

Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular B
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

**MECANISMES ASSOCIATS AL DESENVOLUPAMENT DE
LA CAQUÈXIA EN ESTATS PATOLÒGICS:
IMPLICACIONS TERAPÈUTIQUES**

M^aTERESA FIGUERAS POLO

Barcelona, gener de 2005

MEMÒRIA PER OPTAR AL GRAU DE DOCTOR EN BIOLOGIA
PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOMEDICINA, BIENNI 1999-2001
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Presentada per

M^aTERESA FIGUERAS POLO

Vist i plau dels directors

Dr. Josep M. ARGILÉS i HUGUET

Catedràtic de Bioquímica i Biologia Molecular

Dra. M^aNeus CARBÓ i CARBÓ

Prof.associada Bioquímica i Biologia Molecular

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Universitat de Barcelona

La interessada

M^aTeresa Figueras Polo

A la meva mare

Aquesta tesi és per mi molt més que coneixements i resultats. Durant aquests anys, he conegut moltes persones sense les quals no hagués pogut arribar fins aquí, i per tant aquesta tesi és una mica de tots. És per això, que vull agrair-vos haver estat al meu costat durant tot aquest temps.

Vull donar les gràcies als meus directors de tesi. Al Josep per donar-me l'oportunitat d'entrar en el món de la recerca, per les seves idees, el seu optimisme i per seguir comptant amb mi. A la Neus que em va ensenyar a donar "les primeres passes" i em va contagiar el seu entusiasme, dedicació i il·lusió per la investigació.

Al Francesc li agraeixo el seu ajut en el laboratori, el seu seny i paciència que tantes vegades són necessaris en ciència.

També vull agrair l'ajuda de tota la gent el laboratori, perquè a més de feina hem compartit molts bons moments. A la Sílvia, no tinc paraules per agrair-li tot el que ha fet per mi, sobretot en aquesta última etapa. Et dec una (o moltes!!!); sé que últimament t'he donat molta feina i mai t'has queixat. Més que una companya o "jefa" he trobat en tu una gran amiga. A la Vane, que vam començar juntes aquest camí... i vèiem tant lluny el final....però tot arriba!. També al Rodrigo, la Eli (per estar sempre de bon humor), i la Gemma (ets un sol!). Us enyoro molt, ho sabeu!

Vull agrair també a la gent de fóra de la facultat que m'ha ajudat en la realització d'aquesta tesi. A l'Esther B., al Roberto R. i a la Paola, que em va fer sentir com a casa quan vaig estar a Torino.

També vull donar les gràcies a la gent del departament perquè m'han ajudat sempre que ho he necessitat, en especial al grup NO (l'Anna, la Marta, la Montse, Xavier R...), RST (el Javi, la Miriam, Sònia, Ivette, Sylvie, Elena...) i Insulina (la Marta C., l'Anna G., la Manu, etc.); a la gent de l'estabulari, el Toni, les "secres" (Pili, Georgina) i en especial a la Raquel amb la que he compartit llagues xerrades, riures i penes i sempre estar disposada a ajudar-me, ets una gran amiga!

També agraeixo el suport que m'han donat els meus amics, sobretot, la Mabel i el German (por cuidarme), la Patricia (por animarme y soportarme incondicionalmente y creer en mi).

A ti Franky, porque aunque la vida cambia, te agradezco lo que has hecho por mi durante todo este tiempo.

I sobretot, dono les gràcies a la meva família, en especial a la meva mare i a la meva germana que m'han donat ànims per continuar quan més ho necessitava i sempre han confiat en mi.

Moltes gràcies a tots!

AACR	aminoàcids de cadena ramificada	RT-PCR	<i>retrotranscriptase polimerase chain reaction</i>
ACTH	hormona adenocorticotropa	SIDA	síndrome de immunodeficiència adquirida
APAF	factor activador de la proteasa apoptòtica	SOD	superòxid dismutasa
ARC	repressor de l'apoptosi amb domini d'unió a caspases	TAM	teixit adipós marró
BMI	índex de massa corporal	TAB	teixit adipós blanc
CAD	DNAasa activada per caspases	TNF- α	factor de necrosi tumoral α
CNA-1	calcineurina	TNFR (1-2)	receptors (1-2) de TNF- α
CREB	Proteïna d'unió en resposta al cAMP	TNFs-R	receptor soluble de TNF- α
CRF	factor alliberador de corticotropina	TNF- β	limfotoxina
DAG	1' 2'-diacilglicerol	TRADD	proteïna associada al domini de mort del TNF- α
DD	domini de mort	TRAF	factor associat al receptor de TNF- α
DMD	distròfia muscular de Duchenne	TSH	hormona estimuladora de la tiroide
E1	enzim activador de la ubiquitina	TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling</i>
E2	enzim conjugador de la ubiquitina	UCP	proteïna desacobladora
E3	llogasa d'ubiquitina		
EDL	<i>extensor digitorum longus</i>		
FACS	<i>flourescence activated cell sorter</i>		
FADD	proteïna associada al domini de mort de Fas		
FasL	llogand de Fas		
FIA	factor inductor de l'apoptosi		
FLIP	<i>Fas-associated death domain like IL1 converting enzyme-inhibitory protein</i>		
γ GCS	gamma glutamil cisteïna sintasa		
GH	hormona del creixement		
GLUT	transportador de glucosa		
GSH	glutatió reduït		
GSN	<i>gastrocnemius</i>		
GSSG	glutatió oxidat		
H ₂ O ₂	peròxid d'oxigen		
I κ B α	inhibidor de NF κ B		
ICE	<i>interleukin-β converting enzyme</i>		
IFN	interferó		
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>		
IL-(1-23)	interleucina-(1-23)		
IL-1ra	antagonista de IL-1		
iNOS	sintasa d'òxid nítric induïble		
JNK	cinasa de c-jun		
LMF	factor mobilitzador de lípids		
LPL	lipoproteïna-lipasa		
LPS	lipopolisacàrid		
MAPK	cinasa de proteïna activada per mitògens		
MPOC	malaltia pulmonar obstructiva crònica		
NF κ B	factor nuclear κ B		
NO	òxid nítric		
NPY	neuropèptid Y		
PIF	factor inductor de la proteòlisi		
PKC	proteïna cinasa C		
RIP	<i>receptor interacting protein</i>		
ROS	espècies reactives de l'oxigen		

ÍNDEX

I. INTRODUCCIÓ.....	1
1. LA CAQUÈXIA CANCEROSA.....	1
1.1 Malnutrició.....	2
1.1.1 Alteracions de l'aparell digestiu i malabsorció.....	3
1.1.2 Anorèxia.....	4
1.1.2.1 Mecanismes d'inducció de l'anorèxia.....	4
1.1.2.2 Mediadors de l'anorèxia.....	5
1.1.2.2.1 Citocines.....	5
1.1.2.2.2 Hormones.....	6
1.1.2.2.3 Serotonina.....	7
1.1.2.2.4 Neuropèptids.....	8
1.1.2.2.5 Hormones peptídiques.....	9
1.2 Alteracions metabòliques.....	10
1.2.1 Metabolisme energètic.....	11
1.2.2 Metabolisme glucídic.....	12
1.2.3 Metabolisme lipídic.....	15
1.2.4 Metabolisme proteic.....	17
2. MEDIADORS DE LA CAQUÈXIA.....	19
2.1 Insulina.....	20
2.2 Hormones tiroïdals.....	20
2.3 Glucocorticoides.....	21
2.4 Catecolamines.....	21
2.5 Factors mobilitzadors de lípids (LMF).....	21
2.6 Factor inductor de proteolisi (PIF).....	22
2.7 Citocines.....	23
2.7.1 Principals tipus de citocines.....	25
3. FACTOR DE NECROSI TUMORAL α (TNF-α).....	27
3.1 Biosíntesi i estructura proteica.....	29
3.2 Estructura gènica i regulació.....	30
3.3 Receptors del TNF- α (TNFR1 i TNFR2).....	31
3.4 Transducció de senyal.....	33
3.4.1 Proteïnes G.....	34
3.4.2 Activació de les caspases.....	35
3.4.3 Activació de NF- κ B.....	36
3.4.4 MAPKS.....	37
3.4.5 Ceramides.....	39
3.4.6 Via JAKS/STATS.....	39
3.4.7 Radicals lliures (ROS).....	40

3.5 Efectes metabòlics i fisiològics del TNF- α	41
3.5.1 Efectes sobre la temperatura corporal.....	41
3.5.2 Efectes sobre la ingestió i el buidat gàstric.....	42
3.5.3 Efectes sobre el metabolisme glucídic.....	43
3.5.4 Efectes sobre el metabolisme lipídic.....	46
3.5.5 Efectes sobre el metabolisme proteic.....	47
3.5.6 Efectes sobre la miogènesi.....	50
3.6 TNF- α i situacions patològiques.....	51
3.6.1 Resistència a insulina.....	51
3.6.2 Sèpsia.....	52
3.6.3 Càncer.....	54
3.6.4 Malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC).....	57
4. EL MÚSCUL ESQUELÈTIC.....	64
4.1 Recanvi proteic muscular.....	65
4.1.1 Regulació del recanvi proteic.....	65
4.1.1.1 Insulina.....	65
4.1.1.2 IGF-I.....	66
4.1.1.3 Hormones tiroideas.....	67
4.1.1.4 Glucocorticoides.....	67
4.1.1.5 Glucagó.....	68
4.2 Sistemes proteolítics.....	68
4.2.1 Sistema lisosomal.....	69
4.2.1.1 Catepsines.....	70
4.2.2 Sistema dependent de calci.....	70
4.2.3 Sistema dependent d'ATP i ubiquitina.....	71
4.2.3.1 Ubiquitina.....	71
4.2.3.1.1 Estructura i propietats.....	72
4.2.3.2 Degradació proteica.....	72
4.2.3.3 Enzims del sistema.....	73
4.2.3.4 Reconeixement de substrats.....	76
4.2.3.5 Gens de la ubiquitina.....	77
4.2.3.5.1 Gens de poliubiquitina.....	78
4.2.3.5.2 Gens de les proteïnes de fusió ribosomals.....	78
4.2.3.6 Regulació de l'expressió dels gens de la ubiquitina.....	79
4.2.3.7 Funcions de la ubiquitina.....	79
4.2.3.7.1 Creixement tumoral.....	81
4.2.3.7.2 Proteòlisi muscular en estats catabòlics.....	82
4.2.3.7.2.1 Estratègies per impedir la proteòlisi dependent del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina.....	84

4.3 Apoptosi.....	85
4.3.1 Mort cel·lular.....	85
4.3.1.1 Necrosi.....	86
4.3.1.2 Apoptosi.....	86
4.3.2 Mètodes per a la detecció de l'apoptosi.....	88
4.3.2.1 Mètodes morfològics.....	88
4.3.2.2 Mètodes moleculars i bioquímics.....	89
4.3.3 Mecanismes moleculars per a la regulació de l'apoptosi.....	90
4.3.3.1 Caspases.....	90
4.3.3.2 Mitocondri i alliberament de metabòlits reguladors de l'apoptosi.....	92
4.3.3.3 APAF-1.....	92
4.3.3.4 Família Bcl-2.....	93
4.3.3.5 Òxid nítric.....	93
4.3.4 Apoptosi al múscul esquelètic.....	94
4.3.4.1 Situacions fisiològiques.....	94
4.3.4.1.1 Mioblasts en cultiu.....	94
4.3.4.1.2 Múscul esquelètic immadur: estudis <i>in vivo</i>	95
4.3.4.2 Situacions patològiques.....	96
4.3.4.2.1 Distrofia muscular.....	96
4.3.4.2.2 Atròfia.....	98
4.3.4.2.3 Isquèmia i reperfusió.....	99
4.3.4.2.4 Insuficiència cardíaca crònica.....	99
4.3.4.2.5 Miopaties inflamatòries.....	100
4.3.4.2.6 Miopaties degudes a defectes mitocondrials.....	101
4.3.4.2.7 Oftalmopatia associada a la tiroide.....	101
4.3.4.2.8 Exercici.....	101
4.3.4.2.9 Creixement tumoral.....	102
4.3.5 Incidència i significat de l'apoptosi a múscul esquelètic.....	103
4.3.6 Citocines.....	104
4.3.6.1 TNF α	104
4.3.6.2 Altres citocines.....	107
4.4 Implicació de la calcineurina en el creixement del múscul esquelètic.....	107
4.4.1 Transducció del senyal.....	107
4.4.2 Control de la diferenciació i la regeneració del múscul esquelètic.....	109
4.4.3 Control de la hipertròfia del múscul esquelètic.....	110
4.4.4 Paper de la calcineurina en l'atròfia muscular.....	111
5. ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES. LA INTERLEUCINA 15: UNA CITOCINA ANABÒLICA.....	112
5.1 Estratègies terapèutiques per combatre la caquèxia.....	112

5.1.1 Incrementar la ingesta.....	112
5.1.1.1 Aproximació farmacològica.....	112
5.1.1.2 Aproximació nutricional.....	115
5.1.2 Combatre les alteracions metabòliques.....	115
5.1.2.1 Mediada per citocines.....	115
5.1.2.1.1 Bloqueig de la síntesi.....	115
5.1.2.1.2 Bloqueig de l'acció.....	116
5.1.2.2 Mediada per hormones.....	117
5.1.2.3 Altres.....	119
5.2 IL-15: una citocina anabòlica.....	123
5.2.1 Estructura gènica i regulació.....	123
5.2.2 Estructura proteica i biosíntesi.....	126
5.2.3 Receptors.....	127
5.2.4 Transducció del senyal.....	132
5.2.5 Efectes fisiològics i metabòlics.....	133
5.2.5.1 Sistema immunitari.....	134
5.2.5.2 Tracte gastrointestinal.....	136
5.2.5.3 Apoptosi.....	138
5.2.5.4 Angiogènesi.....	139
5.2.5.5 Metabolisme proteic.....	140
5.2.6 Situacions patològiques.....	141
5.2.6.1 Malalties inflamatòries cròniques.....	141
5.2.6.1.1 Artritis reumatoide.....	141
5.2.6.1.2 Hepatitis C.....	142
5.2.6.1.3 Sarcoidosi.....	142
5.2.6.1.4 Malaltia inflamatòria de l'intestí.....	142
5.2.6.1.5 Arteriosclerosi.....	143
5.2.6.2 Càncer.....	143
5.2.6.3 Rebuig d'òrgans.....	145
5.2.6.4 Diabetis.....	146

II. OBJECTIUS.....147

III. MATERIALS I MÈTODES.....150

1. ESTUDIS <i>IN VIVO</i>.....	150
1.1. Animals i condicions experimentals.....	150
1.2. Tractaments i grups experimentals.....	150

1.3. Anestèsia i sacrifici.....	152
1.4. Extracció de teixits i sang.....	152
1.5. Estudis en pacients.....	153
1.5.1 Pacients MPOC.....	153
1.5.2 Pacients amb càncer de pàncrees.....	153
1.6 Disseny experimental dels estudis en pacients.....	154
1.6.1 Pacients MPOC.....	154
1.6.2 Pacients amb càncer de pàncrees.....	154
1.7 Biòpsies humanes.....	155
1.7.1 Pacients MPOC.....	155
1.7.2 Pacients amb càncer de pàncrees.....	155
1.8 Captació de α -amino[1- ¹⁴ C]isobutirat.....	155
1.8.1 Absorció intestinal.....	156
1.8.2 Incorporació a teixits.....	156
1.9 Destí metabòlic de la [¹⁴ C]-alanina.....	157
1.9.1 Oxidació.....	157
1.9.2 Absorció intestinal.....	157
1.9.3 Incorporació a teixits.....	158
1.10 Captació de 2-desoxiglucosa.....	159
1.11 Recanvi proteic.....	160
1.12 Determinació de la proteïna total.....	161
1.12.1 Mètode de Bradford.....	161
1.12.2 Mètode de BCA.....	161
1.13 Western blot.....	162
1.13.1 CNA-1.....	162
1.13.2 iNOS.....	163
1.13.3 TNFR1.....	164
1.13.4 PARP.....	165
1.13.5 Tubulina.....	167
1.14 ELISA.....	167
1.15 Valoració de l'estrés oxidatiu.....	167
1.15.1 Determinació dels nivells de glutatió.....	167
1.15.2 Carbonilació de proteïnes.....	168
1.15.3 Determinació dels enzims antioxidants i proteïnes carbonilades.....	168
2. ESTUDIS EX VIVO.....	169
2.1 Preparació de músculs aïllats.....	169
2.2 Taxa de degradació proteica.....	170
2.3 Taxa de síntesi proteica.....	171
2.4 Captació de α -metil[1- ¹⁴ C]aminoisobutirat.....	172

2.5 Destins metabòlics de [U- ¹⁴ C]alanina.....	173
2.5.1 Oxidació.....	173
2.5.2 Destins metabòlics.....	173
2.6 Captació de 2-desoxiglucosa.....	174
2.7 Destins metabòlics de la glucosa.....	175
2.7.1 Oxidació.....	175
2.7.2 Destins metabòlics.....	176
3. ESTUDIS <i>IN VITRO</i>.....	177
3.1 Cultius cel·lulars.....	177
3.1.1 Normes generals de manipulació.....	177
3.1.2 Línia cel·lular C2C12.....	178
3.1.3 Medis de cultiu, suplementes i antibiòtics.....	178
3.1.4 Tècniques generals en cultius cel·lulars.....	180
3.1.4.1 Manteniment de l'stock.....	180
3.1.4.2 Subdivisió (tripsinització).....	180
3.1.4.3 Comptatge.....	180
3.1.4.4 Sembra.....	181
3.1.4.5 Congelació.....	181
3.1.4.6 Descongelació.....	181
3.1.4.7 Tractaments.....	182
3.2 Condicions de cultiu i diferenciació de les cèl·lules.....	182
3.3 Captació de 2-desoxiglucosa.....	182
3.4 Destins metabòlics de la glucosa.....	182
4. MANIPULACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS.....	183
4.1 Extracció de DNA.....	183
4.1.1 Fragmentació del DNA.....	184
4.2 Extracció d'RNA.....	185
4.3 Quantificació d'àcids nucleics.....	185
4.4 Comprovació de l'estat de l'RNA.....	186
4.5 Northern blot.....	186
4.6 Marcatge de la sonda.....	187
4.7 Sondes de cDNA.....	188
4.8 Retrotranscriptase polimerase chain reaction (RT-PCR).....	188

IV. RESULTATS.....	191
1. MECANISMES ASSOCIATS A LA PÈRDUA DE MASSA MUSCULAR EN CONDICIONS PATOLÒGIQUES.....	191
1.1 Apoptosi.....	191
1.1.1 Fragmentació del DNA en múscul esquelètic en sèpsia.....	191
1.1.2 Fragmentació del DNA en caquèxia cancerosa en humans.....	193
1.2 Expressió muscular del TNF- α	195
1.2.1 Model animal: hepatoma Yoshida AH-130.....	195
1.2.2 Humans afectats de càncer de pàncrees.....	196
1.2.3 Humans afectats de MPOC.....	196
1.3 Expressió muscular dels TNFRs.....	199
1.3.1 Model animal: hepatoma Yoshida AH-130.....	199
1.3.2 Malalts afectats de càncer de pàncrees.....	201
1.4 L'estrès oxidatiu.....	202
1.5.1 Malalts MPOC.....	202
1.5.2 Model animal: hepatoma Yoshida AH-130.....	208
1.5 Implicació del sistema de la CNA-1 en la pèrdua de massa muscular.....	210
1.4.1 Model animal: Yoshida AH-130.....	210
2. IL-15, UNA CITOCINA ANABÒLICA AMB IMPLICACIONS TERAPÈUTIQUES.....	212
2.1 Efectes metabòlics.....	212
2.1.1 IL-15 i múscul esquelètic: estudis <i>in vitro</i> i <i>ex vivo</i>	212
2.1.1.1 Degradació proteica.....	212
2.1.1.2 Síntesi proteica.....	213
2.1.1.3 Captació d'aminoàcids.....	214
2.1.1.4 Destins metabòlics de l'alanina.....	214
2.1.1.5 Captació de 2 desoxiglucosa.....	215
2.1.1.6 Destins metabòlics de la glucosa.....	216
2.1.2 IL-15 i múscul esquelètic: estudis <i>in vivo</i>	217
2.1.2.1 Captació d'aminoàcids.....	217
2.1.2.2 Destins metabòlics de l'alanina.....	217
2.1.2.3 Captació de glucosa.....	218
2.2 Aplicacions terapèutiques.....	219
2.2.1 Efectes sobre la proteïna en caquèxia.....	219
2.2.1.1 Recanvi proteic.....	220
2.2.1.2 Sistemes proteolítics.....	222
2.2.2 Apoptosi i estrès oxidatiu.....	223
2.2.3 Mecanismes implicats.....	226
2.2.3.1 Interacció amb l'expressió dels receptors de TNF- α	226

2.2.3.2 iNOS.....	227
2.2.3.3 UCPs.....	229
V. DISCUSSIÓ.....	230
VI. CONCLUSIONS.....	253
VII. BIBLIOGRAFIA.....	255

I. INTRODUCCIÓ

1. LA CAQUÈXIA CANCEROSA

La caquèxia cancerosa és una síndrome complexa que apareix en dos terços dels pacients amb càncer avançat i, segons Warren (1932), és el responsable de més del 22% de les morts entre els pacients cancerosos. De fet, el grau de caquèxia està inversament correlacionat amb el temps de supervivència del pacient, i sempre implica un pronòstic desfavorable.

Aquesta síndrome es caracteritza per una important i progressiva pèrdua de pes corporal de l'hoste com a conseqüència de la desaparició dels dipòsits de greix i de la disminució de la massa muscular, i va acompanyat també d'anorèxia, nausees, anèmia, astenia, debilitat, alteracions de l'homeostasis hormonal i immunodepressió (Strain, 1979). Donat que una pèrdua de pes superior al 30% es considera irreversible (Studley, 1936), i que aquesta síndrome causa en els pacients que la presenten una pitjor resposta a la quimoteràpia (Van Eys, 1982) i a la cirurgia (De Wys et al. 1980), s'han dedicat molts esforços a l'estudi de l'etiopatogènesi de la caquèxia cancerosa (Brennan, 1981). La caquèxia és un dels principals motius causants de la mort dels pacients amb càncer: del 16 al 73% d'aquests manifesten els símptomes de la caquèxia (Warren, 1932; Nixon *et al.*, 1980).

La caquexia no només està associada a estats neoplàsics, sinó que és una resposta comuna de l'organisme davant d'estímuls exògens, com infecció, trauma i immunodeficiència (Pomposelli et al. 1988). En tots aquests casos l'eliminació de l'agent causant pot ser suficient per permetre la recuperació del pacient. Possiblement els mecanismes implicats en el desenvolupament de la caquexia siguin comuns, com a mínim en part, entre aquestes situacions patològiques.

Existeixen diferents explicacions per a la caquexia cancerosa. La presència i creixement del tumor estan associats invariablement a un estat de malnutrició com a conseqüència de la inducció de l'anorèxia o disminució de la ingesta. A més, la competència pels nutrients entre el tumor i l'hoste desencadena un estat d'inanició accelerat (Argilés et al. 1992) que causa grans perturbacions metabòliques en l'hoste. En tot cas, però, aquestes alteracions només expliquen una part de la síndrome de la caquèxia (Costelli *et al.*, 1991). De fet, les alteracions del metabolisme intermediari de l'hoste associades a la caquèxia s'assemblen més a la resposta que té lloc durant una

situació d'inflamació o de lesions traumàtiques (on es produeix una pèrdua important del nitrogen corporal) que a la fisiologia d'adaptació al dejuni.

La caquèxia es relaciona amb la presència de varis factors tumorals i humorals (principalment citocines), als que se'ls considera causants de la depleció tant de les reserves de greix com del teixit muscular.

Tot i la complexitat de la caquèxia, es poden diferenciar dos components bàsics entre les causes que porten a l'estat caquètic: la disminució de la ingesta que experimenta el pacient amb càncer i les alteracions bioquímiques i fisiològiques patides per aquest coma conseqüència de la presència del tumor.

1.1 MALNUTRICIÓ

La incidència de la malnutrició en els pacients neoplàstics varia en funció de l'estat de la malaltia, del tipus de tumor i de la localització d'aquest. La malnutrició és responsable, almenys en part, de la deterioració general de l'hoste. Tanmateix, no n'és el factor principal, ja que una correcta nutrició per via parenteral o enteral no aconsegueix revertir aquesta situació, sinó que només la millora parcialment (Bennegard *et al.*, 1984).

El procés de caquèxia es caracteritza principalment per la pèrdua de teixit adipós i de massa muscular, de manera que semblaria que la mort esdevé com a causa del dejuni. Tanmateix, nombrosos estudis sobre les anormalitats de l'hoste indiquen que la caquèxia no és un simple estat de malnutrició. Durant el dejuni es poden diferenciar clarament dues fases referents al metabolisme proteic: una fase inicial aguda, en la qual es consumeixen proteïnes musculars i hepàtiques, i una segona fase on hi ha restricció del consum proteic i s'incrementa la utilització de les reserves lipídiques. Aquest no és, però, el comportament de l'organisme en situació de caquèxia. A més, els individus sans s'adapten a una ingestió menor reduint el cost energètic per compensar el dèficit alimentari, mentre que els individus portadors de tumor són incapaços de desenvolupar unes adaptacions metabòliques comparables (Norton *et al.*, 1987). Els individus portadors de tumor presenten un cost energètic que tendeix a estar inalterat, o fins i tot elevat (Moldawer i Copeland, 1988), una mobilització de proteïnes constant, i la seva supervivència és, generalment, independent de les reserves lipídiques (Morrison, 1984). A més, en la caquèxia cancerosa el desgast que presenta el múscul esquelètic contrasta

amb la relativa preservació del fetge i altres òrgans, mentre que durant la malnutrició aquests també estan afectats (Fearon *et al.*, 1988). En general, en la caquèxia té lloc una disminució de la ingestió de nutrients, causada en part per la mateixa teràpia, els efectes locals del tumor, i la incapacitat d'una alimentació adequada (Norton *et al.*, 1987). Si la malnutrició fos la principal causa de la caquèxia cancerosa, l'aportació de nutrients exògens a través d'una alimentació forçada (enteral o parenteral) disminuiria els símptomes de la caquèxia, i milloraria la supervivència i la resposta a la teràpia. Malauradament, això no passa en la caquèxia cancerosa (Brennan *et al.*, 1981). De fet, el tumor, fins i tot, pot utilitzar la nutrició parenteral en benefici propi com una font suplementària de nutrients. Així, s'ha observat que les cèl·lules tumorals poden actuar com a trampes de nitrogen, i d'aquesta manera continuar creixent (Mider, 1951). De fet, un estudi dut a terme amb rates portadores de tumor, que han estat sotmeses a una dieta pobre en proteïnes, demostra que presenten una supervivència superior si es comparen amb les rates portadores de tumor alimentades amb una dieta equilibrada. S'ha comprovat que la substitució dels carbohidrats per lípids com a font energètica provoca menys estimulació del creixement tumoral i una recuperació adequada de l'hoste, gràcies a la baixa capacitat del tumor per utilitzar greixos (Kurzer i Meguid, 1986).

S'han descrit diversos mecanismes que poden estar implicats en la malnutrició, entre els quals destaquen les alteracions de l'aparell digestiu i malabsorció i l'anorèxia.

1.1.1 ALTERACIONS DE L'APARELL DIGESTIU I MALABSORCIÓ

Les alteracions de l'aparell digestiu es poden deure directament al tumor si aquest està localitzat en algun lloc del tracte gastrointestinal, i interfereix mecànicament en la digestió, o si és en òrgans importants per a la digestió com en el cas del tumor pancreàtic o quan es localitza en la via biliopancreàtica. La malabsorció que això suposa contribueix notablement a l'empitjorament de l'individu. L'alteració pot ser també d'origen iatrogènic després d'un tractament quirúrgic, per radiacions o amb fàrmacs antineoplàstics. A més, el tracte digestiu pot ser la diana de compostos alliberats pel tumor, com ara els esteroides, les prostaglandines i les citocines, les quals provoquen alteracions en l'absorció de nutrients. De fet, després de l'administració de citocines (el factor de necrosi tumoral α o la interleucina 1) s'observa una disminució de l'absorció de lípids i aminoàcids (Argilés *et al.*, 1989a i 1989b).

1.1.2 ANORÈXIA

L'anorèxia es defineix com la pèrdua de gana amb la sensació de sacietat precoç, la qual cosa fa que tingui lloc una hipofàgia a causa de la disminució del nombre d'àpats o de la quantitat de menjar ingerit (Morrison, 1984). A més, és un component quasi bé universal de la caquexia. Encara que és improbable que l'anorèxia sigui per sí mateixa responsable del desgast que s'observa en pacients cancerosos, pot ser un factor que hi contribueix; a més, la gana i la capacitat per menjar han estat descrits com els factors més importants tant en l'aspecte físic com en el psicològic de la qualitat de vida del pacient (Padilla, 1986). L'anorèxia sembla ser més una conseqüència que una causa de la caquexia, doncs es pot desenvolupar quan la pèrdua de pes ja ha aparegut, però el que sí sembla establir-se és un cicle de retroalimentació positiva entre el debilitament i la manca de gana, que s'agregen mutuament.

1.1.2.1 MECANISMES D'INDUCCIÓ DE L'ANORÈXIA

La gana i els patrons alimentaris estan regulats per una sèrie de factors psicològics, gastrointestinals, metabòlics i nutritius, com també per efectes neuronals i endocrins (Plata-Salamán, 1991a).

Les causes de l'anorèxia es poden deure, en alguns casos, al mateix tractament anticancerós (quimioteràpia, radioteràpia o immunoteràpia). Aquests tractaments produeixen nàusees i vòmits, o bé una reducció de la ingestió a causa d'alteracions en la percepció del gust i l'olor del menjar. Com a conseqüència, s'acaba induint l'anorèxia. També algunes causes psicològiques pel fet d'haver desenvolupat un tumor, com ara la depressió, influeixen a l'hora de manifestar l'anorèxia (Balducci i Hardy, 1985). L'anorèxia també es pot deure a un efecte directe del tumor, quan aquest està localitzat a l'hipotàlem o a l'aparell digestiu (Van Eys, 1985). S'ha suggerit que alguns tumors poden produir bombesina, la qual actuaria a l'hipotàlem i determinaria una sensació de sacietat precoç (Cuttitta *et al.*, 1985). De fet, s'han observat nivells plasmàtics elevats de bombesina en pacients amb càncer (Erisman *et al.*, 1982).

En la majoria dels casos, però, l'origen de l'anorèxia cancerosa sembla provenir de les alteracions metabòliques que pateix el pacient a causa de la presència del tumor.

1.1.2.2 MEDIADORS DE L'ANORÈXIA

La ingestió és una activitat complexa que resulta de la interrelació entre diferents sistemes: el sistema nerviós central, el fetge i el tracte gastrointestinal (Meguid *et al.*, 1996). Dins de cada sistema, diferents factors interaccionen per modular la ingestió segons les necessitats corporals. Així, la sacietat, de la mateixa manera que la gana, és més el resultat de la interacció recíproca de diferents estímuls químics (inhibidors o estimuladors) en diferents localitzacions anatòmiques, que no l'efecte d'un únic factor localitzat. Un dels principals punts implicats en la regulació de l'homeòstasi energètica és l'hipotàlem. De fet, la destrucció del nucli periventricular hipotalàmic provoca hiperfàgia i obesitat, mentre que la destrucció de l'àrea lateral provoca una afàgia total (Morrison, 1989).

S'han proposat diversos mediadors que regulen la ingestió a diferents nivells, la producció o actuació dels quals està alterada en la síndrome de la caquèxia. En veurem alguns en més detall com ara les citocines, la leptina, els neuropèptids (la serotonina, el neuropètid Y i el factor alliberador de corticotropina) i, les hormones peptídiques (la insulina i el glucagó)

Altres neuropèptids i hormones peptídiques que s'han implicat en l'aparició de processos anorèctics són l'hormona concentradora de la melatonina (MCH), l'orexina, la melanocortina, el pèptid *agouti-related* (AGRP), la galanina, i altres pèptids opioides. També hi ha altres factors que podrien tenir un paper en la resposta anorèctica en la caquèxia, com ara els nivells elevats de lactat, oligonucleòtids (Carmichael *et al.*, 1980) i àcids grassos circulants, i els canvis en els nivells d'aminoàcids circulants, tots característics en presència de tumor.

1.1.2.2.1 CITOCINES

Diferents processos, tant aguts (infecciosos o inflamatoris) com crònics (infecciosos o neoplàstics), estimulen la síntesi i l'alliberació de citocines inflamatòries, com són la interleucina 1 (IL-1), la IL-6, la IL-8, el factor de necrosi tumoral α (TNF- α) i l'interferó gamma (IFN- γ). Algunes d'aquestes molècules, principalment el TNF- α , la IL-1 β i el factor neurotròpic ciliar (CNTF) s'han descrit com a inductores de l'anorèxia. Diverses evidències suggereixen que l'anorèxia produïda per citocines està

mediada per mecanismes neuronals centrals, on la principal diana d'acció és a l'hipotàlem (Woods *et al.*, 1998).

El TNF- α , la IL-1 β i la IL-8 indueixen anorèxia en rates a dosis capaces de produir concentracions patofisiològiques en el fluid cerebrospinal en models animals o en pacients que manifesten desgast tissular (Moldawer *et al.*, 1987a). Aquestes citocines són alliberades a la circulació i transportades al sistema nerviós central a través de la barrera hematoencefàlica i els òrgans circumventriculars (Plata-Salamán, 1991b). Les citocines perifèriques poden exercir les seves funcions sobre el cervell mitjançant l'estimulació de segons missatgers, com ara l'òxid nítric i els prostanoides, en el sistema vascular cerebral o mitjançant el nervi vague. Les citocines també poden produir-se al cervell en resposta a citocines alliberades perifèricament.

1.1.2.2 HORMONES

LEPTINA

La clonació del gen de la leptina (*lep*), també conegut com el gen de l'obesitat, va demostrar clarament el concepte que els senyals circulants produïdes en proporció a les reserves de greix influenciaven la gana i la despesa energètica (Friedman, 1998). La leptina és una hormona produïda i secretada pels adipòcits. Els seus nivells són directament proporcionals a les reserves de greix de l'organisme, i la seva acció és la de reduir la gana i activar els sistemes aferents de regulació energètica (Inui, 1999). Tant la mutació del gen de la leptina que presenten els ratolins *ob/ob* com la resistència a la leptina que presenten els ratolins *db/db*, produeix obesitat severa. L'administració directa de leptina en el sistema nerviós central redueix fortament la ingestió. De fet, s'han trobat receptors per a la leptina a l'hipotàlem, i per això es creu que el cervell és una diana principal de l'efecte anorexigen de la leptina.

S'ha observat que el TNF- α , la IL-1 i el factor mobilitzador de lípids (LMF) incrementen l'expressió de l'mRNA de la leptina al teixit adipós i els nivells plasmàtics de la leptina (Grunfeld *et al.*, 1996). Alguns estudis recents fets en el nostre grup d'investigació indiquen que les rates portadores de tumor presenten menys expressió del gen de la leptina al teixit adipós blanc, i nivells circulants de leptina superiors als que presenten les rates controls (Lopez-Soriano *et al.*, 1999).

GRELINA

La grelina és un pèptid acetilat sintetitzat principalment per l'estòmac. Aquesta pèptid estimula l'alliberament de la hormona del creixement de la pituitària, independentment del factor alliberador de l'hormona del creixement (Kojima et al. 1999). A més, la grelina estimula la ingesta ja que estimula l'activitat de regions hipotalàmiques de vital importància per la regulació de la gana (Inui A., 2001). De tot això es pot suggerir que la grelina podria estar implicada en l'anorèxia associada al càncer. Hanada et al. (2003) van demostrar que tant el pèptid com el mRNA de la grelina es trobaven sobreexpressats a l'estòmac de ratolins portadors de tumor, encara que la ingesta es trobava disminuïda. En pacients amb càncer de pulmó, les concentracions plasmàtiques de la grelina no són significativament diferents a les de individus controls (Shimizu et al. 2003). Tanmateix, les concentracions plasmàtiques de grelina en pacients amb caquèxia són superiors als pacients sense caquèxia. Dades obtingudes tant amb animals com amb humans semblen suggerir que les elevades concentracions de grelina que s'observen en pacients amb càncer podrien ser un mecanisme compensatori pel balanç catabòlic-anabòlic, el qual no és capaç de revertir, malgrat tot, la supressió de la gana ni el desgast muscular.

1.1.2.2.3 SEROTONINA

El sistema serotoninèrgic central sembla tenir un paper important en la regulació de la ingestió durant el creixement tumoral. En condicions normals, aquest sistema controla la sensació de sacietat a través de les seves accions a l'hipotàlem (Leibowitz, 1990). A finals dels anys setanta, es va descriure per primera vegada la possible relació entre els nivells cerebrals de la serotonina i la caquèxia cancerosa (Krause *et al.*, 1979). Diversos experiments fets amb rates han mostrat que la presència de tumors experimentals està associada freqüentment a un increment dels nivells circulants de serotonina, tot i que l'eliminació de la serotonina no és capaç d'impedir el desenvolupament de l'anorèxia neoplàstica (Chance *et al.*, 1983).

La concentració de serotonina al cervell depèn de la disponibilitat de l'aminoàcid precursor: el triptòfan (Fernstrom i Wurtman, 1971). Així, en rates portadores de tumor es van trobar nivells elevats de triptòfan, abans fins i tot que el tumor es visualitzés. Els nivells de l'aminoàcid van incrementar fins que els nivells de

la serotonina al cervell van començar a augmentar, induint llavors l'anorèxia (Muscaritoli *et al.*, 1996). Liviano *et al.* (1996) suggereixen que l'anorèxia cancerosa està influenciada per l'acció de la IL-1, la qual actua centralment sobre l'hipotàlem incrementant l'alliberació de la serotonina i de manera perifèrica sobre els nivells del triptòfan.

1.1.2.2.4 NEUROPEPTIDS

NEUROPEPTID Y

L'NPY és una molècula clau en la resposta hipotalàmica a la inanició. És un pèptid de 36 aminoàcids que està distribuït àmpliament en el sistema nerviós central (Inui, 1999). Se sintetitza a les neurones del nucli arqueàtic de l'hipotàlem, i és projectat principalment al nucli periventricular de l'hipotàlem (Heinrichs *et al.*, 1998). L'NPY indueix la ingestió en diverses espècies de vertebrats. L'administració d'NPY en el sistema nerviós central incrementa la ingestió, disminueix la despesa energètica i incrementa la lipòlisi; d'aquesta manera crea un estat de balanç energètic positiu i estimula l'emmagatzematge de reserves. L'NPY és part d'una cascada de senyals estimulants de la ingestió que actuen a l'hipotàlem i que s'activen com a conseqüència de la caiguda dels nivells de la leptina (Fliers i Maratos-Flier, 1998).

En rates portadores de tumor, la injecció intrahipotalàmica d'NPY té menys capacitat estimuladora de la ingestió que en les rates controls (Chance, 1996). A més, els nivells d'alliberació de l'NPY a l'hipotàlem estan reduïts en les rates portadores de tumor, mentre que estan augmentats en rates dejunades o sotmeses a una ingestió restringida (*pair-fed*) (Chance, 1994). La implantació d'un tumor a rates sanes pot produir anorèxia, tot i l'existència de nivells elevats de l'mRNA de l'NPY al nucli arquejat de l'hipotàlem (Jensen *et al.*, 1998). A més, hi ha una disminució de l'afinitat del receptor de l'NPY a l'hipotàlem en rates portadores de tumor (Jensen *et al.*, 1998). S'ha proposat que les citocines proinflamàtores TNF- α , IL-1, LMF i CNTF en els casos d'anorèxia cancerosa, interfereixen en l'acció de l'NPY incrementant els nivells de l'expressió de la leptina, la qual interaccionaria amb l'NPY (Grunfeld *et al.*, 1996). La CNTF interfereix directament en l'expressió de l'NPY (Xu *et al.*, 1998a).

Aquests resultats ens indiquen que la disfunció del sistema d'NPY podria ser un factor important, en el sistema nerviós central, de l'etiologia de l'anorèxia cancerosa.

FACTOR ALLIBERADOR DE CORTICOTROPINA (CRF)

El CRF és un neuropèptid hipotalàmic catabòlic que contribueix a l'homeòstasi energètica i que està regulat, en part, per la leptina i la insulina (Inui, 1999). Contràriament l'NPY, el CRF produeix anorèxia continuada i incrementa l'activitat del sistema nerviós simpàtic, així incrementa la termogènesi, la despesa energètica i la lipòlisi.

L'anorèxia induïda per l'administració intracerebrovascular d'IL-1 pot ser revertida parcialment amb l'anticòs anti-CRF, fet que indica el paper del CRF intrahipotalàmic en aquesta resposta (Uehara, 1989). És possible que l'acció de les citocines proinflamàtores a l'hipotàlem estigui mediada per una estimulació persistent del CRF al nucli periventricular. De fet, s'han trobat nivells elevats de CRF en rates portadores de tumor amb anorèxia (McCarthy i Daun, 1993).

1.1.2.2.5 HORMONES PEPTÍDIQUES

INSULINA

La insulina, igual que la leptina, és secretada en proporció al nivell d'adipositat corporal, i té dianes al sistema nerviós central, on actua mitjançant l'activació de la sensació de sacietat i inhibint la ingestió. La insulina promou un estat de balanç energètic negatiu al cervell, i contraresta la seva potent acció anabòlica als teixits perifèrics (Plata-Salaman, 1996). La insulina actua estimulants l'expressió del gen de la leptina (Friedman, 1998). La seva producció, a més, està regulada per citocines procaquètiques com ara la IL-1 (Plata-Salaman, 1991b).

GLUCAGÓ

El glucagó, produït al pàncrees, i el pèptid *glucagon-like I* (GLP-I) de l'intestí i el cervell són pèptids anorexigens potents (Gibbs i Smith, 1992). En la rata, l'administració d'un anticòs altament específic pel glucagó augmenta la ingestió, fet que suggereix un paper fisiològic del glucagó en el control de la ingestió.

La presència d'un tumor està associada a la disminució de la relació insulina/glucagó, i aquest estat hiperglucagònic és el que podria ser l'alteració hormonal

més important a l'hora de provocar les anormalitats metabòliques de la caquèxia cancerosa (Noguchi *et al.*, 1989). La inhibició de la secreció de glucagó fa que el pes de la carcassa s'incrementi, preserva la proteïna muscular, i fins i tot inhibeix el creixement tumoral (Bartlett *et al.*, 1995). Un altre indicatiu de la implicació del glucagó en els estats anorèctics-caquèctics és que algunes citocines com ara la IL-6 estimulen la secreció de glucagó en humans (Tsigos *et al.*, 1997).

Altres neuropèptids i hormones peptídiques que han estat implicats en l'aparició de processos anorèctics són la hormona concentradora de la melatonina (MHC), orexina, melanocortina, el pèptid *agouti-related* (AGRP), galanina, i altres pèptids opioides.

Per últim, altres factors que podrien prendre part en la resposta anorèctica en la caquèxia són els elevats nivells de lactat i àcids grassos circulants, i dels canvis en els nivells d'aminoàcids circulants que acompanyen a la presència del tumor.

1.2 ALTERACIONS METABÒLIQUES

A més de la presència de l'anorèxia, una de les principals característiques de la caquèxia cancerosa és el desgast tissular que pateix l'hoste, particularment al múscul esquelètic i al teixit adipós. Altres òrgans, com ara el fetge, la melsa, els ronyons i les càpsules adrenals sofreixen, a vegades, un increment de pes transitori. Les alteracions metabòliques representen l'aspecte més important de la caquèxia cancerosa, ja que fins i tot en absència de malnutrició poden, *per se*, determinar un balanç energètic i nitrogenat negatiu, juntament amb un greu deteriorament de l'organisme. A més, tot i que l'anorèxia és un component gairebé universal de la caquèxia, no explica totalment el desgast que presenten els pacients, ja que els patrons de pèrdua de pes i canvi de composició corporal difereixen dels de la inanició, i els seus efectes catabòlics no es poden contrarestar mitjançant l'administració extra de calories.

La hipòtesi actual per explicar la caquèxia és que aquesta es deu principalment a les alteracions metabòliques produïdes per la presència del tumor. Així, en el pacient afectat per la caquèxia s'observen alteracions del metabolisme energètic, glucídic, lipídic i proteic, que condueixen a la simptomatologia d'aquesta síndrome.

Durant molt temps es va pensar que aquestes alteracions estaven produïdes per algun factor secretat pel tumor, o per la competència del tumor amb l'hoste pels nutrients. Actualment se sap que aquests factors procedeixen de l'hoste en resposta al creixement tumoral (Argilés *et al.*, 1992).

1.2.1 METABOLISME ENERGÈTIC

Molts autors han descrit una despesa energètica incrementada, tant en repòs com en activitat, en els pacients de càncer que presentaven pèrdua de pes (Hylander *et al.*, 1993). En un estudi en pacients amb tumors sòlids, es va constatar que un increment de la despesa energètica precedeix la pèrdua de pes, fet que suggereix que aquest increment pot ser més una causa de la caquèxia que no una conseqüència (Hylander *et al.*, 1993). A diferència de les persones sanes, on la pèrdua de pes condueix a una adaptació metabòlica que comporta una disminució de la despesa energètica, els pacients amb càncer presenten una despesa energètica molt elevada. Els organismes portadors de tumor mantenen crònicament un balanç energètic negatiu, ja que l'energia produïda excedeix l'energia ingerida. Per compensar aquest desequilibri energètic, l'organisme està obligat a mobilitzar les reserves energètiques. D'aquesta manera, inicialment mobilitza el glucogen hepàtic i muscular; seguidament incrementa la lipòlisi al teixit adipós blanc (amb la consegüent alliberació d'àcids grassos que s'oxiden per proporcionar energia i glicerol, el qual es transforma en glucosa mitjançant gluconeogènesi), i finalment comença la proteòlisi muscular, la qual proporciona aminoàcids que entren en la via gluconeògena o bé són oxidats directament per produir energia.

S'ha suggerit que l'augment de l'activitat d'un cicle anàleg al de Cori que s'estableix entre el múscul i el fetge, implica una despesa energètica molt alta en els pacients amb càncer. El tumor, a través de la glucòlisi anaeròbia, produeix grans quantitats d'àcid làctic, que es converteixen en glucosa al fetge i als ronyons de l'hoste, amb el consegüent consum d'ATP (Lawson *et al.*, 1982; Argilés i López-Soriano, 1991). El resultat és el reciclatge de la glucosa gastada pel tumor, associat a una despesa d'energia important per part de l'hoste, que n'incrementa així la taxa metabòlica basal. Un altre cicle fútil activat durant la caquèxia, el qual pot contribuir a l'increment de la despesa energètica, és el que resulta del mal funcionament de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$. S'han observat alteracions en l'estequiometria d'aquesta bomba a les cèl·lules del tumor ascític d'Ehrlich (Racker, 1976). D'altra banda, hi ha una sèrie de compostos secretats pel tumor que provoquen el desacoblament de la fosforilació oxidativa mitocondrial als teixits de l'hoste, que afavoreix en la dissipació d'una quantitat d'energia important en forma de calor, ja que no es pot aprofitar per a la síntesi d'ATP (Tisdale, 1993).

Un altre factor que pot contribuir a la despesa energètica és la febre, que es presenta freqüentment durant la malaltia neoplàstica o com a conseqüència de les complicacions infeccioses. L'increment d'un grau de temperatura determina un augment del 13% del consum basal d'energia.

D'altra banda, s'ha suggerit que una hiperestimulació adrenèrgica pot ser important a l'hora de determinar la situació hipermetabòlica que s'observa en els pacients neoplàstics (Lowry, 1991). De fet, s'observa una elevada concentració plasmàtica de catecolamines i un augment de l'excreció urinària de substàncies adrenèrgiques en pacients amb càncer (Tisdale, 1993), mentre que els pacients amb malnutrició (però sense tumor) mostren una disminució del recanvi de les catecolamines.

Recentment s'han descobert diversos membres de la família de les proteïnes desacobladores de la cadena respiratòria mitocondrial, i és interessant considerar-ne la possible contribució a la despesa energètica incrementada que presenten els pacients amb càncer. Concretament, la UCP2 i la UCP3, les quals s'han suggerit que podrien ser determinants en la despesa energètica basal en humans (Schrawen *et al.*, 1999b; Barbe *et al.*, 1998). De fet, l'activitat termogènica del teixit adipós marró (TAM) està incrementada en diferents situacions de creixement tumoral (Brooks *et al.*, 1981; Rothwell, 1990). A més, s'ha observat que diferents citocines (especialment la IL-1, la IL-6 i el TNF- α) poden tenir un paper important en la reposta termogènica en diferents patologies (Faggioni *et al.*, 1998).

1.2.2 METABOLISME GLUCÍDIC

Els nivells plasmàtics de la glucosa, tant en pacients neoplàstics com en animals experimentals portadors de tumor, poden presentar una àmplia variabilitat en relació amb el tipus de tumor i el grau de desenvolupament. Els tumors de creixement ràpid es caracteritzen per l'alta capacitat glucolítica, que porta a un augment de la gluconeogènesi hepàtica de l'hoste i de l'activitat dels enzims gluconeogènics (Shaw i Wolfe, 1986). Hi ha una correlació positiva entre la producció endògena de glucosa i l'estat tumoral, de manera que la velocitat de la gluconeogènesi augmenta a mida que el tumor avança. Atès que la gluconeogènesi és inhibida per la insulina i activada pel glucagó, les catecolamines i els glucocorticoides, alguns canvis en la concentració d'aquestes hormones poden regular-ne l'activitat. De fet, s'ha vist que en situacions de

creixement tumoral, els nivells d'insulina poden ser baixos (Jasani *et al.*, 1978); mentre que els de glucocorticoides estan augmentats. L'alliberació perifèrica de lactat (glucòlisi del tumor), aminoàcids (proteòlisi muscular) i glicerol (lipòlisi) augmenta la disponibilitat dels precursors gluconeogènics, els quals poden tenir també un paper en la regulació d'aquesta via.

El consum de les reserves energètiques de l'hoste es deu a un recanvi alterat de glucosa, que desemboca en cicles metabòlics fútils. Freqüentment el pacient neoplàstic presenta una intolerància a la glucosa (Norton *et al.*, 1985), que s'observa prèviament a l'aparició de la caquèxia, i la magnitud d'aquesta intolerància es correlaciona amb el desenvolupament tumoral. Aquesta incapacitat de digerir la glucosa exògena pot relacionar-se amb la disminuïda sensibilitat a la insulina dels teixits (Jasani *et al.*, 1978). Els pacients amb càncer presenten una resistència a la insulina que afecta teixits com ara el múscul esquelètic, fetge i teixit adipós. Al múscul esquelètic, la utilització de la glucosa està disminuïda, tant en animals experimentals com en pacients amb càncer, fet que revela una resistència clara a la insulina. El pacient amb tumor presenta un comportament similar al d'un diabètic de tipus II, ja que no és capaç de maximitzar la captació de la glucosa en presència de concentracions elevades d'insulina (Tayek, 1992). Aquesta estimulació minvada de la captació de la glucosa no sembla un defecte de la unió de la insulina al seu receptor, sinó més aviat un defecte intracel·lular. D'altra banda, Lundholm *et al.* (1978) suggeriren que la sensibilitat dels receptors de les cèl·lules beta pancreàtiques dels pacients neoplàstics està disminuïda, fet que produeix menys alliberació d'insulina en resposta a una càrrega de glucosa. La producció hepàtica incrementada de glucosa és, en part, el resultat de cert grau de resistència a la insulina per part del fetge. La resistència a la insulina de l'individu portador del tumor es pot solucionar administrant insulina exògena, fet que millora el grau de caquèxia en animals portadors de tumor (Tessitore *et al.*, 1993), com també la resposta a la teràpia anticancerosa, inclosa la cirurgia i la quimioteràpia.

L'alteració del metabolisme de la glucosa es pot deure també a la producció de TNF- α i IL-1 per part de l'hoste o del propi tumor. L'administració de dosis elevades de TNF- α a rates sanes determina l'aparició d'hiperglucèmia i acidosi làctica (Tracey *et al.*, 1986a); en canvi, la IL-1 produeix un efecte hipoglucèmiat que sembla que és independent de la insulina (Del Rey i Besedowsky, 1987), ja que la concentració de l'hormona no varia. Aquesta hipoglucèmia es pot deure a un augment de la utilització de glucosa de manera perifèrica o a una menor alliberació hepàtica.

Les cèl·lules tumorals són consumidors potents de glucosa, la qual, juntament amb la glutamina i l'alanina, constitueixen les seves principals fonts d'energia. Les baixes concentracions intracel·lulars de glucosa a les cèl·lules tumorals generen un important gradient de concentració entre la sang i la massa tumoral, que afavoreix el tumor en la competència que s'estableix entre aquest i els teixits de l'hoste. Sembla que aquest alt transport de glucosa no és dependent d'insulina, ja que sovint s'observen estats d'hipoglucèmia en aquests pacients, paral·lelament a nivells d'insulina normals o fins i tot baixos (Jasani *et al.*, 1978).

Des del punt de vista metabòlic, la característica més representativa de les cèl·lules tumorals, en especial les de més alt grau de malignitat, és l'elevada capacitat d'oxidar la glucosa en condicions aeròbiques (Pedersen, 1978). Un altre factor important que pot explicar l'alta capacitat glucolítica de les cèl·lules tumorals és l'elevada activitat de l'ATPasa dependent de Na^+/K^+ de la membrana plasmàtica (Argilés i López-Soriano, 1990b). Aquesta activitat és conseqüència d'un funcionament defectuós d'aquest tipus de bomba, que opera amb gran ineficiència en la utilització d'ATP. Una altra característica és la seva baixa activitat respiratòria i, en conseqüència, un efecte Pasteur (inhibició de la glucòlisi en condicions aeròbiques per excés d'ATP, amb producció de grans quantitats de lactat) poc marcat (Warburg, 1930). De fet, el grau de malignitat del tumor es correlaciona amb la producció aeròbica de lactat (Pedersen, 1978). L'alta concentració circulat de lactat augmenta la disponibilitat hepàtica d'aquest compost per la gluconeogènesi, de manera que s'estableix un cicle anàleg al de Cori entre el fetge i el tumor. El fet que la glucosa sigui metabolitzada només fins a lactat genera una energia molt petita en comparació de la que s'allibera quan l'oxidació és total. La principal conseqüència d'aquesta utilització tant ineficient és que el fetge de l'hoste es veu obligat a sintetitzar activament glucosa, amb la corresponent despesa energètica que dona lloc a una clara ineficiència metabòlica.

Així, el pacient amb tumor presenta un metabolisme molt diferent del d'un individu sa, bàsicament perquè els tumors tendeixen a utilitzar grans quantitats de glucosa, i generen d'aquesta manera l'activació d'un mecanisme compensatori per part del fetge (tant per la hipoglucèmia com per l'acidosi) que dona com a resultat una producció elevada de glucosa. Aquesta elevació de les concentracions de glucosa en plasma es deu principalment al desenvolupament de la resistència a la insulina i a l'increment de les hormones contrareguladores com ara els glucocorticoides (Werk *et al.*, 1964) o el glucagó (Inculet *et al.*, 1987).

1.2.3 METABOLISME LIPÍDIC

El metabolisme lipídic també està alterat: s'observa una clara hiperlipidèmia i una reducció de les reserves del teixit adipós (taula 1) (Kralovic *et al.*, 1977). L'atròfia del teixit adipós, juntament amb la mobilització de lípids que té lloc a l'hoste durant el procés invasiu, contribueix notablement a la pèrdua de pes corporal dels individus caquètics. Tanmateix, i a diferència del que passa en el dejuni, la supervivència dels individus portadors de tumor està generalment poc correlacionada amb les reserves lipídiques (Morrison, 1979). La mobilització de les reserves lipídiques sembla que està relacionada amb la massa tumoral, i té lloc en les primeres etapes de la malaltia, quan la mida del tumor encara és petita. La dissolució progressiva de les reserves lipídiques contribueix tant al manteniment de l'hoste com al desenvolupament tumoral. En un principi es pensava que aquest procés estava activat per algun factor lipolític alliberat pel mateix tumor i de natura desconeguda. Posteriorment, l'estudi s'ha centrat en un mediador del sistema immune, el TNF- α . En aquest sentit, s'ha descrit que el TNF- α és capaç d'inhibir l'activitat de la lipoproteïna-lipasa (LPL) (Kern, 1988a), i possiblement està implicat en la hiperlipidèmia observada en els animals portadors de tumors. Recentment, però, Todorov *et al.* (1996) han aïllat un factor amb efectes lipolítics en el model tumoral MAC16, anomenat PIF (*proteolysis-inducing factor*) (vegeu apartat 2.6) (Lorite *et al.*, 1998).

En situacions com ara el dejuni o la diabetis, els nivells elevats d'àcids grassos circulants i la seva utilització al fetge donen lloc a una producció augmentada de cossos cetònics (acetoacetat i β -hidroxibutirat), i també n'augmenten els nivells circulants (Miles *et al.*, 1980). Els cossos cetònics proporcionen un combustible alternatiu a la glucosa i, a la vegada, n'inhibeixen l'oxidació i la utilització de reserves lipídiques i proteiques (Robinson i Williamson, 1980). Els hepatomes de creixement ràpid utilitzen activament l'acetoacetat, i s'ha trobat activitat de β -hidroxibutirat deshidrogenasa en hepatomes de Morris (Fenselau *et al.*, 1975); contràriament, també s'ha observat una baixa capacitat del metabolisme dels cossos cetònics en un carcinoma mamari de rata (Mueller i Watkin, 1961). Possiblement la hipercetonèmia sigui un avantatge per a l'hoste, ja que evita la proteòlisi muscular i una excessiva utilització d'aminoàcids de cadena ramificada (Thompson i Wu, 1991).

Com ja s'ha dit anteriorment, la mobilització lipídica massiva dóna lloc a una hiperlipidèmia profunda (Kralovic *et al.*, 1977), amb elevats nivells de VLDL i d'àcids grassos circulants (Mueller i Watkin, 1961). L'ambient hipoglucèmic de l'hoste és el responsable de l'activació de la mobilització lipídica, i també l'ambient hormonal afavoreix aquest procés. Així, la producció disminuïda d'insulina i la resistència a aquesta, activen encara més el procés lipolític i redueixen l'activitat de l'LPL del teixit adipós (Evans i Williamson, 1988). A més, la sobreproducció de glucocorticoides també afavoreix aquesta situació, a causa del marcat caràcter antiinsulínic que tenen. L'LPL és l'enzim responsable de la captació dels triacilglicerols de la sang pels adipòcits. La seva activitat està disminuïda al múscul i al teixit adipós, tant en animals portadors de tumor com en pacients humans (Vlassara *et al.*, 1986), cosa que concorda amb l'alta concentració plasmàtica de triacilglicerols que es detecta en aquesta situació. El grau d'inhibició de l'LPL depèn del tipus de tumor, de manera que els que provoquen més pèrdua de pes es correlacionen amb una inhibició més forta de l'LPL.

A més de l'augment de la lipòlisi, en diferents models de tumors experimentals i en neoplàsies humanes s'observa una disminució de la lipogènesi i alteracions del metabolisme del colesterol, amb un augment de la colesterolèmia total de l'hoste. La colesterolèmia es deu principalment a una disminució de l'activitat de la lecitíncolesterol aciltransferasa (LCAT), i la consegüent reducció del colesterol lligat a la fracció lipoproteica HDL₂ (Dessi *et al.*, 1992a i 1992b). Aquestes alteracions porten a un augment del contingut de colesterol del tumor, associat a una taxa augmentada de síntesi *de novo* de colesterol. La capacitat de sintetitzar lípids (components importants de la membrana cel·lular i mediadors intracel·lulars) per part de les cèl·lules tumorals és quasi sempre insuficient per satisfer les necessitats de la cèl·lula, la qual cosa fa que els hagi d'obtenir a partir dels sintetitzats al fetge de l'hoste, on la seva síntesi està augmentada generalment. En canvi, el colesterol, un altre dels components de les membranes cel·lulars, és sintetitzat activament a les cèl·lules tumorals (Pedersen, 1978).

Les cèl·lules tumorals presenten una baixa capacitat de sintetitzar lípids, els quals són essencials per a la producció d'energia i per a la proliferació cel·lular. Gairebé sempre la capacitat biosintètica és insuficient per satisfer les necessitats de la cèl·lula tumoral i, per tant, ha d'obtenir els lípids a partir del fetge de l'hoste, on generalment la síntesi d'aquests és elevada. Per tant, l'increment de la concentració de lípids circulants sembla que és una característica dels estats tumorals, fins al punt que alguns autors han

suggerit que els nivells al plasma podrien utilitzar-se per detectar la presència de tumors en els pacients (Eisenberg, 1984).

La presència de la hiperlipidèmia provoca un efecte immunodepressiu (Spiegel *et al.*, 1982), com també un efecte específic immunoregulador sobre monòcits i macròfags (Chapman i Hibbs, 1977), que pot conduir finalment a la hipofuncionalitat del sistema immunitari i a una disminució de la supervivència.

1.2.4 METABOLISME PROTÈIC

En individus sans i adults el recanvi proteic és continu i necessari per al manteniment de la proteïna corporal. Aquests individus tenen un balanç nitrogenat en equilibri, on la síntesi proteica és igual a la degradació. Tanmateix, en els individus portadors de tumor aquest equilibri està alterat i hi ha un flux de nitrogen des dels teixits normals als neoplàstics, que dona lloc a un clar balanç nitrogenat negatiu (Kurzer i Meguid, 1986; Kern i Norton, 1988b), a causa d'una activació de la degradació enfront d'una síntesi inalterada o reduïda (recanvi proteic incrementat) (Lundholm *et al.*, 1980; Smith i Tisdale, 1993; Buzby *et al.*, 1980). Una de les característiques de la caquèxia, l'astènia (fatiga mental i física), està directament relacionada amb el desgast muscular. La disminució del pes corporal de l'hoste reflecteix, en gran manera, la pèrdua real de proteïna tissular, que porta a l'hoste a una situació de malnutrició proteica que, sens dubte, contribueix al procés caquètic. La disminució de la proteïna muscular comença en estadis primerencs de la malaltia neoplàstica, i ja es manifesta en el moment de la diagnosi en la majoria de pacients (Kern i Norton, 1988b). El múscul esquelètic conté el 50% de la massa proteica corporal total i, un cop s'ha reduït per sota de la massa considerada crítica, pot produir-se la mort (Norton *et al.*, 1987). Per això, la preservació de la proteïna de l'hoste és una fita important en les teràpies dirigides contra la caquèxia cancerosa.

En el nostre grup d'investigació es va demostrar, mitjançant diversos models experimentals, que la síntesi proteica pràcticament no està alterada al múscul esquelètic durant el creixement tumoral, mentre que hi ha un gran increment de la degradació proteica tant en models tumorals *in vivo* (Costelli *et al.*, 1993; Carbó *et al.*, 1994) com *in vitro* (Llovera *et al.*, 1995). A més, el nostre grup ha identificat també el mecanisme proteolític implicat en la degradació del múscul esquelètic durant la caquèxia: el sistema proteolític no lisosomal dependent d'ATP i ubiquitina (Llovera *et al.*, 1995).

A diferència del que passa al múscul esquelètic, molts autors descriuen una síntesi proteica hepàtica augmentada en els animals portadors de tumor (Tessitore *et al.*, 1987), de manera similar al que passa en situacions de sèpsia o trauma (Fischer i Hasselgren, 1991). A més, en pacients amb càncer s'ha observat un augment de la producció de proteïnes de la fase aguda, com la α -glucoproteïna àcida, la α -antitripsina, les proteïnes C-reactives i les haptoglobulines (Levin i Gevers, 1981), que s'han utilitzat com a marcadors de la progressió tumoral en una gran varietat de tumors humans. Tanmateix, però, la síntesi d'albumina disminueix, i dona lloc a una hipoalbuminèmia. De fet, en ratolins portadors d'un tumor que produeix grans quantitats de TNF- α , s'ha observat la inhibició de l'expressió del gen que té codificada la informació de l'albumina (Brenner *et al.*, 1990), cosa que suggereix que aquesta citocina pot tenir un paper important en la determinació de la hipoalbuminèmia. També s'ha observat que les alteracions de la síntesi proteica hepàtica poden ser mimetitzades per citocines com ara el TNF- α i la IL-1. De tota manera, la IL-6 sembla que és el principal regulador de la síntesi de les proteïnes de la fase aguda en hepatòcits humans. Aquest fet és especialment interessant, ja que Jablons *et al.* (1989) demostraren que l'administració de TNF- α a pacients amb càncer produïa l'aparició immediata d'IL-6 al sèrum. L'augment de la síntesi proteica al fetge està lligat a un increment de la captació d'aminoàcids, en particular dels gluconeogènics com ara l'alanina i altres transportats pel sistema A (Argilés *et al.*, 1989b).

La principal font de nitrogen del tumor són els aminoàcids procedents de la massa muscular. Mider va introduir el terme *trampa de nitrogen* per explicar la facilitat d'alguns tumors per captar aminoàcids, tant per la seva oxidació com per la síntesi de proteïnes i àcids nucleics (Mider, 1951). La captació excessiva de certs aminoàcids per les cèl·lules tumorals pot causar una disminució de la disponibilitat d'aquests compostos per part dels teixits de l'hoste, en particular del múscul esquelètic, cosa que contribuiria al balanç nitrogenat negatiu observat en pacients neoplàstics (Argilés *et al.*, 1992). Aquest balanç nitrogenat negatiu comporta una alliberació massiva d'aminoàcids, especialment en forma d'alanina i glutamina (Argilés i Azcón-Bieto, 1988), que en part seran captats pel fetge per ser utilitzats per la via gluconeògena (Waterhouse *et al.*, 1979) i la síntesi de proteïnes (Pain *et al.*, 1984), de manera que s'estableix un flux important d'aminoàcids del múscul al fetge (Fischer i Hasselgren, 1991). En aquest sentit, s'ha demostrat que la velocitat de conversió d'alanina a glucosa és molt més alta

en els individus portadors de tumor que en els controls, probablement en relació amb el fort requeriment de glucosa per part del tumor (Burt *et al.*, 1981).

La concentració dels aminoàcids plasmàtics en condicions de neoplàsia no segueix un patró definit, i depèn de diversos factors: variacions en la ingesta de proteïnes, canvis en l'absorció intestinal, alteracions en la biosíntesi hepàtica d'aminoàcids, canvis en l'oxidació d'aquests, diferències entre la síntesi proteica i l'activitat proteolítica dels teixits, entre altres factors (Medina *et al.*, 1992). La glutamina, a més de ser el principal vehicle transportador de nitrogen entre l'hoste i el tumor (Medina *et al.*, 1992), i un dels aminoàcids circulants més abundants a la sang d'animals portadors de tumor, és un dels principals aminoàcids utilitzat pel tumor per a la síntesi de proteïnes i bases nitrogenades. La concentració intracel·lular al tumor és, tanmateix, molt baixa a causa de la seva transformació ràpida i de la baixa activitat de la glutamina-sintetasa (Rivera, 1985). Els hepatomes de creixement ràpid, com ara els tumors ascítics d'Erhlich, són capaços d'oxidar glutamina a través de la glutaminasa dependent de fosfat present a les mitocondries (Sauer *et al.*, 1982). Per tant, el tumor indueix una resposta específica en el metabolisme de l'hoste que porta a un augment dels nivells circulants de glutamina.

El metabolisme dels aminoàcids de cadena ramificada (AACR), en particular el de la leucina, també experimenta canvis importants durant el creixement tumoral. La presència del tumor pot augmentar considerablement les necessitats diàries de leucina en humans (Lazo, 1981), a causa d'un increment en l'oxidació muscular de leucina (Paxton *et al.*, 1988; Goodlad *et al.*, 1981) i a la demanda per part del tumor (Argilés i López-Soriano, 1990a).

El metabolisme de la serina també està alterat als teixits neoplàstics. Atés el seu paper en la síntesi de fosfolípids, proteïnes, pirimidines i en la gluconeogènesi, aquest aminoàcid també és captat en grans quantitats pel tumor (Sauer *et al.*, 1982).

2. MEDIADORS DE LA CAQUÈXIA

Malgrat que la malnutrició i la competència metabòlica que s'estableix entre el tumor i l'hoste estan implicats en el desenvolupament de la caquèxia, s'ha de tenir en compte la participació de determinats factors circulants alliberats pel tumor o generats per la reacció de l'hoste. Alguns dels efectes sistèmics que tenen lloc en els individus

amb càncer s'han atribuït a factors lipolítics i proteolítics produïts pel tumor (Beck i Tisdale, 1987). A més, l'estat hormonal de l'hoste pot tenir un paper important, ja que s'han descrit nivells elevats d'hormones catabòliques, nivells baixos d'insulina i resistència a la insulina en teixits perifèrics.

2.1 INSULINA

La insulina actua sobre la proteïna muscular per mitjà de la disminució de la proteòlisi i l'augment de la síntesi proteica (Fulks *et al.*, 1975). El paper important de la insulina es va observar en estudis fets amb animals dejunats i diabètics, en els quals els nivells baixos d'insulina contribuïen a la proteòlisi muscular (Li i Goldberg, 1976). També s'ha descrit que en alguns tipus de tumor, malgrat haver-hi hiperinsulinèmia, l'hoste perd massa muscular, a causa segurament del desenvolupament de la resistència a la insulina (Lawson *et al.*, 1982); encara que no es coneix el mecanisme involucrat (alteració en la conversió de la proinsulina a insulina, nivells elevats d'hormones antagonistes, presència d'anticossos contra l'hormona o contra el receptor, anomalies al receptor, etc.). D'altra banda, s'ha observat més aclariment en pacients neoplàstics i anorèctics (Byerley *et al.*, 1991), que pot inhibir la supressió de la producció hepàtica de glucosa, i evitar així l'aparició de la hipoglucèmia. Aquestes alteracions del metabolisme poden reflectir una capacitat adaptativa de l'individu per evitar la hipoglucèmia per restricció calòrica, i és reversible amb l'administració d'aliment (Zúñiga-Guijardo *et al.*, 1986).

2.2 HORMONES TIROÏDALS

Des de fa molt temps, hi ha descrites alteracions dels nivells d'hormones tiroïdals associades a malalties neoplàstiques. Així, s'han detectat nivells baixos de T_3 associats a nivells normals, elevats o reduïts de T_4 . Els nivells baixos de T_3 es poden deure a la inhibició de l'enzim responsable de la conversió perifèrica de T_4 (Chopra *et al.*, 1978). Els nivells baixos de T_4 s'associen a malalties greus i es correlacionen positivament amb la taxa de mortalitat. En animals portadors del carcinoma de Walker 256, s'han observat nivells baixos d'ambdues hormones. Tant en aquest cas com en la

patologia humana, els nivells de TSH són normals, cosa que suggereix que la glàndula tiroide no està en situació d'hipofuncionalitat (Kumara-Siri *et al.*, 1981).

2.3 GLUCOCORTICOIDES

En diferents malalties, com ara infecció, anorèxia i càncer, s'han descrit nivells elevats de cortisol. Aquest augment de la síntesi de glucocorticoides per la glàndula adrenal facilitaria la mobilització de les proteïnes musculars i la captació hepàtica d'aminoàcids. En casos de càncer de mama, s'ha observat una correlació directa entre l'estadi clínic de la malaltia i la producció de cortisol (Sáez, 1971). D'altra banda, en animals portadors de tumor s'ha descrit una marcada hipertròfia de la glàndula suprarenal, que no s'evita amb una nutrició forçada (Begg, 1958). En les fases inicial i terminal del desenvolupament del tumor, la glàndula suprarenal és poc sensible a l'hormona adrenocorticotropa (ACTH) (Kavetsky *et al.*, 1962), amb un període intermedi de sensibilitat elevada, però no es coneix en profunditat el paper dels glucocorticoides en el creixement tumoral.

2.4 CATECOLAMINES

L'adrenalina i la noradrenalina són mediadors que actuen sobre el sistema simpàtic i són sintetitzats en la porció medul·lar de la glàndula suprarenal. Normalment, en els animals portadors de tumor, els nivells de catecolamines estan augmentats i, per tant, proporcionen a l'organisme gran quantitat de substrats susceptibles de ser oxidats, com ara glicerol, àcids grassos i cossos cetònics, i alhora deprimeixen l'oxidació de la glucosa. Aquesta disponibilitat de substrats transformables en energia permet a l'organisme superar situacions d'estrès de diversos orígens.

2.5 FACTORS MOBILITZADORS DE LÍPIDS (LMF)

S'ha suggerit que part dels efectes observats en animals experimentals portadors de tumors podrien ser el resultat de l'acció directa dels compostos secretats pel mateix tumor o per l'hoste, com a resposta al creixement tumoral. Aquests compostos van rebre inicialment el nom de factors mobilitzadors de lípids o LMF, i la seva concentració al sèrum de pacients amb càncer estaria relacionada amb la magnitud de la pèrdua de pes.

Nakahara i Fukuoka (1948), a partir de teixits tumorals, aïllaren un factor anomenat toxohormona, que és una proteïna de 75 kD responsable de la pèrdua de lípids i de la immunosupressió. Un factor de característiques similars s'ha trobat en el sèrum de pacients amb caquèxia cancerosa, absent en individus sans, tant alimentats com dejunats. Més tard, a partir de ratolins portadors de sarcomes i de pacients amb hepatomes, es va aïllar l'anomenada toxohormona-L, la qual, administrada a animals experimentals, indueix una clara mobilització lipídica (Masuno *et al.*, 1984). També s'ha aïllat un factor lipolític de 5 kD a partir del timus de ratolins portadors del limfoma AKR i de línies derivades d'aquest tumor (Kitada *et al.*, 1981).

D'altra banda, el grup de Tisdale desenvolupà un model tumoral: MAC16, un adenocarcinoma murí de còlon induït amb metilcolantrè, capaç d'induir caquèxia amb una massa tumoral molt petita i en absència d'hipofàgia (Tisdale, 1990). En aquest model s'ha trobat un factor mobilitzador de lípids responsable de la dissolució del teixit adipós i també implicat en la degradació proteica muscular (Beck i Tisdale, 1987). En canvi, en un adenoma anàleg però no caquètic (MAC13), l'activitat lipolítica del plasma és significativament inferior. Quan el factor lipolític procedent dels animals amb MAC16 s'injecta a animals sans, es produeix una reducció de la massa corporal acompanyada d'una pèrdua de teixit adipós, sense variacions en la ingestió (Beck *et al.*, 1990).

2.6 FACTOR INDUCTOR DE PROTEÒLISI (PIF)

Recentment, s'ha identificat un compost amb un pes molecular relatiu de 24 kD i amb característiques de proteoglicà que s'ha anomenat *factor inductor de proteòlisi* o PIF. Aquest pot induir caquèxia *in vivo* activant el catabolisme proteic muscular sense provocar anorèxia. També s'ha detectat a l'orina de pacients amb caquèxia cancerosa, però no en individus sans o amb càncer amb poca pèrdua de pes corporal (Todorov *et al.*, 1996). De fet, els factors inductors de proteòlisis (PIF) aïllats pel grup de Tisdale són dos: un es va obtenir a partir del tumor murí inductor de caquèxia MAC16 (Lorite *et al.*, 1998) i l'altre, idèntic immunològicament, a partir del melanoma humà G361, tumor també inductor de caquèxia quan s'inocula a ratolins *nude* (Todorov *et al.*, 1999). Ambdós factors induïen pèrdua de pes corporal quan s'injectaven a ratolins sans, sense produir canvis ni en la ingestió ni en la beguda. La pèrdua de pes es devia a la disminució de la massa no grassa de la carcassa (Lorite *et al.*, 1998; Todorov *et al.*,

1999). A més, s'han detectat nivells elevats de PIF en pacients amb tumor afectats per la caquèxia (Wigmore *et al.*, 2000; Belizario *et al.*, 1991).

2.7 CITOCINES

S'ha suggerit que, d'entre els mecanismes que desencadenen la caquèxia cancerosa, les citocines tenen un paper primordial en un ampli ventall d'accions fisiològiques. La producció d'aquests mediadors de la resposta immunitària està regulada d'una manera extraordinàriament complexa, i els desequilibris en la producció poden conduir a una àmplia gamma d'alteracions metabòliques.

En situacions d'infecció, trauma o creixement tumoral, l'hoste experimenta una sèrie d'alteracions bioquímiques i fisiològiques, com són anorèxia, febre, mobilització proteica muscular, canvis en els patrons leucocítics, en el metabolisme de carbohidrats i greixos, i alteracions en el patró de síntesi proteica hepàtica. Inicialment es va pensar que aquests canvis eren atribuïbles a factors produïts per l'agent invasor, però actualment se sap amb certesa que són provocats pel mateix hoste, com a mecanisme de defensa enfront de l'estímul invasor. En molts casos, aquests canvis són responsables de la recuperació de l'hoste, fomentant les necessitats anabòliques dels teixits immunes i reduïnt el grau de destrucció cel·lular (Evans *et al.* 1989).

Molts dels canvis del metabolisme de l'hoste es poden explicar per la producció endògena de citocines, pèptids sintetitzats majoritàriament per les cèl·lules del sistema immunitari que s'indueixen com a resposta davant del procés invasiu. En situacions de malaltia s'ha observat un augment de la síntesi de citocines (Moldawer i Copeland, 1988) que, com s'ha demostrat en gran nombre d'estudis, indueixen una sèrie de canvis metabòlics importants. Aquests factors es van descriure inicialment com a activitats que es trobaven en sobrenedants de cultius cel·lulars i que podien modular una gran varietat de respostes biològiques, com ara la producció d'anticossos, l'increment de la resposta dels limfòcits T contra antígens o mitògens, i el creixement i la diferenciació de cèl·lules precursors hematopoètiques.

Les citocines produeixen una gran varietat d'activitats biològiques, com són immunitat, inflamació, hematopoesi, curació de ferides, i participació en la resposta sistèmica contra agents invasius i altres malalties. Així, s'ha observat que en certes situacions patològiques, la biosíntesi de les citocines s'incrementa (Moldawer i Copeland, 1988). El terme citocina s'ha associat a vegades amb el concepte proteïna

similar a hormona (*hormone-like protein*), ja que els dos tipus de molècules (citocines i hormones) actuen com missatgers intracel·lulars. La diferència radica en el fet de que les hormones són produïdes generalment per òrgans especialitzats (glàndules endocrines) i provoquen els seus efectes sobre cèl·lules distants del punt on s'han sintetitzat, mentre que les citocines són produïdes per cèl·lules aïllades de diferents òrgans del cos i les seves accions es produeixen en el microambient que envolta la cèl·lula productora, i fan que el seu paper biològic consisteixi a establir una xarxa de comunicacions entre les cèl·lules de cada teixit o òrgan (Billiau i Vandekerckhove, 1991).

Les citocines regulen les interaccions entre cèl·lula i cèl·lula en situacions normals i patofisiològiques, i poden exercir la seva acció de manera autocrina, paracrina o endocrina mitjançant la interacció amb receptors específics que hi ha a la membrana de la cèl·lula diana. Aquesta interacció pot induir proliferació, activació, diferenciació o mort de la cèl·lula diana. Inicialment es van considerar les citocines com reguladores de la resposta immune, però posteriorment s'ha constatat que tenen una funció molt més amplia en la comunicació cel·lular. Actualment se sap que les citocines formen una xarxa interactiva, de manera que les seves accions poden encavalcar-se, ser antagoniques o sinèrgiques, i induir la producció d'altres citocines i dels seus receptors. A causa d'aquesta complexitat, han d'haver-hi mecanismes que en controlin la biosíntesi, l'alliberació i l'acció. Pel que fa a la biosíntesi i l'alliberació de les citocines, aquestes estan estretament regulades per altres citocines i factors en diferents aspectes: en la degradació, en la modulació dels receptors cel·lulars, o en la transducció de senyal. La producció i l'alliberació de les citocines està influenciada per cicles de retroalimentació positiva i negativa de la mateixa citocina o d'altres citocines.

Les citocines també formen xarxes interactives amb les hormones. S'han descobert dos mecanismes nous que poden controlar l'acció de les citocines. El primer implica els antagonistes dels receptors (inhibidors de citocines de tipus I), els quals són molècules amb una homologia elevada amb les citocines i que s'uneixen al receptor corresponent sense induir la transducció de senyal; d'aquesta manera s'estableix una competència amb la citocina. El segon mecanisme consisteix en la unió que s'estableix entre les molècules solubles del receptor (inhibidors de citocines de tipus II) i les citocines. Aquestes molècules segresten les citocines i n'impedeixen la unió amb el receptor de la membrana cel·lular (Gehr *et al.*, 1992).

Les citocines normalment no són produïdes constitutivament, són efectives a concentracions molt baixes (de picogram a nanogram) i, quan són alliberades, la seva vida mitjana és molt curta. Els efectes de les citocines es produeixen mitjançant la unió a receptors d'alta afinitat de la superfície cel·lular, que es troben en poca quantitat (de 100 a 1.000 per cèl·lula) però quan les cèl·lules s'activen experimenten una gran *up-regulation*.

2.7.1 PRINCIPALS TIPUS DE CITOCINES

Durant la resposta immunològica de l'hoste davant d'una situació anòmala s'alliberen nombrosos mediadors, i un d'aquests són les citocines. Les citocines constitueixen una superfamília de compostos polipeptídics solubles que tenen característiques bioquímiques similars entre si, cosa que en dificulta la purificació. Tot i que l'existència de diverses citocines es va descriure fa uns trenta anys, el seu aïllament en forma pura a partir de teixits ha estat molt difícil. La dificultat radica en el fet que les citocines es produeixen en quantitats ínfimes i són molt làbils. Fins als anys vuitanta no es va disposar de les eines adients per afrontar aquelles dificultats. Així, es van poder purificar i se'n van poder seqüenciar els gens gràcies a les tècniques d'immunocitoquímica i DNA recombinant (Trotta, 1991). Durant les últimes dècades s'ha avançat molt en el coneixement d'aquests compostos i de les funcions específiques de cada un d'ells, el que ha comportat certa confusió de la nomenclatura. D'aquesta forma, en un principi se les va anomenar utilitzant diferents termes com interleucines (“molècula que es mou entre els limfòcits”), monocines (“molècules sintetitzades pels monòcits”) i citocines (“molècules que es mouen entre les cèl·lules”). Tots aquests noms no són del tot correctes; per exemple, les interleucines no només porten missatges entre els leucòcits sinó també entre altres tipus cel·lulars, i les limfocines i monocines poden ser sintetitzades i actuar sobre cèl·lules no limfoides.

Actualment les podem agrupar en diferents famílies:

Interleucines

Es coneixen actualment de la IL-1 a la IL-31

Factors de creixement hematopoiètics

Eritropoietina

CSFs (factors estimuladors de colònies)

Multi-CSF (IL-3)

GM-CSF (*granulocyte/macrophage-CSF*)

G-CSF (*granulocyte-CSF*)

M-CSF (*macrophage-CSF*)

Interferons

IFN- α

IFN- β

IFN- γ

Factors necròtics tumorals

TNF- α o caquectina

TNF- β o limfotoxina

Factors de creixement

EGF (*epidermal growth factor*)

TGF- α , TGF- β (*transforming growth factors*)

FGF (*fibroblast growth factor*)

PDGF (*platelet-derived growth factor*)

NGF (*nerve growth factor*)

IGF (*insulin-like growth factor*)

Quimiocines

RANTES

MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*)

Taula 1. Principals tipus de citocines.

També es poden diferenciar dos grups de citocines si en tenim en compte el paper en la caquèxia: les procaquèctiques i les anticaquèctiques.

Les citocines implicades en l'activació de la resposta inflamatòria desencadenada pel sistema immunitari en resposta a estímuls invasius reben el nom de proinflamatòries. Les principals citocines d'aquest grup són el TNF- α , el TNF- β o limfotoxina, la IL-1, la IL-6, l'IFN- α , l'IFN- β i l'IFN- γ . Les citocines que s'han relacionat amb la resposta caquèctica (anomenades citocines procaquèctiques) pertanyen a aquest grup de citocines proinflamatòries, d'entre les quals destaquen el

TNF- α , la IL-1, la IL-6 i l'IFN- γ . Aquestes citocines, secretades pel sistema immunitari, actuen sobre diversos teixits diana (medul·la òssia, miòcits, hepatòcits, cèl·lules endotelials, etc.) en els quals activen una sèrie de respostes biològiques que condueixen al desgast tissular associat a la caquèxia (Argilés i López-Soriano, 1999). Aquestes citocines comparteixen molts efectes metabòlics i la seva activitat està íntimament interrelacionada; fins i tot es produeixen efectes sinèrgics.

Hi ha un altre grup de citocines, les antiinflamatòries o anticaquèctiques, les quals actuen en sentit contrari, modulant l'acció de les citocines proinflamatòries. En aquest grup s'inclouen la IL-10, la IL-4, la IL-13, l'antagonista del receptor IL-1 (IL-1ra), i altres molècules com ara el receptor soluble de la IL-6 (sIL-6R) i el receptor soluble del TNF- α (sTNFR) (Argilés i López-Soriano, 1998).

La IL-15 és una citocina que no té un paper antiinflamatori com les anteriors, però és una candidata important al grup de citocines anticaquèctiques gràcies a les seves accions anabòliques sobre el múscul esquelètic (Quinn *et al.*, 1995).

A continuació es descriurà l'estructura i els efectes fisiològics d'una de les citocines proinflamatòries que més impacte ocasiona en la simptomatologia de la caquèxia: el TNF- α .

3. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF- α)

Malgrat que la caracterització del factor necròtic tumoral α (TNF- α) es va fer fa menys de dues dècades, les primeres evidències de l'existència d'un factor capaç de produir regressió en tumors es remunten al segle passat, quan un cirurgià de Nova York, William B. Coley, observà que malalts de càncer milloraven, en alguns casos, en produir-los una infecció amb *Streptococcus* o *Serratia* (Coley, 1893; revisat per Wiemann i Starnes, 1994). Cap als anys cinquanta, s'observà que els factors activadors de leucòcits produïen febre quan s'injectaven a animals sans (Bennet i Beeson, 1953). Més tard, es van definir aquests mitjancers en la resposta biològica com un pirogen endogen, producte del sistema immunitari (Atkins, 1984). D'altra banda, diversos estudis de l'agent bacterià implicat en el procés de regressió tumoral observat per Coley portaren a la conclusió que era un lipopolisacàrid que, malgrat la gran toxicitat, era útil com a agent antineoplàstic i inductor del procés de necrosi hemorràgica (Shear i Turner, 1943). En el mateix sentit, s'obtingué sèrum de ratolins infectats amb bacteris

productors de lipopolisacàrid, i es va veure que era útil per tractar tumors d'altres animals (O'Malley *et al.*, 1962). Altres estudis posteriors sobre productes secretats per leucòcits portaren a la definició de diverses activitats de les molècules produïdes per aquestes cèl·lules i implicades en la resposta de l'hoste a estímuls invasors: mediador endogen leucocític, pirogen endogen, factor d'activació leucocític, etc. Una d'aquestes molècules fou anomenada caquetina quan va ser considerada el mitjancer de la síndrome caquètica associada a infeccions cròniques i neoplàsies. La caquetina fou aïllada de la línia cel·lular RAW 264.7 de macròfags activats de múrids, on un 1,1-2% de les seves secrecions són caquetina (Beutler *et al.*, 1985a).

L'any 1984 es van caracteritzar i clonar el factor necròtic tumoral α i la limfotoxina, s'observà una gran homologia entre ambdues (Pennica *et al.*, 1984; Gray *et al.*, 1984; Aggarwal *et al.*, 1985a). A més, es va poder constatar una gran homologia entre la caquetina de ratolí i el TNF- α humà; de fet, la posterior seqüenciació d'ambdues proteïnes posà de manifest que es tractava de la mateixa molècula (Beutler *et al.*, 1985a) i que el TNF- α era el principal mediador de la sèpsia induït per l'endotoxina bacteriana (Beutler *et al.*, 1985b). Un any més tard es va redescobrir una altra funció del TNF- α : la de factor inductor de diferenciació (Takeda *et al.*, 1986). Darrerament s'estan aclarint molts encavalcaments de funcions i molècules conegudes amb més d'un nom, que es creien diferents; per exemple, funcions antigament atribuïdes al pirogen endogen se sap ara que es deuen a la IL-1 o al TNF- α .

Així doncs, dues línies molt diferents d'investigació, una encaminada a l'aïllament del missatger endogen de la necrosi i l'altra a la del missatger endogen de la caquèxia i la sèpsia, conduïren a la conclusió que ambdós processos, necrosi tumoral i xoc endotòxic, sorgeixen per l'acció del mateix producte macrofàgic: el TNF- α o caquetina (Beutler i Cerami, 1987). Des de llavors s'han desenvolupat nombrosos estudis sobre estructura, mecanismes d'acció i activitats biològiques del TNF- α , com també de la complexa xarxa de citocines produïdes pel sistema immunitari de la qual en formaria part. Això no obstant, sembla clar que el TNF- α és el responsable de totes les alteracions nutricionals que es donen en infeccions, tumors i traumes, de les quals la més important és la inducció de caquèxia. Ara per ara, és evident que la resposta biològica de l'hoste no és cosa d'una sola proteïna, sinó d'un grup de molècules que actuen sincrònicament (Moldawer i Copeland, 1988). Molts estudis científics han

orientat els seus objectius a la manera d'eliminar els efectes tòxics del TNF- α sobre l'hoste, conservant els relacionats amb el procés de necrosi tumoral.

3.1 BIOSÍNTESIS I ESTRUCTURA PROTÈICA

Fins l'any 1984 es creia que els macròfags eren les úniques cèl·lules productores de TNF- α , encara que actualment se sap que els tipus cel·lulars productors són nombrosos: macròfags, limfòcits B i T, polimorfonuclears, fibroblasts, cèl·lules musculars llises, osteoblasts, cèl·lules epitelials de la retina i nombroses línies tumorals (revisat per Aggarwal i Natarajan, 1996). És possible, fins i tot, que tots els tipus cel·lulars puguin expressar el gen del TNF- α sota condicions adequades, encara que no se n'hauria descobert la síntesi a causa dels baixos nivells o per una estimulació inadequada (Aggarwal i Natarajan, 1996).

El precursor del TNF- α en humans és un propèptid de 233 aminoàcids, intracel·lular, ancorat a la membrana. Allà és trencat proteolíticament, s'allibera la forma extracel·lular de la proteïna madura activa de 157 aminoàcids (17 kD), i deixa a la membrana un pèptid de 76 aminoàcids (pèptid senyal de 14 kD) (Jue *et al.*, 1990). La secreció del TNF- α és un procés altament regulat i encara que no s'ha identificat la proteasa, les metal·loproteïnases semblen estar-hi implicades (Gearing *et al.*, 1994 i 1995). Hi ha un alt grau d'homologia entre el TNF- α de diferents espècies, tant en la seqüència dels aminoàcids com en la dels nucleòtids, però, a diferència de la versió humana, el TNF- α murí és glicosilat i la glicosilació diferencial dóna lloc a la secreció de diverses isoformes d'elevat pes molecular que semblen tenir la mateixa bioactivitat (Sherry *et al.*, 1990; Jue *et al.*, 1990). La prohormona no processada de 26 kD és inactiva (Kriegler *et al.*, 1988), però recentment s'ha suggerit que es pot ancorar a la membrana plasmàtica per la regió pro, exposar extracel·lularment la seqüència madura i exercir bioactivitat local (Decker *et al.*, 1987; Kriegler *et al.*, 1988; Cseh i Beutler, 1989). En la forma madura es coneix l'existència d'un pont disulfur entre dues cisteïnes situades en les posicions 69 i 101, i una histidina a la posició 73 que li donen una conformació determinada (Pennica *et al.*, 1984 i 1985), però que no són essencials per a la seva activitat biològica (Fiers *et al.*, 1991a i 1991b). La seqüència del pèptid senyal, molt llarga respecte a altres proteïnes, és rica en aminoàcids hidrofòbics i és sensible a la tripsina.

L'estructura nadiua del TNF- α és un trímer amb una massa molecular total de 52 kD, de gran similitud topològica amb el TNF- β . Cada subunitat conté una estructura antiparal·lela de tipus *sandwich* (Jones *et al.*, 1989; Eck *et al.*, 1988). Es tracta d'una proteïna estable en un ventall ampli de pH (de 5,5 a 10), però una desnaturalització deguda al pH és irreversible. També perd la seva activitat per sobre dels 100°C, i es destrueix per l'acció de la tripsina, l'elastasa i la O-quimotripsina. Nombrosos estudis han tractat d'establir la relació entre estructura i funció, cosa que permetria redissenyar la citocina eliminant-ne la toxicitat, però mantenint-ne l'activitat anticancerígena. Estudis de mutagènesi dirigida i deleció parcial han establert regions de la molècula essencials per a la unió al receptor o per a l'activitat biològica (Kircheis *et al.*, 1992; Gase *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1992).

3.2 ESTRUCTURA GÈNICA I REGULACIÓ

El gen que té codificada la informació del TNF- α es troba en el braç curt del cromosoma 6 humà (Nedospasov *et al.*, 1986; Aggarwal *et al.*, 1987), molt a prop del gen que té codificada la informació del TNF- β , a la regió del complex major d'histocompatibilitat (Spies *et al.*, 1986; Muller *et al.*, 1987). Hi ha una homologia del 80% en la seqüència de nucleòtids entre rates, conillets d'índies i humans. El gen humà té 3 kb de llargada i tres introns de gran homologia als de conill i rata. També es conserven les regions no traduïdes a 3' i 5', i sembla que tenen un paper important en la regulació de l'expressió de la proteïna. El seu mRNA conté a 3' una seqüència de 33 nucleòtids d'uridina i adenosina, repeticions de l'octàmer UUAUUUAU. Aquesta seqüència també es troba en altres citocines com ara interleucines, limfotoxines i interferons, i en oncògens (Caput *et al.*, 1986). Alguns estudis recents suggereixen que d'aquesta seqüència no traduïda dependrà la vida mitjana de l'mRNA, que generalment no supera els 10 minuts (Moldawer i Copeland, 1988). Un cop sintetitzada la proteïna, té una vida mitjana molt curta, semblant a la d'altres citocines; en conills s'ha estimat sobre els 6 minuts. La seva biodegradació es duu a terme al fetge, al ronyó i a la pell (Beutler *et al.*, 1988).

La producció de TNF- α està regulada per nombrosos estímuls. La endotoxina fou considerada fa anys com el principal activador de la seva síntesi, encara que actualment es sap que les bacteries gram-positives, fongs, llevats, micoplasmes,

cèl·lules tumorals, RNA i DNA víric, nombroses citocines, mitògens, activadors de la seva síntesi (revisat per Aggarwal i Natarajan, 1996). Igualment, les radiacions ionitzants (Hallahan *et al.*, 1989) i els estímuls fisiològics diversos com ara febre, xoc tèrmic o estrès, poden induir-ne la síntesi en macròfags. El mecanisme d'acció de l'estimulació no és ben conegut, tot i que les serina/treonina-cinases, les tirosina-cinases i les serina/treonina-fosfatases, les proteases, l'inositol fosfat, la fosfolipasa D i les prostaglandines semblen implicades (Chung *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1994). També són diversos els factors que produeixen una disminució de l'expressió del gen del TNF- α , com esteroides, inhibidors de la síntesi de prostaglandines, inhibidors de proteases i fosfodiesterases i algunes citocines (Espevik *et al.*, 1987; Nguyen *et al.*, 1990; Roby i Hunt, 1994; Chao *et al.*, 1995; Kunkel *et al.*, 1988).

3.3 RECEPTORS DEL TNF- α (TNFR1 i TNFR2)

Els receptors del TNF- α són presents en gairebé tots els tipus cel·lulars amb poques excepcions, com són els eritròcits i els limfòcits T no activats (Fiers *et al.*, 1986). Hi ha dos tipus de receptors del TNF, que són comuns per al TNF- α i el TNF- β : receptor de tipus I (TNFR1) també anomenat p55, CD120a o 55 kD; i receptor de tipus II (TNFR2) també anomenat p75, CD120b o 75 kD (Loetscher *et al.*, 1991). Aquests dos receptors pertanyen a la mateixa família del receptor de l'NGF i d'altres proteïnes, com ara CD27, CD30, CD40 i TNF-RP (TNF *related protein*), caracteritzades per presentar certs dominis (de tres a sis) rics en cisteïna a la part extracel·lular de la molècula.

El receptor de tipus II s'expressa principalment en cèl·lules endotelials i del sistema immunitari, mentre que el de tipus I es troba pràcticament en tots els tipus cel·lulars. Ambdós uneixen el TNF- α i el TNF- β amb alta afinitat (Schoenfeld *et al.*, 1991). En estudis d'unió dels dos tipus de receptors murins al TNF- α humà, s'ha vist que el receptor murí de tipus II és específic d'espècie, mentre que el de tipus I mediarà les respostes que el TNF- α indueixi en ratolins (Lewis *et al.*, 1991). L'expressió d'aquests tipus de receptors està regulada independentment (Hohmann *et al.*, 1990), i tot i que la seva presència és indispensable per traduir-se en un efecte biològic, no hi ha correlació entre el nombre de receptors i la magnitud de la resposta, o fins i tot la direcció de la resposta (Fiers *et al.*, 1991a i 1991b). S'ha determinat que és suficient un

5% de receptors ocupats per generar una resposta biològica, encara que a concentracions fisiològiques se'n pot arribar a ocupar el 50% (Aggarwal *et al.*, 1985b).

El domini extracel·lular del receptor de tipus I consta de 182 aminoàcids, i el de tipus II, de 235; ambdós són *N*-glicosilats, però sols el darrer és *O*-glicosilat. Ambdues seqüències estan relacionades entre elles, cadascuna amb quatre seqüències repetitives, d'uns 40 residus de llargada amb sis (alguns amb quatre) residus de cisteïna. El domini citoplasmàtic del receptor de tipus I és de 220 aminoàcids, i el del tipus II de 174; en aquesta regió no hi ha homologia, i cap d'aquests dominis dóna informació de la seva funció. Els dominis intracel·lulars no tenen cap activitat enzimàtica intrínseca i medien els seus senyals mitjançant el reclutament de proteïnes citosòliques a través de dominis d'interacció proteïna-proteïna. La família del receptor del TNF- α se subdivideix en dos grans grups: el primer inclou receptors com el TNFR1 i el receptor de Fas i contenen un domini anomenat *death domain* (DD), el segon inclou receptors com ara el TNFR2 i CD40, i presenten un motiu que s'uneix a proteïnes de la família del factor associat al receptor de TNF- α (TRAF) (Liu *et al.*, 1999).

