen a los triglicéridos hasta ácidos grasos y glicerol. El SNS está ampliamente involucrado puesto que las catecolaminas al unirse a los receptores adrenérgicos activan a la proteína quinasa A y G respectivamente (PKA/PKG). Estas quinasas fosforilan a HSL la cual se transloca hacia la superficie de los lípidos, y la proteína estructural peripilina A, la cual se separa de CG1-58 lo que le permite unirse y activar a ATGL, HSL y MSL los cuales disocian a los triglicéridos. Durante caquexia asociada a cáncer, este catabolismo puede ser

conducido por citocinas como TNF, IL-6, factor de movilización de lípidos ZAG y el péptido relacionado a la hormona paratiroidea, mientras que la insulina se asocia con un efecto anti lipolítico potente (Dalal 2019). Dado el papel del sistema nervioso simpático en la regulación de tejido adiposo a través de β -3, se han realizado algunos experimentos explorando el potencial terapéutico que este supone. Petruzelli et al. (2014) utilizó el antagonista SR59230A en ratones caquéticos y encontró que el tratamiento protege a los animales de la pérdida de peso, del desgaste de tejido adiposo de diversos depósitos, disminuye la expresión de *Ucp-1* además observa una protección en la pérdida de tejido musculo esquelético otro indicador de caquexia descrito más adelante. En un trabajo más reciente Jin et al. (2018) utilizó el L-748,337 un antagonista beta 3 con modificaciones químicas para buscar potenciar el efecto y lo prueba en ratones machos BALB/c con cáncer de colon C26 encontrando una protección en la pérdida de peso así como reducción de glicerol plasmático un indicador de lipolisis, y también un efecto antitumoral.

A su vez, la degradación de proteína en musculo es otro indicador de caquexia asociada a cáncer, la atrofia de musculo esquelético en caquexia se da principalmente por la vía de la ubiquitina-proteosoma. El proceso de ubiquitnación comienza con la activación ATP-dependiente de la ubiquitina por una enzima activadora E1. Después, esta es transferida a una enzima conjugadora E2. Por último, la ubiquitina es transferida de la enzima E2 hacia una E3 por medio de una enzima E3 ligasa. Una de las enzimas o genes más estudiados en atrofia muscular son las enzimas E3 MurF1 y Atrogin-1 (Bodine y Baehr, 2014). Estudios han asociado a la atrofia muscular con el eje hipotálamo pituitario adrenal en donde se ha observado que los glucocorticoides son capaces de inducir proteólisis por medio de la vía ubiquitina-proteosoma a través de la sobre expresión de MurF1 y Atrogin 1 y que el silenciamiento con siRNAs de estos genes previene proteólisis *in-vitro* (Castillero et al. 2013). Sin embargo, el efecto de la norepinefrina sobre atrofia muscular es variado y depende del tipo de tejido muscular, así como del receptor adrenérgico activado. En un trabajo realizado por Ito et al. (2019) en musculo cardíaco y el masetero, encontró que la activación de receptores beta-adrenérgicos tipo 1 inducen fibrosis y apoptosis en musculo cardíaco y masetero, mientras que la activación de receptores tipo beta 2 induce hipertrofia en ambos casos. Esto utilizando el agonista β -1 dobutamine y el agonista β -2 clenbuterol. Dando así un efecto catabólico al receptor β -1 y un efecto

protector al β -2 en ratones machos C57BL/6. Por otro lado, se ha observado que al utilizar el agonista tipo β -3 CL316,243 en ratones machos C57BL/6J incrementa la fuerza del musculo esquelético e induce hipertrofia (Puzzo et al. 2016). El uso de antagonistas adrenérgicos en la atrofia muscular y cáncer ha sido poco estudiado, aunque un estudio en ratas macho de la cepa Wistar de una edad avanzada de 19 meses ha encontrado que el uso de espidolol un "agente transformante anabólico catabólico" con actividad antagonista no selectiva para receptores tipo β -1, 2 además antagonista de 5-HT1A y parcial agonista tipo β -2 ejerce efectos benéficos. Se encontró un aumento en el peso corporal e índice de masa corporal al utilizar el compuesto, aunque este redujo de manera significativa el contenido adiposo. También disminuyó la expresión transcripcional de MuRF-1 aunque no afectó la expresión de Atrogin-1 en el musculo gastronemius (Potsch et al. 2014). Mientras que en un estudio de fase II en humanos con caquexia asociado a cáncer pulmonar de células no pequeñas y colorrectal encontró que el uso de espidolol incrementa la masa muscular sin afectar el tejido adiposo (Stewart et al. 2016).

Otra característica importante de caquexia asociada a cáncer es la presencia de citocinas inflamatorias circulantes que promueven los distintos mecanismos de lipólisis, proteólisis y anorexia. IL-6 es una citocina presente en este síndrome metabólico, en un trabajo se observó su presencia junto con TNF- α en pacientes caquéticos en caquexia temprana y tardía y se ha asociado su presencia con la presencia de ácidos grasos libres en circulación, además de la expresión transcripcional y proteica de *Ucp-1* en pacientes con caquexia. En ratones BALB/c portadores del cáncer de colon c26 también se ha observado que al utilizar un anticuerpo anti-IL-6 hay protección en el tejido adiposo inguinal, interescapular y muscular. Acompañado de una reducción en los niveles séricos de ácidos grasos libres, así como *Ucp-1* en tejido adiposo (Han et al. 2018). Se ha observado que en ratones APC min/+ los cuales desarrollan caquexia asociada a cáncer de colon, cuando estos se les electropora un plásmido para la sobreexpresión de IL-6, hay un incremento en el desgaste muscular comparado contra ratones sin el plásmido (Puppa et al. 2011). En pacientes humanos caquéticos, niveles elevados de IL-6 junto con TNF- α se ha asociado con anorexia e interesantemente los niveles de ghrelina se correlacionaron de manera positiva, indicando una posible resistencia a la ghrelina en pacientes con caquexia (Shinsyu et al. 2020). Estas citocinas inflamatorias también son un medio de comunicación con el

sistema nervioso, se sabe que la secreción de IL-6 puede ser inducida por activación β -3 en adipocitos (Tchiviela et al. 2009) Además, en astrocitos se ha observado que la activación de receptores tipo beta 2 induce la expresión de TNF- α así como la expresión de IL-6 (Laureys et al. 2014).

Lipólisis y crecimiento tumoral

Dado a la tasa de proliferación elevada en los tumores, es necesario una cantidad grande de energía que sustente este crecimiento además de nutrientes. Como se ha descrito en apartados anteriores, dentro del cáncer hay alteraciones en las vías catabólicas como lo es en las del tejido adiposo, estos lípidos son importantes como fuente de energía además como bloques biológicos para la constitución de membranas lipídicas y mensajeros químicos (Zaidi et al. 2013). Un medio de obtención de ácidos grasos por parte de los tumores es la síntesis de ácidos grasos y esto se ha observado en varias líneas celulares de cáncer de mama como MX1, MCF7, MDA-MB231 y MDA-MD157. Mediante la sobreexpresión del transcrito para el ácido graso sintasa, una enzima importante en lipogénesis en condiciones de hipoxia, y este resultado se confirmó *in-vivo* implantando las células MDA-MV231 en ratones desnudos (Furuta et al. 2008). También se ha observado la expresión transcripcional de la lipoproteína lipasa y CD36 una molécula carroñera o translocadora de ácidos grasos, que internaliza estos a la célula en cáncer de mama y sarcoma. Al utilizar un siRNA anti LPL hay una inhibición en el crecimiento celular y se ha encontrado la expresión por inmunohistoquímica de LPL y CD36 en tejidos de pacientes de cáncer de mama, liposarcoma y cáncer de próstata (Kuemmerle et al. 2011). Se ha observado que la expresión de CD36 está involucrada en la proliferación y migración celular en células MCF7 (Liang et al. 2018). En otro experimento se examinaron paneles histológicos de 133 pacientes con cáncer cervical y se observó la sobreexpresión de CD36 en tejido cervical canceroso comparado contra tejido cervical sano. Mientras que un análisis de Kaplan Meier indicó una prognosis desfavorable en pacientes con CD36 sobre expresado. En el mismo estudio con un siRNA bloquean al transcrito de CD36 y encuentran una disminución en la proliferación y migración celular (Deng et al. 2019). En otro trabajo por Yoshida et al. (2020) en el carcinoma de células escamosas de esófago correlaciona la expresión de CD36 por inmunohistoquímica con

características de agresividad del cáncer en 160 pacientes. También observa que utilizando un RNA de interferencia contra CD36 disminuía la viabilidad celular y el fenotipo de célula invasiva en células TE15. Observaciones similares se han realizado en cáncer colorrectal al analizar arreglos de tejido encontrando una expresión elevada de CD36 comparado contra tejido de colon sano. Otros análisis de este trabajo encontraron que al tratar tejido canceroso humano con un inhibidor de FASN se sobre expresaba los mensajeros de RNA para CD36, indicando un efecto compensatorio (Drury et al. 2020).

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una enfermedad con una alta incidencia y aun difícil de tratar. En México se registraron 89,536 casos de cáncer con un coste de 90,222 muertes en el 2020 (Iarc.fr, 2021). Adicionalmente, el cáncer se asocia con otras comorbilidades que impactan la calidad de vida del paciente tales como deterioro cognitivo, alteraciones en metabolismo lipídico y caquexia, este último un factor que contribuye en la mortalidad.

Por un lado, se sabe de la importancia de los efectos del SNS sobre el tumor, sin embargo, los efectos del tumor sobre el SNS y su interacción con otros tejidos tales como el tejido adiposo han sido menos estudiados. El entender la comunicación del tumor con otros sistemas de forma multidireccional tales como con el sistema nervioso central y el tumor nos puede ayudar a identificar blancos terapéuticos que ayuden a identificar blancos terapéuticos que prevengan o retarden tanto la progresión tumoral como síndromes para neoplásicos como caquexia y deterioro cognitivo asociado a cáncer.

HIPÓTESIS

El sistema nervioso simpático, la masa tumoral y el tejido adiposo se comunican entre sí de forma multidireccional promoviendo la progresión tumoral, el síndrome de caquexia y deterioro cognitivo asociado a cáncer en el modelo del linfoma L5178Y-R en ratones BALB/c.

OBJETIVO

Estudiar las interacciones entre sistema nervioso simpático, masa tumoral y tejido adiposo durante la progresión tumoral, caquexia y deterioro cognitivo.

Objetivos específicos

1. Evaluar el papel del sistema nervioso simpático sobre la progresión tumoral, catabolismo lipídico y proteico.
2. Determinar el efecto de la masa tumoral sobre el sistema nervioso central en ratones BALB/c portadores del linfoma murino L5178Y-R.
3. Determinar el papel del sistema nervioso simpático en los efectos de la masa tumoral sobre el sistema nervioso central.
4. Evaluar la relación entre las alteraciones en el metabolismo lipídico durante progresión tumoral y deterioro cognitivo.
5. Identificar cambios metabólicos asociados a la carga tumoral y la contribución del sistema nervioso simpático a ese paisaje metabólico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones macho y hembra de 10-12 semanas de edad de la cepa BALB/c los cuales fueron proporcionados por el bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la UANL. Se mantuvieron en jaulas microventiladas con acceso a agua y alimento *ad libitum* con un ciclo luz/oscuridad de 12 h, a una temperatura ambiental controlada de 22 °C y humedad relativa de 45%. Se enriqueció su ambiente con tubos de cartón para la creación de nidos y recreación del murino. Todos los procedimientos de trabajo con los animales fueron sometidos para su aprobación por el comité interno de ética del Departamento de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL (CEIBA-2021-003).

Linfoma murino L5178Y-R

Se utilizó el linfoma murino L5178Y-R como modelo de cáncer in vivo. El linfoma L5178YR se obtuvo originalmente en ratones de la cepa DBA/2 y ha sido utilizado ampliamente en ratones BALB/c puesto que poseen el mismo haplotipo (H-2d) que la cepa DBA/2. Las células L5178Y-R originales se obtuvieron a partir de un linfoma inducido con metilcolantreno en ratones DBA/2 el 8 de julio de 1951 en la Universidad de Yale (USA) (Szumiel et al. 2005 a, b). En cuanto al tipo celular, presentan 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 llevó a cabo por trasplante de ratón a ratón mediante la inyección i.p. de un volumen de 0.2 mL de una suspensión de células tumorales L5178Y-R (5×10^6 células/ratón) en ratones hembras BALB/c de 8 a 10 semanas de edad. Trece días después de la inoculación se colectó el líquido ascítico de la cavidad peritoneal del ratón (previamente sacrificado por dislocación cervical) en tubos cónicos de 50 mL con 10 mL de PBS. La suspensión celular se lavó dos veces en PBS, por centrifugación a 2000 rpm/10 min, y se ajustaron a una densidad de 2×10^7 células/mL en medio RPMI completo.

Para la formación sólida del tumor, se inoculó 0.2 mL de la suspensión de células ajustadas en la extremidad posterior derecha de ratones BALB/c por vía subcutánea (Gómez-Flores et al. 2005).

Diseño experimental

Para este estudio se llevó a cabo una serie de experimentos donde se probó la hipótesis en grupos de ratones machos y hembras de la cepa BALB/c, para lo cual se distribuyeron de manera aleatoria los diferentes grupos experimentales.

- a) Para el primer objetivo, se empleó una simpatectomía química en ratones machos con el compuesto 6-OHDA. Para esto, los ratones se dividieron en 4 grupos. Un grupo libre de tumor sin tratamiento (n=6), grupo sin tumor y simpatectomizados (n=6), un tercer grupo con tumor (n=6), y un cuarto grupo de ratones con tumor simpatectomizados (n=5).
- b) Para el segundo objetivo se realizaron pruebas para evaluar conducta y cognición en ratones portadores de tumor machos y hembras los cuales se dividieron en los siguientes grupos: Libre de tumor (n=8) y otro grupo portador de tumor (n=8) en machos y hembras
- c) Para el tercer objetivo se empleó simpatectomía en ratones machos y hembras portadoras de tumor y se evaluó conducta y cognición en los siguientes grupos: Libre de tumor + simpatectomía (n=8) y portador de tumor + simpatectomía (n=8) en machos y hembras
- d) Para el cuarto objetivo, se emplearon los hipolipemiantes Atorvastatina, Acipimox y se evaluó conducta y cognición. Para ello se dividieron ratones machos portadores de tumor en los siguientes grupos: Tumor tratado con Atorvastatina (n=8), y Tumor tratado con Acipimox (n=8).
- e) Finalmente, para el quinto objetivo se utilizó plasma de los animales experimentales del segundo y tercer objetivo para analizar los distintos metabolitos considerando 4 ratones por grupo.

Simpatectomía

Se llevó a cabo una ablación química de los terminales nerviosos simpáticos con el compuesto 6-OHDA disuelto en solución salina con 0.2% de ácido ascórbico por vía intraperitoneal a una concentración de 100 mg/kg de peso animal. La ablación simpática se realizó 7 días antes de la inoculación del tumor, administrando el 6-OHDA dos días consecutivos y se monitoreo diariamente el estado de los animales. Los síntomas que acompañan la administración del 6-OHDA y que se monitorearon durante el experimento son: la presencia de ptosis (caída del párpado) y presencia de sangre en orina (Horvathova et al. 2016).

Tratamiento con Atorvastaina y Acipimox

Los ratones machos recibieron Atorvastatina a 10mg/kg disuelto en 2% DMSO o Acipimox 50mg/kg disuelto en PBS por vía intraperitoneal diariamente.

Peso corporal e índice de masa corporal

Se determinó el peso de cada ratón cada dos días hasta finalizar el experimento, para ello se utilizó una balanza analítica y se registrarán los datos en la bitácora. Posteriormente se utilizó como referencia el primer peso registrado de cada ratón para calcular el porcentaje de peso corporal durante el experimento.

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

Tejido graso interescapular, inguinal y visceral

Posterior a la eutanasia, se colectaron los depósitos de grasa Interescapular, inguinal y visceral. Se pesaron las muestras de grasa y se calculó el porcentaje respecto al peso total. Se multiplicó por 100 el peso del tejido y se dividió entre el peso total del animal.

Tejido muscular

El músculo gastrocnemio y el corazón fueron disectados y pesados en una balanza analítica. Para el músculo gastrocnemio se realizaron los cálculos del porcentaje respecto al peso tal como se describió para el tejido graso.

Ingesta de alimento y agua

Se registró el consumo de alimento en gramos, utilizando una balanza analítica. El monitoreo se realizó, cada dos días hasta finalizar el experimento.

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

Activación de tejido adiposo interescapular

Para evaluar la activación del tejido adiposo pardo en los diferentes grupos, se extrajo la grasa parda interescapular después del sacrificio ético, se fijó en formaldehído al 4% por 24 h se prepararon cortes histológicos y se tiñeron con hematoxilina-eosina para su análisis por microscopía. Se tomaron fotografías de los cortes histológicos en un microscopio con un objetivo al 40X/0,65. Las imágenes se guardaron en el formato PNG. Posteriormente, se analizaron utilizando el software libre Image J (NIH) y el plugin Adiposoft para calcular número el área celular. Del tejido adiposo interescapular de cada individuo se analizaron como mínimo dos fotografías de distintas locaciones del mismo corte.

Volumen tumoral y peso tumoral final

Se midió el largo y ancho del tumor durante el tratamiento, cada tres días, utilizando un vernier digital (Fisher Scientific, Hampton, NH). Las medidas fueron tomadas por la misma persona para evitar variaciones en el registro. Se calculó el volumen tumoral de acuerdo a la siguiente formula: $VT = L \times A^2 / 2$ donde L= largo y A= ancho.

Al finalizar el experimento y posterior al sacrificio ético, se obtuvieron los tumores y se pesaron en una balanza analítica.

Pruebas de conducta

Antes de realizar las pruebas los ratones fueron manipulados por el experimentador principal al menos cada 2 días durante 2 semanas antes de comenzar las pruebas para reducir el estrés por manipulación. El día de las pruebas los grupos fueron llevados al cuarto de experimentación una hora antes para habituarse al espacio. El cuarto contaba con iluminación a 4 lux, temperatura de 22-25°C y el aire acondicionado fungía como ruido blanco con 65db.

Prueba de campo abierto: Los ratones se introdujeron de forma individual en una arena de 50 cm x 50cm x 50cm, y se les permitió explorar de forma libre durante 5 minutos, al terminar, el ratón se colocó aislado en una jaula. Se contaron el número de heces y la presencia de orina en la arena. La arena se limpió con etanol al 70% y se secó bien antes de comenzar la primera fase del reconocimiento de objeto novedoso. Para el análisis de campo abierto se utilizó el programa libre Toxtrac para calcular la distancia recorrida, tiempo en el centro, porcentaje de exploración y movilidad.

Prueba de reconocimiento de objeto novedoso (NORT): Esta prueba consta de una fase de entrenamiento y una fase de reconocimiento del objeto novedoso. En la fase de entrenamiento se les permitió a los ratones explorar objetos idénticos, durante 5-10 min, los ratones deben explorar un mínimo de 20 segundos cada objeto para pasar a la fase de reconocimiento. En la fase de reconocimiento se coloca un triplicado del objeto y un objeto nuevo y se le permite al ratón explorar la arena con los objetos durante 5 minutos.

Todas las pruebas fueron grabadas en video y se analizaron en el programa Toxtrac para obtener los parámetros de distancia recorrida, porcentaje de movilidad, porcentaje de exploración y tiempo en el centro. Para la prueba NORT, se registraron los tiempos de exploración de forma manual utilizando un timer, considerando que la nariz apunte hacia el objeto y se mantenga aproximadamente 5cm de distancia como máximo. Para el análisis de los resultados se empleó la formula siguiente: $(ON/ON-OC) \times 100 = \text{Índice de reconocimiento}$. Donde ON significa “objeto nuevo” y OC “objeto conocido”.