En ratolins s'ha descrit que els dos tipus de receptors inicien vies de senyals que donen lloc a la inducció de diferents respostes cel·lulars. El de tipus II inicia els senyals per a la proliferació dels timòcits i les cèl·lules T citotòxiques, per a la inducció gènica i per a l'apoptosi; mentre que el de tipus I inicia els senyals per a la citotoxicitat, resposta proinflamatòria i la inducció de l'activitat protectora, activant la Mn-superòxid dismutasa (MnSOD) (Tartaglia *et al.*, 1991). Aquestes diferències en la resposta poden estar relacionades amb les diferències marcades de les regions intracel·lulars d'aquestes molècules (Dembic *et al.*, 1990).

Els gens que tenen codificada la informació d'aquests dos receptors estan localitzats en cromosomes diferents del genoma humà. El gen del TNFR1 és al cromosoma 12 (p13) i el del TNFR2, al cromosoma 1 (p36) (Baker *et al.*, 1991). Aquestes dues regions del genoma humà s'ha vist que estan implicades en els canvis cromosòmics dels desordres neoplàstics (Trent *et al.*, 1989). Els gens que tenen codificada la informació dels dos receptors murins també mapen en cromosomes diferents: el TNFR1 és al cromosoma 4 i el TNFR2, al cromosoma 6 (Goodwin *et al.*, 1991). El gen que té codificada la informació del TNFR1 s'expressa constitutivament, i els agents que modulen el nombre de receptors a la superfície cel·lular no alteren l'expressió d'aquest gen; per tant el mecanisme de regulació és posttranscripcional (Lindvall *et al.*, 1990). El gen del TNFR2 és induïble.

Els receptors de TNF- α , igual que la mateixa citocina, estan fortament regulats per multitud de molècules, especialment per l'IFN- γ , tot i que el sentit de la regulació varia entre tipus cel·lulars (Drapier i Wietzerbin, 1991; Aggarwal i Pandita, 1994). Altres citocines que poden regular l'expressió dels receptors de TNF- α són les interleucines 1, 2, 4, 6 i 8, i el GM-CSF, com també l'hormona estimuladora de la tiroide (TSH). També el mateix TNF- α regula els seus receptors, indueix la internalització del TNFR1 i la secreció en el medi extracel·lular del TNFR2 (Higuchi i Aggarwal, 1994). També s'ha descrit modulació per agents despolimeritzadors de microtúbuls, i també activadors o inhibidors de la proteïna-cinasa C, els glucocorticoides, el retinal, l'LPS, les lectines, el PAF, etc. (revisat per Aggarwal i Natarajan, 1996).

S'ha descrit la secreció d'ambdós receptors al medi extracel·lular, per proteòlisi parcial dels dominis extracel·lulars (Engelmann *et al.*, 1990; Schall *et al.*, 1990; Himmler *et al.*, 1990), tant *in vivo* com *in vitro*. És un procés altament regulat (Zhang, 1994) i aquest fet és més comú en el receptor TNFR2 que en el TNFR1. S'han trobat, *in vivo*, receptors solubles en sèrum i orina de pacients amb càncer, i s'ha suggerit que podrien competir pel TNF- α amb els receptors de membrana, inhibint-ne l'acció, i alhora, com que la unió és reversible, afectarien les cinètiques farmacològiques i l'estabilitat del TNF- α (Engelmann *et al.*, 1990).

Pel que fa a la transmissió de senyal, s'ha proposat que el TNFR2 més que transduir el senyal d'ell mateix, actuaria passant el TNF- α que capta el TNFR1 (Tartaglia *et al.*, 1993). Altres estudis suggereixen que la senyalització a través de TNFR2 és additiva a la de TNFR1, i que això requereix el domini intracel·lular de TNFR2 (Declercq *et al.*, 1998; Riches *et al.*, 1998).

3.4 TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL

El TNF- α , en forma trímera, interactua amb el receptor i, formant un complex, s'internalitza en vesícules revestides de clatrina (almenys en el cas del TNRF1), que després es transformen en endosomes, cossos multivesiculars i finalment acaben en els lisosomes secundaris, on són degradats (Mosselmans *et al.*, 1988). No hi ha evidències que es recicli el receptor, perquè en absència de síntesi proteica el receptor no reapareix a la superfície cel·lular (Scheurich *et al.*, 1988). La vida mitjana dels receptors s'ha

establert entre 30 minuts (Baglioni *et al.*, 1987) i 2 hores (Scheurich *et al.*, 1988). La resposta cel·lular està correlacionada amb el nombre de complexos TNF-receptor internalitzats, però el nombre de receptors de la superfície cel·lular normalment no és limitant (Scheurich *et al.*, 1988). La internalització dels receptors té lloc contínuament, però el procés és accelerat per la unió al lligand (Smith *et al.*, 1990). Al fetge, s'ha vist que el TNF- α promou una regulació negativa dels seus receptors, que estan latents a la membrana plasmàtica (Han *et al.*, 1990).

La multiplicitat d'efectes biològics que desencadena el TNF- α , fins i tot en un sol tipus cel·lular, fa pensar en la necessitat de diferents senyals per als diferents efectes induïts per la citocina. Tanmateix, com es desencadenen efectes tan diversos, i fins i tot oposats entre ells, continua sent una incògnita. Diversos estudis hi han implicat les fosfodiesterases, les ceramides, els radicals superòxid, les cinases i fosfatases diverses, les proteïnes G i nombrosos factors transcripcionals (revisat per Fiers *et al.*, 1991b; Beyaert i Fiers, 1994).

3.4.1 PROTEÏNES G

Sembla evident que la unió del TNF- α al seu receptor comporta l'activació de proteïnes G. El receptor TNFR1 del TNF- α pot experimentar una *down-modulation* per acció de la proteïna-cinasa C i, en alguns tipus cel·lulars, la proteïna-cinasa A produeix una *up-regulation* (Scheurich *et al.*, 1989). A més, les proteïnes G estan involucrades en la transducció del senyal, ja que l'acció citotòxica és inhibida per la toxina pertussis (Suffys *et al.*, 1987; Hepburn *et al.*, 1987), i altres treballs n'han corroborat la implicació en la transducció de senyal del TNF- α (Imamura *et al.*, 1988; Hotta *et al.*, 1999). Aquesta toxina desacobla proteïnes G_t, G_i i G_o dels seus receptors. Imamura *et al.* (1988) van descriure que el TNF- α promou la unió de nucleòtids de guanidina a la membrana de les cèl·lules L929 i HL-60, alhora que es produeix en paral·lel un increment en l'activitat GTPasa. Encara que els receptors acoblats a proteïnes G contenen normalment una estructura de set dominis transmembrana, això no és una norma universal. Està descrit que la inducció dels receptors muscarínics en cèl·lules musculars respiratòries per part del TNF- α està mediada per una incrementada expressió i funció de les subunitats G_{ai-2} i G_{q α} i un augment en les vies de transsenyalització associades

(Hotta et al. 1999). Tanmateix, l'activació de la lipòlisi induïda en adipòcits succeeix per una inhibició de les subunitats $G_{i1\alpha}$, $G_{i2\alpha}$ i $G_{i3\alpha}$ (Gasic et al. 1999).

Altres evidències mostren l'activació d'una fosfolipasa C (PLC) específica de fosfatidilcolina (PC) i la hidròlisi d'inositol, amb la consegüent elevació dels nivells de Ca^{2++} i de diacilglicerol (DAG) per part del TNF- α (Beyaert et al. 1993). Per altra banda, s'han descrit que l'elevada producció de TNF- α en sepsis en el fetge produeix un increment dels nivells intracel·lulars de calci i una activació de la via mediada per la proteïna quinasa C (PKC) que desencadena la resposta de fase aguda (Sayeed, 1996). També l'activació de les proteïnes G pel TNF- α comporta l'activació de la proteïna cinasa A (PKA), que activa el factor de transcripció CREB i de la fosfolipasa A_2 (PLA₂), via activació de l'adenilatciclasi (Krönke et al. 1990). Sembla ser que la PLA₂ té un paper en la citotoxicitat induïda per aquesta citocina en determinats tipus cel·lulars (Suffys et al. 1987). Les cèl·lules sensibles tractades amb TNF- α alliberen àcid araquidònic al medi (Fiers *et al.*, 1986; Suffys *et al.*, 1987; Matthews *et al.*, 1987; Suffys *et al.*, 1991). Quan les cèl·lules contenen els enzims adequats, l'àcid araquidònic pot ser convertit a prostaglandines (Dayer *et al.*, 1985) i altres eicosanoides; això suggereix l'activació de la fosfolipasa A_2 i, com que només té lloc a les cèl·lules sensibles al TNF- α , sembla que és un pas necessari per a l'acció citotòxica.

3.4.2 ACTIVACIÓ DE LES CASPASES

En l'estimulació de l'apoptosi pel TNF- α són determinants una sèrie de proteïnes portadores, al igual que el TNFR1, de la regió DD (*death domain*), i que sembla ser clau en la inducció de la mort cel·lular. Aquestes proteïnes, que formen complexos amb el receptor, són la proteïna DD associada a Fas (FADD/MORT1), la proteïna DD associada al TNFR (TRADD) i la proteïna associada al receptor (RIP). L'apoptosi induïda per TNF- α implica a una família de proteases relacionada amb ICE, les caspases. Les caspases són proteases de cisteïna, que existeixen en la cèl·lula com precursors inactius i són processats i activats en resposta a l'estímul de mort cel·lular. Quan el TNF- α s'uneix al seu receptor, aquest, s'uneix a TRADD, el qual alhora recluta a FADD. A aquest complex s'uneixen la procaspasa 8 (FLICE) i la procaspasa 10 (FLICE2). La formació d'aquest complex duu al autoprocessament i activació d'aquestes últimes (Vincenz i Dixit, 1997). Per altra banda, TRADD activa la

procaspasa 2 mitjançant la formació d'un complex amb RIP (Ahmad et al. 1997). Les caspases semblen mediar la senyal apoptòtica mitjançant l'acció directa d'elles mateixes o per l'acció mediada per la desestabilització de Bcl-2, un enzim de la membrana mitocondrial que actúa prevenint l'apoptosi (Ksontini et al., 1998).

3.4.3 ACTIVACIÓ DE NF- κ B

El TNF- α indueix una ràpida però transitòria activació de *c-fos* i *c-jun*, i una activació més tardana de l'NF κ B (Lin i Vilcek, 1987; Osborn *et al.*, 1989; Haliday *et al.*, 1991), tots tres factors de transcripció nuclear. El TNF- α altera l'expressió gènica mitjançant l'activació de factors de transcripció nuclears (Schutze et al. 1992). En diversos tipus cel·lulars, un factor de transcripció principal és el factor nuclear κ B (NF- κ B). NF- κ B es troba en el citoplasma en forma de complex inactiu unit a la proteïna inhibidora I κ B α . El TNF- α estimula la degradació del I κ B α mitjançant el sistema proteolític dependent d'ubiquitina. Aleshores, el NF- κ B s'activa i es transloca al nucli (Palombella et al. 1994; Chen et al. 1996). Els mecanismes senyalitzadors postreceptor varien segons el tipus cel·lular, explicant la naturalesa pleiotròpica del TNF- α (Schutze et al. 1992). NF- κ B regula molts gens en la resposta immune i inflamatòria: indueix la síntesi de la cadena lleugera de les immunoglobulines, del complex major d'histocompatibilitat, de citocines com IL-6 o IL-2 i de molècules d'adhesió com la E-selectina, ICAM-1 o VCAM-1. Per altra part, l'activació del NF- κ B ha estat implicada en la prevenció de l'apoptosi induïda pel mateix TNF- α (Beg i Baltimore, 1996).

L'activació de NF- κ B comença per la formació d'un complex entre el receptor TNFR1 i dues molècules que s'associen a la seva regió citoplasmàtica: TRADD i el factor associat al TNFR2 (TRAF2). El TNFR2, al qual li manca la regió DD per associar-se al FADD, ho fa directament a través de TRAF2 (Hsu et al., 1996). Encara que es desconeix la seva acció concreta, la molècula de connexió entre el complex TNFR1-TRADD-TRAF2 i l'activació de NF- κ B sembla ser l'anomenada cinasa inductora de NF- κ B (Malinin et al., 1997). El mecanisme molecular d'activació de l'NF κ B pel TNF- α és un procés seqüencial en el qual s'activa la fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC); aquesta provoca l'alliberament de 1' 2'-diacilglicerol (DAG), el qual a la vegada activa una esfingomielinasa. Aquesta, al seu torn, talla l'esfingomielina i produeix ceramida, molècula senyal donat que és

necessària i suficient per induir l'activitat nuclear de l'NFκB (Schütze *et al.*, 1992; Pushkareva *et al.*, 1995). La producció de ceramides activa les CAPK (*ceramide-activated protein kinase*) que permeten fosforilar la RAF-1, la qual inicia la cascada de MAP-cinasa (Wiergnann *et al.*, 1994). A més, el PAI-2 (*plasminogen activator inhibitor type 2*) inhibeix l'apoptosi induïda pel TNF-α, cosa que també suggereix la participació d'una serina proteasa en l'acció del TNF-α (Aggarwal i Natarajan, 1996). A més de les ceramides, també s'han implicat en l'activació de NF-κB, les espècies reactives de l'oxigen, la PKA i les cascades de cinases d'ERK1/2 i de p38 (Vabden Berghe *et al.*, 1998). En particular s'ha implicat a PKCξ, la qual es troba *downstream* en la cascada activada per ERK1/2 (Berra *et al.*, 1998).

3.4.4 MAPKS

Nombrosos estudis suggereixen que el TNF-α indueix l'activació de proteïnes-cinases, les quals serien essencials en la transducció del senyal. S'observa que pocs minuts després de la interacció amb el seu receptor, el TNF-α indueix la fosforilació de nombroses proteïnes, depenent del tipus cel·lular estudiat. La fosforilació es produeix tant en residus de serina com de tirosina, fet que indica l'activació de serina i tirosina-cinases. Entre d'altres, s'activen la JNK (*c-jun kinase*), l'*hsp-27* i la β-caseïna-cinasa, la *c-RAF-1*-cinasa, proteïna-cinasa C (PKC), l'EGFR-cinasa (*epidermal growth factor receptor*) i les MAP-cinases (*mitogen activated protein*). Malgrat aquesta fosforilació de proteïnes, el domini intracel·lular del receptor del TNF-α no presenta activitat de cinasa. Es creu que algunes cinases intracel·lulars estarien lligades al receptor, i s'activarien després de la unió del TNF-α a aquest (Aggarwal i Natarajan, 1996).

Tant la cascada de cinases activades per mitògens (MAPKS) d'ERK1/2, com la de JNK/SAPK i la de p38 medien algunes de les senyals cel·lulars del TNF-α.

La via d'ERK1/2 (p44/p42) consisteix en una cascada de proteïnes-cinases que connecta les senyals de creixement i diferenciació amb la transcripció en el nucli. Els receptors de factors de creixement i les tirosines cinases activen Ras, que activa c-Raf, MEK i les MAPKS. Les MAPKS activades es transloquen al nucli, on activen la transcripció al fosforilar diferents factors de transcripció. P44/p42 són principalment activades per factors de creixement via Ras-Raf-1, però varis estudis han demostrat clarament l'acció del TNF-α sobre aquestes cinases en miòcits, macròfags, fibroblasts primaris i cèl·lules

de fibrosarcoma L929sA (Boone et al., 1998; Begum et al., 1996). El TNF- α no sembla actuar a través d'aquestes proteïnes i s'ha proposat que podria fer-ho a través de MADD o ceramides (Schievella et al., 1997; Boone et al., 1998). Són activats per aquesta via els factors de transcripció de la família STAT i TCF/Elk 1.

La via JNK/SAPK és homòloga a la de p44/p42 però sembla ser activada per estímuls diferents. Entre els estímuls extracel·lulars que activen aquesta via estan les citocines proinflamàtòries, la llum UV, certs factors de transcripció, inhibidors de la síntesi de proteïnes i l'estrés osmòtic (Davis, 1994; Sanchez et al., 1994; Derijard, 1995; Raingeaud et al., 1995). Les citocines inflamàtòries com el TNF- α i IL-1 sembla ser que activarien aquesta via mitjançant les proteïnes de la família Rac/Rho, de les proteïnes *small GTP binding proteins*, mentre que els inhibidors de la síntesi i la llum UV semblen actuar independentment de Rac i Rho (Sluss et al., 1994; Coso et al., 1995). Està descrit que la unió de MADD al TNFR1 és necessària per a l'activació d'aquest via per part del TNF- α (Schievella et al., 1997) així com la unió de TRAF2. La MEKK1 activada fosforila a SEK (també coneguda com MKK4), la qual alhora activa JNK (SAPK). JNK s'uneix fortament a la regió terminal de c-jun i els fosforila a les serines 63 i 73. Mitjançant aquesta via també s'activen els factors de transcripció ATF2 i TCF/Elk1.

La via de la MAPK p38 també és activada per una varietat de situacions d'estrés cel·lular: shock osmòtic, citocines inflamàtòries, LPS, llum UV, i factors de creixement (Han et al., 1994; Lee et al., 1994; Rouse et al., 1994; Freshney et al., 1994). Les citocines proinflamàtòries sembla que senyalitzen per p38 a través de MEKK i SEK. Està descrit que el TNF- α , via p38, fosforila i activa la cinasa MAPKAP-2 i que fosforila i activa els factors de transcripció CREB i ATF-2 (Brinkman et al., 1999). Malgrat tot, p38 sí sembla estar implicada en l'activació de regulació de la transcripció per TNF- α (Yamakawa et al., 1999). L'activació d'aquesta via sembla ser mediada per la proteïna Rac1 i ser dependent de la unió de TRAF2 al receptor (Carpentier et al., 1998).

3.4.5 CERAMIDES

El TNF- α , actuant a través del TNFR1, activa dues esfingomielinases; una esfingomielinasa neutra localitzada a la membrana (nSM) i una esfingomielinasa àcida endosomal-lisosomal (aSM). L'activació de les esfingomielinases comporta una hidròlisi de l'esfingomielina per generar la ceramida, la qual activa alhora una cinasa capaç de transmetre el senyal. L'activació de les esfingomielinases àcides sembla que succeeix a través del complex TRADD/FADD o a través de DAG, i l'activació de la fosfolipasa àcida a través de TRAF2/RIP. La ceramida és un potencial segon missatge, que ha estat relacionat amb la inducció d'apoptosi (Gamard et al., 1997) i com a senyal mitogènica (Kolesnick i Krönke, 1998). En aquest sentit, s'ha descrit a la cinasa activada per ceramida com activadora de la via de MAPKs p42/p44 (Boone et al., 1998). Ni la aSM ni la nSM sembla ser que estiguin implicades en l'activació de NF- κ B induïda per TNF- α (Adam et al., 1998; Gamard et al., 1997). S'ha proposat que la nSM és medidora de l'activació de la fosfolipasa A2 (PLA2) per TNF- α , donant-li un paper proinflamatori. A més, la ceramida ha estat implicada en la interferència del TNF- α amb el senyal de la insulina. En general, poden mimetitzar molts dels efectes de les citocines proinflamatòries, pel que podrien ser mediadors de moltes de les seves accions.

3.4.6 VIA DE JACKS/STATS

Una gran varietat de citocines medien la transmissió del seu senyal a través d'un tipus de factors de transcripció: el grup dels STAT (*signal transducer and activator of transcription*). Citocines polipeptídiques, limfocines i factors de creixement, tots envien el seu senyal a través d'una família relacionada de receptors de citocines que activen les cinases Janus (JAKs). La interacció de la citocina amb el receptor promou l'associació de JAK seguida de la fosforilació del seu receptor i de les molècules senyalitzadores downstream de la via, com les proteïnes STAT (Darnell et al., 1994; Ihle et al., 1995). La fosforilació de les proteïnes STAT permet la seva translocació al nucli on s'uneixen als llocs IRE i GAS del DNA i activen l'expressió gènica.

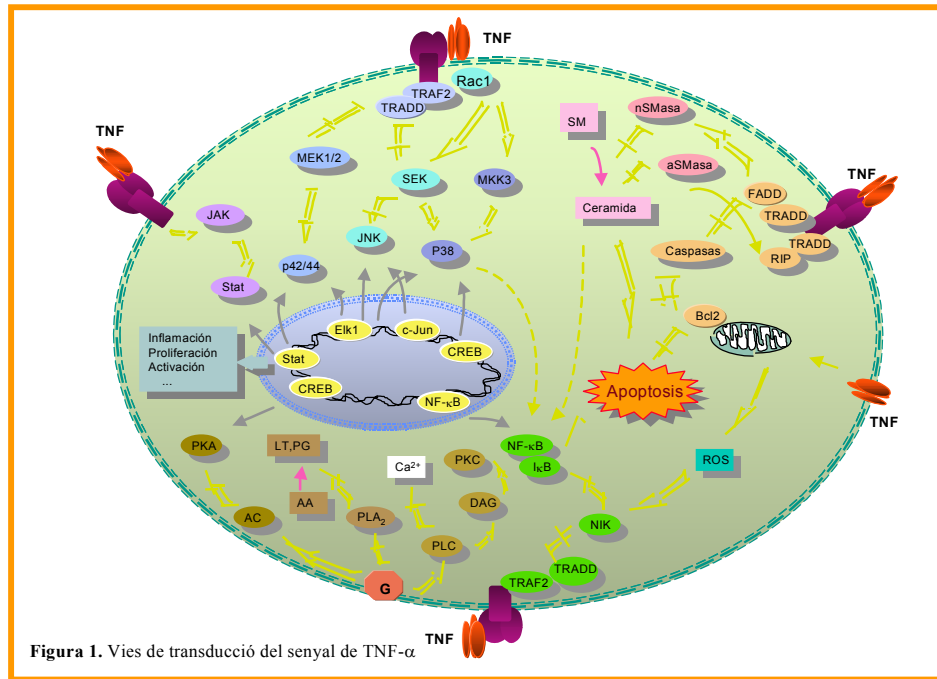
S'ha vist que el TNF- α , a partir del TNFR1, i actuant en adipòcits 3T3-L1, produeix la fosforilació i l'activació de JAK1, JAK2 i TYK2 (també de la família JAK) i que això està associat amb la fosforilació de STAT1, STAT3, STAT5 i STAT6.

3.4.7 RADICALS LLIURES DE L'OXIGEN (ROS)

El TNF- α s'ha involucrat en l'activació de dues vies que condueixen a l'apoptosi cel·lular: una dependent de les espècies reactives de l'oxigen (ROS) i l'altra independent de ROS (Sidoti-de Fraisse *et al.*, 1998), on actuen les caspases, proteases que actuen en situació de mort cel·lular.

Els esdeveniments induïts pel TNF- α fan que part del flux d'electrons al mitocondri es reorienti cap a la formació de radicals d'oxigen (ROS) (Lancaster *et al.*, 1989; Fiers *et al.*, 1991b). Com a resultat, té lloc l'oxidació de lípids i proteïnes, seguida de llur degradació; també la fragmentació del DNA en pot ser conseqüència. El TNF- α , per ell mateix, indueix la producció de proteïnes protectores (Wallach, 1984), entre les quals hi ha la Mn-superòxid-dismutasa (MnSOD). Aquest enzim mitocondrial desactiva els radicals superòxid, i la seva sobreexpressió confereix resistència al TNF- α . En aquest sentit, cal remarcar que les cèl·lules canceroses solen ser deficientes en MnSOD (Oberley i Buettner, 1979), cosa que n'explicaria la sensibilitat al TNF- α . A més, recentment s'ha descrit un receptor del TNF- α a la membrana mitocondrial (Ledgerwood *et al.*, 1998a i 1998b), fet que proporcionaria un mecanisme únic per als efectes de la citocina en aquest orgànu.

En l'apartat 4.6.6 s'explicarà amb més detall la transducció de senyal del TNF- α en situacions que impliquen apoptosi o bé supervivència cel·lular, especialment al múscul esquelètic.



3.5 EFECTES METABÒLICS I FISIOLÒGICS DEL TNF- α

3.5.1 EFECTES SOBRE LA TEMPERATURA CORPORAL

La febre és la primera resposta de l'hoste com a defensa a una situació anòmla. Des de fa molts anys, se sap que l'endotoxina bacteriana produeix febre, ja que indueix els monòcits a sintetitzar i alliberar un mitjancer proteic, primer anomenat pirogen endogen i actualment conegut com IL-1. L'acció de la IL-1 sobre la temperatura corporal té lloc en l'àrea preòptica de l'hipotàlem anterior, on estimula la síntesi de prostaglandina E₂ (PGE₂). Dinarello *et al.* (1986) van descriure que tant el TNF- α com la IL-1 i l'IFN- α poden provocar febre i estimular directament la síntesi hipotalàmica de PGE₂. El paper del TNF- α en la febre, però, és incert, ja que aquest pot activar l'alliberament d'IL-1, la qual pot mediar realment la resposta febril.

L'administració intracerebroventricular de TNF- α en rates no sols produeix febre, sinó també un augment del consum d'oxigen i un increment de l'activitat del teixit adipós marró (Rothwell, 1988). Aquest teixit podria ser el responsable de part de l'increment de la temperatura, com a resultat de la seva activació simpàtica. Se sap, a més, que el TNF- α incrementa l'activitat d'aquest teixit (Coombes *et al.*, 1987). En un altre estudi, la infusió de TNF- α a pacients amb càncer reproduïa els efectes causats per

l'endotoxina, entre els quals hi havia la febre (Michie *et al.*, 1988). Tot i això, Mathison *et al.* (1988) trobaren que el pretractament de conills amb anticossos policlonals contra el TNF- α els protegia contra la hipotensió i la letalitat induïda pel LPS, però la febre no sols no s'atenuava sinó que augmentava considerablement. Long *et al.* (1990) van dur a terme un estudi similar utilitzant rates injectades amb antisèrum per neutralitzar el TNF- α ; la posterior injecció d'LPS causava una febre significativament augmentada als animals pretractats amb anti-TNF- α en lloc de disminuir-la.

Per tot això, s'ha suggerit que el TNF- α té realment una activitat antipirètica i limitant de la magnitud de la febre; la neutralització de l'activitat biològica del TNF- α causaria, per tant, una resposta febril exagerada.

3.5.2 EFECTES SOBRE LA INGESTIÓ I EL BUIDAT GÀSTRIC

El TNF- α s'ha proposat com el responsable, en part, de l'alteració dels patrons d'ingestió i del desgast tissular. En aquest sentit, l'administració de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pes corporal de TNF- α recombinant humà a ratolins C3H/HeJ (resistents a l'endotoxina) produeix una reducció transitòria de la ingestió del 10-15% (Moldawer i Copeland, 1988). Ara bé, certs estudis han trobat que la caquectina no produeix anorèxia ni pèrdua de pes quan s'administra a animals sans (Old, 1985), mentre que la IL-1 s'ha revelat com un potent inductor d'anorèxia (McCarthy *et al.*, 1985). En molts casos el fracàs en la reproducció de la resposta anorèctica es podria deure a les dosis baixes administrades als animals experimentals. A més, en altres treballs amb rates tractades dues vegades al dia amb dosis altes de la citocina (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pes corporal) s'observaren reduccions en la ingestió del 40% (Tracey *et al.*, 1988). En rates tractades crònicament amb TNF- α , la citocina indueix una forta reducció de la ingestió durant el temps d'infusió, i en desapareix l'efecte quan es desenvolupa una tolerància als efectes anorèctics del TNF- α . Per tant, el TNF- α no pot ser el principal mitjancer de l'anorèxia tumoral (Bernstein *et al.*, 1991). De fet, en un estudi sobre l'anorèxia nerviosa s'ha vist que els malalts tenen incrementada la producció de TNF- α , tot i que no sembla tenir el paper principal, sinó que és induït per la ingestió escassa i inconsistent (Vaisman i Hahn, 1991).

Durant estats d'estrès es produeix anorèxia, que pot mimetitzar-se amb l'administració aguda o crònica de TNF- α o IL-1. Una possible explicació d'aquest fenomen pot ser que les citocines inhibeixin el buidat gàstric; de fet, així s'ha demostrat

en rates (Patton *et al.*, 1987). També s'ha observat que el TNF- α i la IL-1, en tractaments aguts a la rata, redueixen la taxa d'absorció de lípids ingerits (Evans i Williamson, 1988). Els estudis amb aminoàcids no són tant concloents, però sí que s'ha observat una reducció de l'absorció d'un anàleg no metabolitzable de l'alanina, l' α -aminoisobutirat (AIB), per acció de la IL-1 (Argilés *et al.*, 1989b). S'ha descrit que aproximadament el 10% del TNF- α administrat es localitza al tracte gastrointestinal (Beutler *et al.*, 1985b), i s'ha observat necrosi a l'intestí com a conseqüència de la injecció de caquectina (Tracey *et al.*, 1986a), que podrien estar mediades pel PAF (*platelet activating factor*) (Sun i Hsueh, 1988). A més, l'administració aguda de TNF- α dona lloc a una ràpida disminució de l'absorció intestinal de glucosa, deguda no a canvis en el metabolisme intestinal, sinó a una reducció de la taxa de buidat gàstric (Arbós *et al.*, 1992).

3.5.3 EFECTES SOBRE EL METABOLISME GLUCÍDIC

Diferents autors han descrit que, a curt termini, l'administració de TNF- α produeix alteracions similars a les que s'observen en pacients amb malalties cròniques (Lang *et al.*, 1992). Tant en la infecció sistèmica com en la caquèxia cancerosa es produeix un augment de la producció hepàtica de glucosaper augment de la glucogenolisi i de la gluconeogènesi. Substrats com el lactat i aminoàcids com l'alanina i la glutamina, alliberats pels teixits perifèrics, són reutilitzats en el fetge per a la producció de glucosa. El TNF- α sembla ser que està implicat en aquest complex procés, encara que no hi ha evidències de que actui en l'àmbit cel·lular.

L'administració de dosis baixes o moderades de TNF- α incrementa la utilització de glucosa en teixits rics en macròfags com ara la melsa, el fetge, el pulmó, l'intestí i la pell (Spitzer *et al.*, 1989). El tractament amb TNF- α no té cap efecte sobre la taxa d'utilització de glucosa en diferents músculs *in vivo* (Spitzer *et al.*, 1989). En canvi, segons Evans *et al.* (1989), la infusió de dosis subletals de TNF- α produeix una lleugera hipoglucèmia associada a un augment dels nivells circulants de cortisol, glucagó i epinefrina, i un augment de la producció de glucosa. Això s'associa a un augment de la utilització muscular de glucosa, procés que sembla ser independent de la concentració d'insulina, i degut en part a un efecte insulinoide del TNF- α sobre el múscul esquelètic.

L'administració de dosis elevades (600 µg/kg de pes corporal) de TNF-α recombinant humà en rates provoca una hiperglucèmia i hiperlactèmia (Tracey *et al.*, 1986a), ambdós símptomes característics de trauma i de sèpsia. Aquests canvis es poden deure, en part, a la hipotensió. Amb infusió a dosis baixes de TNF-α i IL-1 (1,5 µg/h.kg) en conills, només es va veure l'efecte si s'administraven conjuntament les dues citocines (Tredget *et al.*, 1988), fet que demostra que hi ha un sinergisme entre ambdues molècules. A més, la taxa d'aparició de glucosa a la circulació augmenta un 33% i la de reciclatge un 600% (Tredget *et al.*, 1988), cosa que indica un augment de la glucòlisi tissular perifèrica. L'efecte de la infusió de TNF-α en la utilització de glucosa pels diferents teixits és similar al que s'observa amb l'endotoxina i la sèpsia (Mészáros *et al.*, 1988).

L'administració aguda de TNF-α indueix un augment de l'oxidació de la glucosa *in vivo* sense provocar canvis en les activitats de diferents enzims de la via glucolítica a excepció de la fosfofructocinasa (PFK) de múscul esquelètic, la qual mostra un augment significatiu (López-Soriano *et al.*, 1993). A més, Hill i McCallum (1992) van observar una disminució tant de la transcripció de la PEPCK hepàtica (enzim limitant de la gluconeogènesi) com de la seva activitat com a resultat del tractament amb TNF-α de ratolins alimentats. Per tant, dosis elevades de TNF-α poden induir hipoglucèmia mitjançant la disminució de l'absorció intestinal de glucosa i de la gluconeogènesi, i l'augment de la utilització perifèrica de glucosa per diferents teixits.

Els efectes observats *in vitro* del TNF-α sobre el metabolisme de la glucosa han estat variables. S'ha vist que el TNF-α estimula la captació de glucosa, la formació de lactat i la degradació de glicogen en miotúbuls de la línia cel·lular L6. Aquests efectes són dependents de la síntesi de nous transportadors de glucosa (GLUT1) i de llur inserció en la membrana plasmàtica (Lee *et al.*, 1987; Zentella *et al.*, 1993). Altres estudis amb cultius de miòcits primaris (Ciaraldi *et al.*, 1998) revelen que el TNF-α provoca una estimulació de la captació basal de la glucosa i una inhibició de la síntesi del glicogen. En altres estudis fets amb la línia L6, el tractament amb la citocina o bé no produeix canvis (Ranganathan i Davidson, 1996), o bé inhibeix el transport de la glucosa, tant basal com l'estimulat per la insulina (Begum *et al.*, 1996a i 1996b). En cèl·lules sinovials reumatoides en cultiu s'ha vist que el TNF-α augmenta la glucòlisi i el seu efector positiu, la fructosa 2,6-bisfosfat, encara que es requereixen concentracions molt elevades de la citocina (Taylor *et al.*, 1988). Malgrat això, el TNF-α no va

estimular la utilització *in vitro* de glucosa al múscul epitroclear, en cèl·lules aïllades de melsa o en macròfags alveolars (Mészáros *et al.*, 1987), ni la seva conversió a lactat en hemidiafragmes (Rofe *et al.*, 1987). Atès que els estudis *in vitro* no mimetitzen plenament els efectes trobats *in vivo*, podria ser que l'augment de la utilització de la glucosa *in vivo* no estigui mediat directament pel TNF- α , sinó que d'altres citocines o hormones (epinefrina, glucagó, cortisol, o prostaglandines) induïdes per ell hi podrien estar implicades (Grunfeld *et al.*, 1991a; Memon *et al.*, 1994). A partir d'estudis *in vitro* en miòcits en cultiu, s'ha suggerit que el TNF- α activaria un cicle fútil de substrats entre la fosfofructocinasa (PFK) i la fructosa bisfosfatasa (FBP), que produiria una hidròlisi neta d'ATP. Conseqüentment, s'activaria la glucòlisi per compensar la pèrdua d'energia, en què es gastaria glicogen i glucosa i es produiria lactat. El resultat net seria la dissipació d'energia en forma de calor i la utilització d'ATP i glucosa. És possible, doncs, que l'activació en general de cicles fútils, i en particular del cicle PFK/FBP, pugui contribuir a augmentar la despesa energètica induïda pel TNF- α (Zentella *et al.*, 1993).

Els estudis *in vivo* i amb cultius cel·lulars semblen indicar que el TNF- α és capaç d'estimular el transport basal de glucosa, inhibir la síntesi de glicogen i facilitar la formació de lactat a partir de glucosa (revisat per Argilés i López-Soriano, 1999).

Segons Bagby *et al.* (1992), la resposta metabòlica de la glucosa al TNF- α està associada a una concentració plasmàtica elevada de glucagó, epinefrina, glucocorticoides i ACTH. Aquests autors suggereixen que el sistema adrenèrgic té un paper important en l'augment de la producció hepàtica de la glucosa i de la captació de glucosa induïda pel TNF- α . D'altra banda, malgrat la concentració plasmàtica elevada de glucosa, els nivells d'insulina no estan alterats, i s'ha vist que la infusió prolongada de TNF- α produeix un estat de resistència a la insulina (Lang *et al.*, 1992). En individus sans, el TNF- α produeix resistència a l'hormona quan s'indueix hiperglicèmia sense fer baixar els nivells d'insulina. S'han trobat també nivells d'expressió elevats en pacients amb diabetis de tipus II (Hotamisligil *et al.*, 1995; Saghizadeh *et al.*, 1996), i en quatre models animals d'obesitat que presenten resistència a la insulina (rata Zucker *fa/fa*, ratolins *ob/ob*, *tub/tub* i *db/db*) s'ha observat la inducció de l'mRNA de la citocina al TAB i nivells elevats de TNF- α tant de manera local com sistèmica (Hotamisligil *et al.*, 1993). També en cèl·lules en cultiu (adipòcits) s'ha demostrat aquesta resistència a la insulina deguda al TNF- α (Stephens i Pekala, 1991; Spiegelman i Hotamisligil, 1993).

3.5.4 EFECTES SOBRE EL METABOLISME LIPÍDIC

La infecció, el trauma i els processos inflamatoris, així com la caquèxia cancerosa, es caracteritzen per induir importants canvis en el metabolisme lipídic de l'hoste. Aquestes alteracions han estat atribuïdes a l'acció de les citocines, essent el TNF- α la citocina que desenvolupa el paper primordial en aquesta resposta. Durant la caquèxia hi ha una important pèrdua de teixit adipós blanc, bàsicament a causa d'una davallada en l'activitat de l'enzim LPL (lipoproteïna lipasa) i a un augment de l'activitat de la lipasa sensible a hormona (l'enzim limitant de la via lipolítica). L'enzim LPL és el responsable de la hidròlisi dels triacilglicerols circulants (quilomicrons, VLDL) i de dirigir la captació dels àcids grassos de cadena llarga resultants dins dels teixits (principalment adipós o múscul) per a l'emmagatzematge o l'oxidació. També s'observa en la caquèxia una disminució del transport de glucosa i de la lipogènesi *de novo* en el teixit adipós blanc, i a uns elevats nivells de lípids circulants, tant de triacilglicerols com colesterol.

Hi ha controvèrsia sobre la inhibició de l'activitat de l'LPL pel TNF- α *in vitro*. Mentre uns autors no en troben efectes en cultius primaris d'adipòcits humans (Kern, 1988a), d'altres troben una disminució de l'activitat de l'LPL en cultius de preadipòcits 3T3-L1 (Price *et al.*, 1986; Kawakami *et al.*, 1987), associada a una disminució del seu mRNA (Cornelius *et al.*, 1988). Tanmateix, estudis *in vivo* han demostrat que una única dosi de TNF- α és suficient per disminuir l'activitat de l'LPL al teixit adipós de rata (Semb *et al.*, 1987; Evans i Williamson, 1988), ratolí i conillets d'índies (Semb *et al.*, 1987). No es van veure canvis significatius en l'LPL de cor d'animals tractats amb TNF- α , mentre que en rates lactants aquest disminuïa l'activitat de l'LPL de la glàndula mamària i l'acumulació de lípids exògens per aquest teixit.

Hi ha resultats contradictoris d'un mateix grup sobre si el TNF- α pot incrementar els triacilglicerols plasmàtics en l'home (Warren *et al.*, 1987b; Starnes *et al.*, 1988); els nivells poden dependre de l'hora de la presa de sang, de l'estat nutritiu, i de la dosi de TNF- α . L'increment de triacilglicerols en plasma de rates injectades amb TNF- α (Feingold i Grunfeld, 1987; Evans i Williamson, 1988) es pot deure, en part, a l'estimulació de la lipòlisi del teixit adipós amb el subsegüent augment de la secreció de VLDL del fetge.

Un altre factor que pot contribuir a la hipertrigliceridèmia és l'augment de la síntesi hepàtica d'àcids grassos, observat en rates dejunades tractades amb TNF- α (Feingold i Grunfeld, 1987) i que es relaciona amb alts nivells tissulars de citrat (activador al·lostèric de l'enzim acetil-CoA-carboxilasa) (Grunfeld *et al.*, 1991a). Aquest increment de la taxa de síntesi d'àcids grassos, però, només pot explicar el 10% de l'increment total de triacilglicerols al plasma de rates tractades amb TNF- α .

En resum, sembla ser probable que el TNF- α , juntament amb les alteracions metabòliques, estigui implicat en decantar el balanç metabòlic de l'adipòcit cap a la vessant catabòlica. De fet, experiments que s'han dut a terme en el nostre grup utilitzant una anticòs policlonal anti- TNF- α , van demostrar la implicació d'aquesta citocina en les alteracions metabòliques observades en rossegadors portadors de tumor (Carbó *et al.*, 1994).

3.5.5 EFECTES SOBRE EL METABOLISME PROTEIC

La mobilització accelerada de proteïnes musculars i l'augment de la síntesi proteica hepàtica són canvis metabòlics característics de diferents situacions com ara la sèpsia i el creixement tumoral (Fischer i Hasselgren, 1991). Aquests canvis semblen estar relacionats entre ells i poden representar una resposta integrada de l'hoste enfront d'un estímul invasor. L'augment de la proteòlisi muscular porta a una major alliberació d'aminoàcids, una gran part dels quals és captada pel fetge per a la síntesi hepàtica de proteïnes de fase aguda i per a la gluconeogènesi. Si aquesta proteòlisi es manté durant un temps perllongat, pot induir un desgast muscular greu.

Diferents autors han descrit que les citocines tenen un efecte pronunciat sobre el metabolisme proteic, i s'ha demostrat que el TNF- α i la IL-1 poden regular la proteòlisi muscular durant la sèpsia. D'altra banda, altres estudis han estat incapaços de demostrar un augment del recanvi proteic muscular després del tractament amb aquestes citocines (Fischer i Hasselgren, 1991). Sembla que els efectes de les citocines depenen força de les dosis utilitzades.

Hi ha evidències que l'administració de TNF- α augmenta la proteòlisi dels teixits perifèrics. De fet, el tractament crònic amb TNF- α dona lloc a una disminució de la proteïna corporal si es compara amb els animals controls *pair-fed* (Tracey *et al.*, 1988). En humans amb càncer disseminat no caquètic, hi ha una alliberació

d'aminoàcids de la musculatura després de la infusió aguda de TNF- α (Warren *et al.*, 1987b; Starnes *et al.*, 1988). *In vitro*, però, el TNF- α no sembla tenir els efectes observats *in vivo* sobre la síntesi o el catabolisme proteic, fet que indica que no és un efecte directe (Moldawer *et al.*, 1987b; Goldberg *et al.*, 1988). Malgrat aquests resultats, en el nostre grup d'investigació hem observat que en músculs incubats, el TNF- α té un efecte directe sobre la proteòlisi muscular, ja que inhibeix l'expressió dels gens del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina (Llovera *et al.*, 1997).

També s'ha descrit que el TNF- α activa la síntesi i l'alliberament de les proteïnes hepàtiques de la fase aguda, fet característic de la infecció, el trauma i la malignitat (Darlington *et al.*, 1986; Perlmutter *et al.*, 1986); mentre que la secreció d'albumina i transferrina està disminuïda (Perlmutter *et al.*, 1986; Moldawer i Copeland, 1988). De tota manera, sembla que en l'home adult el principal regulador de la síntesi de les proteïnes de la fase aguda és la IL-6 (Castell *et al.*, 1989).

La síntesi proteica hepàtica incrementada en situacions d'estrès està associada a un augment de la captació d'aminoàcids, particularment alanina i d'altres transportats pel sistema A. En aquest sentit, l'administració de TNF- α *in vivo* augmenta la captació hepàtica d'AIB (Warren *et al.*, 1987a i 1988; Argilés *et al.*, 1989b), i alhora disminueix la concentració plasmàtica de molts aminoàcids potencialment gluconeogènics, probablement com a conseqüència de la seva captació hepàtica. En canvi, el TNF- α disminueix la captació d'AIB pel múscul esquelètic i el cor de rata (Starnes *et al.*, 1987; Argilés *et al.*, 1989b), efecte probablement mediat per canvis del potencial de membrana al múscul esquelètic (Tracey *et al.*, 1986b). D'altra banda, l'adrenalectomia anul·la els efectes del TNF- α sobre la captació d'AIB pel múscul, cosa que suggereix l'acció d'alguna hormona segregada per les glàndules adrenals en aquest procés (Starnes *et al.*, 1987).

En experiments *in vitro* no s'han observat efectes directes ni del TNF- α ni de la IL-1 sobre hepatòcits, cosa que referma la hipòtesi que els efectes observats *in vivo* són indirectes i deguts a altres mediadors. Sembla que el glucagó i els glucocorticoides poden tenir un paper important, atès que l'administració de TNF- α o IL-1 provoca un augment de les concentracions plasmàtiques d'aquestes hormones a la rata (Warren *et al.*, 1987a i 1988) i de cortisol a l'home (Warren *et al.*, 1987b). Aquestes hormones, en particular el glucagó, poden estimular la captació hepàtica d'aminoàcids, però encara no és del tot clar quin és el mediador del TNF- α .

Hi ha moltes evidències que indiquen que el TNF- α participa en el desgast proteic i en la pèrdua de nitrogen associats a situacions catabòliques. El tractament crònic de rates amb TNF- α recombinant produeix als animals tractats una depleció de proteïna quan es compara amb controls *pair-fed* (Fong *et al.*, 1989). De fet, el tractament crònic amb TNF- α o IL-1 dóna com a resultat una redistribució de la proteïna corporal i una considerable disminució del contingut proteic muscular, associat a una disminució coordinada dels nivells d'mRNA de proteïnes miofibril·lars (Fong *et al.*, 1989). Els estudis relacionats amb l'administració de TNF- α recombinant *in vivo* han demostrat un increment del flux de sortida del múscul esquelètic de pacients amb càncer disseminat que no presentaven pèrdua de pes (Warren *et al.*, 1987b). Altres autors, mitjançant una infusió de ^{14}C -leucina a rates, van demostrar que l'administració crònica de TNF- α augmentava notablement la proteòlisi muscular (Flores *et al.*, 1989). Goodman (1991) va mesurar l'alliberació de tirosina i 3-metilhistidina en músculs incubats de rates tractades agudament amb la citocina, i va concloure que el TNF- α estava implicat en l'activació de la proteòlisi muscular. Els mecanismes responsables d'aquestes accions estan cada cop més ben descrits. El nostre grup d'investigació va demostrar que el tractament amb TNF- α augmenta la degradació proteica mesurada *in vivo* al múscul esquelètic (Llovera *et al.*, 1993a i 1993b), i que almenys durant el creixement tumoral, el desgast muscular està associat a l'activació del sistema proteolític no lisosomal dependent d'ATP i ubiquitina (Llovera *et al.*, 1994 i 1995), activació mediada probablement pel TNF- α (García-Martínez *et al.*, 1993a i b, i 1994a). S'ha descrit la presència d'ambdós receptors (TNFR1 i TNFR2) al múscul esquelètic (Tartaglia i Goeddel, 1992), i el nostre grup ha suggerit que l'acció de la citocina en la inducció de la proteòlisi mediada per la ubiquitina pot ser directa (Llovera *et al.*, 1997). Sembla, doncs, que el TNF- α , sol o juntament amb altres citocines, podria mediar els canvis del metabolisme nitrogenat muscular associats a estats caquètics.

Els efectes del TNF- α sobre el recanvi protèic han estat estudiats també utilitzant sistemes de cultius musculars. Frost *et al.* (1997) van descriure que la presència transitòria de TNF- α en el medi de cultiu inhibia l'activació de la síntesi protèica estimulada pel factor de creixement IGF-I (*insulin-like I*) de forma proporcional a la dosi. Malgrat tot, el tractament dels mioblasts amb TNF- α no va tenir cap efecte ni sobre la unió de l'IGF-I al seu receptor ni sobre la seva capacitat d'estimular la incorporació de timidina. Els autors van concloure que les accions de

l'IGF-I sobre la síntesi proteica podrien estar dificultades durant els estats catabòlics, en els quals el TNF- α està sobreexpressat. Relacionat amb aquest estudi, es va observar que l'administració de TNF- α exògen a animals d'experimentació també reduïa el contingut d'IGF-I muscular (Fan et al., 1995)

Altres autors, utilitzant cèl·lules diferenciades de la línia muscular C2C12, van descriure una activació de la proteolisi deguda al tractament amb TNF- α ; proteolisi que anava acompanyada d'una activació del sistema dependent d'ubiquitina i que semblaria ser mediada per NF- κ B (Li et al., 1998b). Contràriament, utilitzant el mateix model, altres autors van descriure que el TNF- α produïa un augment de la via mitja de les proteïnes de vida llarga mitjançant la disminució de la taxa de degradació proteica (Ebisui et al., 1995). En un altre estudi en el que es va realitzar la perfusió de TNF- α en extremitats aïllades de pacients amb dos tipus de tumor, no es va observar cap canvi en el metabolisme glucídic o proteolític muscular, suggerint que la citocina no té un efecte directe en el metabolisme del múscul humà (De Blaaw et al., 1997).

3.5.6 EFECTES SOBRE LA MIOGÈNESI

Miller et al., (1988) varen observar que el TNF- α afegit a cultius de cèl·lules musculars impedia, en cèl·lules no diferenciades (mioblasts), l'expressió de gens musculars (α -actina i cadena pesada de la miosina) així com la fusió que caracteritza els estadis finals de la diferenciació. Els autors varen suggerir que ja que el TNF- α estava implicat en la resposta a l'estrés de les cèl·lules mamàries i la patogènesi del *shock* sèptic i la caquèxia, la diana de l'acció del TNF- α en el múscul esquelètic podria ser la població de cèl·lules satèl·lit, que són les que tenen la capacitat de proliferar en condicions de dany muscular. En aquestes condicions, el TNF- α podria funcionar inhibint la diferenciació de les cèl·lules satèl·lit i “malformant” així els miotúbuls (cèl·lules diferenciades) totalment diferenciats. De forma similar, un altre estudi utilitzant mioblasts murins C2 va demostrar que encara que el TNF- α tenia efectes positius en les etapes primàries de la diferenciació, a l'augmentar la proliferació i l'agregació, inhibia fortament l'expressió dels factors de transcripció miogènics (myoD, miogenina) responsables de l'augment de l'activitat de gens específics de múscul (com els gens de proteïnes miofibrilars), i bloquejava la síntesi de mRNAs de marcadors de la

diferenciació miogènica com l' α -actina i les cadenes lleugera i pesada de la miosina (Szalay et al., 1997).

3.6 TNF- α i SITUACIONS PATOLÒGIQUES

S'ha descrit la presència de TNF- α al sèrum de pacients afectats per una gran varietat de malalties com ara la SIDA, la malària, l'esclerosi múltiple, infeccions parasitàries, malalties renals, artritis reumatoide, la sèpsia i el càncer. En aquesta tesi només farem esment de quatre situacions patològiques on el TNF- α té una acció important: resistència a la insulina, sèpsia, càncer i la malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC).

3.6.1 RESISTÈNCIA A LA INSULINA

La resistència a la insulina és un estat metabòlic en el qual té lloc una supressió de la taxa d'utilització de glucosa perifèrica i un augment relatiu de la taxa de producció de glucosa hepàtica. S'han observat casos de resistència a la insulina en diferents situacions patològiques, com són obesitat, caquèxia, hipertensió, càncer i infecció. S'ha suggerit que el TNF- α podria tenir un paper important en el desenvolupament de la resistència a la insulina i, de fet, hi ha certes evidències que ho demostren: *a*) la infusió crònica de TNF- α disminueix l'acció de la insulina en la captació perifèrica de glucosa i en la producció de glucosa hepàtica (Lang *et al.*, 1992); *b*) el TNF- α pot induir la *down-regulation* del nombre de transportadors de glucosa GLUT4, especialment al teixit adipós i al múscul esquelètic (Stephens i Pekala, 1991); *c*) el TNF- α se sobreexpressa als adipòcits dels animals obesos resistent a la insulina (Hotamisligil *et al.*, 1993), i *d*) en moltes d'aquestes situacions, la concentració de TNF- α és elevada. L'administració de TNF- α en humans indueix un estat hiperglucèmic sense disminuir els nivells d'insulina, el qual confirma la inducció d'un estat de resistència a la insulina (Hofmann *et al.*, 1994). Les accions pleotròpiques del TNF- α poden contribuir a la resistència a la insulina a través de diferents mecanismes moleculars: mitjançant la disminució de l'expressió dels mRNA del transportador de glucosa sensible a la insulina (GLUT4) (Hotamisligil *et al.*, 1993) i mitjançant la mobilització d'àcids grassos (McGarry, 1992); en aquest sentit, s'ha descrit que el TNF- α estimula la lipòlisi i l'alliberament d'àcids

grassos dels adipòcits (Grunfeld *et al.*, 1991a). També és possible que el TNF- α interfereixi directament en la via de senyalització de la insulina (Spiegelman i Hotamisligil, 1993).

S'ha descrit una correlació positiva entre l'estat de resistència a la insulina i els nivells elevats dels mRNA del TNF- α i dels seus receptors, els quals poden disminuir significativament després del tractament amb un agent antidiabètic. També s'ha vist que en un model d'obesitat associat a un estat de diabetis resistent a la insulina té lloc una sobreexpressió del TNF- α i dels seus receptors al teixit adipós i al múscul; això podria donar lloc a una producció elevada de TNF- α al teixit adipós, on produiria directament els seus efectes i, a més, el TNF- α circularia sistèmicament fins al múscul, on induiria l'estat de resistència a la insulina (Hofmann *et al.*, 1994).

D'altra banda, s'ha descrit que el bloqueig dels receptors β -adrenèrgics atenua l'estat de resistència a la insulina induït pel TNF- α . Per tant, sembla que l'estimulació dels receptors β -adrenèrgics pot ser un dels factors implicats en el desenvolupament de la resistència a la insulina induïda pel TNF- α (Lang, 1993).

El TNF- α s'ha associat amb el desenvolupament de l'obesitat, malaltia que presenta en la simptomatologia una resistència a la insulina (Bullo-Bonet *et al.*, 1999).

3.6.2 SÈPSIA

El TNF- α és una de les principals citocines produïdes durant la infecció i situacions d'estrès, i es pensa que és el principal mediador en la patogènia de la infecció, les lesions tissulars i la inflamació. La secreció d'aquesta citocina pot induir efectes biològics molt diversos, que poden finalment beneficiar o danyar l'hoste. Quan el TNF- α es produeix localment als teixits durant infeccions localitzades, els seus efectes beneficiosos predominen; en aquestes situacions, el TNF- α pot actuar com a factor de creixement i factor angiogènic, i pot activar les funcions dels macròfags i cèl·lules endotelials que contribueixen a la defensa de l'hoste i a la regeneració dels teixits lesionats. En canvi, l'alliberament sistèmic de grans quantitats de TNF- α durant situacions d'infecció té efectes negatius, com el desenvolupament de la sèpsia i la necrosi hemorràgica tissular.

La sèpsia es pot definir com un estat associat a una perfusió tissular inadequada acompanyada d'una pressió sanguínia baixa, que causa un ampli ventall de lesions

tissulars i disfunció d'òrgans, i que pot acabar provocant la mort. La sèpsia és una síndrome que generalment s'associa a infeccions invasives i presenta una taxa de mortalitat elevada (entre el 20 i el 90% en humans, en funció de l'edat i d'altres factors clínics associats al pacient) (Tracey, 1992). Se suggereix que el TNF- α i la cascada secundària de citocines determinen, en gran part, el curs i la letalitat de la sèpsia (Tracey i Cerami, 1993). Les concentracions del TNF- α , la IL-6 i la IL-1 estan freqüentment elevades al sèrum de pacients humans amb sèpsia, i aquestes concentracions es correlacionen amb la gravetat i l'estat de la malaltia (Edwards i Moldaver, 1998). Els ratolins deficientes en IL-6 no estan afectats per l'anorèxia, la febre o la caquèxia associada quan se'ls indueix una inflamació localitzada, però sí que ho estan quan són infectats pel virus de la grip, fet que suggereix que la IL-6 està més implicada en el desenvolupament de l'estat patològic durant una inflamació local que durant la infecció (Kozack *et al.*, 1997). També s'ha descrit que els ratolins *knockout* pels receptors TNFR1 del TNF- α i pel receptor 1 de la IL-1 són resistents a l'administració d'endotoxina (0% de mortalitat enfront del 100% en els controls) (Fisher *et al.*, 1996).

Hi ha diverses evidències que situen el TNF- α en un paper central en el desenvolupament de la síndrome de la sèpsia: *a)* el TNF- α es detecta en la circulació d'animals i humans durant la sèpsia experimental i clínica, i els seus nivells es relacionen amb el desenllaç clínic final; *b)* la inhibició del TNF- α amb anticossos anti-TNF- α en models de sèpsia protegeix del desenvolupament de la malaltia i de la mortalitat associada a aquest estat (Wherry *et al.*, 1993), i *c)* l'administració de TNF- α a diferents espècies de mamífers produeix un estat de xoc i lesions tissulars similars a les de la síndrome de la sèpsia (Tracey, 1992). Zamir *et al.* (1992) van comprovar la implicació de la citocina quan van incubar múscul esquelètic d'animals sèptics tractats amb anti-TNF- α , i van observar com es revertia la degradació incrementada de proteïnes miofibril·lars.

L'administració de TNF- α a rates i gossos (en absència de bacterièmia) ocasiona en pocs minuts un increment de la freqüència respiratòria i acidosi severa, caiguda de la pressió sanguínia, augment de la freqüència cardíaca i, finalment, mort sobtada. S'ha observat isquèmia i necrosi hemorràgica en diferents teixits i òrgans, bàsicament als pulmons i al tracte gastrointestinal, com també necrosi tubular als ronyons (Tracey *et al.*, 1986a).

L'efecte protector dels anticossos anti-TNF- α es deu, probablement, a l'atenuació de la citotoxicitat del TNF- α , a la inhibició de l'alliberament de factors secundaris tòxics induïts pel TNF- α , i a la prevenció de la secreció d'altres citocines que actuen sinèrgicament incrementant la toxicitat del TNF- α .

De fet, alguns dels efectes del TNF- α en la sèpsia poden atribuir-se a diferents mediadors secundaris. A més de diferents hormones (adrenalina, noradrenalina, glucagó i cortisol) poden anomenar-se diferents citocines, especialment la IL-1. Se sap que aquesta incrementa sinèrgicament la toxicitat del TNF- α (Waage i Spevik, 1988) i que dosis subletals d'ambdues citocines administrades conjuntament causen una mortalitat elevada. També el LPS i l'INF- γ actuen de manera sinèrgica amb el TNF- α (Rothstein i Schreiber, 1987; Stolpen *et al.*, 1986). Presumiblement aquests mediadors permeten amplificar el rang d'acció de la resposta immunitària, però un excés en la producció acaba en detriment de l'hoste, ja que incrementa la severitat de la sèpsia i les lesions tissulars mediades pel TNF- α (Tracey, 1992).

3.6.3 CÀNCER

El TNF- α mimetitza moltes de les alteracions metabòliques que s'observen durant la caquèxia cancerosa (vegeu l'apartat 1.2) i que es representen esquemàticament en la figura 1.

Tot i que el TNF- α fou descrit originàriament com un factor capaç de causar necrosi hemorràgica en tumors, el paper d'aquesta citocina en diferents models tumorals és extraordinàriament complex i, en ocasions, contradictori. Malgrat que s'han trobat nivells plasmàtics elevats de TNF- α i altres citocines en situacions de sèpsia i trauma, no succeeix el mateix en el cas del creixement tumoral, on les evidències a favor d'una correlació positiva entre els nivells plasmàtics de TNF- α i el desenvolupament del càncer són discutibles (Männel *et al.*, 1992). El fet que el TNF- α actuï localment, d'una manera paracrina, podria explicar parcialment la manca d'unanimitat en aquests resultats. Balkwill i Burke (1989) han descrit que el 50% dels pacients neoplàstics estudiats presenten nivells elevats de TNF- α ; en canvi, altres autors no han trobat aquest augment (Selby *et al.*, 1988). Igualment, en models animals s'han trobat resultats dispersos segons el model tumoral estudiat.

L'activitat antitumoral del TNF- α descrita per Coley i altres autors posteriors fou redescrita en un model de sarcoma (Carswell *et al.*, 1975). Altres estudis més recents amb el mateix model han demostrat que l'acció antitumoral del TNF- α era dependent de la dosi, i també variable en funció de la via i periodicitat de la seva administració (Haranaka *et al.*, 1984; Sohmura *et al.*, 1986; Creasey *et al.*, 1986). Tanmateix, l'activitat antitumoral observada *in vivo* no es reproduïx en experiments *in vitro*, cosa que suggereix la participació d'altres factors en el desenvolupament de l'activitat antitumoral (Palladino *et al.*, 1987). La participació d'altres citocines i, sobretot, l'alteració profunda en la vasculatura pròxima al tumor i l'activació de cèl·lules immunitàries (macròfags, cèl·lules T i cèl·lules NK) semblen responsables d'aquest fet (Malik, 1992).

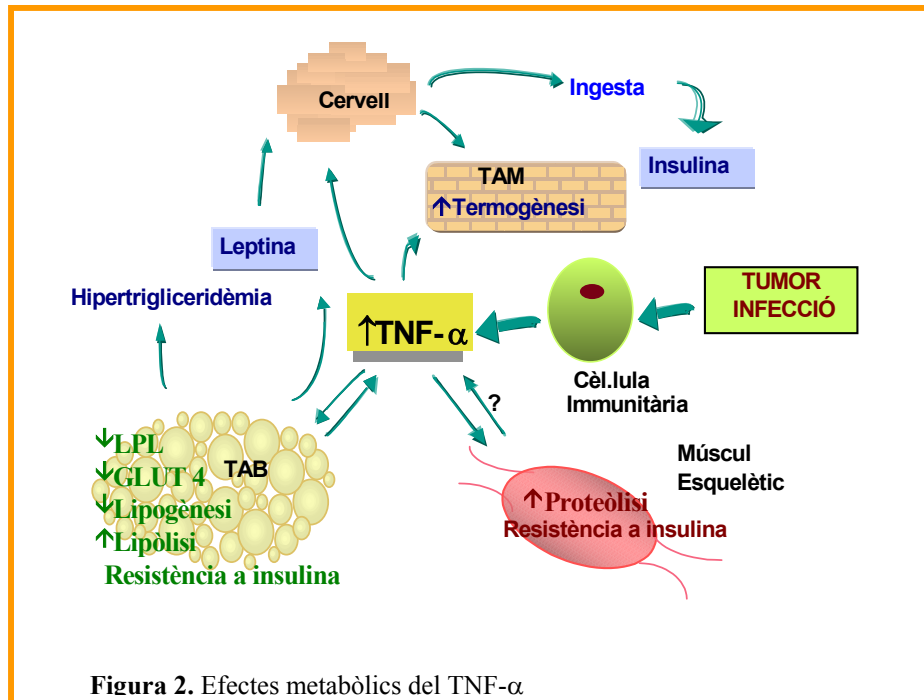
Els efectes antiproliferatius *in vitro* del TNF- α sobre cèl·lules tumorals poden ser notablement augmentats per algunes citocines, essencialment la IL-2 i l'IFN- γ (Sugarman *et al.*, 1985; Fransen *et al.*, 1986; Ruggiero i Baglioni, 1987). Igualment, el TNF- α pot potenciar mecanismes tumoricides activats *in vivo* per la IL-2 (Owen-Schaub *et al.*, 1988) o l'IFN- γ (Hori *et al.*, 1987). Diferents autors han estudiat la combinació de TNF- α i IL-2. Winkelhake *et al.* (1989) van descriure que l'administració conjunta d'ambdues citocines inhibia completament el creixement subcutani de cinc línies tumorals, tot i que cap de les dues citocines presentava aquesta activitat per separat. Diversos autors van obtenir resultats similars, si bé només amb tumors immunogènics (Nishimura *et al.*, 1987; Agah *et al.*, 1988).

Tanmateix, s'ha descrit la producció de TNF- α per cèl·lules tumorals en diferents línies cel·lulars (Männel *et al.*, 1992). En aquestes cèl·lules, el TNF- α sembla actuar com a factor de creixement, activant col·lagenases tumorals i la desadhesió d'aquestes cèl·lules, contribuint així al procés metastàtic (Malik, 1992). D'altra banda, però, el TNF- α pot inhibir la seva capacitat metastàtica a través de la seva activitat antitumoral *in vivo* en estimular les cèl·lules efectores de la defensa de l'hoste (macròfags, cèl·lules NK, cèl·lules T citotòxiques, etc.).

L'aplicació terapèutica del TNF- α com a agent neoplàstic no ha estat fins ara gaire esperançadora. El principal problema radica en la via d'administració, ja que fins i tot per via sistèmica se'n requereixen quantitats elevades, que són tòxiques per a l'hoste en afectar no sols les cèl·lules o l'endoteli tumoral sinó també els teixits sans (North i Havell, 1988). A causa d'això, s'han dissenyat diferents estratègies per evitar les

limitacions derivades de la toxicitat del TNF- α , com ara l'administració intraarterial local per a tumors molt localitzats (Ohkawa *et al.*, 1989), la identificació de tumors altament sensibles a l'efecte citotòxic del TNF- α i no a l'efecte promotor del creixement, l'administració de dosis no tòxiques de TNF- α en combinació amb altres citocines o agents químics, o bé el disseny d'altres mètodes que dissociïn els efectes tòxics sobre teixits de l'hoste de la citotoxicitat tumoral (Tracey i Cerami, 1993). Un objectiu ambiciós és la producció d'una forma mutant de TNF- α que mantingui l'acció citotòxica sobre les cèl·lules tumorals sense induir una toxicitat sistèmica perjudicial per a l'hoste (Van-Ostade *et al.*, 1993).

Altres citocines semblen estar també implicades en el desenvolupament de la caquèxia cancerosa. Strassman *et al.* (1993) van utilitzar el model d'adenocarcinoma, i van demostrar que el tractament amb anti-IL-6 murina era eficaç a l'hora de fer revertir els paràmetres més característics de la caquèxia en ratolins portadors del tumor. De fet, alguns estudis fets amb cultius cel·lulars (C2C12) incubats amb IL-6 revelaven un increment en la taxa de degradació proteica (Ebisui *et al.*, 1995). Malgrat això, altres estudis tant *in vivo* (Soda *et al.*, 1994) com amb músculs incubats *in vitro* (García-Martínez *et al.*, 1994b) no observen cap efecte catabòlic sobre la proteòlisi muscular per part de la IL-6. Un altre candidat interessant com a mediador de la caquèxia és l'IFN- γ . Aquesta citocina presenta sinergisme amb el TNF- α en moltes de les seves activitats biològiques, i és capaç de mimetitzar els efectes del TNF- α en el metabolisme lipídic (Argilés *et al.*, 1997a). Matthys *et al.* (1991b) van utilitzar l'anticòs monoclonal contra l'IFN- γ i van poder revertir la síndrome de desgast associat al creixement del carcinoma pulmonar de Lewis en ratolins. El mateix grup va demostrar que els ratolins *nude* inoculats amb cèl·lules CHO, les quals sintetitzaven constitutivament IFN- γ , desenvolupaven una caquèxia severa en molt poc temps (Matthys *et al.*, 1991b). Altres citocines com ara el LIF (Mori *et al.*, 1991), el TGF- β (Zugmaier *et al.*, 1991) o la IL-1 (Moldawer *et al.*, 1987a) també s'han proposat com a mediadores de la caquèxia. Concretament, a la IL-1, amb propietats anorexigèniques i pirogèniques, se li ha atribuït un paper secundari en la caquèxia, ja que l'administració d'IL-1ra a rates portadores de tumor no millorava el grau de caquèxia que presentaven els animals (Costelli *et al.*, 1995b).



3.6.4 MALALTIA PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÒNICA (MPOC)

D'acord amb la definició de la Societat Respiratòria Europea, la malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC) és una malaltia caracteritzada per una reducció del fluxe màxim d'expiració i lentitud del buidat forçat dels pulmons (Siafakas i Tzanakis, 1998). Aquesta limitació normalment és progressiva i està associada a una resposta inflamatòria pulmonar anormal a partícules o gasos nocius (Pauwels et al., 2001). La fisiopatologia d'aquesta malaltia està bastant definida, fet que no es reflecteix en els mecanismes cel·lulars tant heterogenis d'aquesta malaltia, si es compara amb la bronquitis o l'emfisema. La síndrome clínica de MPOC, que es manifesta clínicament per la disnea, tos, intolerància a l'exercici físic, abarca diferents condicions de la malaltia, variant des de la bronquitis obstructiva crònica (amb obstrucció de les vies aèries petites), fins a l'emfisema (caracteritzat per ampliació dels espais d'aire i la destrucció del parènquima pulmonar, pèrdua d'elasticitat pulmonar, i tancament de les vies aèries petites). El resultat d'aquesta diferenciació en subtipus de la malaltia encara està força inexplorat malgrat existir estratègies que permeten una bona caracterització de les conseqüències patològiques d'aquesta malaltia. La major part dels estudis estan centrats en trobar un diagnòstic adequat per MPOC *per se* mitjançant tests de funcionalitat pulmonar especialment en l'atenció primària. S'espera que l'any 2020 la

MPOC sigui la tercera causa de mort mundial (Viegi et al., 2001). El major factor de risc de les manifestacions clíniques i la progressió de la MPOC és el fum del tabac. Encara que aproximadament el 90% de tots els pacients amb MPOC són fumadors, per raons desconegudes només el 20% dels fumadors desenvolupen la malaltia (Repine et al., 1997; Snider, 1989). Una altre factor de risc és la deficiència en α 1-antitripsina, la pol·lució ambiental, l'estatus socio-econòmic i el baix pes en el naixement (Repine et al., 1997).

Durant l'última dècada, el desgast muscular i la disfunció del múscul esquelètic han estat identificats com els factors determinants de la morbiditat i la mortalitat que s'observa en els pacients amb MPOC. El desgast muscular és una manifestació sistèmica que succeix en els malalts amb MPOC. La seva prevalença és del 20% en pacients clínicament estables i d'un 35% en malalts que requereixen rehabilitació pulmonar (Engelen et al., 1994; Schols et al., 1993). Altres fets característics de la caquèxia, que també es troben el MPOC, i que no poden ser explicats per un desequilibri nutricional, inclouen preferencialment la pèrdua de teixit muscular més que adipós, una major degradació protèica (Morrison et al., 1988), i manca de resposta a teràpies nutricionals (Schols et al., 1995; Tisdale, 1997). Clarament, el desgast muscular en MPOC té molts més trets comuns amb la caquèxia que amb el dejuni o el desequilibri nutricional. La pèrdua de massa magra afecta de manera negativa a la funció respiratòria i a la musculatura perifèrica, la capacitat per realitzar exercici i la salut (Baarends et al., 1997; Palange et al., 1995, 1998; Engelen et al., 2000a i b; Mostert et al., 2000). Aquesta pèrdua de pes que es manifesta en aquesta patologia afecta negativament a la prognòsis. En un estudi retrospectiu de 400 pacients afectats de MPOC, Schols et al. (1998) van demostrar que el baix índex de massa corporal (BMI), l'edat i la baixa pressió parcial d'oxigen eren predictors independents de l'incrementada taxa de mortalitat. Un BMI inferior a 25 kg/m² incrementava el risc de mort. Gosker et al. (2002) han demostrat recentment, una forta correlació entre la massa magra i l'àrea de la secció de biòpsies del múscul *vastus lateralis*. La pèrdua de massa magra sembla que està molt relacionada amb l'estat inflamatori sistèmic que succeeix en aquests pacients (Schols et al., 1996; Di Francia et al., 1994; de Godoy et al., 1996). Altres estudis en els que s'utilitzen músculs incubats o extractes musculars suggereixen que el sistema proteolític dependent d'ubiquitina (proteasoma) és el responsable en gran part de la incrementada proteòlisi en diferents tipus d'atròfia muscular (Mitch i Goldberg,

1996; Jagoe i Goldberg, 2001). Tanmateix, encara no està clar com moltes proteïnes són ubiquitinitzades i degradades.

Li et al. (1998) han descrit que el TNF- α té efecte directe sobre les cèl·lules musculars esquelètiques diferenciades. Van demostrar que miotubs diferenciats tractats amb TNF- α tenien reduccions en el contingut de proteïna total i la pèrdua de del contingut de la cadena pesada de la miosina de manera dosi i temps dependent. Aquests canvis eren evidents a concentracions de TNF- α que eren presents en el plasma de malalts amb MPOC. El senyal del TNF- α succeeix en part per l'activació de NF- κ B, un procés que implica la conjugació amb ubiquitina i la degradació del I κ B α per part del proteasoma (veure apartat 3.4.3). Aquests autors van demostrar que el TNF- α estimula la conjugació amb ubiquitina de les proteïnes musculars, suggerint que és més probable que un *pool* ja existent d'ubiquitina sigui activat que no pas hi hagi síntesi de noves proteïnes. A més, van descriure que els inhibidors del proteasoma prevenien completament la translocació del NF- κ B, indicant que les interaccions entre la ubiquitina i el proteasoma eren obligades per la senyalització TNF- α - NF- κ B en el múscul esquelètic. A més d'alteracions de l'energia o el balanç anabòlic-catabòlic, el desgast muscular pot ser el resultat de la disminució del nombre de fibres o dels canvis en la regulació de la diferenciació del múscul esquelètic. MyoD s'expressa en mioblasts proliferatius no diferenciats, quan es retira el factor de creixement, és activat per iniciar la diferenciació del múscul esquelètic, dirigint finalment la fusió dels mioblasts per formar miotubs multinucleats. Així, MyoD és essencial per reparar el dany tissular (Koishi et al., 1995). Guttridge et al. (2000) van demostrar en miòcits diferenciats l'activació de NF- κ B induïda per TNF- α provocava la inhibició de la diferenciació del múscul esquelètic mitjançant la supressió del mRNA de MyoD a nivell post-transcripcional. Per això, el TNF- α causa una severa reducció dels nivells protèics de MyoD en aquestes cèl·lules, i aquesta pèrdua va predita per una igual pèrdua dels nivells del mRNA de MyoD (Guttridge et al., 2000). Contràriament en miotubs diferenciats és necessari el TNF- α juntament amb el IFN- γ per la *downregulation* de MyoD dependent de NF- κ B i la disfunció de les fibres de múscul esquelètic.

L'MPOC es caracteritza per un baix grau sistèmic d'inflamació (Di Francia et al., 1994; Schols et al., 1996; Riise et al., 1994) que va normalment acompanyada per baixos nivells circulants d'hormones anabòliques (Kamischke et al., 1998; Casaburi et al., 1998). Els elevats nivells circulants de IL-6 (Schols et al., 1996), IL-8 (Schols et al.,

1996), TNF- α (Di Francia et al., 1994), i proteïna reactiva C (Schols et al., 1996) que tenen els pacients amb MPOC han estat associats a un increment de la despesa energètica basal (Schols et al., 1996) i la manca de resposta a teràpies nutricionals, donant suport a la hipòtesi de que aquestes citocines tenen un paper clau en la caquèxia associada a MPOC. A més s'ha demostrat l'increment de molècules d'adhesió en fluids broncoalveolars i en plasma de pacients amb MPOC respecte individus control (Riise et al., 1994). La presència de molècules d'adhesió a la sang és necessària per a la infiltració de cèl·lules inflamatòries bronquials. En teoria, aquestes molècules d'adhesió podrien també induir la infiltració de cèl·lules inflamatòries a altres teixits com el múscul esquelètic, però això encara no està confirmat. En quant a la possible interacció entre citocines proinflamatòries i ROS (espècies reactives de l'oxigen), és interessant el fet de l'increment en la generació de ROS, probablement originat pels músculs contràctils, que ha estat descrit en pacients amb MPOC després de l'exercici de baixa intensitat (Heunks et al., 1999). Malgrat que en pacients amb MPOC s'observi un baix grau d'inflamació sistèmica, aquests mostren una elevada prevalença de baixos nivells plasmàtics de testosterona (Kamischke et al., 1998) i IGF-I (Casaburi et al., 1998) en comparació amb individus control d'edat similar. La rellevància clínica d'aquest fet encara no s'ha esbrinat ja que les correlacions entre el pes corporal o la massa muscular i els nivells plasmàtics d'aquestes hormones són dèbils (Kamischke et al., 1998) i els suplementes amb esteroides anabòlics (Schols et al., 1995) o hormona del creixement (Burdet et al., 1997) només tenen un efecte modest sobre la massa magra i l'estatus funcional, potser per un defecte en el receptor de l'hormona.

La hipoxèmia, ja sigui crònica o intermitent, és un tret comú en MPOC i pot influir en l'homeostasi del múscul esquelètic de moltes maneres a l'igual que succeeix en individus sans quan estan exposats a un ambient hipòxic (Howald et al., 1990). La hipoxèmia pot contribuir al desgast muscular en MPOC disminuint els nivells d'hormones anabòliques (Semple et al., 1980) i incrementant les citocines proinflamatòries (Takabatake et al., 2000). La presència d'hipoxèmia està també relacionada amb la generació de ROS que contribueixen a l'estrés oxidatiu (Heunks et al., 1999). Per tot això, la hipoxèmia pot contribuir al desgast muscular desplaçant el balanç entre factors anabòlics/ catabòlics a favor dels darrers.

El fet que les citocines proinflamatòries per sí mateixes puguin ser les responsables de caquèxia és discutible ja que les concentracions plasmàtiques d'aquestes són molt inferiors a les requerides per induir caquèxia en animals

d'experimentació (Buck et al., 1996). A més, no s'ha demostrat que hi hagi un increment en concentració o activitat de citocines proinflamatòries entre músculs d'individus caquètics amb MPOC o altres malalties cròniques. El relatiu manteniment d'alguns grups musculars com el diafragma (Levine et al., 1997) és també difícil d'explicar si es proposa una etiologia sistèmica com a causa del desgast muscular. La implicació preferencial d'alguns grups de músculs suggereix que hi hagi factors musculars locals implicats en el desenvolupament de la caquèxia.

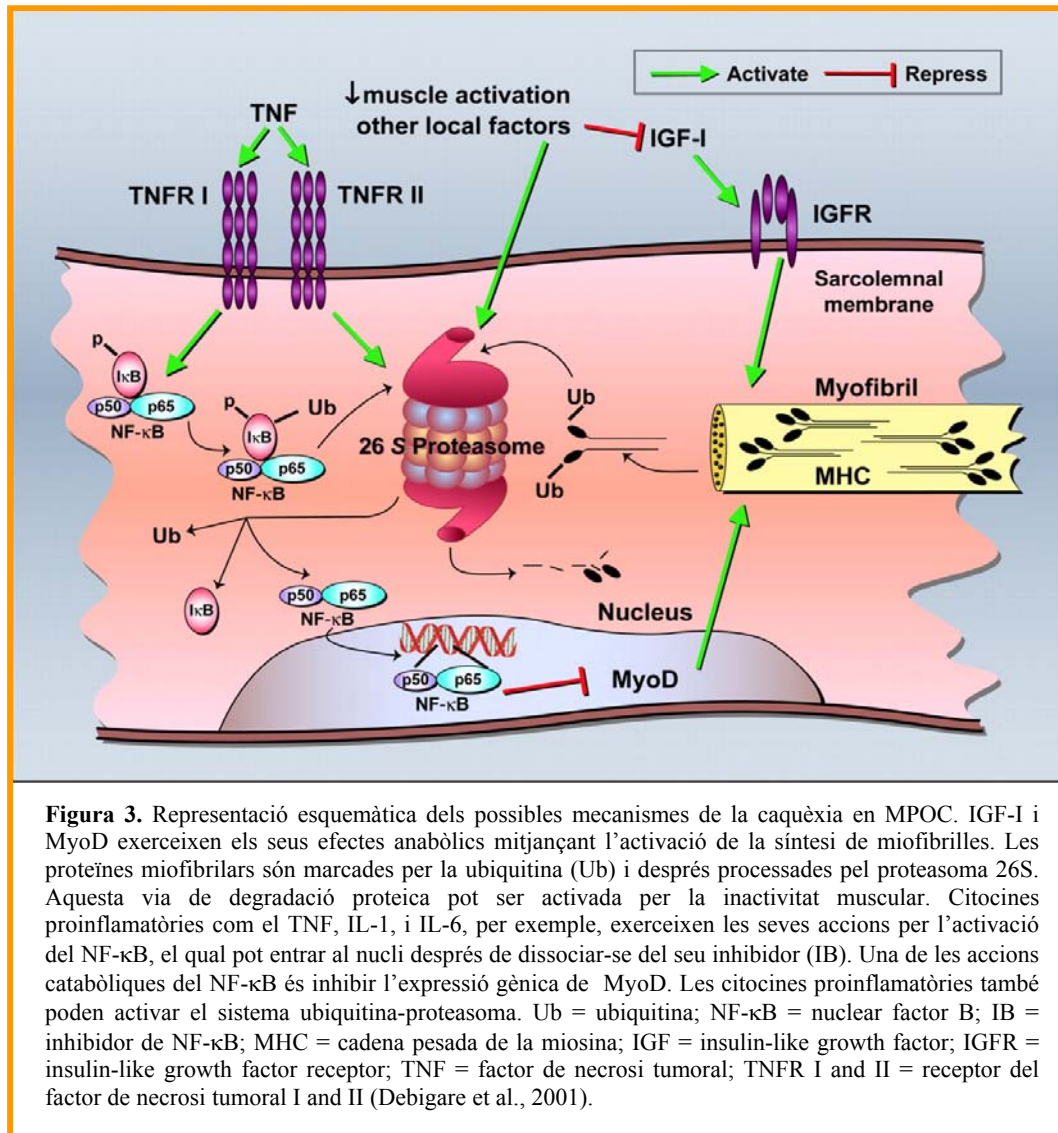
La inactivitat, com a un dels factors locals obvis, pot incrementar l'activitat de la via ubiquitina-proteasoma (Medina et al., 1995) i disminuir la producció i la resposta a IGF-I (Lalani et al., 2000). Altres factors locals, encara per identificar, estan possiblement implicats en el desgast muscular com indiquen les marcades modificacions en la cadena pesada de la miosina en el *vastus lateralis* de pacients amb MPOC en comparació amb individus sans malgrat observar petites diferències en la capacitat física (Maltais et al., 1999). Potser l'observació més curiosa en aquest aspecte, és la baixa capacitat oxidativa dels músculs de les extremitats que tenen hámsters amb emfisema malgrat no presentar una reducció del seu nivell d'activitat en comparació amb animals control (Mattson i Poole, 1998). Com s'ha esmentat anteriorment, els ROS poden actuar de manera local desencadenant desgast muscular. A més, alguns estudis suggereixen que l'acidosis muscular podria estar implicada en la degradació proteica (Mitch i Goldberg, 1996; Du et al., 2000). Això pot ser important en pacients amb MPOC ja que han de dur a terme un mínim d'exercici a la seva vida diària, el que els hi produeix una primària i exagerada acidosis muscular comparada amb individus sans (Maltais et al., 1998). Una hipòtesi raonable seria que la caquèxia en MPOC és el resultat de la interacció de factors sistèmics (com citocines i factors de creixement) que malgrat no estar significativament elevats podrien fer sinergisme amb factors locals com l'inactivitat, els nivells elevats de ROS i l'acidosis entre d'altres. Tot això desencadenaria un desequilibri entre l'anabolisme i el catabolisme. La Figura 3 representa una representació esquemàtica dels possibles mecanismes cel·lulars del desgast muscular en MPOC.

Recentment, s'ha relacionat el desenvolupament de la MPOC amb un increment de l'estrés oxidatiu o una reducció d'antioxidants (Heffner i Repine, 1989; White i Repine, 1985). Molts articles relacionats amb la MPOC han descrit canvis en els nivells d'estrés oxidatiu, citocines circulants i proteïnes de fase aguda o en els nivells d'activació de les cèl·lules circulants. Una hipòtesi bastant generalitzada és que el

desequilibri entre oxidants i antioxidants seria el que donaria lloc a la patogènesi de la MPOC. Els ROS, que són generats pels neutròfils, tant si són circulants com si no, són eliminats pels enzims antioxidants, indicant que la capacitat de prevenir els efectes nocius de l'estrés oxidatiu d'un individu depèn de la capacitat antioxidant de la sang i els teixits. Al menys en fumadors i durant les crisis agudes dels malalts MPOC, s'ha descrit que hi ha un marcat desequilibri el balanç oxidant-antioxidant (Rahman et al., 1996a i b). Altres estudis (Schols et al., 1996; Takabatake et al., 1999) han demostrat que en aquesta malaltia hi ha alts nivells de citocines circulants. L'estrés oxidatiu present en la circulació sistèmica dels pacients amb MPOC pot influir a la pèrdua de massa muscular per estimulació de la proteòlisi muscular (Mitch i Goldberg, 1996; Buck i Chojkier, 1996). L'estrés oxidatiu causat per sobreproducció de NO (òxid nítric) pot ser el resultat d'una sobreexpressió de la iNOS (òxid nítric sintasa induïble) al múscul, iniciada per exemple per la hipòxia tissular o inflamació sistèmica, ambdós processos que succeixen a la MPOC (Agusti et al., 1999; Lawler i Song, 2002; Moncada i Higgs, 2002; Jung et al., 2000). El múscul esquelètic dels pacients amb MPOC, que pateix una pèrdua de pes, també presenta una sobreexpressió de la iNOS (Gari et al., 2002). A més, la sobreproducció de NO podria conduir a l'estrés oxidatiu i a patologies mediades per estrés oxidatiu com el desgast muscular per desequilibris en enzims antioxidants com la superòxid dismutasa o la catalasa (Lawler i Song, 2002). Utilitzant dos models experimentals de desgast muscular com són la suspensió d'extremitat i l'oclusió coronària crònica, s'ha observat en el múscul esquelètic una *upregulation* de la iNOS, un augment de l'estrés oxidatiu i una disminució de l'activitat d'enzims antioxidants (Barreiro et al., 2003; Beckman i Koppenol, 1996; Demaree et al., 2000; Lawler et al., 1993). En patologies on hi ha desgast muscular també hi ha un increment en la producció de ROS i RNS (espècies reactives del nitrogen) i un augment en els nivells de iNOS (Reid, 2001; Callahan et al., 2001). La producció de ROS i RNS pot conduir a deteriorar la protecció antioxidant al múscul esquelètic.

L'apoptosi és un procés actiu de mort cel·lular. Stangel et al. (1996) van demostrar que l'apoptosis es podia desencadenar per estrés oxidatiu en animals d'experimentació. En cèl·lules mononucleades l'apoptosi condueix a la mort cel·lular mentre que en cèl·lules multinucleades com els miòcits es dona una atròfia cel·lular (Allen et al., 1997; Vescovo et al., 2000). La inexplicable pèrdua de pes que succeeix en els pacients amb MPOC és causada principalment per l'atròfia del múscul esquelètic, indicant que podria haver-hi una excessiva apoptosi en aquests pacients (Gosker et al.,

2000). A més, molts desencadenants de l'apoptosi com la hipòxia, l'estrés oxidatiu i la inflamació sistèmica són presents en pacients amb MPOC (Green i Reed, 1998; Petrache et al., 2000a i b). Un estudi recent en pacients amb MPOC amb baix índex de pes corporal (BMI) indica que en pacients amb MPOC hi ha una incrementada apoptosi al múscul esquelètic (Agustí et al., 2002). Agustí et al. (2002) van suggerir que l'apoptosi podria estar implicada en l'atròfia del múscul esquelètic que presenten els pacients amb MPOC. Van observar un alt percentatge de nuclis apoptòtics en *vastus lateralis* de biòpsies de pacients amb MPOC. Els pacients que tenien BMI per sota de 20 kg/m² tenien més nuclis apoptòtics que aquells que estaven per sobre. Els factors o mecanismes responsables de l'apoptosi podrien ser, al igual que en altres patologies, mitjançant receptors de mort com el del TNF- α , Fas, caspases, entre d'altres. S'ha descrit un procés inflamatori crònic a les vies aèries de pacients amb MPOC (Jeffery, 1998). A més, els pacients amb MPOC, amb BMI baix, tenen nivells circulants de TNF- α , IL-6, i els receptors solubles més alts i més baix índex de creatinina (CHI) comparat amb els pacients que tenen BMI i CHI normals (Eid et al., 2001). A més, la inflamació crònica podria ser un factor important del desgast muscular, actuant en part per la via apoptòtica a través de receptors de mort. Altres vies que juguen un paper clau en l'apoptosi són les de la mitocondria. L'estimulació de les vies apoptòtiques mitocondrials inclouen efectes directes i indirectes dels ROS, alteració de l'homeostasi cel·lular i mitocondrial, senyals d'estrés mitjançant la via esfingomielina/ceramida, etc. Això és interessant ja que s'ha descrit que en pacients amb MPOC hi ha una reducció dels nivells de glutatió en *vastus lateralis* comparat amb individus sans (Engelen et al., 2000c), suggerint que aquests tenen una major susceptibilitat a l'estrés induït per oxidants. Els ROS poden incrementar l'expressió i la translocació mitocondrial de factors proapoptòtics (com Bax y Bad).



4. EL MÚSCUL ESQUELÈTIC

Els teixits musculars són els responsables del moviment de materials a través del cos, el moviment d'una part del cos respecte una altra i la locomoció. Existeixen tres tipus de teixit muscular en el cos: llis (o visceral), cardíac i esquelètic. Els tres tipus de fibres estan adaptades per contraure's en resposta a estímuls del sistema nerviós. El teixit muscular esquelètic s'uneix a l'esquelet i és responsable dels moviments voluntaris del cos. Les funcions del múscul esquelètic són les del moviment, producció de calor i donar postura i suport al cos. El múscul esquelètic constitueix aproximadament el 40% del pes del cos.

4.1 RECANVI PROTÈIC MUSCULAR

Les proteïnes musculars estan en un estat continu de recanvi, de manera que a la rata adulta la vida mitja de les proteïnes dels músculs en contracció lenta i ràpida és de 12.2 i de 18.3 dies respectivament (Lewis et al., 1984). Durant la vida postnatal, el ràpid creixement del múscul va acompanyat d'un increment en les taxes totals de síntesi protèica; quan s'expressen com taxes fraccionades de síntesi o degradació (el percentatge de massa protèica sintetitzada o degradada per dia), aquestes són independents del tamany muscular. Amb l'edat, ambdues taxes disminueixen progressivament (Lewis et al., 1984; Kelly et al., 1984). Les grans diferències entre les dues taxes (a favor de la síntesi) en el període perinatal disminueixen gradualment fins arribar a les condicions de no creixement assolides pels músculs de l'adult. Aquests canvis del desenvolupament del recanvi protèic tenen a veure tant amb les proteïnes miofibrilars com amb les sarcoplasmàtiques, i sembla que també estan parcialment relacionats amb el l'estat canviant de la diferenciació dels músculs. Una vegada el desenvolupament s'ha completat, les taxes absolutes de síntesi i degradació protèica estan correlacionades amb el nivell d'activitat expressat pel múscul. Degut a això, els músculs que estan continuament actius, com el cor i el soleus, presenten de manera similar taxes elevades de recanvi protèic, molt superiors a les dels músculs de contracció ràpida que són activats amb menys freqüència, com el EDL (Goldspink, 1991).

4.1.1 REGULACIÓ DEL RECANVI PROTÈIC

4.1.1.1 INSULINA

Estudis *in vitro* han demostrat que la insulina estimula la síntesi protèica i inhibeix la degradació protèica en preparacions de múscul esquelètic i cardíac incubats sota condicions basals, amb la glucosa com a substrat. Els efectes de la insulina en el recanvi protèic de les cèl·lules musculars en cultiu són similars als dels músculs incubats, encara que requereixen concentracions hiperfisiològiques de l'hormona per obtenir respostes màximes, degut a que expressen un baix nombre de receptors per a la insulina. L'acció de l'hormona és a nivell traduccional, activant el pèptid-cadena d'iniciació, i és independent dels efectes d'aquesta sobre el transport d'aminoàcids

(Rannels et al., 1975). Malgrat que la insulina probablement estimula la síntesi de la majoria o totes les proteïnes musculars, no es coneix fins a quin punt aquesta estimulació és uniforme.

En estudis *in vivo* s'ha vist que la insulina és important en la resposta de la síntesi proteica a la retroalimentació després del dejú, però altres factors estan implicats, com els aminoàcids que cadena ramificada (BCAA), que augmenten la sensibilitat a la insulina de la taxa fraccional de síntesi proteica muscular (Preedy i Garlick, 1986; Garlick i Grant, 1988). No està clar com la insulina afecta a la taxa fraccional de degradació proteica muscular *in vivo*. Es pot concloure que la insulina és important en la regulació aguda del recanvi proteic, especialment mitjançant l'estimulació de la síntesi proteica, però a més altres factors són importants.

4.1.1.2 IGF-I

La insulina, l'IGF-I, i l'hormona del creixement (GH) tenen una paper determinant en la regulació, el metabolisme proteic i la resposta a processos fisiològics i patofisiològics (Fryburg i Barrett, 1999). És evident que aquestes hormones peptídiques funcionen de forma coordinada i interdependent, encara que no es sap encara del tot (revisat per Russell-Jones i Umpleby, 1996). Els estudis *in vivo* han demostrat les accions biològiques de l'IGF-I, que són les d'un factor de creixement i les accions similars a la insulina (insulin-like). L'injecció intravenosa d'IGF-I va produir, en rates hipofisectomitzades i rates normals, una disminució de la vida mitja de les proteïnes (Zapf et al. 1986). Els estudis realitzats tant en animals com humans (Elahi, 1993; Mauras et al., 1992) mostren que el mecanisme d'acció de l'IGF-I en el metabolisme proteic *in vivo* és igual al de la insulina: una reducció de la degradació i sense efectes en la síntesi.

Utilitzant miotubs L6, Fernandez i Sainz (1997) descriuen l'acció de l'IGF-I inhibint tant la degradació proteica total (40%) com la miofibrilar (55%). Grans reduccions en la degradació total s'han descrit també en estudis amb miotubs L8 (Gulve i Dice, 1989) i en cultius primaris de miotubs esquelètics (Harper et al., 1987).

4.1.1.3 HORMONES TIROIDEES

Les hormones tiroidees també afecten a la taxa de síntesi i degradació proteica muscular, exercint efectes oposats segons la dosi utilitzada. En aquest sentit, s'ha observat que nivells fisiològics de T_3 són essencials per al creixement normal del múscul i altres teixits, però dosis molt elevades comporten una pèrdua general de pes i a un sever desgast muscular. És interessant destacar el fet que la T_3 augmenta la síntesi proteica en la mateixa extensió que ho fa la GH (Faim et al., 1978).

En quant a la degradació proteica, també s'ha observat que les hormones tiroidees poden augmentar la proteòlisi lisosomal i la no lisosomal dependent d'ATP (Kettelhut et al., 1988). La proteòlisi dependent de calci sembla ser independent d'aquestes hormones, ja que malgrat que la proteòlisi general està disminuïda després d'una hipofisectomia, la proteòlisi dependent de calci no disminueix, i encara que l'addició de T_3 augmenta la proteòlisi general, no augmenta la capacitat d'aquest sistema (Kettelhut et al., 1988).

4.1.1.4 GLUCOCORTICOIDES

Els glucocorticoides poden influir notablement en la mida del múscul. En aquest sentit, es sap que en la síndrome de Cushing els elevats nivells d'aquests esteroides adrenals poden produir una inhibició del creixement dels joves, i una marcat desgast muscular en els adults (Kettelhut et al., 1988).

La disminució en la síntesi proteica ha estat àmpliament demostrada en diferents estudis tant *in vivo* com *in vitro* (McGrath i Goldspink, 1982); per tant, alguns dels efectes han de ser directes. La síntesi de proteïnes miofibrilars és especialment sensible a la inhibició per glucocorticoides (Odedra et al., 1983). També s'ha vist que causen resistència a la insulina (Odedra et al., 1982). Els efectes dels glucocorticoides en la taxa de degradació en el múscul esquelètic són transitoris; poden afectar primerament a la degradació proteica miofibrilar, però només es pot observar utilitzant dosis farmacològiques (Odedra i Millward, 1982; Tomas et al., 1984; Odedra et al., 1983; Kayali et al., 1987).

4.1.1.5 GLUCAGÓ

El glucagó inhibeix la síntesi proteica tant *in vivo* com *in vitro*, encara que a concentracions hiperfisiològiques. Pot estimular la disminució de proteïna perifèrica i l'acúmulo proteic hepàtic (Kibler et al., 1964). De tota manera, el paper fisiològic del glucagó en la regulació del recanvi proteic és relativament limitat.

4.2 SISTEMES PROTEOLÍTIQUES

La proteòlisi intracel·lular té una funció molt important, ja que molts aspectes de la fisiologia i el desenvolupament cel·lular estan controlats per la degradació de proteïnes específiques. De fet, la degradació de proteïnes reguladores (factors de transcripció, enzims o factors inhibidors) és essencial per al control del creixement cel·lular i per al metabolisme. La degradació ràpida de proteïnes específiques permet l'adaptació a les noves condicions fisiològiques i als canvis en la composició de la cèl·lula (revisat per Lecker *et al.*, 1999a). En el cas del múscul esquelètic, les proteïnes estan sotmeses a un recanvi continu, resultat del balanç entre les taxes de proteòlisi i síntesi proteica. La regulació de la proteòlisi muscular té un paper molt important en l'homeòstasi energètica, el control de la massa muscular i el creixement corporal, tant en situacions fisiològiques com en patològiques. La degradació proteica proporciona un mecanisme de control de qualitat que elimina selectivament les proteïnes mal plegades o malmeses que sorgeixen a causa de mutacions, errors biosintètics, o per l'efecte de radicals d'oxigen o per desnaturalització (revisat per Lecker *et al.*, 1999a). La degradació proteica és també important per al funcionament del sistema immunitari, ja que així s'eliminen les proteïnes anormals (virus) que hi ha dins les cèl·lules o a l'espai extracel·lular. Al múscul esquelètic, la degradació proteica té un paper fonamental en situacions de manca d'ingestió o malalties catabòliques, ja que proporciona aminoàcids a altres teixits que els utilitzaran per a la gluconeogènesi, la síntesi proteica i l'obtenció d'energia (Mitch i Goldberg, 1996).

Mentre que la síntesi de proteïnes és un procés força conegut, la degradació proteica és encara un camp on s'aporten coneixements nous. Actualment se sap que les cèl·lules de mamífers tenen diversos sistemes proteolítics que s'utilitzen per a diferents funcions fisiològiques. Aquests sistemes proteolítics es classifiquen de la següent manera (segons Lecker *et al.*, 1999a):

- **Sistema lisosomal**
- **Sistemes citosòlics no lisosomals:**
 - Dependent de calci
 - Caspases o proteases ICE (*interleukin- β converting enzymes*)
 - Dependent d'ATP i ubiquitina
 - Dependent d'ATP i independent d'ubiquitina
- **Sistemes mitocondrials:**
 - Dependent d'ATP

4.2.1 SISTEMA LISOSOMAL

La proteòlisi lisosomal és un dels sistemes proteolítics més estudiats en les cèl·lules de mamífer. Els lisosomes són orgànuls cel·lulars que contenen gran nombre de proteases (anomenades catepsines) i altres hidrolases àcides, totes amb l'activitat òptima pròxima al pH 5 (pH que presenten els lisosomes a l'interior). Es coneixen més de 40 enzims lisosomals, tots hidrolítics: proteases, nucleases, glucosidases, lipases, fosfolipases, fosfatases i sulfatases. S'ha descrit que la proteòlisi s'inicia amb l'acció de les endopeptidases (catepsines B i H), les quals són el pas limitant, i el procés continua mitjançant les exopeptidases (catepsines A i C).

Els lisosomes s'encarreguen de degradar sobretot proteïnes extracel·lulars (hormones), proteïnes plasmàtiques i de membrana, glicoproteïnes, bacteris fagocitats o receptors de membrana, les quals són endocitades per la cèl·lula (Lecker *et al.*, 1999a).

La via d'autofàgia lisosomal de la proteòlisi intracel·lular és un procés en gran part no selectiu, i es considera el principal responsable de la degradació total de les proteïnes cel·lulars. De fet, més del 90% de les proteïnes de vida llarga i una fracció de les de vida curta són degradades al lisosoma (Ahlberg *et al.*, 1985).

El múscul esquelètic conté pocs lisosomes, i s'ha comprovat que les principals proteases lisosomals (catepsines B, H, L i D) no contribueixen gaire a la proteòlisi general en músculs incubats (Temparis *et al.*, 1994). A més, tampoc semblen estar implicats en la degradació de proteïnes miofibril·lars (Lowell *et al.*, 1986).

4.2.1.1 CATEPSINES

Les principals catepsines que hi ha al múscul són les següents:

Catepsina B: s'ha detectat en la majoria de teixits i òrgans en mamífers. Té activitat d'endopeptidasa (Kirschke i Barrett, 1987). Presenta baixa activitat en comparació amb la catepsina L (menys del 10%).

Catepsina D: és un dels enzims més abundants als lisosomes, almenys al fetge de rata. És una aspartil-proteïnasa amb especificitat similar a la pepsina, que duu a terme la hidròlisi de residus hidrofòbics. El seu pH òptim és entre 3 i 5. És una proteïna dímera.

Catepsina H: s'ha detectat en tots els teixits i òrgans de rata. El seu òptim és entre un pH de 6 i 7. Té activitat d'aminopeptidasa, i actua sobre pèptids que no tenen bloquejat l'extrem N-terminal i sobre l'extrem N-terminal de proteïnes i productes peptídics de la seva pròpia acció d'endopeptidasa. L'activitat d'aquest enzim és molt limitada i no representa més d'un 5% de l'activitat proteolítica total.

Catepsina L: és la cisteïnil-proteïnasa més potent. La hidròlisi catalitzada per aquest enzim necessita que els substrats tinguin aminoàcids hidrofòbics a les posicions P3 i P2, i si a més hi ha un aminoàcid apolar a la posició P1, la hidròlisi és més ràpida (Kirschke *et al.*, 1980).

4.2.2 SISTEMA DEPENDENT DE CALCI

Aquest sistema està distribuït àmpliament a les cèl·lules eucariotes. Els enzims que pertanyen a aquest sistema proteolític s'anomenen calpaïnes o proteïnases neutres activades per calci (CANP). Les calpaïnes són enzims intracel·lulars, la majoria dels quals són citosòlics, i entre un 7 i un 30% estan associades a estructures de membrana (Samis i Elce, 1989). Estan regulades per la seva unió al calci i per modificacions autoproteolítiques.

S'han identificat fins al moment onze membres de la família, que es divideixen, en mamífers, segons la seva distribució a l'organisme. Així, es poden dividir en ubiques (μ -calpaïna i m-calpaïna, les més estudiades); i les específiques de teixit: calpaïna 3 (específica de múscul esquelètic), n-calpaïna 2 i n-calpaïna 2' (específiques d'estómac) (revisat per Saido *et al.*, 1994), n-calpaïna 4 (específica de túbuls digestius) (Sorimachi

et al., 1997), n-calpaïna 5, n-calpaïna 6 i n-calpaïna 11 (expressades en diferents teixits i períodes de desenvolupament en el ratolí) (Dear i Boehm, 1999). S'han trobat també homòlegs de les calpaïnes en insectes, nematodes, fongs i llevats (revisat per Sorimachi *et al.*, 1997). A més, s'han identificat dues proteïnes reguladores: una d'inhibidora i una d'estimuladora. Tot això indica que aquestes proteases pertanyen a un sistema proteolític força complex.

4.2.3 SISTEMA DEPENDENT D'ATP I UBIQUITINA

Actualment se sap que la gran majoria de proteïnes intracel·lulars són degradades pel sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina (revisat per Lecker *et al.*, 1999a). Els substrats proteics d'aquest sistema són marcats prèviament per la unió covalent de diverses molècules de ubiquitina, i la proteòlisi es duu a terme mitjançant el complex proteasòmic 26S, el qual degrada les proteïnes fins a petits pèptids (Kisselev *et al.*, 1998). En aquest sistema proteolític es degraden proteïnes anormals i proteïnes reguladores de vida curta, però també és el responsable del recanvi lent de les proteïnes de vida llarga, que constitueixen la gran majoria de proteïnes intracel·lulars (Mitch i Goldberg, 1996; Rock *et al.*, 1994), com també de generar els pèptids que es presenten a l'MHC (complex d'histocompatibilitat major) de classe I durant la resposta immunitària (Rock *et al.*, 1994). A més, aquesta via proteolítica té un paper molt important en la proteòlisi accelerada de les proteïnes miofibril·lars durant el dejuni i altres estats patològics, com s'explicarà més endavant. S'ha postulat que el sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina podria ser una de les principals vies per la qual es degradarien selectivament les proteïnes intracel·lulars.

4.2.3.1 UBIQUITINA

La ubiquitina està implicada en una llista quasi inacabable de processos cel·lulars. Absent en procarïotes, aquesta proteïna de 76 aminoàcids és present en tots els eucariotes estudiats, ja sigui en forma lliure o unida a un gran nombre de proteïnes citoplasmàtiques, nuclears i de membrana. Totes les funcions cel·lulars en les quals participa les duu a terme a través de l'associació a un complex multienzimàtic, que s'encarrega d'unir o desunir molècules d'ubiquitina a una gran varietat de substrats proteics. Les característiques més rellevants d'aquesta proteïna són la gran conservació

durant l'escala evolutiva, la gran abundància, i la gran estabilitat estructural. S'ha demostrat que la ubiquitinització té un paper important en el metabolisme de les proteïnes, de l'RNA i del DNA (Schlesinger, 1990).

4.2.3.1.1 ESTRUCTURA I PROPIETATS

La ubiquitina és una proteïna petita, amb un pes molecular de 8,5 kD. La seva estructura cristal·lina, com també l'anàlisi per ressonància magnètica nuclear (Vijay-Kumar *et al.*, 1987; Weber *et al.*, 1987), revelen una conformació globular compacta, constituïda per cinc làmines β i una hèlix α de tres voltes i mitja. Conté un nucli hidrofòbic i un gran nombre de ponts d'hidrogen, fet que n'explica la gran estabilitat davant els canvis de temperatura (és estable per sota dels 80°C) i de pH (roman plegada entre els pH 1 i 13) (Cary *et al.*, 1980), i la seva resistència a la degradació proteica, tot i mantenir un contacte molt estret amb les proteases del sistema. Un dels punts més característic de l'estructura de la ubiquitina és que el seu extrem C-terminal (Arg₇₄-Gly₇₅-Gly₇₆) sobresurt de l'estructura globular formant un apèndix de gran mobilitat. A través d'aquest extrem interactua tant amb els enzims del sistema com amb les proteïnes diana.

La ubiquitina és una de les proteïnes més abundants a la cèl·lula, juntament amb l'actina, la tubulina i les histones. S'ha estimat que, dependent del tipus cel·lular, hi ha de l'ordre de $8 \cdot 10^7$ i $2 \cdot 10^8$ molècules de ubiquitina per cèl·lula (Haas i Riley, 1988; Carlson i Rechsteiner, 1987). La ubiquitina està en equilibri dinàmic entre la forma lliure i les formes conjugades, ja sigui amb histones, amb proteïnes d'elevat pes molecular, o amb enzims d'activació o conjugació del seu sistema (Carlson i Rechsteiner, 1987).

4.2.3.2 DEGRADACIÓ PROTEICA

La degradació proteica és la funció més estudiada i coneguda de la ubiquitina (revisat per Rechsteiner, 1987; Hershko, 1991; Jentsch *et al.*, 1992; Varshavsky, 1992). El sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina té un paper molt important tant en la degradació de la majoria de les proteïnes cel·lulars com en el procés selectiu i de presentació d'antígens pel complex MHC de classe I (Rock *et al.*, 1994).

A la cèl·lula, la ubiquitina es pot trobar lliure o conjugada mitjançant una unió covalent entre el seu extrem C-terminal i el grup ϵ -amino dels residus de lisina de les proteïnes. Per al començament de la degradació de les proteïnes per aquest sistema, és necessària la unió covalent de la ubiquitina amb els substrats proteics. Les proteïnes conjugades amb múltiples ubiquitines són les que tenen més probabilitats de ser degradades pel sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina. La conjugació de la ubiquitina als substrats proteics és un procés que consta de diverses reaccions, en les quals estan implicats diferents enzims i que requereixen energia en forma d'ATP.

4.2.3.3 ENZIMS DEL SISTEMA

E1 (enzim activador de la ubiquitina)

La primera reacció consisteix en l'activació de la ubiquitina, i la catalitza l'enzim E1, anomenat també enzim activador de la ubiquitina (Figura 4). És una reacció dependent d'ATP en la qual es forma adenilat d'ubiquitina, seguida de la transferència de l'extrem C-terminal de la ubiquitina a un residu cisteïna de l'enzim E1 mitjançant un enllaç tioèster. L'E1 està associat als tres components principals del citosquelet (actina, tubulina i filaments intermedis). La distribució variable de l'E1 i la seva aparent distribució al citosquelet suggereixen que tant aquest enzim, com el sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina, tenen funcions pleotròpiques (Tausch *et al.*, 1993).

E2 (enzim conjugador de la ubiquitina)

La ubiquitina activada és transferida de l'enzim E1 a un residu específic de cisteïna d'un dels diferents enzims E2 (anomenats enzims conjugadors o transportadors de la ubiquitina), mitjançant un enllaç tioèster (Figura 4). Després, els enzims E2 transfereixen la ubiquitina al substrat proteic, i es forma així una proteïna conjugada ramificada en la qual l'extrem C-terminal del residu de la glicina-76 de la ubiquitina s'uneix a residus de lisina interns de la proteïna diana, mitjançant un enllaç isopeptídic.

E3 (lligases d'ubiquitina)

Algunes de les reaccions de la conjugació de la ubiquitina i el substrat requereixen un tercer tipus d'enzims: E3 o lligases de la ubiquitina. Aquests enzims ajuden al reconeixement dels substrats susceptibles de ser ubiquitinatzats (Ciechanover i Schwartz, 1989; Hershko, 1991). En aquests casos, la unió de la ubiquitina a les proteïnes diana té lloc en dues etapes: primer el substrat proteic s'uneix en un lloc específic de l'E3, i després la ubiquitina activada és transferida de l'E2 a la proteïna (Figura 4). S'ha suggerit que, per facilitar aquesta transferència, és probable que l'E3 tingui un lloc d'unió amb l'E2. A causa de l'elevada estabilitat dels llocs d'unió del substrat proteic, l'E3 sembla tenir un paper important en la selecció de les proteïnes que han de ser degradades. Els diferents subtipus de l'E3 que hi ha (actualment se'n coneixen sis) es diferencien en l'estructura i en el tipus de senyal (que presenten les proteïnes susceptibles de ser degradades pel sistema) que reconeixen. Aquest enzim proporciona l'alta especificitat que caracteritza el sistema dependent d'ATP i ubiquitina (revisat per Ciechanover *et al.*, 2000).

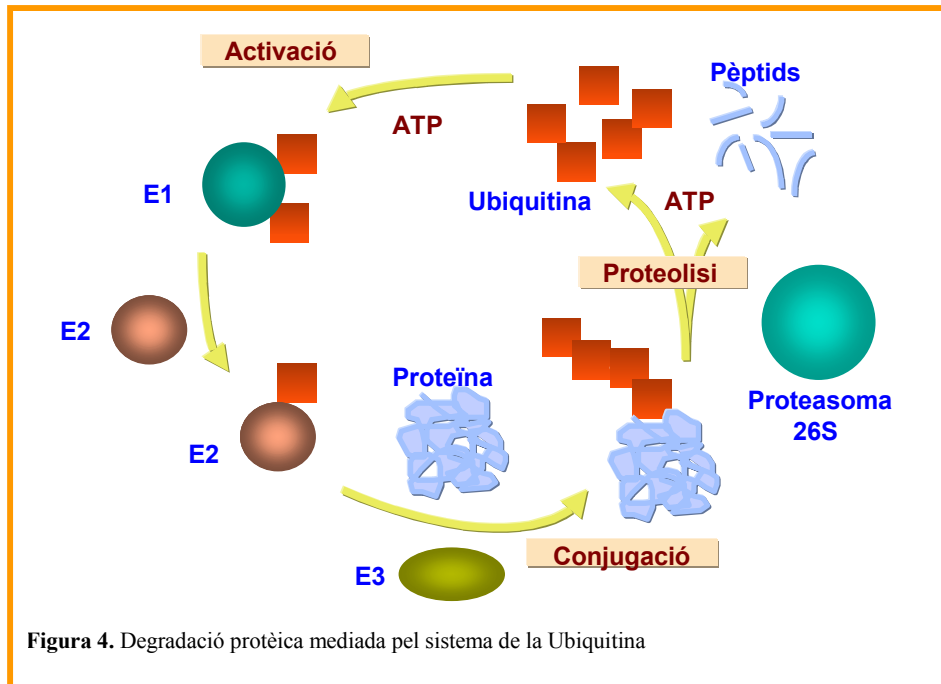
Proteasoma 26S

Les proteïnes ubiquitinatzades solen ser degradades pel complex anomenat proteasoma 26S, tot i que pot passar que la ubiquitina s'alliberi de les proteïnes diana gràcies a l'acció de certes hidrolases i quedi lliure per ser reutilitzada en un nou cicle de conjugació (Matsui *et al.*, 1982) (Figura 4). El proteasoma 26S, de 1.500 kD, funciona com una proteasa dependent d'ATP (Goldberg i Rock, 1992; Rivett, 1993), i està implicat en la degradació de proteïnes anormals, proteïnes de vida curta i llarga, proteïnes reguladores de vida curta i antígens de presentació (Peters, 1994; Rock *et al.*, 1994). La degradació de substrats depèn del grau de poliubiquitinatzació (Chau *et al.*, 1989), i la monoubiquitinatzació és suficient sols en alguns casos (Haas *et al.*, 1990); per tant, sembla que és necessària la multiubiquitinatzació dels substrats per a la degradació de les proteïnes *in vivo* per aquest sistema. Alguns estudis electroforètics i immunoquímics han demostrat que el complex 26S degrada substrats multiubiquitinatzats de manera dependent d'ATP, que té una activitat d'ATPasa que li aporta l'energia necessària per a la proteòlisi, i que presenta una activitat d'isopeptidasa dependent de Mg^{2+}/ATP , que genera ubiquitina lliure. El proteasoma no es detecta

només al citoplasma sinó també al nucli, fet que suggereix que aquest sistema proteolític controla tant les proteïnes citosòliques com les nuclears. El complex 26S sembla que és el responsable de la proliferació i diferenciació de les cèl·lules a través de l'eliminació selectiva de diverses proteïnes reguladores implicades en la progressió del cicle cel·lular. S'han obtingut evidències que demostren que el proteasoma és el responsable de la proteòlisi del sistema de la ubiquitina (Matthews *et al.*, 1989; Heinemeyer *et al.*, 1991). És interessant destacar que no sempre la ubiquitinització és essencial per al reconeixement dels substrats pel proteasoma, ja que en certes ocasions el complex 26S degrada proteïnes no conjugades amb la ubiquitina (Driscoll i Goldberg, 1990; Murakami *et al.*, 1992; revisat per Glickman, 2000). S'ha identificat una activitat de nucleasa específica associada al proteasoma, fet que suggereix un possible paper d'aquest en la regulació de la traducció (Pouch *et al.*, 1995).

Enzims desubiquitinizants

L'últim pas en el mecanisme proteolític de la ubiquitina consisteix en la regeneració de la ubiquitina lliure i en la reutilització d'aquesta. El procés el duen a terme els enzims desubiquitinizants, que es poden dividir en dues famílies: les hidrolases C-terminal de la ubiquitina (UCH), anomenades també isopeptidases, i les proteases específiques de la ubiquitina (UBP) (Wilkinson, 2000). Per poder reciclar la ubiquitina després de la degradació proteica, cal l'activitat d'aquests enzims que actuen sobre els ponts isopeptídics de la ubiquitina amb la proteïna conjugada i donen lloc a l'escissió de la ubiquitina dels pèptids petits derivats de la proteòlisi de la proteïna diana. Aquests enzims són també necessaris per a la conjugació reversible de proteïnes amb la ubiquitina, és a dir, per eliminar la ubiquitina de les proteïnes conjugades incorrectament, així mostra un paper corrector (Matsui *et al.*, 1982). Una altra funció essencial d'aquests enzims és el processament dels precursors biosintètics de la ubiquitina (Özkaynak *et al.*, 1987).



4.2.3.4 RECONeixEMENT DE SUBSTRATS

S'han proposat diferents mecanismes mitjançant els quals les proteïnes són reconegudes pel sistema dependent d'ATP i ubiquitina.

Un dels primers models proposats sobre el reconeixement de substrats en la degradació proteica es basa en el residu aminoacídic en posició N-terminal. La regla N-terminal proposa que la vida mitja de les proteïnes *in vivo* està en funció del tipus de residu N-terminal que tenen en la seva seqüència (Bachmair *et al.*, 1986). La major part de les proteïnes degradades al múscul esquelètic són ubiquitinitzades mitjançant el reconeixement dels substrats proteics segons aquesta regla (Solomon *et al.*, 1998). Estudis posteriors han demostrat que el reconeixement dels residus N-terminals d'una proteïna no són els únics responsables de marcatge de la proteïna per a la degradació posterior, i que poques proteïnes són marcades per a la conjugació i degradació per aquesta via. Per tant, es va creure que la regla N-terminal no era tan important com semblava, i que només estava implicada en un nombre limitat de substrats proteics. Actualment, però, se sap que la major part de proteïnes citosòliques tenen l'extrem N-terminal acetilat i són degradades pel sistema de la ubiquitina, i que les proteïnes dels músculs caquètics susceptibles de ser degradades, ho fan segons aquesta regla (revisat per Hasselgren i Fischer, 2001).

Rogers *et al.* (1986) van observar un altre tipus de senyal: les proteïnes de vida curta contenen regions riques en prolina (P), àcid glutàmic (E), serina (S) i treonina (T). D'aquesta manera, aquestes seqüències es van anomenar PEST, i constitueixen un senyal que marca certes proteïnes perquè siguin degradades ràpidament. S'ha suggerit també que el reconeixement de les seqüències PEST pot ser un mecanisme compartit per diferents vies proteolítiques, i que aquestes seqüències poden tenir un paper auxiliar en diferents vies de la degradació proteica (Hershko *et al.*, 1992).

Altres proteïnes, com en el cas de les ciclins mitòtiques, presenten una seqüència interna anomenada *caixa de destrucció* que consisteix en una seqüència de consens conservada de nou aminoàcids necessària per a la degradació dependent d'ubiquitina (Glutzer *et al.*, 1991).

A més, recentment s'ha identificat un senyal que consta de dues leucines juntes a la ubiquitina, que pot estar involucrat en l'endocitosi mediada per la ubiquitina de proteïnes de membrana i la degradació posterior d'aquestes al lisosoma (Nakatsu *et al.*, 2000). Així, es demostra que la ubiquitina pot estar relacionada amb un altre sistema proteolític i conduir les proteïnes a una degradació independent d'ATP i del proteasoma.

Hi ha tres vies principals per les quals una proteïna que ha de ser degradada, sigui reconeguda i ubiquitinitzada: 1) que estigui mal plegada o tingui danys a l'estructura, 2) que sigui ubiquitinitzada de manera activa i constitutiva segons els senyals que conté, és a dir, que estigui programada genèticament, o 3) que sofreixi modificacions induïbles, com pot ser la fosforilació (revisat per Wilkinson, 1999 i 2000).

4.2.3.5 GENS DE LA UBIQUITINA

La ubiquitina està codificada com una proteïna de fusió, malgrat que hi ha excepcions en les quals apareix com a monòmer. Es troben dos tipus de gens: els gens de poliubiquitina i els gens de fusió ribosomals. Totes les proteïnes de fusió derivades d'aquests gens són processades per hidrolases específiques immediatament després de la traducció. Els dos tipus de gens s'expressen de manera diferent: els transcrits de poliubiquitina estan molt incrementats en situacions d'estrès, mentre que els transcrits de les proteïnes de fusió ribosomals són més abundants a les cèl·lules en condicions basals.

4.2.3.5.1 GENS DE POLIUBIQUITINA

Els gens de poliubiquitina estan constituïts per repeticions en tàndem capicua de monòmers d'ubiquitina. Podem trobar més d'un gen de poliubiquitina en un mateix organisme, els quals estan formats per nombres diferents de monòmers i poden estar regulats de manera diferent. El genoma humà i d'altres mamífers posseeix una família multigènica de gens de la ubiquitina amb una organització i seqüència de DNA inusual, ja que no hi ha espais entre les repeticions de les seqüències codificants, sinó que són adjacents.

Al genoma humà s'han identificat tres gens que tenen codificada la informació de la ubiquitina (UbA, UbB i UbC) i que donen lloc a mRNA de diferents longituds (650, 1100 i 2500 nucleòtids respectivament). UbB i UbC són dos gens de poliubiquitina que contenen tres i nou seqüències consecutives i repetides de la ubiquitina, sense cap espai o interrupció entre elles. UbA és un gen que té codificada la informació d'un monòmer de la ubiquitina (Wiborg *et al.*, 1985).

Al genoma murí també es detecten tres gens que tenen codificada la informació de la ubiquitina: UbA, UbB i UbC. Igual que en l'home, UbB i UbC són gens que tenen codificada la informació de transcrits de poliubiquitina, i el gen UbA que té codificada la informació d'un transcrit de la proteïna de fusió ribosomal de 52 aminoàcids (Finch *et al.*, 1992).

S'ha observat l'existència d'una gran homologia entre els gens de poliubiquitina de diferents espècies a la regió 3' no traduïda i a l'mRNA madur, fet que suggereix que la regió 3' podria tenir una funció reguladora de l'expressió gènica i que, a més, aquests gens podrien pertànyer a una subfamília amb origen comú.

4.2.3.5.2 GENS DE LES PROTEÏNES DE FUSIÓ RIBOSOMALS

Els gens de fusió ribosomals tenen codificada la informació de proteïnes que consisteixen en la fusió de ubiquitina amb proteïnes ribosomals de 52 aminoàcids (CEP52: *carboxy extension protein*) i de 76-81 aminoàcids (CEP76-81). La longitud d'aquestes proteïnes varia segons les espècies. Els gens CEP52 i CEP76-81 consisteixen en un monòmer de ubiquitina fusionat per l'extrem N-terminal a una seqüència que té codificada la informació d'una proteïna ribosomal. Hi ha un o dos gens de les proteïnes de fusió per organisme, i aquests contenen més introns a la zona codificant i a la regió 5' no codificant, a diferència del que passa als gens de poliubiquitina. Una característica

important d'aquests gens és la presència d'elements comuns amb els gens de les proteïnes ribosomals.

Sembla que aquestes proteïnes de fusió estan implicades en el processament del RNA ribosomal (Finley *et al.*, 1989). De fet, aquestes proteïnes són altament bàsiques i riques en cisteïnes, amb possibles motius de dits de zinc, fet que suggereix que poden unir-se a àcids nucleics, presumiblement RNA ribosòmic (Jentsch *et al.*, 1990).

4.2.3.6 REGULACIÓ DE L'EXPRESSION DE LA UBIQUITINA

La regulació dels gens de poliubiquitina i de les extensions ribosomals s'ha documentat en diverses espècies. En general, els gens de fusió ribosomals s'expressen preferentment en estats de creixement cel·lular. La ubiquitina en aquesta situació té relació amb l'activitat traduccional de la cèl·lula (Finley *et al.*, 1989; Redman i Rechsteiner, 1989). En canvi, els gens de poliubiquitina s'expressen preferentment en situacions d'estrès, on calen grans quantitats d'ubiquitina (Finley *et al.*, 1987; Müller-Taudenberger *et al.*, 1988).

L'augment de la temperatura i altres situacions d'estrès provoquen un increment transcripcional de les proteïnes de xoc tèrmic que actuen com a xaperonines. La ubiquitina també s'ha considerat com una proteïna de xoc tèrmic en la majoria d'espècies estudiades. Així, a elevades temperatures es produeix un increment de la transcripció dels gens de poliubiquitina presents a l'organisme (Mezquita i Mezquita, 1991). En humans se n'ha observat un increment quan hi ha una infecció cel·lular per virus (Kemp i Latchman, 1988), durant el creixement tumoral (Williams *et al.*, 1999), i en la síndrome de la immunodeficiència adquirida (Llovera *et al.*, 1998c). També s'han trobat variacions en la transcripció dels gens de poliubiquitina en els diferents estadis de desenvolupament i als diferents teixits d'un mateix organisme (Mezquita i Mezquita, 1991; Rocamora i Agell, 1990; Ohmachi *et al.*, 1989; Gausing i Barkardottir, 1986). La regulació d'aquests gens durant el desenvolupament podria estar modulada per l'acció hormonal (Reynolds i Hooley, 1992; Schwartz *et al.*, 1990).

4.2.3.7 FUNCIONS DE LA UBIQUITINA

Com ja s'ha explicat en l'apartat 4.2.3.2, la degradació proteica és la funció més estudiada i coneguda de la ubiquitina (revisat per Rechsteiner, 1987; Hershko, 1991;

Jentsch *et al.*, 1992; Varshavsky, 1992). Aquest sistema és molt important, tant en la degradació de la majoria de les proteïnes cel·lulars, com en el procés selectiu i de presentació d'antígens pel complex MHC de classe I (Rock *et al.*, 1994).

Hi ha també altres funcions que duu a terme la ubiquitina. S'ha suggerit que hi ha una relació entre la unió de la ubiquitina a les histones de determinats gens i l'augment de transcripció d'aquests (Levinger i Varshavsky, 1982; Nickel *et al.*, 1989). També, les ubiquitines sembla que estan implicades en la reparació del DNA (Redman i Rechsteiner, 1989).

També s'ha descrit que la ubiquitina participa en el control del cicle cel·lular i la transcripció. El paper de la ubiquitina en el cicle cel·lular s'ha proposat sobre la base del descobriment que certes proteïnes reguladores del cicle cel·lular són ubiquitinitzades segons l'estadi cel·lular. Se sap que la transició de la metafase a l'anafase s'indueix per la degradació de les ciclins mitòtiques per mitjà de la ubiquitina (Glotzer *et al.*, 1991). S'ha constatat també que certs reguladors transcripcionals poden ser marcats per la ubiquitina per a una degradació posterior mitjançant el sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina, com és ara el cas del repressor MAT α 2 (Hochstrasser i Varshavsky, 1990) i el factor transcripcional NF κ B (Palombella *et al.*, 1994).

Diferents evidències bioquímiques i genètiques donen suport fermament a la idea que el sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina és el principal sistema implicat en la degradació de les proteïnes danyades per efecte de l'estrès cel·lular en organismes eucariotes. En situacions on la cèl·lula es recupera d'un estrès oxidatiu, s'observa també un increment de l'activitat de conjugació de la ubiquitina (Shang *et al.*, 1997). De fet, l'eliminació de les proteïnes anormals, que es produeixen en resposta a l'estrès, és necessària a causa de la seva toxicitat, ja que tendeixen a formar precipitats que originen cossos d'inclusió (Parag *et al.*, 1987).

Altres funcions de la ubiquitina estarien relacionades amb les infeccions víriques on actuarien com a xaperonines en el procés de replicació vírica (Meyers *et al.*, 1989; Guarino, 1990), o que contenen seqüències de ubiquitina al seu genoma que estan correlacionades amb el grau de citopatogenicitat del virus (Meyers *et al.*, 1991). Aquests fets, però, semblen estar a favor d'un paper de la ubiquitina en l'eliminació de la infecció (Mayer *et al.*, 1991). També tenen un paper important en malalties neurodegeneratives i miodegeneratives, com l' Alzheimer (Finley i Chau, 1991), síndrome de Down, i malaltia de Parkinson (Mayer *et al.*, 1991), entre d'altres.

També s'ha proposat que el sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina pot estar lligat al sistema proteolític lisosomal i actuar amb aquest de manera cooperativa. Diversos estudis fets amb microscòpia electrònica revelen la presència de ubiquitina dins els lisosomes cosa que suggereix una possible via de degradació lisosomal dependent d'ubiquitina (Doherty *et al.*, 1989). A més, recentment s'ha identificat un senyal en la ubiquitina que pot estar involucrada en l'endocitosi mediada per la ubiquitina de proteïnes de membrana i la posterior degradació d'aquestes al lisosoma (Nakatsu *et al.*, 2000).

A continuació veurem la funció que duu a terme la ubiquitina en dues situacions: el creixement tumoral i la proteolisi muscular en estats catabòlics.

4.2.3.7.1 CREIXEMENT TUMORAL

Assatjos de transferència *Northern* mostren una sobreexpressió de l'mRNA d'una de les proteïnes de fusió ribosomals de la ubiquitina en la metàstasi de fetge i els tumors de còlon primaris en comparació amb la mucosa normal del còlon adjacent. Aquestes dades suggereixen que la maquinària traduccional de les proteïnes està altament activada durant la progressió i metàstasi de tumors de còlon, i que les proteïnes de fusió ribosomals de la ubiquitina poden ser un marcador molt útil de l'agressivitat biològica del tumor. Es postula que l'expressió selectiva d'aquesta proteïna de fusió ribosomal pot modular els factors de creixement necessaris per a la progressió del tumor als carcinomes colorectals (Mafune *et al.*, 1991). Wong *et al.* (1993) han demostrat que la cinètica d'inducció del gen d'aquesta proteïna de fusió ribosomal és gairebé idèntica a la dels protooncogens *c-jun* i *c-fos*, i que per tant, aquest gen sembla que és un nou gen de resposta prematura al creixement i que se sobreexpresa en carcinomes colorectals.

En cèl·lules tumorals renals humanes s'ha observat un augment marcat de l'expressió de l'mRNA de les subunitats del proteasoma i de l'expressió dels gens de les proteïnes de fusió ribosomals (CEP52 i CEP76-81) i els gens de la poliubiquitina UbC, fet que indica que aquest sistema proteolític està implicat en aquesta patologia (Kanayama *et al.*, 1991). S'han detectat també acumulacions de ubiquitina en diferents tumors primaris malignes (Ishibashi *et al.*, 1991).

4.5.3.7.2 PROTEÒLISI MUSCULAR DURANT ESTATS CATABÒLICS

El desgast muscular que es produeix en pacients o animals amb caquèxia (com ara durant el càncer, les infeccions cròniques o els traumatismes) sembla que està relacionat amb un augment de la degradació proteica, sense afectar pràcticament la síntesi proteica. Això comporta l'aparició d'un balanç nitrogenat negatiu al múscul. El sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina semblava que podria tenir un paper important en aquesta situació de desgast del teixit muscular (Furuno i Goldberg, 1986; Han *et al.*, 1988), i de fet, així s'ha demostrat posteriorment en diverses situacions patològiques (Argilés *et al.*, 1998).

El nostre grup d'investigació ha treballat durant molts anys en aquest camp, i ha aconseguit resultats que indiquen que aquest sistema proteolític és el que contribueix en més mesura en aquesta proteòlisi incrementada durant la caquèxia. Així, s'ha demostrat un increment dels nivells de conjugats d'ubiquitina (García-Martínez *et al.*, 1993) i també un augment de l'expressió dels gens relacionats amb el sistema dependent de ubiquitina (Llovera *et al.*, 1994) al múscul esquelètic de rates portadores de tumor que indueix caquèxia. Aquesta activació del sistema dependent d'ubiquitina es va demostrar també en un model d'incubació de múscul esquelètic *in vitro* (Llovera *et al.*, 1995). L'activació del sistema dependent d'ATP i ubiquitina no sembla estar relacionada amb l'augment de la concentració circulat de glucocorticoides (augment que es dona en la caquèxia, apartat 2.3), com tampoc un antagonista dels receptors de glucocorticoides (RU38486) no pot evitar l'activació del sistema (Llovera *et al.*, 1996a). En dejuni, en canvi, sí que són capaços d'activar el sistema proteolític dependent d'ubiquitina (Wing i Goldberg, 1993). L'activació del sistema proteolític, a més, es pot fer revertir si s'administren agonistes β_2 -adrenèrgics, com ara el clenbuterol (Costelli *et al.*, 1995a).

Com ja s'ha comentat en l'apartat 2.7, el TNF- α té un paper destacat en situacions de caquèxia cancerosa, i el nostre grup d'investigació ha demostrat la implicació d'aquesta citocina en l'activació del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina. Així, el tractament amb anticossos anti-TNF- α fa revertir l'increment d'expressió dels gens relacionats amb el sistema (ubiquitina i la subunitat C8 del proteasoma) (Llovera *et al.*, 1996b). Els ratolins *knockout* pel receptor de tipus 1 del TNF- α portadors de tumor no presenten expressions elevades dels gens del sistema dependent d'ubiquitina, la qual cosa indica que l'activació del sistema induïda per la

citocina està mediada per la unió al receptor de tipus 1 (Llovera *et al.*, 1998a). Els ratolins portadors de l'adenocarcinoma de Lewis que sobreexpressen el receptor soluble del TNF- α no aconsegueixen bloquejar els efectes produïts pel tumor sobre el recanvi proteic, ni sobre l'expressió dels gens de la ubiquitina ni la subunitat C8 (Llovera *et al.*, 1998b). També l'administració de TNF- α intravenosa provoca un increment de l'expressió dels gens de la ubiquitina al múscul esquelètic de rates sanes (García-Martínez *et al.*, 1994a). Recentment, s'ha demostrat que el TNF- α actua directament sobre l'activació del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina (Llovera *et al.*, 1997).

Algunes citocines com ara l'IFN- γ i la IL-1 administrades intravenosament provoquen un increment de l'expressió dels gens de la ubiquitina, mentre que la IL-6 i el LIF (*leukaemia inhibitory factor*) no produeixen cap canvi de l'expressió (Llovera *et al.*, 1998d). Altres estudis, en canvi, indiquen que la IL-1 no sembla estar involucrada en l'activació de la proteòlisi en rates portadores de tumor (Costelli *et al.*, 1995a).

En models experimentals d'infecció aguda també s'ha demostrat l'activació del sistema de la ubiquitina al múscul esquelètic. Així, el lligament i la punció cecal, que comporta un quadre sèptic als animals, provoca un increment de l'expressió dels transcrits dels gens de poliubiquitina (García-Martínez *et al.*, 1995). Tiao *et al.* (1994) van utilitzar el mateix model de lligament i punció cecal per induir sèpsia, i van observar increments del 50% i del 440% en la degradació de la proteïna total i miofibril·lar respectivament. Aquest increment estava associat a un increment de la proteòlisi dependent d'ATP i a un increment dels conjugats d'ubiquitina, de l'expressió del gen de la ubiquitina (Tiao *et al.*, 1994), i de l'expressió d'E2 (Hobler *et al.*, 1999). S'han demostrat resultats equivalents en pacients humans (Tiao *et al.*, 1997). Algunes citocines com ara la IL-6 no semblen estar involucrades en l'activació de la proteòlisi en rates afectades per infeccions agudes (García-Martínez *et al.*, 1994b).

També en models d'acidosi s'ha descrit un augment de l'activitat d'aquest sistema proteolític (Mitch *et al.*, 1994), fet que explicaria la pèrdua persistent de massa muscular que acompanya els pacients afectats per una insuficiència renal crònica, i que pot revertir amb l'administració de bicarbonat per tal de compensar l'estat acidòtic dels pacients.

Els pacients afectats per la SIDA mostren símptomes clars de caquèxia, i també presenten un increment de l'expressió dels gens del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina al múscul esquelètic (Llovera *et al.*, 1998c).

Les rates a les quals s'ha induït diabetis mitjançant la injecció d'estreptozotocina també mostren un increment de la degradació proteica, que està associada a un increment de l'expressió dels gens de la poliubiquitina (Rodríguez *et al.*, 1998) i dels enzims E2 i E3 (Lecker *et al.*, 1999b).

Hi ha treballs on s'indica que en situacions catabòliques hi ha més degradació de la fracció miofibril·lar per part del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina: en pacients en estat crític amb atrofia de les fibres musculars hi ha una associació entre la pèrdua de filament de miosina i la presència d'ubiquitina (Helliwell *et al.*, 1998).

4.2.3.7.1.1 ESTRATÈGIES PER IMPEDIR LA PROTEÒLISI DEPENDENT DEL SISTEMA PROTEOLÍTIC DEPENDENT D'ATP I UBIQUITINA

La inhibició del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina podria esdevenir una aproximació molt atractiva per al tractament de la síndrome de la caquèxia i del balanç nitrogenat negatiu associat a aquesta. De fet hi ha diversos estudis on s'ha aconseguit una inhibició del sistema en models animals. Alguns estudis amb inhibidors del proteasoma apunten a la possibilitat de ser utilitzats com a agents anticancerígens (revisat per Murray i Norbury, 2000). Alguns exemples d'aquests inhibidors del proteasoma són el PS-341 (Adams *et al.*, 1999), el qual té un efecte antitumoral; el PSI (Fischer *et al.*, 2000) que evita l'activació de la proteòlisi en un model animal de sèpsia; la lactacistina (Lazarus *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 1998); la LLnL (Fang *et al.*, 1998); la β -lactona (Fang *et al.*, 1998); l'MG132 (Price *et al.*, 1996), els quals també impedeixen l'activació de la proteòlisi en diferents situacions catabòliques. Calen, però, més estudis en relació amb aquests inhibidors, ja que provoquen efectes negatius per a l'organisme com, per exemple, el bloqueig de la generació de pèptids presentats per l'MHC de classe I (Rock *et al.*, 1994).

La pentoxifil·lina (inhibidor de la fosfodiesterasa) podria utilitzar-se també com a agent antitumoral, ja que a més d'actuar com a inhibidor de la transcripció del TNF- α , també bloqueja l'expressió augmentada dels gens de la ubiquitina, de l'enzim E2 i de la subunitat C2 del proteasoma 20S, al múscul esquelètic d'animals portadors de tumor (Combaret *et al.*, 1999).

4.3 APOPTOSIS

4.3.1 MORT CEL·LULAR

La mort cel·lular pot esdevenir per un dels dos mecanismes coneguts fins ara: necrosi o apoptosi. Els dos processos presenten diferències en l'aparença morfològica de la cèl·lula durant el procés de mort, segueixen mecanismes reguladors diferents, i el seu significat biològic és també diferent (Taula 2).

	NECROSI	APOPTOSI
Estímul	toxines, hipòxia severa, depleció d'ATP, estrès químic o tèrmic, inhibidors metabòlics	condicions fisiològiques i patològiques sense depleció d'ATP
Requeriment d'energia	no	dependent d'ATP
Histologia	cèl·lules inflades, trencament dels orgànuls	condensació de la cromatina, cossos apoptòtics, mort de les cèl·lules aïllades
Patró de degradació del DNA	fragments de mides a l'atzar (smear)	escalament de fragments de múltiples de 180 pb
Membrana plasmàtica	lisi	intacte, amb evaginacions i alteracions moleculars (externalització de fosfatidilserines)
Fagocitosi de les restes cel·lulars	mitjançant fagòcits immigrants	mitjançant cèl·lules veïnes
Reacció del teixit	inflamació	sense inflamació

Taula 2. Comparació de les característiques principals de la necrosi i l'apoptosi (Adams *et al.*, 2001).

4.3.1.1 NECROSI

La necrosi s'ha associat amb condicions que comporten un dany a la membrana de la cèl·lula, un desajust osmòtic, fluxos d'ions i un inflament de la cèl·lula. Tots aquests factors provoquen la mort de la cèl·lula per necrosi. El flux d'entrada passiu i l'acumulació de Ca^{2+} són els mecanismes específics desencadenants de la necrosi (Sandri i Carraro, 1999). En el procés de necrosi, el trencament de la membrana plasmàtica és un fet que té lloc molt ràpidament, i com a conseqüència apareix la inflamació del teixit que comporta un dany secundari a aquest (Adams *et al.*, 2001). Es considera que no és necessària l'expressió de nous mRNA o proteïnes per al procés de la necrosi (Schwartz i Osborne, 1993). La necrosi és la causa de molts canvis destructius associats a situacions patològiques com són el trauma, la hipòxia, la depleció d'energia i la inflamació. S'ha observat recentment que la cèl·lula que ha rebut un primer senyal apoptòtic, però que no pot acomplir el programa de mort per apoptosi, acaba executant el procés de mort per necrosi (Sandri i Carraro, 1999). Una de les causes per no continuar amb el procés d'apoptosi podria ser la depleció d'ATP dins la cèl·lula, necessari per a moltes reaccions del procés apoptòtic. Per això, se suggereix que tant l'apoptosi com la necrosi podrien compartir els mateixos senyals d'activació (Sandri i Carraro, 1999), com ara la trimerització del receptor Fas (Vercammen *et al.*, 1998) o la unió del TNF- α al seu receptor (Laster *et al.*, 1988). A més, els dos processos de mort cel·lular poden coexistir en una mateixa situació i el mateix teixit, com és ara el cas de l'infart de miocardi (Haustetter i Izumo, 1998).

4.3.1.2 APOPTOSI

El terme apoptosi va aparèixer en la bibliografia mèdica el 1972 per descriure un tipus de mort cel·lular diferent del conegut fins llavors, responsable de la pèrdua de cèl·lules als teixits vius (Kerr *et al.*, 1971 i 1972). De fet, el primer estudi de l'apoptosi es va fer el 1965, quan es va descriure la mort regulada de músculs de larves en desenvolupament (Lockshin i Williams, 1965).

L'apoptosi es pot considerar com un programa fisiològic i conservat de suïcidi cel·lular i com un mecanisme que controla el balanç de la proliferació cel·lular (revisat per Sandri i Carraro, 1999). Les cèl·lules d'un organisme multicel·lular s'autodestruïen quan no són necessàries o són danyades per algun factor. Ho fan a

través de l'activació de maquinària controlada genèticament que condueix al suïcidi cel·lular o apoptosi. La supervivència de totes les cèl·lules d'organismes multicel·lulars depèn de la constant repressió d'aquest programa de suïcidi mitjançant senyals d'altres cèl·lules (Steller, 1995).

L'any 1972, Kerr *et al.* van descriure per primera vegada les característiques morfològiques de l'apoptosi, que inclouen la reducció del volum cel·lular, l'aparició d'evaginacions a la membrana plasmàtica, la divisió de la cèl·lula en diversos fragments envoltats de membrana (a vegades orgànuls intactes) anomenats cossos apoptòtics, la condensació del citoplasma, la condensació de la cromatina nuclear, i la degradació del DNA catalitzada per una endonucleasa (taula 2) (revisat per Adams i Carraro, 2001). Una característica particular de l'apoptosi és que la membrana plasmàtica de la cèl·lula es manté intacta fins a les últimes etapes del procés (Kerr *et al.*, 1972). Alguns canvis en diverses molècules de la membrana cel·lular asseguren que, als teixits, les cèl·lules apoptòtiques siguin reconegudes i fagocitades per cèl·lules veïnes o macròfags. Aquest fenomen evita l'activació de processos inflamatoris, els quals conduirien a un dany tissular secundari (Kerr *et al.*, 1972; Bursch *et al.*, 1990).

La mort cel·lular per apoptosi és un procés coordinat i actiu que requereix ATP com a font d'energia (Tsuijimoto, 1997; Kroemer *et al.*, 1998). S'ha demostrat que la pèrdua del potencial de membrana mitocondrial és un dels primers fets que apareixen quan la cèl·lula comença el procés d'apoptosi, i llavors es perd la producció d'ATP deguda a la fosforilació oxidativa (Zamzami *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1996). Així, la quantitat d'ATP que cal per finalitzar el procés d'apoptosi ha de ser subministrada per la glicòlisi.

Recentment, s'han identificat diverses vies de senyalització que condueixen a l'apoptosi. El punt final comú de totes les vies és l'activació de les cisteïna-proteases, conegudes també amb el nom de caspases (Thornberry i Lazebnik, 1998) (vegeu l'apartat 3.4.2). L'activació de les caspases a la seva vegada dona com a resultat l'activació de proteïnes CAD (*caspase activated DNAase*), que condueixen finalment a la mort cel·lular (Figura 5).

L'apoptosi té un paper fisiològic molt important durant el desenvolupament embriogènic i en el control del nombre de cèl·lules en teixits proliferatius. A més, s'ha descrit que al cervell madur (Heron *et al.*, 1993; Linnik *et al.*, 1993), al cor (Gottlieb *et al.*, 1994; Buerke *et al.*, 1995; Mallat *et al.*, 1996; Narula *et al.*, 1996), i al timus (Ayala *et*

al., 1995) apareixen processos apoptòtics en resposta a diversos estímuls perjudicials per a aquests teixits.

Es coneix força bé la regulació de l'apoptosi en cèl·lules immunocompetents, però encara es desconeix molt del procés de mort programada als teixits sòlids i diferenciats, com és ara el cas del múscul esquelètic (Burgess *et al.*, 1999). De fet, definir la relativa importància de l'apoptosi nuclear a les fibres musculars és complicat, a causa de la presència de centenars de mionuclis a cada una de les fibres (Tidball *et al.*, 1995).

En aquesta tesi s'aprofundirà, bàsicament, en l'apoptosi del múscul esquelètic.

4.3.2 MÈTODES PER A LA DETECCIÓ DE L'APOPTOSI

La detecció de l'apoptosi es basa en dues característiques del procés: els canvis en la morfologia cel·lular (Kerr *et al.*, 1972) i en la fragmentació internucleosomal del DNA (Wyllie, 1980).

4.3.2.1 MÈTODES MORFOLÒGICS

Els mètodes de microscòpia, com ara la microscòpia electrònica, la microscòpia confocal o la microscòpia òptica, són utilitzats per detectar les alteracions morfològiques del nucli cel·lular.

Amb la microscòpia electrònica es va detectar apoptosi al teixit cardíac en una situació de degeneració del sistema de conducció (James *et al.*, 1993), en un model experimental d'insuficiència cardíaca (Saraste *et al.*, 1997), i en un model humà de miocardi (Elsasser *et al.*, 1997). La limitació d'aquesta tècnica és que la detecció d'un sol nucli apoptòtic és molt difícil. A més, els cardiomiòcits i els miòcits de múscul esquelètic no presenten la morfologia nuclear clàssica associada a l'apoptosi, malgrat l'observació de la fragmentació del DNA (Ohno *et al.*, 1998; Gottlieb *et al.*, 1994).

La microscòpia òptica ofereix una idea més aproximada de la magnitud de l'apoptosi en un teixit. En cèl·lules apoptòtiques, és possible detectar l'externalització de les fosfatidilserines (taula 1) amb el marcatge amb anexina 5. La tinció específica es pot avaluar mitjançant el microscopi òptic convencional, o mitjançant l'anàlisi per FACS (*fluorescence activated cell sorter*). En alguns teixits, les cèl·lules apoptòtiques es poden identificar mitjançant una tinció convencional histològica o utilitzant tincions

específiques de nuclis, com ara el iodur de propidi o la tinció Hoechst (revisat per Adams *et al.*, 2001).

4.3.2.2 MÈTODES MOLECULARS I BIOQUÍMICS

Un dels mètodes més utilitzats per detectar l'apoptosi d'una secció de teixit és la reacció del TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling*) (Gavrieli *et al.*, 1992). Aquest mètode es basa en el marcatge de l'extrem 3' lliure del DNA mitjançant la transferasa terminal. El marcatge es pot detectar amb tècniques d'immunohistoquímica. Aquesta tècnica sembla que no és gaire fiable a vegades, perquè hi ha resultats de falsos negatius i falsos positius amb freqüència, així que actualment s'estan proposant millores de la tècnica (Negosecu *et al.*, 1996; Labat-Moleur *et al.*, 1998). La tinció, a més, depèn molt del temps de fixació de les mostres (Davison *et al.*, 1995), del tractament proteolític de la secció tissular (Negoescu *et al.*, 1996; Migheli *et al.*, 1994) i de la concentració de nucleòtids i de la transferasa terminal utilitzada per marcar (Migheli *et al.*, 1994). De fet, una anàlisi recent ha demostrat que els miòcits de pacients amb cardiomiopatia dilatada que presentaven apoptosi segons la tècnica del TUNEL eren en realitat cèl·lules amb una activitat molt incrementada de la reparació del DNA (Kano *et al.*, 1999).

Hi ha diverses tècniques basades amb mètodes immunològics que detecten i quantifiquen les proteïnes relacionades amb l'apoptosi, com ara la Bcl-2, el protooncogen Bax, la Bcl-X_L, el trencament de PARP (*poly-ADP-ribose polymerase*) induït per caspases, l'alliberament mitocondrial del citocrom c, o el processament de la procaspasa 3 (Saraste, 1999; Duriez i Shah, 1997; Sgonc i Gruber, 1998; Narula *et al.*, 1999). L'inconvenient de totes aquestes tècniques és que han de ser considerades només com a evidències indirectes de l'apoptosi (revisat per Adams *et al.*, 2001).

Un altre mètode molt utilitzat, basat en la segona característica de l'apoptosi (la fragmentació internucleosomal del DNA), és la separació dels fragments del DNA cel·lular en gels d'agarosa (*DNA-laddering*). Aquesta tècnica aprofita la peculiaritat següent: durant el procés apoptòtic, el DNA és tallat en punts localitzats entre les unitats nucleosomals, i es generen fragments mononucleosomals i oligonucleosomals (múltiples de 180 pb). Aquests fragments es poden visualitzar en un gel d'agarosa i presenten un aspecte d'escala (*ladder*). L'inconvenient d'aquesta tècnica és la dificultat de quantificar el procés apoptòtic, i que cal una quantitat de teixit força elevada per

aïllar el DNA. A més, no tots els tipus cel·lulars presenten aquesta característica, i a vegades el processament de la cromatina pot ser inhibit sense afectar els altres processos apoptòtics (Jacobson *et al.*, 1994; Schulze-Osthoff *et al.*, 1994).

La tècnica del COMET permet la detecció de la fragmentació del DNA en una cèl·lula aïllada. El grau d'apoptosi s'analitza quan se sotmet el DNA a una migració mitjançant l'electroforesi d'un microgel (permet analitzar una sola cèl·lula) en condicions alcalines (Singh *et al.*, 1988; Fairbairn *et al.*, 1995).

4.3.3 MECANISME MOLECULAR PER A LA REGULACIÓ DE L'APOPTOSI

Hi ha un gran coneixement pel que fa a la regulació de l'apoptosi en cèl·lules immunocompetents (revisat per Ju *et al.*, 1999 i Tsubata, 1999) (Figura 13). S'han descrit dues vies d'activació de l'apoptosi: la primera consisteix en l'associació dels dominis de mort (*death domains*) a proteïnes com ara Fas i caspasa 8, fet que estimula l'activació d'altres caspases (Muzio *et al.*, 1996); la segona depèn de l'estímul intracel·lular mitjançant senyals d'estrès cel·lular, i inclouen l'alliberació del citocrom c del mitocondri, que juntament amb l'APAF (*apoptosis protease activating factor*), estimula l'activació de caspases (caspasa 9, 3...) (Li *et al.*, 1997; Srinivasula *et al.*, 1998).

D'altra banda, als teixits sòlids, especialment a les cèl·lules multinucleades com ara en el cas del múscul esquelètic, l'inici i la regulació de l'apoptosi és encara força desconeguda. En aquesta tesi es resumiran els coneixements sobre diferents factors importants per a la transsenyalització de l'apoptosi en cèl·lules musculars.

4.3.3.1 CASPASSES

L'apoptosi pot ser induïda endògenament mitjançant un programa genèticament definit, o bé mitjançant proteïnes exògenes, citocines i hormones, o compostos xenobiòtics (radiació, estrès oxidatiu i hipòxia). Un component central del mecanisme de senyalització, que finalitza amb la mort cel·lular per apoptosi, és l'activació de diverses proteases anomenades procaspases (Zhvotosky *et al.*, 1997). Yashuhara *et al.* (1999) van estudiar la incidència de l'apoptosi després d'efectuar cremades en un model experimental de rata i van observar que tant sota la superfície cremada com als músculs situats en llocs distants a la cremada, les caspases 1, 3 i 9 eren activades, i que es podia

4.3.3.2 MITOCONDRI I ALLIBERAMENT DE METABÒLITS REGULADORS DE L'APOPTOSI

Certes alteracions de la funció mitocondrial induïdes per diversos factors (toxines) estan associades amb canvis del potencial de membrana. Un cop s'ha perdut el potencial de membrana mitocondrial, la conductància del porus de transició s'incrementa, i fa que el mitocondri sigui més permeable, i el citocrom c i el factor d'inducció de l'apoptosi (FIA) siguin alliberats al citosol (Figura 5). Aquest increment de la permeabilitat el pot evitar el protooncogen Bcl-2 (Kroemer, 1998; Kluck *et al.*, 1997; Zamzami *et al.*, 1996; Susin *et al.*, 1996), localitzat a la membrana mitocondrial externa (Kroemer, 1998). Un cop al citosol, el citocrom c activa l'oligomerització d'APAF-1 (*apoptosis protease activating factor*) (Liu *et al.*, 1996; Zou *et al.*, 1997 i 1999), un homòleg de la proteïna ced-4 (*cell death protein*) de *Caenorhabditis elegans* (Yuan i Horvitz, 1990). Un cop activat l'APAF-1, s'uneix i activa la procaspasa 9. El complex format pel citocrom c, APAF-1 i la procaspasa 9 es designa amb el nom d'apoptosoma (Li *et al.*, 1997).

Pel que fa a resultats obtinguts al múscul esquelètic, no hi ha encara dades disponibles, però almenys als cardiomiòcits s'ha documentat un increment de 15-20 vegades de la concentració del citocrom c al citoplasma, que dóna com a resultat l'activació de la caspasa 3 (Narula *et al.*, 1999).

4.3.3.3 APAF-1

A més de l'alliberament del citocrom c, APAF-1 és un factor important per a l'activació de la procaspasa 9 mitjançant el citocrom c. Un treball recent de Burgess *et al.* (1999) ha demostrat que l'APAF-1, un factor central en l'activació de la caspasa 3, no era detectable al múscul esquelètic d'humans sans a la proteïna, i només hi havia un senyal feble pel que fa al seu mRNA (James *et al.*, 1993; Zou *et al.*, 1997). Tot i això, encara no hi ha resultats sobre l'expressió d'APAF-1 en situacions patofisiològiques on realment es detecta l'apoptosi al múscul esquelètic.

4.3.3.4 FAMÍLIA Bcl-2

L'alliberament de factors apoptòtics mitocondrials com ara el citocrom c i la FIA al citoplasma és controlat pels reguladors de l'apoptosi de la família de la Bcl-2 (Figura 5). En aquesta família es poden diferenciar membres que promouen la supervivència de les cèl·lules (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X_L), i membres amb efectes proapoptòtics (Bax, Bad, Bcl-X_S) (Kroemer, 1997; Reed, 1997).

Els mitocondris purificats de cèl·lules que sobreexpressen la Bcl-2 (membre de la família antiapoptòtica) presenten una protecció contra la inducció de permeabilitat mitocondrial i l'alliberament del citocrom c i FIA, i contra la inducció posterior de mort cel·lular mitjançant apoptosi (Kluck *et al.*, 1997; Susin *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997). D'altra banda, la sobreexpressió de Bax (membre de la família proapoptòtica) provoca la dissipació del potencial de membrana, i inicia així el senyal que finalitzarà amb la inducció de l'apoptosi. En diversos treballs s'analitza l'expressió relativa dels membres proapoptòtics i antiapoptòtics de la família Bcl-2. S'ha observat que en diferents malalties, on l'apoptosi pot ser detectada als miòcits esquelètics, l'expressió de Bcl-2 no varia o bé disminueix, mentre que l'expressió de Bax incrementa, i decanta d'aquesta manera el balanç entre factors proapoptòtics i antiapoptòtics cap a la inducció de mort cel·lular per apoptosi (Sandri *et al.*, 1997 i 1998a; Vescovo *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 1999). S'ha observat que la Bcl-2 és degradada específicament després de l'estimulació de cèl·lules endotelials amb TNF- α , i ho fa a través del sistema dependent d'ATP i ubiquitina i no a través de les caspases (Dimmeler *et al.*, 1999).

4.3.3.5 ÒXID NÍTRIC

L'òxid nítric (NO) podria ser un altre possible factor inductor del senyal apoptòtic al múscul esquelètic. S'ha demostrat que el NO té el potencial per induir apoptosi en cultius cel·lulars de timòcits de ratolí (Fehsel *et al.*, 1995), macròfags (Messmer *et al.*, 1996), miòcits ventriculars de rata (Arstall *et al.*, 1999) i de mioblasts de múscul esquelètic de rata (Stangel *et al.*, 1996). Recentment, l'expressió de la isoforma induïble de la sintasa d'òxid nítric (iNOS) s'ha observat als miòcits esquelètics de pacients afectats per insuficiència cardíaca crònica (Adams *et al.*, 1997; Riede *et al.*, 1998). A més, l'expressió de iNOS es correlaciona inversament amb la capacitat d'efectuar un exercici en aquests pacients (Hambrecht *et al.*, 1999). Adams *et al.* (1999)

van demostrar, a més, que els pacients afectats per insuficiència cardíaca crònica que presentaven apoptosi en les biòpsies de múscul esquelètic, també mostraven una expressió més elevada de la iNOS. Aquests resultats indiquen que el NO és un estímul potencial per a l'apoptosi al múscul esquelètic d'aquests pacients. El mecanisme pel qual el NO indueix l'apoptosi podria ser a través del peroxinitrit, un potent producte proapoptòtic del NO i del superòxid (Arstall *et al.*, 1999). Un altre mecanisme possible podria ser a través d'una via depenent del mitocondri en la qual el NO podria incrementar el potencial de membrana i modificar químicament el citocrom c, i alterar-ne així l'estructura i facilitar-ne l'alliberament del mitocondri al citosol, on activaria la caspasa 3 (Hortelano *et al.*, 1999).

4.3.4 APOPTOSI AL MÚSCUL ESQUELÈTIC

La mort de cèl·lules musculars s'observa en diverses situacions fisiològiques i patofisiològiques. L'apoptosi s'ha relacionat amb aquesta mort de cèl·lules musculars en alguns casos. La mort per apoptosi de les cèl·lules musculars en situacions fisiològiques es concentra en els estadis de proliferació de mioblasts, en els processos de diferenciació de les cèl·lules musculars i en la formació de miotúbuls (Sandri i Carraro, 1999). Al múscul esquelètic diferenciat, el fenomen de l'apoptosi també s'ha observat en situacions patològiques com veurem en l'apartat 4.3.4.2.

4.3.4.1 SITUACIONS FISIOLÒGIQUES

4.3.4.1.1 MIOBLASTS EN CULTIU

Els mioblasts són cèl·lules germinals estimulades per reiniciar el seu cicle cel·lular. Els mioblasts es poden diferenciar i fusionar formant els miotúbuls, o bé morir abans si estan afectats per situacions com ara la retirada dels factors de creixement (Smith *et al.*, 1995; Stewart i Rotwein, 1996), el dany al DNA (Soddu *et al.*, 1996 i 1998; Sandri *et al.*, 1998b), l'estrès oxidatiu (Stangel *et al.*, 1996), les alteracions en el procés de cicle cel·lular (Wang i Walsh, 1996b; Mampuru *et al.*, 1996; Fimia *et al.*, 1998) o en el metabolisme cel·lular (Mampuru *et al.*, 1996; Rufini *et al.*, 1997), i alteracions al citosquelet (Bhagwati *et al.*, 1997). Tots aquests factors poden induir l'activació de l'apoptosi dels mioblasts (revisat per Sandri i Carraro, 1999). La majoria d'experiments

per estudiar l'apoptosi s'han fet en cultius de cèl·lules derivades del teixit muscular (C2C12, L6).

S'ha observat que la calpastatina, inhibidor de les calpaïnes, suprimeix l'apoptosi dels mioblasts (Mampuru *et al.*, 1996). També s'ha detectat una activació del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina durant l'apoptosi dels mioblasts induïda per la retirada del factor de creixement (Mampuru *et al.*, 1996; Smith, 1996) o bé als ratolins *mdx* quan fan exercici (Sandri *et al.*, 1997).

Durant la diferenciació dels mioblasts, també hi pot haver la inducció d'apoptosi si les cèl·lules s'exposen a substàncies com ara esteroides anabòlics (Abu-Shakra *et al.*, 1997), o bé se les sotmet a un dany del DNA (Sandri *et al.*, 1998b), o es pertorba l'estat G₀ en el qual són les cèl·lules (Endo i Nadal-Ginard, 1998). La inducció de l'apoptosi als mioblasts durant la diferenciació pot ser mediada per Fas (Figura 5) (Kang *et al.*, 1997; Giurisato, 1998), i per la disminució de l'expressió de Bcl-2 i Bcl-6 (Dominov *et al.*, 1998; Kumagai *et al.*, 1999).

4.3.4.1.2 MÚSCUL ESQUELÈTIC IMMADUR: ESTUDIS *IN VIVO*

La primera vegada que es va observar l'apoptosi al múscul esquelètic va ser en insectes. De fet, durant la metamorfosi hi ha una degradació massiva dels músculs (Lockshin i Williams, 1965). Durant la diferenciació de la granota *Xenopus laevis*, els músculs de la cua dels capgrossos es fragmenten mitjançant apoptosi, i grans trossos de múscul són fagocitats (Nishikawa i Hayashi, 1995). Schwartz *et al.* (1990) van associar la mort cel·lular programada del procés de desenvolupament dels músculs abdominals d'un insecte (*Manduca sexta*) amb un increment dels nivells del gen de la poliubiquitina. Altres grups d'investigació van observar resultats similars (Lauzon *et al.*, 1993; Fahrbach i Schwartz, 1994). Posteriorment, un altre grup d'investigació va confirmar els resultats observats per Schwartz *et al.* van aportar, a més, que els nivells proteics de la ubiquitina i els enzims del sistema proteolític al qual pertany aquesta molècula (E1, E2 i E3) s'incrementaven a causa de la disminució dels nivells circulants de l'hormona 20-hidroxiecdisona. La disminució d'aquesta hormona també induïx l'apoptosi als músculs abdominals durant el desenvolupament de l'insecte adult. Així, el sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina sembla estar involucrat en l'apoptosi muscular que hi ha durant la metamorfosi dels insectes (Haas *et al.*, 1995).

S'ha observat un tipus de fragmentació, relacionada amb la que experimenten els capgrossos, als músculs esquelètics embrionaris d'ocells (McClearn *et al.*, 1995) i mamífers (Kaminska i Fidzianska, 1996), incloent-hi l'home (Fidzianska, 1996). L'apoptosi als músculs embrionaris és un fenomen ben documentat (Webb, 1977; Fidzianska i Goebel, 1991). En aquesta situació es considera un procés en el qual l'excés de cèl·lules immadures són eliminades (revisat per Sandri i Carraro, 1999).

4.3.4.2 SITUACIONS PATOLÒGIQUES

4.3.4.2.1 DISTRÒFIA MUSCULAR

La distròfia muscular de Duchenne (DMD) és una de les malalties musculars més estudiades. Aquesta distròfia es caracteritza per un desgast del teixit muscular i per la mort prematura dels pacients a conseqüència d'una insuficiència respiratòria. Tot i que el defecte primari al múscul distròfic està molt ben caracteritzat (Hoffman *et al.*, 1987), la relació entre la proteïna citosquelètica distrofina i la mort cel·lular no està encara determinada. Moltes de les característiques de la mort cel·lular dels músculs deficients en distrofina són pròpies de la necrosi, com ara l'elevació patològica del calci intracel·lular, l'increment del volum sarcoplasmàtic, la morfologia aberrant dels mitocondris i la inflamació (Bulfield *et al.*, 1984; Carnwath i Shotton, 1987; Anderson *et al.*, 1988; Cullen i Jaros, 1988; Stedman *et al.*, 1991). Ara bé, el model de la mort del miòcit, mitjançant necrosi, no explica la relativa tardança de l'aparició clínica de la patologia muscular (tres anys en els pacients de DMD, i 3-4 setmanes en els ratolins *mdx*, afectats per una distòfia muscular). Es creu que hi ha d'haver un detonant per a la mort cel·lular entre l'absència de la distrofina i la mort de les cèl·lules musculars. Hi ha molts estudis on s'ha analitzat la incidència d'apoptosi en mostres de múscul esquelètic de pacients afectats per la DMD i d'un model animal de la distròfia (*mdx*).

El 1995, dos treballs van demostrar que al múscul esquelètic de ratolins *mdx* l'apoptosi precedia la necrosi, i que aquest fenomen continuava durant el període de la patologia de la malaltia (Matsuda *et al.*, 1995; Tidball *et al.*, 1995). Diversos treballs posteriors van confirmar aquestes observacions (Spencer *et al.*, 1997; Sandri *et al.*, 1997, 1998a i 1998b). Sandri *et al.* (1997) van demostrar, a més, que l'índex apoptòtic dels ratolins *mdx* s'incrementava dràsticament després de fer un exercici físic, mentre que als músculs d'animals controls només es detectava un petit increment. Aquest fet podria

explicar el dany muscular causat per l'exercici i la seva influència en la progressió de la DMD. La incidència de l'apoptosi en ratolins *mdx* s'estima que és del 0,5-2% del total de nuclis (Smith *et al.*, 1995; Matsuda *et al.*, 1995; Tidball *et al.*, 1995; Sandri, *et al.* 1995). La ubiquitina, juntament amb membres de la família de Bcl-2, estan involucrades també en la fase activa de la distròfia *mdx* en ratolins (Veal i Jackson, 1996). Pel que fa a la inducció de l'apoptosi en aquest model animal de distròfia, hi ha un estudi que apunta que els limfòcits citotòxics T podrien ser-ne els detonants, mitjançant un mecanisme depenent de la perforina (Spencer *et al.*, 1997).

Hi ha altres models experimentals de distròfia on s'ha observat apoptosi. En ratolins amb distròfia muscular deguda a la deficiència de la proteïna laminina $\alpha 2$, es va verificar també la inducció a l'apoptosi (Mukasa *et al.*, 1999; Miyagoe *et al.*, 1997). Ratolins *knockout* pel gen de γ -sarcoglicà, però que tenen funcional la distrofina, presenten apoptosi a les fibres musculars, cosa que suggereix que aquesta és un fet primerenc del procés de distròfia muscular (Hack *et al.*, 1998).

En biòpsies de múscul esquelètic obtingudes de pacients de DMD, els resultats referents a la presència de mionuclis apoptòtics són encara controvertits. En estudis recents, s'ha demostrat que les fibres musculars presenten apoptosi segons la metodologia del TUNEL (Sandri *et al.*, 1998a; Tews i Goebel, 1997a), però no han pogut ser confirmats mitjançant estudis que utilitzen la metodologia del *DNA-laddering* (Olivé *et al.*, 1997; Inukai *et al.*, 1997). Behrens *et al.* (1997) van utilitzar la metodologia d'immunohistoquímica i van detectar presència de Fas i Bcl-2 (en menys del 5% de les fibres analitzades), i no van obtenir resultats positius mitjançant el TUNEL. Inukai *et al.* (1997) van analitzar fibres de pacients afectats per DMD i distròfia muscular de Becker, i van observar un 17% de fibres positives pel marcatge de Fas, però tampoc no van observar apoptosi mitjançant la tècnica del TUNEL. Els pacients amb distròfia muscular espinal presenten un 2,3-3% de mionuclis apoptòtics (Migheli *et al.*, 1997). En altres tipus de distròfia (degudes a la deficiència d'adalina, merosina...) també s'observen nuclis apoptòtics (al voltant del 12% de les miofibres analitzades) (Tews i Goebel, 1997a). Molts d'aquests nuclis estan localitzats a l'interstici (on hi ha cèl·lules inflamàtores i cèl·lules satèl·lit –cèl·lules amb capacitat proliferativa en situació de dany muscular–) (Sandri *et al.*, 1998a). En la distròfia muscular de *limb-girdle*, l'apoptosi mionuclear correlaciona amb la deficiència de la calpaïna 3 (Baghdiguiian *et al.*, 1999).

4.3.4.2.2 ATRÒFIA

La reducció de l'activitat neuromuscular deguda a denervació, immobilització de les extremitats posteriors o gravetat zero durant vols espacials, dóna com a resultat una atròfia ràpida i substancial de les fibres musculars (Roy *et al.*, 1991). Els mecanismes pels quals la mida de la fibra muscular es redueix inclouen vies transcripcionals i post-transcripcionals (Howard *et al.*, 1989; Thomason *et al.*, 1992).

Molts estudis han demostrat que l'atròfia muscular associada amb la reducció de l'activitat neuromuscular està acompanyada per la reducció del nombre de mionuclis per fibra muscular (Allen *et al.*, 1995 i 1996; Hikida *et al.*, 1997). Fins i tot abans de l'aparició del nom d'apoptosi en la ciència (Kerr *et al.*, 1972), Lee i Altschel (1963) van observar anomalies en la ultraestructura mionuclear després d'una denervació, com ara la condensació de la cromatina, la reducció nuclear, i la fragmentació del nucli. Gairebé totes les fibres musculars denervades mostren una expressió molt elevada de Bax (proapoptòtica), mentre que Bcl-2 i Bcl-X_L (antiapoptòtiques) s'expressen només en el 25% de les fibres (Tews i Goebel, 1997a). Allen *et al.* (1997) van estudiar si l'eliminació dels mionuclis durant l'atròfia muscular es devia a l'apoptosi en un model d'immobilització de les extremitats. Els autors van observar que el nombre de mionuclis que presentaven fragmentació del DNA augmentava després de tres dies de suspensió i mantenien aquesta proporció 14 dies després.

Hi ha observacions que apunten a una regulació del nombre de mionuclis per part dels efectes interactius de les hormones del creixement circulants i l'IGF-I (*insulin-like growth factor*). McCall *et al.* (1997) van demostrar que l'atròfia muscular estava associada amb una disminució dels nivells circulants de l'hormona del creixement. A més, el tractament amb IGF-I dels músculs d'animals que han estat immobilitzats, juntament amb exercici, redueixen significativament la freqüència de mionuclis apoptòtics (Allen *et al.*, 1997).

En humans s'han estudiat malalties que tenen associada l'atròfia del múscul esquelètic a desordres a les neurones motores: polineuropatia, esclerosi lateral amiotròfica i atròfia muscular espinal. Les fibres atrofiques dels pacients afectats per la polineuropatia i l'esclerosi lateral amiotròfica presenten mionuclis apoptòtics (14 i 44% respectivament) i es detecta la presència d'expressió de Bcl-2, Bax i ICE (*interleukin-1 β converting enzyme* o caspasa 1) (Tews *et al.*, 1997b). En pacients amb atròfia muscular espinal també hi ha una inducció de l'apoptosi a les fibres musculars (Fidzianska *et al.*,

1990), tot i que encara hi ha controvèrsia amb els resultats obtinguts segons les metodologies aplicades (Inukai *et al.*, 1997; Migheli *et al.*, 1997).

4.3.4.2.3 ISQUÈMIA I REPERFUSIÓ

La isquèmia, amb la reperfusió posterior o sense, és una causa comuna i clínicament important de producció de dany tissular en molts òrgans. L'apoptosi, després de la isquèmia i la reperfusió posterior, s'ha observat en cèl·lules endotelials hipòxiques (Gobe *et al.*, 1999), i en cèl·lules de diferents teixits, com ara l'intestí (Horie *et al.*, 1997) i el cor (Bielawska *et al.*, 1997; Yue *et al.*, 1998).

Els resultats que hi ha sobre l'apoptosi dels miòcits esquelètics després d'una isquèmia són encara controvertits. Hachiya i Kazui (1996) van demostrar que la mort cel·lular deguda a la isquèmia es produeix tant per necrosi com per apoptosi. D'altra banda, Knight *et al.* (1999) van observar apoptosi a les cèl·lules endotelials, cèl·lules musculars llises i cèl·lules del sistema immunitari; mentre que les cèl·lules de múscul esquelètic esdevenen necròtiques. Cowled *et al.* (2001) van observar que eren els neutròfils infiltrats i no les cèl·lules musculars, les que presentaven apoptosi a causa de la reperfusió. Així, encara no hi ha cap treball que demostrï si les cèl·lules de les fibres musculars moren per necrosi o apoptosi durant la isquèmia i la seva reperfusió.

4.3.4.2.4 INSUFICIÈNCIA CARDÍACA CRÒNICA

La insuficiència cardíaca crònica està associada a una mortalitat elevada, intolerància a l'exercici, i a fatiga prematura. Hi ha diverses mesures de paràmetres biològics per determinar el nivell de tolerància de l'activitat de l'individu afectat per aquesta malaltia, com ara l'activitat ventricular (Szlachcic *et al.*, 1985; Higginbotham *et al.*, 1983) i el flux sanguini regional.

Diversos treballs fets amb múscul cardíac demostren l'existència d'apoptosi durant malalties com ara la insuficiència cardíaca crònica, la mort sobtada cardíaca, la miocarditis vírica i la isquèmia (Gottlieb *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1994; Itoh *et al.*, 1995 i 1996; Kajstura *et al.*, 1996; James *et al.*, 1994; Buerke *et al.*, 1995; Packer, 1995; Umansky *et al.*, 1996).

S'ha estudiat l'existència i el significat de l'apoptosi als músculs esquelètics de pacients afectats per la insuficiència cardíaca crònica, com també en un model animal

de la malaltia (Vescovo *et al.*, 1998; Dalla Libera *et al.*, 1999; Cohen *et al.*, 1983). Es va detectar la presència de mionuclis apoptòtics en el 47% de biòpsies de múscul esquelètic de pacients humans analitzades, com també una disminució de l'expressió de Bcl-2 i un increment dels nivells de la iNOS (Adams *et al.*, 1999). L'existència d'apoptosi es correlacionava amb la capacitat reduïda de fer exercici (mesurada com a VO₂max), cosa que suggereix un significat funcional de l'apoptosi per la intolerància a l'exercici dels pacients afectats per la insuficiència cardíaca crònica. En el model animal d'aquesta malaltia (induïda amb monocrotalina), es va observar un increment dels mionuclis apoptòtics del múscul tibial (múscul ràpid); aquest increment d'apoptosi estava acompanyat d'una atròfia muscular (Vescovo *et al.*, 1998). Es va observar el mateix en un altre tipus de múscul esquelètic, el sòleus (múscul lent), tot i que en aquest teixit l'apoptosi no era tan elevada i no hi havia atròfia muscular (Dalla Libera *et al.*, 1999), fets que suggereixen que l'atròfia muscular apareix més tard als músculs lents que als músculs ràpids. A més, al sòleus es va observar una disminució de l'expressió de la proteïna antiapoptòtica Bcl-2, acompanyada d'un increment dels nivells de la caspasa 3 (Dalla Libera *et al.*, 1999). En experiments *in vitro*, l'exposició a la monocrotalina produeix una inducció clara de l'apoptosi a les cèl·lules endotelials arterials (Thomas *et al.*, 1998).

Així, sembla que en la insuficiència cardíaca crònica hi ha una inducció de l'apoptosi al múscul esquelètic, i que aquesta pot tenir influència en l'atròfia muscular i la seva capacitat de contracció.

4.3.4.2.5 MIOPATIES INFLAMATÒRIES

La polimiositis, la dermatomiositis i la miositis associada a cossos d'inclusió pertanyen al grup de miopaties inflamatòries. En les tres hi ha una proporció de fibres positives per Fas que oscil·la entre l'1 i el 50% (Behrens *et al.*, 1997) que en gran nombre es coexpressen amb Bcl-2. Behrens *et al.* no van detectar, però, apoptosi mitjançant la tècnica del TUNEL ni mitjançant la tècnica de DNA *laddering*, mentre que altres grups d'investigació sí que van observar fragmentació del DNA, però no a les fibres musculars, sinó només a les cèl·lules intersticials (Migheli *et al.*, 1997; Olive *et al.*, 1997). Tews i Goebel (1998) tampoc no van poder observar apoptosi a les fibres musculars d'aquests pacients, però van detectar-la a les cèl·lules inflamatòries. En un treball més recent, es detecta la presència de Fas i el lligand de Fas (FasL), però no es detecta cap senyal d'apoptosi. És més, s'ha demostrat un increment en l'expressió d'una

molècula antiapoptòtica (FLIP o *FLICE* (*Fas-associated death domain like IL-1 converting enzyme*)-inhibitory protein) (Nagaraju *et al.*, 2000). Fins al moment, només hi ha un treball que demostra l'existència d'apoptosi a les fibres musculars durant la polimiositis (1-2%) la qual es correlaciona amb l'activació del sistema FasL/Fas (Sugiura *et al.*, 1999).

4.3.4.2.6 MIOPATIES DEGUDES A DEFECTES MITOCONDRIALS

La idea que un defecte al mitocondri podria conduir al desenvolupament d'una malaltia va ser proposada per Luft *et al.* el 1962. Des de llavors, s'han descrit diverses miopaties amb característiques clíniques heterogènies correlacionades amb canvis en el nombre i la morfologia dels mitocondris musculars (revisat per Sandri i Carraro, 1999). Les miopaties estan causades, almenys en part, per la producció de ROS al mitocondri (Wallace *et al.*, 1995). Ara bé, com que el mitocondri té un paper important en l'activació de l'apoptosi a través de l'alliberació de factors com ara el citocrom c i el FIA (Figura 5), es creu que podria tenir un paper important en les miopaties degudes a defectes mitocondrials. Així, pacients amb miopaties que mostren defectes en la cadena respiratòria, presenten mionuclis apoptòtics (Monici *et al.*, 1998). En músculs que contenen delecions al DNA mitocondrial, s'ha demostrat l'existència d'expressió d'ubiquitina, Bcl-2 i Bax (DiMauro *et al.*, 1998). Altres defectes als mitocondris, com ara la deficiència del coenzim Q10, estan associats a la presència d'apoptosi al múscul esquelètic (Servidei *et al.*, 1998; Vita *et al.*, 1998)

4.3.4.2.7 OFTALMOPATIA ASSOCIADA A LA TIROIDE

L'oftalmopatia associada a la tiroide és una malaltia autoimmunitària caracteritzada per l'allargament del teixit muscular extraocular. També en aquesta patologia hi ha el fenomen de l'apoptosi als mionuclis, com també l'existència de Fas a la superfície de les miofibres (Koga *et al.*, 1998).

4.3.4.2.8 EXERCICI

Després de la realització d'exercici excessiu, el múscul esquelètic es pot danyar (Carraro i Franceschi, 1997). Les contraccions repetides d'estirament (activitat

eccèntrica) per part del múscul són més perjudicials que les contraccions que presenten una activitat isomètrica o concèntrica (contraccions d'escurçament). Això implica que els diferents tipus d'activitat del múscul provoquen danys mitjançant mecanismes diferents (Bar *et al.*, 1994).

Després d'una nit d'exercici espontani (girar dins una roda), els mionuclis apoptòtics incrementen als animals controls i als afectats per la distròfia *mdx* (Sandri *et al.*, 1997). Els conjugats d'ubiquitina de proteïnes solubles i miofibril·lars també s'incrementen als músculs de ratolins *mdx* després de l'exercici (Sandri *et al.*, 1996 i 1997), i en humans després de dos dies de fer un exercici d'estiraments (Thompson i Scordilis, 1994). Els mionuclis que presenten nivells elevats d'ubiquitina són també mionuclis apoptòtics (Sandri *et al.*, 1997). De fet, després d'un dany al DNA, la ubiquitina està fortament unida a les histones i a altres proteïnes de la matriu nuclear (Haas *et al.*, 1988). L'electroestimulació eccèntrica a baixa freqüència del sòleus i l'EDL de rata durant 4-24 hores provoca danys a nombroses fibres. Aquestes fibres musculars presenten nuclis apoptòtics (Biral *et al.*, 1998). Un cop s'ha deixat de fer l'exercici, l'apoptosi disminueix (Podhorska-Okolow *et al.*, 1998).

4.3.4.2.9 CREIXEMENT TUMORAL

En un estudi molt recent, s'ha estudiat l'apoptosi al múscul esquelètic quan s'implanta el tumor VX2 a conills. L'índex apoptòtic, mesurat per la tècnica del TUNEL, assoleix el 55% poc temps després d'inocular el tumor, moment on la pèrdua de massa magra és del 18% i encara no es veuen canvis en el ratio 3-metilhistidina/creatinina a l'orina. Quan la pèrdua de massa magra és del 30% i el ratio demostra la pèrdua de proteïna, l'índex apoptòtic és de només el 5%. Els autors suggereixen que podrien haver-hi dos mecanismes en el desgast muscular durant el creixement tumoral: apoptosi en les fases primerenques i anormalitats metabòliques al múscul en estadis més avançats (Ishiko *et al.*, 2001).

4.3.5 INCIDÈNCIA I SIGNIFICAT DE L' APOPTOSI AL MÚSCUL ESQUELÈTIC

Actualment, encara no es coneix la importància patofisiològica de l'apoptosi dels miòcits en certes malalties. Les dades publicades sobre la incidència de nuclis apoptòtics de cèl·lules de múscul esquelètic en malalties humanes i en models animals d'aquestes estan entre el 0,03% (Vescovo *et al.*, 1998) i el 2,1% (Sandri *et al.*, 1998a). Cal, per això, conèixer el significat i la importància de l'apoptosi al múscul esquelètic i resoldre preguntes com ara si aquesta petita pèrdua de nuclis afecta la integritat i les funcions dels miòcits. Aquest índex d'apoptosi baix, segons Howie *et al.* (1994), podria representar un recanvi cel·lular. Ells van demostrar que la depleció del 50% de cèl·lules CD4 dels nòduls limfàtics de ratolins es pot aconseguir mitjançant apoptosi en 48 hores, però la taxa d'apoptosi observada no augmenta mai per sobre de l'1,3%. Per tant, un petit nombre de nuclis apoptòtics detectats en un determinat moment al múscul esquelètic en diferents malalties, podria contribuir a una pèrdua substancial de massa muscular en un període de temps llarg. Llavors, donaria com a resultat una disminució de contractibilitat, entre d'altres conseqüències (Sandri *et al.*, 1998a; Adams *et al.*, 1999).

La rellevància i el significat de l'apoptosi al múscul esquelètic és difícil d'establir, pel fet que cada fibra muscular conté més de 100 nuclis, i que només una petita part de mionuclis presenta fragmentació del DNA (Allen *et al.*, 1997; Tews *et al.*, 1997c). Així, cal saber si la pèrdua d'un o pocs nuclis més podria alterar la morfologia i la funció de la fibra muscular. Referent a això, hi ha el concepte que un nucli controla una zona citoplasmàtica específica i que, per tant, la pèrdua del nucli podria estar associada a la pèrdua de control sobre la zona citoplasmàtica en qüestió (Landing *et al.*, 1974; Ralston i Hall, 1992). Recentment, Hikida *et al.* (1997) van demostrar que al múscul esquelètic atrofiat a causa de la manca de gravetat, el nombre de nuclis disminuïa proporcionalment amb la pèrdua del volum de la fibra muscular.

A les cèl·lules mononucleades, la cèl·lula apoptòtica és eliminada completament mitjançant la fagocitosis; mentre que, en el cas de cèl·lules multinucleades, només s'elimina el nucli apoptòtic, deixant la resta de cèl·lula intacta. Actualment no se sap com s'elimina aquest mionucli sense provocar danys als altres nuclis o a la mateixa cèl·lula, tot i que hi ha estudis fets amb altres tipus cel·lulars que apunten que podria

sofrir una desintegració sense conseqüències negatives per a la cèl·lula (Dipasquale i Youle, 1992).

4.3.6 CITOCINES

4.3.6.1 TNF- α

Aquesta citocina és una inductora de l'apoptosi en molts tipus cel·lulars (Jarvis *et al.*, 1994; Obeid *et al.*, 1993; Ohta *et al.*, 1994). Pel que fa als teixits musculars, es va començar a estudiar la implicació del TNF- α en l'apoptosi a les cèl·lules cardíques, ja que en moltes malalties coronàries s'observava el fenomen de l'apoptosi (Gottlieb *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1994; Itoh *et al.*, 1995 i 1996; Kajstura *et al.*, 1996; James, 1994; Buerke *et al.*, 1995; Packer, 1995; Umansky *et al.*, 1996). De fet, la citocina és produïda per les cèl·lules cardíques (Kapadia *et al.*, 1995; Giroir *et al.*, 1994), i és possible que les concentracions locals del TNF- α siguin superiors a les sistèmiques. També es detecta l'expressió dels receptors pel TNF- α als cardiomiòcits (Krown *et al.*, 1995; Torre-Amione *et al.*, 1995). El *death domain* del receptor TNFRI és present als cardiomiòcits, i s'ha relacionat amb l'apoptosi mediada per TNF- α a les cèl·lules no musculars (Figura 6) (Vanderabeele *et al.*, 1995), i això suggereix, per tant, que també podria estar implicat en l'apoptosi dels cardiomiòcits.

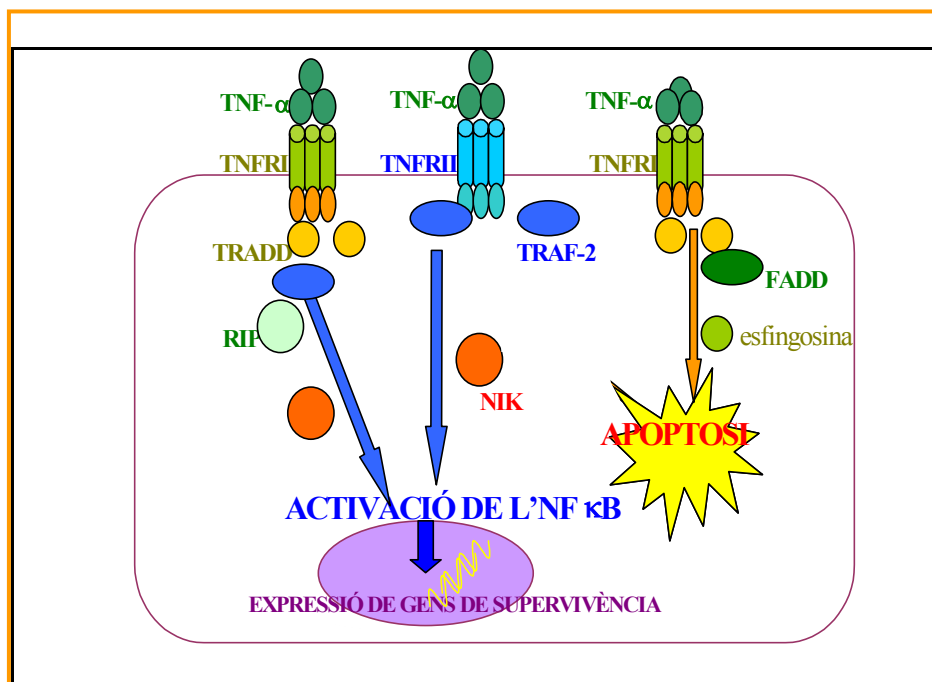


Figura 6. Transsenyalització del TNF- α : inducció de l'apoptosi /proliferació cel·lular per l'activació de l'NF κ B

Hi ha treballs on s'ha observat aquesta implicació del TNF- α en la inducció de la mort cel·lular per apoptosi als teixits musculars: als miòcits cardíacs (Krown *et al.*, 1996), i al cor i als vasos sanguinis (Haunstetter i Izumo, 1998; Karsan, 1998). Així, Krown *et al.* (1996) van demostrar que nivells fisiològics de la citocina induïen apoptosi als cardiomiòcits de rata *in vitro*. Aquesta inducció es feia a través del TNFR1, pel qual s'activava la producció d'un segon missatger, l'esfingosina (Figura 6). L'esfingosina és un inhibidor potent de la PKC, la qual protegeix la cèl·lula de la mort en fosforilar Bcl-2; d'aquesta manera, el TNF- α indueix la mort cel·lular per apoptosi mitjançant la regulació del Bcl-2. Una altra evidència de la implicació de la citocina en l'apoptosi es va observar quan s'injectava LPS a rates, i va donar com a resultat una inducció de l'apoptosi als cardiomiòcits, i sembla que aquesta inducció es deu a l'acció del TNF- α (Comstock *et al.*, 1998).

L'apoptosi al cor és un mecanisme molt efectiu, i presenta avantatges en la prevenció del dany ocasionat per malalties cardíques, ja que les cèl·lules cardíques actuen ràpidament sobre les cèl·lules apoptòtiques i impedeixen que afectin les cèl·lules veïnes; així, limiten l'àrea afectada per l'infart o la infecció vírica (Krown *et al.*, 1996). Aquesta eficiència per destruir ràpidament les cèl·lules apoptòtiques podria explicar també la baixa incidència de tumors cardíacs primaris (Goldstein *et al.*, 1995). Ara bé, hi ha inconvenients pel que fa a la inducció de l'apoptosi per part del TNF- α : els efectes cardiotòxics de la utilització de la citocina com a agent terapèutic (anticancerígen i antivíric) (Sidhu i Bollon, 1993).

A banda del paper del TNF- α com a inductor de l'apoptosi, s'han publicat diversos treballs que suggereixen que el TNF- α podria desenvolupar una acció protectora davant la isquèmia i la hipòxia cardíaca, ja sigui protegint els miòcits davant aquestes situacions (Nakano *et al.*, 1998; Eddy *et al.*, 1992) o bé estimulant l'expressió de factors antiapoptòtics i citoprotectors (Beg i Baltimore, 1996), i fins i tot facilitant la reparació del dany tissular un cop s'ha produït la manca d'irrigació al cor (Yokoyama *et al.*, 1997; Bozkurt, 1998). Aquest paper protector del TNF- α es pot perdre si l'expressió del seu gen és sostinguda o excessiva (Kurrelmeyer *et al.*, 2000). En un model animal d'isquèmia aplicat a ratolins *knockout* pels dos receptors del TNF- α (TNFR1-TNFR2) i a ratolins *knockout* per cada un dels receptors (TNFR1 i TNFR2), es va observar que els animals *knockout* pels dos receptors presentaven un increment del dany degut a l'infart que se'ls induïa, comparat amb els altres ratolins *knockout* (TNFR1 i TNFR2),

secundari a un increment de l'apoptosi als cardiomiòcits i independent de les diferències a l'anatomia cardíaca que presenten aquests animals respecte de la resta de grups. Els resultats suggereixen que el senyal de la citocina, a través de TNFR1 o TNFR2, és suficient per protegir els cardiomiòcits de l'apoptosi després de la inducció de la isquèmia (Kurrelmeyer *et al.*, 2000), i actuarien per vies redundants proporcionant citoprotecció als cardiomiòcits, o bé activant el TRAF-2 (Figura 6) (*TNFR-associated factor 2*), el qual està involucrat en la senyalització d'ambdós receptors. Llavors es produiria l'activació de l' $\text{NF-}\kappa\text{B}$ el qual incrementa l'expressió de proteïnes antioxidants com ara la Mn-superòxid-dismutasa, i altres proteïnes relacionades amb la supervivència de la cèl·lula (Rothe *et al.*, 1995; Das *et al.*, 1995; Weiss *et al.*, 1997). El TRAF-2 s'ha considerat com una via fortament antiapoptòtica (MacLachlan i Giordano, 1998). També s'ha observat que la Bcl-2 pot regular la via $\text{NF-}\kappa\text{B}$, ja que disminueix els nivells d' $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, l'inhibidor citosòlic de l' $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (de Moissac *et al.*, 1998), i s'allibera així la forma activa de l' $\text{NF-}\kappa\text{B}$, la qual és promotora de la supressió de l'apoptosi (Wu *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996a; Van Antwerp *et al.*, 1996).

Pel que fa a treballs fets amb múscul esquelètic, s'ha observat una implicació del $\text{TNF-}\alpha$ en l'apoptosi de sòleus i tibialis en un model d'insuficiència cardíaca crònica. Així, en els animals als quals s'indueix un atac de cor, s'observa un increment paral·lel dels nivells circulants de $\text{TNF-}\alpha$, i la inducció de l'apoptosi al múscul ràpid (tibial) sembla estar associada a aquest increment (Vescovo *et al.*, 1998), tot i que en altres estudis no s'observa cap associació entre l'increment del $\text{TNF-}\alpha$ i l'apoptosi al múscul lent (sòleus) (Dalla Libera *et al.*, 1999). A més, l'atròfia observada en aquests animals no sembla ser induïda per la via per la qual el $\text{TNF-}\alpha$ activa el sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina, sinó que sembla que és només dependent de l'apoptosi (Dalla Libera *et al.*, 1999).

El $\text{TNF-}\alpha$ és considerat el mediador fonamental de les reaccions inflamatòries i del dany tissular induït per trauma. Aquest empitjora la perfusió microvascular, incrementa el nombre de cèl·lules del sistema immunitari al lloc on s'ha produït el dany tissular, i induïx l'apoptosi al múscul estriat dels hàmmsters. L'aplicació de fred a la ferida té un efecte protector sobre els efectes descrits del $\text{TNF-}\alpha$ (Westermann *et al.*, 1999).

Finalment, experiments *in vitro* fets amb cultius de mioblasts esquelètics demostren que el $\text{TNF-}\alpha$ bloqueja la proliferació i incrementa l'apoptosi dels mioblasts,

mitjançant la supressió de l'expressió d'alguns membres de la família de l'IGF, els quals són essencials per mantenir la diferenciació i supervivència de les cèl·lules musculars (Meadows *et al.*, 2000).

4.3.6.2 ALTRES CITOCINES

S'ha observat, en models animals afectats per una insuficiència cardíaca, que l'IGF-I (*insulin-like growth factor I*), juntament amb l'hormona del creixement, produeix efectes beneficiosos pel que fa a la funció del miocardi, i un d'aquests és la prevenció de l'apoptosi (Delafontaine i Brink, 2000). De fet, la línia muscular C2 que no expressa IGF-II no es diferencia i, a més, les cèl·lules moren per apoptosi quan s'incuben en un medi de diferenciació (Lawlor i Rotwein, 2000). L'IGF-I sembla també implicat en la regeneració de la massa muscular als músculs atrofiats, en part a causa de l'estimulació proliferativa que exerceix sobre les cèl·lules satèl·lit del múscul (Chakravarthy *et al.*, 2000).

La combinació de l'interferó gamma (IFN- γ) amb la proteïna amiloide- β (causant de la miositis associada a cossos d'inclusió) estimulen la producció de NO²⁻ mitjançant la inducció de l'expressió de la iNOS a les cèl·lules en cultiu C2C12, un percentatge de les quals experimenta fragmentació del DNA (Baron *et al.*, 2000).

4.4 IMPLICACIÓ DE LA CALCINEURINA EN EL CREIXEMENT DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC

4.4.1 TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL

La calcineurina, també anomenada fosfatasa 2B (PP2B), és una serina treonina fosfatasa localitzada al citoplasma (Rao *et al.*, 1997; Crabtree, 1999). És un enzim ubiquu, però es troba en concentracions deu vegades més grans en cervell i múscul esquelètic que en altres tipus cel·lulars. La calcineurina és un heterodímer, format d'una subunitat catalítica (CNA) de 59 kDa que conté el domini d'unió a calmodulina i una regió autoinhibitòria, i d'una subunitat reguladora (CNB) de 19 kDa que s'uneix a Ca²⁺. Les dues subunitats són essencials per a la activitat catalítica de l'holoenzim, malgrat que la subunitat CNA pot activar-se de manera constitutiva, sense requeriments de Ca²⁺.

i calmodulina, per deleció de la regió reguladora carboxi-terminal (O'Keefe et al., 1992).

La calcineurina està estretament regulada per les concentracions de Ca^{2+} intracel·lular i es va descriure per primera vegada que podia ser activada en cèl·lules T activades en resposta a nivells elevats i sostinguts de Ca^{2+} intracel·lular (Flanagan et al., 1991). La calcineurina activa uneix membres de la família de factors de transcripció NF-AT defosforilats, produïnt la seva translocació al nucli on interaccionen amb el factor de transcripció AP-1 i activen diferents gens de citocines requerits per l'activació i proliferació de cèl·lules T (Rao et al., 1997; Crabtree, 1999). L'activitat de la calcineurina es pot inhibir per drogues immunosupressores com la ciclosporina A i el FK-506, les quals s'uneixen a proteïnes citoplasmàtiques de receptors, ciclofilina A i FKBP 12, respectivament, formant complexos que interaccionen amb la calcineurina, i per tant prevenen l'activació de gens dependents de la calcineurina i l'activació de cèl·lules T (Liu et al., 1991).

La resposta a la calcineurina també pot ser inhibida per proteïnes citoplasmàtiques que s'uneixen a la calcineurina, cabina/caïna (Lai et al., 1998; Sun et al., 1998) o MCIP1 (*myocyte-enriched calcineurin interacting protein 1*) i MCIP2 (Rothermel et al., 2000). L'activació de la proteïna cinasa C estimula l'associació de la cabina amb la calcineurina, produïnt-se així un mecanisme de retroalimentació negativa que inhibeix la transducció del senyal de la calcineurina en resposta a l'activació de les cèl·lules T (Sun et al., 1998). La cabina s'expressa al cervell de forma abundant, però els nivells són baixos en múscul esquelètic i cor (Lai et al., 1998), mentre que els nivells de MCIP1 i MCIP2 són més elevats en múscul estriat (Rothermel et al., 2000). L'expressió selectiva de teixit d'aquestes proteïnes que inhibeixen l'activitat de la calcineurina permet la possibilitat de desenvolupar drogues que poden actuar de manera teixit-específica per tal de regular la via de la calcineurina.

S'han identificat 5 gens que codifiquen per NF-AT (NF-ATc1/NF-ATc/NF-AT2; NF-ATc2/NF-ATp/NF-AT1; NF-ATc3/NF-ATx/NF-AT4; NF-ATc4/NF-AT3; NF-AT5). Tots els membres de la família NF-AT excepte el NF-AT5 s'activen mitjançant la calcineurina (Hoey et al., 1995; Rao et al., 1997; Crabtree, 1999; Lopez-Rodriguez et al., 1999). Malgrat que primerament la família NF-AT es va estudiar en cèl·lules T, aquestes proteïnes també s'expressen en altres tipus cel·lulars i les isoformes NF-AT2 i NF-AT4 són especialment abundants en múscul esquelètic (Hoey et al., 1995).