Eutanasia y recolección de muestras

Se empleó eutanasia por punción cardíaca terminal al finalizar cada tratamiento, se empleó una mezcla de ketamina/xilacina como anestésico a una concentración de 100 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilacina. En cada animal se llevó a cabo la punción cardíaca terminal utilizando jeringas de 1 mL, aguja Luer Lock de 27Gx13 mm, con trazas de anticoagulante EDTA. La sangre se recolectó en microtubos de 1.5 mL y se centrifugó a 5000 rpm por 10 min, al finalizar se colectó el plasma, se alicuotó y se almacenó a -80 °C. Después de la punción cardíaca, se aseguró la eutanasia de los animales con dislocación cervical, y se llevará a cabo disección para coleccionar tumor, grasa interescapular, inguinal, visceral, musculo gastrocnemio y corazón. El tumor y la grasa se pesarán en una balanza analítica y se almacenará a -80°C para su uso posterior.

Extracción de ARN y obtención de cDNA

Se extrajo ARN total (ácido ribonucleico) de tejido adiposo interescapular, y tumor por el método del QIAzol® Lysis Reagent de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La calidad de la extracción se aseguró cuantificando la cantidad de RNA y la absorbancia 260/230 utilizando un equipo Nanodrop. En breve, se homogenizaron 100 mg de tejido en 1 mL de QIAzol con un pistilo. Se incubó el homogenizado por 5 min a 25 °C. Enseguida, se adicionaron 0.2 mL de cloroformo, se agitó por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 15 min. Se centrifugó a 12,000 x g por 15 min a 4 °C. En seguida se colectó el sobrenadante y se le agregó 0.5 mL de isopropanol, se agitó en vórtex, se incubó a 10 min en temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol al 75%, se centrifugó a 7500 x g por 5 min a 4 °C. Finalmente, se decantó el sobrenadante, se dejó secar el pellet y se resuspendió en 20 µL de agua.

Para la retrotranscripción de ARN a cDNA se empleó el kit High Capacity ADNc Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Tras la cuantificación del RNA, se ajustó la cantidad de RNA a 2 µg. Las condiciones de reacción a utilizar fueron las siguientes: 25 °C (10 min), 37 °C (120 min), 85 °C (5 min) y 4 °C (∞). Una vez finalizada la retrotranscripción, el cDNA se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

Expresión transcripcional de genes asociados a progresión tumoral y termogénesis.

Se cuantificó la expresión relativa de los ARN mensajeros que codifican para los genes *Mmp-2* y *Mmp-9* en tumor y *Ucp-1* en tejido adiposo interescapular. Para evaluar los genes *Mmp-2* (MM00439498_M1) y *Mmp-9* (MM00442991_M1) se utilizaron sondas Taqman (Applied Biosystems) y el gen *Gadph* (Mm99999915_g1) como gen endógeno. Por otro lado, que para evaluar *Ucp-1* se utilizaron los siguientes primers: forward 5' AGT ACC CAA GCG TAC CAA GC-3' y reverse 5' TCG TGG TCT CCC AGC ATA GA-3' los cuales presentan un amplicón de 248 pb y para el gen endógeno beta actina se utilizaron los primers forward 5' TGA GCT GCG TTT TAC AC CCT-3' y reverse 5'GCC TTC ACC GTT CCA GTT TTT-3' los cuales presentan un amplicón de 198 pb. Todos los primers fueron adquiridos de Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA).

Para la reacción con las sondas Taqman se añadió 10 µL de TaqMan™ Universal Master Mix, 1 µL de sonda TaqMan™, 4 µL de agua libre de nucleasas y 5 µL de cDNA (100 ng). Las condiciones fueron las siguientes: 50 °C (2 min), 95 °C (10 min), 95 °C (15 seg; 40 ciclos), 60 °C (60 seg; 40 ciclos). Para la reacción con primers se utilizó el kit GoTaq qPCR Máster Mix (Promega Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y se realizaron curvas de fusión para asegurar la especificidad de los primers. Todas las reacciones se realizaron por duplicado y el análisis de resultados se realizó con ayuda del software del termociclador Real-Time PCR System 7500. La expresión relativa se determinó mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Cuantificación de citocinas plasmáticas

Se cuantificó la presencia de citocinas proinflamatorias IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- γ y TNF- α en plasma de los ratones de los diferentes grupos por citometría de flujo con el equipo (BD Accuri C6; Becton-Dickinson Biosciences, Ann Arbor, MI, USA) y utilizando el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse inflammation kit (BD Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, los datos obtenidos se analizaron con el programa FCAP Array Software V 3.0 (Soft Flow Hungary, Ltd., Pécs, Hungary). Se realizó la preparación de una curva de estándares (entre 20-5000 pg/mL) y las muestras. Se añadieron 50 µL de la mezcla de perlas de captura a cada tubo de ensayo,

50 μL de cada muestra y 50 mL de ficoeritrina, y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente y en ausencia de luz.

Después, se realizó un lavado con 1 mL de buffer de lavado y se centrifugaron los tubos por 5 minutos a 200 g. Finalmente, se aspiró el sobrenadante y se añadieron otros 300 μL del buffer de lavado y se resuspendieron las perlas con un vórtex para la lectura en el citómetro.

Análisis metabolómico

Para la obtención de los perfiles metabolómicos, se enviaron 80 microlitros de plasmas al TMIC (The Metabolomics Innovation Centre). Se enviaron los siguientes grupos para ratones macho y hembra: Libre de Tumor, Tumor, Libre de tumor + simpatectomía, Tumor + Simpatectomía.

Análisis estadístico

Para el análisis del objetivo uno, se determinó la distribución de los datos utilizando una prueba de Kolmogorov-Smirnov considerando los valores de p mayores a 0.05 con una distribución normal. Para este caso se aplicó la prueba estadística paramétrica de ANOVA de una vía seguida por comparaciones planeadas con corrección de Bonferroni y en caso contrario se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido por pruebas planeadas con corrección de Dunn's. Las pruebas planeadas en ambos casos fueron: Libre de tumor contra libre de tumor + simpatectomía, libre de tumor contra tumor y tumor contra tumor + simpatectomía. Para el análisis de la expresión transcripcional de las metaloproteinasas, cada gen se comparó de forma independiente contra el control usando una prueba Dunn. Para las determinaciones conductuales en el segundo, tercer y cuarto objetivo, se utilizó ANOVA de medidas repetidas. Los valores de $p \leq 0.05$ se consideraron como estadísticamente significativos. Para el quinto objetivo, se ingresaron los datos crudos a la plataforma MetaboAnalyst 6.0 (Pang et al. 2024), donde se realizó un análisis estadístico de un solo factor. Se seleccionó la opción de concentración como tipo de datos y, posteriormente, se estableció un umbral máximo del 20% para valores faltantes. Para la normalización de los datos se empleó el escalamiento automático (auto scaling). Finalmente, se llevaron a cabo los análisis de análisis de varianza (ANOVA), análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLSDA), análisis de componentes principales (PCA) y análisis de mapa de calor (heatmap).

RESULTADOS

Efectos de la carga tumoral y el SNS sobre indicadores de composición corporal

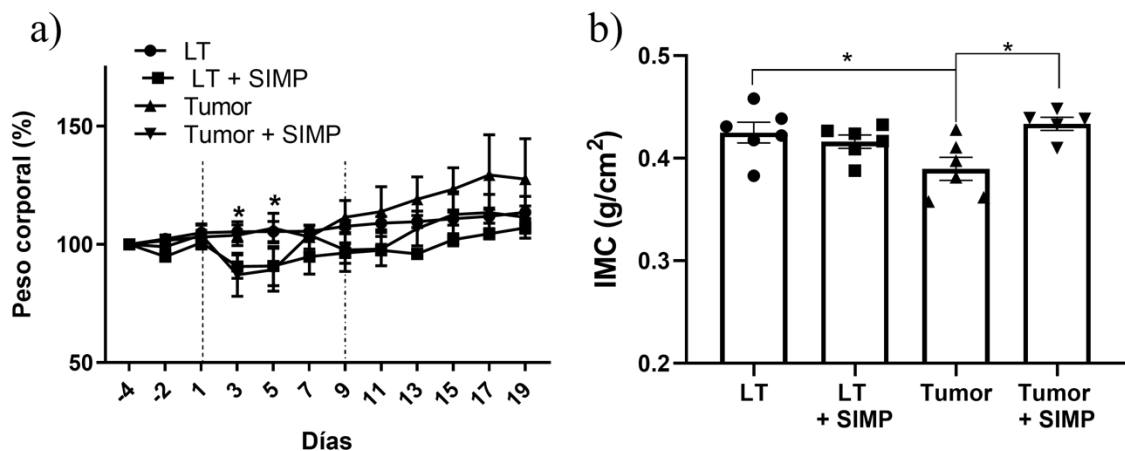


Figura 1.- a) Evolución del peso corporal en ratones con simpatectomía (SIMP) tanto libres de tumor (LT) y portadores de tumor (Tumor) durante el experimento, la primera línea punteada corresponde al día de la simpatectomía mientras la segunda línea corresponde a la implantación tumoral. En la segunda gráfica b) se observa el IMC, para calcularlo se restó el peso del tumor. Los valores se presentan como la media \pm el error estándar de la media de 6 ratones. Los valores de p igual o menores a 0.05 se consideran estadísticamente significativo.

Los valores de peso corporal fueron normalizados al día -4, cuatro días antes de la simpatectomía. En los grupos simpatectomizados se observó disminución significativa en el peso corporal en los días 3 y 5 ($p=0.011$; 0.03) en un 9.3 y un 9.1% para el grupo LT + SIMP y en un 11.7 y 10.6% en el grupo Tumor + SIMP respectivamente en los días 3 y 5 ($p=0.017$; 0.017). A partir del día 7 no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos durante la progresión del experimento (Fig.1a). Para calcular el índice de masa corporal (IMC) se restó la diferencia de la masa tumoral en los grupos tumor. Se observó una disminución significativa en el IMC asociado a la carga tumoral en un 10.5% ($p=0.033$) comparado contra el grupo LT observando una media de IMC de 0.38 g/cm² comparado a 0.42 g/cm² en el grupo LT. Al comparar el IMC en el grupo tumor contra el grupo tumor simpatectomía se observó un restablecimiento a un IMC de 0.43 g/cm². No se observó efecto en el grupo LT + SIMP comparado contra el grupo LT (Fig. 1b).

Efectos de la carga tumoral y el SNS sobre la ingesta de agua y alimento

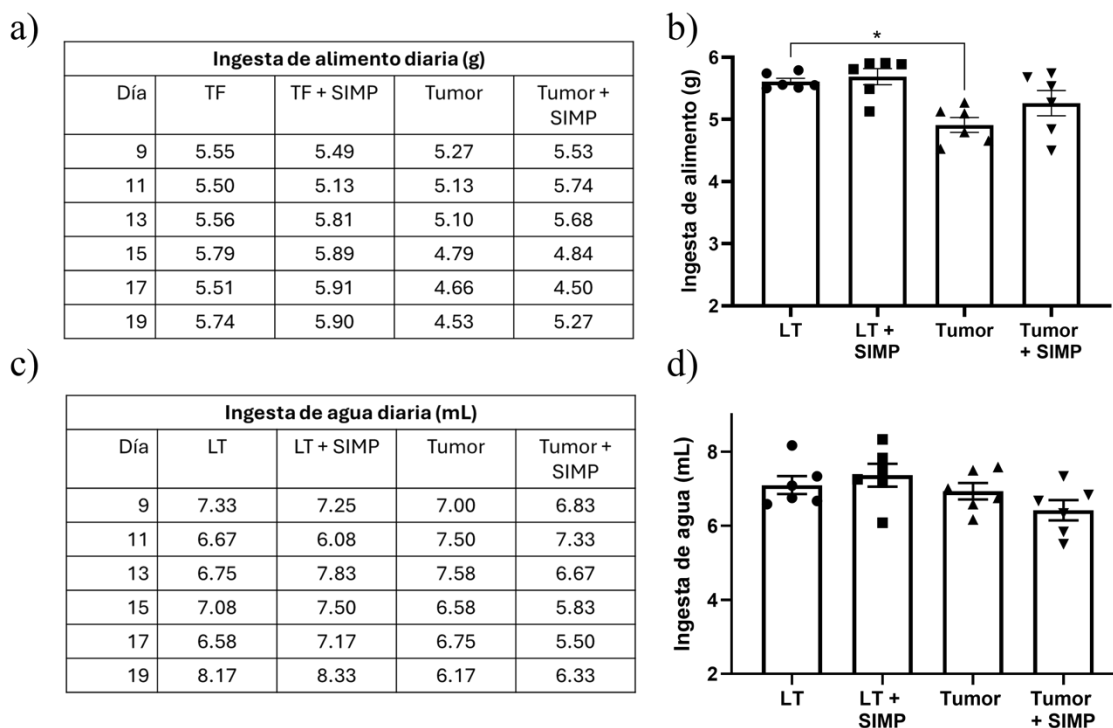


Figura 2.- En las tablas a) y c) se presentan los valores del consumo de alimento y agua diario en ratones libre de tumor (LT) y con simpatectomía (SIMP) a partir del día de la implantación tumoral. En las gráficas b) y d) se presentan los valores de ingesta total. Los valores se presentan como la media \pm el error estándar de la media. Los valores de p igual o menores a 0.05 se consideran estadísticamente significativo (*).

La implantación tumoral se realizó al día 9 por lo que la conducta alimentaria se monitoreo empezando desde ese día. Se observó que la ingesta de alimento se mantuvo similar durante el experimento en los grupos sin tumor, sin embargo, a partir del día 15 que corresponde a 6 días después de la implantación tumoral disminuye la ingesta de alimento hacia valores menores a 5 gramos como se observa en la tabla 2a. A calcular la ingesta de alimento total se observó una disminución significativa del 12% comparado contra el grupo libre de tumor ($p= 0.04$) en ingesta de alimento asociada a tumor con una media de consumo de alimento de 4.9g mientras el grupo libre de tumor consumió 5.58g (Fig. 2b). En cuanto a la ingesta de agua, no se observaron cambios estadísticamente significativos asociados a la carga tumoral o a la simpatectomía (Fig.2d).

Efectos de la carga tumoral y el SNS sobre la composición de tejido adiposo y músculo

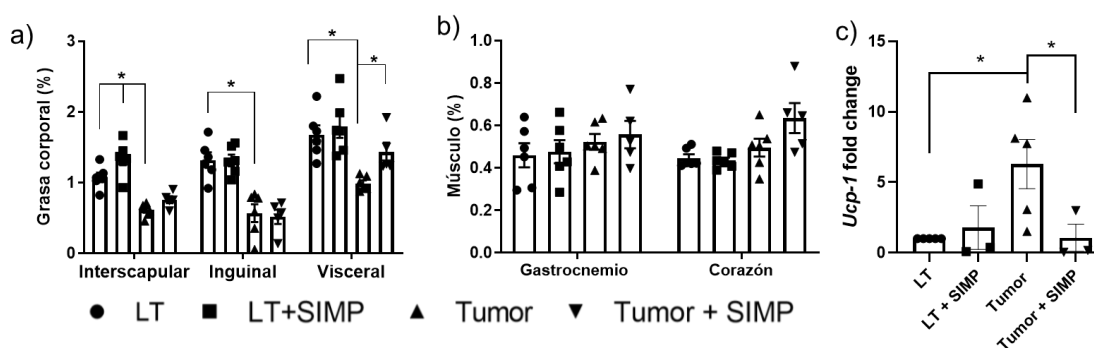


Figura 3.- Se presentan los valores de porcentaje con respecto al peso de a) grasa y b) músculo de diferentes depósitos en ratones con simpatectomía (SIMP) libres de tumor (LT) y portadores de tumor. En la gráfica c) se presentan los niveles de *Ucp-1* relativos expresados en el tejido adiposo interscapular. Los valores de p igual o menores a 0.05 se consideran estadísticamente significativo.

En cuanto a la grasa corporal (Fig. 3a), se observó disminución asociada a la carga tumoral en los tres depósitos: Visceral (40.19% de reducción), inguinal (54% de reducción), y visceral (37.17% de reducción) con valores de $p=0.001$, $p=0.0007$, y $p=0.0085$ respectivamente comparado contra el grupo libre de tumor. Por su parte, en el grupo de tumor + SIMP no se observaron cambios estadísticamente significativos en los depósitos interscapular e inguinal, sin embargo, en la grasa visceral si se observa una atenuación en el desgaste de este depósito ($p=0.05$). Además, se observó un aumento significativo en grasa interscapular en un 25.18% en ratones con simpatectomía libres de tumor comparado contra el grupo libre de tumor ($P=0.0097$). Por otro lado, en el peso de músculo gastrocnemio y corazón, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, tal como se observa en la figura 2b. Por otro lado, al analizar la expresión relativa de *Ucp-1* en tejido adiposo interscapular, se encontró un aumento significativo de 6.2 veces ($p=0.03$) mientras que la simpatectomía restableció los niveles relativos de *Ucp-1* con valores de 1.06 veces en el grupo LT + SIMP y 1.78 veces en tumor + SIMP (Fig. 2c).

Efectos de la carga tumoral y el SNS sobre la activación del tejido adiposo interescapular

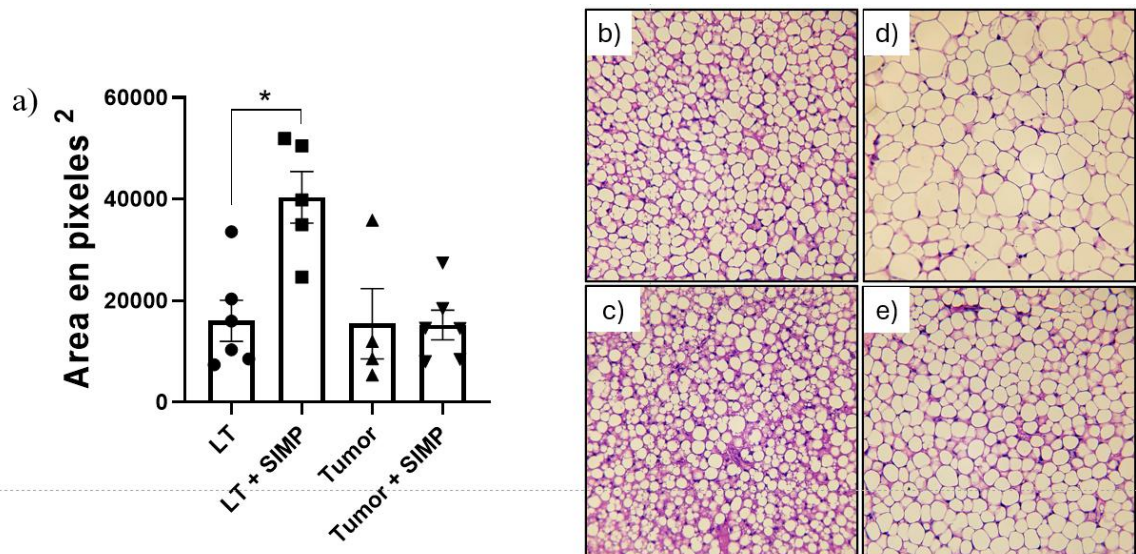


Figura 4.- Se presentan los valores del área en pixeles obtenidos con el programa de uso libre Adiposoft. Se presentan imágenes representativas de los grupos b) libre de tumor (LT), c) tumor, d) libre de tumor + simpatectomía (SIMP), y e) Tumor + SIMP. Los valores de p igual o menores a 0.05 se consideran estadísticamente significativo.

En el análisis de imagen, el área en pixeles corresponde al área en los adipocitos o la gota lipídica. La activación de tejido adiposo se observan gotas lipídicas pequeñas. En el análisis se observó un incremento significativo en el área en pixeles en el tejido adiposo interescapular de ratones simpatectomizados libres de tumor con un valor de p de 0.0001. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el resto de los grupos.