Els factors de transcripció NF-AT estan sotmesos a un cicle dinàmic i reversible de fosforilació/defosforilació que regula la seva localització al nucli i l'activació de gens dependents de NF-AT (Rao et al., 1997; Crabtree, 1999). En cèl·lules no estimulades, les proteïnes NF-ATc1/NF-ATc estan fosforilades en una regió rica en serines propera a l'extrem aminoterminal i es troben al citoplasma (Flanagan et al., 1991). La defosforilació d'aquestes serines per acció la calcineurina desenmascara dues seqüències de localització nuclear, resultant en la ràpida translocació al nucli d'aquestes proteïnes (Beals et al., 1997). Una vegada en el nucli, els factors NF-AT defosforilats poden tornar a ser refosforilats per una o més cinases. Aquestes creen un lloc de reconeixement fosforilat perquè actui la glicogen sintasa-3 cinasa (GSK3), la qual permet que els NF-ATs es transloquin al citoplasma i finalitzai la transcripció regulada per calcineurina (Beals et al., 1997). El NF-ATc3/NF-AT4 també pot ser fosforilat en el nucli per JNK i la combinació de MEKK1 i lacaseïna cinasa 1a (Chow et al., 1997; Zhu et al., 1998). S'ha suggerit que la fosforilació estimula l'exportació nuclear dels NF-ATs mitjançant l'exposició d'una seqüència nuclear exportadora o regulant la seqüència de localització nuclear. A més d'activar gens dependents de NF-AT, la calcineurina també pot activar la caixa MADS del factor de transcripció MEF2 mitjançant un mecanisme que encara no ha estat definit (Liu et al., 1997). MEF2 activa diferents gens primàrics, incloent-hi c-jun, així com alguns gens específics de múscul (revisat per Black i Olson, 1998).

4.4.2 CONTROL DE LA DIFERENCIACIÓ I LA REGENERACIÓ DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC

El coneixement de si la via de senyalització cel·lular calcineurina/NF-AT té funcions similars en el múscul cardíac i esquelètic és de molt interès, donat els elevats nivells d'expressió de certes isoformes de NF-AT en múscul esquelètic (Hoey et al., 1995; Abbott et al., 1998).

La diferenciació del múscul esquelètic implica la sortida irreversible del cicle cel·lular dels mioblasts, la fusió per formar miotubs multinucleats, i l'activació de la transcripció de gens específics de múscul. Abbot et al. (1998) van descriure que la ciclosporina A inhibia la diferenciació dels mioblasts *in vitro*, suggerint que l'activitat de la calcineurina és essencial per l'activació del programa de diferenciació cel·lular. S'ha descrit que les isoformes de NF-AT poden ser translocades de manera diferencial del

citoplasma al nucli en els diferents estadis de la diferenciació dels mioblasts, suggerint que poden respondre a senyals del citoplasma (Abbott et al., 1998).

El dany produït en el múscul esquelètic adult resulta en l'activació de cèl·lules satèl·lit miogèniques quiescents, adjacents a les fibres musculars, que es fusionen amb fibres musculars pre-existents i d'aquesta manera reparen el dany. La ciclosporina A impedeix la regeneració muscular en resposta al dany, el que suggereix un paper important de la calcineurina en el desenvolupament muscular *in vivo* (Abbott et al., 1998). Això podria explicar perquè els pacients que s'han sotmès a un transplantament i s'han tractat amb ciclosporina A presenten una debilitat muscular severa (Goy et al., 1989).

4.4.3 CONTROL DE LA HIPERTRÒFIA DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC

Els IGFs són inductors potents de la hipertròfia *in vivo* i *in vitro*, i actuen estimulants l'expressió dels canals de Ca^{2+} tipus L, els quals incrementen les concentracions de Ca^{2+} prop de la membrana cel·lular (Bruton et al., 1999; Wang et al., 1999). S'ha descrit que mioblasts de rata que expressaven un vector d'expressió d'IGF-1 o bé que havien estat incubats en presència d'IGF-1 presentaven una severa hipertròfia acompanyada d'un increment de l'expressió de la calcineurina i la seva localització nuclear (Musaro et al., 1999; Semsarian et al., 1999). A més, la ciclosporina A bloqueja la hipertròfia en resposta a l'IGF-1. Això suggereix que la calcineurina té un paper essencial en l'activació de la hipertròfia dels miòcits esquelètics mediada per IGF-1.

Tant l'IGF-1 com la calcineurina activada indueixen l'expressió de GATA2 (factor de transcripció de dits de zinc cardíac) en múscul esquelètic, el qual s'associa amb la calcineurina i a la forma defosforilada de NF-ATc1 (Musaro et al., 1999). Aquests fets suggereixen que el múscul esquelètic i cardíac comparteixen aspectes d'un sistema de senyalització hipertròfica comú mediat per la calcineurina i els factors de transcripció NF-AT i GATA.

Els nivells de Ca^{2+} intracel·lular són elevats en les fibres de múscul esquelètic en resposta a la sobrecàrrega muscular crònica (Hongbo et al., 1995), i recentment, s'ha observat que rates tractades amb ciclosporina A i FK-506 doblen la seva massa muscular alhora que incrementen les fibres musculars de tipus lent (Dunn et al., 1999). Aquests fets podrien suggerir que la via de senyalització de la calcineurina és

mediadora del creixement muscular induït per l'exercici, així com també la transformació del tipus de fibres. S'han descrit els efectes de la inhibició farmacològica de la calcineurina per reduir la massa muscular, l'expressió dels enzims del metabolisme oxidatiu i la proporció de fibres de tipus I (Goy et al., 1989; Hokanson et al., 1995; Mercier et al., 1995; Biring et al., 1998; Chin et al., 1998). En individus sotmesos a transplantaments que han rebut drogues antagonistes de la calcineurina, és difícil discernir entre les conseqüències directes en les propietats del múscul esquelètic de les conseqüències de la inactivitat física resultat de la malaltia que pateixen.

La miostatina, un membre de la superfamília de TGF- β que s'expressa específicament en múscul esquelètic, actua com un inhibidor de la hipertròfia del múscul esquelètic, mentre que en soques de ratolins transgènics portadors de mutacions en el gen de la miostatina presenten un increment important de la musculatura (McPherron et al., 1997).

4.4.4 PAPER DE LA CALCINEURINA EN L'ATRÒFIA MUSCULAR

Mentre que la implicació de la calcineurina en la hipertròfia del múscul esquelètic és un fet acceptat, el seu paper en l'atròfia muscular no és tan clar. S'ha descrit que el desgast muscular induït en rata per la secció de la medulla espinal s'associa amb uns nivells reduïts de calcineurina (Spangenburg et al., 2001). A més, l'activació de la via de senyalització de la calcineurina millora el dany muscular en ratolins *mdx* amb distròfia (Chakkalakal et al., 2004; Stupka et al., 2004). Altres estudis, malgrat això, han demostrat que els inhibidors de la calcineurina no bloquegen l'increment de la mida de les fibres induïda per l'activitat nerviosa en la regeneració muscular (Bodine et al., 2001). També s'ha demostrat que l'eficàcia de les estratègies dirigides a revertir el desgast muscular en dos models experimentals com l'extremitat en suspensió o la secció de la medulla espinal no es troba afectada per la inhibició de la calcineurina (Dupont-Versteedgen et al., 2002).

Com ja s'ha comentat anteriorment, existeix una relació estreta entre el desgast muscular i el TNF- α , donat que tractaments anti-TNF- α poden revertir, com a mínim en part, l'estat hipercatabòlic (Costelli et al., 1993, 2002). Es coneix poc la relació entre la calcineurina i el TNF- α . D'una banda, en cèl·lules B, així com també en cèl·lules T, la ràpida inducció del gen del TNF- α pot ser bloquejada per drogues immunosupressores

com la ciclosporina A o FK506 (inhibidors de la calcineurina) (Goldfeld et al., 1992). Goldfeld et al. (1994) varen observar que aquests inhibidors bloquejaven la inducció del mRNA del TNF- α i del seu promotor en cèl·lules T transfectades transitòriament amb un plàsmid que contenia la regió promotora del TNF- α . Per tant, es podria suggerir que la calcineurina és el principal mediador de l'expressió gènica del TNF- α en cèl·lules B i T activades. A més, s'ha descrit que els inhibidors de calcineurina són inhibidors potencials de la citotoxicitat induïda per TNF- α (Kantrow et al., 2000). D'altra banda, estudis recents suggereixen que la calcineurina comparteix amb el TNF- α la capacitat d'activar la transcripció mediada per NF- κ B, mitjançant un mecanisme diferent a la defosforilació i inactivació de I κ -B α (Pons i Torres-Aleman, 2000; Biswas et al., 2003). A més, Alzuherri et al. (2003) varen observar que en cèl·lules C2C12 que expressaven la calcineurina de manera constitutiva, hi havia una activació significativa de NF- κ B i una activació de NF-AT reduïda en presència de TNF- α , fets que anaven associats a la reducció de l'activitat fosfatasa, que és l'indicador de l'activitat de la calcineurina.

5. ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES. LA INTERLEUCINA 15 (IL-15): UNA CITOCINA ANABÒLICA

5.1 ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES

5.1.1 INCREMENTAR LA INGESTA

5.1.1.1 APROXIMACIÓ FARMACOLÒGICA

Derivats de la progesterona

Per contrarestar els efectes de l'anorèxia es poden utilitzar fàrmacs que estimulin la ingestió. Els derivats de la progesterona com l'acetat de megestrol (MA o la medroxiprogesterona (MPA) són fàrmacs sintètics, oralment actius. En humans aquests compostos milloren la gana, la ingestió calòrica i l'estatus nutricional en diferents casos clínics (Loprinzi et al., 1993a; Bruera et al., 1990; Neri et al., 1997). En el cas de MA, el mecanisme pel qual provoca un guany de pes no és conegut, malgrat això s'ha postulat

que el seu efecte està parcialment mediat pel neuropèptid Y, un estimulant del centre de la gana (Argilés et al., 1997a). Els casos d'humans tractats amb derivats de progesterona demostren que sí hi ha un efecte favorable en la gana i el guany de pes però aquest darrer s'atribueix a un increment en la massa grassa i no de la massa muscular (Von Roenn et al., 1994; Loprinzi et al., 1993b).

Carabinoids

Els carabinoids, presents en la marihuana i els seus derivats, tenen un efecte demostrat sobre el guany de pes corporal i per aquest motiu han estat utilitzats per incrementar la ingesta en pacients amb càncer (Mitchelson, 1992). El mecanisme pel qual els carabinoids exerceixen els seus efectes encara no s'ha aclarit. S'ha suggerit que aquests actuen mitjançant els receptors d'endorfina o bé inhibint la síntesi de prostaglandines (Mitchelson, 1992). Altres estudis proposen que el derivat de la marihuana podria actuar inhibint la producció/secreció de citocines (Watzl et al., 1991; Srivastava et al., 1998; Facchinetti et al., 2003).

Ciproheptadina

Hi ha evidències, tant en humans com en animals d'experimentació, que suggereixen que l'anorèxia podria estar mediada per un augment de l'activitat serotoninèrgica al cervell (Rossi-Fanelli i Cangiano, 1991; Laviano et al., 1996). Per això, per bloquejar l'activitat de la serotonina durant la caquèxia cancerosa s'ha fet servir la ciproheptadina, un antagonista de la serotonina amb propietats antihistamíniques, usualment utilitzat pel tractament d'al·lèrgies.

Insulina

Moltes de les principals alteracions associades al creixement tumoral inclouen la intolerància a la glucosa, l'augment de la gluconeogènesi i de l'activitat del cicle de Cori (reciclatge hepàtic del lactat generat pel tumor), i una accelerada lipòlisi i catabolisme protèic. Aquests canvis metabòlics van acompanyats per resistència a insulina i secreció directa d'insulina en resposta a la hiperglucèmia (Argilés et al., 1997a). Tenint això en compte, la caquèxia cancerosa pot millorar-se per l'ús d'insulina

exògena. Per exemple, en estudis amb animals, l'administració d'insulina va millorar el grau d'ingesta i el desgast muscular (Moley et al., 1988; Tessitore et al., 1993).

Corticoesteroides

Els corticoesteroides varen ser la primera aproximació farmacològica pel tractament de l'anorèxia en càncer. S'han fet servir per incrementar la ingesta en pacients amb càncer i molts estudis demostren que molts dels símptomes de la caquèxia com l'anorèxia i l'astènia poden ser parcialment mitigats pel tractament amb corticoesteroides com la dexametasona i la prednisolona (Vigano et al., 1994). El mecanisme d'acció dels corticoesteroides és ben conegut. La seva acció antiinflamatòria es dona per la inhibició de l'alliberament de TNF- α (Han et al., 1990) i també s'han relacionat amb la proteolisi muscular induïda per TNF- α , fet característic de la caquèxia (Hardin, 1993). Hi ha altres estudis, però, que descarten la implicació dels glucocorticoides en el desgast del múscul esquelètic associat a la caquèxia cancerosa (Llovera et al., 1996a).

Mediadors orexigènics i anorexigènics

López-Soriano et al., (1999) van observar baixos nivells circulants i una disminució en l'expressió gènica de la leptina en animals caquètics portadors de tumor. També s'han observat baixos nivells de leptina en sèrum de pacients amb càncer de pulmó avançat (Aleman et al., 2002) i de còlon (Arpaci et al., 2002). Malgrat això, en pacients amb fallida cardíaca crònica avançada s'han detectat elevats nivells circulants de leptina (Schulze et al., 2003), indicant una possible implicació de la leptina en el desenvolupament de la caquèxia cardíaca.

La grelina és un mediador orexigènic (un lligand endògen del receptor secretador de l'hormona del creixement) que s'ha descrit que té un paper clau en incrementar la gana i per tant la ingesta. En animals portadors de tumor i en rates afectades de fallida cardíaca el tractament amb grelina va produir una millora en el desgast muscular (Nagaya i Kangawa, 2003; Nagaya et al., 2001; Hanada et al., 2003). Curiosament, però, s'han observat nivells circulants de grelina en pacients amb fallida cardíaca crònica (Nagaya et al., 2001) i en pacients amb caquèxia cancerosa (Shimizu et

al., 2003). Sembla ser que això podria ser un mecanisme compensatori del balanç energètic negatiu.

5.1.1.2 APROXIMACIÓ NUTRICIONAL

La nutrició enteral és una alternativa a la via oral en pacients amb tumors avançats de cap, coll o carcinoma esofàgic que no poden tragar però conserven la gana i tenen un bon estatut (Vigano et al., 1994).

La nutrició totalment parenteral s'aplica a pacients amb càncer desnutrits que no poden rebre ni una nutrició oral o enteral. El seu ús clínic té resultats conflictius. Mentre que en alguns estudis s'observa que aquest tipus de nutrició té efectes beneficiosos (Bozzetti et al., 1987; Muller et al., 1982), altres, després d'avaluar les conseqüències del tractament conclouen que els beneficis són limitats i poden portar complicacions (Klein et al., 1986).

5.1.2 COMBATRE LES ALTERACIONS METABÒLIQUES

5.1.2.1 MEDIADA PER CITOCINES

La presència del tumor és un estímul invasiu que provoca l'alliberament de citocines per les cèl·lules del sistema immune. Les citocines que han estat implicades en la resposta caquètica són: TNF- α , IL-1, IL-6 i IFN- γ (Evans et al., 1989). Per combatre els canvis metabòlics produïts per aquestes citocines, l'estratègia podria dirigir-se a neutralitzar-los. Així, es poden neutralitzar les citocines mitjançant fàrmacs que en bloquegen la síntesi o l'acció (Yamamoto et al., 1998).

5.1.2.1.1 BLOQUEIG DE LA SÍNTESI

Pentoxifilina

La pentoxifilina, un derivat de la metilxantina, és un inhibidor de fosfodiesterasa que inhibeix la síntesi de TNF- α mitjançant la disminució de la transcripció gènica. Mentre alguns estudis que utilitzen animals d'experimentació suggereixen que la pentoxifilina és capaç de disminuir la toxicitat induïda per citocines

d'alguns agents antineoplàsics alhora que preserven l'eficàcia del tractament antitumoral (Balazs i Kiss, 1994), estudis clínics demostren que aquest fàrmac no millora la gana o no incrementa el pes corporal dels pacients caquètics (Goldberg et al., 1995). A més, la pentoxifilina també s'ha utilitzat el tractament de pacients caquètics amb SIDA sense bons resultats (Dezube et al., 1993).

Talidomida

S'ha demostrat que la talidomida (α -N-talidomidoglutaramida) suprimeix la producció de TNF- α per part dels monòcits *in vitro* (Sampaio et al., 1991) i normalitza els elevats nivells de TNF- α *in vivo* (Sampaio et al., 1993). La seva acció sembla ser deguda a la desestabilització selectiva del mRNA del TNF- α (Moreira et al., 1993). S'ha observat una millora en la qualitat de vida i guany de pes de pacients amb SIDA a relativament dosis baixes de talidomida (Klausner et al., 1996). La seva utilitat en el tractament de la caquèxia cancerosa encara no s'ha establert.

5.1.2.1.2 BLOQUEIG DE L'ACCIÓ

Anticossos i receptors solubles

En rates portadores de l'hepatoma ascític de Yoshida AH-130 (un tumor altament caquètic), la teràpia amb anticossos anti-TNF- α resulta en una reversió parcial de les alteracions associades tant al metabolisme lipídic (Carbó et al., 1994) com el proteic (Costelli et al., 1993). Malgrat això, en humans, el tractament amb anti-TNF- α no ha donat gaire bons resultats en la reversió del catabolisme proteic associat a la sèpsia (Reinhart et al., 1996). A més, l'ús clínic d'etanercept (proteïna de fusió contra el receptor p75 del TNF- α) o l'infliximab (anticòs monoclonal contra el TNF- α) en el tractament de la fallida cardíaca crònica tampoc han funcionat (Anker i Coats, 2002).

Altres drogues com la suramina (la qual prevé la unió de la IL-6 al receptor de membrana) bloqueja parcialment els efectes catabòlics associats amb l'adenocarcinoma 26 de còlon en ratolí (Strassmann et al., 1993). En humans, el tractament de malalts de SIDA amb anticossos anti-IL-6 ha resultat molt positiu en la febre i la caquèxia (Emilie et al., 1994).

Fent referència a altres citocines, la teràpia anti-IFN- γ també ha estat efectiva en la reversió de la caquèxia en ratolí portador del carcinoma de Lewis lung (Matthys et al., 1991) però no hi ha dades clíniques.

D'altra banda, el bloqueig de les accions de la IL-1, mitjançant un antagonista del receptor, en rates portadores de tumor no té cap efecte ni en el pes corporal ni en revertir el canvis metabòlics (Costelli et al., 1995a).

Citocines antiinflamatòries

El grau de la síndrome caquètica no només depèn de la producció de les citocines esmentades anteriorment, conegudes com citocines pro-inflamatòries sinó que també de les anomenades citocines anti-inflamatòries com són la IL-4, IL-10, i IL-12. A dosis baixes de IL-12 s'han observat efectes anticaquètics en el model d'adenocarcinoma de colon de ratolí, encara que són insuficients per inhibir el creixement tumoral. Els efectes de la IL-12 sembla que són dependents d'una important disminució de la IL-6 (Mori et al., 1996), que és la responsable de la caquèxia associada a aquest model tumoral (Tanaka et al., 1990; Fujimoto-Ouchi et al., 1995). Una acció similar s'ha descrit per IFN- γ (Bielefeldt-Ohmann et al., 1995).

Estudis realitzats en el nostre laboratori han proposat a la IL-15 com un factor anabòlic del múscul esquelètic (Quinn et al., 1995). Més endavant, en l'apartat 5.2 aprofundirem en les propietats i funcions d'aquesta citocina.

5.1.2.2 MEDIADA PER HORMONES

L'altra estratègia per evitar els canvis metabòlics que perjudiquen la salut del pacient seria la utilització d'hormones que revertissin algunes de les alteracions esmentades en l'apartat 1.2.

Hormona del creixement

L'administració de l'hormona del creixement resulta en un increment de tot el cos i de la síntesi proteica del múscul esquelètic (Wolf et al., 1992a; Fryburg et al., 1991; Manson et al., 1988). Així, s'ha demostrat en models experimentals que l'administració de hormona del creixement recombinant de rata a rates portadores de

tumor resulta en una considerable estimulació de la síntesi protèica (Ng et al., 1993). De la mateixa manera, que l'hormona del creixement també és beneficiosa en càncer (Wolf et al., 1992b), SIDA (Mulligan et al., 1993) i en la fallida cardíaca (O'Driscoll et al., 1997).

IGF-I

L'IGF-I actua com a mediador d'algunes propietats anabòliques de l'hormona del creixement (Froesch et al., 1985) i sembla que està implicat en la regulació del recanvi proteic (Florini, 1987). Altres estudis han demostrat que té un paper important en la proliferació de la cèl·lula muscular i la diferenciació (Florini et al., 1996). Donat que l'IGF-I estimula la captació d'aminoàcids i la síntesi protèica (Froesch et al., 1985), aquest factor és un candidat potencial per contrarrestar els canvis que es produeixen en el múscul esquelètic durant la caquèxia. A més, l'IGF-I també disminueix la lipòlisi (Froesch et al., 1985), una via metabòlica que s'activa en l'adipòcit durant la caquèxia cancerosa. S'ha obtingut resultats positius tant en models experimentals de tumor (Ng et al., 1992) i alguna millora en pacients amb SIDA (Lieberman et al., 1994).

Melatonina

Estudis recents han demostrat l'existència d'una relació recíproca entre l'activitat de les citocines i la immunomodulació de neurohormones o neuropèptids. Concretament, l'hormona pineal (melatonina) sembla que influencia l'activitat de citocines durant el creixement tumoral. L'administració de melatonina a pacients amb tumors metastàsics provoca una disminució en els nivells de TNF- α circulant (Lissoni et al., 1994) per inhibició de la secreció d'aquesta citocina, i una menor pèrdua de pes (Lissoni et al., 1996). A més, el tractament amb melatonina sembla que redueix la toxicitat a la quimioteràpia (Lissoni et al., 1997).

Somatostatina

La caquèxia cancerosa està associada a una disminució de la relació insulina/glucagó. Aquest fet podria ser el responsable del catabolisme progressiu característic de la caquèxia. Bartlett et al. (1994) van estudiar els efectes de la

somatostatina en combinació amb insulina i l'hormona del creixement en animals portadors de tumor. El tractament incrementava el pes de la carcassa, el pes muscular i el contingut proteic (Bartlett et al., 1994). A més la somatostatina disminueix els nivells de glucagó.

5.1.2.3 ALTRES

Esteroides anabòlics

Els esteroides anabòlics promouen l'acumulació de nitrogen de les proteïnes i per aquest motiu podrien utilitzar-se per contrarrestar la progressiva pèrdua de nitrogen associada a la caquèxia cancerosa. El tractament amb decanoat de nandrolona fa que disminueixi la pèrdua de pes en pacients amb carcinoma de pulmó (Patton et al., 1986). De la mateixa manera, l'oximetolona, un derivat de la testosterona, s'ha fet servir pel tractament de pacients caquètics amb SIDA on s'ha observat un guany en el pes corporal (Hengge et al., 1996). Tot i això, hi ha efectes secundaris associats com la masculinització, la retenció de líquids o la toxicitat hepàtica.

Agonistes β_2 -adrenèrgics

Aquests agonistes tenen efecte sobre el metabolisme proteic en múscul esquelètic, afavorint la deposició de proteïna. Així, el clenbuterol inhibeix la proteòlisi muscular durant el creixement tumoral (Costelli et al., 1995b; Carbó et al., 1997). Els agonistes β_2 -adrenèrgics també supprimeixen l'augment l'oxidació dels aminoàcids de cadena ramificada (BCAA) que succeeix en el múscul esquelètic durant la caquèxia (Costelli et al., 1995b). També s'ha observat un increment en la força de la musculatura respiratòria en pacients amb fallida cardíaca crònica que han estat tractats amb salbutamol. Malgrat això, aquestes drogues no milloren les alteracions del quàdriceps o la capacitat front l'exercici (Harrington et al., 2000).

Àcids grassos ω -3

Els àcids grassos poliinsaturats ω -3 (PUFA), presents en l'oli de peix, tenen un gran potencial com a reductors tant del creixement tumoral (Anti et al., 1992; Rose et al., 1993) com del desgast tissular, concretament del teixit adipós (Tisdale, 1993). Tisdale i Beck han demostrat que l'administració d'àcid eicosapentanoic (EPA) a ratolins portadors d'un adenocarcinoma de còlon resulta en una reversió de la caquèxia induïda pel tumor sense canvis en la ingesta (Tisdale, 1993; Beck et al., 1991). A més, l'EPA disminueix la taxa de degradació proteica en múscul esquelètic. En pacients amb càncer de pàncreas, el tractament amb càpsules d'oli de peix va produir una millora del pes corporal i l'estabilització de la despesa energètica basal (Wigmore et al., 1996).

Aminoàcids i nucleòtids

La proteòlisi muscular perifèrica, com succeeix durant la caquèxia cancerosa, serveix per mobilitzar aminoàcids que són necessaris per a la síntesi proteica en el fetge i en el tumor. Per tant, l'administració d'aminoàcids exògens sembla ser una bona estratègia per proveir aquests substrats preservant la massa muscular. Tayek et al. (1986) van utilitzar els BCAA en nutrició parenteral en pacients amb adenocarcinoma intra-abdominal avançat i van trobar una millora en la cinètica proteica i en la síntesi d'albúmina. D'altra banda, els BCAA s'han fet servir per contrarrestar l'anorèxia associada a la caquèxia cancerosa i es va observar una reducció de la gravetat de l'anorèxia (Cangiano et al., 1996). Sembla ser que els BCAA poden competir amb el triptòfan en el seu transport a través de la barrera hematoencefàlica, impeding així la seva acció anorexigènica en el sistema nerviós central.

La glutamina és un dels substrats més utilitzats pel tumor, el qual aconsegueix deplecionar a l'hoste d'aquest aminoàcid amb les corresponents conseqüències negatives. Per això s'ha utilitzat la suplementació amb glutamina en la nutrició parenteral i s'han trobat efectes beneficiosos en pacients amb transplantament de medul·la (Ziegler et al., 1992). Malgrat que hi ha arguments en contra d'aquest tractament per la seva potencialitat per activar el creixement del tumor, s'ha comprovat en models experimentals de tumor que potencia l'activitat antitumoral d'alguns agents, a l'augmentar el nombre de cèl·lules en fase S del cicle cel·lular, la fase de major susceptibilitat a la quimioteràpia.

D'altra banda, durant els estadis de creixement tumoral, la incrementada producció de lactat i degradació de cisteïna a sulfat i protons condueixen a una depleció del glutatió intracel·lular. Una possible estratègia per contrarrestar els estats catabòlics seria incrementar la disponibilitat de cisteïna, mitjançant la suplementació de N-acetilcisteïna. Aquesta teoria s'ha vist reforçada per estudis en pacients amb SIDA (Van Buren et al., 1990).

En el cas dels nucleòtids, estudis amb animals d'experimentació demostren que el seu ús com a suplement en la nutrició parenteral millora la resposta immune, l'activitat de les cèl·lules *natural killer* i la resistència a les infeccions (Van Buren et al., 1990). Per aquestes raons els nucleòtids podrien tenir un efecte positiu en el tractament de pacients amb càncer que reben quimioteràpia.

Sulfat d'hidrazina

Aquest compost és un inhibidor de la gluconeogènesi a partir de lactat i aminoàcids, per la qual cosa en principi serviria per contrarrestar l'augment en la gluconeogènesi i l'activitat del cicle de Cori observat en la caquèxia. Els primer assajos en pacients amb tumor han descrit una millora de les alteracions del metabolisme dels carbohidrats (Chlebowski et al., 1990) i una reducció del flux d'aminoàcids (Tayek et al., 1987).

Inhibidors de l'ACE

En pacients amb fallida cardíaca crònica, la inhibició de l'enzim convertidor de l'angiotensina (ACE) per enalapril redueix el risc de perdre pes i està relacionat amb una major supervivència (Anker et al., 2003). Altres inhibidors de l'ACE com el captopril, sembla que actuen disminuint la producció de TNF- α en les cèl·lules mononucleades (Zhao i Xie, 2001).

Fàrmacs antianèmics

Tant l'eritropoietina com l'epoetina- α han estat utilitzades per contrarrestar l'anèmia observada en pacients amb caquèxia cancerosa. Hi ha casos clínics on el

tractament de l'epoetina- α en combinació amb indometacina fa que s'observi una millora de l'hematòcrit juntament amb un increment del pes corporal i de la resposta inflamatòria hepàtica (Daneryd, 2002; Mantovani et al., 1999; Daneryd et al., 1998).

ATP i creatina

El manteniment del pes corporal és un balanç dels suplementes energètics. Molt sovint, en condicions catabòliques hi ha un increment de les demandes energètiques. Per aquesta raó, l'administració d'ATP podria potenciar que el balanç anés dirigit cap al guany de pes i la preservació de la massa magra corporal. Això ha estat confirmat per dades clíniques (Haskell et al., 1998; Agteresch et al., 2000; Agteresch et al., 2002).

De la mateixa manera, l'administració de creatina podria resultar en un increment del contingut de fosfocreatina del múscul esquelètic, la qual cosa podria protegir aquest teixit en condicions catabòliques. Aquest tractament ha estat efectiu en pacients amb fallida cardíaca crònica (Gordon et al., 1995).

5'deoxi-5-fluorouridina

La 5'deoxi-5-fluorouridina és un agent citostàtic que es metabolitza i resulta en un metabòlit actiu anomenat 5-fluorouracil, el qual és molt actiu en el tumor (Ishitsuka et al., 1980; Kono et al., 1983). Tanaka et al. (1990) van observar que el tractament de ratolins portadors d'un adenocarcinoma de còlon amb 5-fluorouracil produïa una millora en les alteracions metabòliques induïdes pel tumor (Tanaka et al., 1990). Aquests autors conclouen que l'acció antitumoral d'aquesta droga és independent de la seva acció antiproliferativa (eda et al., 1991), el que fa a aquest fàrmac un candidat tant pel tractament de la caquèxia com per un potencial quimioteràpic.

Inhibidors del proteasoma

L'increment de la degradació proteica en el múscul esquelètic durant la caquèxia implica l'activació del sistema proteasoma/ubiquitina. Així doncs, com a drogues potencials podríem suggerir els inhibidors d'aquest sistema proteolític com la lactacistina i la β -lactona, les quals poden bloquejar en les cèl·lules més del 90% de la degradació de proteïnes normals i de vida curta (Lee et al., 1998). Aquests compostos, però, tenen una elevada toxicitat perquè no són inhibidors específics del sistema

proteolític en el teixit muscular. Així doncs, cal trobar una molècula que bloquegi de manera específica la degradació de proteïnes miofibrilars en el múscul esquelètic.

Així, per al tractament de la síndrome de la caquèxia s'han de combinar diferents aproximacions farmacològiques per tal de fer revertir eficaçment els canvis metabòlics associats a la caquèxia, i també millorar l'estat anorèctic dels pacients. Una teràpia efectiva comportaria la millora de la qualitat de vida d'aquests pacients afectats, i podria contribuir a incrementar el temps de supervivència.

5.2 LA INTERLEUCINA 15 (IL-15): UNA CITOCINA ANABÒLICA

La IL-15 va ser identificada per dos grups d'investigadors de manera independent, per la capacitat del sobrenedant de cultius de dues línies cel·lulars diferents, la CV-1/EBNA i la HTLV-1 (virus-1 de la leucèmia humana de cèl·lules T), anomenada també Hut-102, d'estimular la proliferació d'una línia murina de cèl·lules T dependent de IL-2, la CTLL-2 (Burton *et al.*, 1994; Bamford *et al.*, 1994; Grabstein *et al.*, 1994). Es va observar que la línia cel·lular HTLV-1 secretava una limfocina d'aproximadament 15 kDa, originalment anomenada IL-T, que estimulava la proliferació de cèl·lules T i induïa l'activació de cèl·lules NK (Burton *et al.*, 1994; Bamford *et al.*, 1994). De manera simultània es va aïllar una citocina, anomenada IL-15, del sobrenedant de cultius de la línia epitelial de ronyó de simi CV-1/EBNA (Grabstein *et al.*, 1994). La IL-15 presentava moltes característiques comunes amb la IL-T, i posteriorment es va demostrar, utilitzant anticossos específics, que ambdues molècules eren idèntiques (Bamford *et al.*, 1996).

5.2.1 ESTRUCTURA GÈNICA I REGULACIÓ

El gen de la IL-15, de 34 kb, està mapat en humans en posició 4q31 i en ratolí en la regió central del cromosoma 8. L'estructura genòmica de la IL-15 humana conté 9 exons (7 exons codificants) i té un tamany semblant al gen murí; l'estructura murina conté 8 exons i 7 introns (Anderson *et al.*, 1995a; Krause *et al.*, 1996). Existeix un 97% d'homologia de seqüència entre la IL-15 humana i de simi (Grabstein *et al.*, 1994), i un 73% entre la humana i la murina (Anderson *et al.*, 1995a). S'ha determinat que la IL-15 humana manté activitats proliferatives similars a la IL-15 murina quan s'utilitza en

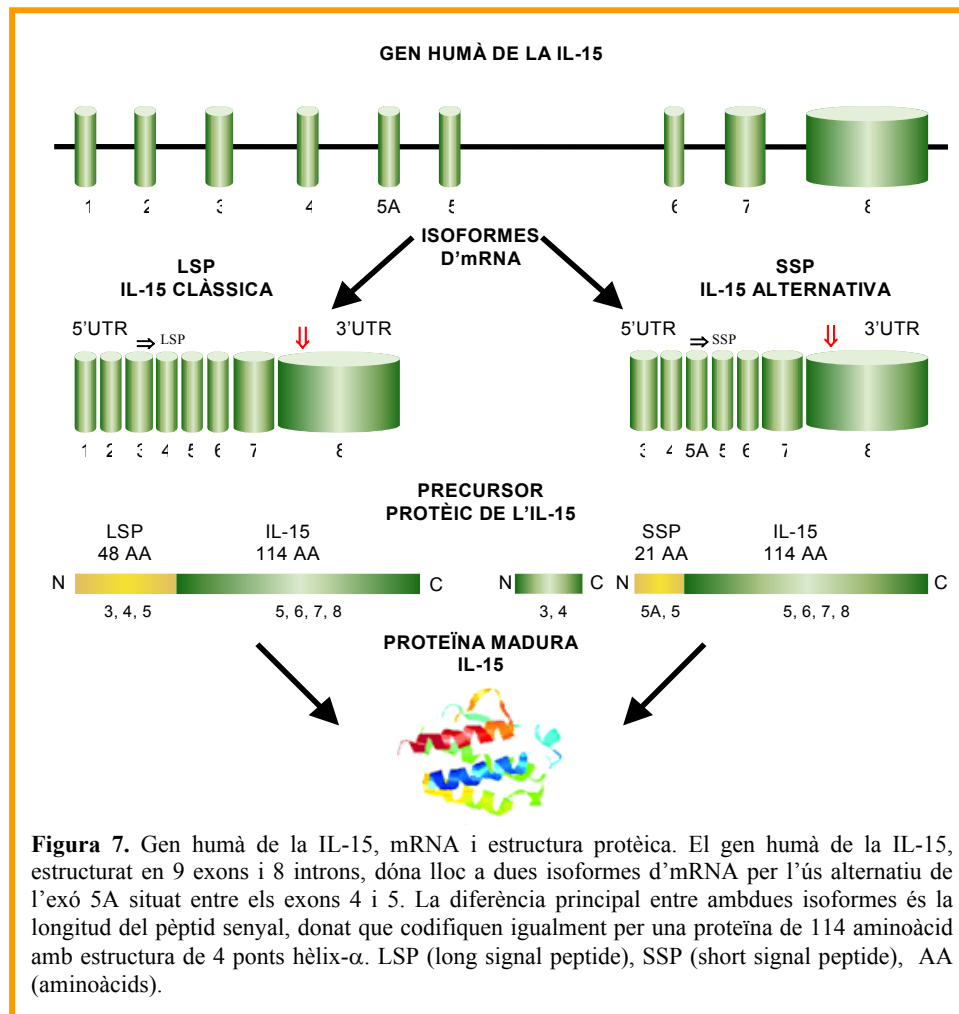
models murins, però s'han de tenir en compte les diferències quantitatives en l'activitat específica quan es volen realitzar estudis de toxicitat i eficàcia (Eisenman *et al.*, 2002).

Pel que fa al control de la transcripció, s'ha vist que en la zona promotora del gen de la IL-15, tant humana com murí, existeixen diverses seqüències *consensus* d'unió, com ara α -INF-2, NF-IL-6, γ -IRE, myb, GCF i NF- κ B (Azimi *et al.*, 1998; Washizu *et al.*, 1998). Sembla ser que el lloc d'unió d'NF- κ B, localitzat en posicions -75 a -65 relativament al lloc d'inici de transcripció, és important per la sobreexpressió del gen de la IL-15 induïda per la proteïna HTLV-1 Tax (Azimi *et al.*, 1998) i per l'expressió d'IL-15 induïda per LPS en macròfags murins (Washizu *et al.*, 1998). La regió -201 i -141 del promotor del gen humà de la IL-15 conté un lloc no identificat responsable de la regulació negativa de la seva expressió; la deleció de la regió 5' d'aquesta zona causa un notable increment en l'activitat del promotor (Azimi *et al.*, 1998). També s'ha identificat un lloc d'unió essencial pel factor regulador de l'interferó (IRF-1) en posició -348 a -336 del promotor de la IL-15. S'ha vist que ratolins IRF-1^{-/-} perden l'expressió induïble de la IL-15, així com les cèl·lules *natural killer* (NK) (Ogasawara *et al.*, 1998; Ohteki *et al.*, 1998).

S'han descrit 3 punts reguladors en la traducció de la proteïna precursora de la IL-15: múltiples codons d'inici de traducció (AUGs) en la 5'UTR (*untranslated region*), dos pèptids senyal inusuals, i un regulador negatiu proper a la zona C-terminal.

El primer cDNA de la IL-15 humana descrit conté una 5'UTR d'unes 316 pb, una pauta oberta de lectura de 486 pb i una 3'UTR de unes 400 pb, el que codifica per un precursor de la IL-15 amb un pèptid líder de 48 aminoàcids i una proteïna madura de 114 aminoàcids (Grabstein *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 1995a; Bamford *et al.*, 1996). S'ha identificat però, un exó alternatiu en el gen humà i murí de la IL-15 inserat entre els exons 4 i 5, el qual codificaria per un pèptid líder alternatiu (Meazza *et al.*, 1996; Onu *et al.*, 1997) (Figura 7). Aquesta variant conté 119 nucleòtids de més entre l'intró 4 i 5, però a diferència del cDNA original, no conté els exons 1 i 2, resultant en un mRNA alternatiu més petit (Tagaya *et al.*, 1997). Aquesta seqüència exònica codifica 3 codons d'*stop* prematurs i un nou senyal AGT d'inici de transcripció, donant com a resultat un precursor proteic amb un pèptid senyal més curt, de 21 aminoàcids (*short signal peptide, SSP*), en comparació amb el pèptid senyal original de 48 aminoàcids (*long signal peptide, LSP*) (Nishimura *et al.*, 1998; Prinz *et al.*, 1998). Tant en humana com en ratolí ambdues isoformes de la IL-15 codifiquen per una proteïna madura idèntica que només es diferencia en les seqüències senyal. La regulació de les dues espècies

d'mRNA es pot produir per *splicing* alternatiu i/o per un promotor addicional no caracteritzat que conduiria a l'expressió de la forma SSP (Tagaya *et al.*, 1997). Sembla ser que la forma LSP-IL-15 té una eficiència de traducció més petita que la forma SSP, i que per tant, la forma SSP seria traduïda eficientment però no secretada, mentre que la forma LSP es traduiria menys eficientment però seria secretada de la cèl·lula en poca quantitat (Tagaya *et al.*, 1997; Kurys *et al.*, 2000). S'ha intentat determinar en un petit estudi pilot amb humans, si la secreció de la IL-15 estaria sotmesa a un ritme circadià. Els resultats preliminars però, apunten a que la seva síntesi no segueix cap tipus de patró biològic (Chevalier *et al.*, 2003). Les dues isoformes de mRNA contenen diferències en la zona N-terminal dels seus pèptids senyal. Els pèptids senyal determinen la localització intracel·lular i la potencial secreció de la proteïna madura associada. Tant la LPS-IL-15 com la SSP-IL-15 presenten una taxa de secreció comparativament petita (de 2 a 3 cops menys) respecte d'altres citocines com ara la IL-2 (Tagaya *et al.*, 1997), i s'ha pogut comprovar que mentre que la isoforma LSP està dirigida i localitzada en la via secretòria (reticle endoplasmàtic i aparell de Golgi), la isoforma SSP sembla trobar-se restringida a citoplasma i nucli (Tagaya *et al.*, 1997; Gaggero *et al.*, 1999; Kurys *et al.*, 2000). L'mRNA de la isoforma SSP s'expressa en cor, timus, apèndix i testicles, mentre que la isoforma LSP s'expressa en múscul esquelètic, placenta, cor, pulmó, fetge, timus i ronyó (Meazza *et al.*, 1996; Tagaya *et al.*, 1997).



Amb l'eliminació d'aquests tres punts reguladors, és a dir, eliminant les zones AUGs, substituint el pèptid líder pel de la IL-2 i fusionant la zona C-terminal de la proteïna madura amb el *FLAG epitop tag*, s'aconsegueix que la síntesi de IL-15 augmenti 250 vegades (Bamford *et al.*, 1998). Aquesta superregulació en l'expressió de la IL-15, inusual per la majoria de citocines, fa pensar que una sobreexpressió d'aquesta hauria de ser perjudicial per l'organisme. Aquesta idea es veu reforçada pel fet que ratolins transgènics que sobreexpressen la IL-15 per eliminació dels punts de regulació, desenvolupen leucèmia limfocítica (Fehniger *et al.*, 2001a).

5.2.2 ESTRUCTURA PROTEICA I BIOSÍNTESI

Donat que la IL-15 va ser identificada inicialment com un factor capaç de mimetitzar la proliferació de cèl·lules T induïda per la IL-2, el primer en analitzar-se va ser la relació bioquímica i funcional entre ambdues citocines. Comparacions de

l'estructura primària i de les seqüències de cDNA de la IL-15 humana o de simi amb la IL-2 demostren una homologia primària molt petita. Estudis d'estructura molecular suggereixen, donada l'estructura secundària de la IL-15, que aquesta pertany a la família de citocines amb estructura de 4 punts hèlix- α (Grabstein *et al.*, 1994), la qual inclou l'hormona de creixement, la IL-2, la IL-3, la IL-6, la IL-7, el factor estimulador de colònies de granulòcits (G-CSF) i el factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF) (Bazan, 1990a, 1990b). Les zones en hèlix- α es trobarien situades en les posicions aminoacídiques 1-15, 18-57, 65-78 i 97-114. Conté dos punts disulfur en les posicions C⁴²-C⁸⁸ i C³⁵-C⁸⁵, estructura homòloga a l'únic pont disulfur de la IL-2. També existeixen dos llocs de glicosilació a l'extrem C-terminal, en posició N⁷⁹ i N¹¹² (Grabstein *et al.*, 1994; Pettit *et al.*, 1997).

El primer cDNA de la IL-15 humana descrit codifica un precursor de la IL-15 amb un pèptid líder de 48 aminoàcids (Grabstein *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 1995a; Bamford *et al.*, 1996). S'ha identificat però, un exó alternatiu en el gen humà i murí de la IL-15 que codificaria un pèptid líder més curt, de 21 aminoàcids (*short signal peptide, SSP*), en comparació amb el pèptid senyal original de 48 aminoàcids (*long signal peptide, LSP*) (Nishimura *et al.*, 1998; Prinz *et al.*, 1998). En la següent secció es discutirà la funcionalitat d'aquests pèptids senyal. Ambdós isoformes però, codifiquen per una proteïna madura de 114 aminoàcids i 14-15 kDa (Grabstein *et al.*, 1994). S'ha detectat la seva expressió en múscul esquelètic, cor, pulmons, fetge, ronyons (Grabstein *et al.*, 1994) i cervell (Hanisch *et al.*, 1997).

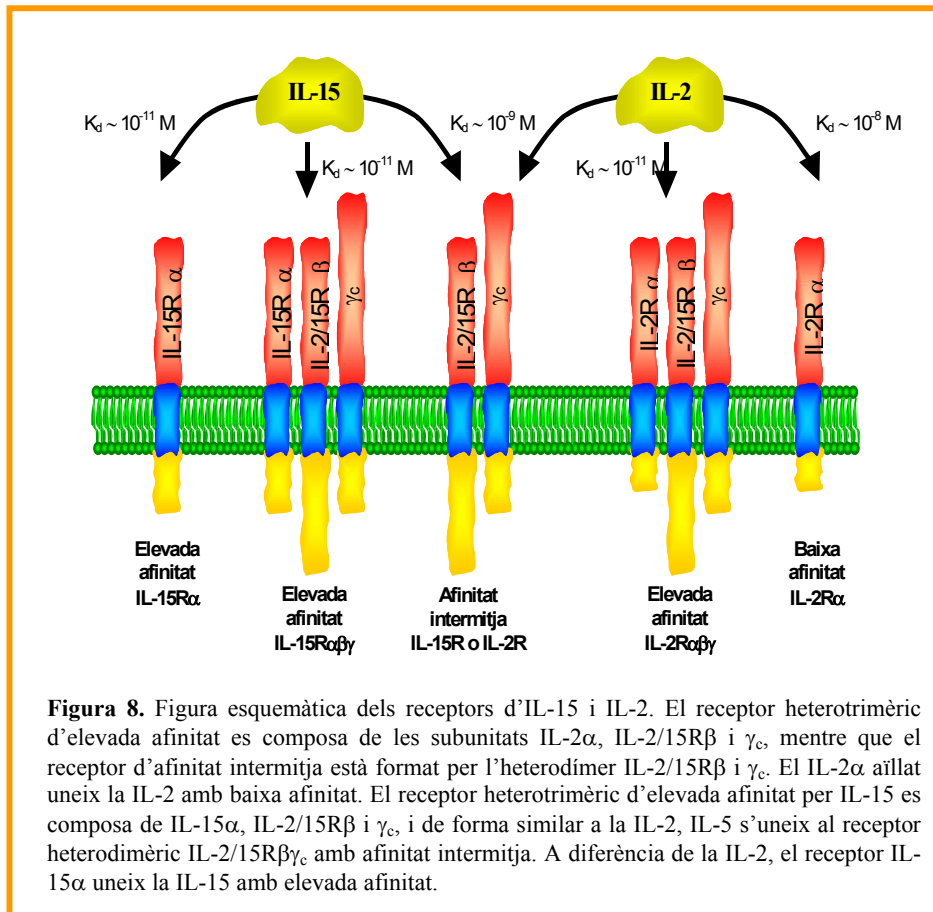
També s'ha vist, en diverses línies cel·lulars, que la IL-15, en lloc de ser secretada, pot estar ancorada a la membrana, el que explicaria que exercís les seves funcions tot i no ser detectada en els sobrenedants de cultius (Musso *et al.*, 1999). No se sap sota quin pèptid senyal es troba sotmesa l'expressió d'aquesta IL-15 de membrana, tot i que, com es discutirà més endavant, aquesta IL-15, més que ser una forma de membrana semblaria estar unida de forma no covalent a un dels seus receptors (Dubois *et al.*, 2002).

5.2.3 RECEPTORS

La IL-15 utilitza un receptor heterotrimèric, que consta de les subunitats β (70/75 kDa) i γ_c (64 kDa) del receptor de la IL-2 (Grabstein *et al.*, 1994; Giri *et al.*,

1995), i d'una única subunitat α (58 kDa) específica de la IL-15 (Cosman *et al.*, 1995; Kennedy i Park, 1996). Les subunitats β i γ_c pertanyen a la superfamília del receptor de la hematopoietina i estan implicades en la transducció del senyal i la internalització del lligand (Giri *et al.*, 1994 i 1995; Kumaki *et al.*, 1995). Tot i això, com es descriurà més endavant, estudis recents indiquen que la internalització de la IL-15 es duu a terme amb la subunitat α del seu receptor (Dubois *et al.*, 2002). Aquesta subunitat α , així com la del receptor de la IL-2, són proteïnes de membrana de tipus I amb similitud estructural però amb poca homologia de seqüència, i constitueixen una família de receptors de citocines (Giri *et al.*, 1995). El IL-15R α humà complet conté un pèptid senyal de 32 aminoàcids, un domini extracel·lular de 173 aminoàcids, un domini transmembrana de 21 aminoàcids, una cua citoplasmàtica de 37 aminoàcids i múltiples llocs de N- i O-glicosilació (Giri *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1995b). La comparació entre la seqüència proteica d'unió a la IL-15 i el IL-2R α indica la presència d'un domini d'unió conservat, el domini *sushi*, també conegut com el motiu GP-I o SCR (*short consensus repeat*) (Giri *et al.*, 1995) (Figura 8). S'ha descrit que aquest domini seria essencial per la unió de la IL-15 així com per la funcionalitat de IL-15R α (Wei *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 1995b). Tot i això, com a diferència estructural entre les subunitats α d'ambdues citocines, veiem que no existeix un segon domini *sushi* en IL-15R α , el qual està present en IL-2R α , i que la cua citoplasmàtica de IL-15R α resulta més llarga (Giri *et al.*, 1995). El receptor IL-2R α uneix la IL-2 amb baixa afinitat ($K_d \sim 10^{-8}$ M) i no transdueix senyal; el receptor heterodimèric IL-2R $\beta\gamma_c$ uneix IL-2 amb afinitat intermitja ($K_d \sim 10^{-9}$ M) i transdueix senyal, mentre que el receptor heterotrimèric IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ uneix la IL-2 amb elevada afinitat ($K_d \sim 10^{-11}$ M). A partir d'experiments de transfecció s'ha determinat que la subunitat α és suficient per la unió de la IL-15 amb elevada afinitat ($K_d \sim 10^{-11}$ M), però igual que IL-2R α , aquesta no està implicada en la transducció de senyal, funció per la qual necessita de les subunitats β i γ_c . La IL-15, com la IL-2, també es pot unir i enviar senyals amb el receptor heterodimèric IL-2/15R $\beta\gamma_c$ amb afinitat intermitja ($K_d \sim 10^{-9}$ M) en absència de IL-15R α (Giri *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1995b) (Figura 8). Tot i això, ratolins IL-15 $^{-/-}$ o IL-15R $^{-/-}$ tenen els mateixos fenotips, el que indica que en condicions normals la IL-15 actuaria a través del receptor heterotrimèric IL-15R $\alpha\beta\gamma_c$ (Eisenman *et al.*, 2002).

El gen humà IL15RA que codifica IL-15R α , es localitza en 10(p14-p15), la mateixa zona que conté el locus IL2RA; el gen murí IL15ra està mapat al cromosoma 2 (Anderson *et al.*, 1995b). Existeixen variants d'*splicing* alternatiu del transcrit de IL-15R α , que són les combinacions de la deleció de l'exó 2, deleció de l'exó 3 i ús alternatiu de l'exó 7 o 7'. Mentre que totes les isoformes es poden localitzar en la membrana plasmàtica, reticle endoplasmàtic i aparell de Golgi, s'ha descrit que només la forma de IL-15R α que conté l'exó 2 es pot localitzar a la membrana nuclear, desconeixent-se el seu significat biològic. Per altra banda, les isoformes que no contenen l'exó 2 són incapaces d'unir IL-15, el que apuntaria a que Δ 2IL-15R α s'uniria al complex IL-2/IL-15R $\beta\gamma_c$ impedit que aquest participi en els receptors d'alta afinitat (Anderson *et al.*, 1995b; Dubois *et al.*, 1999). També s'ha de tenir en compte que l'exó 2 és el que codifica pel domini *sushi*, que com ja s'ha apuntat abans, és indispensable per la unió d'alta afinitat de la IL-15 (Anderson *et al.*, 1995b). La distribució de IL-15R α és bastant més extensa que la de IL-2R α ; s'ha detectat la seva expressió en diverses línies cel·lulars com cèl·lules T, macròfags, cèl·lules B, cèl·lules tímiques no limfoides i línies estromals de medul·la òssia, així com en cervell, intestí, fetge, cor, melsa, pulmó i múscul esquelètic, tot i que els nivells d'expressió varien en funció del teixit (Giri *et al.*, 1995; Dubois *et al.*, 1999).

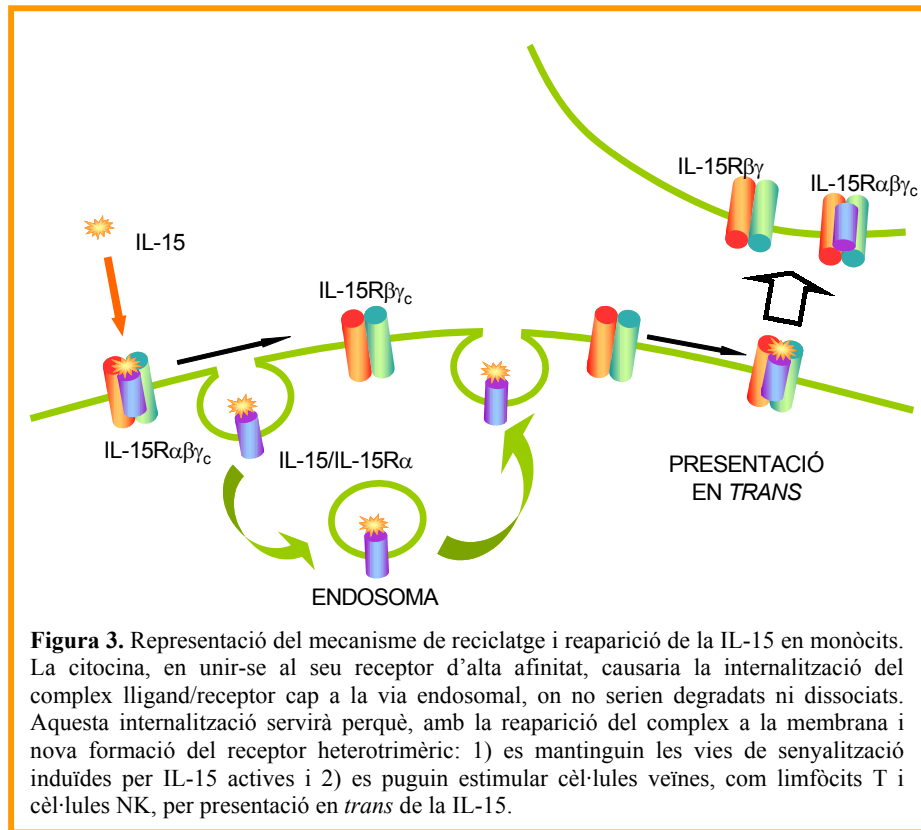


En mastòcits derivats de medul·la òssia es va descriure l'existència d'un receptor diferent anomenat IL-15RX (Tagaya *et al.*, 1996a), que posteriorment va ser caracteritzat, no pas com un receptor diferent, sinó com tres isoformes diferents del IL-15R α resultat d'*splicing* alternatiu les quals transmeten senyal en absència de IL-15R β i IL-15R γ_c (Bulanova *et al.*, 2003). Aquests es corresponen a deleccions de l'exó 4, els exons 3 i 4, o els exons 3, 4 i 5 (IL-15R $\alpha\Delta 4$, IL-15R $\alpha\Delta 3,4$ i IL-15R $\alpha\Delta 3,4,5$ respectivament). S'ha demostrat que en aquestes isoformes només hi ha un lloc de N-glicosil·lació i no hi ha cap de O-glicosil·lació, i que la distribució subcel·lular d'aquests és similar a l'observada per IL-15R α en altres tipus cel·lulars (Bulanova *et al.*, 2003). No es descarta però, l'existència d'altres isoformes de IL-15R α en aquest tipus cel·lular. La presència d'aquestes isoformes, conseqüència d'*splicing* alternatiu, fa plantejar-se els motius biològics pels quals existeix tanta diversitat d'aquest receptor IL-15R α .

Dubois i col·laboradors (2002), en un treball molt interessant en monòcits, proposen que el receptor d'alta afinitat per la IL-15, el IL-15R α , mediarà el reciclatge trans-endosomal de la citocina, el qual mantindria una senyalització persistent fins i tot

després de ser eliminada la IL-15 del medi (Figura 9). Altres treballs han descrit el trànsit intracel·lular del IL-15R α i han proposat una possible translocació al nucli (Dubois *et al.*, 1999; Pereno *et al.*, 1999). En el treball de Dubois es demostra que el complex IL-15/IL-15R α es recicla entre la membrana plasmàtica i els endosomes, reapareixent després en la superfície cel·lular. Així, la IL-15 podria ser presentada a cèl·lules veïnes amb IL-15R $\alpha\beta\gamma_c$ o IL-15R $\beta\gamma_c$ per induir la seva proliferació tot i que no pugui ser detectada en el medi. Aquest mecanisme, on el IL-15R α actuaria com un reservori de la citocina, explicaria perquè, amb baixos nivells d'IL-15, a vegades indetectables, es podrien mantenir les cèl·lules T de memòria que constantment estarien migrant cap a teixits perifèrics. També seria una explicació coherent al fet que cèl·lules T CD8(+) perdessin la seva capacitat proliferativa en un ratolí IL-15R $\alpha^{-/-}$, mentre que cèl·lules T CD8(+) 15R $\alpha^{-/-}$ proliferessin en un medi normal (Lodolce *et al.*, 2001); i de manera semblant, que cèl·lules NK 15R $\alpha^{-/-}$ es poguessin mantenir en un ratolí normal però no en un IL-15R $\alpha^{-/-}$ (Koka *et al.*, 2003).

L'absència de IL-2R γ_c causa immunodeficiència combinada associada al cromosoma X (*X-linked combined immunodeficiency, X-SCID*) (Noguchi *et al.*, 1993). Els pacients amb X-SCID tenen poblacions de cèl·lules T anormals i poques cèl·lules T madures, així com una resposta anormal de les cèl·lules B (Cooper i Butler, 1989). Respecte al IL-15R α , hi ha poques malalties humanes localitzades al locus on es troba IL15RA. La síndrome DiGeorge, anomalia congènita caracteritzada per absència de timus i glàndules paratiroides, s'ha associat a una deleció de la regió distal 10p. En les leucèmies mieloides agudes i limfocítiques sovint es produeixen translocacions cromosòmiques que impliquen la regió distal de 10p (Anderson *et al.*, 1995b).



5.2.4 TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL

S'han descrit diferents vies de senyalització de la IL-15 en funció del tipus cel·lular i dels receptors, de manera que el mecanisme de senyalització activat determinaria els efectes d'aquesta. S'ha vist que en cèl·lules B activades, la quinasa Syk o p72^{syk} (tirosin quinasa citoplasmàtica associada a *src*) està físicament i funcional associada al IL-15R α . Quan la IL-15 s'uneix al IL-15R α , Syk s'activa i fosforil·la tant la cua citoplasmàtica del IL-15R α com la fosfolipasa γ C. S'ha vist que l'activació de Syk és independent de la presència del IL-15R β , donat que en cèl·lules Raji, les quals careixen d'aquest receptor, es produeixen els mateixos efectes (Bulanova *et al.*, 2001). En cèl·lules T actives però, s'activa la via Jak/STAT (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*). El IL-2/IL-15R β estaria associat amb Jak1 i el IL-2/IL-15R γ c estaria associat amb Jak3, fet que portaria a una fosforil·lació de les tirosines de STAT3 i STAT5 respectivament, i la seva posterior translocació nuclear, el que remarcaria la redundància de l'acció induïda per la IL-2, la IL-4, la IL-7, la IL-9 i la IL-15, donat que totes utilitzen el receptor γ c (Miyazaki *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1995). Les

vies de senyalització de la IL-2 i la IL-15 en cèl·lules T actives també impliquen la fosforil·lació de les tirosina quinases citoplasmàtiques associades a *src*, p56^{lck} i p72^{syk}, la inducció de Bcl-2 i l'estimulació de la via Ras/Raf/MAPK, que resultarà en l'activació de fos/jun (Miyazaki *et al.*, 1995). Per altra banda, en mastòcits s'ha descrit que la transcripció del senyal es duu a terme per la fosforil·lació d'STAT3, STAT5, STAT6, Jak2, Tyk2 i Syk2 (Tagaya *et al.*, 1996a i 1996b; Masuda *et al.*, 2001; Bulanova *et al.*, 2003). En neutròfils s'ha descrit que la IL-15 activaria la via de les Jak quinases (jak-2,-3), MAPK i ERK sense que es produís activació de la transcripció d'STAT5 (Pelletier *et al.*, 2002). També s'ha descrit la fosforil·lació d'Erk 1/2 així com d'Akt en la línia cel·lular humana de queratinòcits HaCaT (Yano *et al.*, 2003).

5.2.5 EFECTES FISIOLÒGICS I METABÒLICS

La IL-15 s'expressa en molts teixits (placenta, múscul esquelètic, ronyó, pulmó, cor, monòcits/macròfags) (Grabstein *et al.*, 1994) i nombrosos tipus cel·lulars per diferents estímuls (Carson *et al.*, 1995; Doherty *et al.*, 1996; Blauvelt *et al.*, 1996; Jonuleit *et al.*, 1996; Mrozek *et al.*, 1996; Leclercq *et al.*, 1996; Murray *et al.*, 1998; Mohamadzadeh *et al.*, 1995; Kawai *et al.*, 1996; Kumaki *et al.*, 1996; Reinecker *et al.*, 1996; Weiler, *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1996). Els primers tipus cel·lulars que es van identificar com a font funcional d'IL-15 varen ser les que pertanyien al llinatge de monòcits/macròfags (Carson *et al.*, 1995; Doherty *et al.*, 1996). S'ha descrit que altres cèl·lules presentadores d'antígen (APCs) com les cèl·lules dendrítiques derivades de la sang també produeixen mRNA i proteïna de la IL-15, suggerint que la IL-15 està implicada en l'atracció i estimulació de les cèl·lules T (Blauvelt *et al.*, 1996; Jonuleit *et al.*, 1996). Altres teixits productors d'IL-15 són la medul·la espinal (Grabstein *et al.*, 1994; Mrozek *et al.*, 1996), l'epiteli del timus (Leclercq *et al.*, 1996) i l'epiteli intestinal fetal (Murray *et al.*, 1998), això concorda amb el paper de la IL-15 durant l'hematopoesi. Les cel·lules epitelials i els fibroblasts de diferents teixits també produeixen mRNA i/o proteïna de IL-15, incloent-hi les cèl·lules de l'epiteli del ronyó (Grabstein *et al.*, 1994), les cèl·lules de l'epidermis i els queratinòcits (Mohamadzadeh *et al.*, 1995), la pell fetal (Kawai *et al.*, 1996), l'epiteli pigmentat de la retina (Kumaki *et al.*, 1996) i les cèl·lules de l'epiteli intestinal (Reinecker *et al.*, 1996). Hi ha altres cèl·lules productores d'IL-15 on la funció d'aquesta citocina no és clara: les cèl·lules del túbul proximal dels ronyons (Weiler, *et al.*, 1998), els astròcits i la microglia (Lee *et al.*,

1996). Malgrat que inicialment no es va detectar l'expressió d'IL-15 en cèl·lules T gràcies a tècniques més sensibles s'ha vist que aquestes cèl·lules sí expressen aquesta citocina (Azimi et al., 1998).

Com hem vist amb apartats anteriors, donat l'extens control posttranscripcional de la IL-15, localitzar els tipus cel·lulars i/o teixits que produeixen proteïna de la IL-15 tant a nivell intracel·lular, de la superfície cel·lular o de la forma secretada, pot ser important per comprendre la funció de la IL-15 en l'homeostasi i la defensa immunològica.

5.2.5.1 SISTEMA IMMUNITARI

La IL-15 juga un paper molt important en el desenvolupament, diferenciació, proliferació i activació de diverses cèl·lules del sistema immunitari (revisat per Fehniger i Caligiuri, 2001). Les cèl·lules NK juguen un paper molt important en la defensa immunitària innata. Per la seva completa maduració, aquestes cèl·lules necessiten el microambient de la medul·la òssia, on es troben les cèl·lules estromals que sintetitzen IL-15 (Mrozek *et al.*, 1996). S'ha observat que la IL-15 és un factor crític per les últimes fases de desenvolupament de les cèl·lules NK; ratolins IL-15^{-/-} careixen de cèl·lules NK (Kennedy *et al.*, 2000), així com els ratolins IL-15R α ^{-/-} (Lodolce *et al.*, 1998), IL-15R β ^{-/-} (Suzuki *et al.*, 1997), IL-15R γ_c ^{-/-} (DiSanto *et al.*, 1995) i IRF-1^{-/-} (Ohteki *et al.*, 1998). També està implicada en l'ontogènia de les cèl·lules NK, donat que progenitors bipotencials del tipus T/NK aïllats es diferencien selectivament cap a NK en presència d'IL-15 (Leclercq *et al.*, 1996). A més, el tractament de ratolins normals amb IL-15 augmenta l'activitat de les cèl·lules NK, així com el percentatge de cèl·lules NK de la melsa (Munger *et al.*, 1995; Kennedy *et al.*, 2000), i ratolins que sobreexpressen la citocina pateixen una forta expansió primerenca de cèl·lules NK (Fehniger *et al.*, 2001a).

La IL-15 juntament amb la IL-12 activen la síntesi de IFN- γ i TNF- α en macròfags (Fehniger *et al.*, 1999a), i potencien 10 vegades la síntesi de IFN- γ , TNF- α i GM-CSF en cèl·lules NK (Fehniger *et al.*, 1999b). Els macròfags activats també expressen IL-15 (Grabstein *et al.*, 1994), la qual juntament amb la IL-12, és necessària per la producció òptima de IFN- γ en les NK (Carson *et al.*, 1995). Una co-estimulació massa prolongada però, produeix apoptosi en cèl·lules NK induïda de forma autocrina pel TNF- α (Ross i Caligiuri, 1997).

Els macròfags humans expressen els receptors de la IL-15, els quals augmenten després d'una estimulació amb LPS (Giri *et al.*, 1994), i en monòcits també s'han trobat els receptors, fet que suggereix que la IL-15 pot actuar de forma autocrina (Anderson *et al.*, 1995b). En monòcits la IL-15 estimula la producció de IL-8 i de la proteïna quimiotàctica de macròfags-1 (*macrophage chemotactic protein-1, MCP-1*) implicades en la quimiotaxi de neutròfils i monòcits respectivament (Musso *et al.*, 1999), i en macròfags regula la producció de citocines proinflamatòries (Alleva *et al.*, 1997). Els neutròfils humans són activats per la IL-15, provocant canvis morfològics, incrementant la capacitat de fagocitòsi i la síntesi d'RNA i proteïnes (Girard *et al.*, 1996). Tot i això, en aquest tipus cel·lular la IL-15 no sembla ser crítica pel desenvolupament o expansió, donat que ratolins IL-15R $\alpha^{-/-}$ o IL-15 $^{-/-}$ no són deficients en neutròfils (Lodolce *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2000).

A part de les cèl·lules NK, s'ha descrit l'expressió del IL-2/15R β o γ_c en altres poblacions de cèl·lules T, com ara les cèl·lules T TCR $\gamma\delta$ dendrítiques epidèrmiques (DETCs), limfòcits intraepitelials intestinals (I-IELs) i cèl·lules NK $^{1+}$ -T. La IL-15 sembla crítica pel creixement i supervivència de les DETCs. Aquestes cèl·lules migren cap a la pell durant el desenvolupament fetal, etapa en que s'ha detectat expressió d'IL-15 en cèl·lules epidèrmiques (Kawai *et al.*, 1998). A més, s'ha vist que les DETCs murines proliferen en resposta a la IL-15 (Edelbaum *et al.*, 1995). Els I-IELs són cèl·lules TCR $\alpha\beta$ i TCR $\gamma\delta$ localitzades en la zona basolateral de les cèl·lules epitelials intestinals implicades en la immunitat de la mucosa (Guy-Grand i Vassalli, 1993). Els efectes de la IL-15 sobre aquestes es discutirà en el següent apartat. Les cèl·lules NK $^{1+}$ -T depenen de les senyals induïdes per IL-15/IL-15R per la seva expansió i homeostàsi, però no pel desenvolupament, com succeeix amb les cèl·lules NK. S'ha vist que les cèl·lules NK $^{1+}$ -T proliferen en resposta a la IL-15, i la seva proliferació disminueix en ratolins IL-15R $\alpha^{-/-}$ o IL-15 $^{-/-}$ (Ohteki *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 2000).

La IL-15 va ser identificada com un factor de creixement de cèl·lules T per la seva capacitat de promoure la diferenciació de cèl·lules T citotòxiques (cèl·lules CTLL). La resta de cèl·lules T no responen a la IL-15 a no ser que hagin estat prèviament estimulades amb el TCR. D'aquesta manera, expressen a la seva membrana el IL-15R α i poden respondre als estímuls de la IL-15. Això suggereix que la IL-15 expressada per les cèl·lules presentadores d'antigen seria important per l'activació de les cèl·lules T en els llocs d'inflamació immediatament després de l'activació del TCR (Kanegane i

Tosato, 1996). La IL-15 també actuaria com quimioatracent de cèl·lules T, com s'ha pogut observar en diversos estudis d'inflamació crònica que es descriuen més endavant. De fet, ratolins IL-15R $\alpha^{-/-}$ tenen defectes en el *homing* de cèl·lules T cap als nòduls limfàtics perifèrics (Lodolce *et al.*, 1998). La IL-15 també estimula, en funció de l'expressió de IL2/15R β , la proliferació de les cèl·lules humanes de memòria CD4 i CD8 i les cèl·lules T natives CD8(+), mentre que no té efecte en els limfòcits T nadius CD4(+) (Kanegane i Tosato, 1996). Ratolins IL-15 $^{-/-}$ presenten un nombre reduït de cèl·lules T de memòria CD8(+) en la melsa i els nòduls limfàtics, però tenen un nombre normal de timòcits CD8(+), pel que la IL-15 no deu ser necessària pel desenvolupament però sí per l'expansió i la supervivència de les cèl·lules T CD8(+) (Kennedy *et al.*, 2000).

5.2.5.2 TRACTE GASTROINTESTINAL

El tracte gastrointestinal actua com un important modulador de les defenses immunitàries. De fet, els I-IELs, situats en les cares basolaterals de les cèl·lules epitelials intestinals, són la primera línia de defensa contra patògens, donada la seva activitat citotòxica. S'ha descrit que les cèl·lules epitelials intestinals humanes i de rata expressen i responen a la IL-15, la qual estimularia la proliferació cel·lular via STAT3. Diversos estudis sobre la implicació de la citocina en el tracte gastrointestinal han fet pensar en la IL-15 com un mediador important que pot integrar la funció cel·lular epitelial intestinal amb el sistema immunitari intestinal, no només per la regulació homeostàtica sinó també per la defensa contra agents infecciosos (Reinecker *et al.*, 1996; Yoshikai, 1999). Aquesta citocina també sembla estar implicada en el recanvi tissular, donat que s'ha vist que la mort cel·lular programada que pateixen les cèl·lules epitelials intestinals sembla estar regulada per la IL-15, la qual activaria les cèl·lules NK intraepitelials (Kinoshita *et al.*, 2002). Per altra banda, ratolins IL-2/15R $\beta^{-/-}$ presenten una disminució de la població de cèl·lules T CD8(+) així com una inhibició en el desenvolupament de cèl·lules NK (Suzuki *et al.*, 1997). Resulta curiós però, que la sobreexpressió d'IL-15 específicament en cèl·lules epitelials intestinals només causa inflamació en la zona proximal de l'intestí prim. Estudis histopatològics revelen que en aquesta zona es produeix una disminució del tamany del villus, una marcada infiltració de limfòcits i degeneració de l'epiteli als 3-4 mesos d'edat. A més, es produeix un

augment dramàtic de les cèl·lules T CD8(+) (Ohta *et al.*, 2002). De fet, les cèl·lules T CD8(+) intestinals expressen IL-15R α , i la IL-15 les protegeix de l'apoptosi induïda per la deprivació del factor de creixement per sobreexpressió de Bcl-2 (Inagaki-Ohara *et al.*, 1997). S'ha proposat que la IL-15 també estaria implicada en la supervivència de les cèl·lules T CD8(+) en absència d'estimulació antigènica així com en l'expansió i la supervivència en presència d'antigen (Lai *et al.*, 1999).

El paper regulador de la IL-15 sobre els I-IELs ha fet que s'estudiï la seva implicació en diverses patologies associades al tracte gastrointestinal. La interrupció de la barrera cel·lular epitelial intestinal és una de les principals causes de la patogènesi de la malaltia inflamatòria intestinal, on es produeix una desregulació de les reaccions immunitàries locals. En una línia cel·lular epitelial intestinal humana, s'ha vist que la IL-15 és capaç de regular la formació de les unions adherents en les cèl·lules epitelials intestinals, la qual cosa implica vies de senyalització dependents i independents del IL-2R β , que comporten el reclutament de claudines, ocludines, ZO-1 i ZO-2 cap al complex proteic de la unió adherent (Nishiyama *et al.*, 2001). En els macròfags de la mucosa de pacients amb malaltia inflamatòria intestinal, es produeix una sobreexpressió d'IL-15 que potencia l'activació local de les cèl·lules T i la proliferació i producció de citocines inflamatòries per part tant de cèl·lules T com de macròfags. Per això, s'ha suggerit que un tractament directe contra la IL-15 podria ser beneficiós en aquesta malaltia (Liu *et al.*, 2000). També s'ha proposat un paper principal per la IL-15 en la manifestació patològica de la malaltia celíaca, donat que indueix l'apoptosi dels enteròcits (Maiuri *et al.*, 2000). De fet, en aquest cas, tant en la làmina pròpia com en l'epiteli intestinal hi ha sobreexpressió d'IL-15, la qual no es secreta sinó que queda ancorada a la membrana dels enteròcits. D'aquesta manera estimula l'expansió i la supervivència dels limfòcits intraepitelials anormals, els quals alhora tindran una funció citotòxica contra les cèl·lules epitelials intestinals (Mention *et al.*, 2003).

En el cas de càncer de colon, s'ha observat que l'expressió d'IL-15 augmenta amb una dieta rica en fibra (oligosacàrids de cadena curta) (Bassonga *et al.*, 2001), a més de disminuir la toxicitat causada pel tractament amb 5-fluorouracil i de potenciar l'activitat antitumoral del compost (Cao *et al.*, 1998a). S'ha associat a la IL-15 amb el manteniment de la integritat de les cèl·lules epitelials intestinals. La protecció que dona el lipopèptid sintètic JBT-3002 contra el dany intestinal causat pel tractament antitumoral amb irinotecan, és conseqüència de que augmenta l'expressió d'IL-15 en els macròfags de la làmina pròpia (Shinohara *et al.*, 1999). Quan el tractament és només

amb irinotecan, també es potencia l'activitat antitumoral del tractament (Cao *et al.*, 1998b).

5.2.5.3 APOPTOSI

S'ha descrit a la IL-15 com un potent inhibidor de diferents vies d'apoptosi, tan *in vitro* com *in vivo*. Els mecanismes pels quals exerceix el seu efecte antiapoptòtic difereixen en funció del tipus cel·lular. Els estudis principals al respecte es basen en cèl·lules del sistema immunitari, on la IL-15 juga un paper important en l'activació i manteniment de diverses línies cel·lulars, així com en la inhibició d'apoptosi en limfòcits T, cèl·lules dendrítiques, eosinòfils, cèl·lules NK i mastòcits entre d'altres (Josien *et al.*, 1999; Rodella *et al.*, 2001; Masuda *et al.*, 2001; Hoontrakoon *et al.*, 2002; Mueller *et al.*, 2003). Els ratolins IL-15^{-/-} són deficients en cèl·lules T CD8(+); la causa és que la manca de citocina fa que aquestes cèl·lules tinguin una expressió de Bcl-2 disminuïda i siguin propenses a patir apoptosi (Wu *et al.*, 2002). En el cas de la SIDA, situació patològica en la qual les cèl·lules T CD8(+) són molt susceptibles a patir mort cel·lular, també s'ha observat un efecte protector de l'apoptosi (Mueller *et al.*, 2003). De fet, la IL-15 i el IL-15R α regulen l'expressió de Bcl-2 en cèl·lules T CD8(+) durant totes les fases de desenvolupament (Wu *et al.*, 2002; Matthys *et al.*, 2002). S'ha proposat que la IL-15 es produeix en una fase primerenca de la resposta immunitària, quan les cèl·lules T encara no estan activades, generant unes cèl·lules NK activades i funcionals que estan protegides contra l'apoptosi. Quan les cèl·lules T s'activen, es sintetitza IL-2 que reverteix l'efecte protector de la IL-15, induint apoptosi en les cèl·lules NK (Rodella *et al.*, 2001). En l'artritis reumatoide, la IL-15 sintetitzada pels sinoviòcits *fibroblast-like* (cèl·lules que formen el teixit que envolcalla l'articulació), exerciria un efecte autocrí activant el seu receptor i augmentant l'expressió de Bcl-2 i Bcl-x, protegint les cèl·lules d'aquesta manera contra l'apoptosi (Kurowska *et al.*, 2002). En mastòcits, la IL-15 també actuaria augmentant l'expressió de Bcl-x mediada per STAT6 (Masuda *et al.*, 2001). La IL-15, sola o en combinació amb TNF- α , també pot activar altres mecanismes protectors d'apoptosi, com ara la producció autocrina de GM-CSF i activació d'NF- κ B en eosinòfils. En el cas d'inflamació al·lèrgica, la patologia es veuria potenciada negativament per la IL-15, donat que es produiria una disminució de l'apoptosi espontània en els eosinòfils (Hoontrakoon *et al.*, 2002). En

neutròfils la IL-15 activa a Jak-2, p38 MAPK i Erk-1/2, mecanismes pels quals evita l'apoptosi cel·lular (Pelletier *et al.*, 2002).

In vivo, s'ha observat que la IL-15 protegeix els ratolins del dany hepàtic letal i d'apoptosi multisistèmica induïts per Fas, així com de l'apoptosi epitelial induïda per quimioteràpia (Bulfone-Paus *et al.*, 1997; Lindner *et al.*, 1998). Els ratolins IL-15^{-/-}, a més de ser deficients en cèl·lules T CD8(+), també presenten un increment substancial de l'apoptosi en cèl·lules epitelials tubulars (on s'expressa tant la citocina com els seus receptors) respecte els controls (Shinozaki *et al.*, 2002). En el cas de xoc sèptic, on es produeix apoptosi multisistèmica, la IL-15 protegeix contra l'apoptosi induïda per TNF- α , com s'ha pogut estudiar en models transgènics per la citocina (Hiromatsu *et al.*, 2003). De fet, un estudi de Bulfone-Paus i col·laboradors (1999) en la línia fibroblàstica L929, proposa que la IL-15 inhibiria l'apoptosi induïda per TNF- α per inhibició de l'ensamblatge de la proteïna adaptadora a TNFR1 i del reclutament de TRAF2 (molècula necessària per generar la transducció del senyal del receptor de TNF- α), el qual seria captat pel IL-15R α . Per tant, la IL-15 i el TNF- α funcionarien com antagonistes en el control de l'apoptosi en aquesta línia cel·lular.

5.2.5.4 ANGIOGÈNESI

La formació de vasos sanguinis per la neovascularització és essencial per molts processos fisiològics, però també s'ha associat a diversos processos patològics com ara càncer, artritis reumatoide i retinopatia diabètica. La IL-15 indueix una forta resposta angiogènica en plaques de Matrigel injectades en ratolins immunosuprimits, amb característiques histològiques semblants a les induïdes pel bFGF. Les cèl·lules endotelials expressen el receptor per IL-15, que indueix una ràpida fosforil·lació de les proteïnes en aquestes cèl·lules, tot i que no estimula la seva proliferació *in vitro*. Segurament els diferents resultats obtinguts en experiments *in vitro* i *in vivo* es deuen a que l'efecte angiogènic induït per la IL-15 observat *in vivo* sigui resultat de la contribució d'altres cèl·lules i factors induïts per la citocina (Angiolillo *et al.*, 1997).

L'expansió del teixit sinovial inflammat en l'artritis reumatoide juvenil es deu en part a la formació de nous vasos sanguinis. S'ha relacionat la revascularització d'aquest teixit amb l'expressió d'IL-15. En cultius cel·lulars però, no s'observa inducció d'VEGF (*vascular endothelial growth factor*) per part de la IL-15, tot i que s'ha proposat que

l'estimulació de la supervivència de les cèl·lules estromals vasculares induïda per la citocina seria rellevant per la formació d'estructures vasculares en aquesta patologia (Yang *et al.*, 2002).

5.2.5.5 METABOLISME PROTÈIC

L'any 1995 Quinn i col·laboradors van descobrir que la IL-15 era un factor de creixement que estava altament expressat en múscul esquelètic. Aquesta citocina estimulava l'acumul de la cadena pesada de la miosina específica de múscul esquelètic en miòcits diferenciats i en fibres musculars en cultiu sense cap efecte en la proliferació mioblàstica (Quinn *et al.*, 1995). A més, la incubació de miòcits diferenciats amb IL-15 i IGF-I conjuntament incrementava l'acumul de MHC observat anteriorment per la qual cosa aquests dos factors atuaven de manera aditiva sobre les fibres musculars. Aquest estudi va indicar que la IL-15 afectava paràmetres associats amb l'hipertrofia de la fibra muscular, suggerint que la IL-15 podria ser un agent anabòlic per incrementar la massa muscular esquelètica.

Diversos estudis *in vivo* i *in vitro* proposen que la modulació de les vies de senyalització de la IL-15 i/o la seva administració podrien resultar beneficioses en el tractament del desgast muscular associat a determinades patologies, com ara el càncer (Carbó *et al.*, 2000) i l'envelliment (Cannon, 1998).

La reversió parcial del desgast muscular associat al tumor, es produeix per la inhibició de la via proteolítica dependent d'ubiquitina (Carbó *et al.*, 2000). La sobreexpressió d'IL-15 induïda per un vector retroviral en cultius cel·lulars causa un gran increment en l'acumulació de la cadena pesada de la miosina (*myosin heavy chain*, MHC) així com de l' α -actina. Aquests efectes són similars als descrits per sobreexpressió d'IGF-I, tot i que les vies implicades són diferents. A diferència del IGF-I, la IL-15 no causa proliferació ni diferenciació mioblàstica, i a més d'estimular la síntesi proteica, també inhibeix la degradació (Quinn *et al.*, 2002). De fet, la IL-15 només pot induir diferenciació miogènica en condicions on els forts efectes diferenciadors de l'IGF-I es trobin inhibits (Quinn *et al.*, 1997). Els efectes anabòlics de la IL-15 però, són temporalment diferents als del factor anabòlic IGF-I. La IL-15 resulta més efectiva com anabolitzant proteic quan s'afegeix a cultius cel·lulars humans després de la diferenciació dels mioblasts, mentre que l'IGF-I és més efectiu quan s'afegeix abans d'induir diferenciació (Furmanczyk i Quinn, 2003).

5.2.6 IL-15 I SITUACIONS PATOLÒGIQUES

5.2.6.1 MALALTIES INFLAMATÒRIES CRÒNIQUES

Donat l'ampli espectre d'efectes immunoestimuladors exercits per la IL-15, un increment en la producció d'aquesta citocina en diversos teixits comporta una supervivència immunitària alterada. Donat que la producció d'IL-15 pot ser induïda per factors bacterians i mediadors inflamatoris, deu ser un important factor patogènic en malalties immunoinflamatòries cròniques (revisar per Fehniger i Caligiuri, 2001).

5.2.6.1.1 ARTRITIS REUMATOIDE

Les característiques clíniques d'una artritis reumatoide activa estan causades en part per un increment en la producció d'IL-15 en el teixit sinovial, donat que en aquesta malaltia la citocina s'expressa en la membrana sinovial (teixit que embolcalla les articulacions) i s'allibera en elevades concentracions cap al líquid sinovial (líquid que emplena la cavitat articular). El líquid sinovial de pacients amb artritis reumatoide activa atrau a les cèl·lules mononuclears de la sang perifèrica, pel que s'ha suggerit que la IL-15 seria capaç de reclutar i activar les cèl·lules immunitàries implicades en aquesta patologia (McInnes *et al.*, 1996). A més, la formació de nous vasos sanguinis també contribuiria a la proliferació de les cèl·lules sinovials i al reclutament de nous leucòcits, pel que s'ha de tenir en compte el possible efecte angiogènic que la IL-15 també causaria en aquesta situació. Tot i això, en aquesta patologia es produeix una cascada molt complexa d'activació de citocines entre les quals trobem, a més de la IL-15, TNF- α , IL-8, IL-17 i IL-18 (Fehniger i Caligiuri, 2001). Com ja s'ha comentat abans, la IL-15 sintetitzada pels sinoviòcits també protegiria a les cèl·lules de l'apoptosi augmentant l'expressió de Bcl-2 i Bcl-x (Kurowska *et al.*, 2002). En el cas de l'artritis idiopàtica juvenil en nens però, els limfòcits de sang perifèrica tendeixen a patir apoptosi, el grau de la qual s'ha relacionat amb els nivells sèrics d'IL-15 (Smolewska *et al.*, 2003).

Actualment, els laboratoris Genmab estan en fase II clínica del tractament de l'artritis reumatoide i la psoriasi amb anticossos contra la IL-15 (<http://www.bioprocessingjournal.com>).

5.2.6.1.2 HEPATITIS C

S'han observat elevades concentracions d'IL-15 en pacients amb hepatitis C, tant amb hepatitis C crònica com amb cirrosi hepàtica o amb carcinoma hepatocel·lular, essent aquests últims els que presenten una major concentració, però no en portadors asimptomàtics del virus de l'hepatitis C (Kakumu *et al.*, 1997). S'ha vist que el tractament amb IFN α causa una disminució en els nivells d'IL-15 circulants en pacients amb hepatitis C crònica, disminuint paral·lelament els nivells d'aminotransferasa. Els nivells d'IL-15 es mantenen disminuïts després de finalitzar la teràpia i de considerar els pacients amb remissió clínica i serològica (Kamuku *et al.*, 1997). Aquests resultats indiquen que els elevats nivells sèrics d'IL-15 trobats en situacions d'hepatitis C podrien reflexar el grau de dany hepàtic causat per la patologia.

5.2.6.1.3 SARCOIDOSI

La sarcoidosi és una malaltia granulomatosa multisistèmica d'origen desconegut, en la qual es produeix una acumulació anormal de limfòcits T *helper* principalment en pulmó, els quals acaben desenvolupant un granuloma. El desenvolupament de la sarcoidosi sembla dependre de la IL-15. Els pacients amb sarcoidosi activa expressen i sintetitzen IL-15 en els macròfags alveolars mentre que els afectats amb sarcoidosi aquiescent no. S'ha proposat que el significat patofisiològic seria que les cèl·lules CD4(+) d'aquests pacients expressen les cadenes β i γ del receptor d'IL-15, pel que aquestes cèl·lules deuen respondre a la proliferació induïda per la citocina (Agostini *et al.*, 1996).

5.2.6.1.4 MALALTIA INFLAMATÒRIA DE L'INTESTÍ

Existeixen dos tipus majoritaris de malaltia intestinal inflamatòria, la colitis ulcerativa i la malaltia de Crohn. Els pacients amb colitis ulcerativa o amb malaltia de Crohn severa presenten nivells d'expressió d'IL-15 elevats en macròfags, els quals disminueixen després d'un tractament simptomàtic (Kirman i Nielsen, 1996). Els nivells d'IL-15 circulant però, només són detectables en pacients amb colitis ulcerativa (Kirman i Nielsen, 1996), els quals no presenten alteracions en els nivells d'expressió d'IL-15 en colon (Vainer *et al.*, 1998). També s'ha detectat proteïna IL-15 en els

sobredants de biòpsies de la mucosa rectal, i el seu mRNA en macròfags i cèl·lules epitelials de pacients amb colitis ulcerativa i malaltia de Crohn, però no en controls (Sakai *et al.*, 1998). Aquests estudis suggereixen que la IL-15 alliberada durant inflamació crònica de l'intestí podria contribuir a la patogènesi de la colitis ulcerativa, i segurament a la de la malaltia de Crohn.

5.2.6.1.5 ARTERIOSCLERÒSI

Les lesions d'arteriosclerosi, malaltia reconeguda com inflamatòria, es caracteritzen per una forta infiltració de macròfags i cèl·lules T. S'ha apuntat a que la IL-15, donada la seva propietat quimiotàctica per cèl·lules T, podria estar implicada en la patogènesi de la malaltia. Així, s'ha vist que l'expressió d'IL-15 augmenta tant en les lesions arterioscleròtiques d'un model murí d'arteriosclerosi, i en lesions humanes, així com en els macròfags infiltrats (Wuttge *et al.*, 2001).

5.2.6.2 CÀNCER

Tot i que fins el moment no s'ha administrat IL-15 a humans, diversos estudis apunten a un potencial ús de la IL-15 en la immunoteràpia contra el càncer. Aquesta es basa teòricament en l'augment del nombre de cèl·lules immunitàries per estimulació de la proliferació i la supervivència, o per activació de la citotoxicitat o de la producció de citocines. S'ha de tenir en compte però, que els efectes de la citocina poden variar en funció del tumor, i que per tan calen més estudis per determinar realment quines són les dianes activades que podrien tenir ús beneficiós en el tractament del càncer. Diversos tumors i línies cel·lulars tumorals expressen IL-15, encara que no totes la secreten (Stoeck *et al.*, 1998; Portis *et al.*, 2001; Kuniyasu *et al.*, 2001; Kukita *et al.*, 2002). Per exemple, en la línia tumoral A549 de carcinoma humà de pulmó la IL-15 s'expressa constitutivament i els seus nivells intracel·lulars augmenten amb el tractament amb TNF- α o IL-1 β , tot i que no és detectable en els sobredants cel·lulars (Stoeck *et al.*, 1998). En el cas de càncer colorectal humà, la IL-15 sembla jugar un paper molt important en la proliferació cel·lular, invasió i metàstasi. S'ha vist que diverses cèl·lules d'aquest tipus de càncer expressen IL-15, encara que no sempre és secretada. Aquestes línies proliferen en resposta a la IL-15, la qual pot arribar a revertir la inhibició de creixement causada per privació de sèrum (Kuniyasu *et al.*, 2001).

La síntesi d'aquesta citocina pot tenir un efecte positiu, per estimulació del sistema immunitari, o negatiu, induint proliferació cel·lular tumoral. De fet, en pacients amb leucèmia adulta de cèl·lules T, les quals sintetitzen i secreten IL-15, és troben nivells sèrics detectables de la citocina, a diferència de pacients control. Aquestes cèl·lules leucèmiques creixen sota l'estímul de la IL-15, creixement que està relacionat amb l'agressivitat de la malaltia (Kukita *et al.*, 2002). En un model murí de leucèmia de cèl·lules T també s'ha observat una elevada expressió per part del tumor d'IL-6, IL-10 i IL-15 (Portis *et al.*, 2001). Aquests efectes sobre la leucèmia és deuen a la forta implicació que té la IL-15 amb el sistema immunitari. Fehniger i col·laboradors (2001a) ja havien proposat que, donat que l'expressió d'IL-15 està fortament controlada a diversos nivells, una expressió inapropiada de la citocina podria resultar detrimental per l'hoste. En un model de ratolí transgènic desenvolupat en el seu laboratori, on s'eliminen els punts de control posttranscripcional i es sobreexpressa la IL-15, es produeix una expansió primerenca de cèl·lules NK i T CD8(+), que finalment acaben desenvolupant, després de diversos mesos d'estimulació proinflamatoria crònica, leucèmia limfocítica fatal amb fenotip NK-T. A les 3 setmanes d'edat ja s'observa limfocitosi, i a les 5-6 setmanes es desenvolupa una alopecía progressiva. Aquesta limfocitosi crònica i la subseqüent leucèmia observada manté moltes de les característiques clíniques observades en la leucèmia limfocítica granular humana. Una possible causa seria que, a conseqüència de l'estimulació de la proliferació i supervivència de cèl·lules T i NK induïda per la IL-15, es produïssin una sèrie de mutacions acumulatives que acabessin desenvolupant leucèmia (Fehniger *et al.*, 2001a i 2001b). Nishimura i col·laboradors (2000) han descrit un altre model de ratolí transgènic per la IL-15 que sobreexpressa globalment la forma LSP de la IL-15. En aquest model s'observa un augment de cèl·lules T en els nòduls limfàtics i la melsa, però no es produeix expansió de cèl·lules NK ni leucèmia.

Tot i això, al majoria d'estudis realitzats fins el moment apunten cap a un paper positiu de la IL-15 en la teràpia contra el càncer. De fet, resulten sorprenents els resultats obtinguts amb estudis on es realitza una doble teràpia combinatòria amb IL-12 i IL-15. La línia cel·lular humana de càncer de pulmó N592/IL-15, genèticament dissenyada per sintetitzar IL-15, presenta una taxa de creixement tumoral disminuïda, mentre que la que sintetitza IL-12 presenta una taxa de creixement comparable amb les controls. Sorprenentment, la línia que sobreexpressa les dues citocines presenta una remissió del 100% en ratolins immunosuprimits (Orengo *et al.*, 2003). En un model

murí de melanoma, també s'ha observat que el tractament amb IL-12 combinat amb dosis subterapèutiques d'IL-15 fa que es potenciïn els efectes antitumorals de la IL-12 i s'indueixi una regressió completa del tumor en el 50% dels ratolins, a més de potenciar-se l'activitat NK (Lasek *et al.*, 1999). Podria ser que la IL-12 i la IL-15 mediessin sinèrgicament els efectes antitumorals causats per la resposta immunitària innata, tan de forma directa com per transactivació de cèl·lules B (Orengo *et al.*, 2003), a més de produir-se una sobrerregulació recíproca dels receptors d'ambdues citocines (Lasek *et al.*, 1999). També s'ha proposat una teràpia basada en l'estimulació amb IL-15 de limfòcits T transfectats amb receptors d'antigen. S'ha comprovat que cèl·lules T a les que s'ha transferit genèticament CD19 responen molt bé a la IL-15, i s'expandeixen arribant a eradicar tumors intramedul·lars disseminats en un model murí (Brentjens *et al.*, 2003). Amb una teràpia tumoral en un model murí de fibrosarcoma, basada en la transfecció del gen de la IL-15 modificat i amb una elevada eficiència de traducció, s'ha observat una remissió tumoral total (Kimura *et al.*, 1999).

Una altra hipòtesi proposada és l'ús de la IL-15 així com de la IL-2 com adjuvants en vacunes tumorals. S'ha testat clínicament la possibilitat d'administrar cèl·lules dendrítiques juntament amb pèptids derivats del tumor. S'hipotetitza que l'administració concurrent de IL-2 i IL-15 en aquest cas ajudaria al reclutament de cèl·lules T i dendrítiques que anirien cap als òrgans limfoides on s'activarien les cèl·lules T (Fehniger *et al.*, 2002).

5.2.6.3 REBUIG D'ÒRGANS

El rebuig immunològic d'un òrgan trasplantat és un procés complicat compost de subtipus aguts, subaguts i crònics. Diverses citocines semblen estar implicades en el rebuig d'òrgans per estimulació de la infiltració i activació de les cèl·lules immunitàries receptores cap a l'òrgan trasplantat. Per això s'ha proposat que una inhibició de la via IL-15/IL-15R podria resultar una bona teràpia per evitar l'estimulació de les cèl·lules T CD8(+) que es produeix durant el rebuig d'òrgans (Ferrari-Lacraz *et al.*, 2001). S'ha detectat expressió d'IL-15 en un gran nombre de biòpsies de ronyons rebutjats, la qual era molt superior a aquelles biòpsies de ronyons no rebutjats (Pavlakis *et al.*, 1996). Tot i que s'ha detectat expressió d'IL-15 en un gran nombre de fetges trasplantats, i aquesta era superior a la de fetges no trasplantats, no s'ha trobat relació entre els nivells d'expressió de la citocina i el grau d'acceptació de l'òrgan (Baan *et al.*, 1998). De fet,

en el cas de trasplants de fetge, s'ha associat l'expressió d'IL-15 amb l'acceptació de l'òrgan. Amb un model *in vitro* s'ha observat que la IL-15 augmenta el nombre i l'activitat de cèl·lules reguladores locals, en particular de les cèl·lules hepàtiques NT (*natural T*), les quals estarien implicades en l'eliminació dels limfòcits causants del rebuig (Cookson *et al.*, 2003). En el cas de trasplant de cor també s'ha detectat IL-15 així com el seu mRNA en macròfags CD68+ infiltrats (Baan *et al.*, 1999).

5.2.6.4 DIABETIS

Ratolins diabètics no obesos espontàniament desenvolupen diabetis insulino-dependent a causa d'una destrucció autoimmune de les cèl·lules β . En aquests animals s'ha vist que l'expressió d'IL-15 als illots pancreàtics augmenta amb insulinitis forta que precedeix a la invasió de limfòcits en el pàncreas. Per tant, la IL-15 sembla dirigir la invasió destructiva dels illots pancreàtics (Rothe *et al.*, 2002). Els illots pancreàtics humans i murins expressen IL-15 en resposta a estímuls induïts per IL-1 β , TNF- α o IFN γ (Cardozo *et al.*, 2003). Quan es tracten cèl·lules aïllades dels illots pancreàtics amb una combinació d'aquestes citocines, es produeix una inhibició de l'alliberació d'insulina estimulada per la glucosa, així com de la taxa d'oxidació de la glucosa. El tractament amb IL-15 no pot revertir la inhibició de l'alliberació de glucosa, però sí que pot augmentar la seva oxidació i inhibir l'apoptosi induïda per les diverses citocines (Wallstrom *et al.*, 2003).

**II. OBJECTIUS I
PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL**

Durant certes situacions catabòliques, com el càncer o la sèpsia entre d'altres, es dona un fet comú que és la pèrdua de massa muscular. En el nostre grup d'investigació s'ha estudiat en profunditat el desgast muscular associat a la síndrome de la caquèxia. Així, s'ha identificat el sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina com a mecanisme que participa en l'activació de la proteòlisi muscular. A més, s'han identificat determinades citocines, particularment el TNF- α , elements promotors del desenvolupament de la síndrome de la caquèxia cancerosa.

L'objectiu d'aquesta tesi doctoral ha estat aprofundir en el coneixement dels mecanismes responsables de la pèrdua de massa muscular en diversos estats patològics. En concret, el paper del TNF- α en la caquèxia cancerosa, sèpsia i MPOC i el possible potencial terapèutic de la citocina anabòlica IL-15.

Les aproximacions experimentals utilitzades han estat les següents: d'una banda, per l'estudi de la caquèxia cancerosa, vàrem utilitzar el model tumoral de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 en rata, i biòpsies musculars de pacients amb càncer de pàncrees. Per altra banda, també s'han utilitzat biòpsies musculars de malalts MPOC. Així mateix, es va emprar un model de sèpsia en rata.