Efectos de la carga tumoral y el SNS sobre citocinas proinflamatorias

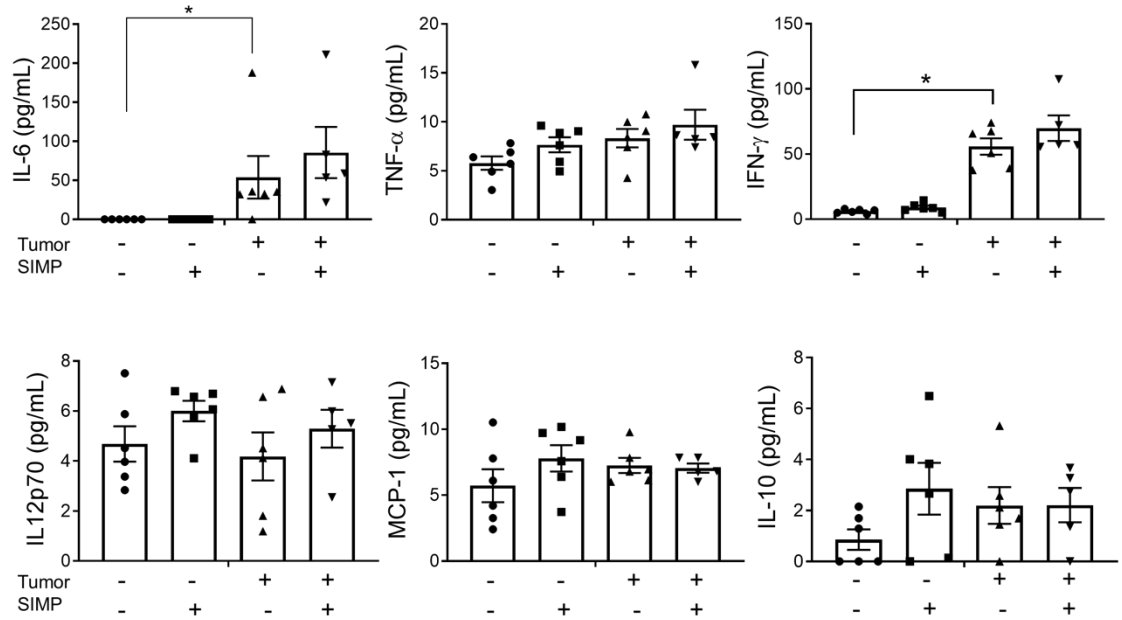


Figura 5.- Se presentan los valores de citocinas inflamatorias presentes en plasma sanguíneo en los diferentes grupos experimentales. Los valores de p igual o menores a 0.05 se consideran estadísticamente significativo.

En cuanto a citocinas se observó un incremento estadísticamente significativo asociado a tumor de IL-6 e IFN- γ . En cuanto a IL-6 no se observó producción de citocinas en los grupos libres de tumor independientemente de la simpatectomía, pero en la presencia de un tumor, se observa producción con una media de 53.9 pg/mL en el grupo tumor y 85.59 en el grupo tumor + simpatectomía con valores de p de 0.03 y 0.002 respectivamente. En cuanto a IFN- γ los valores incrementaron desde 6.0 pg/mL en el grupo libre de tumor, y 8.98 pg/mL en el grupo simpatectomía libre de tumor a 55.76 pg/mL en el grupo tumor y 69.86 pg/mL en el grupo simpatectomía tumor de forma significativa ($p=0.0001$; $p=0.001$) respectivamente.

Efectos de la carga tumoral sobre la progresión tumoral

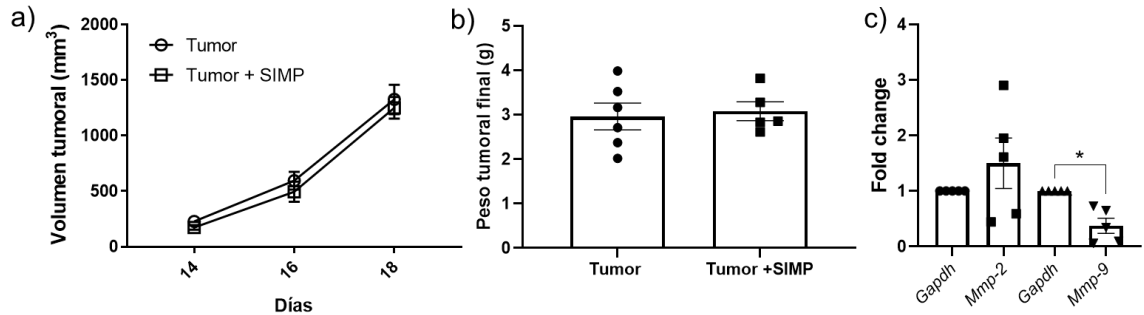


Figura 6.- Se presentan los valores de a) volumen tumoral durante el experimento y los valores de b) peso tumoral final. Los valores de c) expresión relativa de mensajeros para metaloproteinasas en tumores de ratones con simpatectomía. Los valores de p igual o menores a 0.05 se consideran estadísticamente significativo.

En la progresión tumoral no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En cuanto el grupo tumor los tumores presentaron un volumen tumoral en el día 18 de 1325.01 ± 132.28 mm³ y 1249.47 ± 97.53 mm³ para el grupo tumor y tumor simpatectomía respectivamente. Mientras que el peso promedio de los tumores fue de 2.96 g para el grupo tumor y 3.08 g para el grupo tumor + simpatectomía. Por otro lado, al analizar la expresión relativa de metaloproteinasas se observó una disminución estadísticamente significativa en *Mmp-9* con una expresión 2.26 menor ($p=0.0025$).

Efectos de la carga tumoral sobre indicadores de movilidad: Machos

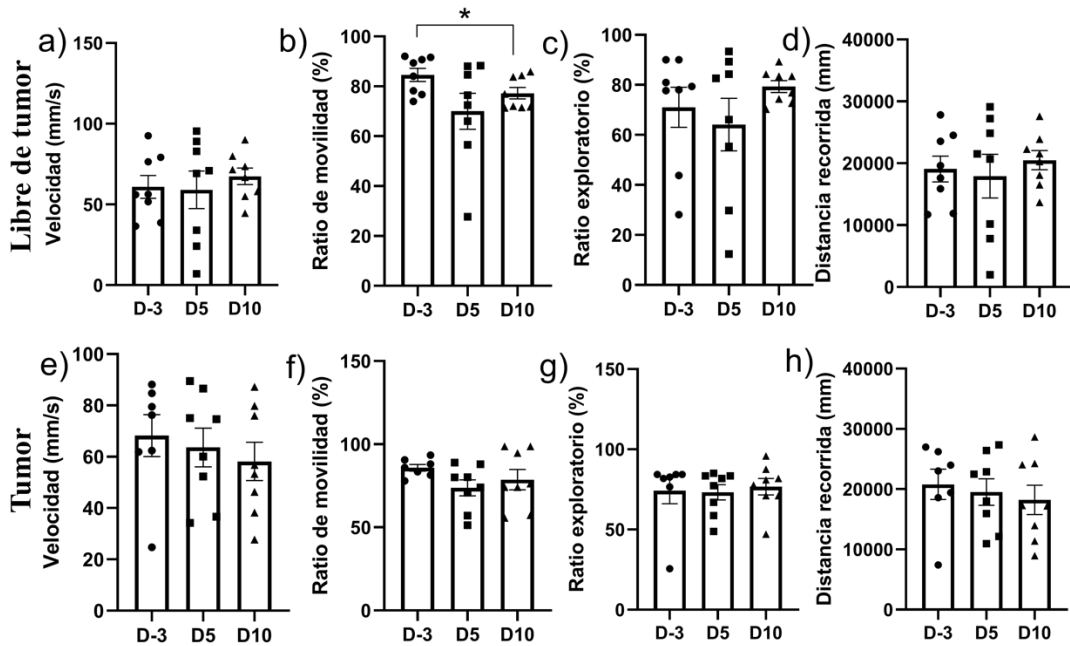


Figura 7.- Desempeño en los indicadores de movilidad en ratones machos libre de tumor (a-d) y portadores de tumor (e-h) en la prueba OFT en los días -3 (D-3), 5 (D5), y 10 (D10). Los datos representan las medias \pm el error estándar de 8 ratones, los valores de $p \leq 0.05$ son considerados significativos (*).

En los indicadores de movilidad de acuerdo con la prueba de campo abierto, en los ratones macho libres de tumor se observó una diferencia significativa ($p=0.01$) en el ratio de movilidad en el día 10 comparado contra el día -3 (Fig. 7b). Pero no se observaron cambios en el resto de los indicadores (Fig. 7a, 7c y 7d). Por otro lado, en los ratones macho portadores de tumor no se observaron diferencias estadísticamente significativas a lo largo de la progresión del experimento como se observa en la figura 7e-h.

Efecto de la carga tumoral sobre indicadores de movilidad: Hembras

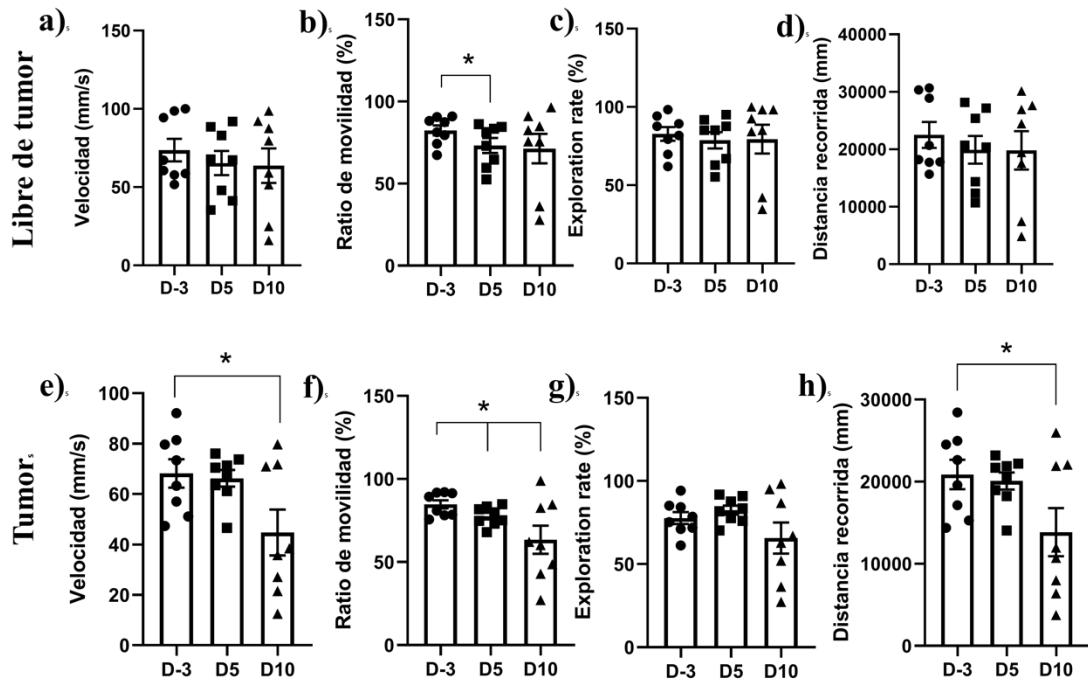


Figura 8.- Desempeño en los indicadores de movilidad en ratones hembra (a-d) y portadores de tumor (e-h) en la prueba OFT en los días -3 (D-3), 5 (D5), y 10 (D10). Los datos representan las medias \pm el error estándar de 8 ratones, los valores de $p \leq 0.05$ son considerados significativos (*).

En los indicadores de movilidad en ratones hembra libres de tumor, se observó una disminución significativa ($p=0.01$) en el ratio de movilidad al día 5 comparado contra el día -3, registrando una media de 82.41% en el día -3 contra una media de 73.16% en el día 5, sin cambios significativos para el día 10 (Fig. 8b). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el resto de los indicadores de movilidad durante la progresión del experimento.

En cuanto ratones hembra portadores de tumor, al día 10 se observaron cambios significativos en tres de los indicadores de movilidad tal como se observa en las Figuras 8e, 8f y 8h. Se observó una disminución significativa en la velocidad ($p=0.03$) con cambios de una media de 68.18 mm/s en el día -3 a una media de 44.76 mm/s en el día 10. También el ratio de movilidad disminuyó de forma significativa en los días 5 y 10 ambos registrando un valor de p de 0.04 con una media de movilidad de 77.63% en el día 5 y 63.42% en el día 10 comparado contra una media de 84.72% en el día -3. En la distancia recorrida se encontró una disminución significativa ($p=0.04$) disminuyendo de

una media de distancia de 20865mm en el día -3 a una media de 13847mm en el día 10. No se observaron cambios significativos en el ratio de exploración.

Efecto de la carga tumoral sobre indicadores de Ansiedad: Machos

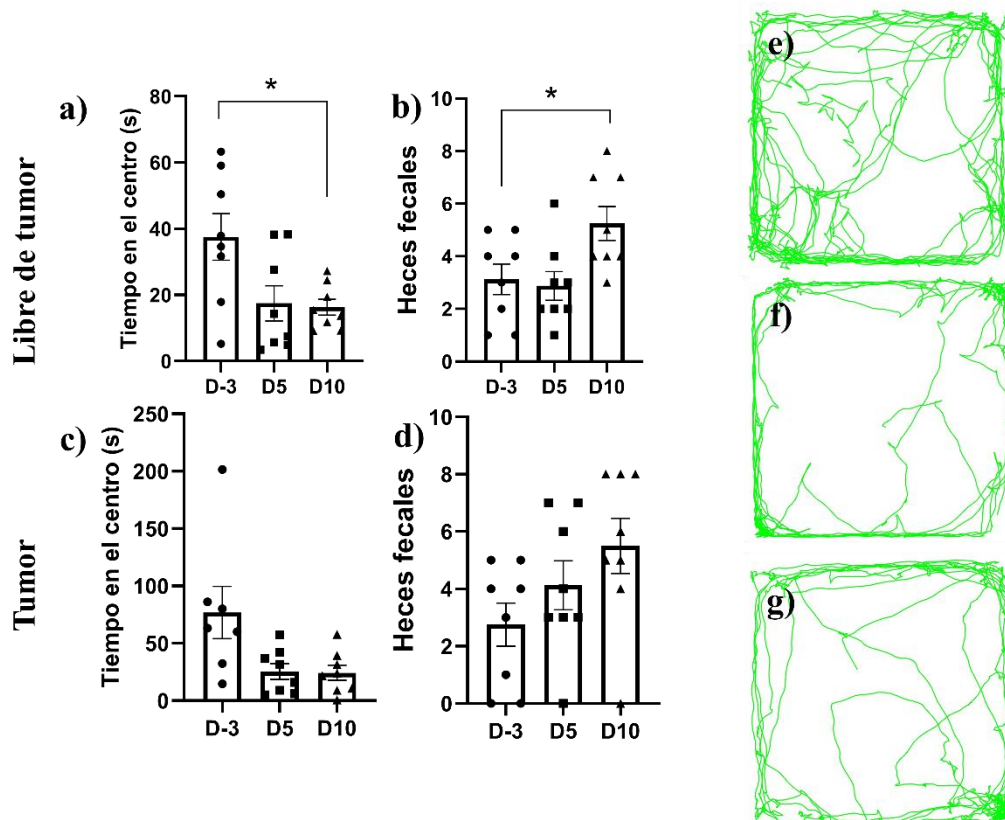


Figura 9.- Desempeño en los indicadores de ansiedad en ratones macho libres de tumor (a y b) y portadores de tumor (c y d) en el OFT en los días -3 (D-3), 5 (D5), y 10 (D10). Imágenes representativas de los trayectos en los días -3(e), 5(f) y 10 (g). Los datos representan las medias \pm el error estándar de 8 ratones, los valores de $p \leq 0.05$ son considerados significativos (*).

En cuanto a los indicadores de ansiedad de acuerdo con la prueba de campo abierto se observaron cambios significativos en los ratones macho libre de tumor como se observa en la Figura 9a y 9b. Se observó menor tiempo en el centro al día 10 con una media de 16.29s comparado con 37.51s en el día -3 ($p=0.04$). Además, se observó un incremento significativo ($p=0.02$) en el número de heces fecales de una media de 3.125 heces a 5.25 heces en el día 10.

Para los ratones machos portadores de tumor, no se observaron diferencias estadísticamente significativas durante la progresión del experimento tal como se observa en la Figura 9c y 9d.

Efecto de la carga tumoral sobre indicadores de ansiedad: Hembras

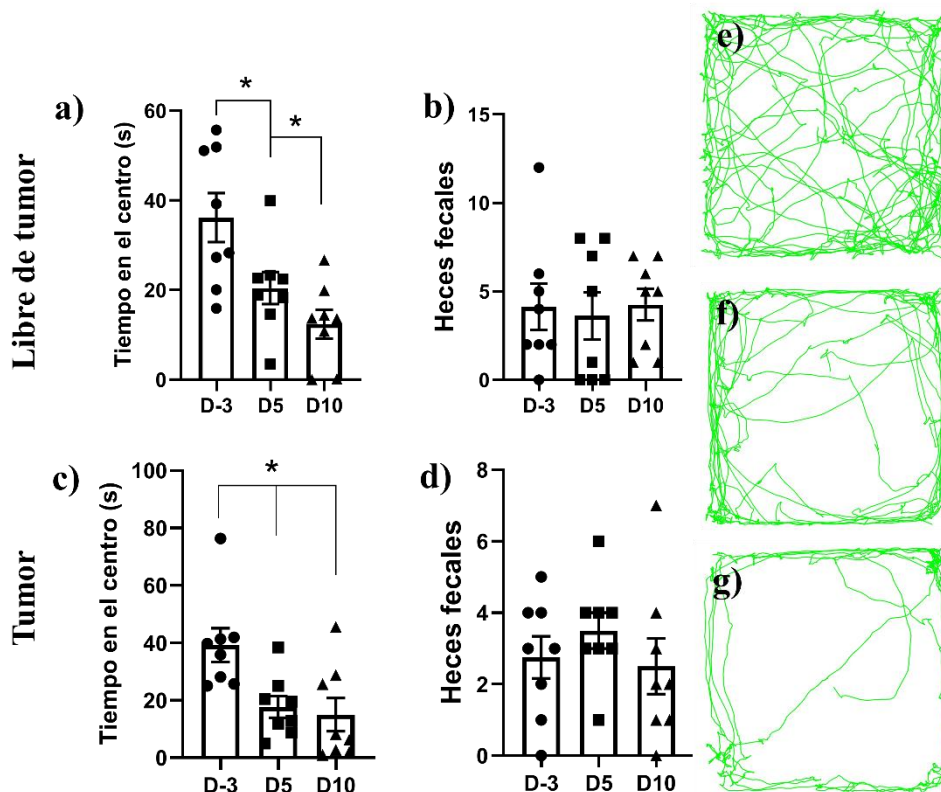


Figura 10.- Desempeño en los indicadores de ansiedad en ratones hembra libres de tumor (a y b) y portadores de tumor (c y d) en el OFT en los días -3 (D-3), 5 (D5), y 10 (D10). Imágenes representativas de los trayectos en los días -3(e), 5(f) y 10(g). Los datos representan las medias \pm el error estándar de 8 ratones, los valores de $p \leq 0.05$ son considerados significativos (*).

En los indicadores de ansiedad de acuerdo con la prueba de campo abierto, en hembras libres de tumor se observó disminución significativa en el tiempo en el centro en los días 5 ($p=0.001$) y día 10 ($p=0.004$) comparado contra el día -3, registrando una media de 36.19s en el día -3, 20.45s en el día 5 y 12.41s en el día 10 (Fig. 10a). Pero no se observaron cambios en el número de heces fecales.

Mientras que el grupo portador de tumor también se observó una disminución significativa en el tiempo en el centro con medias de 39.24s en el día -3, 17.70s en el día 5 y 15s en el día 10 con valores de p de 0.001 y 0.04 en los días 5 y 10 comparado contra el día -3

respectivamente (Fig. 10c). No se observaron cambios significativos en el número de heces fecales.