Els aspectes que s'analitzen en aquesta tesi doctoral són els següents:

1. Paper del TNF- α en la pèrdua de massa muscular

El TNF- α és una citocina catabòlica que ha estat associada al desgast muscular que succeeix durant la caquèxia en diferents situacions patològiques. Ens vam interessar en aprofundir en els mecanismes mitjançant els quals aquesta citocina exerceix els seus efectes sobre el múscul esquelètic. Per això vàrem analitzar en diferents situacions catabòliques:

- ◆ Inducció de l'apoptosi mitjançant la determinació de la fragmentació del DNA en músculs de rates sèptiques i de pacients amb càncer de pàncrees.

◆ L'expressió muscular de TNF- α mitjançant RT-PCR. Es va determinar l'expressió d'aquesta citocina en rates Wistar portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130, i en biòpsies musculars de pacients amb un tumor pancreàtic i en malalts MPOC.

◆ L'expressió muscular dels receptors de TNF- α (TNFRs) mitjançant la metodologia de la RT-PCR en rates Wistar portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 i en biòpsies musculars de pacients amb un tumor pancreàtic.

◆ L'expressió muscular de la calcineurina (CNA-1) en el model tumoral Yoshida AH-130.

◆ L'estrés oxidatiu mitjançant la:

- Determinació dels nivells de glutatió en malalts MPOC.
- Determinació de proteïnes carbonilades i d'enzims antioxidants en el model tumoral Yoshida AH-130.

2. Efectes metabòlics de la IL-15

La IL-15 té efectes metabòlics sobre teixit adipós i múscul esquelètic. Per exemple, té efectes directes sobre teixit adipós mitjançant la inhibició de l'activitat lipoproteïna lipasa i la lipogènesi *de novo*. A més, s'ha demostrat que la IL-15 es comporta com una citocina anabòlica a múscul esquelètic tant *in vivo* com *in vitro* (Quinn et al., 1995; 2002).

Per això ens vam plantejar l'estudi dels efectes de la IL-15 sobre múscul esquelètic, per tal d'esbrinar els mecanismes pels quals aquesta citocina exerceix una acció anabòlica en aquest teixit. Per estudiar l'efecte d'aquesta citocina es varen realitzar estudis *in vivo* (en rata Wistar), *ex vivo* (incubació de múscul esquelètic aïllat) i *in vitro* (línia cel·lular C2C12).

Vam dur a terme les següents aproximacions experimentals:

- ◆ Estudi de la degradació i síntesi proteica
- ◆ Estudi de la captació i destins metabòlics d'aminoàcids
- ◆ Estudi de la captació i destins metabòlics de la glucosa

3. Aplicacions terapèutiques de la IL-15 per combatre el desgast muscular

La IL-15 juga un paper molt important en múscul esquelètic. S'ha demostrat que aquesta citocina és capaç d'estimular l'acúmulo de proteïnes contràctils en miòcits diferenciats i fibres musculars, suggerint que la IL-15 podria exercir una acció en el creixement de la fibra muscular *in vivo*. Donat que en la síndrome de la caquèxia el tret característic és el desgast muscular, ens vam plantejar l'estudi dels efectes de la IL-15 en aquesta situació catabòlica, a través de la realització dels següents experiments:

◆ Efectes sobre la proteïna en caquèxia. Es va estudiar el recanvi proteic en rates Wistar portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130, així com també el sistema proteolític del proteasoma, mitjançant la determinació de l'expressió d'ubiquitina i de la subunitat C8 del proteasoma.

◆ Apoptosi. Es va determinar l'efecte del tractament amb IL-15 sobre la fragmentació del DNA en rates Wistar portadores de tumor. A més, es va estudiar l'expressió de factors moleculars implicats en l'apoptosi (Bcl-2 i Bax).

◆ Mecanismes implicats en l'acció de la IL-15:

- Determinació de l'expressió de TNF- α i els seus receptors
- Nivells de la sintasa d'òxid nítric induïble (iNOS)
- Anàlisi de l'expressió de les proteïnes desacobladores (UCP2, UCP3)

III. MATERIALS I MÈTODES

1. ESTUDIS *IN VIVO*

1.1 ANIMALS I CONDICIONS D'EXPERIMENTACIÓ

Els experiments presentats es van realitzar amb rates Wistar (Interfauna, Barcelona). Els animals es van mantenir estabulats en condicions ambientals estàndar ($22 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, humitat relativa del 70-80%, cicle d' il·luminació de 12 hores diàries de llum), amb lliure accés al pinso i l'aigua. La dieta (B.K. Universal G.J./S.L., Sant Vicenç dels Horts) estava constituïda per un 45.5-48.5% d'hidrats de carboni, (3.5% glucosa absorbible, 43-45% midó), 18.5% de proteïna i 3.1% de greix.

Tots els protocols utilitzats van ser prèviament autoritzats pel Comitè Ètic de la Universitat de Barcelona, i la manipulació va seguir la normativa de la Comunitat Europea.

1.2 TRACTAMENTS I GRUPS EXPERIMENTALS

Tractament agut amb IL-15

Es va realitzar una única administració i.v. (vena de la cua) a una dosi de 100 μg de rhIL-15 (IL-15 recombinant humana, Immunex; Seattle, WA, USA) per kg de pes corporal a rates mascles d'uns 120 grams, utilitzant com a vehicle salí fisiològic estèril. Al grup control se li va administrar, de la mateixa manera, el volum equivalent del vehicle.

Tractament crònic amb IL-15

El tractament crònic va consistir en una administració s.c. diària durant 7 dies, a rates Wistar de 120 grams, a una dosi de 100 μg de rhIL-15 per kg de pes corporal, utilitzant com a vehicle salí fisiològic estèril. Al grup control se li va administrar, de la mateixa manera, el volum equivalent del vehicle. La ingesta d'aigua i beguda i el pes corporal es van determinar diàriament després del tractament.

Inducció de sèpsia

A rates d'entre 120-150 grams se'ls va induir una situació de sèpsia mitjançant el lligament del cec i la seva posterior punció, tècnica amb la qual s'indueix una forta peritonitis en alliberar-se els bacteris intestinals cap al peritoneu (Garcia-Martinez *et al.*, 1995).

Tractament amb rolipram

Es va realitzar una única administració i.v. just després de la inducció de sèpsia a una dosi de 15 mg de rolipram ([4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)-2-pirrolidona], cedida pel Dr. Wachtel, Shering AG, Berling, Alemanya) per kg de pes corporal a rates mascles d'uns 150-200 grams, utilitzant com a vehicle salí fisiològic estèril. Al grup control se li va administrar, de la mateixa manera, el volum equivalent del vehicle.

Model tumoral: hepatoma ascític Yoshida AH-130

L'hepatoma ascític Yoshida AH-130 és un tumor de ràpid creixement (temps de duplicació de 24 hores) que conté cèl·lules poc diferenciades i que causa, a les rates portadores, una ràpida pèrdua de pes corporal i del contingut proteic del múscul esquelètic, així com altres importants alteracions metabòliques (Baccino *et al.*, 1984).

Les cèl·lules tumorals van ser recollides amb una xeringa estèril directament de la cavitat peritoneal d'una rata amb un tumor en fase exponencial (7 dies després de la inoculació), es van diluir en PBS estèril a una concentració de 10^4 cèl·lules/ml i es van inocular 2 ml (10^8 cèl·lules) a cada una de les rates del grup de portadores de tumor injectant-se les intraperitonealment. Al final del període experimental es va recollir el tumor de la cavitat peritoneal i es va medir el seu volum en una proveta graduada. En un eppendorf es va barrejar en el següent ordre: 875 μ l de PBS, 100 μ l de blau Tripà i 25 μ l de suspensió de cèl·lules tumorals; es va agitar suaument, i es van posar 20 μ l en la gradeta de l'hematocitòmetre. Es van comptar les cèl·lules en 6 quadrets de cadascun dels quadrants (X) i es va calcular la mitjana dels 16. El nombre de cèl·lules es va calcular de la següent forma:

$$X \times 16 \times F (\text{factor de dilució}) \times 10^4 = \text{nombre de cèlules / ml}$$

tenint en compte que la suma dels 16 quadrants representa un volum de 0.1 mm³. Aquest model tumoral es va mantenir *in vivo* en la nostra colònia de l'estabulari de forma permanent, obtenint-se per a la realització dels experiments mostres de tumor en fase de creixement experimental.

A més, es va realitzar el tractament crònic amb IL-15 a rates Wistar mascle portadores del tumor que pesaven aproximadament 110-135 g. Les rates es van dividir en dos grups: controls i portadores de tumor (inoculades amb 10⁸ cèl·lules de AH-130). Ambdós grups van ser dividits un altre vegada en animals tractats i no tractats. El tractament es va realitzar de la manera descrita anteriorment. Es van sacrificar els animals a dia 0, dia 4 i dia 7 després de la implantació del tumor. Diàriament es va procedir a la mesura de la ingesta i la beguda presa pels animals.

1.3 ANESTÈSIA I SACRIFICI

Al final dels experiments, els animals van ser pesats i anestesiats amb una barreja de ketamina (Imalgene 500- Rhône Mérieux, Lyon, França) / xilacina (Rompún – Bayer AG, Leverkusen, Alemanya). La mort va ser provocada per l'extracció de la sang després de l'obertura de la cavitat peritoneal i assegurada mitjançant la ruptura del diafragma.

1.4 EXTRACCIÓ DE TEIXITS I SANG

Primerament es va obrir la cavitat abdominal, i una vegada visualitzada l'aorta es va procedir a l'extracció de la mostra de sang amb una xeringa heparinitzada de 5 ml; aquesta sang es va dipositar en un tub que es va mantenir fred en gel. A continuació es van extreure els teixits. Els teixits van ser congelats en nitrogen líquid per *freeze-clamping* immediatament després de la seva extracció i pesats. Les mostres dels teixits congelats es van guardar a -80°C.

De la sang extreta de l'aorta, es van guardar 200 µl en un eppendorf que es va congelar ràpidament en nitrogen líquid i que es va utilitzar per l'estudi d'aminoàcids en sang. 200 µl van ser desproteïtzats al barrejar-los en un tub amb 2 ml d'àcid perclòric al 6%. Aquests tubs van ser centrifugats durant 5 min. i el sobrenedant es va guardar en uns altres tubs que havien estat pesats prèviament. La resta de sang va ser centrifugada i el plasma resultant es va guardar en varis tubs eppendorf que es van congelar

ràpidament en nitrogen líquid. Totes les mostres van ser mantingudes a -20°C al congelador.

1.5 ESTUDIS EN PACIENTS

1.5.1 PACIENTS MPOC

El grup d'estudi estava format per vint pacients MPOC de sexe masculí clínicament estables i no tractats amb esteroides. D'aquests vint pacients, onze tenien un índex de massa corporal (BMI) normal ($28.2 \pm 1.2 \text{ kg.m}^{-2}$) i nou tenien un BMI baix ($19.7 \pm 0.6 \text{ kg.m}^{-2}$). A més es van incloure cinc individus sans com a grup control (BMI $26.5 \pm 0.9 \text{ kg.m}^{-2}$). Els individus inclosos en l'estudi varen ser seleccionats mitjançant proves clíniques, de funcionalitat pulmonar en repòs, radiografies toràciques, anàlisis sanguínies completes i proves físiques. Els canvis fisiològics induïts per l'exercici físic es van mesurar mitjançant la tolerància a l'exercici i la vida mitja de la fosfocreatina. A més, es va realitzar espectroscòpia de resonància magnètica nuclear amb ^{31}P .

Tots els pacients van signar una autorització escrita i el disseny experimental va ser aprovat pel Comitè d'Ètica de l'Hospital Clínic de Barcelona.

1.5.2 PACIENTS AMB CÀNCER DE PÀNCREES

Per aquest estudi es van escollir pacients que anaven a ser intervinguts quirúrgicament d'un càncer pancreàtic potencialment extirpable. Es van incloure quinze pacients amb càncer de pàncrees, tots ells confirmats amb proves histològiques. Com a grup control es van incloure dotze individus (de pes estable) que havien estat admesos per sotmetre's a cirurgia per una malaltia benigne. Els pacients que tenien una malaltia endocrina o aquells que prenién corticosteroides o fàrmacs β -bloquejants van ser exclosos de l'estudi. De la mateixa manera, els pacients que havien rebut quimioteràpia o radioteràpia tampoc varen ser inclosos.

Els pacients amb càncer de pàncrees varen seguir un protocol clínic abans de la intervenció. Després de la confirmació del diagnòstic del càncer per ultrasons abdominals i/o escàner-CT espiral, abans de l'estudi, als pacients se'ls va realitzar una colangio-pancreaticoradiografia endoscòpica retrògrada o per la ruta transhepàtica

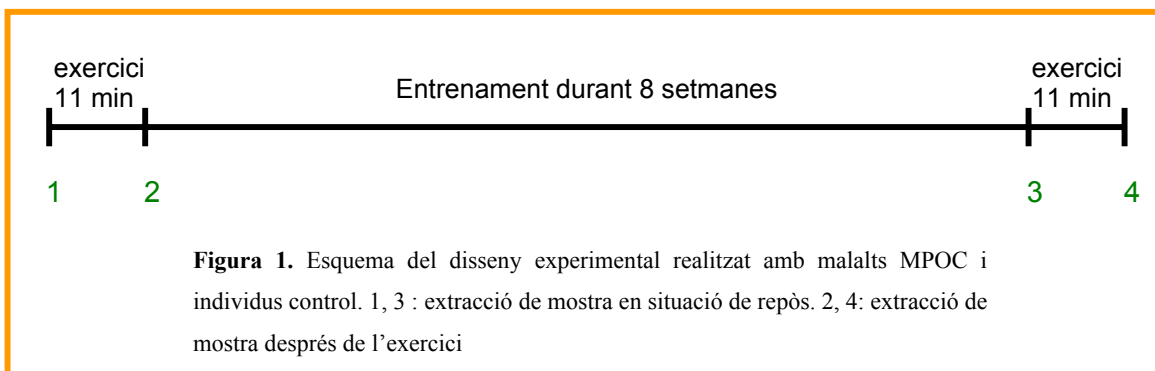
percutània. Després, els van sotmetre a una laparoscòpia com a part de la intervenció de resecció. Normalment, això es realitzava aproximadament dues setmanes abans de la intervenció definitiva.

Aquest protocol va ser aprovat pel Comitè d'Ètica de la Royal Infirmary d'Edimburgh, hospital del qual procedien aquests pacients.

1.6 DISSENY EXPERIMENTAL DELS ESTUDIS EN PACIENTS

1.6.1 PACIENTS MPOC

Tots els individus varen realitzar un període d'entrenament de 5 dies a la setmana durant 8 setmanes. Aquestes sessions d'entrenament consistien en pedalejar (en una bicicleta estàtica) en petites sèries de 2 a 5 min a una intensitat màxima i contínua com a mínim fins arribar a un període efectiu de 30 min (Figura 1).



En tots els individus (tant malalts com controls) es van realitzar biòpsies musculars en repòs i immediatament després de realitzar exercici físic durant onze minuts. A més, tant els controls com els malalts portaven col·locat un catèter per calcular el volum de captació pulmonar d'O₂ i extreure mostres de sang arterial per l'anàlisi de gasos, lactat i citocines.

1.6.2 PACIENTS AMB CÀNCER DE PÀNCREES

Una vegada els pacients estaven admesos dins del grup d'estudi, es va portar un control del pes, determinant el pes estable i el pes que perdien per mes. La REE

(despesa energètica en repòs) es va predir mitjançant les equacions de Harris Benedict i Schofield (Wigmore et al., 1997a; Scalfi et al., 1993). També es van determinar la circumferència del múscul a mig braç, el gruix del tríceps i la força d'ambdues mans (la dominant i la no dominant) (Wigmore et al., 1997b).

A l'endemà al matí, després d'estar en dejú durant la nit, es va tornar a mesurar la REE en posició supina per calorimetria indirecta amb un sistema de campana ventilada (Deltatrac 1, S&W Vickers, UK) (Wigmore et al., 1995; 1997a) utilitzant la mitjana dels resultats obtinguts durant els últims 10 min d'un període de 20 min. La composició corporal es va determinar per mesures de l'impedància bioelèctrica de múltiple freqüència a 5 i 200 MHz amb dos equips diferents: RJL BIA 101 (RJL Systems, Detroit, USA) i Bodystat Dualscan 2005 (Bodystat Ltd., UK) (Wigmore et al., 1997b), utilitzant fórmules estàndar (Wigmore et al., 1997b; 1995; Hannan et al., 1995).

1.7 BIÒPSIES HUMANES

1.7.1 PACIENTS MPOC

Es van realitzar biòpsies de múscul *vastus lateralis* de 150 mg mitjançant una agulla Bergström. La meitat de la mostra es va transferir a tampó Krebs (pH 7.4) per processar-la immediatament (per a la determinació dels nivells circulants de glutatió). La resta de la mostra va ser congelada en N₂ líquid i conservada a -80°C (per a l'extracció d'RNA).

1.7.2 PACIENTS AMB CÀNCER DE PÀNCREES

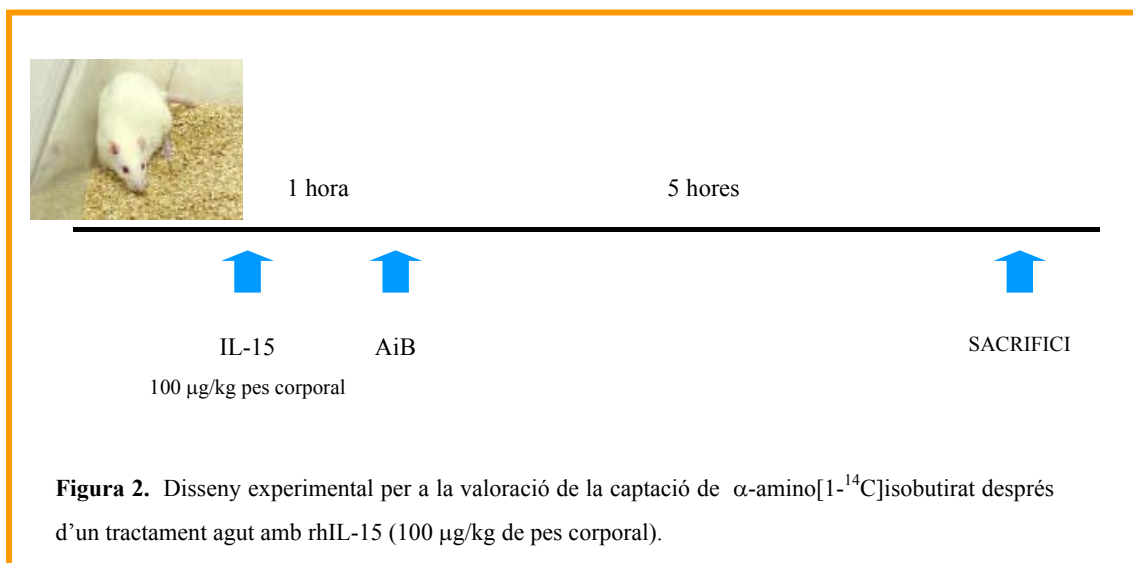
Als pacients se'ls va dur al quiròfan on els van sotmetre a anestèsia general i a la intervenció indicada pel tractament de la seva malaltia. Després d'una incissió a la pell, es van obtenir mostres de 0.5 cm³ del múscul *rectus abdominalis* i es van congelar ràpidament en N₂ líquid. Les mostres es van conservar a -70°C.

1.8 CAPTACIÓ D' α -AMINO[1-¹⁴C]ISOBUTIRAT

L' α -amino[1-¹⁴C]isobutirat (AIB) és un anàleg no metabolitzable de l'aminoàcid alanina. Per tal de determinar si hi havia diferències tissulars en la captació

d'aminoàcids neutres, es va realitzar una administració α -amino[1- 14 C]isobutirat a rates mascles de 150 g després d'una administració aguda de rhIL-15.

Una hora després de l'administració de rhIL-15 o de salí fisiològic en funció del grup, es va realitzar una administració intragàstrica amb cànula metàl·lica de 2 μ Ci de α - amino[1- 14 C]isobutirat (activitat específica 57 mCi/mmol; Amersham, Bucks., UK) en un volum total de 500 μ l d'aigua, sense anestèsia però procurant el mínim estrès per l'animal (Figura 2). Cinc hores més tard es van sacrificar els animals i es va procedir a l'extracció del tracte gastrointestinal (TGI), músculs gastrocnemius (GSN) i tibialis, teixit adipós blanc (TAB) dorsal, fetge, ronyons i carcassa.



1.8.1 ABSORCIÓ INTESTINAL

Per determinar la quantitat de radioactivitat absorbida, es va mesurar la quantitat de α -amino[1- 14 C]isobutirat que roman al TGI. El TGI es va homogenar en un Waring-Blender amb 5 volums d'àcid perclòric al 3% (w/v). Es va agafar una alíquota de 5 ml de l'homogenat en 10 ml de líquid de cintil·lació i es va procedir al recompte de la radioactivitat. La diferència entre la radioactivitat administrada i la que restava al TGI va permetre determinar el percentatge de α -amino[1- 14 C]isobutirat absorbit.

1.8.2 INCORPORACIÓ A TEIXITS

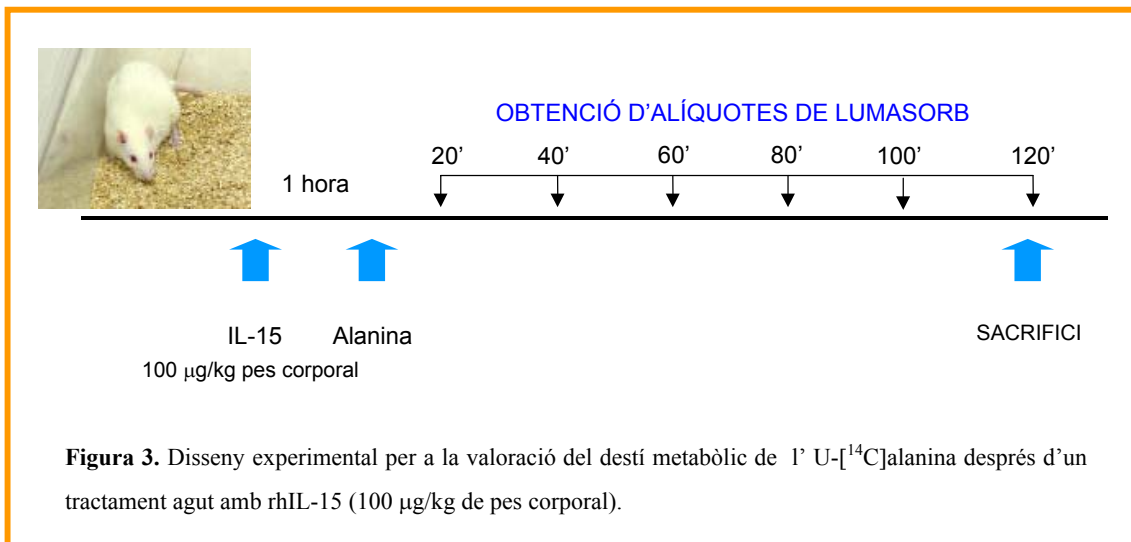
Els teixits esmentats anteriorment varen ser homogenats en 4 volums d'àcid perclòric al 3%. Seguidament, es van centrifugar (1000 g, 5 min) i es va neutralitzar una

alíquota dels sobrenedants per la mesura de la radioactivitat total en el teixit. La radioactivitat incorporada als teixits es va corregir per la radioactivitat absorbida.

1.9 DESTÍ METABÒLIC DE LA [^{14}C]-ALANINA

1.9.1 OXIDACIÓ

Una hora després del tractament agut amb rhIL-15, es va realitzar una administració intragàstrica amb una cànula metàl·lica (Fine Science Tools) de 1 μCi de U- ^{14}C alanina (activitat específica 152 mCi/mmol; Amersham, Bucks., UK) dissolt en 0.5 ml d'aigua destil·lada, sense anestèsia però procurant el mínim estrès per l'animal (Figura 3). Per tal de determinar la taxa d'oxidació d'aquest aminoàcid, el CO_2 expirat va ser recollit cada 20 minuts durant 2 hores mitjançant la seva absorció en Lumasorb (Lumac, Holanda) i la taxa de producció de $^{14}\text{CO}_2$ es va estimar mitjançant el comptatge de la radioactivitat de la mostra de Lumasorb.



1.9.2 ABSORCIÓ INTESTINAL

Per determinar la quantitat de radioactivitat absorbida, es va mesurar la quantitat de [^{14}C]-alanina que roman al tracte gastrointestinal (TGI). El TGI es va homogenar en un Waring-Blender amb 5 volums d'àcid perclòric al 3%. Es va agafar una alíquota

de 5 ml de l'homogenat en 10 ml de líquid de cintil·lació i es va procedir al recompte de la radioactivitat. La diferència entre la radioactivitat administrada i la que restava al TGI va permetre determinar el percentatge de [^{14}C]-alanina absorbida.

1.9.3 INCORPORACIÓ A TEIXITS

Es va calcular la quantitat de radioactivitat incorporada als teixits en forma de lípid, proteïna o glicogen.

Per això es va procedir a l'extracció de lípids segons el mètode de Stansbie i col·laboradors (1976) dels següents teixits: GSN, TAB dorsal, TAM i fetge. Aproximadament, 500 mg de teixit es van homogenar en un Waring-Blender amb 5 ml d'àcid perclòric al 3%. En tubs de vidre de 20 ml es va posar 1 ml de l'homogenat amb 3 ml de KOH 30% i es va incubar 10 min a 70°C. Després es va afegir a cada tub 3 ml de EtOH 100% i es va incubar 2 hores més, remenant de tant en tant. Després de deixar-ho refredar, es van afegir 3 ml de H_2SO_4 per tal de saponificar els lípids. Un cop freds, es va procedir a l'extracció de lípids afegint 5 ml d'èter de petroli de 40-60°, remenant 10 min i centrifugant. La fase superior amb l'èter de petroli i els lípids es va transferir a un tub nou, i es va repetir l'extracció de la fase inferior. L'èter de petroli, amb els lípids, es va posar en un vial de cintil·lació prepesat i es va deixar evaporar, de manera que al vial van quedar els lípids. Per diferència de pes del vial de cintil·lació es va obtenir la quantitat de lípids per gram de teixit. Posteriorment, es van dissoldre els lípids en 10 ml de líquid de cintil·lació i es va procedir al recompte de la radioactivitat.

La incorporació a proteïna es va determinar al múscul GSN. Els fragments de teixit, prèviament deslipidats pel mètode anteriorment descrit, es van solubilitzar incubant-los amb Protosol (Dupont Co., Boston, USA) durant 2h a 50°C i posteriorment decolorats amb peròxid d'hidrogen (Peng, 1977). El teixit solubilitzat va barrejar-se amb 10 ml de líquid de cintil·lació i posteriorment es va determinar la radioactivitat incorporada.

Es va procedir a la determinació del contingut de glicogen en fetge i múscul GSN mitjançant la precipitació amb etanol (Good et al., 1933) seguit de la hidròlisi i valoració de la glucosa (Slein, 1963). La incorporació del traçador en el glicogen tissular es va determinar després de la precipitació i hidròlisi del polisacàrid. De la mateixa manera que en els casos anteriors es va procedir al comptatge.

La quantitat de radioactivitat incorporada a lípid, a proteïna i a glicogen es va expressar en funció de la radioactivitat absorbida.

1.10 CAPTACIÓ DE 2-DESOXIGLUCOSA

La 2-desoxiglucosa (2DOG) és un anàleg de la glucosa que és captat per les cèl·lules pel mateix sistema de transportadors, i que presenta la característica de que, a diferència de la glucosa, no pot ser metabolitzat. Això permet fer una estimació indirecta de la taxa de captació de glucosa.

Es va voler determinar la taxa de captació de 2DOG al múscul GSN després de realitzar una administració aguda de rhIL-15, mantenint el mateix plantejament experimental que en la resta de determinacions realitzades amb un tractament agut. Just 40 min abans del sacrifici dels animals (moment en el qual la IL-15 havia exercit el seu efecte durant 5 hores), es va realitzar una administració i.v. per la vena de la cua de 3 μ Ci de 2-desoxi-D-[14 C]glucosa (activitat específica 60 mCi/mmol; Amersham, Bucks., UK) en un volum total de 100 μ l de salí fisiològic estèril; als animals controls se'ls va administrar la quantitat corresponent del vehicle (Figura 4). És molt important que el temps de captació del traçador sigui molt exacte, donat que el *clearance* de la glucosa, o velocitat a la qual és absorbida, és molt elevada. Per això es van espaiar els animals el temps suficient per permetre el sacrifici de cadascú en el moment adequat. Passats els 40 min, es va procedir a l'extracció de sang de l'aorta abdominal i al sacrifici dels animals, que van ser prèviament anestesiats.

Per determinar la quantitat de 2DOG captada, es van triturar 500 mg de teixit en nitrogen líquid i es van posar amb 2 ml d'àcid perclòric fred al 6% per tal de desproteïnitzar la mostra. Després de centrifugar durant 20 min a 12000 g, es va passar el sobrenedant a tubs de plàstic de 5 ml i es va neutralitzar la mostra amb KOH 30%. Posteriorment es va centrifugar per eliminar les sals i es va procedir al recompte de la radioactivitat d'una alíquota del sobrenedant.

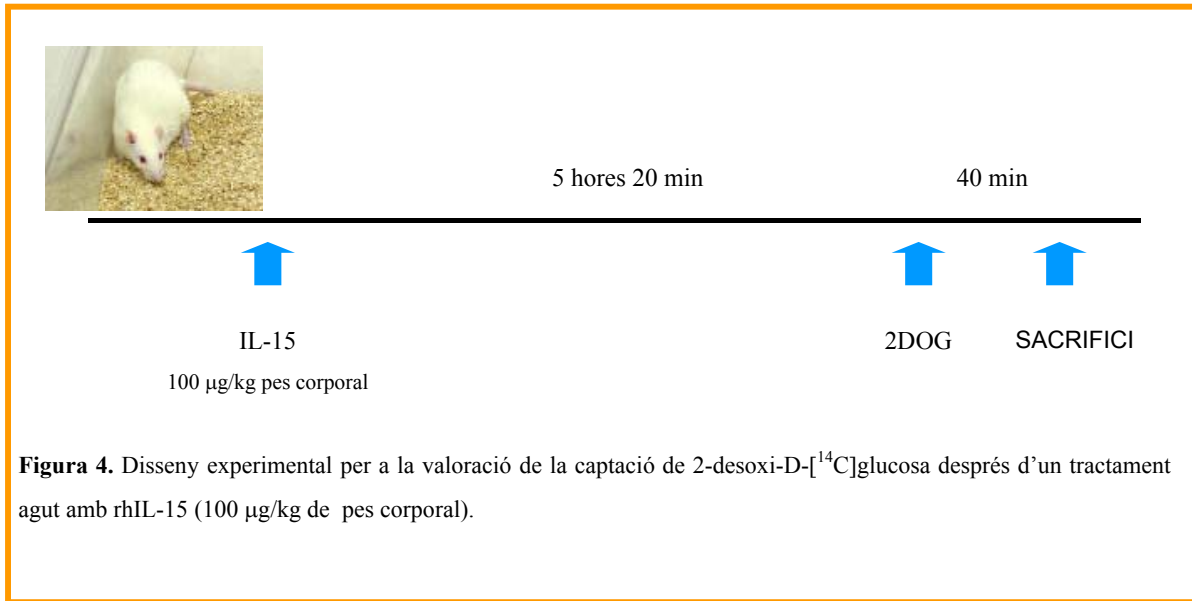


Figura 4. Disseny experimental per a la valoració de la captació de 2-desoxi-D-[¹⁴C]glucosa després d'un tractament agut amb rhIL-15 (100 µg/kg de pes corporal).

1.11 RECANVI PROTÈIC

Les taxes de recanvi protèic es van determinar segons un mètode prèviament descrit (Garlick et al., 1975; Tessitore et al., 1987a, 1993a), el qual ofereix la possibilitat de valorar la síntesi i la degradació protèica simultàniament en el mateix animal. Les taxes de síntesi i degradació de proteïna es van avaluar mitjançant la mesura de la caiguda de radioactivitat de la proteïna total i específica en múscul tibialis després del marcatge *in vivo*, 24h post-implantació del tumor, mitjançant una única dosi intraperitoneal de ¹⁴C-bicarbonat de sodi (250 µCi/kg b.w.; New England Nuclear, Boston, USA). Després de 4 dies de la implantació del tumor, es van calcular les taxes fraccionals de degradació (k_d), síntesi (k_s) i acumulació (k_a) proteica, i es van expressar com a percentatge per dia (t):

$$K_d = \ln(\text{radioactivitat de proteïna total})/t$$

$$K_s = \ln(\text{radioactivitat de proteïna específica})/t$$

$$K_a = \ln(\text{proteïna total})/t$$

L'extracció de proteïna muscular es va realitzar pel mètode de precipitació per àcid tricloroacètic descrit per Costelli et al. (1993). La proteïna tissular es va determinar pel mètode de Bradford (descriu en el següent apartat).

1.12 DETERMINACIÓ DE LA PROTEÏNA TOTAL

1.12.1 MÈTODE DE BRADFORD

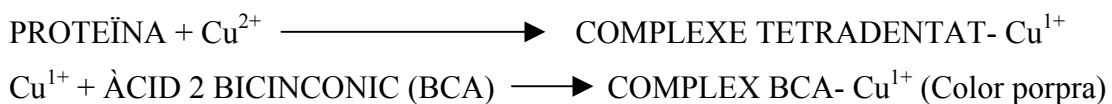
La determinació de la concentració de proteïnes es va realitzar, per norma general, pel mètode de Bradford, a excepció d'aquelles mostres que contenen detergents en el tampó d'homogenització, les quals es van determinar pel mètode de BCA.

Per aquest tipus de determinació es va utilitzar la solució comercial Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) diluïda 5 vegades en aigua destil·lada, i albúmina sèrica bovina (Sigma) per realitzar la recta patró (de 0 a 25 µg/ml). La quantificació de la proteïna es va realitzar mitjançant la lectura de l'absorbància a 590 nm.

1.12.2 MÈTODE DE BCA

La determinació de la quantitat de proteïna pel kit d'assaig de BCA (Pierce, Rockford) es va realitzar quan el tampó d'homogenització portava algun tipus de detergent, com per exemple, SDS o tritó, ja que aquests interferien amb la quantificació pel mètode de Bradford.

El mètode de BCA és una reacció compatible amb detergents que es basa en la utilització d'àcid bicinconic per la determinació colorimètrica de la proteïna total. Aquest mètode combina la reducció de Cu^{2+} a Cu^{1+} en un medi alcalí (reacció de Biuret) amb la detecció colorimètrica del catió de coure per d'àcid bicinconic.



El producte de la reacció és de color porpra i es forma per la quelació de dues molècules de BCA amb un ió coure. Aquest producte pot ser quantificat a 590 nm.

Per realitzar les determinacions es va preparar una recta patró de 0-2000 µg proteïna/ml. En una placa d'ELISA de 96 pouets es va posar 10 µl d'estàndard o mostra i 200 µl del tampó de reacció (40 parts del reactiu A: 1 part del reactiu B). Després

d'incubar dues hores a 37°C es va determinar l'absorbància a 590 nm en un lector de plaques d'ELISA.

1.13 WESTERN BLOT

1.13.1 CNA-1

Els Western blots de calcineurina es van realitzar en gels d'acrilamida al 8% en el sistema *Mini-Protean II* de BioRad, carregant 40 µg de proteïna per mostra. A les mostres se'ls hi va afegir un 10% de tampó de mostra (tampó fosfat 30 mM pH 7, glicerol 30%, SDS 7.5%, ditiotreitòl 9.72 mM i blau de bromofenol 0.05%), i es va utilitzar un marcador de pes molecular de 205 kDa a 6.5 kDa (Color Markers, Sigma). El gel es va córrer a 100 volts (fins que el blau de bromofenol de mostra va arribar a la part inferior del gel) utilitzant com tampó electròlit Tris pH 8.3 0.025 mM, glicina 0.195 M i SDS 0.1%. Un cop finalitzada l'electroforesi, es va preparar la transferència, en la qual es va utilitzar la membrana *Immobilon-P Transfer Membrane* de Millipore. Aquesta membrana ha de ser activada amb metanol abans de la seva utilització. La transferència es va realitzar a 25 mA durant tota la nit, o bé a 400 mA durant 1 hora, utilitzant com tampó de transferència Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% i SDS 0.02%. Per comprovar que la transferència es realitzés correctament, es va realitzar una tinció amb blau de Coomassie del gel, i una tinció amb Ponceau de la membrana. Per això es va tenyir el gel durant 5 min amb blau de Coomassie (0.25% Coomassie Blue G-250, metanol 45%, àcid acètic 10%) i la membrana amb Ponceau (0.2% de Ponceau S en àcid acètic al 3%). Després de les tincions es va decolorar 1 minut amb aigua destil·lada i es van visualitzar les bandes.

Posteriorment es va realitzar el bloqueig de la membrana durant 1 hora amb un 5% de llet desnatada en pols en PBS 1X. Després de realitzar 3 rentats de 10 min amb el tampó TBS II (Tris 4 mM, NaCl 0.5 M, Tween 20 0.5%, a pH 7.4), es va incubar durant 1 hora amb l'anticòs primari monoclonal de ratolí (Monoclonal anti-calcineurin (α -subunit) clone CN-A1; Sigma) diluït 1:1000 en TBS I (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05%, a pH 7.4) amb un 5% de llet en pols, detectant un producte de 61 kDa. Després d'aquesta incubació, es van realitzar 3 rentats de 10 min amb TBS II i es va procedir a la incubació amb l'anticòs secundari anti-ratolí (Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate, Biorad) diluït 1:5000 en TBS I amb un 5% de llet desnatada en

pols durant 1 hora. En estar l'anticòs secundari unit a la peroxidasa, la incubació amb l'anticòs secundari es va realitzar protegint les mostres de la llum. Un cop finalitzada la incubació es van realitzar tres rentats en les mateixes condicions anteriorment descrites.

Per revelar, es van incubar les membranes durant 1 min amb ECL™ (Amersham Biosciences), i ràpidament es van exposar a una pel·lícula fotogràfica (Hyperfilm MP, Amersham), la qual, un cop revelada, va servir per quantificar densitomètricament les bandes obtingudes amb el programa d'anàlisi d'imatge Phoretix (versió 2.51, Phoretix International Ltd). Les mostres es van corregir per la quantitat de tubulina detectada en cada mostra.

1.13.2 iNOS

Els Western blots de iNOS es van realitzar en gels d'acrilamida al 8% tot utilitzant el sistema d'electroforesi Protean II xi Cell (Bio-Rad, Italy), carregant 100 µg de proteïna per mostra. A les mostres se'ls hi va afegir un 10% de tampó de mostra (tampó fosfat 30 mM pH 7, glicerol 30%, SDS 7.5%, ditiotreitòl 9.72 mM i blau de bromofenol 0.05%), i es va utilitzar un marcador de pes molecular de 250 kDa a 6 kDa (SeeBlue Prestained, Novex). El gel es va córrer a 125 volts (fins que el blau de bromofenol de mostra va arribar a la part inferior del gel) utilitzant com tampó electròlit Tris pH 8.8 0.025 M, glicina 0.195 M i SDS 0.1%. Un cop finalitzada l'electroforesi, es va preparar la transferència, en la qual es va utilitzar la membrana de difluorid de polivinilidina (Hybond-P, Amersham, Biosciences UK Limited). La transferència es va realitzar a 400 mA durant 2 hores, utilitzant com tampó de transferència Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% i SDS 0.02%. Per comprovar que la transferència es realitzés correctament, es va realitzar una tinció amb blau de Coomassie del gel, i una tinció amb vermell Ponceau de la membrana. Per això es va tenyir el gel durant 5 min amb blau de Coomassie (0.25% Coomassie Blue G-250, metanol 45%, àcid acètic 10%) i la membrana amb Ponceau (0.2% de Ponceau S en àcid acètic al 3%). Després de les tincions es va decolorar 1 min amb aigua destil·lada i es van visualitzar les bandes.

Posteriorment es va realitzar el bloqueig de la membrana durant 1 hora amb un 5% de llet desnatada en pols en PBS 1X. Després de realitzar 3 rentats de 10 min amb el tampó TBS-T (Tris 4 mM, NaCl 0.5 M, Tween 20 0.5%, a pH 7.4), es va incubar durant tota la nit amb l'anticòs primari monoclonal de ratolí (Transduction Laboratories Inc., Lexington, KY) diluït 1:1000 en TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20

0.05%, a pH 7.5) amb un 5% de llet en pols, detectant un producte de 130 kDa. Després d'aquesta incubació, es van realitzar rentats de 10 min amb TBS-T durant 1h i es va procedir a la incubació amb l'anticòs secundari policlonal anti-ratolí marcat amb peroxidasa (HRP-Conjugated Goat Anti-Mouse Ig specific polyclonal antibody (H+L), BD Biosciences Pharmingen, USA) diluït 1:5000 en TBS-T amb un 5% de llet desnatada en pols durant 1 hora. En estar l'anticòs secundari unit a la peroxidasa, la incubació amb l'anticòs secundari es va realitzar protegint les mostres de la llum. Un cop finalitzada la incubació es van realitzar tres rentats en les mateixes condicions anteriorment descrites.

Com a control positiu per la proteïna iNOS es van utilitzar lisats obtinguts a partir de macròfags activats per citocines i homogenats de diafragma de rata sèptica.

Per revelar, es van incubar les membranes durant 5 min amb solució de detecció Chemilucifer Detection System Kit (Chemicon Inc, Temecula, CA, USA), i ràpidament es van exposar a una pel·lícula fotogràfica (Hyperfilm MP, Amersham), la qual, un cop revelada, va servir per quantificar densitomètricament les bandes obtingudes amb el programa d'anàlisi d'imatge Diversity database (versió 2.1.1, BioRad Laboratories, Philadelphia, PA). Les mostres es van corregir per la quantitat de tubulina detectada en cada mostra.

1.13.3 TNFR1

Els Western blots de TNFR1 es van realitzar en gels d'acrilamida al 10% en el sistema *Mini-Protean II* de BioRad, carregant 50 µg de proteïna per mostra. A les mostres se'ls hi va afegir un 10% de tampó de mostra (tampó fosfat 30 mM pH 7, glicerol 30%, SDS 7.5%, ditiotreitòl 9.72 mM i blau de bromofenol 0.05%), i es va utilitzar un marcador de pes molecular de 205 kDa a 6.5 kDa (Color Markers, Sigma). El gel es va córrer a 100 volts (fins que el blau de bromofenol de mostra va arribar a la part inferior del gel) utilitzant com tampó electrolít Tris pH 8.3 0.025 mM, glicina 0.195 M i SDS 0.1%. Un cop finalitzada l'electroforesi, es va preparar la transferència, en la qual es va utilitzar la membrana *Immobilon-P Transfer Membrane* de Millipore. Aquesta membrana ha de ser activada amb metanol abans de la seva utilització. La transferència es va realitzar a 25 mA durant tota la nit, o bé a 400 mA durant 1 hora, utilitzant com tampó de transferència Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% i SDS 0.02%. Per comprovar que la transferència es realitzés correctament, es va realitzar una

tinció amb blau de Coomassie del gel, i una tinció amb Ponceau de la membrana. Per això es va tenyir el gel durant 5 min amb blau de Coomassie (0.25% Coomassie Blue G-250, metanol 45%, àcid acètic 10%) i la membrana amb Ponceau (0.2% de Ponceau S en àcid acètic al 3%). Després de les tincions es va decolorar 1 min amb aigua destil·lada i es van visualitzar les bandes.

Posteriorment es va realitzar el bloqueig de la membrana durant 1 hora amb un 10% de llet desnatada en pols en PBS 1X. Després de realitzar 2 rentats de 10 min amb el tampó TBS II (Tris 4 mM, NaCl 0.5 M, Tween 20 0.5%, a pH 7.4), es va incubar durant tota la nit a 4°C amb l'anticòs primari policlonal de conill (Policlonal anti-TNFR1 (H-271); Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluït 1:1000 en TBS I (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05%, a pH 7.4) amb un 5% de llet en pols, detectant un producte de 55 kDa. Després d'aquesta incubació, es van realitzar 5 rentats de 5 min amb TBS II i es va procedir a la incubació amb l'anticòs secundari anti-conill (Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate, BioRad) diluït 1:2000 en TBS I amb un 5% de llet desnatada en pols durant 1 hora. En estar l'anticòs secundari unit a la peroxidasa, la incubació amb l'anticòs secundari es va realitzar protegint les mostres de la llum. Un cop finalitzada la incubació es van realitzar tres rentats en les mateixes condicions anteriorment descrites.

Per revelar, es van incubar les membranes durant 1 min amb ECL™ (Amersham Biosciences), i ràpidament es van exposar a una pel·lícula fotogràfica (Hyperfilm MP, Amersham), la qual, un cop revelada, va servir per quantificar densitomètricament les bandes obtingudes amb el programa d'anàlisi d'imatge Phoretix (versió 2.51, Phoretix International Ltd). Les mostres es van corregir per la quantitat de tubulina detectada en cada mostra.

1.13.4 PARP

Els Westerns blots de PARP es van realitzar en gels d'acrilamida al 8% en el sistema *Mini-Protean II* de BioRad, carregant 60 µg de proteïna per mostra. A les mostres se'ls hi va afegir un 10% de tampó de mostra (tampó fosfat 30 mM pH 7, glicerol 30%, SDS 7.5%, ditiotretitol 9.72 mM i blau de bromofenol 0.05%), i es va utilitzar un marcador de pes molecular de 205 kDa a 6.5 kDa (Color Markers, Sigma). El gel es va córrer a 100 volts (fins que el blau de bromofenol de mostra va arribar a la part inferior del gel) utilitzant com tampó electròlit Tris pH 8.3 0.025 mM, glicina 0.195

M i SDS 0.1%. Un cop finalitzada l'electroforesi, es va preparar la transferència, en la qual es va utilitzar la membrana *Immobilon-P Transfer Membrane* de Millipore. Aquesta membrana ha de ser activada amb metanol abans de la seva utilització. La transferència es va realitzar a 400 mA durant 90 min, utilitzant com tampó de transferència Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% i SDS 0.02%. Per comprovar que la transferència es realitzés correctament, es va realitzar una tinció amb blau de Coomassie del gel, i una tinció amb Ponceau de la membrana. Per això es va tenyir el gel durant 5 min amb blau de Coomassie (0.25% Coomassie Blue G-250, metanol 45%, àcid acètic 10%) i la membrana amb Ponceau (0.2% de Ponceau S en àcid acètic al 3%). Després de les tincions es va decolorar 1 min amb aigua destil·lada i es van visualitzar les bandes.

Posteriorment es va realitzar el bloqueig de la membrana durant 1 hora amb un 5% de llet desnatada en pols en PBS 1X. Després de realitzar un rentat de 5 min amb el tampó TBS II (Tris 4 mM, NaCl 0.5 M, Tween 20 0.5%, a pH 7.4), es va incubar durant tota la nit a 4°C o una hora a temperatura ambient amb l'anticòs primari monoclonal de ratolí (Monoclonal anti-PARP; Biosciences) diluït 1:1000 en TBS I (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05%, a pH 7.4) amb un 5% de llet en pols, detectant un producte de 116 o/i 85 kDa. Després d'aquesta incubació, es van realitzar 3 rentats de 10 min amb TBS II i es va procedir a la incubació amb l'anticòs secundari anti-ratolí (Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate, Biorad) diluït 1:3000 en TBS I amb un 5% de llet desnatada en pols durant 1 hora. En estar l'anticòs secundari unit a la peroxidasa, la incubació amb l'anticòs secundari es va realitzar protegint les mostres de la llum. Un cop finalitzada la incubació, es van realitzar tres rentats en les mateixes condicions anteriorment descrites.

Per revelar, es van incubar les membranes durant 1 minut amb ECLTM (Amersham Biosciences), i ràpidament es van exposar a una pel·lícula fotogràfica (Hyperfilm MP, Amersham), la qual, un cop revelada, va servir per quantificar densitomètricament les bandes obtingudes amb el programa d'anàlisi d'imatge Phoretix (versió 2.51, Phoretix International Ltd). Les mostres es van corregir per la quantitat de tubulina detectada en cada mostra.

1.13.5 TUBULINA

Com a control de càrrega dels Western blots es va realitzar la quantificació de tubulina, fent prèviament un *stripping* de la membrana per tal d'eliminar les restes de la hibridació anterior. Per això es va incubar la membrana en un bany humit a 50°C durant 30 min amb un tampó compost per Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2%, β -mercaptoetanol 100 mM. Després de realitzar 2 rentats amb TBS II, es va bloquejar la membrana durant 1 hora amb un 5% de llet desnatada en pols en PBS. Es van realitzar 3 rentats de 5 min amb TBS II i es va incubar durant 1 hora amb un anticòs antitubulina (Monoclonal Anti-A-tubulin, Sigma) diluït 1:8000 en TBS I amb un 5% de llet en pols. Després de 3 rentats més de 10 min, es va incubar durant 1 hora amb l'anticòs secundari anti-ratolí (Biorad) diluït 1:3000 en les mateixes condicions anteriorment descrites. Finalment, i després de realitzar els 3 últims rentats de 10 min amb TBS II, es va revelar la membrana.

1.14 ELISA

La determinació dels nivells plasmàtics de TNF- α i els seus receptors solubles (sTNF-R55, sTNF-R75) i la IL-6 es va realitzar per ELISA (Medgenix, BioSource Europe, Fleurus, Bèlgica per la IL-6 i TNF- α ; Bender MedSystems, Viena, Àustria pels sTNF-R) (Beutler i Cerami, 1987). Els resultats es van expressar en pg/ml.

1.15 VALORACIÓ DE L'ESTRÉS OXIDATIU

1.15.1 DETERMINACIÓ DELS NIVELLS DE GLUTATIÓ

Les dues formes de glutatió, GSH (reduït) i GSSG (oxidat) varen ser determinades en l'homogenat de múscul *vastus lateralis* de pacients MPOC i el grup control, mitjançant HPLC (high-performance liquid chromatography) (Fariss i Reed, 1987).

1.15.2 CARBONILACIÓ DE PROTEÏNES

La reacció directa de ROS amb les proteïnes pot donar lloc a la formació de derivats proteics que contenen grups carbonil altament reactius (aldehids i cetones). En aquest estudi, els nivells d'aquests grups carbonil tan reactius en les cadenes protèiques varen ser detectats mitjançant la reacció amb 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), que resulta en la formació de 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP) (Levine et al., 1994). Les proteïnes derivades de DNP van ser separades per electroforesi i després es va realitzar un immunoblot amb un anticòs selectiu anti-DNP.

1.15.3 DETERMINACIÓ DELS ENZIMS ANTIOXIDANTS I PROTEÏNES CARBONILADES

Per a la valoració de ROS van realitzar Western blots per detectar proteïnes amb grups carbonil (proteïnes oxidades) i dels enzims antioxidants Mn-superòxid dismutasa (Mn-SOD) i catalasa.

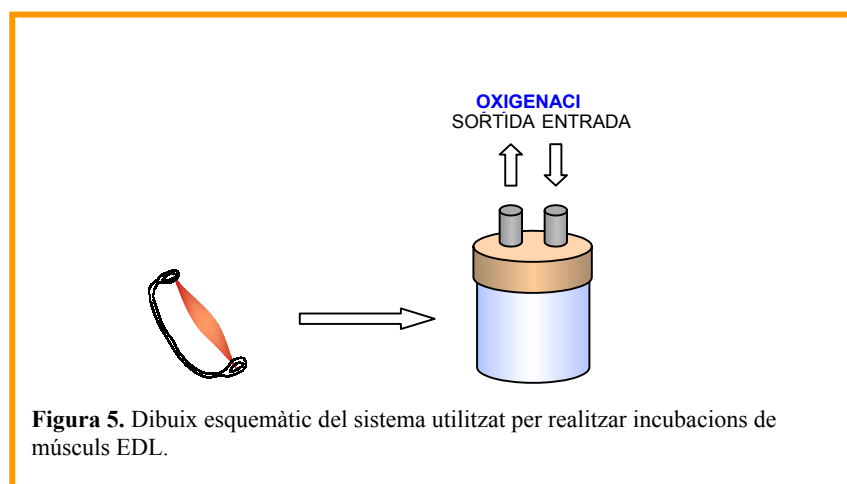
Les mostres de múscul GSN congelades es van homogenitzar en un tampó que contenia HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, NaF 100 mM, pirofosfat sòdic 10 mM, EDTA 5 mM, Tritó-X 0.5%, leupeptina 2 µg/ml, PMSF 100 µg/ml, aprotinina 2 µg/ml i pepstatina A 1mg/100ml. Les mostres es van centrifugar a 1000g durant 30 min. Es va descartar el *pellet* i es va valorar la proteïna muscular total del sobrenedant amb el mètode de Bradford (veure apartat 1.12.1). Seguidament, es va realitzar l'electroforesi de 20 µg de proteïna i després es va fer la transferència a membranes de difluorid de polivinil (PVDF). El bloqueig es va fer amb TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05%, a pH 7.5) amb un 5% de llet en pols, i es van incubar les membranes durant tota la nit amb els anticossos adients. Es van fer servir els següents anticossos policlonals: anti-DNP (Oxiblot kit, Chemico International Inc., Temecula, CA, USA), anti-Mn SOD (StressGen, Victoria, BC, Canada) i anti-catalasa (Calbiochem, San Diedo, CA, USA). Com a controls positius dels enzims Mn-SOD i catalasa es van utilitzar homogenats obtinguts a partir de mitocòndris de cervell de rata i d'eritròcits de rata, respectivament. Després d'aquesta incubació, es van realitzar rentats de 10 min amb TBS-T durant 1h i es va procedir a la incubació amb l'anticòs secundari policlonal anti-ratolí marcat amb peroxidasa diluït 1:5000 (HRP-Conjugated Goat Anti-Mouse Ig specific polyclonal antibody (H+L), BD Biosciences Pharmingen, USA). En estar

l'anticòs secundari unit a la peroxidasa, la incubació amb l'anticòs secundari es va realitzar protegint les mostres de la llum. Un cop finalitzada la incubació es van realitzar 3 rentats en les mateixes condicions anteriorment descrites. Per revelar, es van incubar les membranes durant 5 min amb solució de detecció Chemilucifer Detection System Kit (Chemicon Inc, Temecula, CA, USA), i ràpidament es van exposar a una pel·lícula fotogràfica (Hyperfilm MP, Amersham), la qual, un cop revelada, va servir per quantificar densitomètricament les bandes obtingudes amb el programa d'anàlisi d'imatge Diversity database (versió 2.1.1, BioRad laboratories, Philadelphia, PA). Per confirmar que s'havia carregat la mateixa quantitat de proteïna per totes les mostres, es va procedir a deshibridar les membranes de PVDF i es van rehibridar amb un anticòs anti-tubulina (Monoclonal Anti- α -tubulin, Sigma) diluït 1:8000. En el cas del Western blot per detectar els motius DNP, però, això no va ser possible donat que la presència d'aquests grups va fer que no es pogués donar la unió tubulina amb el seu anticòs.

2. ESTUDIS *EX VIVO*

2.1 PREPARACIÓ DE MÚSCULS AÏLLATS

Es van extreure els músculs EDL de rates anestesiades amb Imalgene®-Rompún® (3:1) segons el mètode descrit per Busquets et al. (2002). Els músculs es van col·locar en un suport metàl·lic de manera que es pogués mantenir la tensió muscular en la que es troben els EDL en situació fisiològica (Figura 5). S'ha descrit que durant 3 hores d'incubació els músculs mantenen intactes els seus nivells d'ATP i fosfocreatina (Busquets *et al.*, 2000).



Un cop extrets, es van incubar en vials de vidre durant 30 min a 35°C (en un bany termostatitzat) sota una atmosfera d'O₂/CO₂ (19:1), en 3 ml de tampó Krebs-Henseleit suplementat amb piruvat (2 mM), HEPES (20 mM) i aminoàcids de cadena ramificada (leucina 17 mM, isoleucina 10 mM, valina 20 mM), a pH 7.4, prèviament gasejat amb carbogen durant 20 min. A continuació es procedia a incubar als músculs en el medi adequat segons el tipus d'assaig.

2.2 TAXA DE DEGRADACIÓ PROTEICA

Per estudiar els efectes directes de la IL-15 sobre la degradació proteica, es van utilitzar preparacions de músculs EDL aïllats (de la manera prèviament descrita) i la posterior quantificació fluorimètrica de la tirosina alliberada al medi (Waalkes i Udenfriend, 1957). Aquest aminoàcid no és significativament sintetitzat ni metabolitzat pel múscul, per la qual cosa, en condicions de síntesi proteica inhibida (en presència de cicloheximida), proporciona una bona mesura de la taxa de degradació proteica muscular.

Els músculs varen ser incubats dins de vials en un bany termostatitzat a 35°C i en agitació (45 cicles/min) durant 3 hores en 2 ml de medi d'incubació compost per tampó Krebs-Henseleit a pH 7.4 que contenia glucosa (5 mM), aminoàcids de cadena ramificada (leucina 17 mM, isoleucina 10 mM, valina 20 mM) i HEPES (20mM). Els vials van estar sota una atmosfera d'O₂/CO₂ (19:1) durant tot el període d'incubació. Els músculs varen ser pre-incubats durant 60 min (30 min en tampó Krebs-Henseleit i 30 min en medi d'incubació), i després es van incubar durant 2 hores en medi d'incubació fresc que contenia 100 ng/ml d'IL-15 o no. Aquest medi també contenia cicloheximida (0.5mM) per inhibir la reincorporació de la tirosina a la proteïna del teixit. Una vegada finalitzada la incubació, es va recollir el medi dels vials i es van mantenir en gel o es van congelar a -20°C.

Per a la determinació de la tirosina alliberada al medi, es van prendre 1.4 ml de la mostra, del blanc (tampó Krebs-Henseleit) o de la patró (patró de tirosina en tampó Krebs-Henseleit de 0.156 a 2.5 µg/ml) i es van barrejar amb 250 µl d'àcid tricloroacètic al 30%. La barreja es va centrifugar a 2500 rpm durant 15 min i el sobrenedant es va barrejar amb 300 µl de reactiu A (1-nitroso-2-naftol 0.1% en alcohol 95%) i 300 µl de reactiu B (0.5 ml (NaNO₂ al 2.5% (p/v) en aigua destil·lada) + 24.5 ml (àcid nítric diluït 1/5 en aigua destil·lada), i es va incubar durant 30 min a 55°C. Una vegada refredada, es

va barrejar amb 4 ml de dicloroetà, es va agitar en el vòrtex i es va centrifugar durant 4 min a 1500 rpm. El sobrenedant es va utilitzar per a la determinació fluorimètrica, ajustant en el fluorímetre la longitud d'ona d'excitació a 460 nm i la d'emissió a 570 nm.

2.3 TAXA DE SÍNTESI PROTÈICA

Pel tal de determinar la síntesi de proteïna muscular, els músculs EDL es van incubar en presència de [^{14}C]fenilalanina.

Els músculs varen ser incubats dins de vials en un bany termostatitzat a 35°C i en agitació (45 cicles/min) durant 3 hores en 2 ml de medi d'incubació compost per tampó Krebs-Henseleit a pH 7.4 que contenia glucosa (5 mM), aminoàcids de cadena ramificada (leucina 17 mM, isoleucina 10 mM, valina 20 mM) i HEPES (20 mM). Els vials van estar sota una atmosfera d'O₂/CO₂ (19:1) durant tot el període d'incubació. Els músculs varen ser pre-incubats durant 60 min (30 min en tampó Krebs-Henseleit i 30 min en medi d'incubació) i després es van incubar durant 2 hores en medi d'incubació fresc que contenia 100 ng/ml d'IL-15 o no. Passat aquest temps, els músculs es van transferir a vials nous amb medi d'incubació suplementat amb 25 mM L-fenilalanina i 1.5 µCi [^{14}C]fenilalanina (activitat específica 119 mCi/mmol), mantenint el tractament amb la rhIL-15. Aquesta última incubació va ser de 30 min i en les mateixes condicions anteriorment esmentades.

Després del temps d'incubació, els músculs varen ser transferits immediatament a salí fred (0.9% NaCl), netejats i secats amb paper de filtre, congelats amb N₂ líquid i pesats. Després es van homogenitzar en salí fred i desproteïnitats amb àcid tricloroacètic al 40% i es van col·locar en eter/etanol (1:1). El pellet va ser secat amb N₂ líquid i digerit en tubs de Teflon amb 0.25 ml de Protosol® (Du Pont) a 50°C durant 2 hores. Posteriorment, es va realitzar el recompte de la radioactivitat de l'homegenat amb 10 ml de líquid de cintil·lació. També es va realitzar el comptatge de la radioactivitat present en el medi d'incubació (fracció extracel·lular). Donat que en el medi d'incubació hi ha una elevada concentració de fenilalanina, la radioactivitat extracel·lular específica de [^{14}C]fenilalanina va ser utilitzada per calcular la quantitat d'aminoàcid incorporat a la fracció protèica i en conseqüència l'estimació de la taxa de síntesi protèica.

2.4 CAPTACIÓ DE α -METIL[1- 14 C]AMINOISOBUTIRAT

Per determinar la captació d'aminoàcids a través del sistema A, es va utilitzar un anàleg d'un aminoàcid no metabolitzable del'alanina, com és α -metil[1- 14 C]aminoisobutirat (MeAiB)

Els músculs EDL es van incubar en vials de vidre durant 30 min a 35°C (en un bany termostatitzat) sota una atmosfera d'O₂/CO₂ (19:1), en 3 ml de tampó Krebs-Henseleit. Passat aquest temps, es van transferir els músculs a vials amb 2 ml medi d'incubació durant 30 min i després es van incubar en 2 ml de medi d'incubació fresc suplementant el grups de músculs tractats amb 100 ng de rhIL-15 per ml de medi. Es van incubar durant 2 hores en aquestes condicions, i seguidament es van tornar a transferir a vials nous amb 2 ml de medi d'incubació suplementat amb 0.1 mM α -metil-aminoisobutirat, 0.12 μ Ci α -metil[1- 14 C]aminoisobutirat (activitat específica 48 mCi/mmol), 1 mM manitol i 0.5 μ Ci [3 H] (activitat específica 20 Ci/mmol), mantenint el tractament amb rhIL-15. Es van incubar durant 30 min en les condicions anteriors.

Amb aquest medi radioactiu, es van incubar els músculs durant 30 min més, temps després del qual es van recollir els músculs, es van netejar amb medi d'incubació per eliminar les restes de traçador adherit i no incorporat, i van ser congelats en nitrogen líquid. Els medis es van utilitzar per determinar la radioactivitat.

Per determinar la quantitat de α -metil[1- 14 C]aminoisobutirat captada pel múscul, es van posar els EDL en tubs Pyrex amb 250 μ l de Protosol® (Du Pont) amb el qual es van incubar a 50°C durant hores fins la seva completa digestió. Un cop el teixit va estar totalment digerit, es van afegir 250 μ l de toluè i 300 μ l de H₂O₂ al 30%, amb els quals es va incubar durant 10 min a la mateixa temperatura. Posteriorment es va neutralitzar amb 150 μ l d'àcid acètic al 25% i es va realitzar el recompte de la radioactivitat amb 10 ml de líquid de cintil·lació, realitzant una doble determinació tant pel 3 H com pel 14 C (Zorzano et al., 1985).

2.5 DESTINS METABÒLICS DE [U-¹⁴C]ALANINA

2.5.1 OXIDACIÓ

Els músculs EDL es van incubar en vials de vidre (tapats amb un tap de cautxú al qual se li havia insertat una tira de paper on posteriorment es recolliria el CO₂) durant 30 min a 35°C (en un bany termostatitzat) sota una atmosfera d'O₂/CO₂ (19:1), en 3 ml de tampó Krebs-Henseleit. Passat aquest temps es van transferir els músculs a vials amb 2 ml medi d'incubació durant 30 min i després es van incubar en 2 ml de medi d'incubació fresc suplementant el grups de músculs tractats amb 100 ng de rhIL-15 per ml de medi. Es van incubar durant 2 hores en aquestes condicions, i seguidament es van tornar a transferir a vials nous amb 2 ml de medi d'incubació amb 1 mM d'alanina, 0.66 µCi [U-¹⁴C]alanina (activitat específica 152 mCi/mmol), 1 mM manitol i 0.5 µCi [³H]manitol (activitat específica 20 Ci/mmol), mantenint el tractament amb rhIL-15. Es van incubar durant 30 min en les condicions anteriors. Per tal de recollir el CO₂ produït, es van afegir 200 µl d'àcid perclòric al 60% en el medi i 200 µl d'hidròxid d'hiamina al paper insertat en el tap. Es va deixar incubar durant 1 hora amb agitació constant i d'aquesta manera l'àcid va desplaçar el CO₂ produït a gas, el qual va ser recollit per la hiamina.

Per determinar la quantitat d'alanina que havia estat oxidada, es va posar la tira de paper amb l'hidròxid d'hiamina en vials amb 10 ml de líquid de cintil·lació i es va procedir al seu recompte. Els resultats es van expressar com nmols de CO₂ produït per gram de múscul.

2.5.2 DESTINS METABÒLICS

Per analitzar el destí metabòlic de l'alanina, es va realitzar una extracció de proteïnes i lípids del múscul. El múscul, un cop homogenat en nitrogen líquid, es va col·locar en tubs de vidre. Es van precipitar les proteïnes afegint 0.5 ml d'àcid tricloroacètic fred, vortejant i incubant 15 min a 4°C. Després de centrifugar (3000 g, 10 min), el sobrenedant es va guardar per l'extracció de lípids, i el *pellet* es va resuspendre en 1 ml de cloroform:metanol (2:1). Es va centrifugar en les mateixes condicions, posant el sobrenedant obtingut amb l'anterior per la posterior extracció de lípids. Per realitzar l'extracció de proteïnes, es va deixar assecar el *pellet* i després es va

resuspendre amb 2 ml d'NaOH 0.3 N i desoxicolat sòdic 0.4%. Es va bullir durant 1 hora, i un cop refredats els tubs, es van posar les proteïnes en vials amb 10 ml de líquid de cintil·lació pel seu posterior recompte. Pel que fa a l'extracció de lípids, es van afegir 5 ml de cloroform:metanol (2:1) i es va agitar per inversió durant 5 min. Després es van afegir 5 ml de PBS i es va tornar a agitar per inversió durant 5 min, centrifugant posteriorment 2 min a 2000 g. Un cop separades les fases, es va descartar la superior i la inferior es va transferir a un vial de cintil·lació, on es va deixar evaporar. Un cop els lípids van estar secs, es van resuspendre en 8 ml de líquid de cintil·lació i es va procedir al seu recompte en un comptador de cintil·lació líquid. Els resultats es van expressar com nmols d'alanina incorporat per gram de teixit.

2.6 CAPTACIÓ DE 2-DESOXIGLUCOSA

Per determinar la captació de 2DOG en músculs aïllats, es van extreure els músculs EDL de rates anestesiades amb Imalgene®-Rompún® (3:1). Els músculs es van manipular amb les consideracions abans esmentades. Un cop extrets, es van incubar en vials de vidre durant 30 min a 35°C (en un bany termostatitzat) sota una atmosfera d'O₂/CO₂ (19:1), en 3 ml de tampó Krebs-Henseleit suplementat amb piruvat (2 mM), HEPES (20 mM) i aminoàcids de cadena ramificada (leucina 17 mM, isoleucina 10 mM, valina 20 mM), a pH 7.4, prèviament gasejat amb carbogen durant 20 min. Passat aquest temps, es van transferir els músculs a vials nous amb 2 ml de medi d'incubació fresc, el qual portava, en el cas del grup tractat, 100 ng/ml de rhIL-15. Després de 30 min d'incubació, es van posar els músculs en altres vials amb el mateix medi, i es van incubar durant 2 hores més. Passat aquest temps es va procedir a realitzar un últim canvi de medi, compost en aquest cas per tampó Krebs-Henseleit suplementat amb manitol 1 mM, D-[³H]manitol (0.35 µCi/ml; activitat específica 20 Ci/mmol), 2-desoxiglucosa 0.1 mM i 2-desoxi-D-[¹⁴C]glucosa (0.1 µCi/ml; activitat específica 60 mCi/mmol). El manitol serveix com mesura indirecta de la quantitat de 2DOG que, en lloc de ser absorbida, es queda a l'espai intersticial. Amb aquest medi radioactiu, es van incubar els músculs durant 30 min més, temps després del qual es van recollir els músculs, es van netejar amb medi d'incubació per eliminar les restes de traçador adherit i no incorporat, i van ser congelats en nitrogen líquid. Els medis es van utilitzar per determinar la radioactivitat present.

Per determinar la quantitat de 2DOG captada pel múscul, es van posar els EDL en tubs Pyrex amb 250 µl de Protosol® (Du Pont) amb el qual es van incubar a 50°C durant hores fins la seva completa digestió. Un cop el teixit va estar totalment digerit, es van afegir 250 µl de toluè i 300 µl de H₂O₂ al 30%, amb els quals es va incubar durant 10 min a la mateixa temperatura. Posteriorment es va neutralitzar amb 150 µl d'àcid acètic al 25% i es va realitzar el recompte de la radioactivitat amb 10 ml de líquid de cintil·lació, realitzant una doble determinació tant pel ³H com pel ¹⁴C.

2.7 DESTINS METABÒLICS DE LA GLUCOSA

2.7.1 OXIDACIÓ

Per determinar l'oxidació de la glucosa en músculs aïllats, es van extreure els músculs EDL de rates anestesiades amb Imalgene®-Rompún® (3:1) i es van col·locar en un suport metàl·lic, de manera que es pogués mantenir la tensió muscular en la que es troben els EDL en situació fisiològica, de la mateixa manera que s'ha descrit en l'apartat anterior. Un cop extrets, es van incubar en vials de vidre (tapats amb un tap de cautxú al qual li havíem insertat una tira de paper on posteriorment es recolliria el CO₂) durant 30 min a 35°C (en un bany termostatitzat) sota una atmosfera d'O₂/CO₂ (19:1), en 3 ml de medi d'incubació, compostat per tampó Krebs-Henseleit suplementat amb glucosa (0.1 mM), HEPES (20 mM) i aminoàcids de cadena ramificada (leucina 17 mM, isoleucina 10 mM, valina 20 mM), a pH 7.4, i gasejat prèviament amb carbogen durant 20 min. Passat aquest temps, es van transferir els músculs a vials nous amb 2 ml de medi d'incubació suplementat amb piruvat (2 mM) i manitol (1 mM). En aquest moment es van establir els grups controls i tractats, portant els últims 100 ng de rhIL-15 per ml de medi. Es van incubar durant 2 hores en aquestes condicions, i seguidament es van tornar a transferir a vials nous amb 2 ml de medi d'incubació suplementat amb piruvat (2 mM), manitol (1 mM), D-[U-¹⁴C]glucosa (0.5 µCi/ml; activitat específica 304 mCi/mmol) i D-[³H]manitol (0.5 µCi/ml; activitat específica 20 Ci/mmol). El manitol serveix com mesura indirecta de la quantitat de glucosa que, en lloc de ser absorbida, es queda a l'espai intersticial. Es van incubar durant 30 min amb oxigenació. Per tal de recollir el CO₂ produït, es van afegir 200 µl d'àcid perclòric al 60% en el medi i 200 µl d'hidròxid d'hiamina al paper insertat en el tap. Després de deixar incubar durant 1 hora

amb agitació constant, l'àcid va desplaçar el CO₂ produït a gas el qual va ser recollir per la hiamina.

2.7.2 DESTINS METABÒLICS

Per determinar la quantitat de glucosa incorporada a lípids, es va realitzar una extracció de lípids del múscul. El múscul, un cop triturat en nitrogen líquid, es va col·locar en tubs de vidre. Es van precipitar les proteïnes afegint 0.5 ml d'àcid tricloroacètic fred, vortejant i incubant 15 min a 4°C. Després de centrifugar (3000 g, 10 min), el sobrenedant es va guardar per l'extracció de lípids, i el *pellet* es va resuspendre en 1 ml de cloroform:metanol (2:1). Es va centrifugar en les mateixes condicions, posant el sobrenedant obtingut amb l'anterior. Per l'extracció de lípids, es van afegir 5 ml de cloroform:metanol (2:1) i es va agitar per inversió durant 5 min. Després es van afegir 5 ml de PBS i es va tornar a agitar per inversió durant 5 min, centrifugant posteriorment 2 min a 2000 g. Un cop separades les fases, es va descartar la superior i la inferior es va transferir a un vial de cintil·lació on es va deixar evaporar. Un cop els lípids van estar secs, es van resuspendre en 8 ml de líquid de cintil·lació i es va procedir al seu recompte en un comptador de cintil·lació líquida. Per determinar la incorporació a proteïna, els fragments de teixit, prèviament deslipidats pel mètode anteriorment descrit, es van solubilitzar incubant-los amb Protosol (Dupont Co., Boston, USA) durant 2h a 50°C i posteriorment decolorats amb peròxid d'hidrogen (Peng, 1977). El teixit solubilitzat va barrejar-se amb 10 ml de líquid de cintil·lació i posteriorment es va determinar la radioactivitat incorporada. Es va procedir a la determinació del contingut de glicogen mitjançant la precipitació amb etanol (Good et al., 1933), seguit de la hidròlisi i valoració de la glucosa (Slein, 1963). La incorporació del traçador en el glicogen tissular es va determinar després de la precipitació i hidròlisi del polisacàrid. De la mateixa manera que en els casos anteriors, es va procedir al comptatge. Els resultats es van expressar com nmols de glucosa incorporada a lípid, proteïna o glicogen per mg de proteïna.

3. ESTUDIS *IN VITRO*

3.1 CULTIUS CEL·LULARS

3.1.1 NORMES GENERALS DE MANIPULACIÓ

Quan es treballa amb cultius cel·lulars, és imprescindible mantenir condicions estrictes d'esterilitat, i és extremadament important mantenir un seguiment de les característiques observables del cultiu al microscopi, per detectar aviat contaminacions (bacteris, fongs, llevats) o canvis espontanis en el fenotip dels cultius.

Es va treballar sempre intentant mantenir la major neteja possible; també rentant-nos les mans amb sabó i mullant-les amb etanol abans de començar a treballar. Es va treballar sempre sota campana de fluxe laminar vertical, la seva superfície es descontaminava amb etanol abans i després de cada sessió de treball. Tot el material fungible estèril es guardava en bosses ben tancades per protegir-lo de contaminacions i brutícia, obrint-les i tancant-les preferentment dins de la campana i mantenint-les dins de la sala de cultius. Les ampolles de medis i reactius, els succionadors i altre material que no estigués convenientment embolicat es fregava amb una mica d'alcohol abans d'introduir-lo dins de la campana. Les ampolles de medi estèrils s'obrien i es tancaven dins de la campana, a prop de la flama del encenedor Bunsen, i es segellaven amb una cinta al voltant del tap abans de treure-les. Tota substància o material que hagués d'estar en contacte amb les cèl·lules es procurava que fos de qualitat per cultius (normalment ja estèrils) o s'esterilitzaven per filtració (filtre de 22 µm) o autoclavat.

Tenint en compte que el flux laminar de la campana és vertical de dalt a baix, els taps de les ampolles i les tapes de les plaques obertes es colocaven boca avall i es procurava no passar la mà o qualsevol altre objecte per sobre dels medis, plaques al descobert o qualsevol material destinat a estar en contacte amb les cèl·lules.

Es realitzaven netejes periòdiques de la campana i del incubador, per evitar contaminacions, i tota la sala era sotmesa a radiacions ultravioleta durant tota la nit.

Les condicions dins de l'incubador eren sempre de 37°C, 90% d'humitat relativa i 5% de CO₂. Es va procurar mantenir les cèl·lules el menor temps possible fora de l'incubador.

Degut a que les cèl·lules amb les que treballem són immortalitzades, és relativament fàcil l'aparició d'alteracions fenotípiques degudes a l'adquisició espontània de característiques de transformació; per això seguim atentament l'aspecte dels cultius en l'observació microscòpica, i no utilitzavem cèl·lules de més de 12 subcultius a partir del pase zero del proveïdor.

El manteniment del estoc es va fer de forma que mai arribés a confluència per no deplecionar el component mioblàstic de la població de cèl·lules: una vegada els mioblasts inicien el programa miogènic, perden irreversiblement la capacitat proliferativa. Les cèl·lules congelades van ser mantingudes en nitrogen líquid.

Es va comprovar l'absència de contaminació per micoplasma mitjançant el kit de detecció de micoplasmes (Biological Industries Co. Reactiva S.A), ja que aquest tipus de contaminació no és detectable a simple vista.

3.1.2 LÍNIA CEL·LULAR C2C12

Aquesta línia cel·lular és un subclon derivat per H. Blau (Blau et al., 1985) de la línia cel·lular miogènica murina C2, establida a partir de cèl·lules satèl·lit de múscul esquelètic de l'extremitat posterior de ratolí C3H adult (Yaffe i Saxel, 1977).

Aquesta línia es diferencia ràpidament i produeix amplis miotubs contràctils que expressen característiques de múscul esquelètic. Aquest clon proporciona un model excel·lent per al estudi de la miogènesi *in vitro* i la diferenciació cel·lular (Blau et al., 1985).

Les cèl·lules amb es quals treballem varen ser obtingudes directament de l'American Type Culture Collection (ATCC CRL-1772, Lot # F-15168).

3.1.3 MEDIS DE CULTIU, SUPLEMENTS I ANTIBIÒTICS

Dubelco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Aquest medi està estèril i ve suplementat amb 4.5 g glucosa/ml, 110 mg piruvat sòdic/ml i 2 mM L-glutamina. L'obriem dins de la campana i el suplementavem immediatament amb 100 unitats de penicilina/ml, 100 mg d'estreptomicina/ml, 25 ng de fungizona/ml i el sèrum corresponent. Una vegada obert es conservava a 4°C i no més de 15 dies.

Sèrum Fetal Bovi (FBS)

És molt important mantenir un lot constant de sèrum, ja que un canvi d'aquest pot introduir molta variabilitat en els experiments. Tots els experiments es van portar a terme amb FBS sempre de la mateixa casa comercial i del mateix lot. El sèrum es va conservar en alíquotes de 50 ml a -20°C . Per inactivar el complement, abans d'aliquotar es mantenia el sèrum 1 hora a 55°C .

Sèrum Equí (HS)

Sempre utilitzavem el mateix HS i del mateix lot. Mantenim les mateixes consideracions de conservació i manipulació que amb el FBS.

AntibiòticsPenicilina-Estreptomicina-Fungizona (PSF)

Els dos primers són antibiòtics i el tercer és un antifúngic. S'afegia al DMEM just després d'obrir l'ampolla, diluint-lo 1:100. Es conserva en alíquotes de 10 ml a -20°C .

Tripsina (Tripsina-Versene)

És convenient utilitzar tripsina amb EDTA perquè aquest últim és un agent quelant dels cations bivalents, inhibint l'adhesió intercel·lular i a la placa. S'aliquotaven en tubs estèrils de 15 ml (ja que resisteix varis cicles de congelació i descongelació), i es conservava a -20°C .

Tampó fosfat salí (PBS)

Per 1l:

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
KH_2PO_4	0.2 g
$\text{Na}_2\text{PO}_4 (2\text{H}_2\text{O})$	1.43 g

PH 7.4 ± 0.05

Es preparava en ampolles de vidre de 500 ml, s'ajustava el pH amb HCl 1M i s'autoclavava.

3.1.4 TÈCNIQUES GENERALS EN CULTIUS CEL·LULARS

3.1.4.1 MANTENIMENT DE L'ESTOC

L'estoc es va mantenir sempre en DMEM 10% FBS en plaques de 10 cm de diàmetre o en flascons de rosca de 75 mm². L'estoc es va mantenir sempre per sota del 80% de confluència, fent subdivisions cada dos o tres vegades per setmana en les que es diluïen les cèl·lules entre 5 i 15 vegades. Es posava especial cura en que les cèl·lules estiguéssin ben disperses perquè no es formessin clons, ja que en el centre d'aquests grups els mioblasts poden començar el programa miogènic. Les alíquotes descongelades procedien d'un pase (o subdivisió) 2 o 3 a partir de l'original de les quals no es van realitzar més de 8 o 9 subdivisions. El temps aproximat de duplicació de la població és d'unes 24 hores (quan les cèl·lules no estan gaire diluïdes). Una placa de 10 cm de diàmetre conté aproximadament 4×10^6 cèl·lules.

3.1.4.2 SUBDIVISIÓ (TRIPSINITZACIÓ)

S'aspirava el medi de les plaques i es rentaven tres vegades amb PBS o amb DMEM sense sèrum (procurant eliminar tota la resta de sèrum perquè inhibeix la tripsina). S'afegia 1 ml de tripsina sense diluir per placa de 10 cm de diàmetre, es posaven 7 min a l'incubador. Es treien i es parava la reacció afegint medi amb sèrum. Es centrifugava a 220 g durant 4 min i es retirava el sobrenedant que contenia la tripsina. Finalment es resuspenien les cèl·lules amb medi amb sèrum.

3.1.4.3 COMPTATGE

Una vegada tripsinitzades les cèl·lules i feta la primera dilució, es resuspenien molt bé amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur estèril, s'agitava bé el tub, i es prenia una alíquota de 15 µl per posar en el hematocitòmetre (cambra de Neubauer). Observant al microscopi a 100 augments, es comptaven 6 dels 16 quadrets de cada quadrant. El nombre de cèl·lules es calculava de la següent manera:

Nº cèl·lules/ ml = mitjana del comptatge dels 4 quadrants $\times 10^4$

3.1.4.4 SEMBRA

Una vegada tripsinitzat l'estoc, es feia una primera dilució d'aproximadament $1.5 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml, i es realitzava el comptatge. Després de fer els càlculs es sembrava a $3.7 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², de forma que es posaven:

- En cada placa de 10 cm de diàmetre, 10 ml de medi amb $2.5 \cdot 10^6$ cèl·lules
- En cada pouet de placa de 6 pous, 2 ml amb $3.5 \cdot 10^5$ cèl·lules

Una vegada realitzada la dilució de cèl·lules desitjada, s'agitava el tub periòdicament per evitar que aquestes es dipositessin al fons. Una vegada sembrades, s'agitaven les plaques suaument d'esquerra a dreta i endavant i endarrera, per repartir-les bé per tota la superfície.

3.1.4.5 CONGELACIÓ

Les cèl·lules tripsinitzades i resuspeses en DMEM-10%FBS es comptaven, es centrifugaven durant 4 min a 220g, i una vegada eliminat el sobrenedant es resuspenien en medi de congelació (DMEM-10%FBS, 10% DMSO) a una concentració de 10^6 cèl·lules/ml. Es repartien en alíquotes d' 1 ml en els vials de congelació i es procedia a la següent seqüència de congelació: 1h a 4°C, 2 hores a -20°C i tota la nit a -80°C. Es conservaven congelades en nitrogen líquid.

3.1.4.6 DESCONGELACIÓ

L'alíquota es desongelava el més ràpidament possible en un bany a 37°C i es resuspenia ràpidament en 10 ml de DMEM-10%FBS, per evitar l'acció del DMSO. Es centrifugava a 220 g durant 4 min i es descartava el sobrenedant. Per últim, es resuspenia en 10 ml de DMEM-10% FBS i es sembraven en una placa de 10 cm de diàmetre.

3.1.4.7 TRACTAMENTS

La rhIL-15 (PeProtech) es conservava a -20°C just fins al moment de ser afegida al medi. Es barrejava la citocina en un tub amb el medi adient i després es repartia entre els pouets, per assegurar-nos que tots rebessin la mateixa dosi. El tractament era d'una única dosi de rhIL-15 a una concentració final de 100 ng/ml.

3.2 CONDICIONS DE CULTIU I DIFERENCIACIÓ DE LES CÈL·LULES

Les cèl·lules C2C12 es van sembrar a 3.7×10^4 cèl.lules/cm² en DMEM-FBS 10%. Al dia següent les cèl·lules es trobaven en un 90-100% de confluència, de manera que es va procedir al canvi de medi per diferenciar. Els experiments es van realitzar a dia 7 de diferenciació.

3.3 CAPTACIÓ DE 2-DESOXI-[¹⁴C]GLUCOSA

Per estudiar la captació de 2DOG en cèl·lules C2C12, es van establir dos grups: controls i tractats amb IL-15 (10 ng/ml). Les cèl·lules es van fer créixer en plaques multipous de 6 pous. Un cop les cèl·lules van estar diferenciades (dia 7 de diferenciació), es van rentar dues vegades amb PBS i es van afegir 3 ml de tampó Krebs-Henseleit a pH 7.4 suplementat amb piruvat 2 mM, HEPES 20 mM, 2-DOG 25 mM i 0.01 $\mu\text{Ci/ml}$ de 2-desoxi-[¹⁴C]glucosa; en el cas del grup tractat, el medi també contenia la IL-15. Es van incubar les cèl·lules 3 hores a 37°C. Posteriorment es van rentar els pous dues vegades amb PBS i es van incubar durant 1 hora més a 37°C amb NaOH 0.1 N-Tritó 0.1%. Es va realitzar una valoració de proteïnes pel mètode de BCA, i es va quantificar la radioactivitat continguda en 200 μl de l'homogenat cel·lular. Els resultats es van expressar com mmols de 2DOG per mg de proteïna.

3.4 DESTÍ METABÒLIC DE LA [¹⁴C]GLUCOSA

Per estudiar el destí metabòlic de la glucosa en cèl·lules C2C12 diferenciades, es van establir dos grups: controls i tractats amb IL-15 (10 ng/ml). Les cèl·lules es van fer créixer en flascons de 25 cm². Un cop les cèl·lules van estar diferenciades (dia 7 de

diferenciació), es van rentar dues vegades amb PBS 1X i es van afegir 3 ml de tampó Krebs-Henseleit suplementat amb glucosa 5 mM, HEPES 20 mM i 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^{14}C]glucosa. Es van tapar els flascons amb un tap de cautxú on s'havia incorporat una tira de paper on posteriorment es recolliria el CO_2 , i es van incubar durant 3 hores a 37°C . Passat aquest temps es van afegir 200 μl de H_2SO_4 0.5 M al medi, i 200 μl d'hidròxid d'hiamina al paper, i es van incubar durant 1 hora més en agitació suau. Després, es va posar el paper en un vial amb 10 ml de líquid de cintil·lació, i es va recollir el medi, per a la determinació de l'oxidació. Les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS i es van incubar durant 1 hora més a 37°C amb NaOH 0.1 % N-Tritó 0.1%. De l'homogenat cel·lular es va realitzar una valoració de proteïnes pel mètode de BCA (Pierce). Per l'anàlisi de la quantitat de glucosa incorporada a lípid, es va fer una extracció de lípids. A 200 μl de l'homogenat se li van afegir 1.5 ml d'una solució amb heptà:isopropanol: H_2SO_4 1N (4:1:0.1), es va agitar vigorosament i es van afegir 1.5 ml més d'heptà. Després de tornar a agitar, es van deixar separar les fases durant uns minuts. Es va recollir la fase orgànica, la qual es va posar en un vial amb 5 ml de líquid de cintil·lació pel seu recompte. Els resultats es van expressar com nmols de glucosa incorporada a lípid per mg de proteïna. Per determinar la incorporació a proteïna, la fase sobrant de l'extracció de lípids es va incubar amb Protosol (Dupont Co., Boston, USA) durant 2h a 50°C i posteriorment es va decolorar amb peròxid d'hidrogen (Peng, 1977). Després, va barrejar-se amb 10 ml de líquid de cintil·lació i posteriorment es va determinar la radioactivitat incorporada. Els resultats es van expressar com nmols de glucosa incorporada a proteïna per mg de proteïna.

4. MANIPULACIÓ D'ACIDS NUCLEÏCS

4.1 EXTRACCIÓ DE DNA

Per realitzar l'extracció de DNA, es van triturar uns 100 mg de teixit en nitrogen líquid. Les mostres es van recollir amb una espàtula prèviament refredada amb nitrogen líquid i es van posar en eppendorfs prepesats. Es van tornar a pesar els eppendorfs amb la mostra i es van congelar ràpidament. La diferència de pesos va servir per estimar la quantitat real de mostra recollida. Posteriorment, es van afegir a cada mostra 1.2 ml de tampó Kauffman (Tris 0.5 M pH 9, EDTA 2 mM pH 8.3, NaCl 10 mM, SDS 1 %) amb

0.1 mg/ml de proteïnasa K (Roche Diagnostics). Després de remenar suaument per inversió per assegurar la penetració del tampó a la mostra, es va deixar 12-18 hores en un termoagitador a 50°C amb una petita oscil·lació. Un cop el teixit va estar ben homogenat, es va realitzar una extracció amb fenol-cloroform. Es va separar cada mostra en dos eppendorfs, i es van afegir 750 µl de fenol/cloroform (1:1) a cada mostra. Després de remenar per inversió durant 2 min, o bé amb el vòrtex de manera molt suau durant uns 10-15 segons, es va centrifugar (13000 g 1 min) i es va transferir el sobrenedant a un nou eppendorf, al qual se li va realitzar una altre extracció amb fenol/cloroform. Al sobrenedant recollit se li van afegir 750 µl de cloroform, es va remenar per inversió durant 2 min o bé amb el vòrtex de manera molt suau durant uns 10-15 segons, i es va centrifugar en les mateixes condicions, recuperant finalment el sobrenedant. Per tal de precipitar el DNA, es van afegir 45 µl d'acetat sòdic 3 M pH 5.2 i etanol 100% fred fins completar l'1.5 ml de capacitat de l'eppendorf. Després de remenar suaument, es va començar a visualitzar el DNA, el qual va acabar de precipitar després de 18 hores a -80°C. Després de centrifugar (13000 g 45 min a 4°C) es va eliminar el sobrenedant amb la pipeta (no per decantació) i es va afegir 1 ml d'etanol al 70%. Després de centrifugar en les mateixes condicions, es va eliminar el sobrenedant i es va deixar assecar el *pellet*, corresponent al DNA. Els àcids nucleics es van resuspendre en 30 µl de tampó TE pH 8 (Tris 10 mM i EDTA 1 mM) amb 200 µg/ml ribonucleasa A (Sigma) i es van incubar 1 hora a 37°C amb una petita oscil·lació. Finalment les mostres, que havien estat prèviament separades, es van ajuntar i van ser guardades a -20°C.

Abans de procedir a la seva quantificació espectrofotomètrica (apartat 4.3), es van deixar les mostres durant 5 min a 65°C amb una petita oscil·lació per acabar de dissoldre bé el DNA.

4.1.1 FRAGMENTACIÓ DEL DNA

L'estudi de fragmentació del DNA es va realitzar a partir de múscul GSN. L'extracció de DNA s'ha detallat anteriorment en aquest capítol. La integritat del DNA es va realitzar mitjançant l'electroforesi en gel d'agarosa al 2% i tinció amb bromur d'etidi. El percentatge de DNA fragmentat es va quantificar per densitometria (Phoretix

versió 2.51, Phoretix International Ltd). Com a control positiu de fragmentació, es va utilitzar DNA de fetge de ratolí tractat amb l'anticòs anti-Fas durant 8 hores (Ogasawara et al., 1993).

4.2 EXTRACCIÓ D'RNA

Per l'extracció d'RNA es va fer servir el reactiu Tripure Isolation Reagent® (Roche), el qual permet obtenir aproximadament entre 1-1.5 µg RNA/mg de teixit en el cas del múscul.

Per realitzar l'extracció, es van homogenar uns 100 mg de teixit amb 1 ml de Tripure en un politró a velocitat mitjana (9500-13500 rpm). Els homogenats es van centrifugar (12000 g 1 min 4°C) per eliminar restes de teixit no disgregades, i el sobrenedant es va passar a un eppendorf nou. Després d'afegir 200 µl de cloroform, es va agitar durant 15 segons i es van incubar les mostres 10 min a temperatura ambient. Es va centrifugar (12000 g 15 min 4°C) i es van obtenir dues fases: una inferior amb els dissolvents orgànics (fenol-cloroform), i una superior, la fase aquosa, que contenia l'RNA. Després de passar la fase superior a un nou eppendorf, es van afegir 500 µl d'isopropanol, es va incubar 5 min a temperatura ambient i es va centrifugar 10 min en les condicions anteriors. Un cop eliminat el sobrenedant, el *pellet* va ser resuspès en 1 ml d'etanol al 75% (en aigua DEPC) i es va tornar a centrifugar durant 5 min en les mateixes condicions. Finalment, després d'eliminar el sobrenedant i assecar el *pellet*, es va resuspendre l'RNA en 40 µl d'aigua DEPC i es va procedir a la valoració de la seva concentració amb l'espectrofotòmetre.

4.3 QUANTIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLÈICS

Per quantificar la concentració d'àcids nucleics, es van utilitzar cubetes de quars i es va realitzar la valoració en un espectrofotòmetre Shimadzu. Amb aquest protocol es realitza una doble lectura: a 260 nm, que és la longitud d'ona de màxima absorció dels àcids nucleics, i a 280 nm, longitud d'ona d'absorció de les proteïnes. Per això es va agafar 1 µl de la solució d'àcids nucleics i es va diluir en 500 µl d'aigua bidestil·lada. La lectura a 260 nm (àcids nucleics) i a 280 nm (proteïnes), ens dona una relació indicativa de la puresa i integritat del producte de l'extracció. Una relació superior a 1.8

indica degradació d'àcids nucleics; una relació inferior indica un contingut proteic tant més elevat com menor sigui la relació. La concentració d'àcids nucleics es va calcular de la següent manera,

$$[\text{ÀC. NUCLEÏCS}] = (\text{DO } 260 \text{ nm/E}) \times (500 \text{ } \mu\text{l cubeta}/1 \text{ } \mu\text{l mostra})$$

on $E = 25 \text{ } \mu\text{l}/\mu\text{g}$ per RNA i DNA de cadena senzilla, o $E = 20 \text{ } \mu\text{l}/\mu\text{g}$ per DNA de cadena doble.

4.4 COMPROVACIÓ DE L'ESTAT DE L'RNA

Per assegurar la qualitat de l'RNA obtingut, es van carregar entre 0.5-2 μg d'RNA en un gel desnaturalitzant d'agarosa (1.2 % agarosa, 18 % formaldehid, MOPS) que es va córrer durant 30 min a 90 volts. L'RNA portava com a tampó de mostra MOPS10X:formamida:formaldehid (2:1:3) i com a tampó de càrrega TC (SDS 0.5%, Blau de Bromofenol 0.25%, EDTA 25 mM, glicerol 25%):bromur d'etidi (40:1). La proporció entre els volums de mostra:tampó de mostra:tampó de càrrega va ser de 1:3:1. Abans de carregar la mostra, aquesta es va incubar 5 min a 65°C en un termoagitador perquè el bromur d'etidi s'incorporés en l'RNA. Finalment, en un transil·luminador de llum ultraviolada es van visualitzar les bandes corresponents als mRNAs ribosòmics 18S i 28S.

4.5 NORTHERN BLOT

L'anàlisi per Northern Blot s'utilitza per determinar la mesura i la quantitat de qualsevol RNA específic a partir d'una barreja d'RNAs. Aquesta tècnica pràcticament no ha patit modificacions des de la seva publicació per Alwine al 1977.

Per realitzar el Northern Blot, es va córrer l'RNA en un gel desnaturalitzant d'agarosa, que permet obtenir una bona resolució de l'RNA de cadena senzilla (Lehrach *et al.*, 1977). La desnaturalització de l'RNA garanteix que la mobilitat electroforètica es produeixi en funció del pes molecular, així com una eficient transferència de l'RNA cap a la membrana de Nylon.

Es van carregar 20 µg d'RNA en un gel desnaturalitzant d'agarosa al 1.2 % que es va córrer durant 3 hores a 90 V. L'RNA va portar com a tampó de mostra MOPS10X:formamida:formaldehid (2:1:3) i com a tampó de càrrega TC (SDS 0.5%, Blau de Bromofenol 0.25%, EDTA 25 mM, glicerol 25%):bromur d'etidi (40:1). La proporció entre els volums de mostra:tampó de mostra:tampó de càrrega va ser de 1:3:1. Igual que en l'apartat anterior, es van incubar les mostres 5 min a 65°C en un termoagitador, per tal de que el bromur d'etidi s'incorporés en els l'RNAs. Un cop l'electroforesi va finalitzar, es va comprovar en el transiluminador l'estat de l'RNA.

La transferència es va realitzar durant 24 hores per capilaritat, en un sistema de transferència unidireccional en el que el tampó SSC 20X, que està en contacte constant amb al gel, va arrossegant l'RNA cap a una membrana de Nylon (Hybond; Amersham). Per comprovar l'eficiència de la transferència, es va exposar la membrana i les restes del gel en un transil·luminador, observant on es localitzava el bromur d'etidi. Per fixar l'RNA de forma covalent, es va col·locar la membrana en un *gene-liker* (mitjançant radiació UV, 150 mJoules; BioRad G.S. Gene Linker UV Chamber).

La membrana es va prehibridar amb tampó fosfat 7.2 M pH 6.8, SDS 7%, EDTA 1 mM i BSA 1%, durant un mínim d'una hora a 65 °C, a excepció de les sondes per FAT i FATP, que es van preincubar i incubar a 42 °C. Posteriorment es va afegir la sonda prèviament marcada amb el kit Rediprime™ II i bullida durant 5 min i es van deixar hibridant tota la nit a 65°C o a 42°C en funció de la sonda. Després de la hibridació, es van realitzar 3 rentats de 10 min a les temperatures adients amb SSC 2X-SDS 0.1%, SSC 1X-SDS 0.1% i SSC 0.1X-SDS 0.1% respectivament. Finalment es va exposar la membrana a una pel·lícula fotogràfica (Hyperfilm MP, Amersham), la qual un cop revelada, va servir per quantificar densitomètricament les bandes obtingudes amb el programa d'anàlisi d'imatge Phoretix (versió 2.51, Phoretix International Ltd). L'expressió dels gens analitzats va ser corregida per l'expressió del rRNA 18S.

4.6 MARCATGE DE LA SONDA

Pel marcatge de la sonda s'utilitza en kit Rediprime™ II, Random Prime Labelling System (Amersham Biosciences). Es van agafar uns 40 ng de sonda que, un cop liofilitzats, van ser resuspesos en 45 µg de Tris 10 mM-EDTA 1 mM. Es va bullir la sonda durant 5 min, es va deixar en gel uns altres 5 min, i es va afegir el DNA en

l'eppendorf comercial, en gel. Després d'afegir 5 µl de α -³²P-dNTP (500 µCi, Amersham, Bucks), es va remenar i es va deixar a temperatura ambient durant 1 hora a 37°C. La reacció de marcatge es va aturar amb 5 µl d'EDTA 0.2 M. Posteriorment es van afegir 50 µl d'aigua bidestil·lada i es va centrifugar en la columneta comercial Microspin™ S-200 HR Columns (Amersham Biosciences). Es van estimar les cpm en 2 µl de la suspensió de sonda marcada, i es va calcular la quantitat de sonda a afegir per utilitzar $2 \cdot 10^6$ cpm per cada hibridació.