Efectos del sistema nervioso simpático y la carga tumoral sobre indicadores de movilidad: Machos

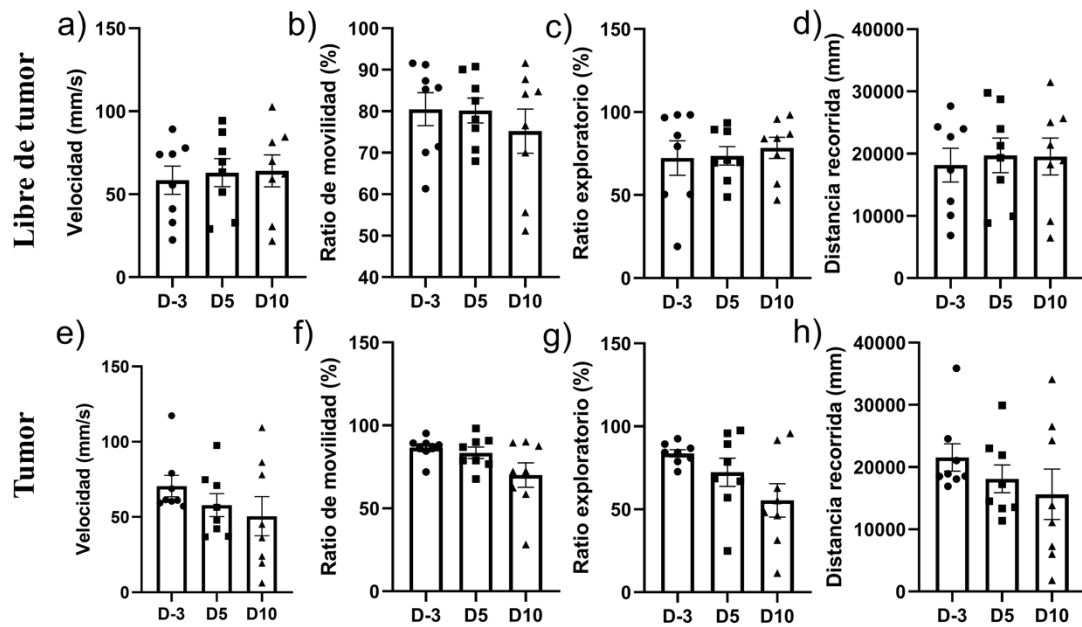


Figura 11.- Desempeño en los indicadores de movilidad en ratones machos simpatetomizados libre de tumor (a-d) y simpatetomizados portadores de tumor (e-h) en la prueba OFT en los días -3 (D-3), 5 (D5), y 10 (D10). Los datos representan las medias \pm el error estándar de 8 ratones, los valores de $p \leq 0.05$ son considerados significativos (*).

En los indicadores de movilidad de acuerdo a la prueba de campo abierto en ratones macho con simpatetomía libres y portadores de tumor, no se observaron cambios estadísticamente significativos durante la progresión del experimento (Fig. 11 a-h).

Efectos del sistema nervioso simpático y la carga tumoral sobre indicadores de movilidad: Hembras

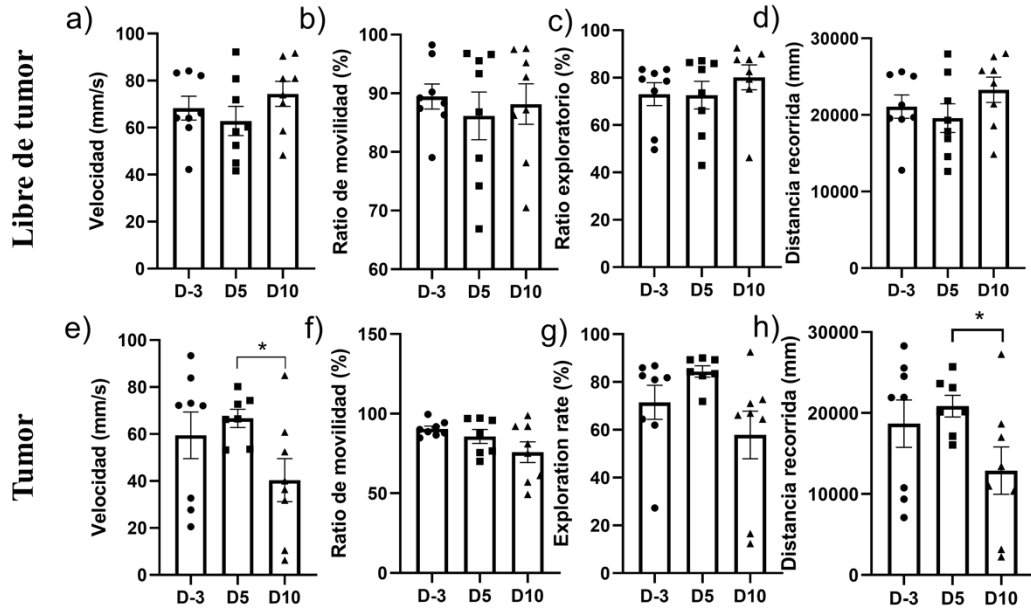


Figura 12.- Desempeño en los indicadores de movilidad en ratones hembras simpatectomizados libre de tumor (a-d) y simpatectomizados portadores de tumor (e-h) en la prueba OFT en los días -3 (D-3), 5 (D5), y 10 (D10). Los datos representan las medias \pm el error estándar de 8 ratones, los valores de $p \leq 0.05$ son considerados significativos (*).

Para los indicadores de movilidad en los ratones hembra con simpatectomía libres de tumor, no se observaron cambios estadísticamente significativos durante la progresión del experimento (Fig. 12 a-d).

Por otro lado, en ratones hembra portadores de tumor la velocidad disminuyó de forma significativa ($p=0.03$) en el día 10 con una media de 40.40 mm/s comparado contra el día 5 con una media de 66.68 mm/s (Fig. 12e). Asimismo, la distancia recorrida disminuyó ($p=0.04$) en un 38.2% en el día 10 con una media de distancia recorrida de 12889 mm contra una media de 20853 mm en el día 5 tal como se observa en la figura 12h. No se observaron cambios significativos en el resto de los indicadores en movilidad.

Efectos del sistema nervioso simpático y la carga tumoral sobre indicadores de ansiedad: Machos

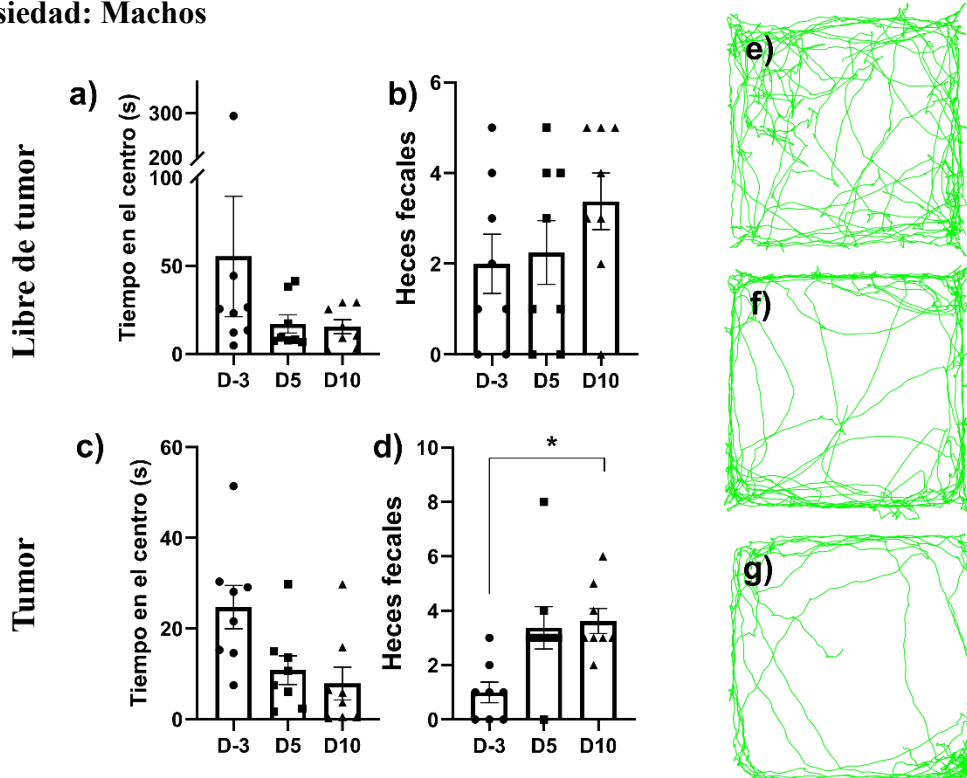


Figura 13.- Desempeño en los indicadores de ansiedad en ratones hembra con simpatectomía libres de tumor (a y b) y portadores de tumor (c y d) en el OFT en los días -3 (D-3), 5 (D5), y 10 (D10). Imágenes representativas de los trayectos en los días -3(e), 5(f) y 10 (g). Los datos representan las medias \pm el error estándar de 8 ratones, los valores de $p \leq 0.05$ son considerados significativos (*).

En los indicadores de ansiedad en ratones macho simpatectomizados, no se observaron diferencias en ratones libres de tumor. Sin embargo, al portar un tumor se observaron cambios en el número de heces fecales al comparar el día -3 con el día 10. Se observó una media de 1 heces fecal en el día -3 comparado con una media de 3.62 heces para el día 10 ($p=0.012$). Asimismo, en ratones hembra simpatectomizadas, no se observaron diferencias en los indicadores de ansiedad el grupo libre de tumor, pero, se observó una disminución significativa ($p=0.018$) en el tiempo en el centro, con una media de 27.96 s en el día -3 comparado contra 8.15 s en el día 10 (Fig. 13c y 13d).

Efectos del sistema nervioso simpático y la carga tumoral sobre indicadores de ansiedad: Hembras

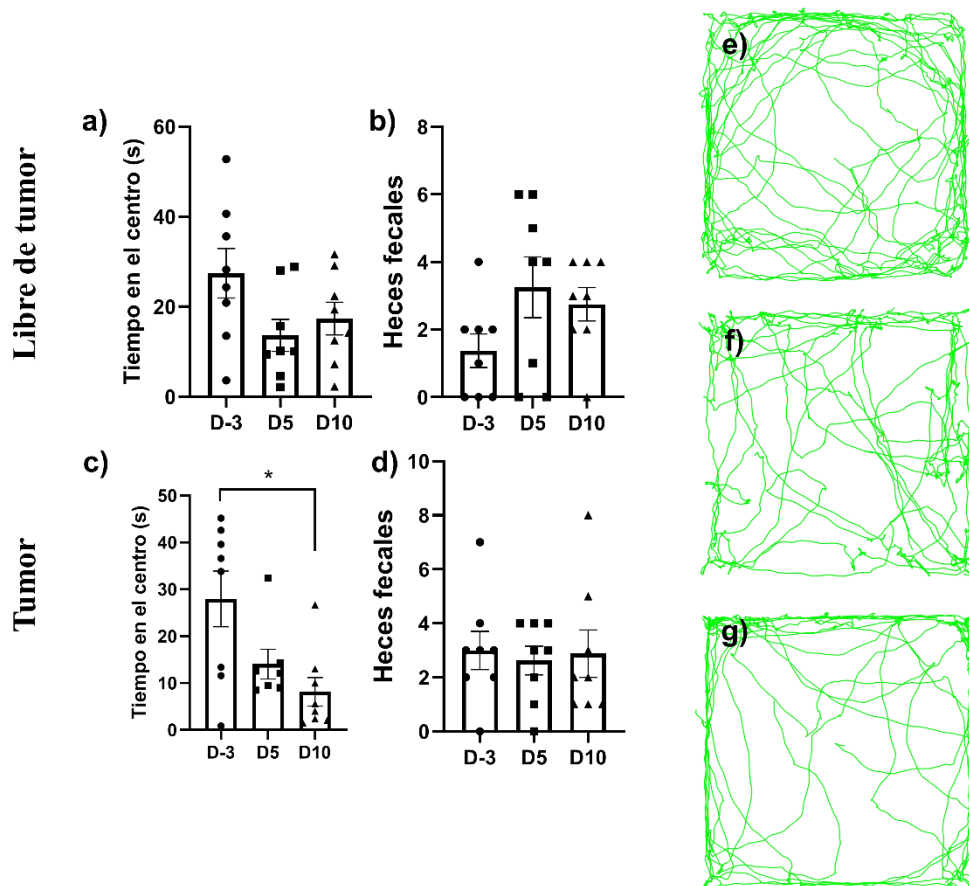


Figura 14.- Desempeño en los indicadores de ansiedad en ratones hembra con simpatectomía libres de tumor (a y b) y portadores de tumor (c y d) en el OFT en los días -3 (D-3), 5 (D5), y 10 (D10). Imágenes representativas de los trayectos en los días -3(e), 5(f) y 10 (g). Los datos representan las medias \pm el error estándar de 8 ratones, los valores de $p \leq 0.05$ son considerados significativos (*).

En cuanto a los indicadores de ansiedad en ratones hembra con simpatectomía, los ratones libres de tumor no presentaron cambios en el tiempo en el centro ni en las heces. Por otro lado, en ratones portadores de tumor se observó una disminución significativa ($p = 0.01$) en el tiempo en el centro, con una media de 27.96 s en el día -3, comparado con 8.15 s en el día -3. No se observaron diferencias en las heces fecales.

Efectos del sistema nervioso simpático y la carga tumoral sobre la memoria de reconocimiento

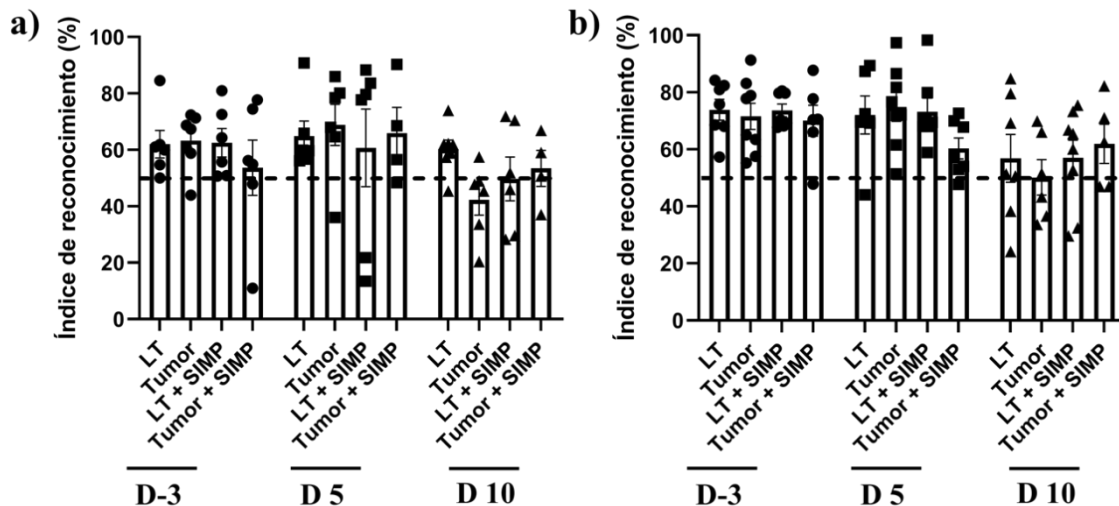


Figura 15.- Tiempo de exploración del objeto novedoso en la prueba NORT en ratones libres de tumor (LT), portadores de tumor (Tumor), libres de tumor simpatectomizados (LT + Symp) y portadores de tumor simpatectomizados (LT + Symp), en los días -3 (D-3), 5 (D5), y 10 (D10). La línea punteada representa el punto de corte en el 50%. Los datos representan las medias \pm el error estándar de 8 ratones, los valores de $p \leq 0.05$ son considerados significativos (*).

El índice de reconocimiento (IR) cercano o igual a 50% es considerado un indicador de deterioro cognitivo. En los ratones machos, los valores de IR en los días -3 y 5 se mantuvieron arriba de 60% en todos los grupos. Mientras que en el día 10 el grupo portador de tumor registró un IR de 42.26% y el grupo libre de tumor registró un valor de 60.23%. Por otra parte, el grupo libre de tumor + simpatectomía registró un valor de 49.67 y el grupo tumor + simpatectomía registro un valor de 53.42%, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Fig. 15a).

Por otro lado, en los ratones hembras se observaron resultados mayores a 60% en los días -3 y 5 pero en el día 10 el grupo tumor registró un IR de 50.16% y en el grupo libre de tumor un IR de 56.84%. En los grupos con simpatectomía, el grupo libre de tumor registro un IR de 57% y el grupo simpatectomía + tumor un IR de 65.67%. N no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Fig. 15b).

Efectos de la carga tumoral sobre niveles de lípidos en plasma en ratones macho

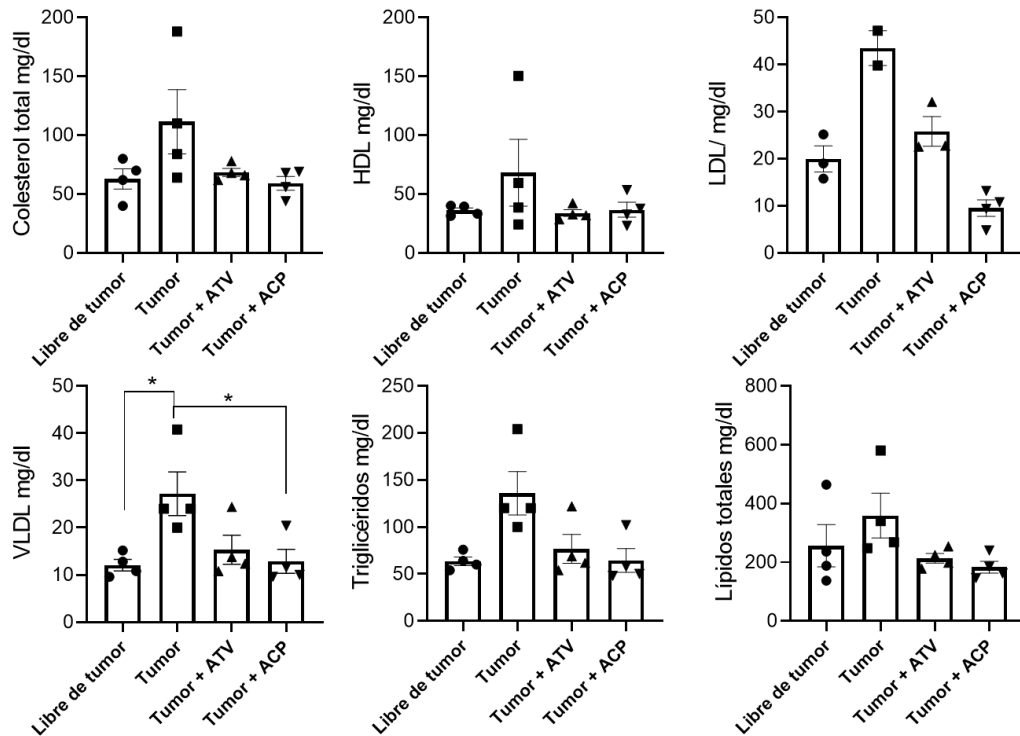


Figura 16.- Niveles de los distintos metabolitos del perfil lipídico plasmático de ratones machos portadores de tumor tratados con Atorvastatina (ATV) y Acipimox (ACP). Los datos representan las medias \pm el error estándar de 4 ratones, los valores de $p \leq 0.05$ son considerados significativos (*).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de lípidos plasmáticos entre los grupos asociado a la carga tumoral o a los tratamientos, pero si se observaron cambios estadísticamente significativos ($p=0.01$) en VLDL. En el grupo portador de tumor se observó un incremento en VLDL en un 124% de una media de 12.10 mg/dl a 27.2 mg/dl mientras que en el grupo tratado con Acipimox los niveles de VLDL se restablecieron de forma significativa ($p=0.02$), a 12.9 mg/dl no se observó diferencias estadísticamente significativas en el grupo tratado con Atorvastatina.

Efecto de la carga tumoral y tratamientos con antilipidemicos en indicadores de movilidad en ratones macho

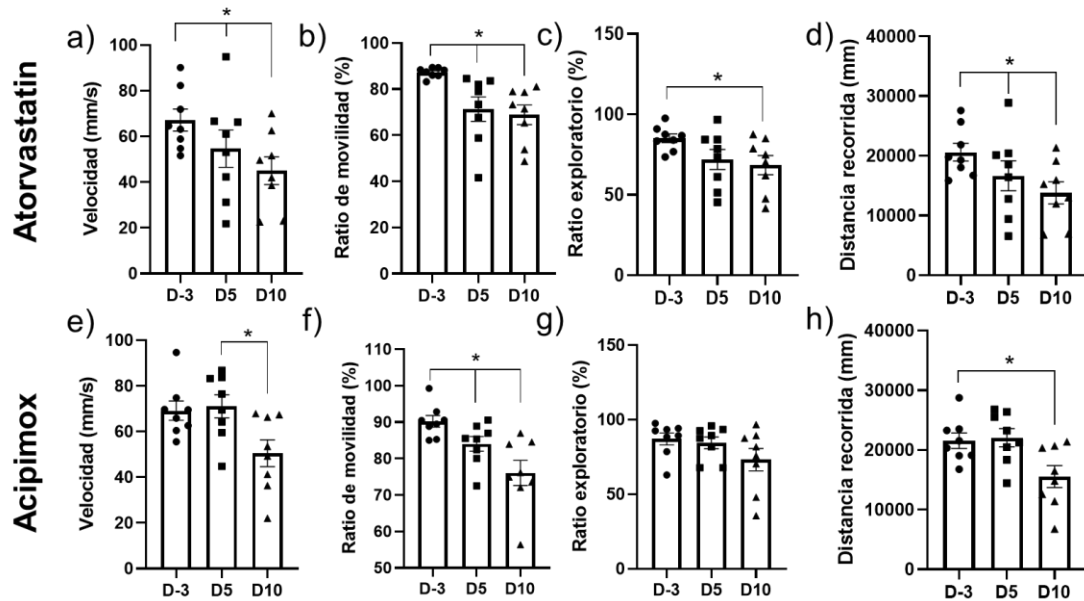


Figura 17.- Desempeño en los indicadores de movilidad en ratones macho portadores de tumor tratados con Atorvastatina (a-d) portadores de tumor tratados con Acipimox (e-h) en la prueba OFT en los días -3 (D-3), 5 (D5), y 10 (D10). Los datos representan las medias \pm el error estándar de 8 ratones, los valores de $p \leq 0.05$ son considerados significativos (*).

Se observaron cambios en todos los indicadores de movilidad en los ratones con tumor tratados con Atorvastatina, disminuyeron de forma significativa ($p=0.05$) su velocidad de una media de 67.17 mm/s en el día -3 a 45.01 mm/s en el día 10. En cuanto el ratio de movilidad, este disminuyó de una media de 87.22% en el día -3 a una media de 68.90% en el día 10 ($p=0.004$). También el ratio exploratorio disminuyó, de una media de 85.10% en el día -3 a una media de 68.54% en el día 10 ($p=0.007$). Por otra parte, la distancia recorrida disminuyó de forma significativa ($p=0.04$) de una media de distancia de 20600 m en el día -3, a 16645mm en el día 5 hasta llegar a una media de 13798 mm ($p=0.006$) en el día 10. Tal como se observa en la Figura 17 a-d.

Por otro lado, en el grupo portador de tumor tratado con Acipimox también se observaron cambios en los indicadores de movilidad. En el indicador de velocidad se observó disminución en el día 10 con una media de velocidad de 50.50 mm/s comparado con el día 5 con una media de 71.02 mm/s ($p=0.04$). Mientras que el ratio de movilidad disminuyó de un 90.22% en el día -3 a un 76.06% en el día 10 ($p=0.01$). Además, la distancia recorrida disminuyó de una media de 22058mm en el día -3 a una media de

15563mm en el día 10 ($p=0.03$). No se observaron diferencias significativas en el ratio exploratorio, tal como se observa en la figura 17 e-h.

Efecto de la carga tumoral y tratamientos con antilipidemicos en indicadores de ansiedad en ratones macho

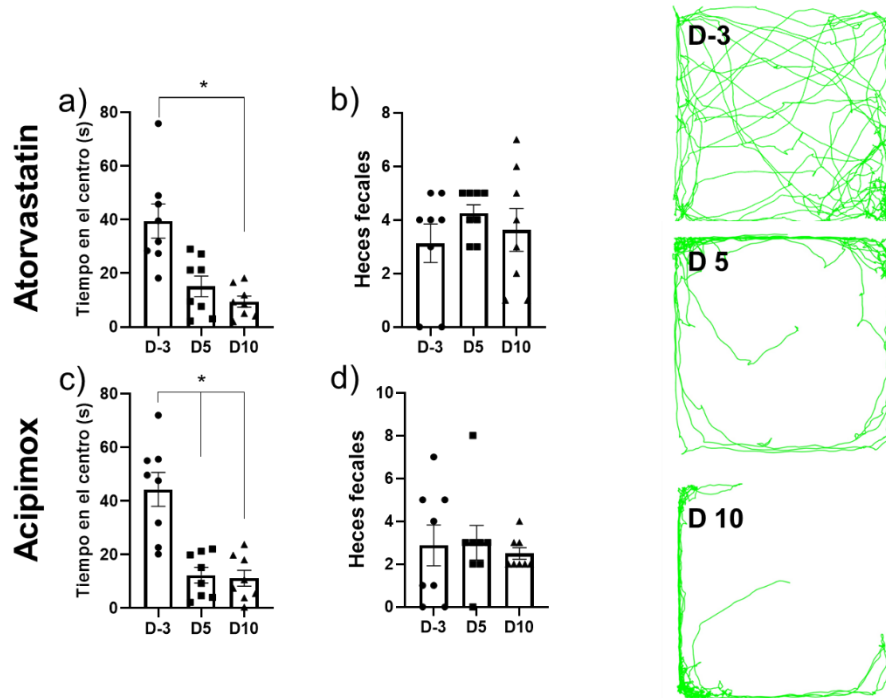


Figura 18.- Desempeño en los indicadores de ansiedad en ratones machos portadores de tumor tratados con Atorvastatina (a y b) y portadores de tumor tratados con Acipimox (c y d) en el OFT en los días -3 (D-3), 5 (D5), y 10 (D10). Imágenes representativas de los trayectos en los días -3(e), 5(f) y 10 (g). Los datos representan las medias \pm el error estándar de 8 ratones, los valores de $p \leq 0.05$ son considerados significativos (*).

El tiempo en el centro disminuyó de forma significativa en ambos grupos, en el grupo tratado con Atorvastatina, el día -3 registró un tiempo en el centro de 39.51s y disminuyó significativamente ($p=0.01$) a 9.45 s Por otro lado, se observó un resultado similar en el grupo tratado con Acipimox donde el día -3 registro una media de 44.35 s de tiempo en el centro y disminuyó de forma significativa ($p=0.001$) a 11.234 s en el día 5 y posteriormente a 11.20 s en el día 10 ($p=0.008$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de heces fecales en los distintos tratamientos durante la progresión del experimento.

Efecto de la carga tumoral y tratamientos con antilipidemicos sobre la memoria de reconocimiento

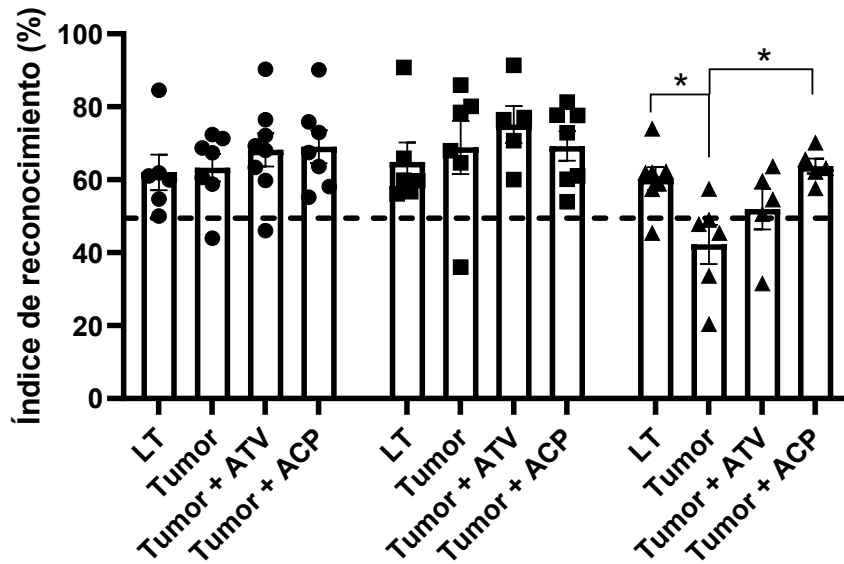


Figura 19.- Tiempo de exploración del objeto novedoso en la prueba NORT en ratones libres de tumor (LT), portadores de tumor (Tumor), portadores de tumor tratados con Atorvastatina (LT + ATV) y portadores de tumor tratados con Acipimox (Tumor + ACP), en los días -3 (D-3), 5 (D5), y 10 (D10). La línea punteada representa el punto de corte en el 50%. Los datos representan las medias \pm el error estándar de 8 ratones, los valores de $p \leq 0.05$ son considerados significativos (*).

En el índice de reconocimiento (IR) de la prueba NORT, se registraron valores por encima del 60% en los días -3 y 5, sin presentar cambios significativos. Sin embargo, para el día 10 se observó una disminución significativa ($p=0.01$) en el IR en el grupo tumor con un valor de 42.26% mientras el grupo libre de tumor registro un IR de 60.23%. Por otro lado, el grupo tratado con Atorvastatina el IR registro un IR de 51.98%. mientras que en el grupo tratado con Acipimox se observó un incremento significativo ($p=0.02$) en el IR con un valor de 63.71%.

Obtener los perfiles metabólicos asociados a la carga tumoral y a un sistema nervioso simpático disfuncional y a su interacción: Machos

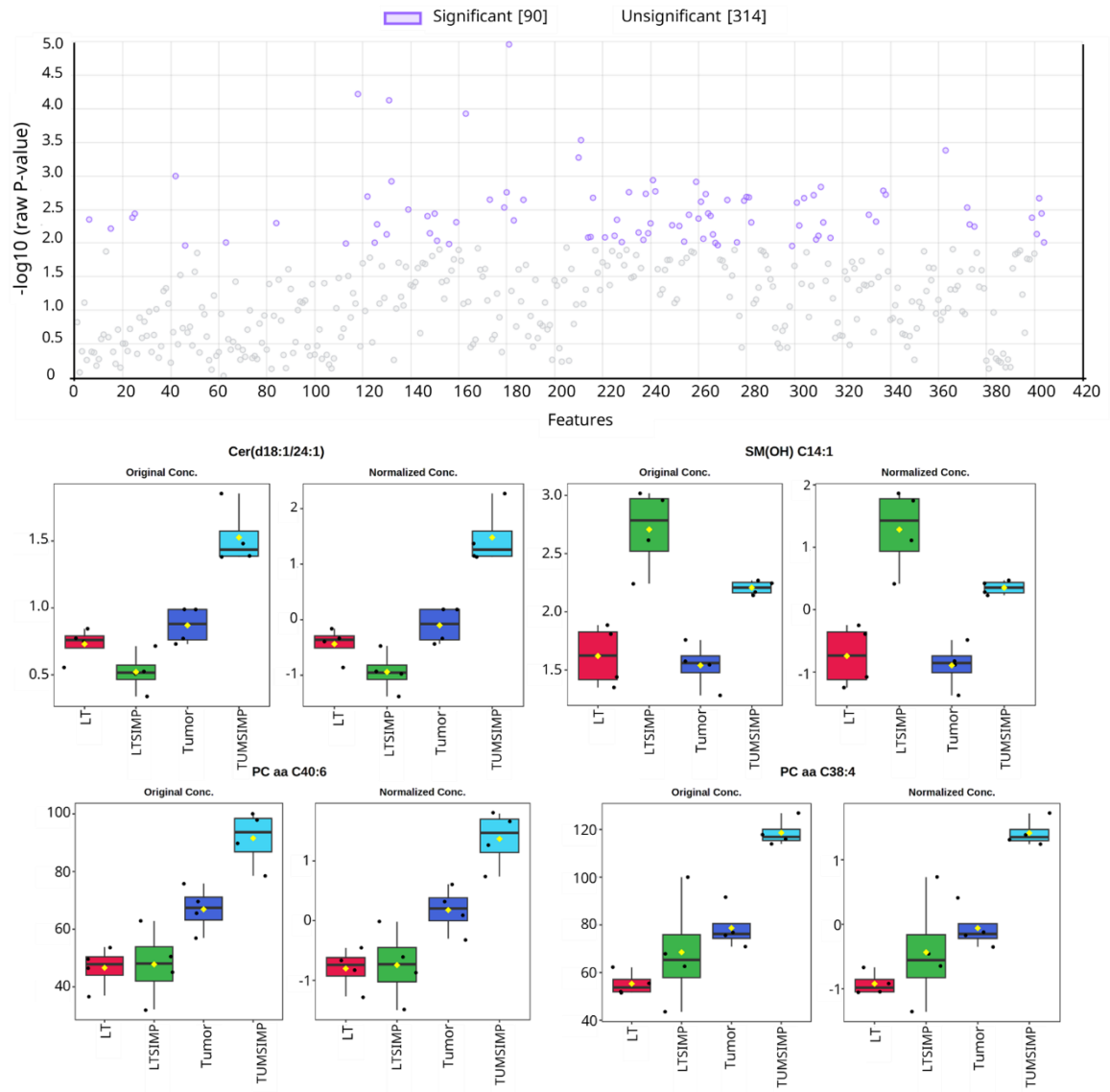


Figura 20.- Valores de la prueba ANOVA en MetaboAnalyst en los grupos libre de tumor (LT), libre de tumor sympatectomizados (LTSIMP), portadores de tumor (Tumor), y portadores de tumor sympatectomizados (TUMSIMP).

En el análisis metabólico en ratones machos después del ajuste de valores faltantes se analizaron 404 metabolitos con 90 de ellos siendo estadísticamente significativos de acuerdo con la prueba ANOVA. En la Figura 20b se muestran los primeros 4 metabolitos del análisis observándose alteraciones principalmente en lípidos tales como ceramidas, esfingolípidos, y fosfatidilcolinas.

Obtener los perfiles metabólicos asociados a la carga tumoral y a un sistema nervioso simpático disfuncional y a su interacción: Hembras

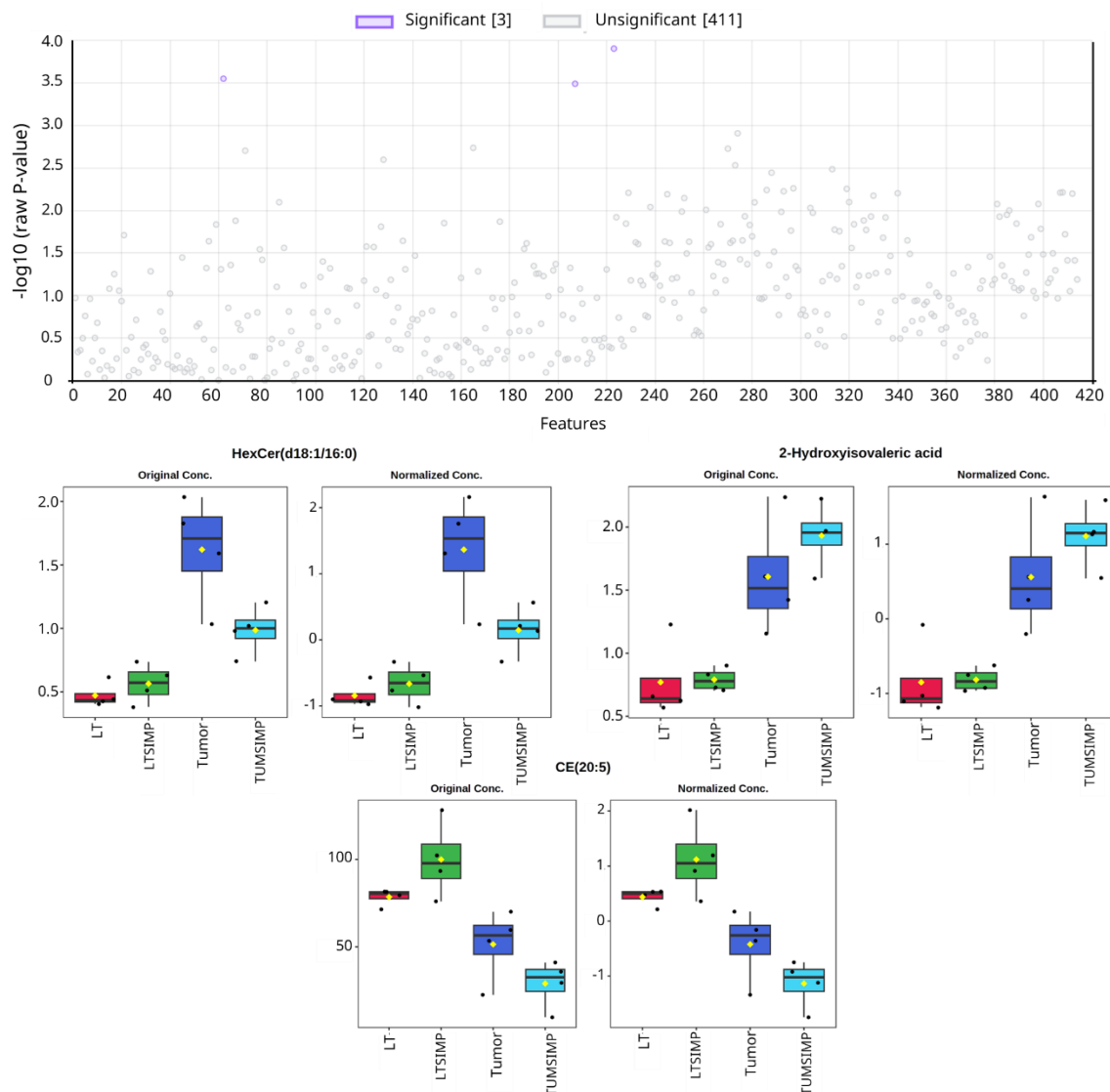


Figura 21.- Valores de la prueba ANOVA en MetaboAnalyst en los grupos libre de tumor (LT), libre de tumor simpatectomizados (LTSIMP), portadores de tumor (Tumor), y portadores de tumor simpatectomizados (TUMSIMP).

En el análisis metabólico en ratones hembra después del ajuste de valores faltantes se analizaron 414 metabolitos con 3 de ellos siendo estadísticamente significativos de acuerdo con la prueba ANOVA. En la Figura 21b se muestran los 3 metabolitos del análisis observando alteraciones en el lípido hexosilceramida, ácido 2-hidroxisovalérico y ceramida.