4.7 SONDES DE cDNA

Les sondes de cDNA utilitzades en aquesta tesis han estat: la regió codificant sencera per la UCP2 de ratolí (Fleury *et al.*, 1997), un clon de cDNA amb la seqüència codificant sencera per la UCP3 de ratolí (Fleury i Bouillaud, GenBank accession number AF032902), un clon de cDNA que contenia 12 parells de bases de la segona seqüència codificant de la ubiquitina més la tercera i quarta seqüència completa i 120 parells de bases de l'extrem 3' no traduït del gen UB1 de la poliubiquitina de pollastre (Bond i Schlessinger, 1985). Per a la subunitat C8 del proteasoma es va utilitzar com a sonda el clon de cDNA que contenia 850 parells de base del gen de C8 del proteasoma de rata (Tanaka *et al.*, 1990). La sonda per Bax es va generar per PCR (Accession N°. U49729).

4.8 RETROTRANSCRIPTASE POLIMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) és una tècnica que ens permet amplificar *in vitro* un fragment de DNA sense necessitat d'aïllar-lo, utilitzant dos oligonucleòtids sintètics (encebadors) que hibridaran en seqüències oposades i flanquejaran la seqüència de DNA que es vol amplificar. En aquesta tesis s'ha fet servir una variant de la PCR, la RT-PCR, en la qual es combina una reacció de transcripció reversa de tots els mRNA d'un teixit seguit de l'amplificació específica del cDNA d'interès mitjançant una reacció de PCR.

Per realitzar totes les RT-PCR, es va utilitzar el kit comercial Time-to-go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences), amb el qual la RT i la PCR succeeixen en una única reacció. Els encebadors es van adquirir a Invitrogene. Per dissenyar els

encebadors, es va utilitzar el programa www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html a partir de la seqüència del mRNA obtinguda en PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi). Realitzant un Megablast en una altra aplicació de la mateixa pàgina web, es va assegurar l'especificitat dels primers dissenyats.

Per la posada a punt de les diferents condicions de RT-PCR per cada sonda, es va realitzar una prova amb cada un dels gens en diferents teixits per establir la zona de linealitat de la reacció. Per això es van realitzar les diferents RT-PCR esmentades amb 2 concentracions d'RNA, 0.25 µg i 0.5 µg, a 25, 30, 35 i 40 cicles. En funció dels productes obtinguts, es van seleccionar les millors condicions per cada gen. Els productes de PCR es van visualitzar en un gel d'agarosa a l'1.5 % o al 2 % amb bromur d'etidi i es va quantificar per densitometria. A la taula següent es detallen els encebadors utilitzats, les condicions d'amplificació, així com la mida dels fragments obtinguts per cadascun dels gens analitzats.

GEN	CONDICIONS D'AMPLIFICACIÓ	CICLES	PRIMERS	MIDA DEL PRODUCTE
rTNF-α	94°C 1'30'' 60°C 1' 72°C 2'	32	5'TACTGAACTTCGG GGTGATTGGTC 3' 5'AGCCTTGTCCCTT GAAGAGAACC 3'	298
hTNF-α	94°C 1' 61°C 1' 72°C 2'	32	5'AAGAGTTCCCCA GGGACCTCT 3' 5'CCTGGGAGTAGAT GAGGTACA 3'	412
rTNFR1	94°C 30'' 60°C 30'' 72°C 45''	30	5'CCTGATTTCCATC TACCTCTGACTTTG AGC 3' 5'ACACTGGAAATGC GTCTCACTCAGGTAG CG 3'	594
hTNFR1	94°C 30'' 60°C 1' 72°C 1'	30	5'GAGAGGCCATAGC TGTCG 3' 5'CTGCAATTGAAGC ACTGGA 3'	461
rTNFR2	94°C 45'' 60°C 30'' 72°C 1'30''	32	5'GATGAGAAATCC CAGGATGCAGTAG G 3' 5'GCTACAGACGTTT ACGATGCAGG 3'	256
γGCS	94°C 30'' 60°C 1' 68°C 1'	33	5'CGGCACGGGATCC TCCAGTT 3' 5'CTGACACATAGCC TCGGTAA 3'	815
Bcl-2	95°C 1' 55°C 1' 72°C 2''	25	5'CTGTACGGCCCC AGCATGCG 3' 5'GCTTTGTTTCATGG TACATC 3'	231
CNA-1	94°C 1' 60°C 1' 72°C 2'	27	5'GGGACATCCATG GACATTT 3' 5'TACACGGTGGTTT GTCTCCA 3'	214
18S	92°C 30'' 55°C 1' 72°C 2'	10	5'CGCAGAATTCCC ACTCCCGACCC 3' 5'CCCAAGCTCCAA CTACGAGC 3'	212

Resum dels encebadors utilitzats, les condicions d'amplificació, així com la mida dels fragments obtinguts per cadascun dels gens analitzats.

IV. RESULTATS

1. MECANISMES ASSOCIATS A LA PÈRDUA DE MASSA MUSCULAR EN CONDICIONS PATOLÒGIQUES: PAPER DEL TNF- α

1.1 APOPTOSI

1.1.1 FRAGMENTACIÓ DEL DNA EN MÚSCUL ESQUELÈTIC EN SÈPSIA

El catabolisme muscular no només es dona en caquèxia cancerosa (Tessitore et al., 1987), sinó que és un component important de la resposta metabòlica de processos inflamatoris aguts o crònics que acompanyen infeccions (Hall-Angeras et al., 1991), trauma (Long et al., 1981) i dany tissular (Odessey i Parr, 1982).

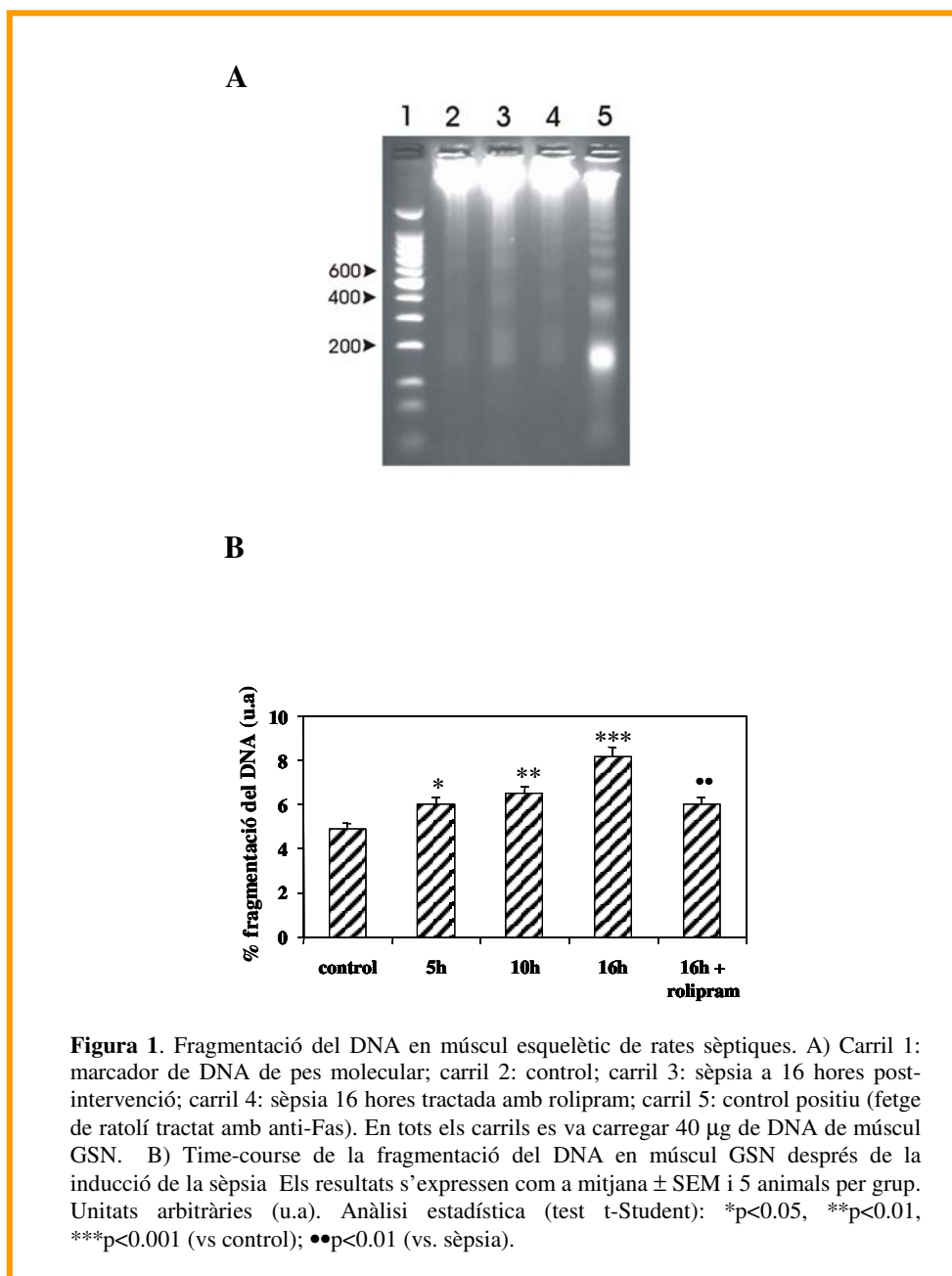
La septicèmia es caracteritza per un sever desgast muscular que resulta en una pèrdua important d'aminoàcids musculars (principalment alanina i glutamina), els quals tenen la funció de mantenir la gluconeogènesi hepàtica i la síntesi de proteïnes de fase aguda.

En aquest treball es va induir la sèpsia a rates per lligació i punció del cec. La sèpsia es produeix per la invasió de microorganismes intestinals que alliberen diferents tipus d'endotoxines. Cada vegada més es pensa que les alteracions que es produeixen en la sèpsia no són efecte directe de les endotoxines sinó que estan mediades per citocines (principalment TNF- α i IL-1) alliberades pels macròfags i altres cèl·lules, en resposta a l'estímul de les endotoxines bacterianes. El fet que els nivells circulants de TNF- α i IL-1 siguin molt alts després d'una injecció de LPS i que anticossos anti-TNF- α protegeixin dels efectes sistèmics i la mort deguts a dosis letals de LPS (Beutler et al., 1985) suporten aquest argument.

El nostre grup va suggerir que el desgast muscular que acompanya la caquèxia cancerosa podria anar lligat a un fenomen apoptòtic; així, les cèl·lules musculars no només perden proteïna sinó també DNA (Van Royen et al., 2000). Per aquest motiu, i donat que en la sèpsia hi ha un marcat desgast muscular, es va voler determinar si en rates sèptiques es produïa també un procés apoptòtic.

Es van realitzar assajos de fragmentació del DNA, ja que aquest és un tret característic de la mort cel·lular per apoptosi. Els resultats, presentats en la Figura 1, mostren clarament que la sèpsia causa un increment en la fragmentació del DNA al

múscul esquelètic a temps curts (5 hores després de la intervenció) i que la magnitud de la fragmentació del DNA augmenta a mesura que dura la sèpsia.

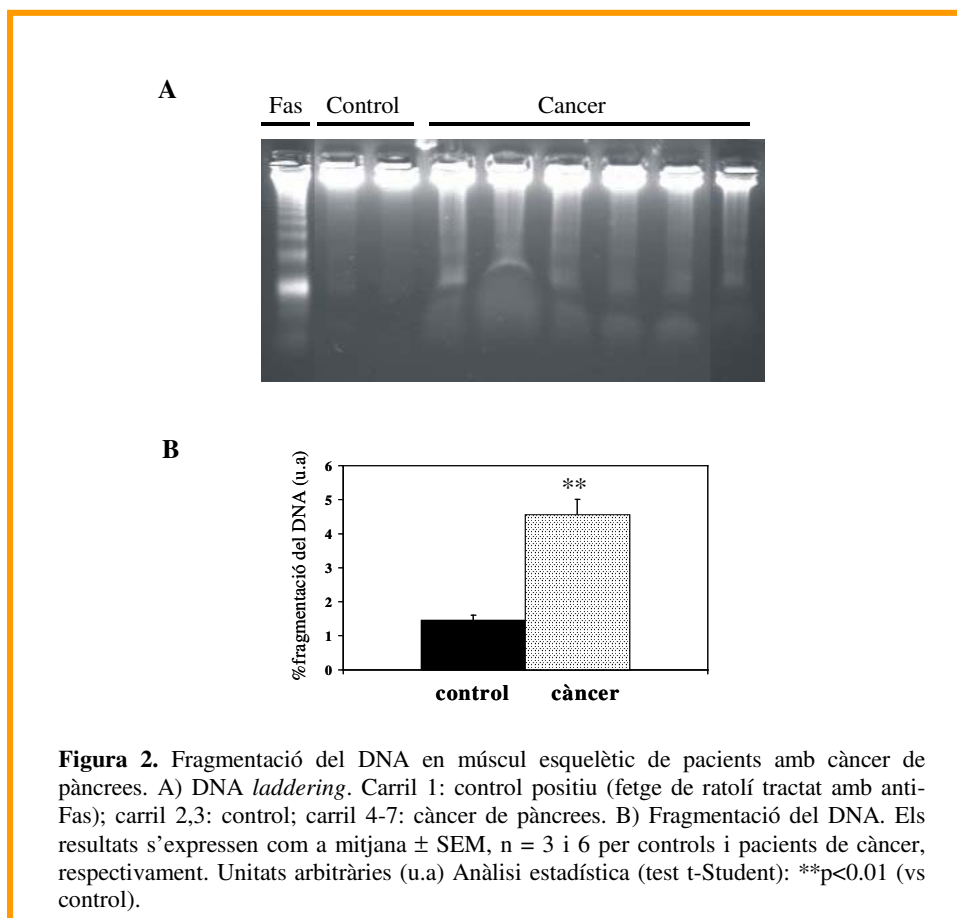


Donat que el nostre grup tenia evidències que el TNF- α podria participar en la inducció de l'apoptosi al múscul esquelètic (Carbó et al., 2002), vam decidir inhibir la síntesi de TNF- α mitjançant el rolipram. El rolipram és un inhibidor específic de la fosfodiesterasa de AMPc de tipus IV (Watchel, 1983) que redueix els nivells de TNF- α en sèrum de models animals (Nyman et al., 1997). A més, és 500 vegades més potent

inhibint la síntesi de TNF- α que la pentoxifilina (un altre inhibidor de la fosfodiesterasa). Els resultats indiquen que la inhibició de la síntesi del TNF- α implica una quasi completa inhibició de la fragmentació del DNA associada a la sèpsia (Figura 1).

1.1.2 FRAGMENTACIÓ DEL DNA EN MÚSCUL ESQUELÈTIC EN CAQUÈXIA CANCEROSA EN HUMANS

Donat que en models experimentals el desgast muscular associat a la caquèxia implica l'apoptosi de les cèl·lules musculars, a més de la degradació protèica ja descrita, vam plantejar-nos si en múscul esquelètic de pacients amb caquèxia cancerosa podria també donar-se aquest fenomen apoptòtic. Per això, vam determinar la fragmentació del DNA en múscul (*rectus abdominalis*) de pacients amb càncer de pàncrees. Com es pot observar en la Figura 2, hi ha un increment significatiu de la fragmentació del DNA en pacients amb tumor respecte individus control.



1.2 EXPRESSIÓ MUSCULAR DEL TNF- α

1.2.1 MODEL EXPERIMENTAL: HEPATOMA YOSHIDA AH-130

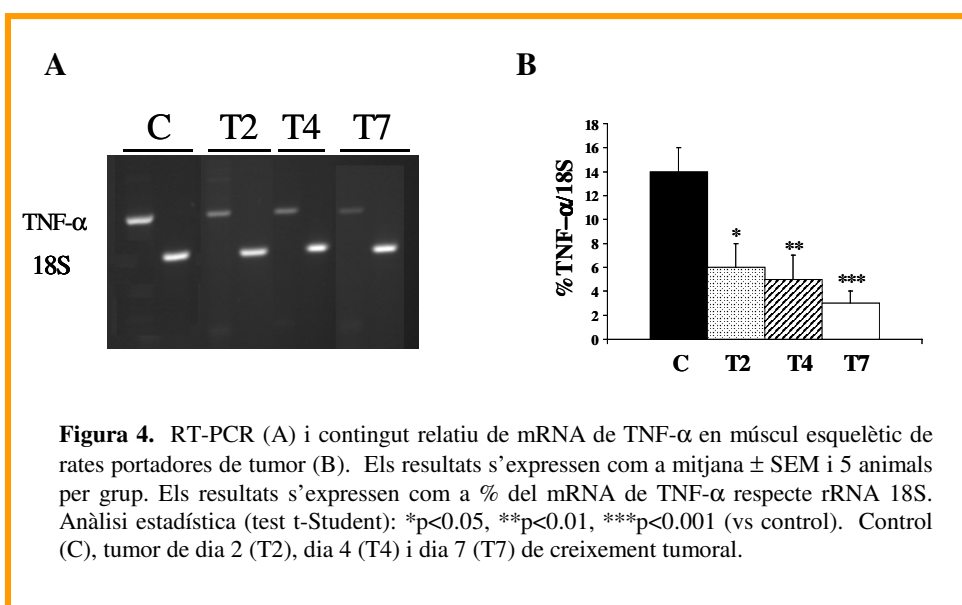
En resposta a la infecció, el creixement tumoral o altres estímuls invasius, el TNF- α és produït principalment per cèl·lules del sistema immunitari. De tota manera, molts altres tipus cel·lulars també poden produir i secretar aquesta citocina (Aggarwal i Natarajan, 1996). Malgrat que els efectes del TNF- α en diversos tipus cel·lulars són molt coneguts, els estudis dels seus efectes sobre el múscul esquelètic encara són confusos i a vegades contradictoris.

S'ha descrit que el múscul esquelètic és la principal font de pèrdua de proteïna en les patologies que tenen associat un desgast muscular i que el TNF- α té un paper clau en aquest procés de desgast muscular (Argilés i López-Soriano, 1999).

El model tumoral utilitzat en aquest estudi va ser l'hepatoma ascític Yoshida AH-130. Aquest tumor és de ràpid creixement i provoca caquèxia a les rates portadores, procés que va agreujant-se a mesura que creix el tumor. A més, aquests animals presenten nivells elevats de TNF- α circulant (Costelli et al., 1993; Llovera et al., 1998).

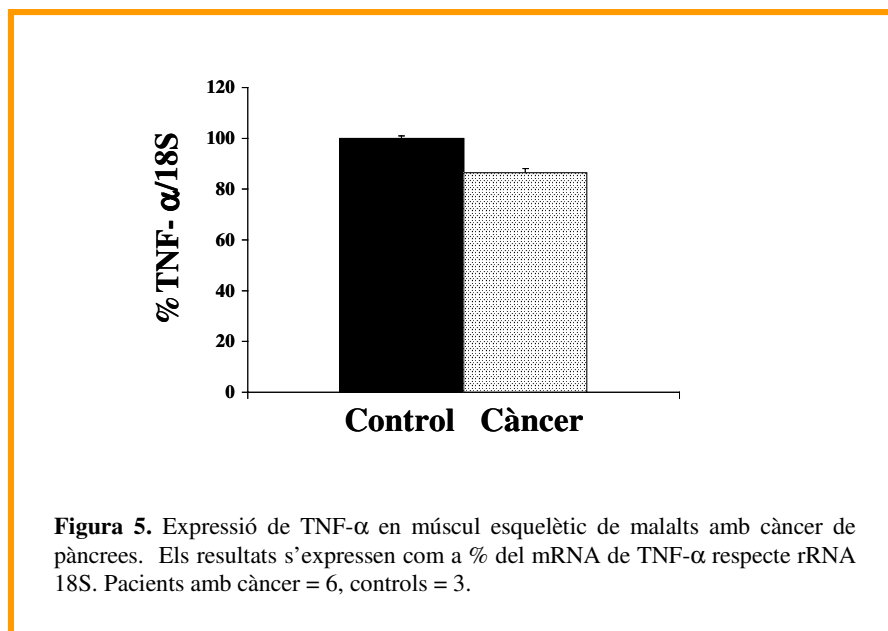
Per tot això, un dels objectius d'aquesta tesi va ser estudiar si el múscul esquelètic contribuïa a la producció de TNF- α . Per tal de determinar l'expressió d'aquesta citocina es va utilitzar la metodologia de la RT-PCR (veure materials i mètodes, apartat 4.13).

Contràriament a la hipòtesi, la implantació de l'hepatoma Yoshida AH-130 produeix una disminució de l'expressió de TNF- α en múscul esquelètic, que ja s'observa a dia 2 de creixement tumoral i que és progressiva fins a dia 7 (Figura 4).



1.2.2 MALALTS AFECTATS DE CÀNCER DE PÀNCREES

De la mateixa manera que en el model experimental de caquèxia cancerosa, vàrem determinar l'expressió gènica del TNF- α en biòpsies musculars de malalts afectats amb càncer de pàncrees. Concretament, en aquests malalts no es detecten nivells circulants elevats de la citocina (Fearon et al., 1998), i alhora, la presència del tumor pancreàtic no produeix canvis en l'expressió de TNF- α al múscul esquelètic (Figura 5).



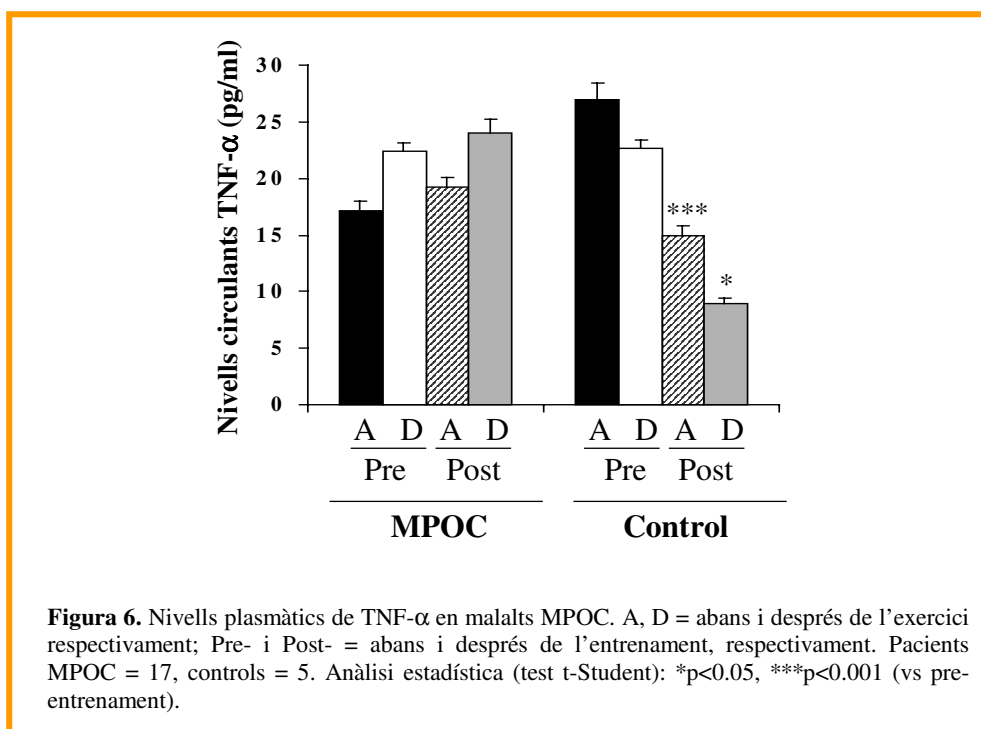
1.2.3 HUMANS AFECTATS PER MPOC

Aproximadament el 20% de malalts MPOC presenten desgast muscular, procés que ha estat relacionat amb citocines, particularment el TNF- α (Takabatake et al., 1999; 2000; Di Francia et al., 1994; De Godoy et al., 1996; Creutzberg et al., 2000). L'estat redox muscular i l'activació de factors de transcripció com el NF- κ B per espècies reactives de l'oxigen (ROS) (Li et al., 1998; Chandel et al., 2000) semblen estar implicats en les vies de transducció del senyal que modulen els nivells intracel·lulars de TNF- α . És conegut el fet que l'exercici intens induïx elevats nivells d'estrès oxidatiu en pacients MPOC (Viña et al., 1996). A més, està descrit que en persones grans sanes, l'exercici disminueix tant l'expressió com la proteïna de TNF- α al múscul (Greiwe et al., 2001), probablement per afavorir el sistema transport d'O₂/ús d'O₂.

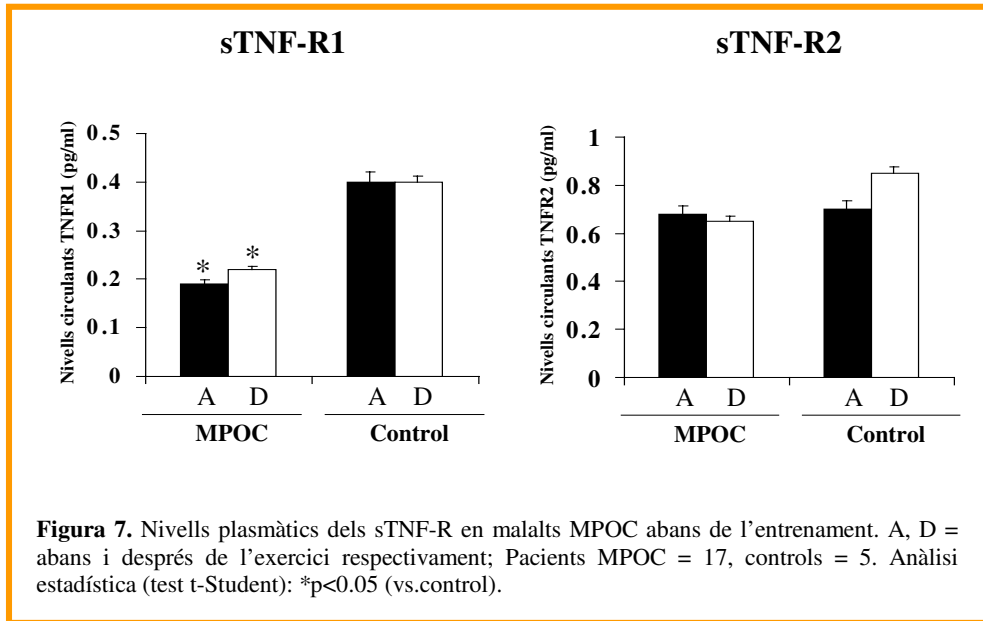
En aquest estudi l'objectiu va ser determinar l'expressió de TNF- α i els nivells plasmàtics tant del TNF- α com dels seus receptors solubles (sTNF-R) i de la IL-6 en pacients MPOC sotmesos a l'exercici (detallat en els apartats 1.5.1, 1.6.1 de la secció Materials i Mètodes).

No es van observar diferències significatives en els nivells plasmàtics de TNF- α en repòs entre malalts MPOC i controls. Malgrat això, en aquests malalts s'observa una tendència a incrementar els nivells plasmàtics de TNF- α després de realitzar un exercici d'intensitat moderada que no es detecta en individus control (Figura 6).

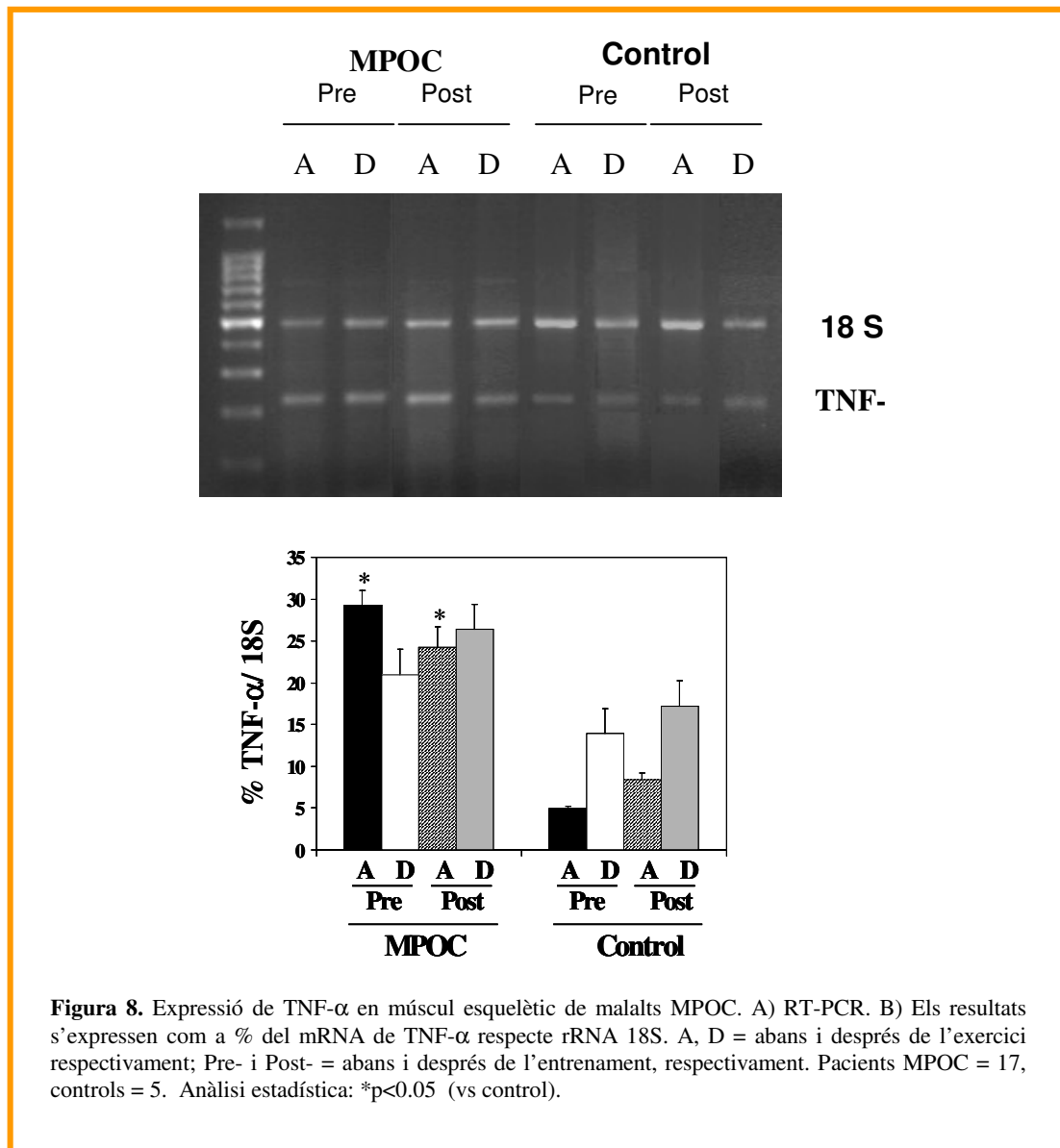
L'entrenament durant 8 setmanes al que varen estar sotmesos aquests malalts no va modificar els nivells plasmàtics de TNF- α ni en repòs, ni després de l'exercici (Figura 6). En canvi, en individus control l'entrenament disminueix significativament, els nivells plasmàtics de TNF- α tant en repòs com després de la realització de l'exercici (Figura 6).



També es van valorar els nivells circulants dels dos receptors solubles del TNF- α : sTNF-R1 i sTNF-R2. Els nivells de sTNF-R1 disminueixen en els malalts MPOC, tant en repòs com després de realitzar l'exercici. En canvi, en els nivells plasmàtics del sTNF-R2 no s'observen diferències entre controls i malalts, ni en repòs ni després de la realització d'exercici de moderada intensitat (Figura 7).



A més, vam determinar l'expressió de TNF- α al múscul esquelètic mitjançant la metodologia de la RT-PCR. En repès, els pacients MPOC tenien nivells d'expressió de TNF- α més alts que els individus sans (més de 5 vegades) encara que s'observava una marcada heterogeneïtat en el grup MPOC (Figura 8). Això es dona perquè el grup de malalts inclou individus amb diferent grau de severitat de la malaltia. Després de l'exercici físic, aquests pacients no presentaven canvis significatius en l'expressió de TNF- α , així com tampoc després de l'entrenament. De la mateixa manera en els individus control tampoc s'observen diferències després de l'exercici pre i post-entrenament (Figura 8).



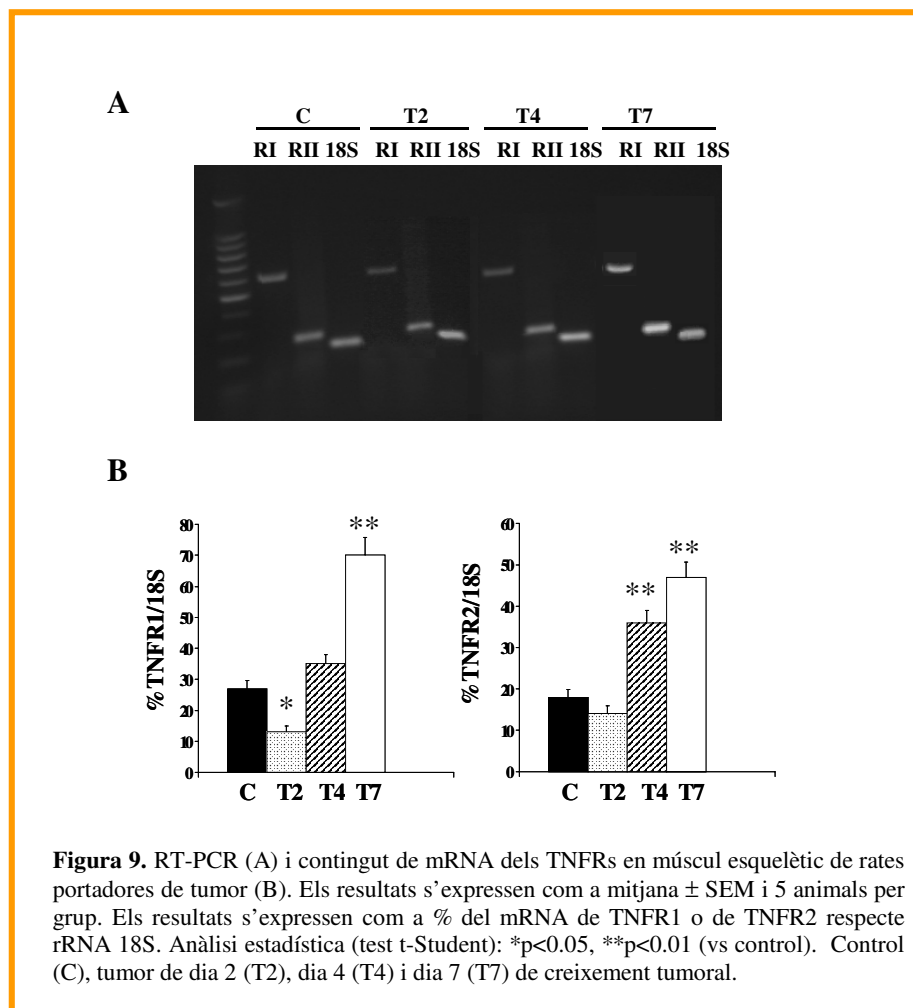
1.3 EXPRESSIÓ MUSCULAR DELS RECEPTORS DE TNF- α : TNFR1, TNFR2

1.3.1 MODEL EXPERIMENTAL: HEPATOMA ASCÍTIC YOSHIDA AH-130

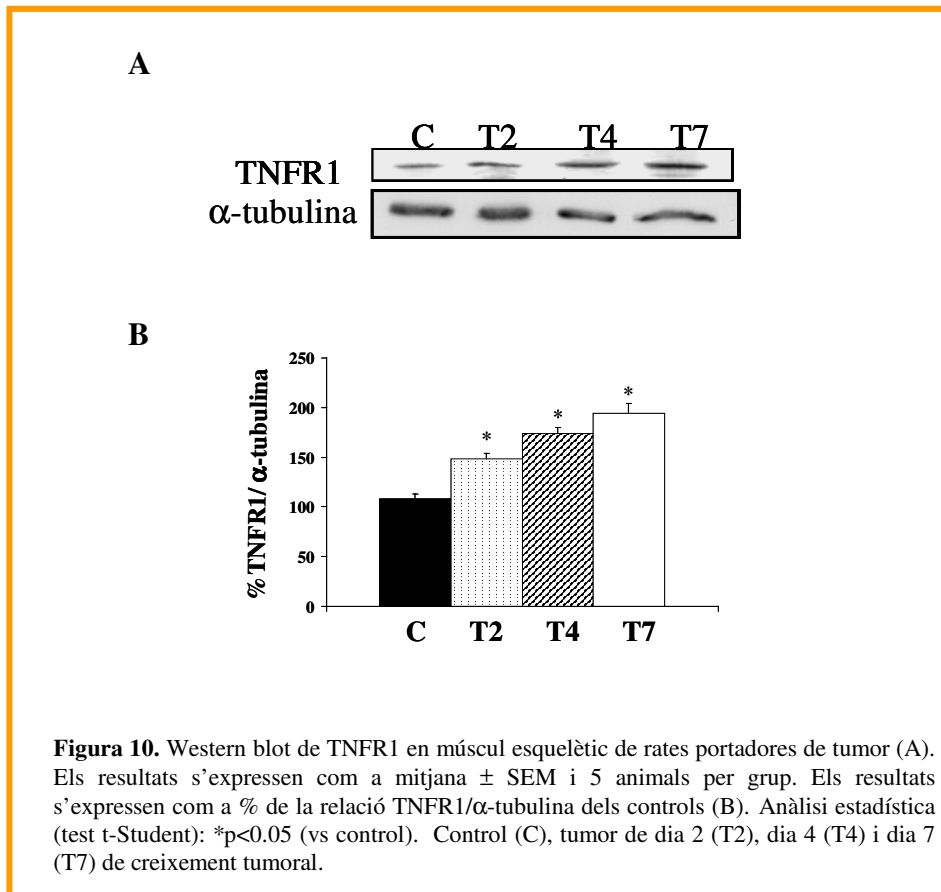
Tenint en compte el que s'ha explicat en l'apartat 1.2.1 d'aquest capítol, vam voler determinar l'expressió dels TNFRs en aquest model tumoral.

Així com la quantitat del mRNA del TNF- α sembla disminuir a mesura que creix el tumor, els mRNA dels receptors segueixen un patró totalment contrari. L'expressió gènica del TNFR1 està incrementada en 2.6 vegades i el TNFR2 en 2.5 vegades a dia 7 de creixement tumoral. L'expressió del darrer receptor ja es troba augmentada en 2

vegades a dia 4 de creixement tumoral. Curiosament, el contingut del mRNA del TNFR1 està disminuït a dia 2 (Figura 9).

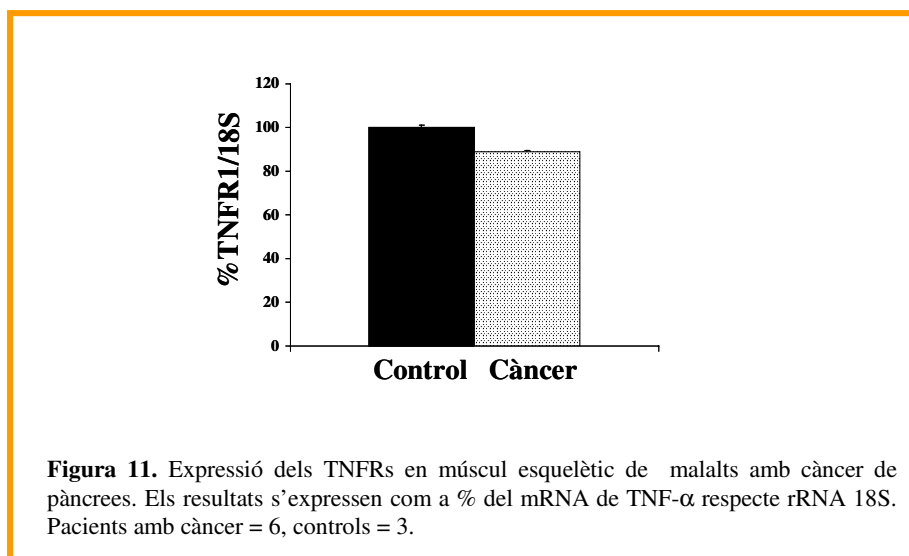


Donat que no sempre hi ha una correlació entre el contingut de mRNA i els nivells de proteïna, vam decidir mesurar la proteïna del TNFR1, ja que aquest receptor està específicament implicat en la cascada apoptòtica induïda per TNF- α (Krown et al., 1996; Madge i Pober et al., 2001). Com es pot observar en la Figura 10 el contingut proteïc del TNFR1 augmenta a mesura que va creixent el tumor, fet que concorda amb l'augment d'expressió gènica detectat per RT-PCR.



1.3.2 MALALTS AFECTATS DE CÀNCER DE PÀNCREES

De la mateixa manera que en el model experimental de caquèxia, i malgrat no haver observat canvis en l'expressió muscular de TNF- α , vam determinar l'expressió del TNFR1 en biòpsies musculars de pacients amb càncer de pàncrees. A la figura 11 s'observa que la presència del tumor no provoca canvis en l'expressió muscular d'aquest receptor.



1.4 L'ESTRÈS OXIDATIU

1.4.1 MALALTS MPOC

L'estrès oxidatiu és un procés dinàmic que reflecteix el desequilibri entre factors pro-oxidants i anti-oxidants (Meister i Anderson, 1983). El glutatió reduït (GSH) juga el paper principal en la regulació d'aquest delicat equilibri neutralitzant les espècies reactives de l'oxigen (ROS), principalment per mantenir un ambient rèdox cel·lular adequat (Meister i Anderson, 1983; Fernandez Checa et al., 1998). Està descrit que pacients amb emfisema pulmonar presenten nivells de GSH muscular en repòs més baixos (Engelen et al., 2000). A més, durant l'exercici, els malalts MPOC mostren nivells més alts de ROS en sang perifèrica i de glutatió oxidat (GSSG) que els individus sans (Viña et al., 1996; Sastre et al., 1992). Aquest fenomen es reverteix parcialment quan els pacients practiquen l'exercici mentre respiren aire amb una concentració elevada d'O₂ (Viña et al., 1996) i després del pretractament amb al·lopurinol (un inhibidor de la xantina oxidasa) (Heunks et al., 1999). S'ha suggerit que l'estrès oxidatiu muscular generat durant l'exercici podria ser un mecanisme clau de la disfunció muscular perifèrica descrita en pacients MPOC (Engelen et al., 2000; American Thoracic Society and European Respiratory Society, 1999; Engelen, 2001).

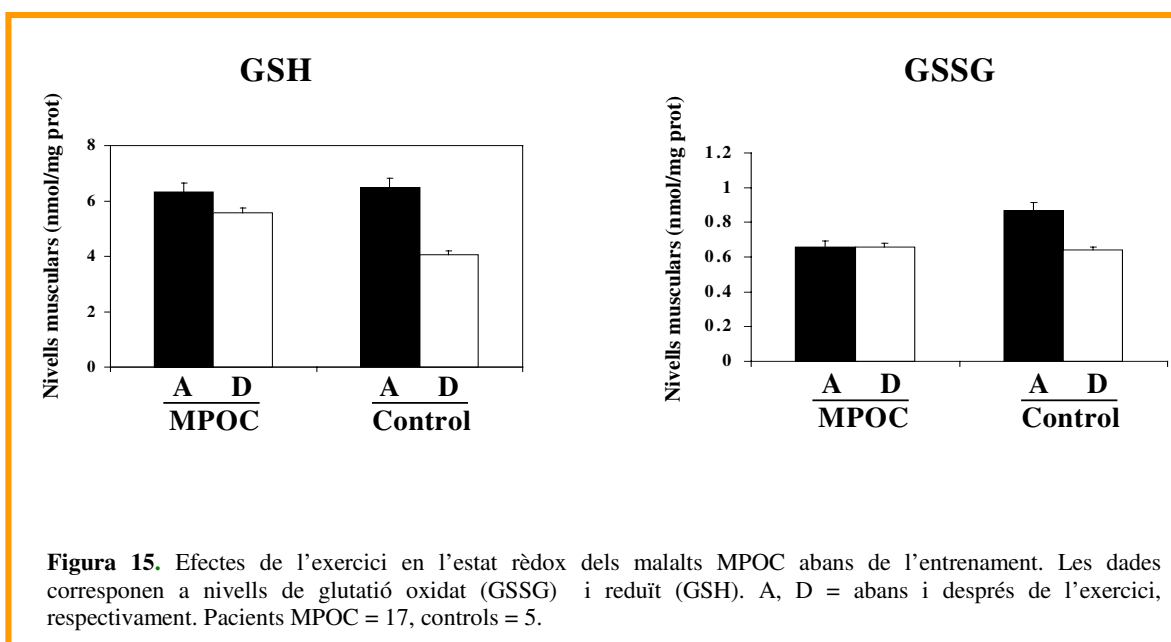
La resistència a l'exercici facilita la capacitat muscular del transport d'O₂/utilització d'O₂ muscular, resultant en un increment de la tolerància a l'exercici tant en pacients MPOC (Sala et al., 1999) com en individus sans (Roca et al., 1992; Sala et al., 1999). Malgrat això, és possible que un entrenament amb un exercici d'alta intensitat faci augmentar l'estrès oxidatiu muscular en pacients MPOC, possiblement per no poder neutralitzar un increment en la producció muscular de ROS. Això pot ser la causa de l'elevada taxa d'utilització d'O₂ en la cadena respiratòria mitocondrial (Fernandez Checa et al., 1998) o per episodis recurrents d'hipòxia cel·lular en el procés d'entrenament. En aquestes condicions, la hipòxia és el desencadenant de la producció de ROS en la cadena respiratòria mitocondrial o pel sistema de la xantina oxidasa, entre d'altres (Heunks et al., 1999).

En aquest estudi, l'objectiu ha estat determinar els efectes de l'entrenament a l'exercici sobre l'estat rèdox muscular en un grup de pacients afectats d'MPOC amb diferents graus de severitat de la malaltia. Per això, es van analitzar els nivells de GSH, GSSG i l'expressió muscular de la cadena pesada de la subunitat gamma-glutamil cisteïna sintasa (γ GCS-HS). Aquestes valoracions es van realitzar en repòs i després de

la realització d'exercici a intensitat moderada, abans i després d'un entrenament de 8 setmanes de durada.

Efectes de l'exercici sobre l'estat redox muscular

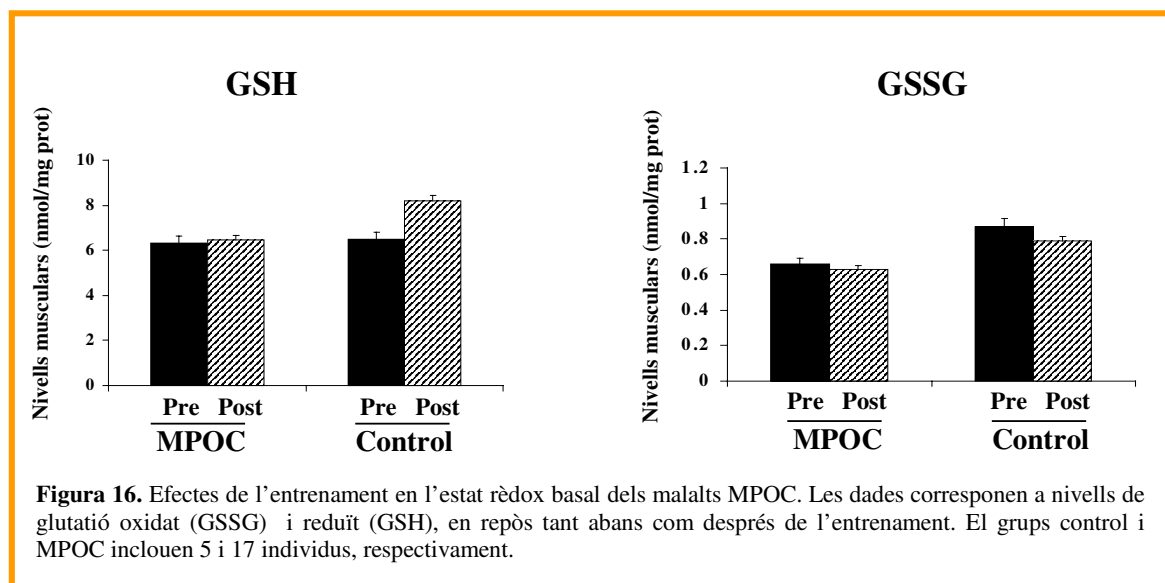
Per avaluar els efectes de l'exercici sobre l'estat redox muscular, es van determinar els nivells musculars de glutatió en pacients MPOC i en individus sans. En els resultats obtinguts no s'observen diferències significatives en els nivells de glutatió (GSH i GSSG) en repòs entre individus sans i malalts MPOC; malgrat això aquests darrers tenen nivells de GSSG lleugerament inferiors als controls (Figura 16). No s'observen canvis en els nivells de glutatió entre abans i després l'exercici en pacients MPOC mentre que els controls presenten una tendència a disminuir tant els nivells de GSH (consumit durant l'exercici) com els de GSSG (Figura 16).



Efectes de l'entrenament sobre l'estat redox basal muscular

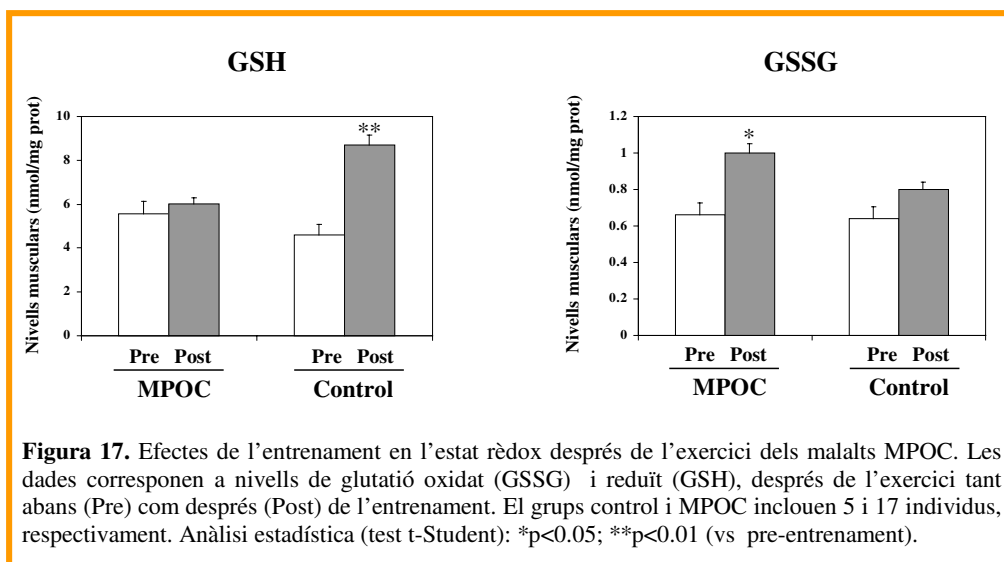
Per analitzar els efectes de l'entrenament, es van determinar els nivells de glutatió i l'expressió de la γ GCS-HS en múscul esquelètic després d'un entrenament de 8 setmanes de durada. No es van observar canvis en els nivells basals de GSH i glutatió

total (GSH + GSSG) de pacients MPOC després de l'entrenament, malgrat que sí s'observa un lleuger increment dels nivells de GSH en múscul d'individus control (Figura 16).

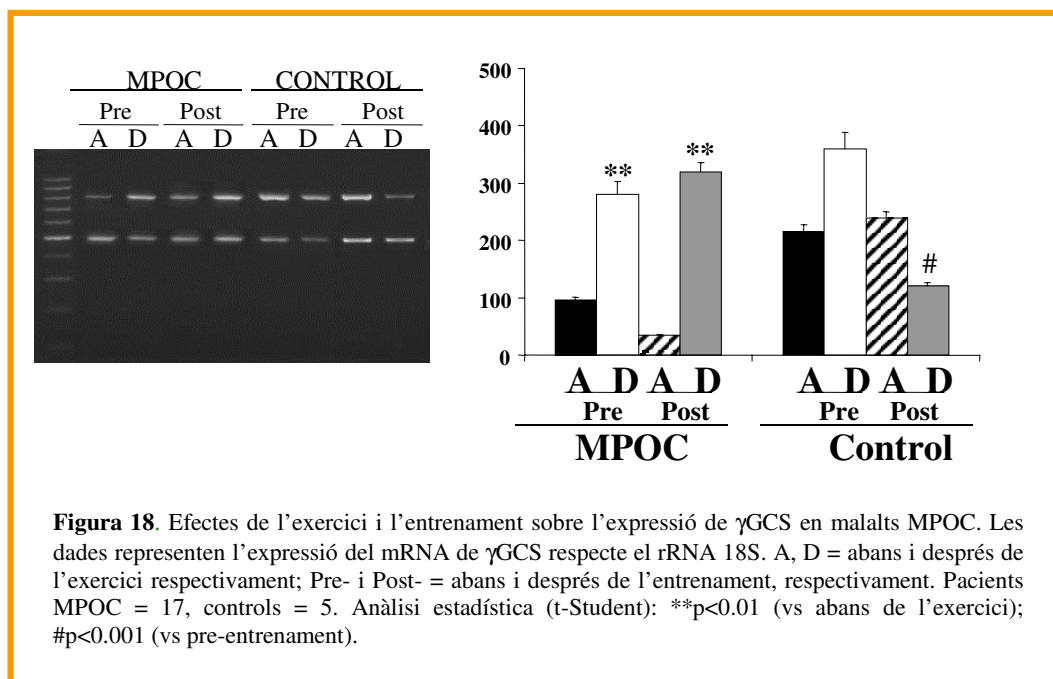


Efectes de l'entrenament sobre l'estat redox muscular després de l'exercici

L'entrenament no millora l'estrès oxidatiu induït per l'exercici que pateixen els malalts amb MPOC. D'aquesta manera, els nivells musculars de GSSG augmenten de manera significativa després de l'entrenament en malalts MPOC mentre que es mantenen sense canvis en individus control (Figura 17). D'altra banda, l'entrenament millora l'estat redox muscular d'individus controls, donat que augmenten de manera significativa els nivells de GSH, mentre que no hi ha canvis en malalts afectats d'MPOC (Figura 17).



Per a la mesura de l'expressió gènica de la γ GCS-HS es va utilitzar la metodologia de la RT-PCR. El contingut de mRNA de γ GCS-HS després de l'exercici en individus sans té tendència a disminuir per l'entrenament, mentre que es manté la tendència a augmentar en malalts MPOC (Figura 18).



Estat redox muscular en pacients MPOC amb índex de massa corporal baix (BMI_L)

En els últims anys un dels efectes sistèmics de MPOC que implica una pitjor prognòs de la malaltia (American Thoracic Society, European Respiratory Society, 1999; Agustí et al., 2003), és el desgast muscular que pateixen aquests pacients (Engelen et al., 2000). En els resultats anteriors els pacients MPOC presenten alteracions en la regulació del GSH muscular. Mentre que un entrenament d'alta resistència facilita el funcionament dels mecanismes antioxidants en individus sans augmentant dues vegades el GSH muscular, els pacients MPOC presenten un increment del GSSG després de l'entrenament, sense haver-hi canvis en el GSH. Aquests resultats suggereixen que en MPOC no es dona l'adaptació dels mecanismes antioxidants als alts nivells de ROS induïts per l'exercici (Couillard et al., 2003; Engelen et al., 2000); per tant el múscul és molt més susceptible a l'estrès oxidatiu. Els mecanismes pels quals es produeix la pèrdua de pes no són gaire clars. És possible que l'estrès oxidatiu sigui un

factor clau en els complexos mecanismes dels desgast al múscul esquelètic en pacients MPOC amb BMI_L (Chandel et al., 2000).

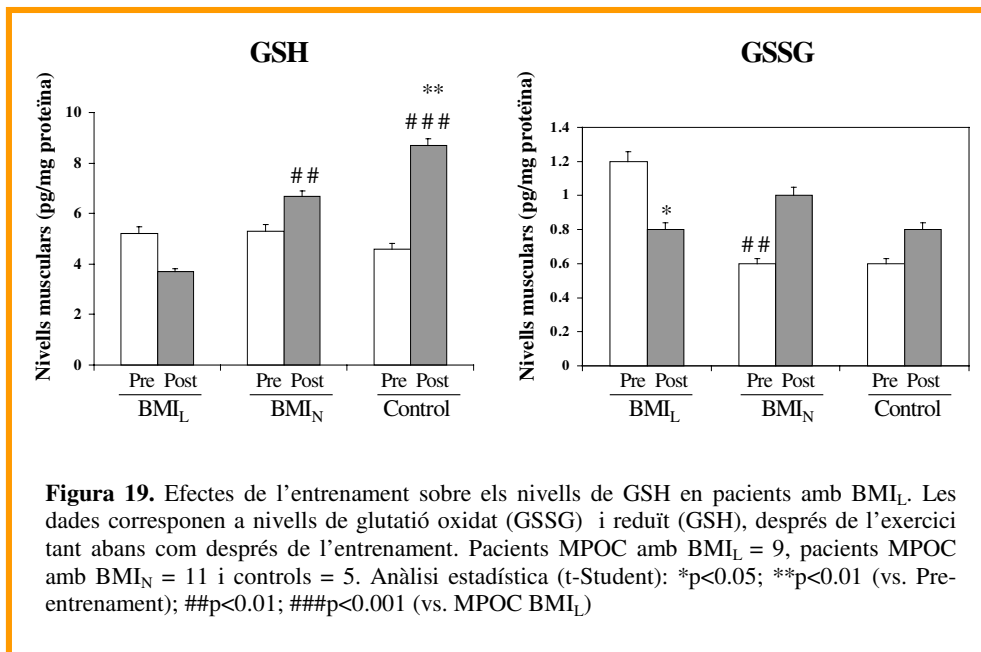
Per tot això, vam voler estudiar la relació entre les alteracions de l'estat redox i el desgast muscular en MPOC. Per fer-ho, vam incloure un grup de malalts MPOC que presentaven un BMI_L per tal de comparar-los amb malalts amb un BMI_N (normal) i individus sans (Taula 1).

	INDIVIDUS SANS	MPOC amb BMI _N	MPOC amb BMI _L
Edat (anys)	62 ± 2.8	67 ± 1.6	66 ± 2.1
Pes (kg)	74.5 ± 1.3	80.2 ± 4.2	55.4 ± 2.3***#
BMI (kg/m²)	26.5 ± 0.9	28.2 ± 1.2	19.7 ± 0.6***#
FEV₁ (% pred)	102 ± 9.0	41 ± 5.0***	30 ± 3.8***
FRC (% pred)	913.5	139 ± 11.9*	159 ± 17.3*
RV (% pred)	829.1	164 ± 14.0**	192 ± 28.0**
PaO₂ (mmHg)	100 ± 3.7	73 ± 3.3***	69 ± 4.2***
PaCO₂ (mmHg)	35 ± 1.5	41 ± 2.4	42 ± 1.9
VO₂ (l/min)	1.76 ± 0.1	1.25 ± 0.1***	0.82 ± 0.1***#

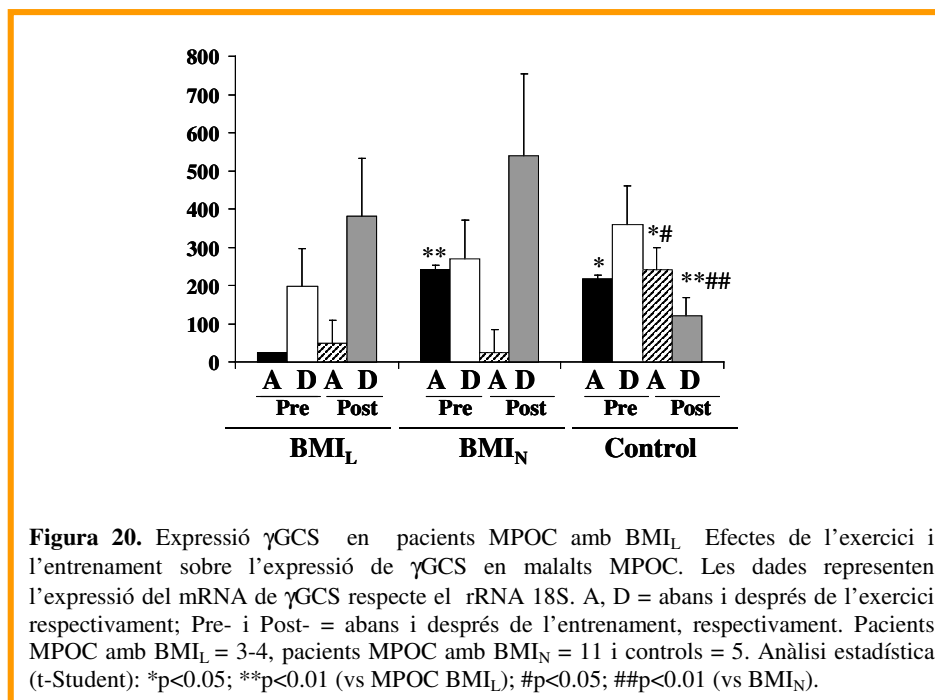
Taula 1. Característiques del grup d'estudi. En aquesta taula es recullen alguns paràmetres avaluats en el grup d'estudi: individus sans i pacients MPOC amb BMI normal (BMI_N) i baix (BMI_L). BMI = índex de massa corporal; FEV₁= percentatge del valor predit del volum expiratori forçat en el primer segon. FRC = capacitat funcional residual predita. RV = volum residual predit. PaO₂, PaCO₂ = pressió parcial d'oxigen i diòxid de carboni, respectivament; VO₂ = volum d'oxigen. Anàlisi estadístic (t-Student): *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (vs individus sans); #p<0.001 (vs MPOC amb BMI_N).

Els pacients MPOC presenten alteracions en els paràmetres respiratoris com el volum d'expiració, la pressió parcial d'oxigen i el volum d'oxigen. Aquestes alteracions són més acusades en els pacients amb un BMI baix, el que relaciona la pèrdua de pes (i BMI baix) amb el grau de severitat de la malaltia (Taula 1).

Per tal de determinar l'efecte de l'entrenament sobre l'estat redox muscular en pacients MPOC amb BMI_L vam analitzar els mateixos paràmetres que en el cas anterior: nivells de GSH i expressió de γGCS-HS en múscul. Els nivells musculars de GSH van augmentar quasi el doble en els individus sans després de l'entrenament mentre que no es van observar diferències en els malalts MPOC amb BMI_N i amb BMI_L (Figura 19). Malgrat això, després de l'entrenament els pacients amb BMI_N tenen tendència a augmentar els nivells de GSH mentre que els nivells dels pacients MPOC amb BMI_L no varien però tenen tendència a disminuir (Figura 19). D'altra banda, els nivells musculars de GSSG són comparables en els tres grups, gràcies a l'efecte de l'entrenament que provoca una disminució d'aquests nivells en el grup de malalts MPOC amb BMI_L (Figura 19).



En el grup de pacients amb BMI_L la tendència a la disminució dels nivells de GSH anava acompanyada d'una marcada tendència a l'augment de l'expressió de la γ GCS-HS en múscul després de l'entrenament (Figura 20). En canvi, l'increment de GSH observat en els controls anava associat a una tendència a disminuir el mRNA de γ GCS-HS. No es va observar cap canvi en resposta a l'entrenament en l'expressió de γ GCS-HS en els pacients amb BMI_N.

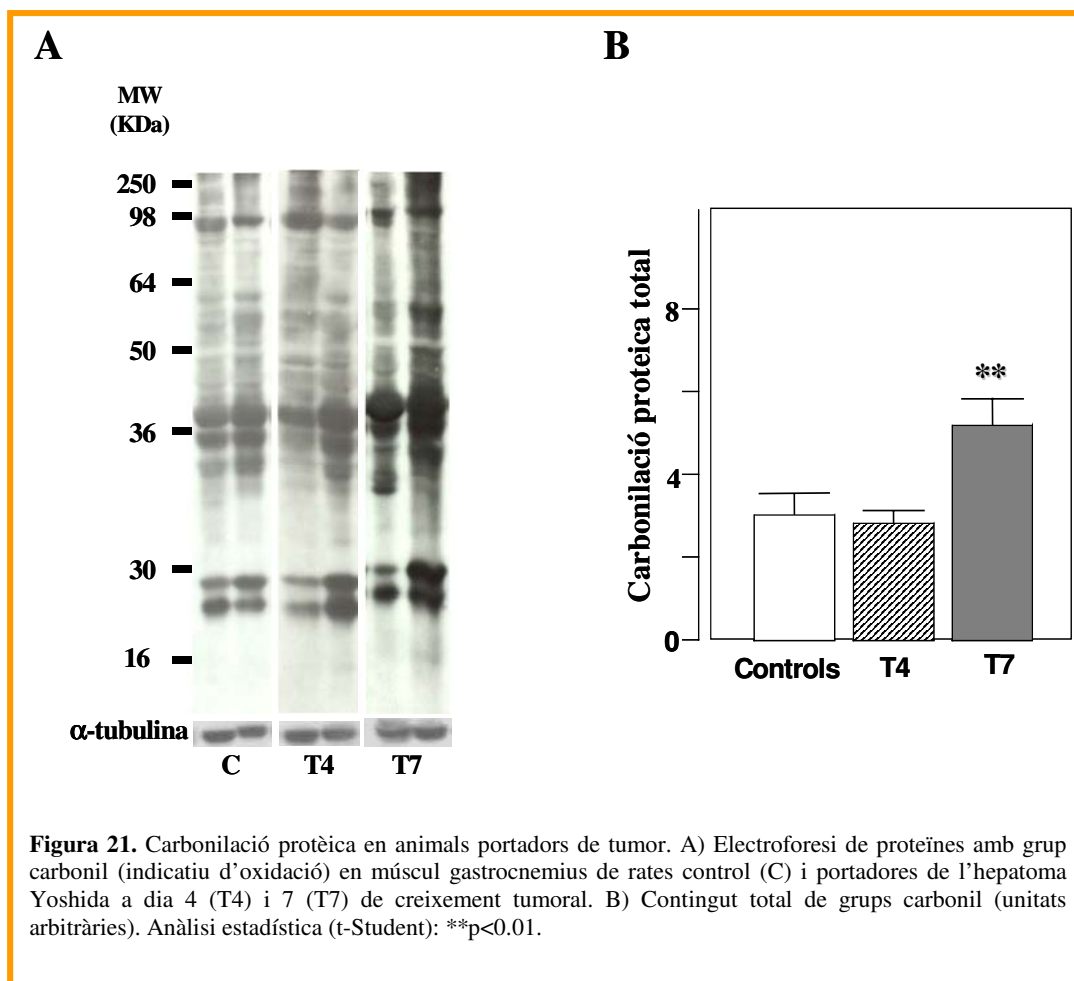


1.4.2 MODEL EXPERIMENTAL: HEPATOMA ASCÍTIC YOSHIDA AH-130

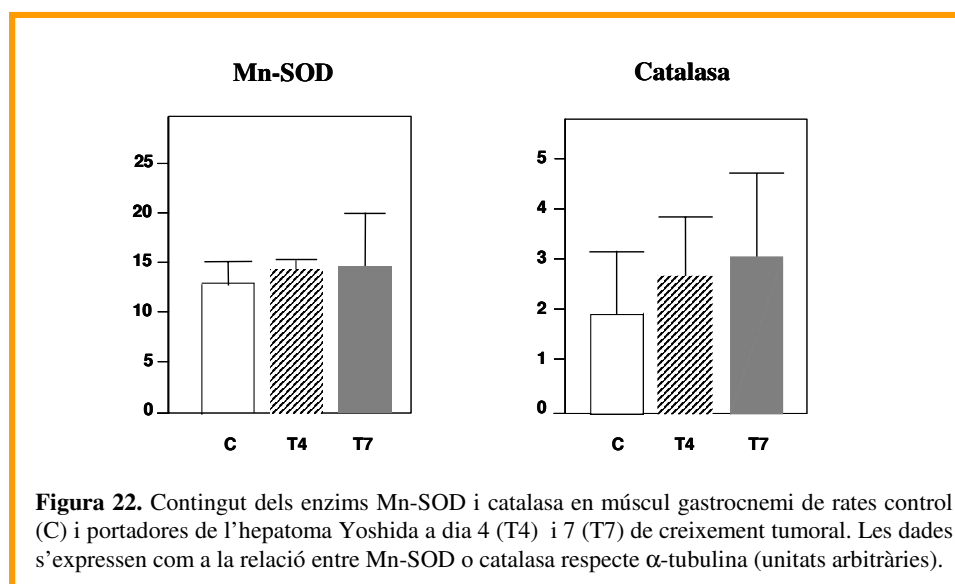
L'estrès oxidatiu, causat per elevats nivells de ROS que normalment són neutralitzats per les defenses antioxidants intracel·lulars, està possiblement implicat en la caquèxia cancerosa. Buck i Chojkier (1996) van demostrar que el desgast muscular i la desdiferenciació podien prevenir-se per inhibidors de la síntesi de l'òxid nítric (NO) i els antioxidants. A més, està descrit que el desgast muscular en caquèxia cancerosa s'associa amb elevats nivells de malondialdehid en múscul gastrocnemius i que l'estrès oxidatiu augmenta la degradació proteica en múscul esquelètic mitjançant un increment de l'expressió de factors de la via proteasoma-ubiquitina (Gomes-Marcondes i Tisdale, 2002). També s'ha observat que els pacients amb càncer tenen elevats nivells de neopterina (un indicador de la producció de ROS) en sèrum i en orina i que aquests nivells elevats es correlacionen amb l'estadi de la malaltia (Murr et al., 1999).

Les proteïnes tissulars són una de les principals dianes dels efectes derivats de l'estrès oxidatiu. D'entre les diferents modificacions induïdes per ROS en els residus d'aminoàcids, la formació del grup carbonil, normalment detectada per una reacció de conversió amb 2,4 dinitrofenilhidrazina a hidrazona, constitueix un dels millors marcadors caracteritzats de l'oxidació proteica en diferents condicions i estats patològics, com la sèpsia i MPOC. Per tant, l'objectiu d'aquest estudi va ser determinar els nivells d'estrès oxidatiu en múscul esquelètic, juntament amb el contingut de diferents enzims implicats en el control de l'estat oxidatiu. Per fer-ho, vam utilitzar el model animal de caquèxia cancerosa: l'hepatoma ascític Yoshida AH-130.

Per detectar la carbonilació de les proteïnes, vàrem realitzar un Western blot amb l'anticòs anti-DNP (veure materials i mètodes, apartat 1.15), i vàrem detectar diferents bandes que corresponien a proteïnes carbonilades de 111 a 27 kDa en múscul gastrocnemius (Figura 21A). A la Figura 21 s'observa que, mentre a dia 4 no hi ha diferències, a dia 7 de creixement tumoral el contingut de proteïnes carbonilades és 50% més elevat que en rates control.



També es va determinar si hi havia alteracions en els nivells d'enzims antioxidants a causa de la presència del tumor. En la Figura 22 s'observa que en aquest model tumoral no hi ha diferències ni en els nivells de Mn-SOD i ni en els de catalasa entre animals portadors de tumor i rates control.



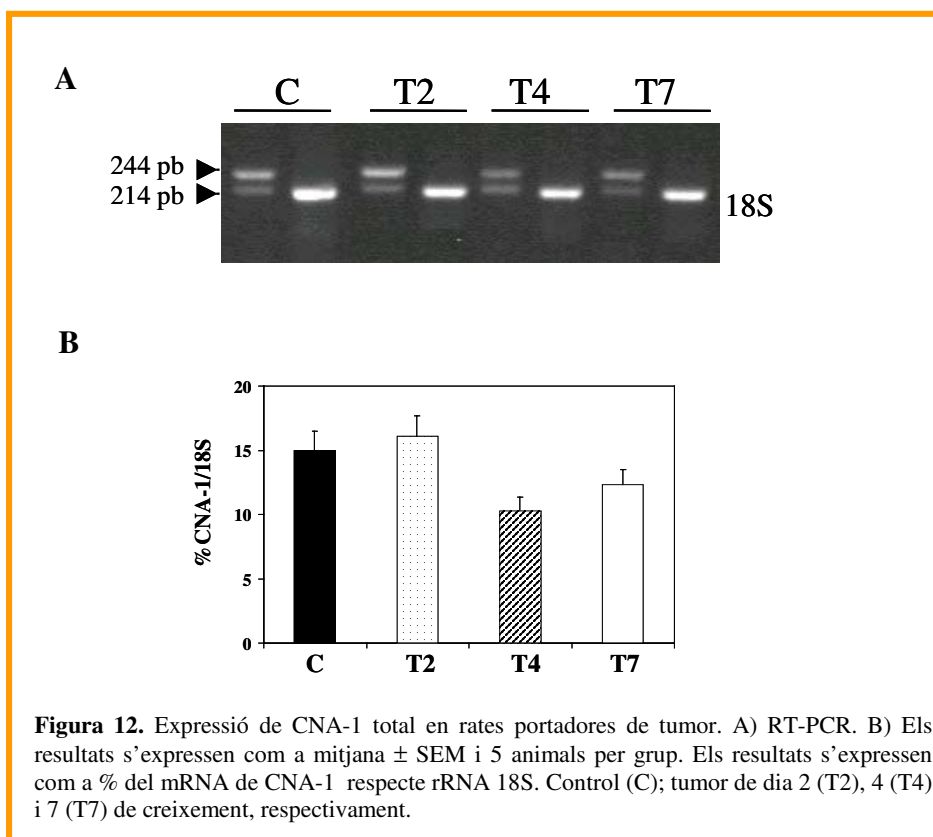
1.5 IMPLICACIÓ DEL SISTEMA DE LA CALCINEURINA EN LA PÈRDUA DE MASSA MUSCULAR

1.5.1 MODEL EXPERIMENTAL: HEPATOMA ASCÍTIC YOSHIDA AH-130

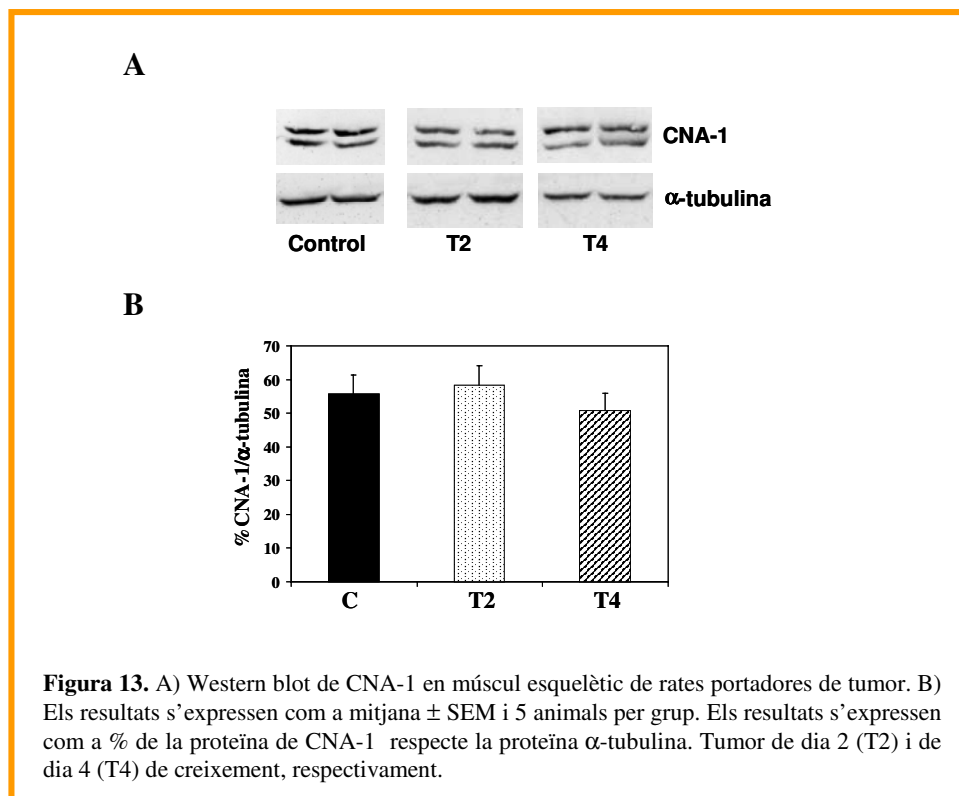
Els músculs estriats, cardíac i esquelètic, utilitzen el calci com a segon missatger per respondre i adaptar-se als estímuls. La calcineurina (una serina/treonina fosfatasa) (CNA-1) és un important regulador de les respostes intracel·lulars activades per calci en les cèl·lules eucariotes. L'augment dels nivells del calci intracel·lular activen la calcineurina fet que indueix l'expressió d'una bateria de gens implicats en el remodelatge del múscul estriat (Bassel-Duby i Olson, 2003). L'activació de la calcineurina en cor produeix hipertròfia cardíaca, i en múscul esquelètic promou la diferenciació cel·lular i transforma l'especificitat dels tipus de fibres (Bassel-Duby i Olson, 2003).

Existeix una relació controvertida entre TNF- α i calcineurina. D'una banda, s'ha descrit que la calcineurina indueix l'expressió de TNF- α en cèl·lules B activades (Goldfeld et al., 1994) i participa en la via apoptòtica induïda per TNF- α en cèl·lules d'hepatoma de rata (Kantrow et al., 2000). D'altra banda, s'ha demostrat que el TNF- α indueix apoptosi independentment de calci (Deneker et al., 1997) i que inhibidors de la calcineurina (com la ciclosporina A) redueixen la inflamació mitjançant la disminució de l'expressió gènica d'IL-1 però no de TNF- α en un model d'artritis en rata (Magari et al., 2003).

Donat que durant la caquèxia cancerosa el múscul esquelètic pateix un important desgast i pèrdua de proteïna, vam voler esbrinar si aquest fet estava relacionat amb alguna alteració en els nivells de CNA-1 en múscul esquelètic de rates portadores de tumor. Com es pot observar a la Figura 12, l'expressió gènica de CNA-1 no es troba alterada en el múscul esquelètic durant el creixement tumoral.



Tot i això, també vam determinar el contingut proteïc de CNA-1, no observant tampoc cap diferència significativa en presència de tumor (Figura 13).



2. IL-15: UNA CITOCINA ANABÒLICA AMB IMPLICACIONS TERAPÈUTIQUES

2.1 EFECTES METABÒLICS

La IL-15, a més de ser un factor inductor de la proliferació de cèl·lules T (Grabstein, et al., 1994), té efectes metabòlics sobre teixit adipós i múscul esquelètic. Així doncs, la IL-15 redueix el contingut del teixit adipós mitjançant la inhibició de l'activitat lipoproteïna lipasa i la lipogènesi *de novo* (Alvarez et al., 2002). Sembla ser que els efectes de la IL-15 sobre el teixit adipós són directes, i s'ha descrit la presència de diferents subunitats del seu receptor en aquest teixit (Alvarez et al., 2002). La IL-15 també exerceix efectes importants en múscul esquelètic. En aquest teixit es comporta com una citocina anabòlica tant *in vivo* (Quinn et al., 1995) com *in vitro* (Quinn et al., 2002).

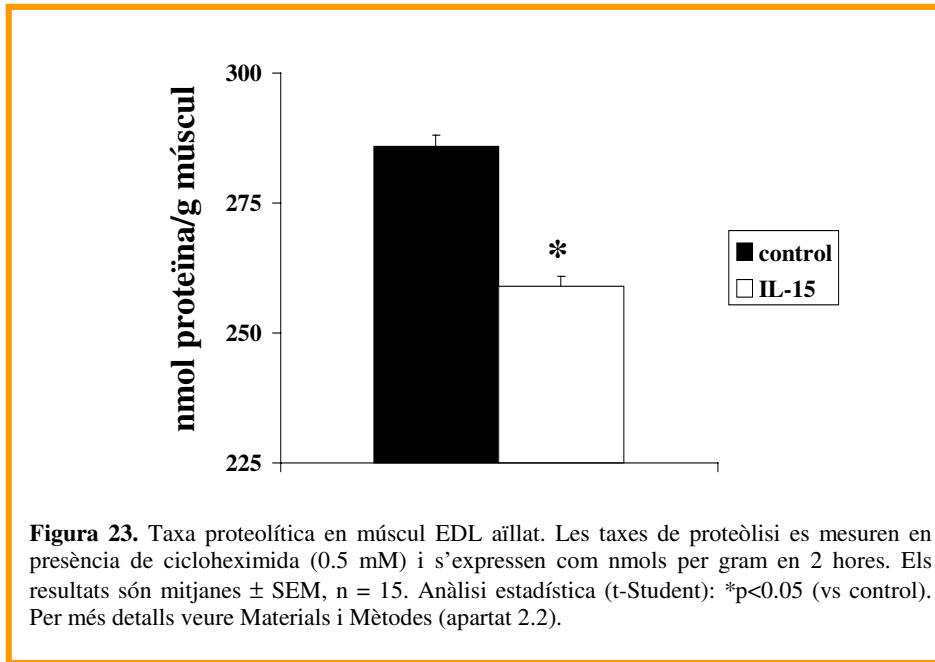
2.1.1 IL-15 I MÚSCUL ESQUELÈTIC: ESTUDIS *IN VITRO* I *EX VIVO*

Estudis *in vitro* demostren que la IL-15 té un efecte anabòlic sobre teixit muscular (Quinn et al., 2002). A més, la IL-15 inhibeix la degradació proteica i estimula la síntesi de proteïna en miotubs musculars incubats (Quinn et al., 1995).

Per tot això, els objectius de l'estudi van ser veure si la IL-15 tenia un efecte directe sobre les fibres musculars i determinar el(s) mecanisme(s) pel(s) qual(s) aquesta citocina té una acció anabòlica a múscul esquelètic. Es van utilitzar dos tipus de metodologies per aquest estudi: preparacions de múscul aïllat i cultius de cèl·lules musculars C2C12.

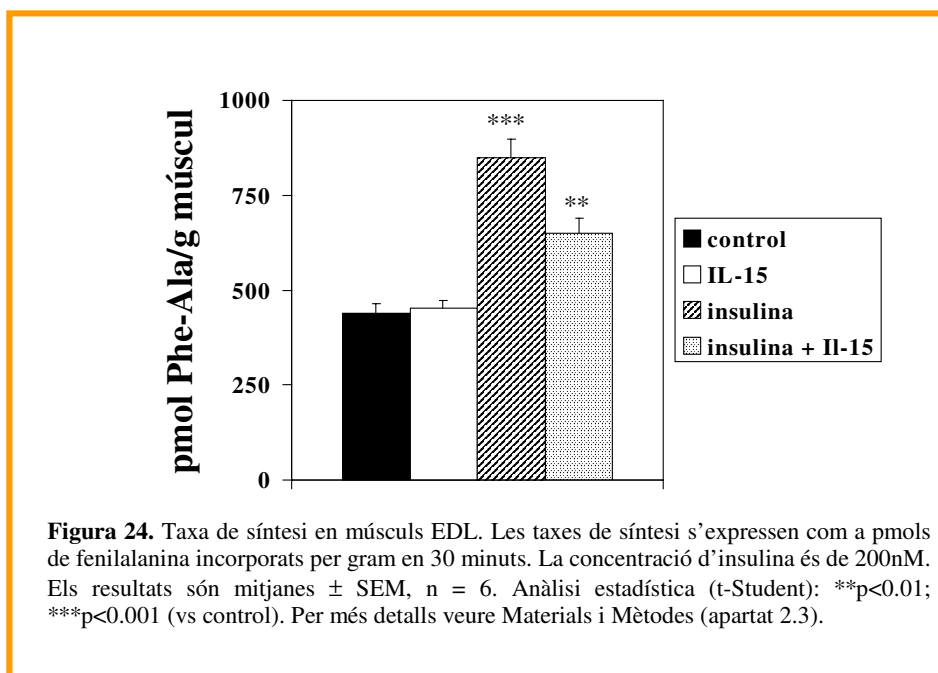
2.1.1.1 DEGRADACIÓ PROTEICA

Els resultats que es presenten a la Figura 23 mostren clarament que la IL-15 és capaç de disminuir de manera significativa la taxa proteolítica, mesurada com alliberament de tirosina per part dels músculs EDL al medi d'incubació en presència de cicloheximida.



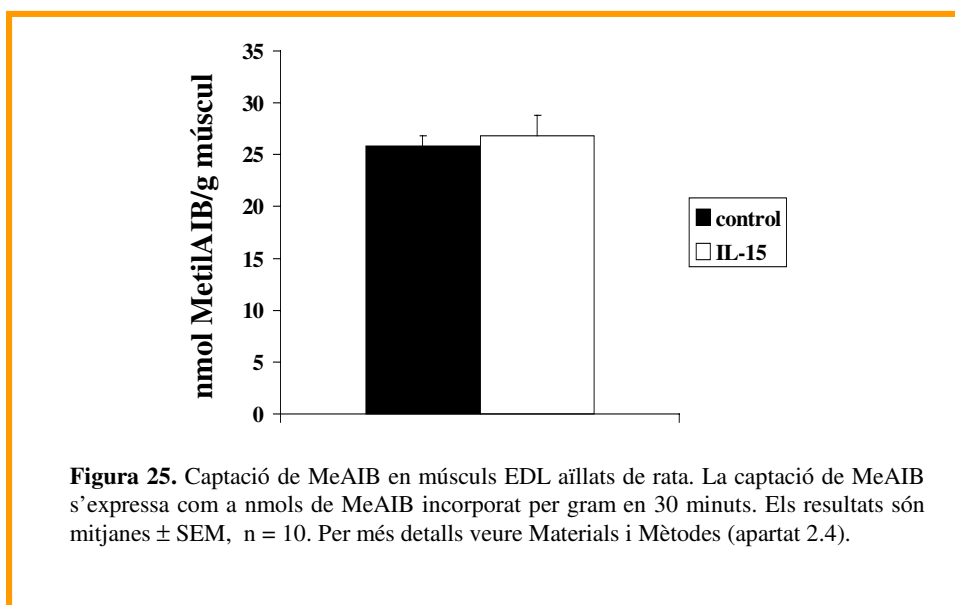
2.1.1.2 SÍNTESI PROTÈICA

La taxa de síntesi protèica es va mesurar com a incorporació de ^{14}C -fenilalanina a la proteïna muscular (Figura 24). Com es pot veure, la insulina estimula 1.9 vegades la taxa de síntesi però l'addició de IL-15 sola no produeix cap canvi en la taxa de síntesi.



2.1.1.3 CAPTACIÓ D'AMINOÀCIDS

Vam analitzar si la IL-15 tenia efectes sobre la captació d'aminoàcids neutres en múscul esquelètic. Per això, vam determinar la captació tissular del metilaminoisobutirat (MeAIB). Els resultats, que es presenten a la Figura 25 mostren que la IL-15 no produeix canvis en la captació de aminoàcids neutres en múscul EDL aïllat.



2.1.1.4 DESTINS METABÒLICS DE L'ALANINA

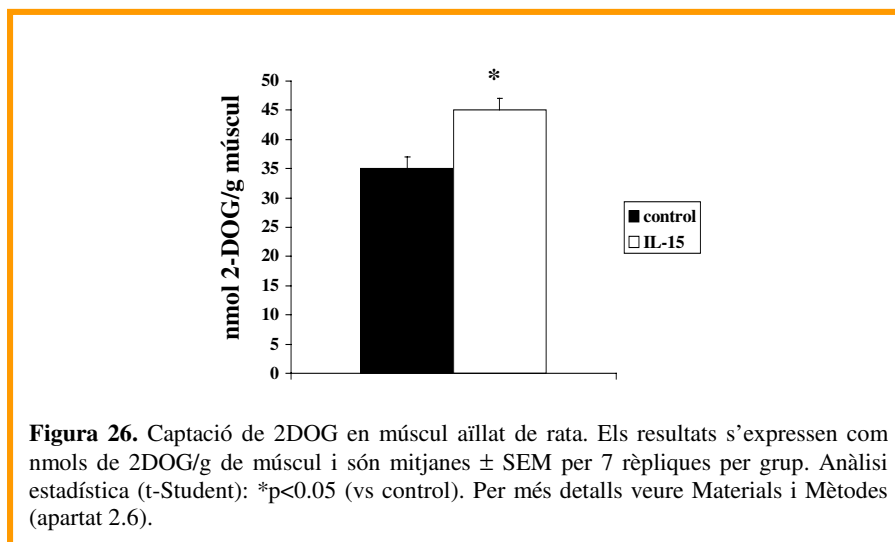
També vam analitzar si la IL-15 afectava el metabolisme de l'alanina, l'oxidació o la seva incorporació a lípid i proteïna. Com es pot veure en la Taula 2, la IL-15 no indueix cap alteració en la incorporació de ^{14}C a lípids o proteïna, malgrat observar-se una tendència a augmentar l'oxidació en múscul esquelètic (mesurat com a CO_2 alliberat).

	Control	IL-15
CO₂	32.2 \pm 3.6	41.2 \pm 3.1
Proteïna	16.7 \pm 2.0	16.1 \pm 1.0
Lípid	6.19 \pm 0.33	5.95 \pm 0.4
Restes	13.6 \pm 0.6	13.2 \pm 1.2

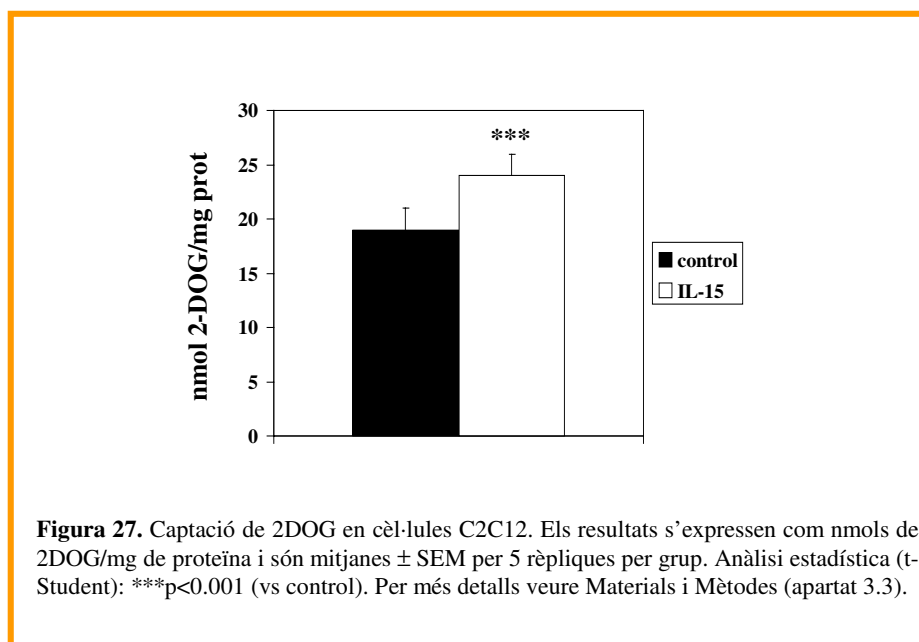
Taula 2. Destins metabòlics de l'alanina en múscul EDL aïllat. La producció de CO_2 i la incorporació tant a lípid com a proteïna s'expressa com a μmol per mg per 30 minuts. Els resultats són mitjanes \pm SEM, n = 10.

2.1.1.5 CAPTACIÓ DE 2-DESOXI [¹⁴C]-GLUCOSA

D'altra banda, també es va decidir analitzar els efectes de la IL-15 sobre la captació de 2-desoxi [¹⁴C]-glucosa (2DOG) en múscul esquelètic aïllat. Es va observar que la captació de la 2DOG augmentava un 30% en músculs EDL incubats amb IL-15 (Figura 26).

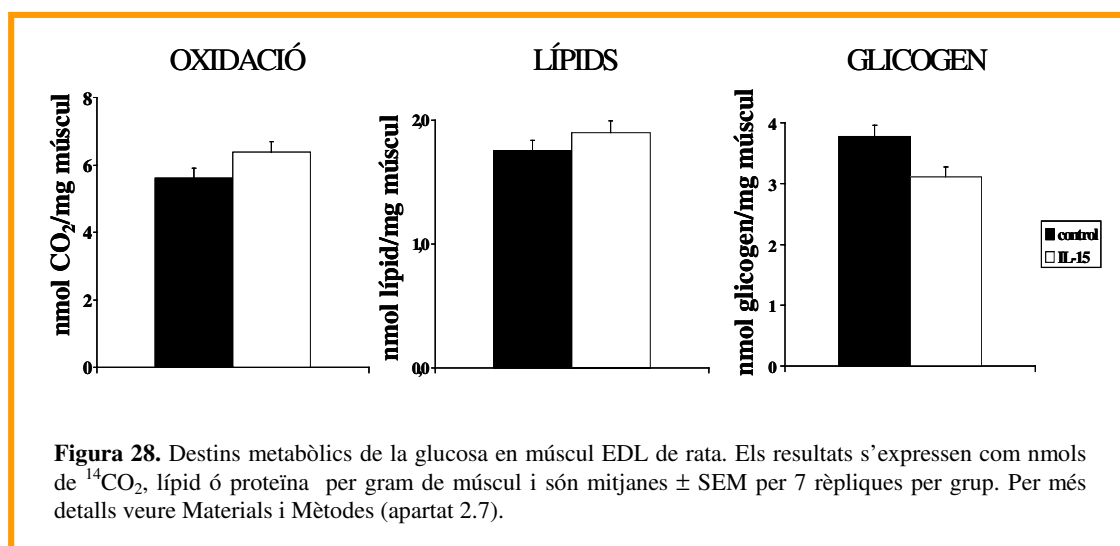


També es va avaluar la captació de 2DOG en miotubs C2C12 a dia 7 de diferenciació incubats durant 3 hores amb IL-15 a una dosi de 10 ng/ml. En la Figura 27 es recullen els resultats obtinguts. El tractament amb IL-15, igual que en les incubacions de múscul aïllat, augmenta en un 19% la captació de 2DOG.

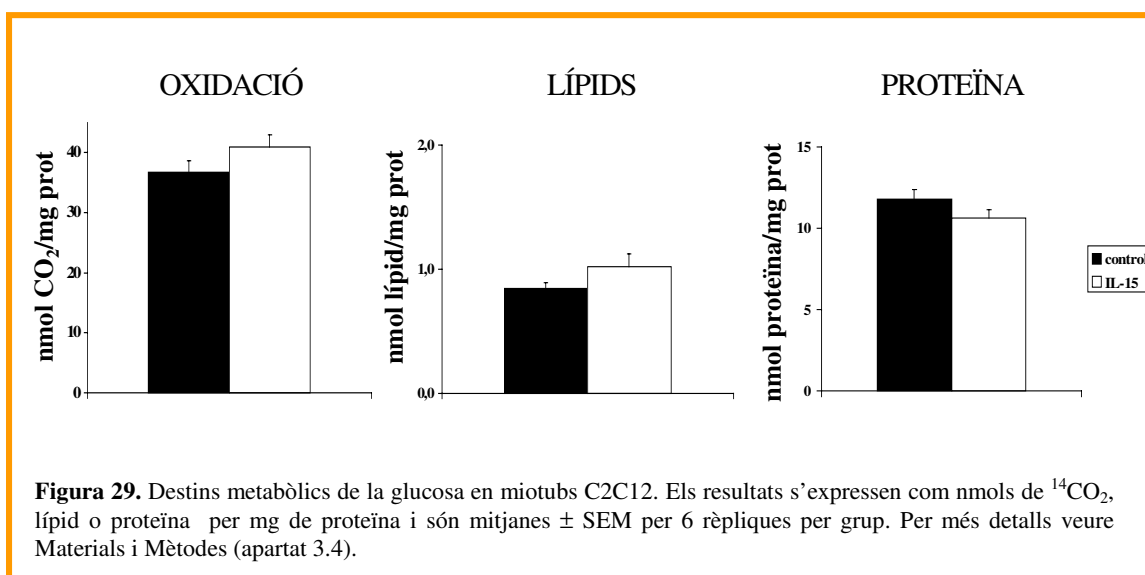


2.1.1.6 DESTINS METABÒLICS DE LA GLUCOSA

Donat que el tractament amb IL-15 fa que augmenti la capacitat de captació de glucosa en el múscul esquelètic, vam decidir determinar el destí metabòlic de la glucosa en múscul EDL aïllat. Sorprenentment, es va observar una clara tendència a augmentar la taxa d'oxidació de la [^{14}C]-glucosa amb el tractament, així com la incorporació de la glucosa a la fracció lipídica (12%) (Figura 28).



També es va determinar el destí de la glucosa utilitzant el model cel·lular C2C12. De la mateixa manera que en l'apartat anterior, els experiments es van realitzar en miotubs a dia 7 de diferenciació. El tractament amb la IL-15 va ser de 3 hores a una dosi de 10 ng/ml. El tractament amb la citocina fa que hi hagi una tendència a augmentar la oxidació de la glucosa (10%) i la incorporació de la glucosa a lípids (17%) (Figura 29).



2.1.2 IL-15 I MÚSCUL ESQUELÈTIC: ESTUDIS *IN VIVO*

2.1.2.1 CAPTACIÓ D'AMINOÀCIDS

Paralelament als estudis *in vitro*, es van realitzar assajos *in vivo* amb rates tractades de manera aguda amb IL-15 (100 µg/kg). Per determinar la taxa de transport d'aminoàcids en aquest model, es va mesurar la captació tissular de l'aminoisobutirat (AIB), un anàleg no metabolitzable de l'alanina, marcat radioactivament, que s'administra intragàstricament. Els resultats que es recullen a la Taula 3 mostren que la citocina no produeix cap canvi en la incorporació d'aquest aminoàcid ni en múscul i en cap altre teixit. Aquests resultats concorden amb els obtinguts en el model *in vitro*.

	Control	IL-15
Absorció	66.6 ± 2	67.9 ± 2.1
Captació d'AIB		
GSN	0.54 ± 0.02	0.55 ± 0.02
Tibialis	0.17 ± 0.009	0.16 ± 0.01
Fetge	4.64 ± 0.2	4.72 ± 0.3
TAB	0.096 ± 0.01	0.100 ± 0.008
Ronyons	7.4 ± 0.5	8.4 ± 0.7
Carcassa	52.6 ± 2.7	50.8 ± 0.9

Taula 3. Captació tissular d'AIB en rates tractades amb IL-15. L'absorció s'expressa com a percentatge de la dosi administrada. La captació d'AIB s'expressa com a percentatge de la dosi absorbida per pes total del teixit. El pes total del TAB inclou només el TAB dorsal. Els resultats són mitjanes ± SEM, n = 5.

2.1.2.2 DESTINS METABÒLICS DE L'ALANINA

Igual que en la captació d'aminoàcids, vàrem realitzar experiments *in vivo* per determinar els destins metabòlics de l'alanina. Vàrem tractar a rates amb una dosi aguda de IL-15 i no vam observar canvis en el metabolisme de l'alanina (Taula 4), amb l'excepció de la incorporació de l'alanina a lípids. L'administració de la citocina resultava amb una disminució (45%) de la incorporació de l'alanina a lípids només en TAB.

A

	Control	IL-15
Absorció	83 ± 0.02	79 ± 0.01
CO₂	28 ± 4.02	34.7 ± 4.9

B

Incorporació	Teixit	Control	IL-15
Proteïna	GSN	0.086 ± 0.01	0.095 ± 0.005
Lípid	TAB	0.075 ± 0.007	0.041 ± 0.008 **
	TAM	0.071 ± 0.02	0.070 ± 0.01
	Fetge	0.345 ± 0.1	0.205 ± 0.05
	Plasma	0.012 ± 0.009	0.009 ± 0.001
Glicogen	GSN	0.074 ± 0.007	0.089 ± 0.008
	Fetge	0.418 ± 0.04	0.428 ± 0.03

Taula 4. Destins metabòlics de l'alanina en rates tractades amb IL-15. A) Absorció i oxidació. B) Incorporació a teixits. L'absorció s'expressa com a percentatge de la dosi administrada. La producció de CO₂ i la incorporació a les diferents fraccions s'expressa com a percentatge de la dosi absorbida per pes total del teixit. El pes total del TAB inclou només el TAB dorsal. GSN: gastrocnemius; TAB: teixit adipós blanc; TAM: teixit adipós marró. Els resultats són mitjanes ± SEM, n=6. Anàlisi estadística (test t-Student): **p<0.01 (vs control).

2.1.2.3 CAPTACIÓ DE GLUCOSA

També es va determinar la captació de 2DOG *in vivo* en rates tractades amb una dosi aguda (100 µg/kg) d'IL-15. Com es pot observar en la Figura 30, el tractament va induir un augment en la taxa de captació de glucosa del 46%.

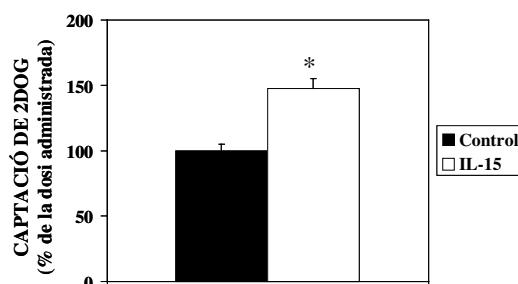


Figura 30. Captació de 2DOG *in vivo*. Els resultats s'expressen com el percentatge de 2DOG captada pel múscul respecte l'administrada, i són les mitjanes ± SEM per 6 animals per grup. Anàlisi estadística (test t-Student): *p<0.05 (vs control). Per més detalls veure Materials i Mètodes (apartat 1.10).

2.2 APLICACIONS TERAPÈUTIQUES

2.2.1 EFECTES SOBRE LA PROTEÏNA EN CAQUÈXIA

Com s'ha comentat anteriorment, està descrit que la IL-15 té efectes anabòlics sobre el múscul esquelètic (Quinn et al., 1995, 2002). La IL-15 té efectes en les cèl·lules musculars disminuint la taxa de degradació proteïca i augmentant la taxa de proliferació (Quinn et al., 2002).

L'objectiu d'aquest estudi va ser analitzar els efectes de la IL-15 sobre la proteïna muscular en el model tumoral Yoshida AH-130.

La implantació del tumor de ràpid creixement, l'hepatoma Yoshida AH-130, va resultar en una disminució del pes del fetge (40%), teixit adipós blanc (TAB) (71%) i la carcassa (39%) (Taula 5). L'administració de la IL-15 a les rates portadores de tumor va promoure un augment significatiu del pes del fetge i la carcassa, mentre que no es varen trobar canvis en el TAB (Taula 5). A més, l'administració de la citocina tampoc va provocar canvis en el contingut de cèl·lules tumorals (dades no presentades). El tractament amb IL-15, però, fa que hi hagi una disminució del pes del fetge (9%) i el TAB (36%) dels animals no portadors de tumor (Taula 5). Aquests resultats concorden amb s'havia observat *in vitro* anteriorment, que la IL-15 disminueix la massa del TAB mitjançant la inhibició de la síntesi d'àcids grassos a l'adipòcit (Carbó et al., 2001).

Grup experimental	IL-15	IBW	Fetge	TAB	Carcassa
Control	No	111 ± 3	7944 ± 123	838 ± 54	108 ± 1
	Sí	111 ± 3	7196 ± 56††	539 ± 52††	104 ± 1
Tumor	No	115 ± 4	4098 ± 105***	269 ± 30***	66 ± 1***
	Sí	114 ± 3	4769 ± 200***†	246 ± 21***	72 ± 1***†

Taula 5 . Pesos dels teixits en animals portadors de tumor tractats amb IL-15. Les dades s'expressen com a mitjana ± SEM. Els pesos dels teixits s'expressen com a mg per 100g del pes corporal inicial (IBW). n = 4 i 6 per no portadors i portadors de tumor, respectivament. TAB = teixit adipós blanc. Anàlisi estadística (t-Student): ***p<0.001 (vs no portadors de tumor), †p<0.05, †† p<0.01 (vs no tractats).

El creixement del tumor provoca una gran disminució del pes dels músculs: en GSN (35%), soleus (28%), tibialis (25%) i cor (32%) (Taula 6). L'administració d'IL-15 és capaç de revertir parcialment aquesta disminució (Taula 6). Aquests efectes, però, no es detecten en els músculs d'animals que no tenen tumor (Taula 6).

Grup experimental	IL-15	GSN	Tibialis	Soleus	Cor
Control	No	683 ± 13	215 ± 3	52.0 ± 0.3	532 ± 14
	Sí	677 ± 13	206 ± 5	55.6 ± 1.3	524 ± 5
Tumor	No	442 ± 13***	140 ± 4***	37.5 ± 1.0***	360 ± 13***
	Sí	489 ± 7***†	163 ± 3***††	42.1 ± 0.9***††	387 ± 6***

Taula 6 . Pesos dels músculs en animals portadors de tumor tractats amb IL-15. Les dades s'expressen com a mitjana ± SEM. Els pesos dels teixits s'expressen com a mg per 100g del pes corporal. n = 4 i 6 per no portadors i portadors de tumor, respectivament. GSN = gastrocnemius. Anàlisi estadística (t-Student): ***p<0.001 (vs no portadors de tumor), †p<0.05, †† p<0.01 (vs no tractats).

2.2.1.1 RECANVI PROTÈIC

Els neoplasmes malignes indueixen, de manera freqüent, una pèrdua progressiva de la massa magra corporal de l'hoste, associada a marcades alteracions en l'homeostasi endocrina i metabòlica. En la caquèxia cancerosa el múscul esquelètic es veu severament afectat, ja que quasi bé la meitat de tota la massa protèica corporal es localitza en aquest teixit (Lawson et al., 1982; Morrison, 1989; Tisdale, 1992). En la caquèxia el desgast muscular s'associa a un major recanvi protèic (Kien i Camitta, 1983; 1987; Beck i Tisdale, 1989; Melville et al., 1990; Beck et al., 1991). A més, la caquèxia tendeix a desenvolupar-se en els estadis més tardans de la malaltia, essent un factor de mala prognosi. Per això, la prevenció del desgast muscular en pacients amb càncer té un gran interès clínic. Existeixen dades controvertides respecte si el balanç protèic negatiu es dona per l'alteració de la taxa de síntesi o degradació o per canvis en els dos sentits (Lundholm et al., 1979; Emery et al., 1982; Pain et al., 1984; Tessitore et al., 1987a).

L'hepatoma ascític Yoshida AH-130 de rata és un bon model per l'estudi dels mecanismes implicats en el desenvolupament de la caquèxia. El seu creixement provoca una ràpida i progressiva pèrdua de pes corporal i desgast muscular, concretament en múscul esquelètic. La ràpida degradació de la proteïna tissular explica la major part del

desgast muscular que pateixen els animals portadors d'aquest tumor (Baccino et al., 1986; Tessitore et al., 1986; 1987a; 1993a).

Per tot l'anteriorment exposat, l'objectiu d'aquest estudi va ser analitzar els efectes del tractament amb IL-15 en el recanvi proteic muscular de rates portadores d'aquest tumor caquètic de ràpid creixement. En múscul esquèletic de rates portadores de tumor s'observa una disminució del pes (Taula 7) i del contingut proteic (Taula 7), com ja s'havia descrit anteriorment (Tessitore et al., 1987a). El tractament amb IL-15 reverteix parcialment el desgast proteic en múscul tibialis (Taula 7). Aquest efecte protector només s'observa en el pes del múscul tibialis d'animals amb tumor, no observant-se canvis en els músculs d'animals no portadors.

Temps	Tumor	Tractament	mg proteïna per gram de teixit	mg proteïna per 100 g IBW
Dia 4	NO	-	143 ± 4.4	25.5 ± 0.58
	NO	IL-15	141 ± 2.0	26.2 ± 0.35
	SI	-	144 ± 3.6	22.7 ± 2.05
	SI	IL-15	146 ± 1.5	25.2 ± 0.97
Dia 7	NO	-	126 ± 1.4	27.0 ± 0.65
	NO	IL-15	129 ± 2.5	26.5 ± 0.56
	SI	-	108 ± 6.0 *	15.3 ± 1.18**
	SI	IL-15	119 ± 4.6	19.2 ± 0.79***#

Taula 7. Contingut proteic en múscul tibialis a dia 4 i 7 de creixement tumoral. Les dades s'expressen com a mitjana ± SEM. n = 4 i 6 per no portadors i portadors de tumor, respectivament. IBW = pes corporal inicial. Anàlisi estadística (t-Student): *p<0.05; **p<0.01 (vs no portadors de tumor), #p<0.05 (vs no tractats).

Es va analitzar el recanvi proteic en múscul tibialis a dia 4 de creixement tumoral amb la finalitat de determinar si la IL-15 exercia la seva acció per canvis en la degradació i/o síntesi de la proteïna muscular. Malgrat no observar-se una disminució significativa de la proteïna (expressada com mg de proteïna per 100g de IBW), les taxes de degradació de proteïna van augmentar un 48% a conseqüència del creixement del tumor, mentre que la síntesi proteica es mantenia sense canvis. Això resultava en una menor taxa d'acumulació proteica (27%) respecte els controls (Taula 8). En el tractament amb IL-15, s'observa una inhibició de l'augment de les taxes de degradació proteica i el retorn fins a valors control de les taxes d'acumulació de proteïna (Taula 8). No es van trobar canvis en les taxes de síntesi proteica. En els animals no portadors de tumor, l'administració de IL-15 va provocar una disminució de la degradació (70%) i

síntesi (12%) proteica, el que implica una tendència a disminuir l'acumulació de proteïna (Taula 8). Altres dades del nostre grup, confirmen que a dia 7 de creixement tumoral la taxa d'acumulació és significativament inferior a causa d'una acusada disminució de la taxa de degradació proteica.

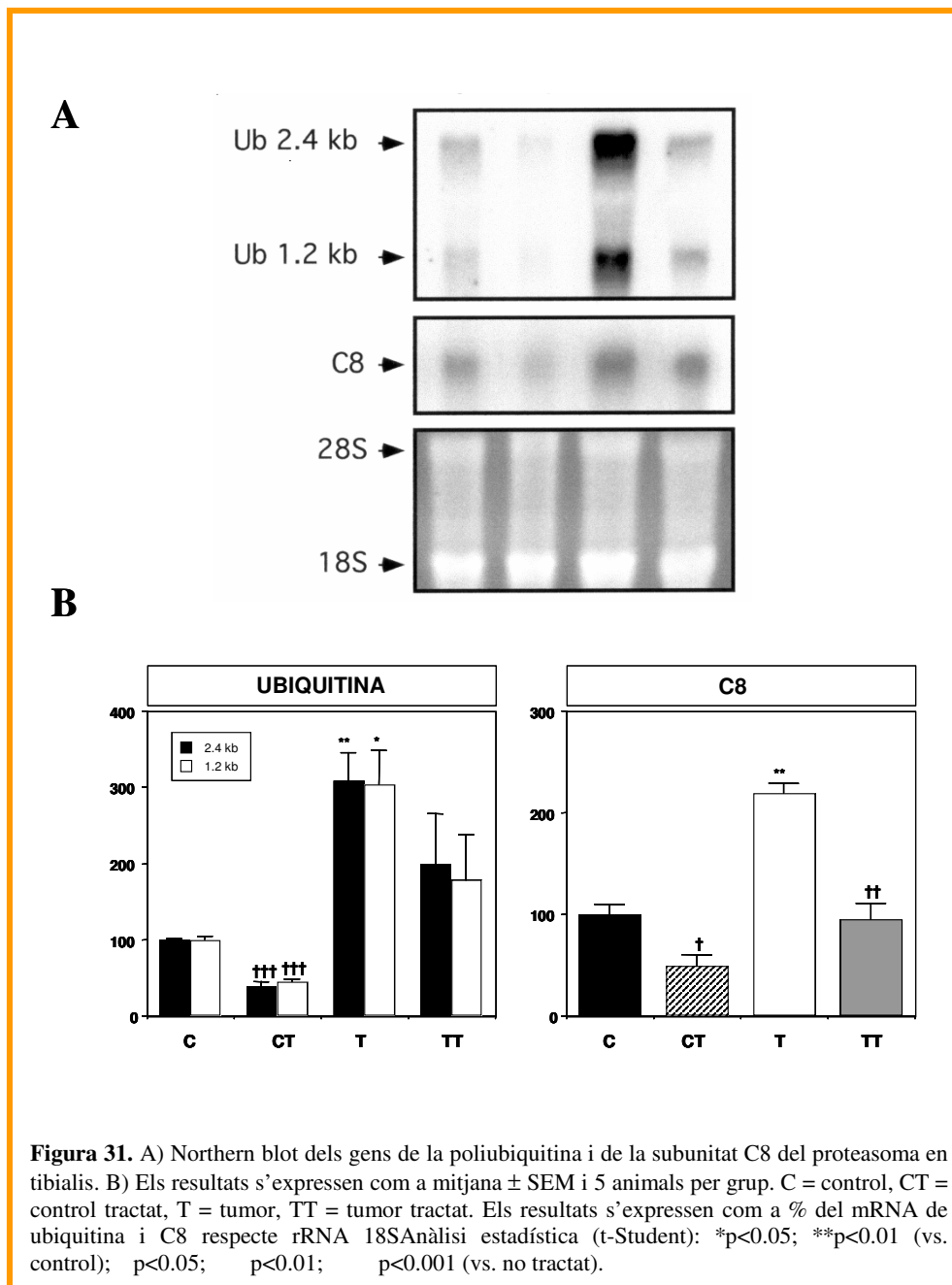
Temps	Tumor	Tractament	k_s	k_d	k_a
Dia 4	NO	-	10.7 ± 0.86	2.77 ± 0.27	7.94 ± 0.63
	NO	IL-15	9.39 ± 1.54	$0.82 \pm 0.20^{***}$	8.22 ± 0.93
	SI	-	10.6 ± 1.54	4.11 ± 0.82	5.76 ± 1.23
	SI	IL-15	8.80 ± 0.75	$0.49 \pm 0.49^{*##}$	8.07 ± 0.98

Taula 8. Recanvi protèic en múscul tibialis. Les taxes fraccionades de síntesi proteica (k_s), degradació (k_d) i acumulació (k_a) s'expressen com a % per dia ($n = 5$ per cada punt) i varen ser calculades en l'interval de temps de 0-4 dies. Anàlisi estadística (t-Student): $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ (vs control), $##p < 0.01$ (vs tumor).

2.2.1.2 SISTEMES PROTEOLÍTICS

L'hipercatabolisme al que es troba sotmès el múscul esquelètic durant la caquèxia cancerosa, implica l'hiperactivació del sistema proteolític dependent d'ubiquitina i ATP (Llovera et al., 1994). Els nivells plasmàtics de TNF- α i alteracions en l'homeostasi hormonal (Tessitore et al., 1993b) podrien jugar un paper important en la tendència cap al metabolisme catabòlic.

Es van trobar dos tipus de mRNA de poliubiquitina (2.4 kb i 1.2 kb) en múscul tibialis (Figura 31). A dia 7 de creixement tumoral, els animals presenten un augment de l'expressió dels gens de la poliubiquitina de més de 2 vegades comparant-ho amb animals control. A més, es va trobar augmentada l'expressió de la subunitat C8 del proteasoma en presència del tumor (Figura 31). Els animals control que varen ser tractats amb IL-15 presentaven una disminució dels tràncrits d'aquests gens (Figura 31), d'acord amb la disminució de la degradació proteica observada amb el tractament (Taula 8). A més, quan els animals portadors de tumor eren tractats amb IL-15, també es revertia parcialment l'activació d'aquest sistema proteolític (Figura 31).



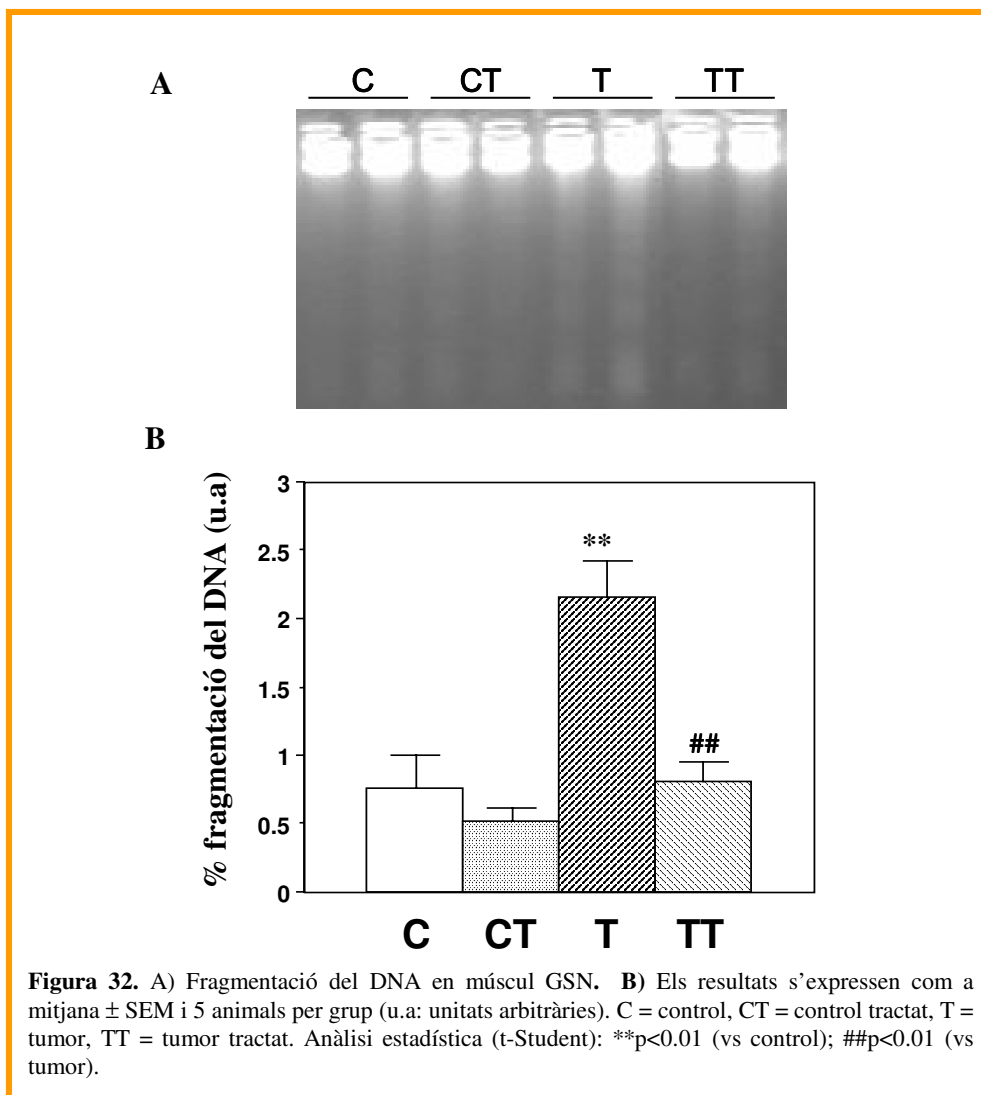
2.2.2 APOPTOSI I ESTRÉS OXIDATIU

Durant el creixement tumoral, a més d'haver-hi un augment de la degradació de proteïna muscular, la presència del tumor també indueix un augment de la taxa de fragmentació del DNA en múscul esquelètic tant en rates com en ratolins (Van Royen et al., 2000). Això suggereix que el desgast de la massa esquelètica va acompanyat per un procés apoptòtic actiu. A més, aquest augment en la taxa de fragmentació sembla ser

activada pel TNF- α (Carbó et al., 2002). S'ha descrit que la IL-15 té una funció anti-apoptòtica en diferents tipus cel·lulars (Pelletier et al., 2002; Berard et al., 2003; Hiromatsu et al., 2003; Matthys et al., 2002). Malgrat això, el mecanisme anti-apoptòtic implicat encara no es coneix (Pelletier et al., 2002; Matthys et al., 2002).

Tenint això en compte, vam voler estudiar si el tractament d'animals portadors de tumor amb la IL-15 podia neutralitzar/reduir l'elevada taxa d'apoptosi prèviament observada en múscul esquelètic d'aquests animals. Per fer-ho vàrem utilitzar mostres musculars d'animals portadors de tumor a dia 7 de creixement.

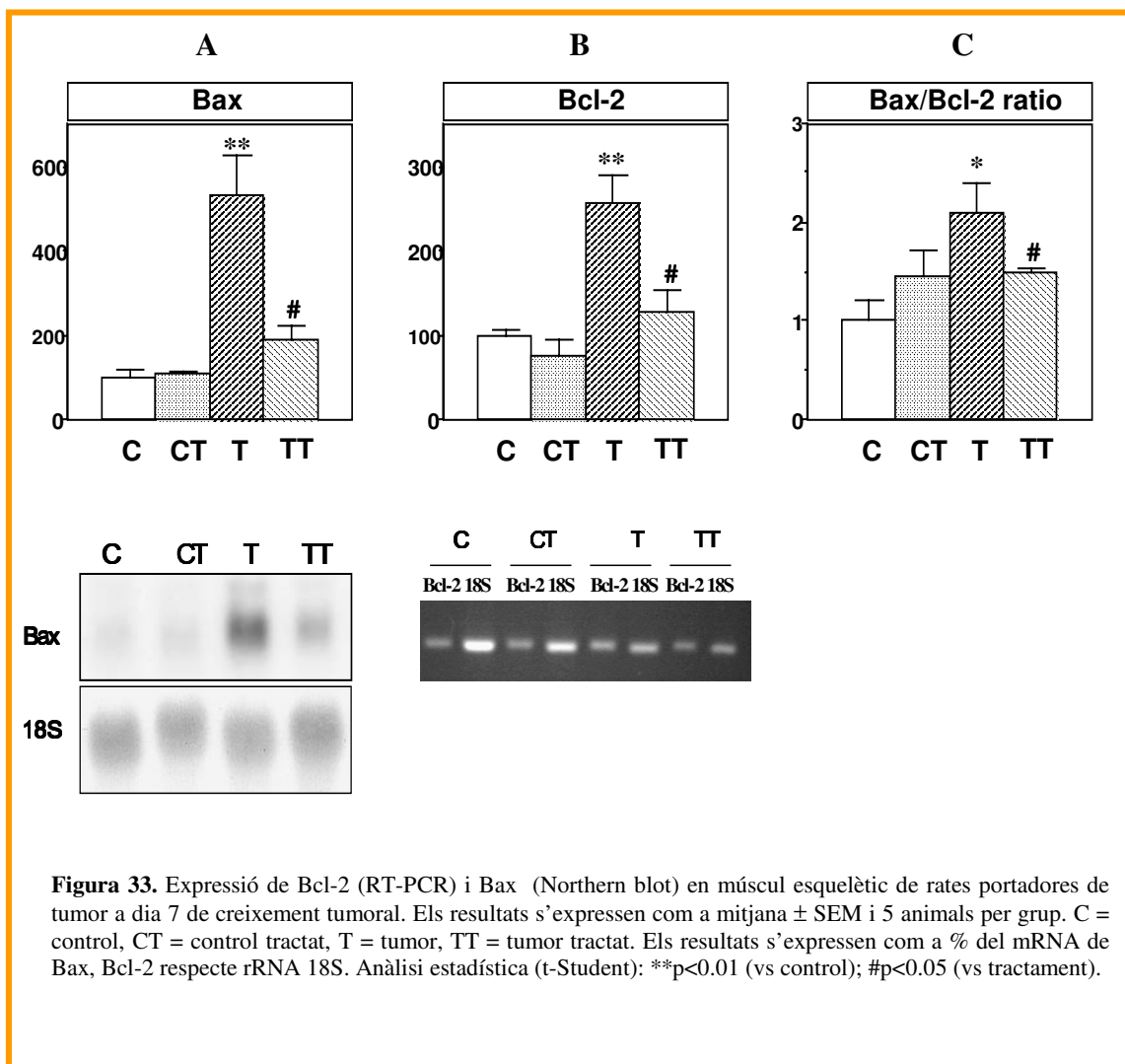
Els resultats que es presenten a la Figura 32 mostren que el creixement del tumor induïx la fragmentació del DNA com ja s'havia observat prèviament en el nostre grup.



D'altra banda, en els animals portadors de tumor que han estat tractats amb IL-15 aquesta fragmentació es troba inhibida. Per tant, els efectes antiapoptòtics de la IL-15 ja descrits en altres teixits serien extensibles al múscul esquelètic.

També vam voler estudiar com afectava la IL-15 als factors moleculars implicats en l'apoptosi. Per això, varem analitzar l'expressió gènica de Bcl-2 i Bax a múscul esquelètic de rates portadores de tumor. Ambdues proteïnes regulen l'activació de la ruta apoptòtica mitocondrial però actuant de diferent manera: Bcl-2, prevenint l'apoptosi i Bax, induint-la.

Els resultats que es presenten a la Figura 34 mostren que en múscul GSN de rates portadores de tumor hi ha un increment de l'expressió de les dues proteïnes (80% per Bax, 61% per Bcl-2) respecte als animals control. El tractament amb IL-15 a animals amb tumor disminueix tant l'expressió de Bcl-2 (50%) com la de Bax (64%). Aquests resultats no deixaven clar l'efecte antiapoptòtic de la IL-15 ja que aquesta citocina disminuïa tant el factor antiapoptòtic com el proapoptòtic. Donat que la inducció de l'apoptosi no depèn tant de l'expressió per separat d'aquestes proteïnes sinó de la relació entre ambdues, vàrem calcular el quocient entre l'expressió de Bax i Bcl-2 (Figura 33C). Els resultats demostren que mentre en animals portadors de tumor el quocient entre Bax/Bcl-2 és més gran que en el grup control, el tractament amb IL-15 reverteix aquest increment, suggerint una funció antiapoptòtica d'aquesta citocina donat que hi ha una abundància relativa major de Bcl-2 que de Bax. Així doncs, els resultats indiquen que l'IL-15 actuaria inhibint l'apoptosi incrementant l'abundància relativa de factors antiapoptòtics (Bcl-2) i en conseqüència mantenint la integritat del DNA.

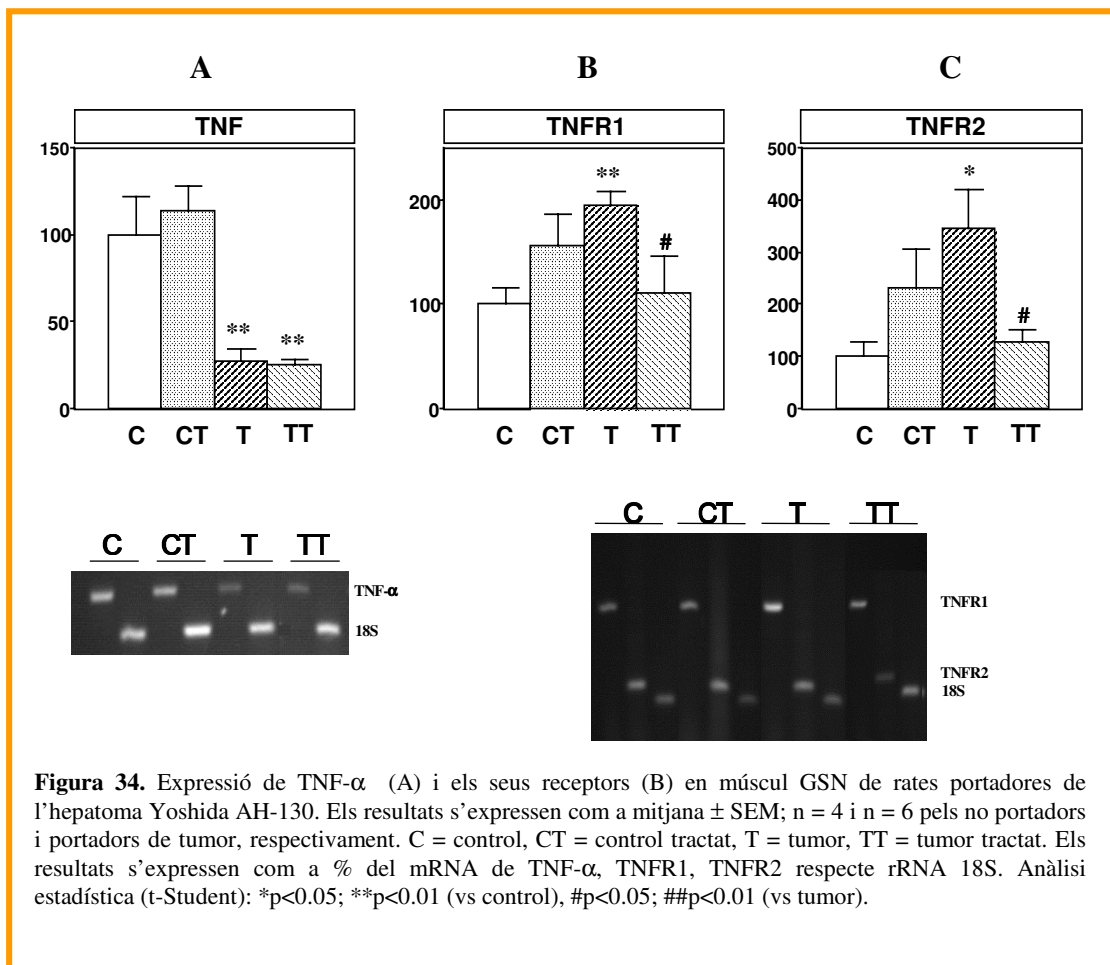


2.2.3 MECANISMES IMPLICATS

2.2.3.1 INTERACCIÓ AMB L'EXPRESSIÓ DELS RECEPTORS DE TNF- α

En animals portadors de tumor, un dels senyals que sembla activar el procés apoptòtic és el TNF- α . Per exemple, animals que han estat tractats de manera crònica amb aquesta citocina presenten un increment en la fragmentació del DNA a múscul esquelètic (Carbó et al., 2002). A més, el TNF- α actua com a senyal clarament apoptòtica en nombrosos tipus cel·lulars (Krown et al., 1996; Madge i Pober, 2001) i on el TNFR1 està implicat de manera específica (Krown et al., 1996; Mitsiades et al., 2003). Per tot això, vam voler analitzar si la IL-15 exercia la seva funció antiapoptòtica a múscul esquelètic alterant la cascada de senyalització del TNF- α .

Com es pot veure a la Figura 34, i com s'ha descrit en l'apartat 1.3.1, la presència de tumor, a dia 7 post-inoculació, indueix un increment en l'expressió muscular del TNFR1 (49%) i del TNFR2 (71%) mentre que l'expressió del TNF- α disminueix (73%). Així, quan s'administra la IL-15, de manera crònica, a animals portadors de tumor l'increment en el contingut d'mRNA dels TNFRs queda totalment revertit mentre que no s'observen canvis en l'expressió del TNF- α . Segons aquests resultats es pot suggerir que el mecanisme antiapoptòtic de la IL-15 implica una disminució de l'expressió gènica dels TNFRs a múscul esquelètic.

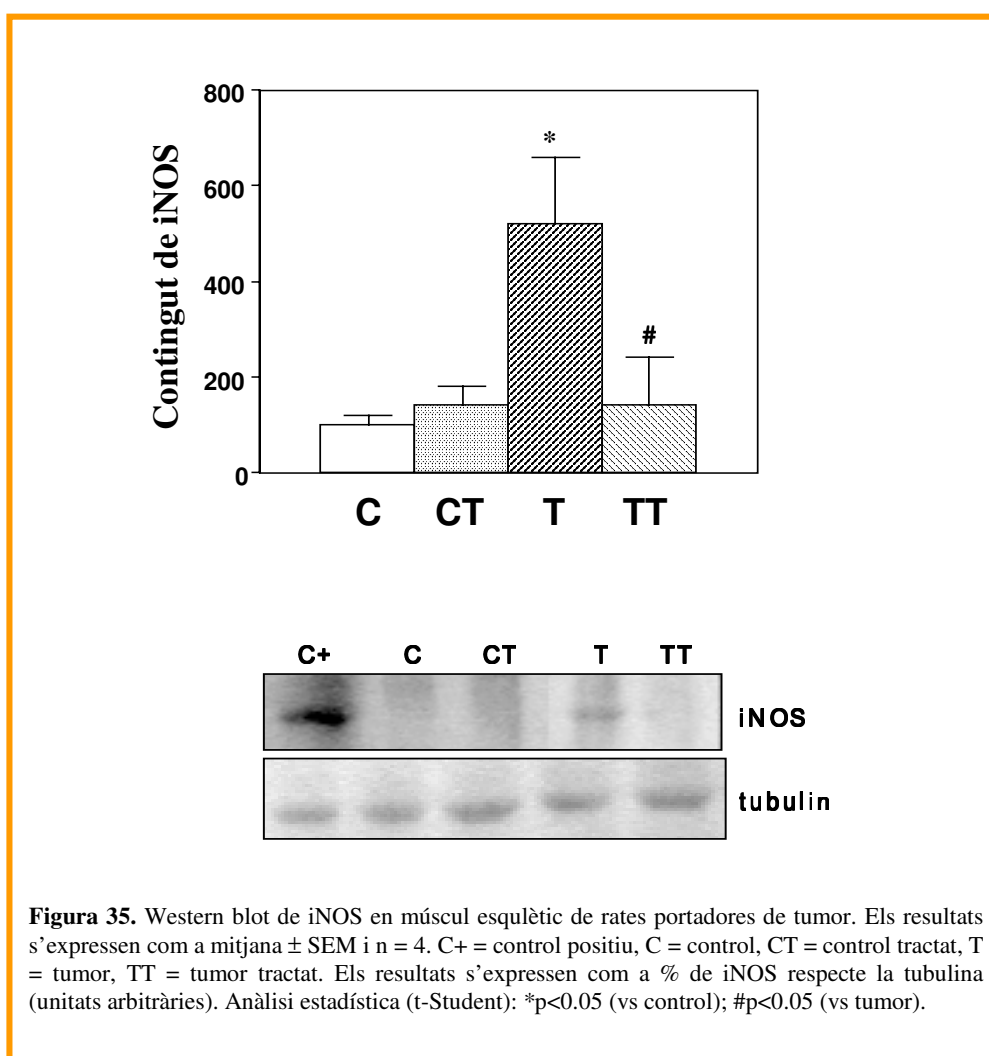


2.2.3.2 iNOS

Hi ha estudis que han suggerit que l'estrès oxidatiu podria estar implicat en l'apoptosis (Chu et al., 2003). De fet, durant l'estrès oxidatiu hi ha producció d'òxid nítric (NO) i aquest s'ha relacionat amb el desgast muscular que succeeix durant la caquèxia cancerosa (Buck i Chojkier, 1996). Està descrit que el TNF- α indueix apoptosi en cardiomiòcits neonatals mitjançant l'estimulació de l'expressió de la síntasa induïble

d'òxid nítric (iNOS) i de NO (Song et al., 2000). La iNOS és la isoforma que contribueix de manera més important a la producció de NO en situacions d'inflamació. En aquesta situació l'increment de l'expressió de la iNOS també seria exercida pel TNF- α mitjançant la unió als seus receptors (TNFRs), i per via de l'activació del factor de transcripció NF- κ B. Per tot això vam decidir determinar el contingut de iNOS en músculs d'animals portadors del tumor ascític Yoshida AH-130 a dia 7 de creixement tumoral.

Els resultats representats en la Figura 35 mostren que el creixement tumoral incrementa la iNOS a múscul esquelètic. El tractament amb IL-15 dels animals portadors de tumor reverteix l'augment de la proteïna fins a nivells equivalents als que trobem a animals control.



2.2.3.3 UCPs

Les proteïnes desacobladores (UCPs) intervenen en la disrupció del gradient de protons a través de la membrana mitocondrial interna, tenint així una capacitat potencial de dissipar energia (Porter, 2001a,b). S'han descrit altres funcions d'aquestes proteïnes (Argiles et al., 2002). Una d'elles és la de ser un mecanisme compensatori de l'estrès oxidatiu. Per exemple, el desacoblament de la cadena respiratòria de la fosforilació oxidativa resulta en una menor formació de ROS (Gomes-Marcondes et al., 2002; Murr et al., 1996). Altres estudis confirmen que l'expressió gènica de la UCP2 està relacionada amb la disminució de la formació de H₂O₂ (Negre-Salvayre et al., 1997). De fet, s'ha suggerit que la inducció de la UCP2 en condicions patofisiològiques seria un mecanisme compensatori de l'elevat estrès oxidatiu (Cortez-Pinto et al., 1998, 1999; Vidal-Puig, 2000).

Com ja s'ha esmentat anteriorment, l'estrès oxidatiu podria estar implicat en l'apoptosis (Chu et al., 2003). Per aquest motiu vam analitzar l'efecte de la IL-15 en l'expressió de les UCPs. El creixement tumoral indueix l'augment significatiu de l'expressió de la UCP3 a múscul esquelètic, mentre que només s'observa una tendència a incrementar en el cas de la UCP2 (Taula 9). L'administració de IL-15 a animals portadors de tumor provoca un increment significatiu de l'expressió de la UCP2 una clara tendència a augmentar l'expressió de la UCP3 (Taula 9).

Grup experimental	Tractament IL-15	UCP 2	UCP 3
Control	No	679 ± 55.4	697 ± 124
	Sí	566 ± 94	803 ± 235
Tumor	No	775 ± 88	2080 ± 241***
	Sí	1100 ± 71*††	2659 ± 160***

Taula 9. Expressió de les UCPs en múscul esquelètic de rates portadores de tumor. L'expressió del mRNA de UCP2 i UCP3 es va mesurar per Northern blot i es va corregir per la subunitat ribosomal 18S (unitats arbitràries). Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM; n = 6 i n = 5 pels no portadors i portadors de tumor, respectivament. Anàlisi estadística (t-Student): *p<0.05, ***p<0.001 (vs no portadors), †† p<0.01 (vs no tractats).

V. DISCUSSIÓ

La caquèxia cancerosa és una síndrome que es caracteritza per una important i progressiva pèrdua de pes corporal de l'hoste com a conseqüència de la desaparició dels dipòsits de greix i de la disminució de la massa muscular, i va acompanyat també d'anorèxia, nàusees, anèmia, astenia, alteracions de l'homeostasi hormonal i immunodepressió (Strain, 1979). Malgrat tot, la caquèxia no només està associada a processos neoplàsics. En aquesta tesi ens hem centrat en l'estudi de la caquèxia associada a tres processos patològics: sèpsia, càncer i MPOC.

1. MECANISMES ASSOCIATS A LA PÈRDUA DE MASSA MUSCULAR EN CONDICIONS PATOLÒGIQUES: PAPER DEL TNF- α

1.1 APOPTOSI

La fragmentació del DNA és un fet comú de la mort cel·lular per apoptosi. L'apoptosi muscular ja ha estat descrita en humans associada a la fallida cardíaca crònica i a l'atròfia (Tews et al., 1997; Dalla Libera et al., 1999), en múscul atrofiat de rata (Kajstura et al., 1996) i en múscul d'insecte (Schwartz et al., 1993).

El nostre grup ja havia suggerit anteriorment que el desgast muscular que acompanya la caquèxia cancerosa podria estar lligat a un fenomen apoptòtic pel qual les cèl·lules musculars no només perdrien proteïna sinó que també perdrien DNA (Van Royen et al., 2000). Per aquest motiu, ens vàrem plantejar si en una situació de caquèxia cancerosa en humans es produïa el fenomen apoptòtic de la mateixa manera que s'havia observat en models animals (Van Royen et al., 2000). Per això varem analitzar la fragmentació del DNA així com l'expressió de PARP en biòpsies de múscul esquelètic de malalts amb càncer de pàncrees. La presència del tumor produïa un augment en la fragmentació del DNA així com un increment de la banda de 85kDa de PARP, fets que confirmen la presència d'un procés d'apoptosi.

També ens vàrem plantejar si també es produïa aquest fenomen en el desgast muscular que es succeeix en una situació de sèpsia. Els resultats d'aquest treball mostren que la inducció de la sèpsia a rates per lligació i punció del cec causa un augment de la fragmentació del DNA a les 5 hores després de la intervenció i que la magnitud de la fragmentació del DNA augmenta a mesura que dura la sèpsia.

El TNF- α és inductor de l'apoptosi en molts tipus cel·lulars (Obeid et al., 1993; Ohta et al., 1994; Jarvis et al., 1994). Pel que fa als teixits musculars, es va començar a estudiar la implicació del TNF- α en l'apoptosi de cèl·lules cardíques ja que en moltes malalties coronàries s'observava el fenomen de l'apoptosi (Gottlieb et al., 1994; Tanaka et al., 1994; Itoh et al., 1995 i 1996; Kajstura et al., 1996; James et al., 1994; Buerke et al., 1995; Parker et al., 1995; Umansky et al., 1996). Hi ha evidències de que el TNF- α podria participar en la inducció de l'apoptosi en múscul esquelètic (Carbó et al., 2002). El nostre grup va demostrar que l'administració crònica de TNF- α provocava un increment de la fragmentació del DNA en el múscul esquelètic d'aquests animals (Carbó et al., 2002). Per tot això, ens vàrem plantejar estudiar el paper del TNF- α sobre l'apoptosi al múscul esquelètic en la sèpsia. Així, es va inhibir la síntesi d'aquesta citocina amb rolipram que és un inhibidor específic de la fosfodiesterasa de tipus IV (Wachtel et al., 1983). El rolipram actua inhibint IL-12 i TNF- α tant a nivell transcripcional com traducciona (Prabhakar et al., 1994). S'ha descrit que el rolipram redueix els nivells de TNF- α en sèrum en models animals (Nyman et al., 1997). En el nostre model, el tractament amb rolipram quasi bé reverteix l'increment de la fragmentació del DNA associada a sèpsia. Els resultats obtinguts indiquen, doncs, que en sèpsia hi ha una activació de l'apoptosi en múscul esquelètic i que el TNF- α hi està implicat.

Per tant, el desgast muscular característic de la caquèxia es deu, en part, a l'apoptosi que es produïx en múscul esquelètic tant en models animals com en humans, podent el TNF- α jugar un paper clau en la inducció d'aquesta.

1.2 EXPRESSIÓ DEL TNF- α I ELS SEUS RECEPTORS

El TNF- α és una citocina pleiotròpica que és produïda principalment per les cèl·lules immunes en resposta a la infecció, el creixement tumoral o a altres estímuls invasius. Malgrat això, s'ha demostrat que altres tipus cel·lulars poden produir i alliberar TNF- α (Aggarwal i Natarajan, 1996). Encara que els efectes del TNF- α sobre alguns tipus cel·lulars siguin coneguts, els estudis dels efectes d'aquesta citocina sobre múscul esquelètic són bastant contradictoris. El múscul esquelètic representa la principal font de pèrdua de proteïna en les malalties que porten associat un desgast muscular, i el TNF- α té un paper clar en el procés de desgast muscular a caquèxia

(Argilés i López-Soriano, 1992). Així, l'administració crònica de TNF- α a animals d'experimentació resulta en un desgast muscular degut a alteracions en el recanvi proteic (Llovera et al., 1993b). El TNF- α activa la degradació proteica muscular mitjançant la via proteolítica dependent d'ATP i ubiquitina (García-Martínez et al., 1993a). Aquesta acció del TNF- α activant aquest procés també succeeix durant la sèpsia (García-Martínez et al., 1995) i en la caquèxia cancerosa (Costelli et al., 1993). En aquest estat patològic, els efectes del TNF- α sobre el recanvi proteic muscular no semblen estar mediat per hormones o altres citocines. De fet, l'addició de TNF- α exògen als músculs soleus o extensor digitorum longus (EDL) de rata resulta en una activació directa de l'expressió gènica de l'esmentat sistema proteolític (Llovera et al., 1997). En relació als efectes d'aquesta citocina sobre cultius de cèl·lules musculars, l'efecte directe del TNF- α sobre el catabolisme proteic muscular continua sense aclarir-se, fins i tot amb alguns resultats negatius (Ebisui et al., 1995). Tanmateix el nostre grup va observar en cèl·lules C2C12 que el TNF- α és capaç de disminuir el contingut proteic i activar la proteòlisi dependent d'ATP (Álvarez et al., 2002). També hi ha evidències, però, que el TNF- α , a més de tenir una acció catabòlica en cèl·lules C2C12 en cultiu, podia modular la proliferació depenent de la concentració (Argilés et al., 2000; Álvarez et al., 2001). Està demostrat que hi ha una producció de TNF- α per part del múscul esquelètic, i això ha estat relacionat amb la resistència a la insulina que pateixen molts pacients amb càncer (Noguchi et al., 1998). A més, el múscul esquelètic podria ser una font important tant de citocines catabòliques com antiinflamatòries. El balanç entre aquests dos tipus de citocines podria participar en la modulació del recanvi proteic, i en conseqüència, sobre el desgast muscular. El nostre grup ha demostrat que l'addició de TNF- α a cèl·lules C2C12 resulta en una inducció de l'expressió tant del propi TNF- α com de la IL-6 (Álvarez et al., 2002). Zhang et al. (2000) varen observar en cèl·lules L6 que l'expressió dels receptors de múltiples citocines estava induïda per TNF- α . El mateix grup de recerca va observar que l'administració a rates d'una endotoxina també provocava canvis en l'expressió del receptor de la citocina. A més, tal i com s'ha comentat en l'apartat anterior, el TNF- α provoca un increment de la fragmentació del DNA en el múscul esquelètic en animals portadors de tumor (Carbó et al., 2002) i en sèpsia, fet que contribueix al desgast muscular en la caquèxia.

Tenint tot això en compte, vàrem plantejar-nos si la caquèxia podia modificar la sensibilitat del múscul esquelètic al TNF- α , ja fos induïnt una producció endògena de

TNF- α pel propi TNF- α o bé modulant l'expressió dels seus receptors. Per això, vàrem analitzar l'expressió gènica tant del TNF- α com dels seus receptors (TNFRs) en múscul esquelètic en diferents situacions de caquèxia, donat que el TNF- α i els seus receptors s'expressen de manera normal en el múscul esquelètic (Zhang et al., 2000).

Per estudiar el paper del TNF- α en la caquèxia cancerosa, vàrem utilitzar el model tumoral de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 (un tumor de ràpid creixement i altament caquètic). Donat que els nivells circulants d'aquesta citocina es troben elevats durant el creixement tumoral (Costelli et al., 1993; Llovera et al., 1998a), ens vàrem plantejar si el múscul esquelètic contribuïa a aquesta elevada producció de TNF- α . La implantació del tumor va provocar una important disminució de l'expressió del TNF- α a dia 2 de creixement tumoral i cinc dies després (dia 7 de creixement) l'expressió era només una quarta part del que trobavem en rates control.

Sembla clar, doncs, que el múscul esquelètic no participa en l'incrementada producció de TNF- α , que es reflecteix en els alts nivells circulants d'aquesta citocina durant la caquèxia cancerosa en animals d'experimentació. Possiblement aquests elevats nivells circulants de TNF- α podrien estar produïnt una disminució de l'expressió d'aquesta citocina en múscul esquelètic d'animals portadors de tumor, contràriament a l'observat en cèl·lules C2C12 (Álvarez et al., 2002). Una possible explicació a aquest fet seria que en models *in vivo*, l'expressió de TNF- α podria estar regulada per molts factors com, per exemple, l'estat redox muscular i l'activació de factors de transcripció per les espècies reactives de l'oxigen (Li et al., 1998; Chandel et al., 2000).

Tanmateix, els receptors seguien un altre patró d'expressió. Tant el mRNA del TNFR1 com el del TNFR2 es trobaven significativament augmentats (més de dues vegades) a dia 7 de creixement tumoral. Ja que la correlació entre el contingut d'mRNA i els nivells proteics no sempre es manté, vàrem decidir determinar els nivells de la proteïna del TNFR1. Aquest receptor sembla estar implicat en la cascada apoptòtica induïda per TNF- α (Krown et al., 1996; Madge i Pober, 2001). Les rates portadores de tumor (a dia 7 post-inoculació) presentaven un increment del contingut proteic del TNFR1, fet que correlacionava amb els resultats obtinguts d'expressió gènica.

D'aquests resultats es podria suggerir que els elevats nivells circulants de TNF- α que es detecten en aquests animals portadors de tumor fan que es produeixi una sobreexpressió dels mRNAs dels TNFRs i de les seves proteïnes. Aquest augment en el contingut dels TNFRs podria tenir dues conseqüències possibles: o bé que part

d'aquests receptors de membrana s'alliberessin a la circulació com receptors solubles, per acció del propi TNF- α (Engelmann *et al.*, 1990; Schall *et al.*, 1990; Himmler *et al.*, 1990; Zhang, 1994), i d'aquesta manera inactivarien part del TNF- α circulant (mecanisme protector), o bé que el fet que augmentin els receptors a membrana potencii l'efecte caquètic (proteolític i apoptòtic) del TNF- α a la fibra muscular. Aquesta segona hipòtesi podria explicar-se pel fet que el receptor TNFR1 té un domini de mort (*death domain*), el qual està relacionat amb la inducció de l'apoptosi en diversos tipus cel·lulars. Aquest domini està present en cardiomiòcits (Vandenabeele *et al.* 1995), fet que suggereix que també podria estar implicat en l'apoptosi dels cardiomiòcits. A més, la sobreexpressió del TNFR1 en múscul esquelètic d'animals portadors de tumor podria estar relacionada amb l'increment de la fragmentació del DNA observada prèviament pel nostre grup (Van Royen *et al.*, 2000).

La Figura 1 és una representació esquemàtica de la hipotètica regulació de l'expressió de TNF- α i dels seus receptors en animals portadors de l'hepatoma Yoshida AH-130.

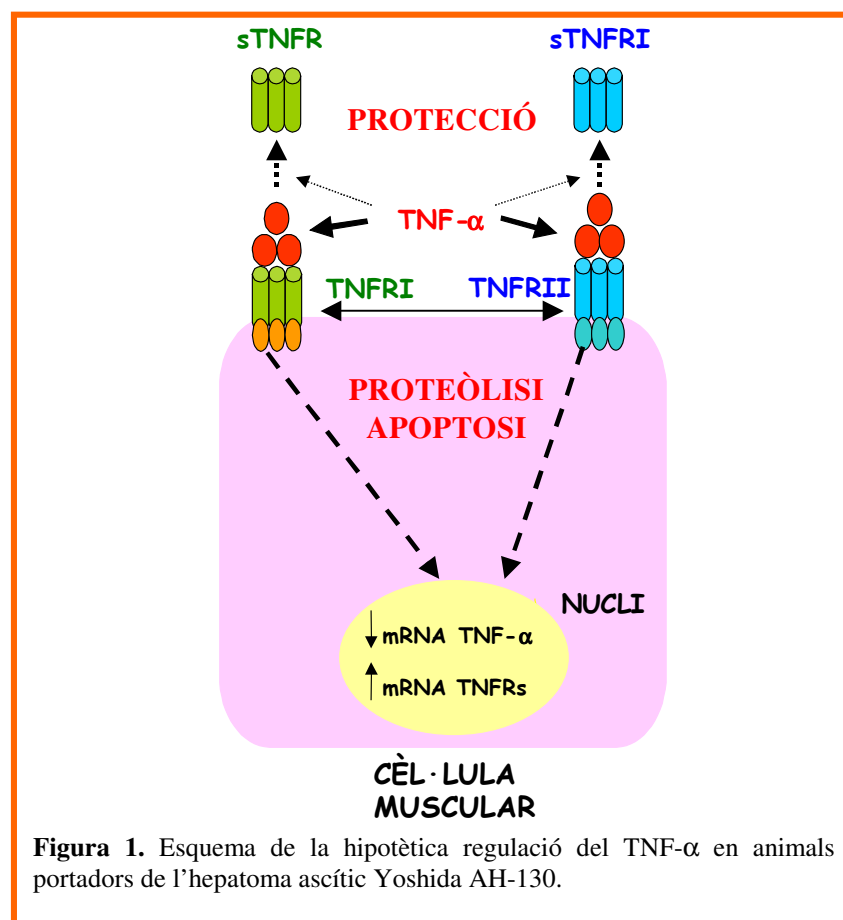


Figura 1. Esquema de la hipotètica regulació del TNF- α en animals portadors de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130.

De la mateixa manera que en model experimental de caquèxia cancerosa, vàrem estudiar el paper del TNF- α en múscul esquelètic de malalts amb un tumor pancreàtic. Curiosament, els resultats que vàrem obtenir no mostraven cap diferència, ni en l'expressió gènica de TNF- α ni el TNFR1, entre el grup control i els malalts amb càncer. En molts tipus de càncer s'observa un augment de l'expressió de TNF- α (Balkwill i Burke, 1989). En el cas concret del càncer de pàncrees, Ariapart et al. (2002) varen mesurar els nivells d'expressió de TNF- α i els seus receptors en cèl·lules sanguínies abans i després de l'extracció del tumor. Els pacients amb càncer de pàncrees presentaven uns nivells d'expressió de TNF- α més elevats que els controls, mentre que després de l'extracció del tumor els seus nivells arribaven quasi bé a valors control. A més, en aquest estudi no es varen observar variacions en l'expressió de TNFRs en cèl·lules sanguínies ni en els nivells plasmàtics de TNF- α . S'ha descrit que els nivells circulants de TNF- α correlacionen inversament amb el pes corporal (Karayiannakis et al., 2001). Els pacients que presenten uns nivells de la citocina detectables tenen un pes corporal i un índex de massa corporal (BMI) menor que aquells on els nivells de TNF- α no són detectables (Karayiannakis et al., 2001). A més, els pacients amb càncer de pàncrees metastàtic tenen uns nivells de TNF- α en sèrum molt superiors a aquells que no presenten metàstasis (Karayiannakis et al., 2001).

En el grup de pacients que participaren en aquest estudi no es varen detectar nivells circulants de TNF- α , fet que havia estat descrit anteriorment (Falconer et al., 1994; Fearon et al., 1998). Potser aquesta és la raó per la qual no s'observen canvis en l'expressió gènica del TNF- α i TNFR1 en múscul esquelètic en aquests pacients. Alhora, això podria estar relacionat amb que aquests pacients es trobaven en un estadi inicial de la malaltia i per tant no s'observa una resposta a nivell de TNF- α ni del seu receptor.

Hi ha evidències que impliquen citocines (principalment el TNF- α), en el desgast del múscul esquelètic que s'observa en aproximadament un 20% de pacients amb MPOC (Di Francia et al., 1994; De Godoy et al., 1996; Takabatake et al., 1999; 2000; Creutzberg et al., 2000). L'estat redox muscular i l'activació de factors de transcripció com el NF- κ B per les espècies reactives de l'oxigen (Li et al., 1998; Chandel et al., 2000) sembla que estan implicats en les vies de transducció del senyal que modulen els nivells cel·lulars de TNF- α . A més, s'ha descrit que l'entrenament a l'exercici en humans adults sans disminueix l'expressió del mRNA de TNF- α , així com

també els nivells musculars d'aquesta citocina (Greiwe et al., 2001), fet possiblement relacionat amb una millora en el sistema de transport/utilització d'O₂.

Per tot allò anteriorment exposat, ens vàrem plantejar estudiar l'efecte de l'exercici de moderada intensitat i l'entrenament en la producció de TNF- α en pacients MPOC. L'observació principal d'aquest estudi va ser l'augment dels nivells plasmàtics de TNF- α (pre i post entrenament) després d'onze minuts realitzant un exercici d'intensitat moderada, equiparable a l'esforç per realitzar les activitats diàries, mentre que en els controls l'entrenament reduïa significativament els nivells circulants de la citocina. A més, vàrem observar que els individus control tenien uns nivells circulants de sTNF-R1 superiors als dels pacients i l'exercici no produïa canvis en els nivells dels sTNF-R en cap dels dos grups. Aquest estudi revela per primer cop que l'increment en els nivells plasmàtics d'aquesta citocina podrien ser considerats com l'equivalent als que s'assoleixen en les activitats quotidianes diàries. No es varen observar diferències significatives entre els valors basals (en repòs) dels nivells plasmàtics de TNF- α entre controls i malalts MPOC, malgrat sí observar-se, després de l'entrenament, uns nivells de la citocina superiors en els darrers. Una possible explicació d'aquests nivells basals seria que el grup de malalts MPOC era molt heterogeni donat que incloïa malalts amb diferents graus de severitat de la malaltia i d'afectació muscular (Eid et al., 2001).

En individus sans s'ha descrit que un exercici llarg i extenuant incrementa els nivells circulants de citocines pro-inflamatòries, concretament la IL-6 (Drenth et al., 1995). Malgrat que l'origen de la producció de citocines en aquesta situació és una qüestió controvertida, s'han suggerit diferents fonts potencials que incrementen la secreció d'aquests mediadors: 1) les cèl·lules sanguínies mononucleades (Rhind et al., 2001; Moldoveanu et al., 2000; Ullum et al., 1994); 2) l'activació simpàtica que actua en òrgans immunes (Drenth et al., 1995); i 3) el múscul esquelètic que està sotmés a un treball intens (Ostrowski et al., 2000). Aquesta tercera hipòtesi és la més probable, donat que l'augmentada expressió d'IL-6 que es va detectar en les biòpsies de múscul de l'extremitat inferior després de córrer una maratón coincidia amb l'increment dels nivells circulants d'IL-6 (Ostrowski et al., 2000). Els nivells plasmàtics de les citocines sembla que estan relacionats amb dos factors principals: la intensitat i durada de l'exercici i el dany muscular induït per un exercici d'alta intensitat. El grau d'intensitat de l'exercici que es va realitzar en el nostre grup d'estudi va ser moderat i perfectament sostenible, ja que es va assajar en condicions normals de ritme cardíac i de consum

d'oxigen. Per tant, cap de les circumstàncies d'aquest estudi estan lligades a un exercici extenuant.

Està acceptat el fet que el TNF- α del múscul esquelètic podria tenir funcions fisiològiques autocrines i/o paracrines. Les vies de transducció del senyal sensibles a les espècies reactives de l'oxigen sembla que juguen un paper fonamental en la modulació dels nivells cel·lulars d'aquesta citocina (Vassilakopoulos et al., 1999; Chandel et al., 2000; Greiwe et al., 2001). Malgrat això, en aquests pacients nivells moderats d'exercici no provoquen grans canvis en l'estat redox muscular (Ravinovich et al., 2001). Potser per això, l'exercici no indueix canvis en el mRNA del TNF- α en els pacients MPOC. A més, el temps trascorregut per a la síntesi *de novo* de TNF- α muscular és insuficient (Albarenque et al., 2001). En aquest estudi no vàrem trobar relació entre l'expressió i els nivells circulants de TNF- α . En el grup de pacients MPOC no s'observava una disminució del TNF- α induïda per l'entrenament (Greiwe et al., 2001). Aquest resultat era d'esperar per la baixa capacitat antioxidant muscular després d'un entrenament de moderada intensitat en aquests pacients si es compara amb la dels individus sans (Ravinovich et al., 2001). Malgrat tot, la manca de mesures de la proteïna de TNF- α muscular no permet treure conclusions. A més, cal esmentar que mentre que els nivells circulants de TNF- α disminueixen després de l'entrenament, l'expressió muscular de la citocina no segueix el mateix comportament en individus sans, la qual es podria atribuir en part al diferent tipus de programa d'entrenament del present estudi (Greiwe et al., 2001).

Per tant, en els pacients MPOC s'observa un lleuger augment del TNF- α circulant després de l'exercici de moderada intensitat, que va acompanyat d'un augment en l'expressió de la citocina respecte els individus control, sense observar-se canvis per efecte de l'entrenament. No es pot suggerir que els elevats nivells plasmàtics de TNF- α siguin a causa de la síntesi muscular *de novo* d'aquesta citocina. De tota manera, es podria especular que l'exercici podria induir l'alliberament de TNF- α pre-format del múscul per mecanismes implicats en la regulació post-transcripcional. La manca de dades de contingut proteic de TNF- α muscular degut a la limitada mostra muscular de la qual es disposava dificulta encara més la interpretació d'aquests resultats.

1.3 L'ESTRÈS OXIDATIU

1.3.1 CÀNCER

Una excessiva producció d'oxidants afavoreix la disrupció de la cadena de transport d'electrons mitocondrial, i l'efecte final pot ser tant el dany cel·lular (necrosi) com la mort cel·lular programada (apoptosi). A més, les espècies reactives de l'oxigen (ROS) són produïdes per múltiples mecanismes en tots els compartiments cel·lulars i exerceixen efectes deleteris quan no es poden compensar pels sistemes antioxidants dels teixits. Per això, les ROS juguen un paper molt important en la patogènesi de diverses malalties (Barreiro et al., 2002; 2003; Javesghani et al., 2003). Les ROS, com els anions superòxid, el peròxid d'hidrogen o els radicals hidroxil, estan implicats directament o indirecta en el procés de la carcinogènesi. Principalment estan involucrats en el dany al DNA produïnt a vegades mutacions en gens supressors de tumor. També actuen com iniciadors i/o promotors de la carcinogènesi. S'han suggerit molts mecanismes que poden produir estrès oxidatiu en pacients amb càncer: a) alteració del metabolisme energètic; b) activació crònica no específica del sistema immune amb una excessiva producció de citocines pro-inflamatòries (les quals, a la vegada, incrementen la producció de ROS), i c) altres mecanismes que podrien ser conseqüència de l'ús de fàrmacs antineoplàsics, concretament agents alquilants i cisplatí, ja que són capaços d'estimular la producció de ROS i per tant, l'estrès oxidatiu.

Estudis previs han suggerit que les ROS podrien tenir un paper en la caquèxia cancerosa. Buck i Chojkier (1996) varen demostrar que el desgast muscular i la desdiferenciació podien prevenir-se mitjançant inhibidors de la síntesi d'òxid nítric (NO) i antioxidants. De la mateixa manera, Gomes-Marcondes i Tisdale (2002) varen observar que el desgast muscular en caquèxia cancerosa anava associat a elevats nivells de malondialdehid en múscul gastrocnemius, i que aquest estrès oxidatiu incrementava la degradació proteica en múscul esquelètic mitjançant un augment de l'expressió de components del sistema ubiquitina-proteasoma. A més, el nostre grup d'investigació ha observat que el TNF- α té un efecte directe sobre la proteòlisi muscular, ja que activa l'expressió dels gens del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina (Llovera *et al.*, 1997). D'altra banda, les vies de transducció del senyal sensibles a les espècies reactives de l'oxigen sembla que juguen un paper fonamental en la modulació dels nivells cel·lulars d'aquesta citocina (Vassilakopoulos et al., 1999; Chandel et al., 2000;

Greiwe et al., 2001). Murr et al. (1999) varen observar concentracions elevades de neopterina (un indicador de la producció de ROS) en sèrum i orina de pacients amb càncer. Aquests nivells elevats correlacionaven amb l'estadi de la malaltia, i predeien significativament una pitjor prognòs i supervivència.

Per tot això, ens vàrem plantejar l'estudi de l'estrès oxidatiu en animals portadors del tumor Yoshida AH-130. Les proteïnes són dianes dels efectes derivats de l'estrès oxidatiu en els teixits. L'oxidació proteica ha estat implicada en la patogènesi de nombroses condicions com malalties degeneratives, l'envelliment i desordres neurològics. De les diferents modificacions induïdes per les ROS en els residus d'aminoàcids, la formació del grup carbonil és un dels marcadors d'oxidació proteica millor caracteritzat en diferents estats patològics, com la sèpsia i la MPOC. En el nostre model experimental de caquèxia cancerosa es va observar un increment en la carbonilació de les proteïnes musculars. Donat que l'oxidació induïda per ROS es representa com la presència de derivats proteics amb grups carbonil, podem suggerir que, com a mínim en el nostre model experimental de caquèxia cancerosa, el dany cel·lular degut a l'oxidació succeeix, probablement via TNF- α , durant el procés del desgast muscular en els animals portadors de l'hepatoma ascític de Yoshida.

La capacitat anti-oxidativa és el resultat de l'acció de dos mecanismes: enzimàtic i no enzimàtic. Els mecanismes no enzimàtics són els que inclouen antioxidants, neutralitzadors de radicals lliures, ions metàl·lics de transició, albúmines, ceruloplasmina, metal·lotioneïnes i el glutatió. D'altra banda, els mecanismes enzimàtics inclouen la superòxid dismutasa (SOD), peroxidasa, catalasa i la NADPH reductasa. Per tal d'estudiar si l'estrès oxidatiu observat en els animals portadors de tumor eren a causa d'alteracions en els mecanismes enzimàtics ens vàrem plantejar l'anàlisi del contingut de la SOD i la catalasa en aquests animals. Sorprenentment, els nivells proteics d'aquests dos enzims antioxidants no estaven alterats en el model Yoshida AH-130. Malgrat això, s'observa que els nivells de catalasa en el múscul esquelètic d'aquests animals tenen tendència a augmentar, encara que no significativament, a mesura que creix el tumor.

Per tots aquests resultats es podria suggerir que la caquèxia, en el model tumoral Yoshida AH-30, està associada a elevats nivells d'estrès oxidatiu (valorat com a increment de carbonilació de proteïnes) i que la catalasa és l'enzim que estaria més implicat alhora de protegir de l'excés d'agents oxidants.

1.3.2 MPOC

Com ja s'ha comentat, el glutatió reduït (GSH) juga un paper important neutralitzant diferents espècies reactives i d'aquesta manera manté les funcions cel·lulars (Meister et al., 1983; Fernández-Checa et al., 1993). Aquest estudi ha caracteritzat la regulació del glutatió com a reflexe de l'estrès oxidatiu del múscul esquelètic després d'un entrenament perllongat en individus sans i en pacients MPOC. Els nostres resultats indiquen una capacitat divergent per adaptar el sistema redox a la demanda cel·lular del transport i consum d'O₂ durant l'entrenament entre aquests dos grups d'individus. En el nostre estudi no vàrem observar canvis en els nivells de glutatió total per efecte de l'exercici, ni en individus control ni en pacients MPOC. Els nivells de glutatió en repòs després de l'entrenament no vàren experimentar canvis significatius, malgrat observar-se una lleugera tendència a augmentar els nivells de GSH i disminuir els de glutatió oxidat (GSSG) en individus control. L'efecte de l'exercici després de l'entrenament va produir dos efectes contraposats: els individus sans incrementaven significativament els nivells de GSH en múscul, mentre que en múscul esquelètic de pacients MPOC s'observava un augment significatiu del GSSG. Tot i això, s'ha observat una pèrdua de peroxidació lipídica en ambdós grups, fet que suggereix que l'estrès oxidatiu després de l'entrenament no té conseqüències deletèries en individus sans ni en pacients MPOC (Rabinovich et al., 2001).

Tot i que, en individus sans, l'entrenament produeix una disminució significativa dels nivells del mRNA de la gamma-glutamil cisteïna sintasa (γ GCS), aquests s'adapten a la demanda de l'exercici doblant els nivells de GSH. La correlació negativa entre l'increment de GSH i la caiguda dels nivells d'expressió de la γ GCS després de l'entrenament és un fet difícil d'explicar. Una hipòtesi possible seria que durant un estímul perllongat (com és l'entrenament), la pujada dels nivells de GSH podria ser el senyal que reprimeix l'expressió de la γ GCS. En el cas dels pacients afectats per MPOC, l'expressió de γ GCS augmenta de manera significativa en resposta a l'exercici, sense observar-se cap diferència per efecte de l'entrenament. Possiblement, aquesta inducció de l'expressió de γ GCS actuaria com un mecanisme compensatori en resposta a l'increment del GSSG o, d'acord amb la hipòtesi anterior, l'expressió gènica de γ GCS no està reduïda a causa dels baixos nivells de GSH detectats en aquests pacients.

En biòpsies musculars extretes en situació de repòs tant abans com després de l'entrenament en pacients MPOC i en controls, no es varen observar grans canvis en l'estat redox. Això sembla suggerir que les alteracions d'aquest sistema només són evidents després de l'exercici. Està demostrat que l'exercici intens (extenuant) induïx nivells d'estrès oxidatiu més alts en pacients MPOC que en individus sans (Viña, et al., 1996). Això es pot suprimir amb tractaments amb inhibidors de la xantina oxidasa com l'al·lopurinol (Heunks et al., 1999) i per teràpia amb O₂ (Viña et al., 1996). En aquest estudi, la presència de canvis lleugers en el sistema redox després de l'exercici tant en pacients MPOC com en controls pot ser deguda a que aquesta exercici era de moderada intensitat (40%). Tant la intensitat com la durada del protocol varen ser triades per fer mesures després de l'exercici.

Tant els pacients MPOC com els individus sans augmenten la seva tolerància a l'exercici depenent de la millora, induïda per l'entrenament, del transport i ús de l'O₂ per part del múscul (American Thoracic Society and European Respiratory Society, 1999). En aquests pacients, la reserva dels òrgans centrals per incrementar el transport d'oxigen (fluxe sanguini i contingut d'oxigen arterial) durant l'exercici intens (American Thoracic Society and European Respiratory Society, 1999; Sala et al., 1999) és limitada per: una funció pulmonar molt deteriorada i pels efectes de les fluctuacions de la pressió pleural sobre el fluxe cardíac (Scirba et al., 1996; Montes de Oca et al., 1996). Aquest fenomen està afavorit per altres factors perifèrics com la deteriorada conductància de l'O₂ dels capilars cap a la mitocondria (Richardson et al., 1995; Jobin et al., 1998) que provoca hipòxia cel·lular durant l'exercici d'intensitat moderada-alta i en conseqüència estrès oxidatiu. L'augment de l'activitat citocrom oxidasa (COX) i l'increment dels nivells d'aquest enzim (Sauleda et al., 1998) pot interpretar-se com una adaptació de la mitocondria a la hipòxia cel·lular.

Engelen et al. (2000a; 2001) varen suggerir que hi havia una relació causal entre l'anormal potencial redox muscular basal i les alteracions del metabolisme proteic observades en pacients amb enfisema. Malgrat això, en aquest estudi no s'han trobat diferències entre els nivells basals de GSH d'individus sans i malalts MPOC. Tot i això, creiem que el nostre estudi no contradiu la hipòtesi anterior, donat que el nombre de biòpsies musculars de pacients no ens ha permès establir diferents subgrups segons el grau de severitat de la malaltia. Una ampliació del nombre de pacients potser hagués permès veure aquest efecte.

En resum, aquest estudi demostra que hi ha diferències en les adaptacions de l'estat redox muscular induït per l'exercici entre pacients MPOC i controls. Mentre que els individus sans incrementen els nivells musculars de GSH després de l'entrenament, el grup MPOC redueix el seu potencial redox. A més, aquest potencial redox reduït podria estar iduïnt l'expressió muscular de TNF- α en els pacients del nostre estudi (Vassilakopoulos et al., 1999; Chandel et al., 2000; Greiwe et al., 2001). Aquests resultats mostren la importància de les adaptacions perifèriques induïdes per l'exercici i la relevància del resultat de l'entrenament dels pacients amb MPOC.

El desgast muscular és una de les complicacions que es presenten en la MPOC, així com en altres desordres crònics (Franssen et al., 2002). La pèrdua de pes en els malalts MPOC podria reflectir el resultat final de la susceptibilitat genètica més la interacció de diferents factors a nivell pulmonar i perifèric. La producció anòmala de citocines, l'estrès oxidatiu, la hipòxia tissular, les condicions físiques i la severitat de la malaltia, s'han descrit extensament com a potencials causants de la disfunció muscular perifèrica en l'MPOC (American Thoracic Society and European Respiratory Society, 1999).

Per tot això, ens vàrem plantejar si l'adaptació anormal a l'entrenament del sistema GSH-GSSG podia estar associada a un fenotip d'MPOC caracteritzat per la pèrdua de pes corporal. El GSH cel·lular sembla que és un regulador important de la diferenciació miogènica en cèl·lules musculars murines C2C12 (Ardite et al., 2004). El manteniment d'uns nivells òptims de GSH podria ser una estratègia útil per prevenir el dany muscular en MPOC. Mentre que el GSH citosòlic garanteix un correcte funcionament del programa miogènic, el manteniment dels nivells de GSH mitocondrial podria assegurar la supervivència cel·lular tal com s'ha observat en estudis previs (Garcia-Ruiz et al., 2003; Ortega et al., 2003) en els quals la depleció selectiva del GSH mitocondrial sensibilitza a la mort cel·lular mediada per agents químics o citocines.

La principal observació d'aquest estudi va ser que els nivells musculars de GSH disminueixen a mesura que ho feia el BMI, essent el grup MPOC amb BMI_L el que tenia els nivells més baixos en resposta a l'entrenament. Només es va observar un increment significatiu en el GSH induït per l'entrenament en individus control. També vàrem determinar l'expressió de γ GCS en aquests malalts. L'increment en l'expressió de γ GCS en pacients MPOC amb BMI_L es pot interpretar com un mecanisme adaptatiu per contrarrestar l'estrès oxidatiu induït per l'exercici en aquests pacients. És conegut el fet

que la γ GCS pot sobreexpressar-se en resposta a diverses condicions estressants incloent-hi l'estrès oxidatiu o la depleció del GSH (Meister et al., 1990; Morales et al., 1998; Ardite et al., 2000). Els nivells de γ GCS després de l'entrenament tendeixen a disminuir en els controls i això pot explicar-se com una regulació de retroalimentació negativa degut a l'increment dels nivells de GSH.

Per tant, d'aquest estudi es pot suggerir que a mesura que disminueix el pes corporal, l'estrès oxidatiu provocat per l'entrenament augmenta en aquests pacients. A més, sembla que la inducció de l'expressió muscular de γ GCS en pacients MPOC amb BMI_L podria ser un mecanisme adaptatiu per contrarrestar la disminució dels nivells musculars de GSH.

1.4 IMPLICACIÓ DE LA CALCINEURINA

La calcineurina és un important regulador de les respostes intracel·lulars activades per calci en múscul esquelètic. La calcineurina, induïda per la via calci/calmodulina, regula la transcripció de diversos gens via els factors nuclears de cèl·lules T actives (NF-ATs). Aquestes proteïnes són una família de molècules descrites originalment com a reguladores de l'expressió de citocines en cèl·lules T (Rao, 1997). Quan la calcineurina s'activa, defosforil·la la cua citoplasmàtica de NF-AT, activant-lo i permetent la seva translocació al nucli, on regularà l'expressió de diversos gens (Delling et al., 2000).

La calcineurina promou la diferenciació i la regeneració del múscul esquelètic. La diferenciació del múscul esquelètic implica la fusió de mio blasts per formar miotubs polinucleats i l'activació de gens musculars específics. Abbott et al. (1998) varen descriure que la ciclosporina A (un inhibidor específic de la calcineurina) inhibia la diferenciació de mio blasts *in vitro*, suggerint que la calcineurina era essencial per l'activació del programa de diferenciació muscular. A més, quan es produeix un dany en el múscul esquelètic adult s'activen les cèl·lules satèl·lit miogèniques quiescents, adjacents a les fibres musculars, i es fusionen amb fibres pre-existents per tal de reparar el múscul. La ciclosporina A impedeix la regeneració muscular en resposta al dany, el que suggereix la importància de la calcineurina en el desenvolupament muscular *in vivo* (Abbott et al., 1998). Això podria explicar perquè pacients que han estat sotmesos a un

transplantament i que es tracten amb ciclosporina A presenten una debilitat severa del múscul esquelètic (Goy et al. 1989).

Un altre potent inductor de l'hipertròfia del múscul esquelètic, tant *in vivo* com *in vitro*, és l'IGF-1 que actua activant l'expressió dels canals de calci de tipus L, els quals incrementen les concentracions de calci (Bruton et al., 1999; Wang et al., 1999). S'ha descrit un paper essencial de la calcineurina en la hipertròfia de miòcits esquelètics mediada per IGF-1. La incubació de mioblasts de rata amb IGF-1 provoca hipertròfia que va acompanyada de la sobreexpressió de calcineurina i la localització d'aquesta al nucli (Musaro et al., 1999; Semsarian et al., 1999). A més, la ciclosporina A bloqueja la hipertròfia en resposta a IGF-1 (Musaro et al., 1999; Semsarian et al., 1999).

Mentre que la implicació de la calcineurina en la hipertròfia del múscul esquelètic és un fet acceptat, el seu paper en l'atròfia muscular no és tan clar. S'ha descrit que el desgast muscular induït en rata per la secció de la medul·la espinal s'associa amb uns nivells reduïts de calcineurina (Spangenburg et al., 2001). A més, l'activació de la via de senyalització de la calcineurina millora el dany muscular en ratolins *mdx* amb distròfia (Chakkalakal et al., 2004; Stupka et al., 2004). Altres estudis, malgrat això, han demostrat que els inhibidors de la calcineurina no bloquejen l'increment de la mida de les fibres induïda per l'activitat nerviosa en la regeneració muscular (Bodine et al., 2001). També s'ha demostrat que l'eficàcia de les estratègies dirigides a revertir el desgast muscular en dos models experimentals com l'extremitat en suspensió o la secció de la medul·la espinal no es troba afectada per la inhibició de la calcineurina (Dupont-Versteedgen et al., 2002).

El desgast muscular en rates portadores de l'hepatoma Yoshida AH-130 està estretament relacionat amb el TNF- α , donat que tractaments anti-TNF- α poden revertir, com a mínim en part, l'estat hipercatabòlic (Costelli et al., 1993, 2002). Es coneix poc la relació entre la calcineurina i el TNF- α . D'una banda, en cèl·lules B, així com també en cèl·lules T, la ràpida inducció del gen del TNF- α pot ser bloquejada per drogues immunosupressores com la ciclosporina A o FK506 (inhibidors de la calcineurina) (Goldfeld et al., 1992). Goldfeld et al. (1994) varen observar que aquests inhibidors bloquejaven la inducció del mRNA del TNF- α i del seu promotor en cèl·lules T transfectades transitòriament amb un plàsmid que contenia la regió promotora del TNF- α . Per tant, es podria suggerir que la calcineurina és el principal mediador de l'expressió

gènica del TNF- α en cèl·lules B i T activades. A més, s'ha descrit que els inhibidors de calcineurina són inhibidors potencials de la citotoxicitat induïda per TNF- α (Kantrow et al., 2000). D'altra banda, estudis recents suggereixen que la calcineurina comparteix amb el TNF- α la capacitat d'activar la transcripció mediada per NF- κ B, mitjançant un mecanisme diferent a la defosforilació i inactivació de I κ -B α (Pons i Torres-Aleman, 2000; Biswas et al., 2003). A més, Alzuherri et al. (2003) varen observar que en cèl·lules C2C12 que expressaven la calcineurina de manera constitutiva, hi havia una activació significativa de NF- κ B i una activació de NF-AT reduïda en presència de TNF- α , fets que anaven associats a la reducció de l'activitat fosfatasa, que és l'indicador de l'activitat de la calcineurina.

Donat que en càncer (Jenkins i Bustin, 2004) i en sèpsia (Dahn et al., 1988; Fan et al., 1994) es dona un desgast muscular important a més de una disminució dels nivells de IGF-1 i alteracions en els nivells de TNF- α , ens vàrem plantejar estudiar si la calcineurina estava implicada en el desgast del múscul esquelètic d'animals portadors de l'hepatoma ascític de Yoshida AH-130. No vàrem observar diferències en l'expressió de calcineurina, ni a nivell de mRNA ni proteïna, en els diferents dies de creixement tumoral analitzats. Aquests resultats suggereixen que la calcineurina no estaria implicada en el desgast que pateix el múscul esquelètic durant la caquèxia cancerosa en el nostre model tumoral.

2. IL-15, UNA CITOCINA ANABÒLICA AMB IMPLICACIONS TERAPÈUTIQUES

2.1 EFECTES METABÒLICS

S'ha demostrat que la IL-15 es comporta com una citocina anabòlica en múscul esquelètic tant *in vivo* (Quinn et al., 2002) com *in vitro* (Quinn et al., 1995). De fet, la IL-15 estimula la síntesi proteica i inhibeix la degradació en miotubs de múscul esquelètic en cultiu que han estat transduïts amb un vector d'expressió retrovíric per la IL-15 (Quinn et al., 2002). Estudis realitzats en cultius cel·lulars mostren que la IL-15 es comporta com un factor anabòlic augmentant el contingut de proteïna miofibrilar (Quinn et al., 1995). De fet, la sobreexpressió d'aquesta citocina en cèl·lules C2C12

indueix una hipertròfia per un mecanisme que sembla ser diferent al de l'IGF-I (Quinn et al., 2002).

Per això, vàrem estudiar si els efectes de la IL-15 sobre les fibres musculars eren directes i els mecanismes implicats en l'acció anabòlica d'aquesta citocina sobre múscul esquelètic. Per fer-ho vàrem incubar músculs EDL aïllats de rata en presència d'IL-15. Els resultats obtinguts, indiquen que la IL-15 és capaç de disminuir la taxa proteolítica (mesurada com alliberament de tirosina al medi d'incubació en presència de cicloheximida) en músculs EDL aïllats de rata. D'altra banda, la presència d'aquesta citocina no altera la taxa de síntesi proteica mesurada com incorporació de ^{14}C -fenilalanina a la proteïna muscular mentre que l'addició d'insulina estimula la taxa de síntesi proteica. Aquesta última observació no concorda amb l'anteriorment descrita per Quinn et al. (2002) degut, potser, a la metodologia emprada o a que aquest estudi ha estat realitzat en múscul aïllat on probablement hi ha altres mecanismes implicats.

D'altra banda, ens vàrem plantejar estudiar l'efecte de la IL-15 en la captació i destí metabòlic dels aminoàcids utilitzant dues aproximacions experimentals: estudis *in vivo* i músculs aïllats. La manca d'efecte d'aquesta citocina sobre la taxa de síntesi tampoc va acompanyada de canvis clars en el metabolisme dels aminoàcids. La presència d'IL-15 en el medi d'incubació de músculs EDL aïllats no provoca canvis en l'oxidació de l'alanina ni en la seva incorporació a lípids o a proteïna. De la mateixa manera, en els resultats dels estudis *in vivo* s'observa que després d'una administració aguda d'IL-15, aquesta citocina només tenia efecte disminuint la incorporació d'alanina a lípids en teixit adipós. Aquests resultats estan d'acord amb altres previs on es demostra que la IL-15 també modula l'activitat del teixit adipós disminuint la taxa de lipogènesi (Carbó et al., 2001).

També vàrem estudiar si la IL-15 podria influir en la taxa de transport d'aminoàcids al múscul esquelètic. Per això vàrem determinar la captació d'AIB, un anàleg no metabolitzable de l'alanina, en rates tractades agudament amb la citocina. El tractament amb IL-15 no va provocar canvis en aquest paràmetre. A més, vàrem analitzar si la IL-15 tenia un efecte directe sobre la captació d'aminoàcids neutres. Per això, vàrem mesurar la captació de MetilAIB en músculs EDL aïllats incubats amb la citocina. De la mateixa manera que en el cas anterior, no es varen observar canvis deguts al tractament amb la citocina.

Per tant, els efectes anabòlics de la IL-15 observats es duen bàsicament a les seves propietats antiproteolítiques, sense descartar però, el possible paper de mecanismes no caracteritzats encara.

També ens vam plantejar si la IL-15 regulava el metabolisme glucídic al múscul esquelètic. Vàrem observar que aquesta citocina augmentava la captació de 2DOG tant *in vivo* com *in vitro*. Per això, vàrem aprofundir en l'estudi analitzant els destins metabòlics de la glucosa. Tot i que esperavem un augment de la utilització de glucosa com a substrat energètic, no vàrem observar diferències estadísticament significatives en cap dels destins analitzats però sí una certa tendència a incrementar l'oxidació i a disminuir el glicogen. Una possible explicació a aquests fets seria que la major disponibilitat de glucosa per part del múscul tractat amb IL-15 modularia la utilització d'altres recursos energètics tals com la proteïna muscular i per tant podria afavorir a que disminueixi la proteòlisi en aquest teixit.

2.2 APLICACIONS TERAPÈUTIQUES

2.2.1 EFECTES SOBRE LA PROTEÏNA

El desgast proteic muscular és un fet característic de la caquèxia cancerosa i s'ha associat a un afavoriment del catabolisme proteic tissular (Kien i Camitta, 1983; 1987; Beck i Tisdale, 1989; Melville et al., 1990; Beck et al., 1991; Tessitore et al., 1993a). Moltes de les estratègies terapèutiques per la caquèxia cancerosa han estat dissenyades basant-se en la suposició que el desgast tissular era el resultat de la malnutrició o de la competència entre el tumor i l'hoste. Malgrat tot, la nutrició parenteral o la sobrealimentació no han estat efectives o en el millor dels casos ho han estat només temporalment (Popp et al., 1981; Shaw i Wolfe, 1986; Moley et al., 1988). A més, en alguns casos sembla que el tractament sigui més avantatjós pel tumor que pel propi hoste (Popp et al., 1981; Tayek et al., 1986).

El model tumoral en rata que s'ha utilitzat en aquest estudi causa una ràpida i progressiva pèrdua de pes corporal i un desgast proteic tissular. Aquest últim està associat amb l'hipercatabolisme proteic tissular (TPH) (Tessitore et al., 1987a; 1987b; 1993a) el qual està probablement mediat per la producció de citocines com el TNF- α (García-Martínez et al., 1993; Llovera et al., 1993a; 1993b) i alteracions en l'homeostasi hormonal (Tessitore et al., 1993a). De fet, s'han obtingut efectes beneficiosos amb els

tractaments amb anticossos anti-TNF- α (Costelli et al., 1993) o amb fàrmacs que interfereixen en el desenvolupament del TPH (Tessitore et al., 1994). Els resultats obtinguts en aquest estudi mostren que el tractament amb IL-15 d'animals portadors de tumor inhibeix part de la pèrdua de proteïna en múscul tibialis mitjançant la reversió de l'increment de la degradació proteica. Això concorda amb estudis previs que indiquen que la IL-15 actua com una citocina anabòlica en múscul esquelètic (Quinn et al., 1995). A més, suporta els resultats obtinguts en múscul EDL aïllat que indicaven que la IL-15 exerceix una acció directa sobre múscul esquelètic, disminuint la degradació proteica sense alterar la síntesi (veure resultats apartat 2.1.1). La IL-15 activa les cèl·lules *natural killer* (Carson et al., 1995), les quals tenen accions propietats anti-tumorals. Malgrat això, s'ha de destacar que la IL-15 en el nostre model no té cap efecte sobre el creixement tumoral (dades no presentades). Per això, els efectes de la IL-15 en la caquèxia induïda per la presència de tumor no estan relacionats amb l'acció anti-tumoral d'aquesta citocina.

Els mecanismes precisos pels quals les proteïnes intracel·lulars són degradades, malgrat no estar encara del tot caracteritzats, són bastant coneguts i s'accepta que hi ha d'haver proteòlisi dins i fóra dels lisosomes. Les proteases dels lisosomes, particularment les catepsines, no són les principals mediadores de la degradació de les proteïnes miofibrilars en el múscul esquelètic de la rata (Lowell et al., 1986; Tessitore et al., 1994). S'havia descrit que el sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina duu a terme el recanvi de les proteïnes de vida curta (Ciechanover et al., 1994) o de proteïnes defectuoses formades durant l'estrès oxidatiu com el shock tèrmic (Bond et al., 1985). De tota manera, s'havia suggerit que l'activitat d'aquest sistema també podria estar relacionada amb proteïnes de vida llarga com les que es troben al múscul esquelètic (Hilenski et al., 1992). De fet, posteriorment, aquest sistema proteolític s'ha relacionat com a responsable en part de les alteracions del metabolisme proteic en múscul esquelètic en diferents condicions patològiques (Argilés i López-Soriano, 1996). Estudis previs del nostre laboratori han demostrat que la via lisosomal està poc implicada en el desenvolupament de l'hipercatabolisme proteic muscular dels animals portadors de l'hepatoma Yoshida AH-130 (Llovera et al., 1994; 1995; Tessitore et al., 1994), mentre que una important activació de la proteòlisi dependent d'ATP sembla ser el mecanisme predominant (Llovera et al., 1994; Costelli et al., 1995). És interessant observar que l'efecte preventiu que exerceix la IL-15 en l'accelerada degradació proteica està associat a una normalització de la sobreexpressió tant de la subunitat C8

del proteasoma com dels trànscripats de la ubiquitina. A més, l'administració de IL-15 a rates control redueix tant l'mRNA d'ubiquitina com el de C8. Per tant, l'efecte de la IL-15 sobre el recanvi proteic sembla que es dona per una disminució de l'activitat del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina.

Donat que la IL-15 exerceix una acció selectiva i protectora del múscul esquelètic revertint l'incrementada degradació proteica i la conseqüent pèrdua de proteïna que caracteritza la caquèxia dels animals portadors del tumor AH-130, es perfila com una possible estratègia terapèutica.

2.2.2 APOPTOSI I ESTRÉS OXIDATIU

Els resultats discutits anteriorment demostren clarament que la IL-15 actua com una citocina anabòlica al múscul esquelètic. El mecanisme que està associat als efectes de la citocina al múscul impliquen una disminució de la taxa de degradació proteica, tal com ha estat descrit en l'apartat anterior. Tot i això, el desgast muscular que succeeix durant la caquèxia no només és a causa de la pèrdua de proteïna sinó que també és a causa d'un augment de l'apoptosi de les cèl·lules musculars. Com s'ha esmentat anteriorment en aquesta discussió, estudis previs del nostre laboratori indiquen que durant la caquèxia cancerosa en models experimentals, s'observa un increment en la fragmentació del DNA al múscul esquelètic, suggerint que el desgast proteic de la massa muscular va acompanyat per un procés apoptòtic actiu (Carbó et al., 2002).

Per tots aquests fets, vàrem decidir comprovar si l'acció anti-caquètica de la IL-15 es devia, a més de preservar la proteïna muscular, a inhibir l'apoptosi muscular. Anteriorment, s'havia demostrat que la IL-15 actuava com una citocina antiapoptòtica en cèl·lules del sistema immune (Pelletier et al., 2002; Berard et al., 2003; Hiromatsu et al., 2003; Matthys et al., 2002). De tota manera el mecanisme antiapoptòtic concret d'aquesta citocina no s'ha esbrinat encara (Pelletier et al., 2002; Matthys et al., 2002).

Els resultats obtinguts en el nostre model de caquèxia cancerosa (l'hepatoma ascític Yoshida AH-130) mostren que el tractament d'aquests animals amb la IL-15 manté la integritat del DNA en múscul esquelètic, reverteix l'apoptosi mesurada com fragmentació del DNA. A més, vàrem analitzar l'expressió gènica de proteïnes implicades en l'apoptosi: Bcl-2 (anti-apoptòtica) i Bax (pro-apoptòtica). L'expressió de totes dues proteïnes es troba augmentada en múscul GSN d'animals portadors de tumor. Curiosament, el tractament amb IL-15 d'aquests animals produïa una disminució tant

Bax com Bcl-2. De fet, la presència del tumor resulta en un increment del quocient Bax/Bcl-2, el que fa que predomini l'activitat pro-apoptòtica. El tractament amb IL-15 reverteix l'increment d'aquesta relació, protegint doncs de l'apoptosi. Per tot això, podem dir que la IL-15 no només té un efecte anti-apoptòtic en cèl·lules immunes (com s'havia descrit previament) sinó que també té aquest efecte sobre múscul esquelètic en la caquèxia cancerosa.

De tota manera, aquest no ha de ser l'únic mecanisme implicat. La pròpia IL-15 pot estar contribuint a l'efecte antiapoptòtic contrarrestant l'efecte proapoptòtic del TNF- α . En rates portadores de tumor, un dels senyals que activen l'apoptosi en el múscul esquelètic és el TNF- α . De fet, en animals tractats de manera crònica amb TNF- α s'observa un increment de la fragmentació del DNA en el múscul esquelètic (Carbó et al., 2002). De manera semblant, els ratolins deficients en el TNFR1 portadors del carcinoma caquètic de pulmó de Lewis no mostren aquesta augmentada taxa de la fragmentació del DNA (Carbó et al., 2002). En efecte, el TNF- α esdevé un clar senyal apoptòtic en nombrosos tipus cel·lulars (Krown et al., 1996; Madge et al., 2001); aquesta cascada apoptòtica implica específicament el TNFR1 (Krown et al., 1996; Mitsiades et al., 2003). Tenint tot això en compte, varem decidir estudiar si la IL-15 exercia la seva acció anti-apoptòtica alterant la cascada de senyalització del TNF- α en múscul esquelètic. Com ja s'ha comentat en aquesta discussió, la presència del tumor disminueix l'expressió del TNF- α i augmenta la dels seus receptors en múscul esquelètic. El tractament amb IL-15 no produeix cap canvi en l'expressió del TNF- α però sí que reverteix l'increment dels TNFRs. Per tant, aquests resultats suggereixen que el mecanisme anti-apoptòtic de la IL-15 implica una disminució de l'expressió gènica dels TNFRs en múscul esquelètic.

S'ha demostrat que la citocina pro-inflamatòria TNF- α indueix apoptosis en cardiomiòcits neonatals via l'expressió de iNOS i la producció d'òxid nítric (NO) (Song et al., 2000). De manera recíproca, l'absència de iNOS en aquestes cèl·lules (ratolins deficients en iNOS) condueix a una dramàtica reducció de l'apoptosis induïda per TNF- α . També s'ha hipotetitzat el fet que l'estrès oxidatiu podria estar implicat en l'apoptosi (Chu et al., 2003). De fet, durant l'estrès oxidatiu es forma NO, i aquest ha estat relacionat amb el degast muscular que succeeix en la caquèxia cancerosa (Buck et al., 1996). En condicions normals, el NO és sintetitzat per l'òxid nítric sintasa neuronal (nNOS) dins les fibres del múscul esquelètic. De tota manera, l'isoforma induïble

(iNOS) és la que contribueix de manera més important a la producció de NO sota condicions d'inflamació, per la qual cosa aquesta isoforma és la que té una taxa de síntesi de NO més alta que les isoformes constitutives. El TNF- α és una de les molècules més conegudes i potents que és capaç d'incrementar l'expressió de la iNOS mitjançant la unió amb els seus receptors (TNFRs) 1 i 2, via l'activació del factor de transcripció NF- κ B.

Tenint tot això en compte, vàrem decidir analitzar el contingut d'iNOS, l'enzim principal que participa en la formació de NO, en el model tumoral Yoshida AH-130. La primera observació d'aquest estudi va ser que el contingut d'iNOS en múscul esquelètic augmentava per la presència del tumor. Això indica que, en aquest model de caquèxia, el múscul esquelètic està en una situació d'estrès oxidatiu, tal i com hem comentat en l'apartat 1.4 d'aquesta discussió. Donat que els animals portadors de tumor tenen uns nivells circulants elevats de TNF- α , i com hem discutit anteriorment una augmentada expressió dels TNFRs, es podria suggerir que l'apoptosi descrita observada en aquests animals (Van Royen et al., 2000; Carbó et al., 2002) podria ser deguda, en part, a la producció de NO induïda per TNF- α i per l'estrès oxidatiu que es produeix en caquèxia (veure apartat 1.5 de resultats). L'administració sistèmica d'IL-15 redueix marcadament els nivells proteics d'iNOS en múscul GSN de rates portadores de tumor. Per tant, l'efecte anti-apoptòtic d'aquesta citocina es podria atribuir també a la capacitat de disminuir l'estrès oxidatiu que pateix el múscul esquelètic mitjançant l'alteració de la cascada de senyalització del TNF- α (revertint l'increment en l'expressió dels TNFRs) discutida anteriorment.

Les proteïnes desacobladores (UCPs) han estat associades a la disrupció del gradient de protons a través de la membrana mitocondrial interna, tenint així un potencial paper de dissipadors d'energia (Porter et al., 2001a i b); malgrat això, s'han observat altres funcions d'aquestes proteïnes (Argilés et al., 2002). D'entre aquestes funcions, s'ha descrit que les UCPs són un mecanisme compensatori de l'estrès oxidatiu (Murr et al., 1996; Gomes-Marcondes et al., 2002). De fet, el desacoblament de la cadena respiratòria de la fosforilació oxidativa produeix ROS. En aquest sentit, varis estudis confirmen que un increment en l'expressió gènica d'UCP2 està relacionada amb una disminució de la producció H₂O₂ (Negre-Salvayre et al., 1997). De fet, la inducció de l'UCP2 s'ha suggerit com a marcador en condicions patofisiològiques on hi ha un increment de l'estrès oxidatiu (Cortez-Pinto et al., 1998; 1999; Vidal-Puig et al., 2000).

Per tant, ens vàrem plantejar l'estudi de l'efecte del tractament amb IL-15 sobre l'expressió de la UCP2 i la UCP3 en múscul esquelètic d'animals portadors de l'hepatoma Yoshida AH-130. En estudis previs del nostre grup, ja s'havia descrit que la presència del tumor incrementa l'expressió tant de UCP2 com UCP3 (Sanchis et al., 1998). D'igual manera, els nostres resultats confirmen que el creixement tumoral indueix l'augment de l'expressió d'aquestes proteïnes en múscul esquelètic. Com que la caquèxia cancerosa podria ser la conseqüència, almenys en part, de la despesa energètica incrementada que implica el desacoblament de la respiració, degut a l'augment en l'expressió de UCP2 i UCP3 que presenten els animals portadors de tumor. Sorprenentment, l'administració de IL-15 a animals portadors de tumor promou un increment de la UCP2 i UCP3. D'acord amb la hipòtesi anterior, hauriem d'esperar una disminució d'aquestes proteïnes per tal de disminuir la despesa energètica d'aquests animals. Malgrat tot, s'ha esmentat anteriorment que les UCPs poden tenir altres funcions. Per tant, es podria suggerir que en caquèxia aquestes proteïnes actuarien com a mecanisme compensatori de l'estrès oxidatiu més que contribuir a incrementar la despesa energètica.

Per tant, en base als resultats obtinguts, el mecanisme associat a l'acció anti-apoptòtica de la IL-15 pot exercir els seus efectes alterant la cascada de senyalització del TNF- α i mitjançant la disminució de l'estrès oxidatiu, possiblement modificant el contingut (i activitat) de les proteïnes desacobladores a múscul esquelètic; posant de manifest el seu ampli potencial terapèutic en el tractament de la caquèxia.