Análisis de PCA y PLSDA de perfiles metabolómicos asociados a la carga tumoral y a un sistema nervioso simpático disfuncional y a su interacción: Machos

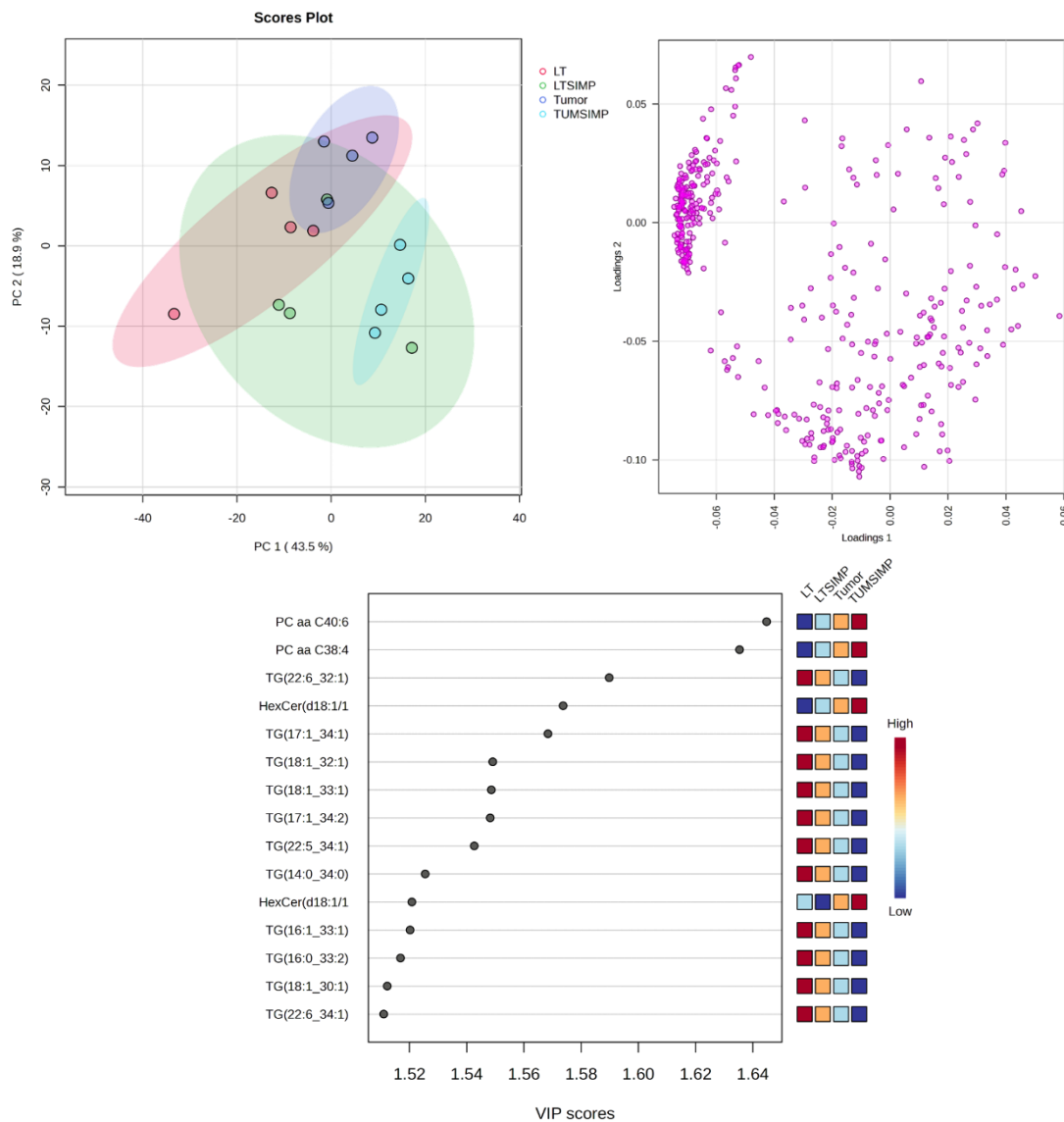


Figura 22.- Análisis de a) PCA en MetaboAnalyst en los grupos Machos libre de tumor (LT), libre de tumor simpatetomizados (LTSIMP), portadores de tumor (Tumor), y portadores de tumor simpatetomizados (TUMSIMP). En la gráfica b) se observa el loadings plot del PCA que refleja el peso de cada variable en el análisis de componentes principales. En la gráfica c) se observa la importancia de la variable en la proyección (VIP) del análisis PLSDA.

Para los ratones machos, en el análisis de componentes principales a) se observa la agrupación de las muestras de los diferentes grupos en el PC1 (43.5%) y PC2 (18.9%). Por otro lado, en el gráfico de cargas (loadings plot) se observa la distribución de los metabolitos que influyeron en la variación observada entre las muestras. Siendo los metabolitos PC aa C38:4, PC aa C40:6, N-Acetyl-Glycine, deoxycytidine, PC aa C40:5

quienes presentan mayor contribución en la dirección positiva del PC1 y los metabolitos TG(18:1_32:2), TG(16:1_32:0), TG(16:1_32:0), TG(16:0_32:2), TG(16:0_32:1) en dirección negativa. En la gráfica c) se muestra la importancia de las variables en la proyección (VIP) del análisis PLS-DA, destacando los 15 metabolitos que más contribuyeron a la separación de los grupos, junto con sus abundancias relativas. La mayoría de ellos corresponden a metabolitos lipídicos.

Análisis de PCA y PLSDA de perfiles metabólicos asociados a la carga tumoral y a un sistema nervioso simpático disfuncional y a su interacción: Hembras

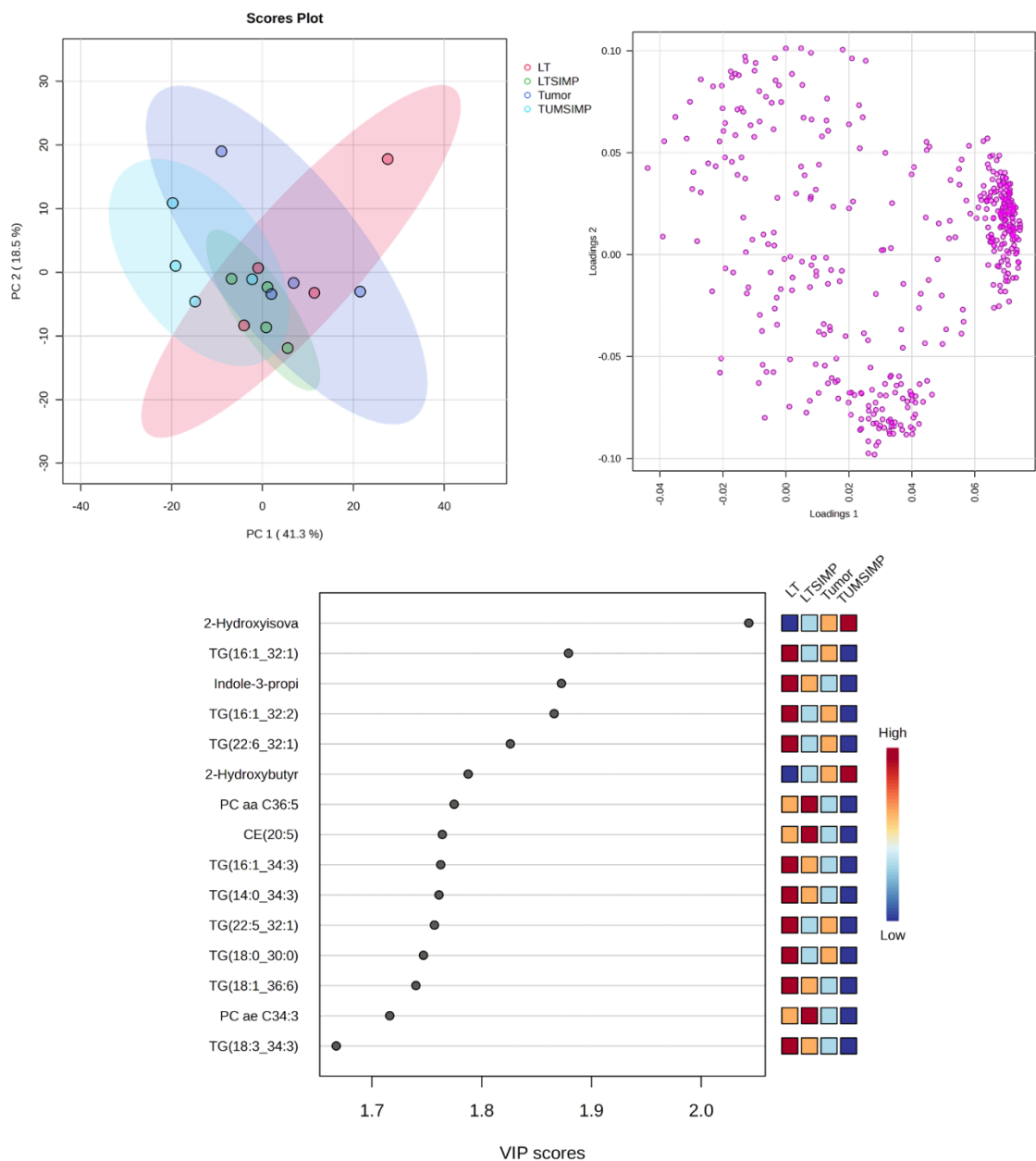


Figura 23.- Análisis de a) PCA en MetaboAnalyst en los grupos Hembras libre de tumor (LT), libre de tumor simpatectomizados (LTSIMP), portadores de tumor (Tumor), y portadores de tumor simpatectomizados (TUMSIMP). En la gráfica b) se observa el loadings plot del PCA que refleja el peso de cada variable en el análisis de componentes principales. En la gráfica c) se observa la importancia de la variable en la proyección (VIP) del análisis PLSDA.

En ratones hembra, el análisis de componentes principales (PCA) se observa a) la agrupación de las muestras de los distintos grupos en los ejes PC1 (41.3%) y PC2 (18.5%). Por otra parte, en el gráfico de cargas (loadings plot) se observa la distribución de los metabolitos que influyeron en la variación entre las muestras. Entre ellos, los triglicéridos TG(18:2_33:1), TG(16:0_38:6), TG(18:3_36:2), TG(18:1_34:3) y TG(20:3_34:2) presentaron una mayor contribución en la dirección positiva del PC1, mientras que los metabolitos ácido 2-hidroxiibutírico, ácido 2-hidroxiisovalérico, ácido α -aminobutírico, ácido láctico y ácido caproico lo hicieron en la dirección negativa. En la gráfica c) se representa la importancia de las variables en la proyección (VIP) del análisis PLSDA, destacando los 15 metabolitos que más contribuyeron a la separación de los grupos, junto con sus abundancias relativas. La mayoría corresponden a metabolitos lipídicos.

Mapa de calor de los perfiles metabolómicos asociados a la carga tumoral y a un sistema nervioso simpático disfuncional y a su interacción: Machos

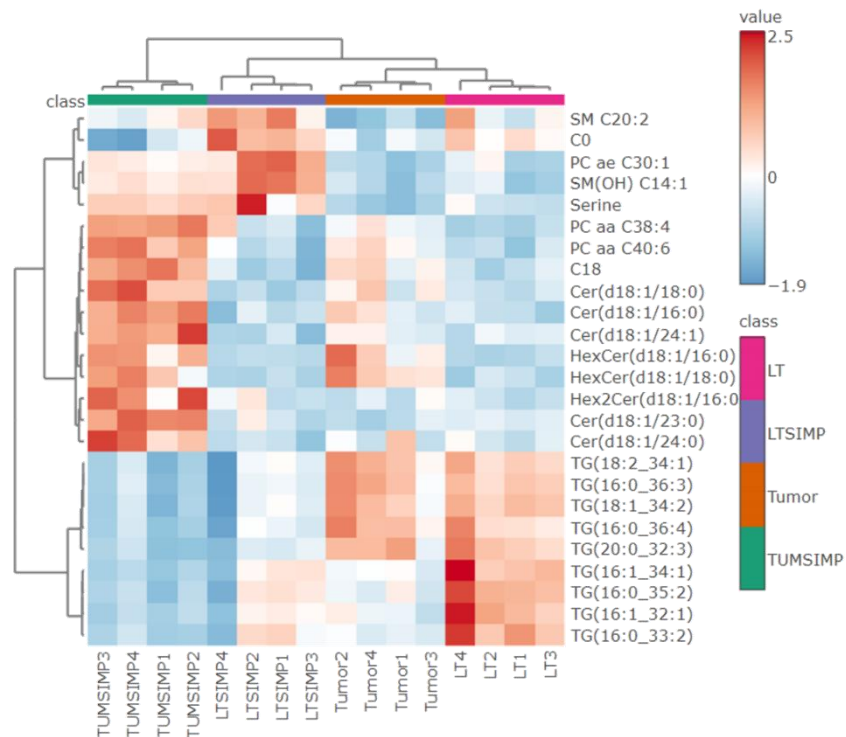


Figura 24.- Mapa de calor de la abundancia relativa de los 25 metabolitos principales con diferencias estadística en los diferentes grupos de ratones macho libre de tumor (LT), libre de tumor simpatectomizados (LTSIMP), portadores de tumor (Tumor), y portadores de tumor simpatectomizados (TUMSIMP).

En el mapa de calor se observa la abundancia relativa de los metabolitos en los ratones macho bajo las distintas condiciones, se observan cambios marcados en la presencia de fosfatidilcolinas, ceramidas y hexosilceramidas de una concentración baja en ratones libre de tumor e incrementando en ratones con tumor simpatectomizados. Por otro lado, en los triglicéridos se observa una concentración alta en los ratones libre de tumor, para disminuir gradualmente hasta llegar a niveles bajos en los ratones con tumor y simpatectomía.

Mapa de calor de los perfiles metabolómicos asociados a la carga tumoral y a un sistema nervioso simpático disfuncional y a su interacción: Hembras

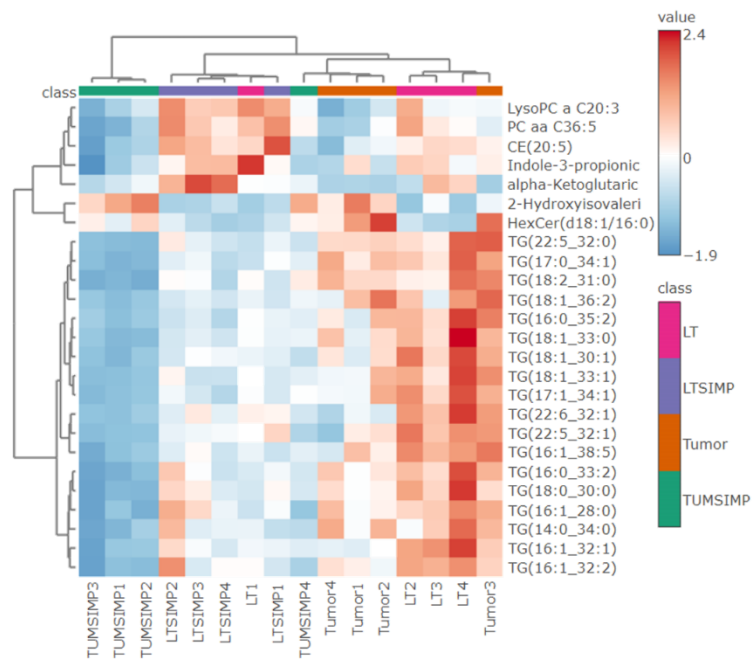


Figura 25.- Mapa de calor de la abundancia relativa de los 25 metabolitos principales con diferencias estadística en los diferentes grupos de ratones hembra libre de tumor (LT), libre de tumor simpatectomizados (LTSIMP), portadores de tumor (Tumor), y portadores de tumor simpatectomizados (TUMSIMP).

En ratones hembra se observan una concentración alta de triglicéridos en ratones libre de tumor, esta disminuye en ratones con tumor, y simpatectomizados.

DISCUSIÓN

En el experimento del primer objetivo, simpatectomizamos ratones portadores de tumor para observar la contribución del SNS en la caquexia asociada a cáncer y en la progresión tumoral. Se observó una disminución en el índice de masa corporal asociado a la carga tumoral, efecto que se revirtió por la simpatectomía. Por un lado, la caquexia también se caracteriza por un desgaste en tejido adiposo. Y por otro lado se sabe que el SNS regula el contenido de grasa en los adipocitos a través de lipólisis y además induce termogénesis en tejido adiposo pardo, esto a través de la activación de los receptores beta-adrenérgicos mediado por norepinefrina (Collins et al. 2022). En nuestro modelo murino de cáncer, se observó desgaste de tejido adiposo en los depósitos de grasa tanto interescapular, inguinal y visceral. Sin embargo, el simpatectomizar ratones portadores de tumor, no previno el desgaste de tejido adiposo interescapular ni inguinal, pero si el visceral. Dado a que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en músculo gastrocnemio y corazón, la atenuación del desgaste del tejido adiposo visceral podría explicar la restauración del IMC. También se observó una mayor cantidad de tejido adiposo interescapular en ratones simpatectomizados sin tumor comparado contra ratones libres de tumor intactos. Esto podría ser debido a que se atenuó la termogénesis basal que requieren los ratones para regular su temperatura corporal en condiciones de bioterio la cual suele estar entre 22 a 25°C, sin embargo, se ha observado que la termoneutralidad en ratones es más cercano a 32°C mientras que en ratones portadores de tumor incrementa hasta 37°C (Hylander et al. 2016). A su vez, la simpatectomía no previno el desgaste del tejido adiposo interescapular en ratones portadores de tumor, lo cual sugiere que otros factores lipolíticos, citocinas o productos del tumor podrían ser responsables. Asimismo, la expresión transcripcional de *Ucp-1* incrementó en ratones portadores de tumor y regresaron a valores basales en ratones con la simpatectomía. *Ucp-1* es una proteína que desacopla la oxidación fosforilativa y en consecuencia genera calor lo cual ayuda en la regulación de la temperatura corporal en los organismos. Hablando específicamente de ratones, el tejido adiposo interescapular es el depósito graso de mayor relevancia para termogénesis, fenómeno regulado por la activación de receptores adrenérgicos β -3 (Tabuchi et al. 2021).

Por otro lado, en los grupos con tumor observamos un incremento en los niveles de IL-6 e IFN- γ plasmáticas, citocinas proinflamatorias asociadas a caquexia, pero no se observaron cambios atribuidos asociados a la simpatectomía. Estos hallazgos podrían explicar los resultados en el desgaste del tejido adiposo interescapular. Estudios han observado que la IL-6 tiene efectos lipolíticos y de termogénesis, en un estudio realizado en ratones BALB/c portadores del cáncer de colon 26, se observó desgaste en tejido adiposo inguinal y activación del tejido adiposo pardo interescapular, efecto que fue inhibido al utilizar anticuerpos anti-IL-6 (Han et al. 2018). Esta observación acompañada por el hecho que la activación de grasa parda interescapular solamente se atenuó en los grupos libres de tumor, sugiere que este pardeamiento en ratones por tumor es llevado principalmente por otros factores asociados a tumor como lo es IL-6. Han et al también observó desgaste en tejido adiposo inguinal y la atenuación en su desgaste dado por intervención con un anticuerpo anti-IL-6 en el modelo C-26 colorrectal. En nuestro modelo tumoral murino, también observamos desgaste de tejido adiposo inguinal, sin atenuación mediada por la simpatectomía. Por lo que el desgaste de este tejido podría ser llevado a cabo principalmente por factores lipolíticos como IL-6 y no por el sistema nervioso simpático, también podría haber variaciones tanto por el tipo de tumor, así como el sitio de implantación debido a que en este modelo se implanta en el flanco posterior el cual anatómicamente está más cercano al depósito de grasa inguinal. Además, a diferencia del tejido adiposo interescapular cuya función es termogénica, la grasa inguinal y visceral son categorizadas como tejido adiposo blanco cuya función principal se asocia a almacenamiento de energía (Chun et al. 2021). Asimismo, se observó incremento en IFN- γ plasmático asociado a la carga tumoral. El IFN- γ es una citocina proinflamatoria asociada a caquexia en diversos tipos de cáncer (Paval et al. 2022). Se ha observado que participa en el desgaste de músculo y pérdida de peso en el modelo caquético de carcinoma pulmonar de Lewis (Chiappalupi et al. 2020). Además, se ha encontrado sobre expresión de IFN- γ en tejido adiposo mesentérico en el modelo caquético de Walker 256 en ratas. Aunado a ello, se ha asociado el incremento de *ifngr1*, el receptor de IFN- γ con indicadores de caquexia tales como pérdida de peso y reducción en la ingesta de alimento en ratas Wistar (Yamashita et al. 2017). Además de IL-6, IFN- γ podría contribuir en las alteraciones morfológicas, desgaste de grasa interescapular e inguinal en nuestro modelo.

Del mismo modo, la anorexia es un indicador importante de caquexia asociada a cáncer. Nosotros observamos una disminución del 12% en la ingesta de alimento asociada a la carga tumoral. Por su parte, un trabajo reportó que ratones C57BL6 portadores del fibrosarcoma CHX207 disminuyeron la ingesta de alimento en un 15% sin encontrar diferencias en la ingesta de agua (Pototschnig et al. 2023) lo cual coincide con nuestras observaciones. Este efecto podría deberse a IL-6 la cual estudios han evidenciado su contribución en efectos anoréxicos inducidos por inflamación en el hipotálamo (Dwarkasing et al. 2016). Por otro lado, se ha observado que también el sistema nervioso simpático es capaz de regular la ingesta de alimento, específicamente a través de receptores adrenérgicos tipo beta-3 en el sistema nervioso central (Richard et al. 2017). Debido a que por sí sola a simpatectomía no ejerció un efecto significativo en la ingesta de alimento, sugiere que moléculas como IL-6 u otras podrían ser responsables de los efectos anorexigénicos en este modelo tumoral.

En cuanto a la progresión tumoral, es sabido que el sistema nervioso simpático participa directamente contribuyendo en la progresión de los hallmarks de cáncer (Qiao et al. 2018). Sin embargo, en nuestro experimento no observamos cambios en el volumen o peso tumoral final asociados a la simpatectomía. Por un lado, algunos trabajos han reportado hallazgos divergentes, donde el efecto de la simpatectomía se asocia a un mayor volumen tumoral pero mayor supervivencia de los ratones portadores de tumor (Horvathova et al. 2016a) pero en otro trabajo por el mismo autor observa que la simpatectomía incrementa la expresión transcripcional de bcl-2 y caspasa 3, los cuales están asociados a apoptosis lo que indica un efecto antitumoral (Horvathova et al. 2016b). En nuestro trabajo, observamos que la simpatectomía no se asocia a cambios en la expresión relativa de *Mmp-2* tumoral, pero sí disminución de la expresión transcripcional de *Mmp-9* tumoral. Las metaloproteinasas son relevantes en varios aspectos de la progresión de cáncer, incluyendo mecanismos como invasión, migración e inflamación (Mustafa et al. 2022).

Nuestra siguiente pregunta fue si el tumor ejerce alteraciones en sistema nervioso central y si estas alteraciones eran con participación del sistema nervioso simpático. Para ello empleamos pruebas conductuales que evalúan características de ansiedad y desempeño cognitivo en ratones macho y hembra portadores de tumor. También nos preguntamos si

la carga tumoral debido a su ubicación podría afectar la movilidad del ratón, afectando los resultados de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (NORT). Con este propósito empleamos una prueba de campo abierto (OFT) para evaluar movilidad y también nos permitió evaluar tigmotaxis o movimiento cerca de las paredes como un indicador de ansiedad (Gould et al. 2009). Las determinaciones se hicieron comparando el día basal -3 contra el día 5 y 10 postimplantación del tumor para ver los cambios conductuales debido a la progresión del experimento. En ratones macho, no se observaron cambios en los indicadores de movilidad tanto en ratones libre y portadores de tumor. Por lo tanto, concluimos que la carga tumoral no afecta a la movilidad en ratones machos portadores de un tumor sólido. En contraste, en ratones hembras sí se observó una disminución en la velocidad media, ratio de movilidad, y distancia total en el día 10, cuando la media del volumen tumoral estaba en 767.68 mm³. Walker et al., y Santos et al., también utilizaron ratones hembra BALB/c utilizando los modelos de cáncer de mama 4T1, y 67NR y encontraron disminución en la distancia total recorrida lo cual va de acuerdo con nuestras observaciones. Estos estudios se centraron en ratones hembra, probablemente por la incidencia de deterioro cognitivo asociado a cáncer (Ahles et al. 2012). Por otro lado, en ratones machos libre de tumor observamos una disminución significativa en tiempo en el centro de la arena de forma constante durante la progresión del experimento, lo cual indica que los ratones exploraban menos tiempo el centro de la arena conforme pasaban las sesiones de campo abierto. En estos animales, el conteo de heces fecales incremento para el día 10. También la frecuencia en la orina incremento conforme progresaban las sesiones de campo abierto. La defecación es considerada un indicador de ansiedad o de alteraciones en la respuesta del sistema nervioso autónomo (Gould et al. 2009). Aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas en el grupo tumor, se observa una tendencia similar al comparar el grupo portador de tumor con los libres de tumor. Estos resultados sugieren que los ratones macho en general tienden a estresarse más conforme cada sesión. En contraste, en ratones hembra si se observó una disminución significativa en el tiempo en el centro de la arena para el grupo portador y libre de tumor, con ello descartamos un estado de ansiedad asociado a tumor. Santos (2019) et al. no encontró diferencias en el tiempo en el centro en el grupo de ratones portadores de tumor, de forma similar, un estudio en hembras BALB/c portadores del

tumor CT26 tampoco encontró diferencias en el tiempo en el centro y en indicadores de locomoción en general. De forma general se suele comparar contrastando grupos libres de tumor contra los portadores de tumor y no durante la progresión del tumor, estudios longitudinales con comparaciones entre sesiones son escasos. Nuestro siguiente objetivo fue evaluar si la carga tumoral está asociada a los déficits cognitivos en ratones portadores del linfoma L5178Y-R. Para ello realizamos pruebas NORT que nos permitieron evaluar alteraciones en memoria a corto plazo lo cual refleja cambios en regiones cerebrales tales como corteza e hipocampo (Antunes y Biala 2011). En la prueba NORT, un índice de reconocimiento cerca o por debajo del 50% de exploración del objeto novedoso indica que el ratón exploró ambos objetos por un tiempo similar, fallando en recordar que ya exploró el objeto conocido y en reconocer el objeto novedoso como nuevo (Kraeuter et al. 2018). En promedio en los días -3, y 5, el tiempo de exploración del objeto novedoso permaneció por encima del 50% tanto en machos como en hembras, indicando que no existen déficits en memoria asociado a la carga tumoral. En nuestro experimento, para el día 5 los tumores son apenas palpables, pero no influyeron en el comportamiento del ratón. Walker et al. (2018) observó deficiencias en el desempeño de las pruebas NORT en el modelo de cáncer de mama 4T1 desde el día 4, antes de que los tumores fueran palpables, lo cual sucede aproximadamente al día 9 según el autor. Para el día 10, encontramos una disminución significativa en el reconocimiento del objeto novedoso en machos, pero no en hembras, aunque en general el promedio el índice de reconocimiento fue de 56.84% en el grupo libre de tumor y 50.15% en el grupo portador de tumor. A pesar de que la literatura reporta un bajo desempeño en la prueba NORT por parte de ratones hembra portadores de tumor. Demers et al. (2018) reportó que ratones hembra C57BL/6 portadores de LLC no mostraron déficits en la prueba NORT con un índice de reconocimiento cerca del 70%, asimismo, Santos et al. (2019) tampoco observó déficits en la prueba NORT. Los estudios que evalúan la influencia del tumor en deterioro cognitivo asociado a cáncer son escasos, y aquellos que consideran al sexo como un factor son marginales. Sin embargo, en ratones C57BL/6J se encontró que la administración de estrógenos mitiga las afecciones menopáusicas en la función cognitiva (Zeng et al. 2023), destacando la importancia al considerar diferencias por sexo en estudios cognitivos. Dado a observaciones previas sobre los niveles de NE plasmática en ratones portando nuestro modelo tumoral, nos

preguntamos si el SNS participa en las alteraciones de movilidad y cognitivas observadas. Ya que estudios en humanos han observado que un SNS hiperactivo afecta la capacidad cognitiva de los individuos (Pagen et al. 2021). Para ello, similar al primer objetivo, realizamos una simpatectomía y se realizaron las mismas pruebas (OFT y NORT) para evaluar la participación del SNS durante la progresión tumoral en los indicadores conductuales. En cuanto los indicadores de movilidad, no se observaron cambios asociados a la simpatectomía, el comportamiento en ratones macho y hembra libres y portadores de tumor se mantuvo, observando que no había cambios en la movilidad de ratones macho y una disminución en indicadores de movilidad de ratones hembra. En cuanto indicadores de ansiedad, la tendencia se mantuvo a explorar menos tiempo el centro independientemente del tumor. Para la prueba NORT, en el día 10 post implantación tumoral, en ratones machos se observó un déficit en el IR tanto en ratones libres de tumor como en los portadores de tumor simpatectomizados, por su parte en hembras, el IR promedio se mantuvo por arriba de 57% a pesar del tumor. Este resultado demuestra las diferencias en respuesta a patologías debido al sexo, en un trabajo realizado por Pinizzotto et al. (2022) encontraron que lesiones con 6-OHDA en ratas Sprague-Dawley induce déficits en el desempeño en la prueba de objeto novedoso en ratas macho pero no en hembras, resaltando la importancia en las diferencias por sexo, sin embargo es importante aclarar que las lesiones hechas en el trabajo citado son a nivel sistema nervioso central mientras que el nuestro es periférico. Estos resultados nos sugieren que en las alteraciones conductuales y cognitivos asociados a tumor no participa el sistema nervioso simpático. Nuestro siguiente objetivo fue explorar si se presenta el fenómeno de hiperlipidemia asociado a tumor, si este contribuye en la progresión tumoral y si esta hiperlipidemia participaba en las alteraciones cognitivas observadas. Esto en respuesta a potenciales alteraciones en el metabolismo de lípidos ya que en este modelo observamos lipólisis asociada a tumor. Al medir un perfil lipídico en plasma de ratones portadores de tumor, observamos un aumento en VLDL. En un estudio se reportó que ratones portadores del carcinoma pulmonar LLC y del melanoma B16 y en células transformadas BCR-Abl precursoras de células B, se observó hiperlipidemia asociada a tumor junto a un incremento en VLDL y que esta hiperlipidemia se asocia con una mayor progresión tumoral (Huang et al. 2016). Sin embargo, nosotros no observamos cambios en el volumen

y peso tumoral final cuando tratamos con las estatinas Atorvastatin y el antilipídico Acipimox, a pesar de que Acipimox restableció los niveles de VLDL. Al evaluar los indicadores de movilidad y ansiedad en los ratones macho, observamos que el tratamiento con las estatinas se asocia a una disminución en la movilidad conforme progresaban las pruebas conductuales. Esto nos sugiere un potencial estrés debido a las inyecciones ya que, en machos portadores de tumor sin inyecciones, no cambiaba su movilidad. Por otro lado, se ha observado que la hiperlipidemia se asocia a déficits cognitivos; sin embargo, ha sido evaluado solamente en contextos ajenos a cáncer. Se ha observado una asociación entre dislipidemia y déficits cognitivos en individuos con obesidad (Morys et al. 2021) y en modelos murinos de Alzheimer la atorvastatina atenúa los déficits cognitivos según la prueba NORT (Zhou et al. 2016). En la prueba NORT se evalúa el índice de reconocimiento el cual un índice cerca o igual a 50 es indicativo de que los objetos se exploraron por igual indicando un déficit en el reconocimiento del objeto nuevo (Denninger et al. 2018). En nuestros resultados observamos también atenuación en el déficit cognitivo según la prueba NORT, en el grupo tratado con Acipimox. El grupo tratado obtuvo un índice de reconocimiento de 63.71% mientras que el grupo tratado con atorvastatina obtuvo un índice de 51.98%. Ambos antilipídicos tienen mecanismos distintos, por una parte, Atorvastatin inhibe la HMG-CoA reductasa regulando así la síntesis de colesterol en el hígado (McIver y Siddique 2025), por su parte Acipimox actúa sobre la triaglicerol lipasa e inhibe la liberación de ácidos grasos y glicerol sin efectos consistentes sobre la síntesis de colesterol, sin embargo, si regula la producción de VLDL (Stirling et al. 1985). Por otro lado, la producción de VLDL es estimulada por ácidos grasos libres (Lewis et al. 1995). Esto sugiere que la dislipidemia inducida por tumor en este modelo está asociado al metabolismo de ácidos grasos libres y triglicéridos, pero no a colesterol, y que VLDL este asociado a los déficits cognitivos.

Por último, se realizó un análisis metabolómico para identificar cambios biológicos en ratones con tumor y si esto podría explicar algunas de las alteraciones asociadas a tumor. En los resultados se observó que los principales metabolitos alterados fueron los lípidos. Además, existe diferencia por sexo, en ratones macho se observa alteración en 90 metabolitos, mientras que en hembras solamente en 3, de acuerdo con la prueba ANOVA. Los principales metabolitos que se observaron alterados fueron las ceramidas,

esfingomielinas y fosfatidilcolinas. Por ejemplo, en ratones macho se observó el incremento de la ceramida Cer(d18:1/24:1), la cual también se ha visto incrementada en perfiles lipídicos en líneas celulares humanas de cáncer de próstata NB26 y PC-3 (Brzozowski et al. 2018). Algo a notar, es que estudios han observado que niveles elevados de ceramidas, incluyendo especies con base d:18 se asocian a riesgo en Alzheimer (Mielke et al. 2012). Otro metabolito que se observó elevado en ratones macho con tumor fue la fosfatidilcolina PC aa C40:6, la cual también se ha visto elevada en muestras de líquido cefalorraquídeo en personas con un perfil bioquímico similar a Alzheimer, caracterizado por niveles reducidos de Ab42 y niveles elevados de tau total, así como P-tau-181 (Koal et al. 2015). Esto es relevante en nuestro estudio dado a las observaciones de deterioro cognitivo en ratones con tumor. Por su parte, en hembras la hexosilceramida HexCer(d18:1/16:0) se observó elevados en comparación a los ratones libres de tumor, dicha observación concuerda con observaciones hechas en exosomas de pacientes con cáncer colorrectal (Elmallah, M.I. et al. 2022).

CONCLUSIONES

En ratones machos BALB/c que portan el linfoma murino L5178Y-R, el sistema nervioso simpático se comunica con el tumor por medio de la inervación simpática promoviendo progresión tumoral a través de la expresión transcripcional de *Mmp-9* y contribuye en el desgaste de tejido adiposo visceral que caracteriza a caquexia. Por otra parte, la carga tumoral se asocia a un estado inflamatorio, hipofagia y a termogénesis de forma independiente de la inervación simpática. Adicionalmente, la carga tumoral se asocia a déficits en memoria de reconocimiento sin participación del SNS. Por otro lado, el tumor se asocia a elevación en VLDL plasmática, niveles que se restablecen con el antilipidémico Acipimox.

PERSPECTIVAS

- Por medio de inmunohistoquímica, evaluar la activación de distintas regiones cerebrales asociadas a retos inmunes, memoria, emociones y SNS en ratones macho y hembra portadores de tumor y simpatectomizados.
- Evaluar gliosis y la expresión de factores neurotróficos como BDNF en cerebros de ratones macho y hembra portadores de tumor y simpatectomizados.
- Evaluar memoria a largo plazo en los ratones macho y hembra portados de tumor
- Realizar la prueba NORT en ratones hembra bajo tratamiento con Atorvastatin y Acipimox.
- Evaluar el uso de las estatinas Atorvastatin y Acipimox en memoria de trabajo espacial en ratones macho y hembra.

REFERENCIAS

- Ahles, T. A., Saykin, A. J., McDonald, B. C., Furstenberg, C. T., Cole, B. F., Hanscom, B. S., Mulrooney, T. J., Schwartz, G. N., Kaufman, P. A. 2008. Cognitive Function in Breast Cancer Patients Prior to Adjuvant Treatment. *Breast Cancer Res Treat*, 110: 143–152.
- Ahles, T.A., Root, J.C. and Ryan, E.L. 2012. Cancer- and cancer treatment–associated cognitive change: An update on the state of the science, *Journal of Clinical Oncology*, 30: 3675–3686. doi:10.1200/jco.2012.43.0116.
- Albo, D., Akay, C., Marshall, C., Wilks, J., Verstovsek, G., Liu, H., Agarwal, N., Berger, D. y Ayala, G., 2011. Neurogenesis in colorectal cancer is a marker of aggressive tumor behavior and poor outcomes. *Cancer*, 117: 4834-4845.
- Aletaha, M., Salour, H., Bagheri, A., Raffati, N., y Amouhashemi, N. 2012. Oral propranolol for treatment of pediatric capillary hemangiomas. *Journal of ophthalmic & vision research*, 7: 130–133.
- Alshak MN, y M Das J. Neuroanatomy, Sympathetic Nervous System. [Updated 2020 Jul 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542195/>
- Antunes, M. and Biala, G. 2011. The novel Object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications, *Cognitive Processing*, 13: 93–110. doi:10.1007/s10339-011-0430-z.
- Bapat, A., Munoz, R., Von Hoff, D. y Han, H., 2016. Blocking nerve growth factor signaling reduces the neural invasion potential of pancreatic cancer cells. *PLOS ONE*, 11(10), p.e0165586.
- Barbieri, A., Bimonte, S., Palma, G., Luciano, A., Rea, D., Giudice, A., Scognamiglio, G., la Mantia, E., Franco, R., Perdonà, S., de Cobelli, O., Ferro, M., Zappavigna, S., Stiuso, P., Caraglia, M. y Arra, C. 2015. The stress hormone norepinephrine increases migration of prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Oncology*, 47: 527-534.
- Baselga, E., Dembowska-Baginska, B., Przewratil, P., González-Enseñat, M., Wyrzykowski, D., Torrelo, A., López Gutiérrez, J., Rychłowska-Pruszyńska, M., de Lucas-Laguna, R., Esteve-Martinez, A., Roé, E., Zaim, M., Menon, Y., Gautier, S.,

- Lebbé, G., Bouroubi, A., Delarue, A. y Voisard, J. 2018. Efficacy of propranolol between 6 and 12 months of age in high-risk infantile hemangioma. *Pediatrics*, 142: 1-8
- Bastos, D., Sarafim-Silva, B., Sundefeld, M., Ribeiro, A., Brandão, J., Biasoli, É., Miyahara, G., Casarini, D. y Bernabé, D. 2018. Circulating catecholamines are associated with biobehavioral factors and anxiety symptoms in head and neck cancer patients. *PLOS ONE*, 13:1-18
- Bernabé, D., Tamae, A., Biasoli, É. y Oliveira, S. 2011. Stress hormones increase cell proliferation and regulates interleukin-6 secretion in human oral squamous cell carcinoma cells. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25:574-583.
- Bodine, S. y Baehr, L., 2014. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 307: E469-E484.
- Brendle, C., Stefan, N., Grams, E., Soekler, M., la Fougère, C. y Pfannenber, C., 2020. Determinants of activity of brown adipose tissue in lymphoma patients. *Scientific Reports*, 10.
- Bruno, G., Cencetti, F., Pini, A., Tondo, A., Cuzzubbo, D., Fontani, F., Strinna, V., Buccoliero, A., Casazza, G., Donati, C., Filippi, L., Bruni, P., Favre, C. y Calvani, M., 2019. β 3-adrenoreceptor blockade reduces tumor growth and increases neuronal differentiation in neuroblastoma via SK2/S1P2 modulation. *Oncogene*, 39: 368-384.
- Brzozowski, J.S., Jankowski, H., Bond, D.R., McCague, S.B., Munro, B.R., Predebon, M.J., Scarlett, C.J., Skelding, K.A. y Weidenhofer, J. (2018) 'Lipidomic profiling of extracellular vesicles derived from prostate and prostate cancer cell lines', *Lipids in Health and Disease*, 17. doi:10.1186/s12944-018-0854-x.
- Bustamante, P., Miyamoto, D., Goyeneche, A., Alba Graue, P., Jin, E., Tsering, T., Dias, A., Burnier, M. and Burnier, J., 2019. Beta-blockers exert potent anti-tumor effects in cutaneous and uveal melanoma. *Cancer Medicine*, 8: 7265-7277.
- Caballero-Hernandez, D., Najera-Valderrabano, D., Valadez-Lira, A., Franco-Molina, M., Gomez-Flores, R., Tamez-Guerra, P., Tamez-Guerra, R. y Rodríguez-Padilla, C. 2017. Alterations of antitumor and metabolic responses in L5178Y-R lymphoma-

- bearing mice after only 30-minute daily chronic stress exposure. *Experimental Oncology*, 39:, 276-280.
- Calvani, M., Pelon, F., Comito, G., Taddei, M., Moretti, S., Innocenti, S., Nassini, R., Gerlini, G., Borgognoni, L., Bambi, F., Giannoni, E., Filippi, L. y Chiarugi, P. 2015. Norepinephrine promotes tumor microenvironment reactivity through β -3 adrenoreceptors during melanoma progression. *Oncotarget*, 6: 4615-4632.
- Cao, Q., Hersl, J., La, H., Smith, M., Jenkins, J., Goloubeva, O., Dilsizian, V., Tkaczuk, K., Chen, W. y Jones, L. 2014. A pilot study of FDG PET/CT detects a link between brown adipose tissue and breast cancer. *BMC Cancer*, 14.
- Castillero, E., Alamdari, N., Lecker, S. y Hasselgren, P. 2013. Suppression of atrogen-1 and MuRF1 prevents dexamethasone-induced atrophy of cultured myotubes. *Metabolism*, 62: 1495-1502.
- Cervantes-Villagrana, R., Albores-García, D., Cervantes-Villagrana, A. y García-Acevez, S. 2020. Tumor-induced neurogenesis and immune evasion as targets of innovative anti-cancer therapies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5.
- Chang, P., Huang, W., Lin, C., Huang, T., Wu, Y., Chen, J., y Kao, C. 2015. Propranolol Reduces Cancer Risk. *Medicine*, 94: e1097. doi: 10.1097/md.0000000000001097
- Ciccarelli, M., Sorriento, D., Coscioni, E., Iaccarino, G. y Santulli, G. 2019. Adrenergic Receptors. En: *Endocrinology of the Heart in Health and Disease*. Academic Press Elsevier. pp. 285-286.
- Cypess, A., Weiner, L., Roberts-Toler, C., Elía, E., Kessler, S., Kahn, P., English, J., Chatman, K., Trauger, S., Doria, A. y Kolodny, G., 2015. Activation of human 42 brown adipose tissue by a β 3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metabolism*, 21: 33-38.
- Deng, M., Cai, X., Long, L., Xie, L., Ma, H., Zhou, Y., Liu, S. y Zeng, C., 2019. CD36 promotes the epithelial–mesenchymal transition and metastasis in cervical cancer by interacting with TGF- β . *Journal of Translational Medicine*, 17.
- Dal Monte, M., Casini, G., Filippi, L., Nicchia, G., Svelto, M. y Bagnoli, P. 2013. Functional involvement of β 3-adrenergic receptors in melanoma growth and vascularization. *Journal of Molecular Medicine*, 91: 1407-1419.

- Dalal, S., 2019. Lipid metabolism in cancer cachexia. *Annals of Palliative Medicine*, 8: 13-23.
- Denninger, J. K., Smith, B. M. y Kirby, E. D., 2018. Novel object recognition and object location behavioral testing in mice on a budget. *Journal of Visualized Experiments*. doi:10.3791/58593.
- Drury, J., Rychahou, P., He, D., Jafari, N., Wang, C., Lee, E., Weiss, H., Evers, B. y Zaytseva, Y., 2020. Inhibition of fatty acid synthase upregulates expression of CD36 to sustain proliferation of colorectal cancer cells. *Frontiers in Oncology*, 10.
- Dundamadappa, S., Shankar, S., Danrad, R., Singh, A., Vijayaraghavan, G., Kim, Y. y Perugini, R., 2007. Imaging of brown fat associated with adrenal pheochromocytoma. *Acta Radiologica*, 48: 468-472.
- Elmallah, M.I.Y., Ortega-Deballon, P., Hermite, L., Pais-De-Barros, J.-P., Gobbo, J. y Garrido, C. 2022. Lipidomic profiling of exosomes from colorectal cancer cells and patients reveals potential biomarkers, *Molecular Oncology*, 16: 2710–2718. doi:10.1002/1878-0261.13223.
- Fearon, K., Strasser, F., Anker, S., Bosaeus, I., Bruera, E., Fainsinger, R., Jatoi, A., Loprinzi, C., MacDonald, N., Mantovani, G., Davis, M., Muscaritoli, M., Ottery, F., Radbruch, L., Ravasco, P., Walsh, D., Wilcock, A., Kaasa, S. y Baracos, V. 2011. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *The Lancet Oncology*, 12: 489-495.
- Fedorenko, A., Lishko, P., y Kirichok, Y. 2012. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*, 151: 400-413. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.010
- Fitzgerald, P. 2009. Is norepinephrine an etiological factor in some types of cancer?. *International Journal of Cancer*, 124: 257-263.
- Furuta, E., Pai, S., Zhan, R., Bandyopadhyay, S., Watabe, M., Mo, Y., Hirota, S., Hosobe, S., Tsukada, T., Miura, K., Kamada, S., Saito, K., Iizumi, M., Liu, W., Ericsson, J. y Watabe, K., 2008. Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. *Cancer Research*, 68: 1003-1011.

- Gould, T.D., Dao, D.T. and Kovacsics, C.E. (2009) The open field test, *Neuromethods*, 42, pp. 1–20. doi:10.1007/978-1-60761-303-9_1.
- Guo.K., Ma Q., Wang L., Hu H., Li J., Zhang D y Zhang M. 2009. Norepinephrine-induced invasion by pancreatic cancer cells is inhibited by propranolol. *Oncology Reports*. 22: 825-830
- Han, J., Meng, Q., Shen, L. and Wu, G. 2018. Interleukin-6 induces fat loss in cancer cachexia by promoting white adipose tissue lipolysis and browning. *Lipids in Health and Disease*, 17.
- Huang, J., Li, L., Lian, J., Schauer, S., Vesely, P. W., Kratky, D., Hoefler, G. y Lehner, R., 2016. Tumor-induced hyperlipidemia contributes to tumor growth. *Cell Reports*, 15: 336–348.
- Ito, A., Ohnuki, Y., Suita, K., Ishikawa, M., Mototani, Y., Shiozawa, K., Kawamura, N., Yagisawa, Y., Nariyama, M., Umeki, D., Nakamura, Y. y Okumura, S., 2019. Role of β -adrenergic signaling in masseter muscle. *PLOS ONE*, 14: p.e0215539.
- Johnson D. 2013. Adrenergic Activation. In: Gellman M.D., Turner J.R. (eds) *Encyclopedia of Behavioral Medicine*. Springer, New York, NY DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1005-9_1204
- Kagami, S., Kaneko, M., y Katori, T. 2018. Thirty-two Japanese cases of infantile hemangiomas treated with oral propranolol. *The Journal of Dermatology*, 45: 719-722. doi: 10.1111/1346-8138.14316
- Koal, T., Klavins, K., Seppi, D., Kemmler, G., Humpel, C. 2015. Sphingomyelin SM(D18:1/18:0) is significantly enhanced in cerebrospinal fluid samples dichotomized by pathological amyloid- β 42, Tau, and Phospho-Tau-181 levels, *Journal of Alzheimer's Disease*, 44:1193–1201. doi:10.3233/JAD-142319.
- Kovalchuk, A., Nersisyan, L., Mandal, R., Wishart, D., Mancini, M., Sidransky, D., Kolb, B. y Kovalchuk, O., 2018. Growth of malignant non-CNS tumors alters brain metabolome. *Frontiers in Genetics*, 9.
- Kraeuter, A.-K., Guest, P.C. and Sarnyai, Z. (2018) The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice, *Methods in Molecular Biology*, pp. 105–111. doi:10.1007/978-1-4939-8994-2_10.

- Kuemmerle, N., Rysman, E., Lombardo, P., Flanagan, A., Lipe, B., Wells, W., Pettus, J., Froehlich, H., Memoli, V., Morganelli, P., Swinnen, J., Timmerman, L., Chaychi, L., Fricano, C., Eisenberg, B., Coleman, W. y Kinlaw, W., 2011. Lipoprotein lipase links dietary fat to solid tumor cell proliferation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10: 427-436.
- Laureys, G., Gerlo, S., Spooren, A., Demol, F., De Keyser, J. y Aerts, J., 2014. β 2-adrenergic agonists modulate TNF- α induced astrocytic inflammatory gene expression and brain inflammatory cell populations. *Journal of Neuroinflammation*, 11: 21.
- Lewis, G. F., Uffelman, K. D., Szeto, L. W., Weller, B. y Steiner, G., 1995. Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 95: 158–166. doi:10.1172/JCI117633.
- Liang, Y., Han, H., Liu, L., Duan, Y., Yang, X., Ma, C., Zhu, Y., Han, J., Li, X. y Chen, Y., 2018. CD36 plays a critical role in proliferation, migration and tamoxifen-inhibited growth of ER-positive breast cancer cells. *Oncogenesis*, 7.
- Li, T., Tsai, Y., Hsu, C., Liu, C., Huang, C., Yang, Y. et al. 2020. Propranolol is associated with lower risk of incidence of hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis: a tertiary-center study and indirect comparison with meta-analysis. *gastroenterology research and practice*, 2020, 1-7. doi: 10.1155/2020/1892584
- Léauté-Labrèze, C., Dumas de la Roque, E., Hubiche, T., Boralev, F., Thambo, J. y Taïeb, A., 2008. *Propranolol for Severe Hemangiomas of Infancy* | *NEJM*. [online] New England Journal of Medicine. Available at: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc0708819> [Accessed 17 February 2021].
- McCorry, L. 2017. Physiology of the autonomic nervous system. *Am J Pharm Educ*. 71: 78. doi:10.5688/aj710478
- McIver, L. A. y Siddique, M. S., n.d. Atorvastatin. National Center for Biotechnology Information. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430779/> [Accessed: 5 November 2025].

- Mielke, M.M., Bandaru, V.V.R., Haughey, N.J., Xia, J., Fried, L.P., Yasar, S., Albert, M., Varma, V., Harris, G., Schneider, E.B., Rabins, P.V., Bandeen-Roche, K., Lyketsos, C.G. y Carlson, M.C. 2012. Serum ceramides increase the risk of Alzheimer disease: The Women's Health and Aging Study II', *Neurology*, 79: 633–641. doi:10.1212/WNL.0b013e318264e380.
- Minarelli, J., Davis, E., Dickerson, A., Moore, W., Mejia, J., Gugala, Z., Olmsted-Davis, E. y Davis, A., 2019. Characterization of neuromas in peripheral nerves and their effects on heterotopic bone formation. *Molecular Pain*, 15, p.174480691983819.
- Mravec, B., Lackovicova, L., Pirnik, Z., Bizik, J., Bundzikova, J., Hulin, I. and Kiss, A., 2009. Brain response to induced peripheral cancer development in rats: dual fos-tyrosine hydroxylase and fos-oxytocin immunohistochemistry. *Endocrine Regulations*, pp.3-11.
- Molina-Montero, S. 2016. Efecto del estrés crónico sobre el linfoma murino L5178YR. Maestría en ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza, N.L., México.
- Morys, F., Dadar, M. y Dagher, A., 2021. Association between midlife obesity and its metabolic consequences, cerebrovascular disease, and cognitive decline. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 106: e4260–e4274.
- Palm, D., Lang, K., Niggemann, B., Drell, T., Masur, K., Zaenker, K. y Entschladen, F. 2006. The norepinephrine-driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by β -blockers. *International Journal of Cancer*, 118:2744-2749.
- Pang, Z., Lu, Y., Zhou, G., Hui, F., Xu, L., Viau, C., Spigelman, A. F., MacDonald, P. E., Wishart, D. S., Li, S., Xia, J. 2024 MetaboAnalyst 6.0: towards a unified platform for metabolomics data processing, analysis and interpretation. *Nucleic Acids Research*, 52: W398–W406. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae253>
- Pagen, L. H. G., Smeets, T., Schmiedek, L., Yassa, M. A., Verhey, F. R. J. y Jacobs, H. I. L., 2021. Elevated activity of the sympathetic nervous system is related to diminished practice effects in memory: a pilot study. *Journal of Alzheimer's Disease*, 80: 1675–1685. doi:10.3233/JAD-200783.

- Petruzzelli, M., Schweiger, M., Schreiber, R., Campos-Olivas, R., Tsoli, M., Allen, J., Swarbrick, M., Rose-John, S., Rincon, M., Robertson, G., Zechner, R. y Wagner, E. 2014. A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. *Cell Metabolism*, 20: 433-447.
- Pinizzotto, C. C., Patwardhan, A., Aldarondo, D. y Kritzer, M. F., 2022. Task-specific effects of biological sex and sex hormones on object recognition memories in a 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease in adult male and female rats. *Hormones and Behavior*, 144, 105206. doi:10.1016/j.yhbeh.2022.105206.
- Pötsch, M., Tschirner, A., Palus, S., von Haehling, S., Doehner, W., Beadle, J., Coats, A., Anker, S. y Springer, J. 2013. The anabolic catabolic transforming agent (ACTA) espidolol increases muscle mass and decreases fat mass in old rats. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 5: 149-158.
- Puar, T., van Berkel, A., Gotthardt, M., Havekes, B., Hermus, A., Lenders, J., van Marken Lichtenbelt, W., Xu, Y., Brans, B. y Timmers, H., 2016. Genotype-dependent brown adipose tissue activation in patients with pheochromocytoma and paraganglioma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101: 224-232.
- Puppa, M., White, J., Velázquez, K., Baltgalvis, K., Sato, S., Baynes, J. y Carson, J., 2011. The effect of exercise on IL-6-induced cachexia in the *ApcMin*/⁺mouse. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 3: 117-137.
- Puzzo, D., Raiteri, R., Castaldo, C., Capasso, R., Pagano, E., Tedesco, M., Gulisano, W., Drozd, L., Lippiello, P., Palmeri, A., Scotto, P. y Miniaci, M. 2016. CL316,243, a β 3-adrenergic receptor agonist, induces muscle hypertrophy and increased strength. *Scientific Reports*, 6.
- Renz, B., Takahashi, R., Tanaka, T., Macchini, M., Hayakawa, Y., Dantes, Z., Maurer, H., Chen, X., Jiang, Z., Westphalen, C., Ilmer, M., Valenti, G., Mohanta, S., Habenicht, A., Middelhoff, M., Chu, T., Nagar, K., Tailor, Y., Casadei, R., Di Marco, M., Kleespies, A., Friedman, R., Remotti, H., Reichert, M., Worthley, D., Neumann, J., Werner, J., Iuga, A., Olive, K. y Wang, T., 2018. β 2 adrenergic-neurotrophin feedforward loop promotes pancreatic cancer. *Cancer Cell*, 33: 75-90.e7.

- Santos, J.C., Bever, S.R., Sullivan, K.A. and Pyter, L.M., 2019. Cancer and cancer survival modulates brain and behavior in a time-of-day-dependent manner in mice. *Scientific Reports*, 9. doi:10.1038/s41598-019-42880-w.
- Shellock, F., Riedinger, M. y Fishbein, M., 1986. Brown adipose tissue in cancer patients: Possible cause of cancer-induced cachexia. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 111: 82-85.
- Shinsyu, A., Bamba, S., Kurihara, M., Matsumoto, H., Sonoda, A., Inatomi, O., Andoh, A., Takebayashi, K., Kojima, M., Iida, H., Tani, M. y Sasaki, M., 2020. Inflammatory cytokines, appetite-regulating hormones, and energy metabolism in patients with gastrointestinal cancer. *Oncology Letters*, 20: 1469-1479.
- Simó, M.; Root, J. C.; Vaquero, L.; Ripollés, P.; Jové, J.; Ahles, T.; Navarro, A.; Cardenal, F.; Bruna, J.; Rodríguez-Fornells, A. Cognitive and Brain Structural Changes in a Lung Cancer Population. *Journal of Thoracic Oncology* **2015**, *10*: 38–45.
- Speakman, J., 2019. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. *International Journal of Obesity*, 43: 1491-1492.
- Stewart Coats, A., Ho, G., Prabhash, K., Haehling, S., Tilson, J., Brown, R., Beadle, J. y Anker, S., 2016. Espindolol for the treatment and prevention of cachexia in patients with stage III/IV non-small cell lung cancer or colorectal cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled, international multicentre phase II study (the ACT-ONE trial). *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 7: 355-365.
- Stirling, C., McAleer, M., Reckless, J. P. D., Campbell, R. R., Mundy, D., Betteridge, D. J. y Foster, K., 1985. Effects of acipimox, a nicotinic acid derivative, on lipolysis in human adipose tissue and on cholesterol synthesis in human jejunal mucosa. *Clinical Science (London)*, 68: 83–88. doi:10.1042/cs0680083.
- Tchivileva, I., Tan, K., Gambarian, M., Nackley, A., Medvedev, A., Romanov, S., Flood, P., Maixner, W., Makarov, S. y Diatchenko, L., 2009. Signaling pathways mediating β 3-adrenergic receptor-induced production of interleukin-6 in adipocytes. *Molecular Immunology*, 46: 2256-2266.
- Tortora, G. y Derrickson, B. 2014. Principles of anatomy and physiology. 14th ed. Hoboken: Wiley, pp.524-525.

- Tsoli, M., Moore, M., Burg, D., Painter, A., Taylor, R., Lockie, S., Turner, N., Warren, A., Cooney, G., Oldfield, B., Clarke, S. y Robertson, G. 2012. Activation of thermogenesis in brown adipose tissue and dysregulated lipid metabolism associated with cancer cachexia in mice. *Cancer Research*, 72: 4372-4382.
- Wang, F., Liu, H., Wang, F., Xu, R., Wang, P., Tang, F., Zhang, X., Zhu, Z., Lv, H. y Han, T. 2018. Propranolol suppresses the proliferation and induces the apoptosis of liver cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 17: 5213-5221.
- Xie, H., Li, B., Li, L., Zou, X., Zhu, C., Li, Y., Gao, N., Chen, Q. y Li, L., 2014. Association of increased circulating catecholamine and glucocorticoid levels with risk of psychological problems in oral neoplasm patients. *PLoS ONE*, 9(7), p.e99179.
- Yang, E., Sood, A., Chen, M., Li, Y., Eubank, T., Marsh, C., Jewell, S., Flavahan, N., Morrison, C., Yeh, P., Lemeshow, S. y Glaser, R. 2006. Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Cancer Research*, 66:10357-10364.
- Yoshida, T., Yokobori, T., Saito, H., Kuriyama, K., Kumakura, Y., Honjo, H., Hara, K., Sakai, M., Miyazaki, T., Obinata, H., Erkhem-Ochir, B., Gombodorj, N., Sohda, M., Saeki, H., Kuwano, H. y Shirabe, K., 2020. CD36 Expression Is associated with cancer aggressiveness and energy source in esophageal squamous cell carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 28: 1217-1227.
- Zaidi, N., Lupien, L., Kummerle, N., Kinlaw, W., Swinnen, J. y Smans, K., 2013. Lipogenesis and lipolysis: The pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 52: 585-589.
- Zheng, M., Zhou, Z., Tian, X., Xiao, D., Hou, X., Xie, Z., Liang, H. y Lin, S., 2020. ADRB3 expression in tumor cells is a poor prognostic factor and promotes proliferation in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 69: 2345-2355.
- Zhou, D., Liu, H., Li, C., Wang, F., Shi, Y., Liu, L., Zhao, X., Liu, A., Zhang, J., Wang, C. y Chen, Z., 2016. Atorvastatin ameliorates cognitive impairment, A β 1-42

production and Tau hyperphosphorylation in APP/PS1 transgenic mice. *Metabolic Brain Disease*, 31: 693–703. doi:10.1007/s11011-016-9803-4.

Zeng, P.-Y., Tsai, Y.-H., Lee, C.-L., Ma, Y.-K. and Kuo, T.-H., 2023. Minimal influence of estrous cycle on studies of female mouse behaviors. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 16. doi:10.3389/fnmol.2023.1146109.