VI. CONCLUSIONS

1. En la síndrome de la caquèxia s'observa una pèrdua de proteïna muscular alhora que un procés apoptòtic actiu mesurat com a fragmentació del DNA. Aquest darrer fet ha estat demostrat en dues situacions patològiques on es dona aquesta síndrome: càncer (model de l'hepatoma Yoshida AH-130 i càncer pàncrees humà) i sèpsia.
2. El TNF- α està implicat en la inducció de l'apoptosi en múscul esquelètic donat que el tractament amb rolipram reverteix parcialment la fragmentació del DNA observada en rates sèptiques.
3. L'augment de l'expressió muscular dels receptors de TNF- α així com l'increment de la relació Bax/Bcl-2 (detectat en càncer experimental) serien mecanismes implicats en la inducció de l'apoptosi i indicarien una major sensibilitat del múscul esquelètic a les accions catabòliques del TNF- α .
4. En el model experimental de caquèxia cancerosa s'observa un increment de la carbonilació de proteïna muscular, alhora que un augment en el contingut de iNOS i de les UCPs. Aquests fets, posen de manifest que el múscul esquelètic pateix estrés oxidatiu durant el procés de caquèxia.
5. Els malalts MPOC presenten uns nivells musculars de glutatió reduït (GSH) inferiors als d'individus sans, fet que és més acusat a mesura que disminueix l'índex de massa corporal. En aquests malalts s'observa un augment de l'expressió muscular de la γ GCS que podria actuar com a mecanisme compensatori dels baixos nivells de GSH. L'estrés oxidatiu muscular detectat en malalts MPOC podria ser el responsable de l'augment de l'expressió gènica de TNF- α observada a múscul esquelètic.
6. En individus sans, el programa d'entrenament millora el seu estat redox muscular mentre que en els malalts MPOC no es millora sino que l'estrés oxidatiu muscular és més acusat.

7. La IL-15 es comporta clarament com una citocina anabòlica a nivell de múscul esquelètic exercint les següents accions: reverteix la degradació proteica i bloqueja l'apoptosi.

8. Els mecanismes associats a les accions terapèutiques de la IL-15 es podrien explicar a nivell de la normalització de l'expressió dels receptors de TNF- α i a la inhibició de l'activació del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina a múscul esquelètic alhora que disminueix la proteïna iNOS i augmenta l'expressió de UCP2 i UCP3 contrarrestant l'estrés oxidatiu en aquest teixit.

VII. BIBLIOGRAFIA

A

Abbott KL, Friday BB, Thaloor D, Murphy TJ, Pavlath GK. Activation and cellular localization of the cyclosporine A-sensitive transcription factor NF-AT in skeletal muscle cells. *Mol Biol Cell.* 9: 2905-16 (1998)

Abu-Shakra S, Alhalabi MS, Nachtman FC, Schemidt RA and Brusilow WS. Anabolic steroids induce injury and apoptosis of differentiated skeletal muscle. *J Neurosci. Res.* 47: 186-97 (1997)

Adam D, Ruff A, Strelow A, Wiegmann and Kronke M. Induction of stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases by the p53 tumour necrosis factor receptor does not require sphingomyelinases. *Biochem J.* 333: 343-50 (1998)

Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S and Elliott PJ. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 58: 2615-22 (1999)

Adams V, Yu J, Möbius-Winkler S, Linke A, Weigl C, Hilbrich L, Schuler G and Hambrecht R. Increased nitric oxide synthase in skeletal muscle biopsies from patients with chronic heart failure. *Biochem. Mol. Med.* 61: 152-60 (1997)

Adams V, Jiang H, Yu J, Möbius-Winkler S, Fiehn E, Linke A, Weigl C, Schuler G and Hambrecht R. Apoptosis in skeletal myocytes of patients with chronic heart failure is associated with exercise intolerance. *J. Am. Coll. Cardiol.* 33: 959-65 (1999)

Adams V, Gielen S, Hambrecht R and Schuler G. Apoptosis in skeletal muscle. *Front. Biosci.* 6: 1-11 (2001)

Agah R, Malloy B, Sherrod A, Bean P, Girgis E and Mazumder A. Therapy of disseminated NK-resistant tumor by the synergistic effects of recombinant interleukin-2 and tumor necrosis factor. *J. Biol. Response Mod.* 7: 140-51 (1988)

Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Hezel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goeddel DV and Harkins RN. Human tumor necrosis factor: production, purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 260: 2345-54 (1985a)

Aggarwal BB, Eessalu TE and Hass PE. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by interferon-gamma. *Nature.* 318: 665-7 (1985b)

Aggarwal BB, Aiyer RA, Pennica D, Gray PW and Goeddel DV. Human tumor necrosis factors: structure and receptor interactions. *Ciba Found. Symp.* 131: 39 (1987)

Aggarwal BB and Pandita R. Both type I and type II interferons down-regulate human tumor necrosis factor receptors in human hepatocellular carcinoma cell line HEP G2: role of protein kinase C. *FEBS Lett.* 337: 99-102 (1994)

Aggarwal BB and Natarajan J. Tumor necrosis factors: developments during last decade. *Eur. Cytokine Netw.* 7: 93-124 (1996)

Agostini C, Trentin L, Facco M, Sancetta R, Cerutti A, Tassinari C, Cimarosto L, Adami F, Cipriani A, Zambello R and Semenzato G. Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis. *J. Immunol.* 157: 910-8 (1996)

Agteresch HJ, Dagnelie PC, van der Gaast A, Stijnen T, Wilson JH. Randomized clinical trial of adenosine 5'-triphosphate in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 92: 321-8 (2000)

Agteresch HJ, Rietveld T, Kerkhofs LG, van den Berg JW, Wilson JH, Dagnelie PC. Beneficial effects of adenosine triphosphate on nutritional status in advanced lung cancer patients: a randomized clinical trial. *J Clin Oncol.* 20: 371-8 (2002)

- Agusti AG, Villaverde JM, Togores B and Bosch M.** Serial measurements of exhaled nitric oxide during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 14: 523-8 (1999)
- Agusti AG, Sauleda J, Miralles C, Gomez C, Togores B, Sala E, Batle S and Busquets X.** Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 166: 485-9 (2002)
- Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X.** Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 21: 347-60 (2003)
- Ahlberg J, Berkenstam A, Henell F and Glaumann H.** Degradation of short and long lived proteins in isolated liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* 260: 5847-54 (1985)
- Albarenque SM, Suzuki K, Nakayama H, Doi K.** Kinetics of cytokines mRNAs expression in the dorsal skin of WBN/ILA-Ht rats following topical application of T-2 toxin. *Exp Toxicol Pathol.* 53: 271-4 (2001)
- Aleman MR, Santolaria F, Batista N, de La Vega M, Gonzalez-Reimers E, Milena A, Llanos M, Gomez-Sirvent JL.** Leptin role in advanced lung cancer. A mediator of the acute phase response or a marker of the status of nutrition? *Cytokine.* 19: 21-6 (2002)
- Allen DG, Monke SR, Talmadge RJ, Roy RR and Edgerton VR.** Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibres. *J. Appl. Physiol.* 78: 1969-76 (1995)
- Allen DG, Yasui W, Tanaka T, Ohira Y, Nagoaka S, Sekiguchi C, Hinds WE, Roy RR and Edgerton VR.** Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus muscle fibres following spaceflight. *J. Appl. Physiol.* 81: 145-51 (1996)
- Allen DG, Linderman JK, Roy RR, Bigbee AL, Grindeland RE, Mukku V and Edgerton VR.** Apoptosis, a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *Am. J. Physiol.* 273: C579-C587 (1997)
- Alleva DG, Kaser SB, Monroy MA, Fenton MJ and Beller DI.** IL-15 functions as a potent autocrine regulator of macrophage proinflammatory cytokine production: evidence for differential receptor subunit utilization associated with stimulation or inhibition. *J. Immunol.* 159: 2941-51 (1997)
- Alvarez B, Quinn LS, Busquets S, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM.** Direct effects of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) on murine skeletal muscle cell lines. Bimodal effects on protein metabolism. *Eur Cytokine Netw.* 12: 399-410 (2001)
- Alvarez B, Carbo N, Lopez-Soriano J, Drivdahl RH, Busquets S, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM, Quinn LS.** Effects of interleukin-15 (IL-15) on adipose tissue mass in rodent obesity models: evidence for direct IL-15 action on adipose tissue. *Biochim Biophys Acta.* 1570: 33-7 (2002)
- Alvarez B, Quinn LS, Busquets S, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM.** TNF-alpha modulates cytokine and cytokine receptors in C2C12 myotubes. *Cancer Lett.* 175: 181-5 (2002)
- Alzuhherri H, Chang KC.** Calcineurin activates NF-kappaB in skeletal muscle C2C12 cells. *Cell Signal.* 15: 471-8 (2003)
- American Thoracic Society and European Respiratory Society.** Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159: S1-40 (1999)
- Anderson JE, Bressler BH and Ovalle WK.** Functional regeneration in the hindlimb skeletal muscle of the mdx mouse. *J. Musc. Res. Cell. Motil.* 9: 499-515 (1988)
- Anderson DM, Johnson L, Glaccum MB, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Valentine V, Kirstein MN, Shapiro DN, Morris SW, et al.** Chromosomal assignment and genomic structure of IL15. *Genomics.* 25: 701-6 (1995a)

- Anderson DM, Kumaki S, Ahdieh M, Bertles J, Tometsko M, Loomis A, Giri J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, et al.** Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J. Biol. Chem.* 270: 29862-9 (1995b)
- Angiolillo AL, Kanegane H, Sgadari C, Reaman GH and Tosato G.** Interleukin-15 promotes angiogenesis in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233: 231-7 (1997)
- Anker SD, Coats AJ.** How to RECOVER from RENAISSANCE? The significance of the results of RECOVER, RENAISSANCE, RENEWAL and ATTACH. *Int J Cardiol.* 86: 123-30 (2002)
- Anker SD, Negassa A, Coats AJ, Afzal R, Poole-Wilson PA, Cohn JN, Yusuf S.** Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study. *Lancet.* 361: 1077-83 (2003)
- Anti M, Marra G, Armelao F, Bartoli GM, Ficarelli R, Percesepe A, De Vitis I, Maria G, Sofo L, Rapaccini GL.** Effect of omega-3 fatty acids on rectal mucosal cell proliferation in subjects at risk for colon cancer. *Gastroenterology.* 103: 883-91 (1992)
- Arbós J, López-Soriano FJ, Carbó N and Argilés JM.** Effects of tumour necrosis factor- α (cachectin) on glucose metabolism in the rat. Intestinal absorption and isolated enterocyte metabolism. *Mol. Cell. Biochem.* 112: 53-9 (1992)
- Ardite E, Sans M, Panes J, Romero FJ, Pique JM, Fernandez-Checa JC.** Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. *Lab Invest.* 80: 735-44 (2000)
- Ardite E, Barbera JA, Roca J, Fernandez-Checa JC.** Glutathione depletion impairs myogenic differentiation of murine skeletal muscle C2C12 cells through sustained NF-kappaB activation. *Am J Pathol.* 165: 719-28 (2004)
- Argilés JM and Azcón-Bieto J.** The metabolic environment of cancer. *Biol. Cell. Biochem.* 81: 3-17 (1988)
- Argilés JM, López-Soriano FJ, Evans RD and Williamson DH.** Interleukin-1 and lipid metabolism in the rat. *Biochem. J.* 259: 673-678 (1989a)
- Argilés JM, López-Soriano FJ, Wiggins D and Williamson DH.** Comparative effects of tumour necrosis factor- α (cachectin), interleukin-1 β , and tumour growth on amino acid metabolism in the rat in vivo. Absorption and tissue uptake of α -amino[1- 14 C] isobutyrate. *Biochem. J.* 261: 357-62 (1989b)
- Argilés JM and López-Soriano FJ.** The oxidation of leucine in tumour-bearing rats. *Biochem. J.* 268: 241-4 (1990a)
- Argilés JM and López-Soriano FJ.** Why do cancer cells have such a high glycolytic rate? *Med. Hypoth.* 32: 151-5 (1990b)
- Argilés JM, López-Soriano FJ.** The energy state of tumor-bearing rats. *J. Biol. Chem.* 266: 2978-2982 (1991)
- Argilés JM, García-Martínez C, Llovera M and López-Soriano FJ.** The role of cytokines in muscle wasting: its relation with cancer cachexia. *Med. Res. Rev.* 12: 637-652 (1992)
- Argilés JM and López-Soriano FJ.** The enzymatic activities of branched-chain amino acid catabolism in tumour-bearing rats. *Cancer Lett.* 61: 239-42 (1992)
- Argilés JM, Alvarez B and López-Soriano FJ.** The metabolic basis of cancer cachexia. *Med. Res. Rev.* 17: 477-98 (1997a)
- Argilés JM, López-Soriano J, Busquets S and López-Soriano FJ.** Journey from cachexia to obesity by TNF. *FASEB J.* 11:743-51. (1997b)

Argilés JM and López-Soriano FJ. Catabolic proinflammatory cytokines. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 1: 245-51 (1998)

Argilés JM, López-Soriano FJ and Pallarés-Trujillo. Ubiquitin and disease. Molecular Biology Intelligence Unit. Landes Company. Austin, Texas, USA. (1998)

Argilés JM and López-Soriano FJ. The role of cytokines in cancer cachexia. *Med. Res. Rev.* 19: 223-48 (1999)

Argiles JM, Alvarez B, Carbo N, Busquets S, Van Royen M, Lopez-Soriano FJ. The divergent effects of tumour necrosis factor-alpha on skeletal muscle: implications in wasting. *Eur Cytokine Netw.* 11: 552-9 (2000)

Argiles JM, Busquets S, Lopez-Soriano FJ. The role of uncoupling proteins in pathophysiological states. *Biochem Biophys Res Commun.* 293: 1145-52 (2002)

Ariapart P, Bergstedt-Lindqvist S, van Harmelen V, Permert J, Wang F, Lundkvist I. Resection of pancreatic cancer normalizes the preoperative increase of tumor necrosis factor alpha gene expression. *Pancreatology.* 2: 491-4 (2002)

Arpaci F, Yilmaz MI, Ozet A, Ayta H, Ozturk B, Komurcu S, Ozata M. Low serum leptin level in colon cancer patients without significant weight loss. *Tumori.* 88: 147-9 (2002)

Arstall MA, Sawyer DB, Fukazawa R and Kelly RA. Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes. The role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation. *Circ. Res.* 85: 829-40 (1999)

Atkins E. Fever: the old and the new. *J. Inf. Dis.* 149: 339-48 (1984)

Ayala A, Herdon CD, DeMaso CM, Ayala CA and Chaundry IH. The induction of accelerated thymic programmed cell death during polymicrobial sepsis. Control by corticosteroids but not tumor necrosis factor. *Shock.* 3: 259-67 (1995)

Azimi N, Brown K, Bamford RN, Tagaya Y, Siebenlist U and Waldmann TA. Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF-kappaB site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 2452-7 (1998)

B

Baan CC, Niesters HG, Metselaar HJ, Mol WM, Loonen EH, Zondervan PE, Tilanus HW, IJzermans JM, Schalm SW and Weimar W. Increased intra-graft IL-15 mRNA expression after liver transplantation. *Clin. Transplan.* 12: 212-8 (1998)

Baan CC, Knoop CJ, van Gelder T, Holweg CT, Niesters HG, Smeets TJ, van der Ham F, Zondervan PE, Maat LP, Balk AH and Weimar W. Anti-CD25 therapy reveals the redundancy of the intra-graft cytokine network after clinical heart transplantation. *Transplantation.* 67: 870-6 (1999)

Baarends EM, Schols AM, Mostert R and Wouters EF. Peak exercise response in relation to tissue depletion in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 10: 2807-13 (1997)

Baccino FM, Tessitore L, Bonelli G. Control of protein degradation and growth phase in normal and neoplastic cells. *Toxicol Pathol.* 12: 281-7 (1984)

Baccino FM, Tessitore L, Bonelli G, Isidoro C. Protein turnover states of tumour cells and host tissues in an experimental model. *Biomed Biochim Acta.* 45: 1585-90 (1986)

Bachmair A, Finley D and Varshavsky A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science.* 234: 179-86 (1986)

- Bachmair A and Varshavsky A.** The degradation signal in a short-lived protein. *Cell*. 56: 1019-32 (1989)
- Bagby GJ, Lang CH, Hargrove DM, Thompson JJ, Wilson LA and Spitzer JJ.** Glucose kinetics in rats infused with endotoxin-induced monokines or tumor necrosis factor. *Circ. Shock*. 24: 111-21 (1988)
- Bagby GJ, Lang CH, Skrepnik N and Spitzer JJ.** Attenuation of glucose metabolic changes resulting from TNF-alpha administration by adrenergic blockade. *Am J Physiol*. 262: R628-35 (1992)
- Baghdiguian S, Martin M, Richard I, Pons F, Astier C, Bourg N, Hay RT, Chemaly R, Halaby G, Loiselet J, Anderson LV, Lopez de Munain A, Fardeau M, Mangeat P, Beckmann JS and Lefranc G.** Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the IkappaB alpha/NF-kappaB pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat. Med.* 5: 503-11 (1999)
- Baglioni, C., Ruggiero, V., Latham, K. and Johnson, S.E.** Tumor necrosis factor and related cytokines. Bock, G. and Marsh, J., eds. John Wiley & Sons, Chichester. pp. 52-63 (1987)
- Baker E, Chen LZ, Smith CA, Callen DF, Goodwin R and Sutherland GR.** Chromosomal localization of the human tumor necrosis factor receptor genes. *Cytogen. Cell. Gen.* 57: 117-8 (1991)
- Balazs C, Kiss E.** Immunological aspects of the effect of pentoxifylline (Trental) (a brief review). *Acta Microbiol Immunol Hung.* 41: 121-6 (1994)
- Balducci L and Hardy C.** Cancer and malnutrition -a critical interaction: a review. *Am. J. Hematol.* 18: 91-103 (1985)
- Balkwill FR and Burke F.** The cytokine network. *Immunol. Today*. 10: 299-303 (1989)
- Bamford RN, Grant AJ, Burton JD, Peters C, Kurys G, Goldman CK, Brennan J, Roessler E and Waldmann TA.** The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 4940-4 (1994)
- Bamford RN, Battiata AP, Burton JD, Sharma H and Waldmann TA.** Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region /IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 2897-902 (1996)
- Bamford RN, DeFilippis AP, Azimi N, Kurys G and Waldmann TA.** The 5' untranslated region, signal peptide, and the coding sequence of the carboxyl terminus of IL-15 participate in its multifaceted translational control. *J. Immunol.* 160: 4418-26 (1998)
- Bar DRP, Rodenburg AJB, Koot RW and Amelik HGJ.** Exercise-induced muscle damage: recent developments. *Basic Appl. Myol.* 4: 5-16 (1994)
- Barbe P, Millet L, Larrouy D, Galitzky J, Berlan M, Louvet JP and Langin D.** Uncoupling protein-2 messenger ribonucleic acid expression during very-low-calorie diet in obese premenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 2450-3 (1998)
- Baron P, Galimberti D, Meda L, Prat E, Scarpini E, Conti G, Moggio M, Prella A and Scarlato G.** Synergistic effect of beta-amyloid protein and interferon gamma on nitric oxide production by C2C12 muscle cells. *Brain*. 123: 374-9 (2000)
- Barreiro E, Comtois AS, Mohammed S, Lands LC, Hussain SN.** Role of heme oxygenases in sepsis-induced diaphragmatic contractile dysfunction and oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 283: L476-84 (2002)
- Barreiro E, Gea J, Corominas JM, and Hussain SN.** Nitric oxide synthases and protein oxidation in the quadriceps femoris of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 29: 771-8 (2003)

- Bartlett DL, Charland S, Torosian MH.** Growth hormone, insulin, and somatostatin therapy of cancer cachexia. *Cancer*. 73: 1499-504 (1994)
- Bartlett DL, Charland SL and Torosian MH.** Reversal of tumor associated hyperglucanogemia as treatment for cancer cachexia. *Surgery*. 118: 87-97 (1995)
- Bassel-Duby R, Olson EN.** Role of calcineurin in striated muscle: development, adaptation, and disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 311: 1133-41 (2003)
- Bassonga E, Forest V, Pierre F, Bornet F, Perrin P, Meflah K and Menanteau J.** Cytokine mRNA expression in mouse colon: IL-15 mRNA is overexpressed and is highly sensitive to a fibre-like dietary component (short-chain fructo-oligosaccharides) in an Apc gene manner. *Cytokine*. 14: 243-6 (2001)
- Bazan JF.** Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol. Today*. 11: 350-4 (1990a)
- Bazan JF.** Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87: 6934-8 (1990b)
- Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR.** Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science*. 275: 1930-4 (1997)
- Beck SA and Tisdale MJ.** Production of lipolytic and proteolytic factors by a murine tumor-producing cachexia in the host. *Cancer Res*. 47: 5919-23 (1987)
- Beck SA, Tisdale MJ.** Effect of insulin on weight loss and tumour growth in a cachexia model. *Br J Cancer*. 59: 677-81 (1989)
- Beck SA, Mulligan HD and Tisdale MJ.** Lipolytic factor associated with murine and human cancer cachexia. *J. Natl. Cancer Inst*. 82: 1922-6 (1990)
- Beck SA, Smith KL, Tisdale MJ.** Anticachectic and antitumor effect of eicosapentaenoic acid and its effect on protein turnover. *Cancer Res*. 51: 6089-93 (1991)
- Beckman JS and Koppenol WH.** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 271: C1424-37 (1996)
- Beg AA and Baltimore D.** An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*. 274: 782-4 (1996)
- Begg RW.** Tumor-host relations. *Adv. Cancer Res*. 5: 1-54 (1958)
- Begum N and Ragolia L.** Effect to tumor necrosis factor on insulin action in cultured rat skeletal muscle cells. *Endocrinology*. 137: 2441-6 (1996a)
- Begum N, Ragolia L and Srinivasan M.** Effect of tumor necrosis factor- α on insulin-estimated mitogen-activated protein kinase cascade in cultured rat skeletal muscle cells. *Eur. J. Biochem*. 238: 214-20 (1996b)
- Behrens L, Bender A, Johnson MA and Hohlfeld R.** Cytotoxic mechanisms in inflammatory myopathies. Co-expression of Fas and protective Bcl-2 in muscle fibres and inflammatory cells. *Brain*. 120 : 929-38 (1997)
- Belizario JE, Katz M, Chenker E and Raw I.** Bioactivity of skeletal muscle proteolysis-inducing factors in the plasma proteins from cancer patients with weight loss. *Br. J. Cancer*. 63: 705-10 (1991)
- Bennegard K, Lindmark L, Eden E, Svaninger G and Lundholm K.** Flux of amino acids across the leg in weight-losing cancer-patients. *Cancer. Res*. 44:386-93 (1984)
- Bennet IL and Beeson PB.** Studies of the pathogenesis of fever. *J. Exp. Med*. 98: 477-92 (1953)

- Berard M, Brandt K, Bulfone-Paus S, Tough DF.** IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. *J Immunol.* 170: 5018-26 (2003). Erratum in: *J Immunol.* 171: 169 (2003)
- Bernstein IL, Taylor EM and Bentson KL.** TNF-induced anorexia and learned food aversions are attenuated by area postrema lesions. *Am. J. Physiol.* 260: R906-R910 (1991)
- Berra E, Diaz-Meco MT and Moscat J.** The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of Erk is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem.* 273: 10792-7 (1998). Erratum in: *J Biol Chem* 273: 16630 (1998)
- Beutler B and Cerami A.** Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N. Engl. J. Med.* 316: 379-85 (1987)
- Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R and Cerami A.** Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature.* 316: 552-4 (1985a)
- Beutler B, Milsark IW and Cerami A.** Cachectin/tumor necrosis factor: productions, distributions and metabolic fate in vivo. *J. Immunol.* 135: 3972-7 (1985b)
- Beutler B, Thompson P, Keyes J, Hagarty K and Crawford D.** Assay of a ribonuclease that preferentially hidrolises mRNAs containing cytokine-derived UA-rich instability sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152: 973-80 (1988)
- Beyaert R, Vanhaesebroeck B, Heyninck K, Boone E, De Valck D, Schulze-Osthoff K, Haegeman G, Van Roy F and Fiers W.** Sensitization of tumor cells to tumor necrosis factor action by the protein kinase inhibitor staurosporine. *Cancer Res.* 53: 2623-30 (1993)
- Beyaert R and Fiers W.** Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. *FEBS Lett.* 340: 9-16 (1994)
- Bhagwati S, Leung B, Shafiq SA and Ghatpande A.** Myotonic dystrophy: decreased levels of myotonin protein kinase (Mt-PK) leads to apoptosis in muscle cells. *Exp. Neurol.* 146: 277-81 (1997)
- Bielawska AE, Shapiro JP, Jiang L, Melkonyan HS, Piot C, Wolfe CL, Tomei LD, Hannun YA and Umansky SR.** Ceramide is involved in triggering of cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia and reperfusion. *Am. J. Pathol.* 151: 1257-63 (1997)
- Bielefeldt-Ohmann H, Marzo AL, Himbeck RP, Jarnicki AG, Robinson BW, Fitzpatrick DR.** Interleukin-6 involvement in mesothelioma pathobiology: inhibition by interferon alpha immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 40: 241-50 (1995)
- Billiau A and Vandekerckhove F.** Cytokines and their interaction with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. *Eur. J. Clin. Invest.* 21:559-73 (1991)
- Biral D, Sandri M and Jakubiec-Puka A.** The fate of dystrophin and some sings of apoptosis in the skeletal muscle work-overloaded in extension. *Basic Appl. Myol.* 8: 205-10 (1998)
- Biring MS, Fournier M, Ross DJ, Lewis MI.** Cellular adaptations of skeletal muscles to cyclosporine. *J Appl Physiol.* 84: 1967-75 (1998)
- Biswas G, Anandatheerthavarada HK, Zaidi M, Avadhani NG.** Mitochondria to nucleus stress signaling: a distinctive mechanism of NFkappaB/Rel activation through calcineurin-mediated inactivation of IkappaBbeta. *J Cell Biol.* 161: 507-19 (2003)
- Black BL, Olson EN.** Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 14: 167-96 (1998)

- Blauvelt A, Asada H, Klaus-Kovtun V, Altman DJ, Lucey DR, Katz SI.** Interleukin-15 mRNA is expressed by human keratinocytes Langerhans cells, and blood-derived dendritic cells and is downregulated by ultraviolet B radiation. *J Invest Dermatol.* 106: 1047-52 (1996)
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD.** Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 3: 1014-9 (2001)
- Bond U, Schlesinger MJ.** Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 5: 949-56 (1985)
- Boone E, Vandevoorde V, De Wilde G and Haegeman G.** Activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinases (MAPK) and p38 MAPK by tumor necrosis factor (TNF) is mediated through the death domain of the 55-kDa TNF receptor. *FEBS Lett.* 441: 275-80 (1998)
- Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ, Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG and Mann DL.** Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- α promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation.* 97: 1382-91 (1998)
- Bozzetti F, Ammatuna M, Migliavacca S, Bonalumi MG, Facchetti G, Pupa A, Terno G.** Total parenteral nutrition prevents further nutritional deterioration in patients with cancer cachexia. *Ann Surg.* 205: 138-43 (1987)
- Brennan MF.** Total parenteral nutrition in the cancer patient. *N. Engl. J. Med.* 305: 375 (1981)
- Brenner DA, Buck M, Feitelberg SP and Chojkier M.** Tumour necrosis factor- α inhibits albumin gene expression in a murine model of cachexia. *J. Clin. Invest.* 85: 248-55 (1990)
- Brentjens RJ, Latouche JB, Santos E, Marti F, Gong MC, Lyddane C, King PD, Larson S, Weiss M, Riviere I and Sadelain M.** Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat. Med.* 9: 279-86 (2003)
- Brinkman BM, Telliez JB, Schievella AR, Lin LL and Goldfeld AE.** Engagement of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 leads to ATF-2- and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent TNF- α gene expression. *J Biol Chem.* 274: 30882-6 (1999)
- Brooks SL, Neville AM, Rothwell NJ, Stock MJ and Wilson S.** Sympathetic activation of brown adipose tissue thermogenesis in cachexia. *Biosci. Rep.* 1: 509-517 (1981)
- Bruera E, Macmillan K, Kuehn N, Hanson J, MacDonald RN.** A controlled trial of megestrol acetate on appetite, caloric intake, nutritional status, and other symptoms in patients with advanced cancer. *Cancer.* 66: 1279-82 (1990)
- Bruton JD, Katz A, Westerblad H.** Insulin increases near-membrane but not global Ca²⁺ in isolated skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 3281-6 (1999)
- Buck M and Chojkier M.** Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. *EMBO J.* 15: 1753-65 (1996)
- Buck M, Houglum K and Chojkier M.** Tumor necrosis factor- α inhibits collagen α 1(I) gene expression and wound healing in a murine model of cachexia. *Am J Pathol.* 149: 195-204 (1996)
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X and Wang X.** Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 15: 269-90 (1999)
- Buerke M, Murohara T, Skurk C, Nuss C, Tomaselli K and Lefer AM.** Cardioprotective effect of insulin-like growth factor 1 in myocardial ischemia followed reperfusion. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 92: 8031-5 (1995)

Bulanova E, Budagian V, Pohl T, Krause H, Durkop H, Paus R and Bulfone-Paus S. The IL-15R alpha chain signals through association with Syk in human B cells. *J. Immunol.* 167: 6292-302 (2001)

Bulanova E, Budagian V, Orinska Z, Krause H, Paus R and Bulfone-Paus S. Mast cells express novel functional IL-15 receptor alpha isoforms. *J. Immunol.* 170: 5045-55 (2003)

Bulfield G, Siller WG, Wight PAL and Moore KJ. X-chromosome linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 1189-92 (1984)

Bulfone-Paus S, Ungureanu D, Pohl T, Lindner G, Paus R, Ruckert R, Krause H and Kunzendorf U. Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nat. Med.* 3: 1124-8 (1997)

Bulfone-Paus S, Bulanova E, Pohl T, Budagian V, Durkop H, Ruckert R, Kunzendorf U, Paus R and Krause H. Death deflected: IL-15 inhibits TNF-alpha-mediated apoptosis in fibroblasts by TRAF2 recruitment to the IL-15Ralpha chain. *FASEB J.* 13: 1575-85 (1999)

Bullo-Bonet M, García-Lorda P, López-Soriano FJ, Argilés JM and Salas-Salvadó J. Tumour necrosis factor, a key role in obesity? *FEBS Lett.* 451: 215-9 (1999)

Burdet L, de Muralt B, Schutz Y, Pichard C and Fitting JW. Administration of growth hormone to underweight patients with chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, randomized, controlled study. *Am J Respir Crit Care Med.* 156: 1800-6 (1997)

Burgess DH, Svensson M, Dandrea T, Grönlund K, Hammarquist F, Orrenius S and Cotgreave IA. Human skeletal muscle cytosols c-dependent activation of type-2 caspases and lack APAF-1. *Cell Death Differ.* 6: 256-61 (1999)

Bursch W, Paffe S, Putz B and Schulte-Hermann R. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis.* 11: 847-53 (1990)

Burt ME, Lowry SF, Gorschboth C and Brennan MF. Metabolic alterations in a non-cachectic animal tumor system. *Cancer.* 42: 2138-43 (1981)

Burton JD, Bamford RN, Peters C, Grant AJ, Kurys G, Goldman CK, Brennan J, Roessler E and Waldmann TA. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 4935-9 (1994)

Busquets S, Alvarez B, Llovera M, Agell N, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Branched-chain amino acids inhibit proteolysis in rat skeletal muscle: mechanisms involved. *J Cell Physiol.* 184: 380-4 (2000)

Busquets S, Alvarez B, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Branched-chain amino acids: a role in skeletal muscle proteolysis in catabolic states? *J Cell Physiol.* 191: 283-9 (2002)

Buzby GP, Mullen JL, Stein TP, Miller EE, Hobbs CL and Rosato EF. Host-tumor interaction and tumor supply. *Cancer.* 45: 2940-2949 (1980)

Byerley LO, Heber D, Bergman RN, Dubria M and Chi J. Insulin action and metabolism in patients with head and neck-cancer. *Cancer.* 67: 2900-6 (1991)

C

Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell.* 96: 611-4 (1999)

Cangiano C, Laviano A, Meguid MM, Mulieri M, Conversano L, Preziosa I and Rossi-Fanelli F. Effects of administration of oral branched-chain amino acids on anorexia and caloric intake in cancer patients. *J. Natl. Can. Inst.* 88: 550-2 (1996)

- Cannon JG.** Intrinsic and extrinsic factors in muscle aging. *Ann. NY Acad. Sci.* 854: 72-7 (1998)
- Cao S, Troutt AB and Rustum YM.** Interleukin 15 protects against toxicity and potentiates antitumor activity of 5-fluorouracil alone and in combination with leucovorin in rats bearing colorectal cancer. *Cancer Res.* 58: 1695-9 (1998a)
- Cao S, Black JD, Troutt AB and Rustum YM.** Interleukin 15 offers selective protection from irinotecan-induced intestinal toxicity in a preclinical animal model. *Cancer Res.* 58: 3270-4 (1998b)
- Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S and Cerami A.** Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of messenger-RNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 1670-4 (1986)
- Carbó N, Costelli P, Tessitore L, Bagby GJ, López-Soriano FJ, Baccino FM and Argilés JM.** Anti-tumour necrosis factor-alpha treatment interferes with changes in lipid metabolism in a tumour cachexia model. *Clin. Sci.* 87: 349-55 (1994)
- Carbo N, Lopez-Soriano J, Tarrago T, Gonzalez O, Llovera M, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM.** Comparative effects of beta2-adrenergic agonists on muscle waste associated with tumour growth. *Cancer Lett.* 115: 113-8 (1997)
- Carbo N, Lopez-Soriano J, Costelli P, Alvarez B, Busquets S, Baccino FM, Quinn LS, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM.** Interleukin-15 mediates reciprocal regulation of adipose and muscle mass: a potential role in body weight control. *Biochim Biophys Acta.* 1526: 17-24 (2001)
- Carbo N, Busquets S, van Royen M, Alvarez B, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM.** TNF-alpha is involved in activating DNA fragmentation in skeletal muscle. *Br J Cancer.* 86: 1012-6 (2002)
- Cardozo AK, Proost P, Gysemans C, Chen MC, Mathieu C and Eizirik DL.** IL-1beta and IFN-gamma induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice. *Diabetologia.* 46: 255-66 (2003)
- Carlson N and Rechsteiner M.** Microinjection of ubiquitin: intracellular distribution and metabolism in HeLa cells maintained under normal physiological function. *J. Cell. Biol.* 104: 537-46 (1987)
- Carmichael, M.J., Clague, M.B., Keir, M.J. and Johnston, I.D.** Protein turnover, synthesis and breakdown in patients with colorectal carcinoma. *Br. J. Surg.* 67: 736-9 (1980)
- Carnwath JW and Shotton DM.** Muscular dystrophy in the mdx mouse, histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscle. *J. Neurol. Sci.* 80: 39-54 (1987)
- Carpentier I, Declercq W, Malinin NL, Wallach D, Fiers W and Beyaert R.** TRAF2 plays a dual role in NF-kappaB-dependent gene activation by mediating the TNF-induced activation of p38 MAPK and IkappaB kinase pathways. *FEBS Lett.* 425: 195-8 (1998)
- Carraro U and Franceschi C.** Apoptosis of skeletal and cardiac muscles and physical exercise. *Aging.* 9: 19-34 (1997)
- Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA, Marien MJ, Boiani N, Grabstein K and Caligiuri MA.** Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 96: 2578-82 (1995)
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RJ, Green S, Fiore N and Williamson B.** An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 3666-70 (1975)
- Cary PD, King DS, Crane-Robinson C, Bradbury EM, Rabbini L, Goodwin G and Johns E.** Structural studies on two high-mobility-group proteins from calf thymus HMG-14 and HMG-20 (ubiquitin) and their interaction with DNA. *Eur. J. Biochem.* 112: 577-80 (1980)
- Casaburi R.** Rationale for anabolic therapy to facilitate rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 12: 407-18 (1998)

Castell JV, Gomez-Lecton MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, Fabre R and Heinrich PC. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Letters*. 242: 237-9 (1989)

Chakkalakal JV, Harrison MA, Carbonetto S, Chin E, Michel RN, Jasmin BJ. Stimulation of calcineurin signaling attenuates the dystrophic pathology in mdx mice. *Hum Mol Genet*. 13: 379-88 (2004)

Chakravarthy MV, Davis BS and Booth FW. IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *J. Appl. Physiol*. 89: 1365-79 (2000)

Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol*. 165: 1013-21 (2000)

Chance WT, Von Meyenfeldt M and Fischer JE. Serotonin depletion by 5,7-dihydroxytryptamine or para-chloroamphetamine does not affect cancer anorexia. *Pharmac. Biochem. Behav*. 18: 115-21 (1983)

Chance WT. Hypotalamic concentration and release of neuropeptide Y into microdialysates is reduced in anorectic tumor bearer rats. *Life Sci*. 54: 1869-1874 (1994)

Chance WT. Assesment of the feeding response of tumor-bearing rats to hypotalamic injection and infusion of neuropeptide Y. *Peptides*. 17: 797-801 (1996)

Chao TC, Van Alten PJ, Greager JA and Walters RJ. Steroid sex hormones regulate the release of tumor necrosis factor by macrophages. *Cell. Immunol*. 160: 43-9 (1995)

Chapman HA and Hibbs JB. Modulation of macrophage tumoricidal capability by components of normal serum: a central role for lipid. *Science*. 197: 282-5 (1977)

Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK and Varshavsky A. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science*. 243: 1576-83 (1989)

Chen CG, Malliaros J, Katerelos M, d'Apice AJ and Pearse MJ. Inhibition of NF-kappaB activation by a dominant-negative mutant of IkappaBalpha. *Mol Immunol*. 33: 57-61 (1996)

Chevalier V, Gachon F, Kwiatkowski F, Papon J, Cure H, Doly M, Madelmont JC and Chollet P. Is there a circadian rhythm of interleukin 15 in humans? *Pathol. Biol*. 51: 194-6 (2003)

Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R, Williams RS. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev*. 12: 2499-509 (1998)

Chlebowski RT, Bulcavage L, Grosvenor M, Oktay E, Block JB, Chlebowski JS, Ali I, Elashoff R. Hydrazine sulfate influence on nutritional status and survival in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 8: 9-15 (1990)

Chopra IJ, Solomon DH, Chopra U, Wu SY, Fischer DA and Nakamura Y. Pathways of metabolism of thyroid hormones. *Rec. Prog. Horm. Res*. 34: 521-67 (1978)

Chow CW, Rincon M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ. Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science*. 278: 1638-41 (1997)

Chu Q, Yang K, Wang A. [Research progress on oxidative stress and apoptosis] *Wei Sheng Yan Jiu*. 32: 276-9 (2003)

Chung IY, Kwon JB and Benveniste EN. Role of protein kinase-C activity in tumor necrosis factor-alpha gene expression. Involvement at the transcriptional level. *J. Immunol*. 149: 3894-902 (1992)

- Ciaraldi TP, Carter L, Mudaliar S, Kern PA and Henry RR.** Effects of tumor necrosis factor-alpha on glucose metabolism in cultured human muscle cells from nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Endocrinology*. 139: 4793-800 (1998)
- Ciechanover A and Schwartz AL.** How are substrates recognized by the ubiquitin-mediated proteolytic system? *Trends Biochem. Sci.* 14: 483-8 (1989)
- Ciechanover A.** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*. 79: 13-21 (1994)
- Ciechanover A, Orian A and Schwartz AL.** Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *BioEssays*. 22: 442-51 (2000)
- Cohen RA, Shepherd JT and Vanhoutte PM.** Inhibitory role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets. *Science*. 221: 273-4 (1983)
- Coley WB.** The treatment of malignant tumours by repeated inoculations of erysipelas; with a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci.* 105: 487-511 (1893)
- Combaret L, Ralliere C, Taillandier D, Tanaka K and Attaix D.** Manipulation of the ubiquitin-proteasome pathway in cachexia: pentoxifylline suppresses the activation of 20S and 26S proteasomes in muscles from tumor-bearing rats. *Mol. Biol. Reports*. 26: 95-101 (1999)
- Comstock KL, Krown KA, Page MT, Martin D, Ho P, Pedraza M, Castro EN, Nakajima N, Glembotski CC, Quintana PJ and Sabbadini RA.** LPS-induced TNF-alpha release from and apoptosis in rat cardiomyocytes: obligatory role for CD14 in mediating the LPS response. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30: 2761-75 (1998)
- Cookson S, Doherty DG, Todryk S, Gibbs P, Portmann B, O'Grady J, Rela M, Heaton N and Norris S.** Hepatic expression of IL-15 mRNA is associated with liver graft acceptance. *Transpl. Immunol.* 11: 39-48 (2003)
- Coombes RC, Rothwell NJ, Shah P and Stock MJ.** Changes in thermogenesis and brown fat activity in response to tumour necrosis factor in the rat. *Biosci. Rep.* 7: 791-9 (1987)
- Cooper and Butler,** 1989 Fundamental Immunology. Raven Press, New York pp.1034-1039
- Cosman D, Kumaki S, Ahdieh M, Eisenman J, Grabstein KH, Paxton R, DuBose R, Friend D, Park LS, Anderson D, et al.** Interleukin 15 and its receptor. *Ciba. Found. Symp.* 195: 221-9 (1995)
- Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T and Gutkind JS.** The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell*. 81: 1137-46 (1995)
- Cornelius P, Enerback S, Bjursell G, Olivecrona T and Pekala PH.** Regulation of lipoprotein lipase mRNA content in 3T3-L1 cells by tumor necrosis factor. *Biochem. J.* 249: 765-9 (1988)
- Cortez-Pinto H, Yang SQ, Lin HZ, Costa S, Hwang CS, Lane MD, Bagby G and Diehl AM.** Bacterial lipopolysaccharide induces uncoupling protein-2 expression in hepatocytes by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251: 313-9 (1998)
- Cortez-Pinto H, Zhi Lin H, Qi Yang S, Odwin Da Costa S and Diehl AM.** Lipids up-regulate uncoupling protein 2 expression in rat hepatocytes. *Gastroenterology*. 116: 1184-93 (1999)
- Costelli P, Tessitore L and Baccino FM.** Cancer cachexia: metabolic alterations and therapeutic approaches in an experimental model. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 2: 531-8 (1991)
- Costelli P, Carbó N, Tessitore L, Bagby GJ, López-Soriano FJ, Argilés JM and Baccino FM.** Tumor necrosis- α mediates changes in tissue protein turnover in a rat cancer cachexia model. *J. Clin. Invest.* 92: 2783 (1993)

Costelli P, Llovera M, Carbó N, García-Martínez C, López-Soriano FJ and Argilés JM. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) is unable to reverse cachexia in rats bearing an ascites hepatoma (Yoshida AH-130). *Cancer Lett.* 95: 33-8 (1995a)

Costelli P, Llovera M, García-Martínez C, Carbó N, López-Soriano FJ and Argilés JM. Enhanced leucine oxidation in rats bearing an ascites hepatoma (Yoshida AH-130) and its reversal by clenbuterol. *Cancer Lett.* 91: 73-8 (1995b)

Costelli P, Bossola M, Muscaritoli M, Grieco G, Bonelli G, Bellantone R, Doglietto GB, Baccino FM, Fanelli FR. Anticytokine treatment prevents the increase in the activity of ATP-ubiquitin- and Ca(2+)-dependent proteolytic systems in the muscle of tumour-bearing rats. *Cytokine.* 19: 1-5 (2002)

Couillard A, Maltais F, Saey D, Debigare R, Michaud A, Koechlin C, LeBlanc P, Prefaut C. Exercise-induced quadriceps oxidative stress and peripheral muscle dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 167: 1664-9 (2003)

Cowled PA, Leonardos L, Millard SH and Fritridge RA. Apoptotic Cell Death Makes a Minor Contribution to Reperfusion Injury in Skeletal Muscle in the Rat. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 21: 28-34 (2001)

Creasey AA, Reynolds MT and Laird W. Cures and partial regression of murine and human tumors by recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Res.* 46: 5687-90 (1986)

Creutzberg EC, Wouters EF, Vanderhoven-Augustin IM, Dentener MA, Schols AM. Disturbances in leptin metabolism are related to energy imbalance during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 162: 1239-45 (2000)

Cseh K and Beutler B. Alternative cleavage of the cachectin/tumor necrosis factor propeptide results in a larger, inactive form of secreted protein. *J. Biol. Chem.* 264: 6256-60 (1989)

Cullen MJ and Jaros E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol.* 77: 69-81 (1988)

Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A and Minna JD. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth-factors in human small-cell lung-cancer. *Nature.* 361: 823-25 (1985)

D

Dahn MS, Lange MP, Jacobs LA. Insulinlike growth factor 1 production is inhibited in human sepsis. *Arch Surg.* 123: 1409-14 (1988)

Dalla Libera L, Zennaro R, Sandri M, Ambrosio GB and Vescovo G. Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscles in chronic heart failure. *Am. J. Physiol.* 277: C982-C986 (1999)

Daneryd P, Svanberg E, Korner U, Lindholm E, Sandstrom R, Brevinge H, Pettersson C, Bosaeus I, Lundholm K. Protection of metabolic and exercise capacity in unselected weight-losing cancer patients following treatment with recombinant erythropoietin: a randomized prospective study. *Cancer Res.* 58: 5374-9 (1998)

Daneryd P. Epoetin alfa for protection of metabolic and exercise capacity in cancer patients. *Semin Oncol.* 29: 69-74 (2002)

Darlington GJ, Wilson DR and Lachman LB. Monocyte-conditioned medium, interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the acute phase response in human hepatoma cells in vitro. *J. Cell. Biol.* 103: 787-93 (1986)

Darnell JE Jr, Kerr IM and Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science.* 264: 1415-21 (1994)

- Das KC, Lewis-Molock Y and White CW.** Activation of NF-kappa B and elevation of MnSOD gene expression by thiol reducing agents in lung adenocarcinoma (A549) cells. *Am. J. Physiol.* 269: L588-602 (1995)
- Davis RJ.** MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci.* 19: 470-3 (1994)
- Davison FD, Groves M and Scaravilli F.** The effects of formalin fixation on the detection of apoptosis in human brain by in situ end labelling of DNA. *Histochem. J.* 27: 983-8 (1995)
- Dayer JM, Beutler B and Cerami A.** Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J. Exp. Med.* 162: 2163-8 (1985)
- De Moissac D, Mustapha S, Greenberg AH and Kirshenbaum LA.** Bcl-2 activates the transcription factor NFkappaB through the degradation of the cytoplasmic inhibitor IkappaBalpha. *J. Biol. Chem.* 273: 23946-51 (1998)
- De Wys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennet JM, Bertino JR, Cohen MH, Douglas HO Jr and Engstrom PF.** Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. *Am. J. Med.* 69: 491-497 (1980)
- Dear TN and Boehm T.** Diverse mRNA expression patterns of the mouse calpain genes Capn5, Capn6 and Capn11 during development. *Mech. Dev.* 89: 201-9 (1999)
- Decker T, Lohmann-Matthes ML and Gifford GE.** Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. *J. Immunol.* 138: 957-62 (1987)
- Declercq W, Denecker G, Fiers W and Vandenameele P.** Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: Involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J. Immunol.* 161: 390-9 (1998)
- de Godoy I, Donahoe M, Calhoun WJ, Mancino J and Rogers RM.** Elevated TNF-alpha production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 153: 633-7 (1996)
- Del Rey A and Besedowsky H.** Interleukin-1 affects glucose homeostasis. *Am. J. Physiol.* 253: R794-R798 (1987)
- Delafontaine P and Brink M.** The growth hormone and insulin-like growth factor 1 axis in heart failure. *Ann. Endocrinol.* 61: 22-6 (2000)
- Delling U, Tureckova J, Lim HW, De Windt LJ, Rotwein P, Molkentin JD.** A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression. *Mol Cell Biol.* 20: 6600-11 (2000)
- Dembic Z, Loetscher H, Cubler U, Pan YCE, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M and Lesslauer W.** Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. *Cytokine.* 2: 231-7 (1990)
- Denecker G, Vandenameele P, Grooten J, Penning LC, Declercq W, Beyaert R, Buurman WA, Fiers W.** Differential role of calcium in tumour necrosis factor-mediated apoptosis and secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in a T cell hybridoma. *Cytokine.* 9: 631-8 (1997)
- Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M and Davis RJ.** JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell.* 76: 1025-37 (1994)
- Dessi S, Batetta B, Anchisi C, Pani P, Costelli P, Tessitore L and Baccino FM.** Cholesterol metabolism during the growth of a rat ascites hepatoma (Yoshida AH-130). *Br. J. Cancer.* 66: 787-93 (1992a)

- Dessi S, Batetta B, Pulisci D, Spano O, Cherchi R, Lanfranco G, Tessitore L, Costelli P, Baccino FM and Panni P.** Altered pattern of lipid metabolism in patients with lung cancer. *Oncology*. 49: 436-41 (1992b)
- Dezube BJ, Pardee AB, Chapman B, Beckett LA, Korvick JA, Novick WJ, Chiurco J, Kasdan P, Ahlers CM, Ecto LT.** Pentoxifylline decreases tumor necrosis factor expression and serum triglycerides in people with AIDS. NIAID AIDS Clinical Trials Group. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 6: 787-94 (1993)
- Di Francia M, Barbier D, Mege JL and Orehek J.** Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 150: 1453-5 (1994)
- DiMauro S, Bonilla E, Davidson M, Hirano M and Schon EA.** Mitochondria in neuromuscular disorders. *Biochim. Biophys. Acta*. 1366: 199-210 (1998)
- Dimmeler S, Breitschopf K, Haendeler J and Zeiher AM.** Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J. Exp. Med*. 11: 1815-22 (1999)
- Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA Jr and O'Connor JV.** Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. *J. Exp. Med*. 163: 1433-50 (1986)
- Dipasquale B and Youle RJ.** Programmed cell death in heterokaryons. A study of the transfer of apoptosis between nuclei. *Am. J. Pathol*. 141: 1471-9 (1992)
- DiSanto JP, Muller W, Guy-Grand D, Fischer A and Rajewsky K.** Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 377-81 (1995)
- Doherty FJ, Osborn NU, Wassell JA, Heggie PE, László L and Mayer RJ.** Ubiquitin-protein conjugates accumulate in the lysosomal system of fibroblasts treated with cysteine proteinase inhibitors. *Biochemistry*. 263: 47-55 (1989)
- Doherty TM, Seder RA, Sher A.** Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol*. 156: 735-41 (1996)
- Dominov JA, Dunn JJ and Miller JB.** Bcl-2 expression identifies an early stage of myogenesis and promotes clonal expansion of muscle cells. *J. Cell. Biol*. 142: 537-44 (1998)
- Drapier JC and Wietzerbin J.** Interferon- γ reduces specific binding of tumor necrosis factor on murine macrophages. *J. Immunol*. 146: 1198-203 (1991)
- Drenth JP, Van Uum SH, Van Deuren M, Pesman GJ, Van der Ven-Jongekrijg J, Van der Meer JW.** Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-alpha and IL-1 beta production. *J Appl Physiol*. 79: 1497-503 (1995)
- Driscoll J and Goldberg AL.** The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1,500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins. *J. Biol. Chem*. 265: 4789-92 (1990)
- Dubois S, Magrangeas F, Lehours P, Raher S, Bernard J, Boisteau O, Leroy S, Minvielle S, Godard A and Jacques Y.** Natural splicing of exon 2 of human interleukin-15 receptor alpha-chain mRNA results in a shortened form with a distinct pattern of expression. *J. Biol. Chem*. 274: 26978-84 (1999)
- Dubois S, Mariner J, Waldmann TA and Tagaya Y.** IL-15R α recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells. *Immunity*. 17: 537-47 (2002)
- Dunn SE, Burns JL, Michel RN.** Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *J Biol Chem*. 274: 21908-12 (1999)

Dupont-Versteegden EE, Knox M, Gurley CM, Houle JD, Peterson CA. Maintenance of muscle mass is not dependent on the calcineurin-NFAT pathway. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282: C1387-95 (2002)

Duriez PJ and Shah GM. Cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase, a sensitive parameter to study cell death. *Biochem. Cell. Biol.* 75: 337-49 (1997)

E

Ebisui C, Tsujinaka T, Morimoto T, Kan K, Iijima S, Yano M, Kominami E, Tanaka K and Mondem M. Interleukin-6 induces proteolysis by activating intracellular proteases (cathepsins B and L, proteasome) in C2C12 myotubes. *Clin. Sci.* 89: 431-9 (1995)

Eck MJ, Beutler B, Kuo G, Merryweather JP and Sprang SR. Crystallization of trimeric recombinant human tumor necrosis factor (cachectin). *J. Biol. Chem.* 263: 2816-9 (1988)

Eda H, Tanaka Y, Ishitsuka H. 5'-Deoxy-5-fluorouridine improves cachexia by a mechanism independent of its antiproliferative action in colon 26 adenocarcinoma-bearing mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 29: 1-6 (1991)

Eddy LJ, Goeddel DV and Wong GH. Tumor necrosis factor-alpha pretreatment is protective in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 1056-9 (1992)

Edelbaum D, Mohamadzadeh M, Bergstresser PR, Sugamura K and Takashima A. Interleukin (IL)-15 promotes the growth of murine epidermal gamma delta T cells by a mechanism involving the beta- and gamma c-chains of the IL-2 receptor. *J. Invest. Dermatol.* 105: 837-43 (1995)

Edwards PD, Moldawer LL. Role of cytokines in the metabolic response to stress. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 1: 187-190 (1998)

Eid AA, Ionescu AA, Nixon LS, Lewis-Jenkins V, Matthews SB, Griffiths TL and Shale DJ. Inflammatory response and body composition in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 164: 1414-8 (2001)

Eisenberg, S. High density lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.* 25: 1017 (1984)

Eisenman J, Ahdieh M, Beers C, Brasel K, Kennedy MK, Le T, Bonnert TP, Paxton RJ and Park LS. Interleukin-15 interactions with interleukin-15 receptor complexes: characterization and species specificity. *Cytokine.* 20: 121-9 (2002)

Elahi D, McAloon-Dyke M, Fukagawa NK, Sclater AL, Wong GA, Shannon RP, Minaker KL, Miles JM, Rubenstein AH, Vandepol CJ. Effects of recombinant human IGF-I on glucose and leucine kinetics in men. *Am J Physiol.* 265: E831-8 (1993)

Elsasser A, Schlepper M, Klovekorn WP, Cai WJ, Zimmermann R, Muller KD, Strasser R, Kostin S, Gagel C, Munkel B, Schaper W and Schaper J. Hibernating myocardium, an incomplete adaptation to ischemia. *Circulation.* 96: 2920-31 (1997)

Emilie D, Wijdenes J, Gisselbrecht C, Jarrousse B, Billaud E, Blay JY, Gabarre J, Gaillard JP, Brochier J, Raphael M. Administration of an anti-interleukin-6 monoclonal antibody to patients with acquired immunodeficiency syndrome and lymphoma: effect on lymphoma growth and on B clinical symptoms. *Blood.* 84: 2472-9 (1994)

Endo T and Nadal-Ginard B. Reversal of myogenic terminal differentiation by SV40 large T antigen results in mitosis and apoptosis. *J. Cell. Sci.* 111: 1081-93 (1998)

Engelen MP, Schols AM, Baken WC, Wesseling GJ and Wouters EF. Nutritional depletion in relation to respiratory and peripheral skeletal muscle function in out-patients with COPD *Eur Respir J.* 7: 1793-7 (1994)

Engelen MP, Deutz NE, Wouters EF and Schols AM. Enhanced levels of whole-body protein turnover in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 162: 1488-92 (2000a)

Engelen MP, Schols AM, Does JD and Wouters EF. Skeletal muscle weakness is associated with wasting of extremity fat-free mass but not with airflow obstruction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr.* 71: 733-8 (2000b)

Engelen MP, Schols AM, Does JD, Deutz NE and Wouters EF. Altered glutamate metabolism is associated with reduced muscle glutathione levels in patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 161: 98-103 (2000c)

Engelen MP, Wouters EF, Deutz NE, Does JD, Schols AM. Effects of exercise on amino acid metabolism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 163: 859-64 (2001)

Engelmann H, Novick D and Wallach D. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell-surface tumor necrosis factor receptors. *J. Biol. Chem.* 265: 1531-6 (1990)

Erisman MD, Linnoila, RI, Hernandez O, Di Augustine RP and Lazarus LH. Human-lung small-cell carcinoma contains bombesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 316: 2379-85 (1982)

Espevik T, Figari IS, Shalaby MR, Lackides GA, Lewis GD, Shepard HM and Palladino MAJ. Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor- β . *J. Exp. Med.* 166: 571-6 (1987)

Evans RD and Williamson DH. Tumor necrosis factor- α (cachectin) mimics some of the effects of tumor growth on the disposal of a [14 C] lipid load in virgin, lactating and litter-removed rats. *Biochem. J.* 256: 1055-8 (1988)

Evans RD, Argilés JM and Williamson DH. Metabolic effects of tumor necrosis factor- α (cachectin) and interleukin 1. *Clin. Sci.* 77: 357-64 (1989)

F

Facchinetti F, Del Giudice E, Furegato S, Passarotto M, Leon A. Cannabinoids ablate release of TNF α in rat microglial cells stimulated with lipopolysaccharide. *Glia.* 41: 161-8 (2003)

Faggioni R, Shigenaga J, Moser A, Feingold KR and Grunfeld C. Induction of UCP2 gene expression by LPS: a potential mechanism for increased thermogenesis during infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244: 75-8 (1998)

Fahrbach SE and Schwartz LM. Localization of immunoreactive ubiquitin in the nervous system of the *Manduca sexta* moth. *J. Comp. Neurol.* 343: 464-82 (1994)

Fairbairn DW, Olive PL and O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339: 37-59 (1995)

Falconer JS, Fearon KC, Plester CE, Ross JA, Carter DC. Cytokines, the acute-phase response, and resting energy expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer. *Ann Surg.* 219: 325-31 (1994)

Fan ST, Lo CM, Lai EC, Chu KM, Liu CL and Wong J. Perioperative nutritional support in patients undergoing hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 331: 1547-52 (1994)

Fan J, Molina PE, Gelato MC, Lang CH. Differential tissue regulation of insulin-like growth factor-I content and binding proteins after endotoxin. *Endocrinology.* 134: 1685-92 (1994)

- Fan J, Char D, Bagby GJ, Gelato MC and Lang CH.** Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins by tumor necrosis factor. *Am J Physiol.* 269: R1204-12 (1995)
- Fang CH, Wang JJ, Hobler S, Li BG, Fischer JE and Hasselgren PO.** Proteasome blockers inhibit protein breakdown in skeletal muscle after burn injury in rats. *Clin. Sci.* 95: 225-33 (1998)
- Fariss MW, Reed DJ.** High-performance liquid chromatography of thiols and disulfides: dinitrophenol derivatives. *Methods Enzymol.* 143: 101-9 (1987)
- Fearon KCH, Hansell DT, Preston T, Plumb JA, Davies J, Shapiro D, Shenkin A, Calman KC and Burns HJG.** Influence of whole body protein turnover rate on resting energy expenditure in patients with cancer. *Cancer Res.* 48: 2590-5 (1988)
- Fearon KCH, Falconer JS, Slater C, McMillan DC, Ross JA and Preston T.** Albumin synthesis rates are not decreased in hypoalbuminemic cachectic cancer patients with an ongoing acute phase protein response. *Ann. Surg.* 227: 249-54 (1998)
- Fehniger TA, Carson WE and Caligiuri MA.** Costimulation of human natural killer cells is required for interferon gamma production. *Transplant. Proc.* 31: 1476-8 (1999a)
- Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, VanDeusen JB, Whitman SP, Cooper MA, Suzuki K, Wechser M, Goodsaid F and Caligiuri MA.** Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J. Immunol.* 162: 4511-20 (1999b)
- Fehniger TA and Caligiuri MA.** Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood.* 97: 14-32 (2001)
- Fehniger TA, Suzuki K, Ponnappan A, VanDeusen JB, Cooper MA, Florea SM, Freud AG, Robinson ML, Durbin J and Caligiuri MA.** Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 193: 219-31 (2001a)
- Fehniger TA, Suzuki K, VanDeusen JB, Cooper MA, Freud AG and Caligiuri MA.** Fatal leukemia in interleukin-15 transgenic mice. *Blood Cells. Mol. Dis.* 27: 223-30 (2001b)
- Fehniger TA, Cooper MA and Caligiuri MA.** Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13: 169-83 (2002)
- Fehsel K, Kröncke KL, Meyer KL, Huber H, Wahn V and Kolb-Bachofen V.** Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J. Immunol.* 155: 2858-65 (1995)
- Feingold KR and Grunfeld C.** Tumor necrosis factor-alpha stimulates hepatic lipogenesis in the rat in vivo. *J. Clin. Invest.* 80: 184-90 (1987)
- Fenselau A, Wallis K and Morris HP.** Acetoacetate coenzyme A transferase activity in rat hepatomas. *Cancer Res.* 35: 2315-20 (1975)
- Fernandez C, Sainz RD.** Pathways of protein degradation in L6 myotubes. *Proc Soc Exp Biol Med.* 214: 242-7 (1997)
- Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, Garcia-Ruiz C, Colell A.** Mitochondrial glutathione: importance and transport. *Semin Liver Dis.* 18: 389-401 (1998)
- Fernstrom JD and Wurtman RJ.** Brain serotonin content: physiological dependence on plasma tryptophan levels. *Science.* 173: 149 (1971)
- Ferrari-Lacraz S, Zheng XX, Kim YS, Li Y, Maslinski W, Li XC and Strom TB.** An antagonist IL-15/Fc protein prevents costimulation blockade-resistant rejection. *J. Immunol.* 167: 3478-85 (2001)

- Fidzianska A, Goebel HH and Warlo I.** Acute infantile spinal muscular atrophy. Muscle apoptosis as a proposed pathogenetic mechanism. *Brain*. 113: 433-45 (1990)
- Fidzianska A and Goebel HH.** Human ontogenesis. 3. Cell death in fetal muscle. *Acta Neuropathol*. 81: 572-7 (1991)
- Fidzianska A.** Apoptosis in human embryonic and diseased skeletal muscle. *Basic Appl. Myol*. 6: 261-4 (1996)
- Fiers W, Brouckaert P, Devos R, Franssen L, Leroux-Roels G, Remaut E, Suffys P, Tavernier J, Van der Heyden J and Van Roy F.** Molecular Biology of Homo sapiens. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York. pp. 587-95 (1986)
- Fiers W.** Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett*. 285: 199-212 (1991a)
- Fiers W.** Tumor necrosis factors: structure, function, and mechanisms of action. Aggarwal, B.B. and Vilcek, J., eds. Marcel Dekker, New York. (1991b)
- Fimia GM, Gottifredi V, Bellei B, Ricciardi MR, Tafuri A, Amati P and Maione R.** The activity of differentiation factors induces apoptosis in polyomavirus large T-expressing myoblasts. *Mol. Biol. Cell*. 9: 1449-63 (1998)
- Finley D, Özkaynak E and Varshavsky A.** The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperature, starvation and other stresses. *Cell*. 48: 1035-46 (1987)
- Finley D, Bartel B and Varshavsky A.** The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature*. 338: 394-401 (1989)
- Finley D and Chau V.** Ubiquitination. *Annu. Rev. Cell Biol*. 7: 25-69 (1991)
- Fischer D, Gang G, Pritts T and Hasselgren PO.** Sepsis-induced muscle proteolysis is prevented by a proteasome inhibitor in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 270: 215-21 (2000)
- Fischer JE and Hasselgren PO.** Cytokines and glucocorticoids in the regulation of the "hepato-skeletal muscle axis" in sepsis. *Am. J. Surg*. 161: 266-71 (1991)
- Fisher CJ Jr, Agosti JM, Opal CM, Lowry SF, Balk CA, Sadoff JC, Abraham E, Schein RM, Benjamin E.** Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein. *N. Engl. J. Med*. 334: 1697-702 (1996)
- Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR.** Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature*. 352: 803-7 (1991)
- Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin M, Surwitt R, Ricquier D and Warden C.** Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat. Genet*. 15: 269-72 (1997)
- Fliers JS and Maratos-Flier E.** Obesity and the hypothalamus novel peptides for novel pathways. *Cell*. 92: 437-440 (1998)
- Flores EA, Bistrrian BR, Pomposelli JJ, Dinarello CA, Blackburn GL and Istfan NW.** Infusion of tumor necrosis factor/cachectin promotes muscle catabolism in the rat. A synergistic effect with interleukin-1. *J. Clin. Invest*. 83: 1614-1622 (1989)
- Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA.** Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev*. 17: 481-517 (1996)
- Florini JR.** Hormonal control of muscle growth. *Muscle Nerve*. 10: 577-98 (1987)

Fong Y, Moldawer LL, Morano M, Wei H, Barber A, Manogue K, Tracey KJ, Kuo G, Fischman DA, Cerami A, Lowry SF. Cachectin/TNF or IL-1 α induces cachexia with redistribution of body proteins. *Am. J. Physiol.* 256: R659-R665 (1989)

Fransen L, Van der Heyden J, Ruyschaert R and Fiers W. Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon- γ on a variety of normal and transformed human cell lines. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 4: 419-24 (1986)

Franssen FM, Wouters EF, Schols AM. The contribution of starvation, deconditioning and ageing to the observed alterations in peripheral skeletal muscle in chronic organ diseases. *Clin Nutr.* 21: 1-14 (2002)

Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J and Saklatvala J. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell.* 78: 1039-49 (1994)

Friedman JM. Leptin, leptin receptors, and the control of body weight. *Nutr. Rev.* 56: 38-46 (1998)

Froesch ER, Schmid C, Schwander J, Zapf J. Actions of insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol.* 47: 443-67 (1985)

Frost RA, Lang CH and Gelato MC. Transient exposure of human myoblasts to tumor necrosis factor- α inhibits serum and insulin-like growth factor-I stimulated protein synthesis. *Endocrinology.* 138: 4153-9 (1997)

Fryburg DA, Barrett EJ. Physiological effects and potential applications of GH and IGF-I. *Diabetes Nutr Metab.* 12: 329-36 (1999)

Fryburg DA, Gelfand RA, Barrett EJ. Growth hormone acutely stimulates forearm muscle protein synthesis in normal humans. *Am J Physiol.* 260: E499-504 (1991)

Fujimoto-Ouchi K, Tamura S, Mori K, Tanaka Y, Ishitsuka H. Establishment and characterization of cachexia-inducing and -non-inducing clones of murine colon 26 carcinoma. *Int J Cancer.* 61: 522-8 (1995)

Fulks RM, Li JB and Goldberg AL. Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *J. Biol. Chem.* 250: 290-8 (1975)

Furmanczyk PS and Quinn LS. Interleukin-15 increases myosin accretion in human skeletal myogenic cultures. *Cell. Biol. Int.* 27: 845-51 (2003)

Furuno K and Goldberg AL. The activation of protein degradation in muscle by Ca²⁺ or muscle injury does not involve a lysosomal mechanism. *Biochem. J.* 237: 859-64 (1986)

G

Gaggero A, Azzarone B, Andrei C, Mishal Z, Meazza R, Zappia E, Rubartelli A and Ferrini S. Differential intracellular trafficking, secretion and endosomal localization of two IL-15 isoforms. *Eur. J. Immunol.* 29: 1265-74 (1999)

Gamard CJ, Dbaibo GS, Liu B, Obeid LM and Hannun YA. Selective involvement of ceramide in cytokine-induced apoptosis. Ceramide inhibits phorbol ester activation of nuclear factor kappaB. *J Biol Chem.* 272: 16474-81 (1997)

García-Martínez C, Agell N, Llovera M, López-Soriano FJ and Argilés JM. Tumour necrosis factor- α increases the ubiquitination of rat skeletal muscle proteins. *FEBS Lett.* 323: 211-4 (1993a)

- García-Martínez C, Llovera M, Lopez-Soriano FJ and Argilés JM.** The effects of endotoxin administration on blood amino acid concentrations: similarities with sepsis. *Cell. Mol. Biol.* 39: 537-42 (1993b)
- García-Martínez C, Llovera M, Agell N, López-Soriano FJ and Argilés JM.** Ubiquitin gene expression in skeletal muscle is increased by tumour necrosis factor-alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 682-6. (1994a)
- García-Martínez C, López-Soriano FJ and Argilés JM.** Interleukin-6 does not activate protein breakdown in rat skeletal muscle. *Cancer Lett.* 76: 1-4 (1994b)
- García-Martínez C, Llovera M, Lopez-Soriano FJ, del Santo B and Argilés JM.** Lipopolysaccharide (LPS) increases the in vivo oxidation of branched-chain amino acids in the rat: a cytokine-mediated effect. *Mol. Cell. Biochem.* 148: 9-15 (1995)
- García-Martínez C,** Mecanismos moleculares implicados en el desgaste muscular durante la caquexia asociada al crecimiento tumoral. *Tesis Doctoral.* 122-30 (1995)
- Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Calvo M, Enrich C, Fernandez-Checa JC.** Defective TNF-alpha-mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *J Clin Invest.* 111: 197-208 (2003)
- Garlick PJ, Millward DJ, James WP, Waterlow JC.** The effect of protein deprivation and starvation on the rate of protein synthesis in tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta.* 414: 71-84 (1975)
- Garlick PJ and Grant I.** Amino acid infusion increases the sensitivity of muscle protein synthesis in vivo to insulin. Effect of branched-chain amino acids. *Biochem. J.* 254: 579-84 (1988)
- Gase K, Korobko VG, Wisniewski HG, Le J, Dobrynin VN, Filippov SA, Gutsche W, Maksimova YN, Schlott B, Shingarova LN, Vilcek J and Behnke D.** Critical role of the C-terminus in the biological activities of human tumour necrosis factor-alpha. *Immunol.* 71: 368-371 (1990)
- Gasic S, Tian B and Green A.** Tumor necrosis factor alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations. *J Biol Chem.* 274: 6770-5 (1999)
- Gausung K and Barkardottir R.** Structure and expression of ubiquitin genes in higher plants. *Eur. J. Biochem.* 158: 57-62 (1986)
- Gavrieli Y, Sherman Y and Ben-Sasson SA.** Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* 119: 493-501 (1992)
- Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL, Leber TM, Mangan M, Miller K, Nayee P, Owen K, Patel S, Thomas W, Wells G, Wood LM and Woolley K.** Processing of tumor necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature.* 370: 555-7 (1994)
- Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements JM, Crimmin M, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA and Gilbert R.** Matrix metalloproteinases and processing of pro-TNF-alpha. *J. Leukoc. Biol.* 57: 774-7 (1995)
- Gehr G, Braun T and Lesslauer W.** Cytokines, receptors and inhibitors. *Clin. Invest.* 79: 64-9 (1992)
- Gibbs J and Smith JP.** Effect of brain-peptides on satiety. In: Obesity. Eds. Björntorp, P., Brodoff, B.N., J.B. Lippincott Company, Philadelphia. pp. 399-410 (1992)
- Girard D, Paquet ME, Paquin R and Beaulieu AD.** Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood.* 88: 3176-84 (1996)

- Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, Namen A, Park LS, Cosman D and Anderson D.** Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* 13: 2822-30 (1994)
- Giri JG, Kumaki S, Ahdieh M, Friend DJ, Loomis A, Shanebeck K, DuBose R, Cosman D, Park LS and Anderson DM.** Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO J.* 14: 3654-63 (1995)
- Giroir BP, Horton JW, White DJ, McIntyre KL and Lin CQ.** Inhibition of tumor necrosis factor prevents myocardial dysfunction during burn shock. *Am. J. Physiol.* 267: H118-24 (1994)
- Giurisato E, Sandri M, Sandri C, Zuin R, Ancona GG and Cantini M.** Proliferating myoblasts transfected with FasL cDNA can escape from apoptosis. *Basic Appl. Myol.* 8: 447-51 (1998)
- Glickman MG.** Getting in and out of the proteasome. *Cell Dev. Biol.* 11: 149-58 (2000)
- Glotzer M, Murray AW and Kirschener MW.** Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature.* 349: 132-8 (1991)
- Gobe G, Willgoss D, Hogg D, Schoch E and Endre Z.** Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* 56: 1299-304 (1999)
- Goldberg AL, Kettelhut IC, Furuno K, Fagan JM and Baracos V.** Activation of protein breakdown and prostaglandin E₂ production in rat skeletal muscle in fever is signaled by a macrophage product distinct from interleukin-1 or other known monokines. *J. Clin. Invest.* 81: 1378-83 (1988)
- Goldberg AL and Rock KL.** Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature.* 357: 375-9 (1992)
- Goldspink DF.** Exercise-related changes in protein turnover in mammalian striated muscle. *J Exp Biol.* 160: 127-48 (1991)
- Goldberg RM, Loprinzi CL, Mailliard JA, O'Fallon JR, Krook JE, Ghosh C, Hestorff RD, Chong SF, Reuter NF, Shanahan TG.** Pentoxifylline for treatment of cancer anorexia and cachexia? A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol.* 13: 2856-9 (1995)
- Goldfeld AE, Tsai E, Kincaid R, Belshaw PJ, Schrieber SL, Strominger JL, Rao A.** Calcineurin mediates human tumor necrosis factor alpha gene induction in stimulated T and B cells. *J Exp Med.* 180: 763-8 (1994)
- Goldstein DJ, Oz MC, Rose EA, Fisher P and Michler RE.** Experience with heart transplantation for cardiac tumors. *J. Heart Lung Transplant.* 14: 382-6 (1995)
- Gomes-Marcondes MC, Tisdale MJ.** Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett.* 180: 69-74 (2002)
- Goodlad GAJ, Tee MK and Clark CM.** Leucine oxidation and protein degradation in the extensor digitorum longus and soleus of the tumor-bearing host. *Biochem. Med.* 23: 143-7 (1981)
- Goodman MN.** Tumor necrosis factor induces skeletal muscle protein breakdown in rats. *Am. J. Physiol.* 260: E727-E730 (1991)
- Goodwin RG, Anderson D, Jerzy R, Davis T, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA and Smith CA.** Molecular cloning and expression of the type 1 and type 2 murine receptors for tumor necrosis factor. *Mol. Cell. Biol.* 11: 3020-6 (1991)
- Gordon A, Hultman E, Kaijser L, Kristjansson S, Rolf CJ, Nyquist O, Sylven C.** Creatine supplementation in chronic heart failure increases skeletal muscle creatine phosphate and muscle performance. *Cardiovasc Res.* 30: 413-8 (1995)

Gosker HR, Wouters EF, van der Vusse GJ and Schols AM. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease and chronic heart failure: underlying mechanisms and therapy perspectives. *Am J Clin Nutr.* 71: 1033-47 (2000)

Gosker HR, Engelen MP, van Mameren H, van Dijk PJ, van der Vusse GJ, Wouters EF and Schols AM. Muscle fiber type IIX atrophy is involved in the loss of fat-free mass in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr.* 76: 113-9 (2002)

Gottlieb RA, Bureson KO, Kloner RA, Babior B and Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* 94: 1621-8 (1994)

Goy JJ, Stauffer JC, Deruaz JP, Gillard D, Kaufmann U, Kuntzer T, Kappenberger L. Myopathy as possible side-effect of cyclosporin. *Lancet.* 24: 1446-7 (1989)

Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, Beers C, Richardson J, Schoenborn MA, Ahdieh M, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science.* 264: 965-8 (1994)

Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, Bringman TS, Henzel WJ, Jarret JA, Leung DW, Moffat B, Ng P, Svederky LP, Palladino MA and Nedwin GE. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumor necrosis factor activity. *Nature.* 312: 721-4 (1984)

Green DR and Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281: 1309-12 (1998)

Greiwe JS, Cheng B, Rubin DC, Yarasheski KE, Semenkovich CF. Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor alpha in frail elderly humans. *FASEB J.* 15: 475-82 (2001)

Grunfeld C and Feingold KR. The metabolic effects of tumor necrosis factor and other cytokines. *Biotherapy.* 3: 143-58 (1991a)

Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, Pollack A, Moser A, Friedman J and Feingold KR. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J. Clin. Invest.* 97: 2152-7 (1996)

Guarino LA. Identification of a viral gene encoding a ubiquitin-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 409-13 (1990)

Gulve EA, Dice JF. Regulation of protein synthesis and degradation in L8 myotubes. Effects of serum, insulin and insulin-like growth factors. *Biochem J.* 260: 377-87 (1989)

Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang CY and Baldwin AS Jr. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science.* 289: 2363-6 (2000)

Guy-Grand D and Vassalli P. Gut intraepithelial T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 247-52 (1993)

H

Haas AL and Riley DA. The dynamics of ubiquitin pools within skeletal muscle. In: The ubiquitin system. Schlesinger and Hershko Eds. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp. 178-85 (1988)

Haas A, Reback PM, Pratt G and Rechsteiner M. Ubiquitin-mediated degradation of histone H3 does not require the substrate-binding ubiquitin protein ligase, E3, or attachment of polyubiquitin chains. *J. Biol. Chem.* 265: 21664-9 (1990)

Haas AL, Baboshina O, Williams B and Schwartz LM. Coordinated induction of the ubiquitin conjugation pathway accompanies the developmentally programmed death of insect skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 270: 9407-12 (1995)

Hachiya J and Kazui H. Studies of histological and molecular biological changes after graded periods of ischemia-reperfusion in mouse skeletal muscle. *Basic Appl. Myol.* 6: 302A (1996)

- Hack AA, Ly CT, Jiang F, Clendenin CJ, Sigrist KS, Wollmann RL and McNally EM.** Gamma-sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. *J. Cell. Biol.* 142: 1279-87 (1998)
- Haliday EM, Ramesha CS and Ringold G.** TNF influences c-fos via a novel pathway requiring conversion of arachidonic acid to lipoxygenase metabolite. *EMBO J.* 10: 109-15 (1991)
- Hall-Angeras M, Angeras U, von Allmen D, Higashiguchi T, Zamir O, Hasselgren PO, Fischer JE.** Influence of sepsis in rats on muscle protein turnover in vivo and in tissue incubated under different in vitro conditions. *Metabolism.* 40: 247-51 (1991)
- Hallahan DE, Spriggs DR, Beckett MA, Kufe DW and Weichselbaum RR.** Increased tumor necrosis factor α mRNA after cellular exposure to ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 104-7 (1989)
- Hambrecht R, Adams V, Gielen S, Linke A, Möbius-Winkler S, Yu J, Niebauer J, Jiang H, Fiehn E and Schuler G.** Exercise intolerance in patients with chronic heart failure and increased expression of inducible nitric oxide synthase in the skeletal muscle. *J. Am. Coll. Cardiol.* 33: 174-79 (1999)
- Han HQ, Furuno QF and Goldberg AL.** The activation of the ATP-dependent proteolytic system in skeletal muscle during denervation atrophy and fasting. *Federation Proc.* 2: A564 (Abstract) (1988)
- Han HM, Kolhatkar AA, Marino MW, Manchester KM and Donner DB.** Identification, characterization, and homologous up-regulation of latent (cryptic) receptors for tumor necrosis factor- α in rat liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 265: 18590-4 (1990)
- Han J, Thompson P, Beutler B.** Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. *J Exp Med.* 72: 391-4 (1990)
- Han J, Lee JD, Bibbs L and Ulevitch RJ.** A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.* 265: 808-11 (1994)
- Hanada T, Toshinai K, Kajimura N, Nara-Ashizawa N, Tsukada T, Hayashi Y, Osuye K, Kangawa K, Matsukura S and Nakazato M.** Anti-cachectic effect of ghrelin in nude mice bearing human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 301: 275-9 (2003)
- Hanisch UK, Lyons SA, Prinz M, Nolte C, Weber JR, Kettenmann H and Kirchhoff F.** Mouse brain microglia express interleukin-15 and its multimeric receptor complex functionally coupled to Janus kinase activity. *J. Biol. Chem.* 272: 28853-60 (1997)
- Hannan WJ, Cowen SJ, Plester CE, Fearon KC, deBeau A.** Comparison of bio-impedance spectroscopy and multi-frequency bio-impedance analysis for the assessment of extracellular and total body water in surgical patients. *Clin Sci (Lond).* 89: 651-8 (1995)
- Haranaka K, Satomi N and Sakurai A.** Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF) against transplanted murine tumors and heterotransplanted human tumors in nude mice. *Int. J. Cancer.* 34: 263-7 (1984)
- Harper JM, Soar JB, Buttery PJ.** Changes in protein metabolism of ovine primary muscle cultures on treatment with growth hormone, insulin, insulin-like growth factor I or epidermal growth factor. *J Endocrinol.* 112: 87-96 (1987)
- Harrington D, Chua TP, Coats AJ.** The effect of salbutamol on skeletal muscle in chronic heart failure. *Int J Cardiol.* 73: 257-65 (2000)
- Hasselgren PO and Fischer JE.** Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. *Ann. Surg.* 233: 9-17 (2001)

- Haunstetter A and Izumo S.** Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ. Res.* 82: 1111-29 (1998)
- Heffner JE and Repine JE.** Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis.* 140: 531-54 (1989)
- Heinemeyer W, Kleinschmidt JA, Saidowsky J, Escher C and Wolf DH.** Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *EMBO J.* 10: 555-62 (1991)
- Heinrichs SC, Menzaghi F and Koob GF.** Neuropeptide-Y induced feeding and its control. *Vitam. Horm.* 54: 51-66 (1998)
- Helliwell TR, Wilkinson A, Griffithst RD, McClelland P, Palmer TEA and Bone JM.** Muscle fiber atrophy in critically ill patients is associated with the loss of myosin filaments and the presence of lysosomal enzymes and ubiquitin. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 24: 507-17 (1998)
- Hengge UR, Baumann M, Maleba R, Brockmeyer NH, Goos M.** Oxymetholone promotes weight gain in patients with advanced human immunodeficiency virus (HIV-1) infection. *Br J Nutr.* 75: 129-38 (1996)
- Hepburn A, Boeynaems JM, Fiers W and Dumont JE.** Modulation of tumor necrosis factor- α cytotoxicity in L929 cells by bacterial toxins, hydrocortisone and inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149: 815-22 (1987)
- Heron A, Pollard H, Dessi F, Moreau J, Lasbennes F, Ben-Ari Y and Charriaut-Marlangue C.** Regional variability in DNA fragmentation after global ischemia evidenced by combined histological and gel electrophoresis observation in the rat brain. *J. Neurochem.* 61: 1973-6 (1993)
- Hershko A.** The ubiquitin pathway for protein degradation. *Trends Biochem. Sci.* 16: 265-8 (1991)
- Hershko A and Ciechanover A.** The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 761-807 (1992)
- Heunks LM, Vina J, van Herwaarden CL, Folgering HT, Gimeno A and Dekhuijzen PN.** Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol.* 277: R1697-704 (1999)
- Higginbotham MB, Morris KG, Conn EH, Coleman RE and Cobb FR.** Determinants of variable exercise performance among patients with severe left ventricular dysfunction. *Am. J. Cardiol.* 51: 52-60 (1983)
- Hightower LE.** Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell.* 66: 191-7 (1991)
- Higuchi M. and Aggarwal BB.** TNF induces internalization of the p60 receptor and shedding of the p80 receptor. *J. Immunol.* 152: 3550-8 (1994)
- Hikida RS, van Nostran S, Murray JD, Staron RS, Gordon SE and Kraemer WJ.** Myonuclear loss in atrophied soleus muscle fibres. *Anat. Rec.* 247: 350-4 (1997)
- Hill MR and McCallum RE.** Identification of tumor necrosis factor as a transcriptional regulator of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene following endotoxin treatment of mice. *Infect. Immun.* 60: 4040-50 (1992)
- Himmler A, Maurer-Fogy I, Krönke M, Scheurich P, Pfizenmaier K, Lantz M, Olsson I, Hauptmann R, Stratowa C and Adolf GR.** Molecular cloning and expression of human and rat tumor necrosis factor receptor chain (p60) and its soluble derivative, tumor necrosis factor-binding protein. *DNA Cell Biol.* 9: 705-15 (1990)

- Hiromatsu T, Yajima T, Matsuguchi T, Nishimura H, Wajjwalku W, Arai T, Nimura Y and Yoshikai Y.** Overexpression of interleukin-15 protects against Escherichia coli-induced shock accompanied by inhibition of tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *J. Infect. Dis.* 187: 1442-51 (2003)
- Hobler SC, Wang JJ, Williams AB, Melandri F, Sun X, Fischer JE and Hasselgren PO.** Sepsis is associated with increased ubiquitin-conjugating enzyme E214k mRNA in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 276: R468-R473 (1999)
- Hochstrasser M and Varshavsky A.** In vivo degradation of a transcriptional regulator: the yeast alpha 2 repressor. *Cell.* 61: 697-708 (1990)
- Hoey T, Sun YL, Williamson K, Xu X.** Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity.* 2: 461-72 (1995)
- Hofmann C, Lorenz K, Braithwaite SS, Colca JR, Palazuk BJ, Hotamisligil GS, Spiegelman BM.** Altered gene expression for tumor necrosis factor-alpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology.* 134: 264-70 (1994)
- Hoffman E, Brown RH and Kunkel LM.** Dystrophin, the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell.* 51: 919-28 (1987)
- Hohmann HP, Brockhaus M, Baeuerle PA, Remy R, Kolbeck R and Van Loon APMG.** Expression of the types A and B tumor necrosis factor (TNF) receptors is independently regulated, and both receptors mediate activation of the transcription factor NF- κ B. TNF- α is not needed for induction of a biological effect via TNF receptors. *J. Biol. Chem.* 265: 2409-17 (1990)
- Hokanson JF, Mercier JG, Brooks GA.** Cyclosporine A decreases rat skeletal muscle mitochondrial respiration in vitro. *Am J Respir Crit Care Med.* 151: 1848-51 (1995)
- Hongo K, White E, Orchard CH.** Effect of stretch on contraction and the Ca²⁺ transient in ferret ventricular muscles during hypoxia and acidosis. *Am J Physiol.* 269: C690-7 (1995)
- Hoontrakoon R, Chu HW, Gardai SJ, Wenzel SE, McDonald P, Fadok VA, Henson PM and Bratton DL.** Interleukin-15 inhibits spontaneous apoptosis in human eosinophils via autocrine production of granulocyte macrophage-colony stimulating factor and nuclear factor-kappaB activation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 26: 404-12 (2002)
- Hori K, Ehrke MJ, Mace K and Mihich E.** Effect of recombinant tumor necrosis factor on tumoricidal activation of murine macrophages: synergism between tumor necrosis factor and γ -interferon. *Cancer Res.* 47: 5868-74 (1987)
- Horie Y, Wolf R and Granger DN.** Role of nitric oxide in gut ischemia-reperfusion-induced hepatic microvascular dysfunction. *Am. J. Physiol.* 273: G1007-G1013 (1997)
- Hortelano S, Alvarez AM and Bosca L.** Nitric oxide induces tyrosin nitration and release of cytochrome c preceding an increase of mitochondrial transmembrane potential in macrophages. *FASEB J.* 13: 2311-7 (1999)
- Hotamisligil GS, Shargill NS and Spiegelman BM.** Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 259: 87-91 (1993)
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL and Spiegelman BM.** Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 95: 2409-15 (1995)
- Hotta K, Emala CW and Hirshman CA.** TNF-alpha upregulates Gi α and Gq α expression and function in human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 276: L405-11 (1999)

Howard G, Steffen JM and Geoghegan TE. Transcriptional regulation of decreased protein synthesis during skeletal muscle unloading. *J. Appl. Physiol.* 66: 1093-8 (1989)

Howald H, Pette D, Simoneau JA, Uber A, Hoppeler H and Cerretelli P. Effect of chronic hypoxia on muscle enzyme activities. *Int J Sports Med.* 11 Suppl 1: S10-4 (1990)

Howie SEM, Sommerfiled A, Gray E and Harrison DJ. Peripheral T lymphocyte depletion by apoptosis after CD4 ligation in vivo, selective loss of CD44- and 'activating' memory T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 95: 195-200 (1994)

Hsu H, Shu HB, Pan Mg and Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell.* 84: 299-308 (1996)

Hwang CS and Lane MD. Up-regulation of uncoupling protein-3 by fatty acid in C2C12 myotubes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258: 464-9 (1999)

Hytlander A, Körner U and Lundholm KG. Evaluation of mechanisms behind elevated energy expenditure in cancer patients with solid tumours. *Eur. J. Clin. Invest.* 23: 46-52 (1993)

I

Ihle JN and Kerr IM. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* 11: 69-74 (1995)

Imamura K, Sherman ML, Spriggs D and Kufe D. Effect of tumor necrosis factor on GTP binding and GTPase activity in HL-60 and L929 cells. *J. Biol. Chem.* 263: 10247-53 (1988)

Inagaki-Ohara K, Nishimura H, Mitani A and Yoshikai Y. Interleukin-15 preferentially promotes the growth of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing gamma delta T cell receptor in mice. *Eur. J. Immunol.* 27: 2885-91 (1997)

Inculet RI, Peacock JL, Gorschboth CM and Norton JA. Gluconeogenesis in the tumor-influenced rat hepatocyte: importance of tumor burden, lactate, insulin, and glucagon. *J. Natl. Can. Inst.* 39: 1039 (1987)

Inui A. Feeding and body weight regulation by hypothalamic-mediation of the levels of leptin. *Trend. Neurosci.* 22: 62-67 (1999)

Inui A. Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nat Rev Neurosci.* 2: 551-60 (2001).

Inukai A, Kobayashi Y, Ito K, Doyu M, Takano A, Honda H and Sobue G. Expression of FAS antigen is not associated with apoptosis in human myopathies. *Muscle Nerve.* 20: 702-9 (1997)

Ishibashi Y, Takada K, Joh K, Ohkawa K, Aoki T and Matsuda M. Ubiquitin immunoreactivity in human malignant tumours. *Br. J. Cancer.* 63: 320-22 (1991)

Ishiko O, Sumi T, Hirai K, Honda Ki K, Nakata S, Yoshida H and Ogita S. Apoptosis of Muscle Cells Causes Weight Loss Prior to Impairment of DNA Synthesis in Tumor-bearing Rabbits. *Jpn. J. Cancer Res.* 92: 30-5 (2001)

Ishitsuka H, Miwa M, Takemoto K, Fukuoka K, Itoga A, Maruyama HB. Role of uridine phosphorylase for antitumor activity of 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Gann.* 71: 112-23 (1980)

Itoh G, Tamura J, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Koike M, Nomura M, Jie T and Ito K. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am. J. Pathol.* 146: 1325-31 (1995)

Itoh G, Jie T, Tamura J, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda Y and Nomura M. Apoptosis and human ischemic myocardial damage, including conduction system. *Basic Apply. Myol.* 6: 237-40 (1996)

J

Jablons DM, Mulé JJ, McIntosh JK, Sehgal PB, May LT, Huang CM, Rosenberg SA and Lotze MT. IL-6/IFN-beta-2 as a circulating hormone. Induction by cytokine administration in humans. *J. Immunol.* 142: 1542-7 (1989)

Jacobson MD, Burne JF and Raff MC. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J.* 13: 1899-910 (1994)

Jagoe RT and Goldberg AL. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 4: 183-90 (2001)

James TN, Terasaki F, Pavlovich ER and Vikhert AM. Apoptosis and pleomorphic micromitochondriosis in the sinus nodes surgically excised from five patients with the long QT syndrome. *J. Lab. Clin. Med.* 122: 309-23 (1993)

James TN. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Circulation.* 90: 556-73 (1994)

Jarvis WD, Turner AJ, Povirk LF, Traylor RS and Grant S. Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C. *Cancer Res.* 54: 1707-14 (1994)

Jasani B, Donaldson LJ, Ratcliff JG and Sokhi GS. Mechanisms of impaired glucose tolerance in patients with neoplasia. *Br. J. Cancer.* 38: 287-92 (1978)

Javesghani D, Hussain SN, Scheidel J, Quinn MT, Magder SA. Superoxide production in the vasculature of lipopolysaccharide-treated rats and pigs. *Shock.* 19: 486-93 (2003)

Jeffery PK. Structural and inflammatory changes in COPD: a comparison with asthma. *Thorax.* 53: 129-36 (1998)

Jenkins PJ, Bustin SA. Evidence for a link between IGF-I and cancer. *Eur J Endocrinol.* 151: S17-22 (2004)

Jensen PB, Blume N, Mikkelsen JD, Larsen PJ, Jensen HI, Holst JJ and Madsen OD. Transplantable rat glaucoma cause acute onset of severe anorexia and adipsia despite highly elevated NPY mRNA levels in the hypothalamic arcuate nucleus. *J. Clin. Invest.* 101: 503-510 (1998)

Jentsch S, Seufert W, Sommer T and Reins HA. Ubiquitin-conjugating enzymes: novel regulators of eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* 15: 195-8 (1990)

Jentsch S. The ubiquitin-conjugation system. *Annu. Rev. Genet.* 26: 179-207 (1992)

Jobin J, Maltais F, Doyon JF, LeBlanc P, Simard PM, Simard AA, Simard C. Chronic obstructive pulmonary disease: capillarity and fiber-type characteristics of skeletal muscle. *J Cardiopulm Rehabil.* 18: 432-7 (1998)

Jones EY, Stuart DI and Walker NP. Structure of tumor necrosis factor. *Nature.* 338: 225-8 (1989)

Jonuleit H, Wiedemann K, Muller G, Degwert J, Hoppe U, Knop J, Enk AH. Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 in attraction of T cells. *J Immunol.* 158: 2610-5 (1997)

Josien R, Wong BR, Li HL, Steinman RM and Choi Y. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J. Immunol.* 162: 2562-8 (1999)

Ju ST, Matsui K and Ozdemirli M. Molecular and cellular mechanisms regulating T and B cell apoptosis through Fas/FasL interaction. *Int. Rev. Immunol.* 18: 485-513 (1999)

Jue DM, Sherry B, Luedke C, Manogue KR and Cerami A. Processing of newly synthesized cachectin/tumor necrosis factor in endotoxin-stimulated macrophages. *Biochemistry*. 29: 8371-7 (1990)

K

Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G and Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab. Invest.* 74: 86-107 (1996)

Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T, Yano M, Enomoto A, Nishimura H, Yoshioka K and Yoshika Y. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease. *Clin. Exp. Immunol.* 109: 458-63 (1997)

Kamischke A, Kemper DE, Castel MA, Luthke M, Rolf C, Behre HM, Magnussen H and Nieschlag E. Testosterone levels in men with chronic obstructive pulmonary disease with or without glucocorticoid therapy. *Eur Respir J.* 11: 41-5 (1998)

Kaminska AM and Fidzińska A. Experimental induction of apoptosis and necrosis in neonatal rat skeletal muscle. *Basic Appl. Myol.* 6: 251-6 (1996)

Kanayama H, Tanaka K, Aki M, Kagawa S, Miyaji H, Satoh M, Okada F, Sato S, Shimbara N and Ichihara A. Changes in expressions of proteasome and ubiquitin genes in human renal cancer cells. *Cancer Res.* 51: 6677-85 (1991)

Kanegane H and Tosato G. Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. *Blood.* 88: 230-5 (1996)

Kang SM, Hoffmann A, Le D, Springer ML, Stock PG and Blau HM. Immune response and myoblasts that express Fas ligand. *Science.* 278: 1322-4 (1997)

Kanoh M, Takemura G, Misao J, Hayakawa Y, Aoyama T, Nishigaki K, Noda T, Fujiwara T, Fukuda K, Minatoguchi S and Fujiwara H. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy, not apoptosis but DNA repair. *Circulation.* 99: 2757-64 (1999)

Kantrow SP, Gierman JL, Jaligam VR, Zhang P, Piantadosi CA, Summer WR, Lancaster JR Jr. Regulation of tumor necrosis factor cytotoxicity by calcineurin. *FEBS Lett.* 483: 119-24 (2000)

Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS and Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J. Clin. Invest.* 96: 1042-52 (1995)

Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, Pitiakoudis M, Bounovas A, Simopoulos K. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and nutritional status in pancreatic cancer patients. *Anticancer Res.* 21: 1355-8 (2001)

Karsan A. Tumor necrosis factor and endothelial cell death. *Trends Cardiovasc. Med.* 8: 19-24 (1998)

Kavetsky RE, Samundgean EM and Butenko ZA. Changes in functional state of adrenal cortex during development of tumours. *Acta Union Int. Contra Cancrum.* 18: 115-7 (1962)

Kawai K, Suzuki H, Tomiyama K, Minagawa M, Mak TW and Ohashi PS. Requirement of the IL-2 receptor beta chain for the development of Vgamma3 dendritic epidermal T cells. *J. Invest. Dermatol.* 110: 961-5 (1998)

Kawakami M, Murase T, Ogawa H, Ishibashi S, Mori N, Takaku F and Shibata S. Human recombinant TNF suppresses lipoprotein lipase activity and stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells. *J. Biochem.* 101: 331-8 (1987)

- Kelly FJ, Lewis SE, Anderson P, Goldspink DF.** Pre- and postnatal growth and protein turnover in four muscles of the rat. *Muscle Nerve*. 7: 235-42 (1984)
- Kemp LM and Latchman DS.** The herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP4 specifically induces increased transcription of the human ubiquitin B gene without affecting the ubiquitin A and C genes. *Virology*. 166: 258-61 (1988)
- Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, Matsuki N, Charrier K, Sedger L, Willis CR, Brasel K, Morrissey PJ, Stocking K, Schuh JC, Joyce S and Peschon JJ.** Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.* 191: 771-80 (2000)
- Kennedy MK and Park LS.** Characterization of interleukin-15 (IL-15) and the IL-15 receptor complex. *J. Clin. Immunol.* 16: 134-43 (1996)
- Kern PA.** Recombinant human tumor necrosis factor does not inhibit lipoprotein lipase in primary cultures of isolated human adipocytes. *J. Lipid Res.* 29: 909-14 (1988a)
- Kern PA and Norton JA.** Cancer cachexia. *J. Parent. Enteral. Nutr.* 12: 286-98 (1988b)
- Kerr JFR.** Shrinkage necrosis, a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* 105: 13-20 (1971)
- Kerr JFR, Wyllie AH and Currie AR.** Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26: 239-57 (1972)
- Kettelhut IC, Wing SS and Goldberg AL.** Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle. *Diabetes Metab. Rev.* 4: 751-72 (1988)
- Kibler RF, Taylor WJ, Myers JD.** The effect of glucagon on net splanchnic balances of glucose, amino acid nitrogen, urea, ketones, and oxygen in man. *J Clin Invest.* 43: 904-15 (1964)
- Kien CL, Camitta BM.** Increased whole-body protein turnover in sick children with newly diagnosed leukemia or lymphoma. *Cancer Res.* 43: 5586-92 (1983)
- Kien CL, Camitta BM.** Close association of accelerated rates of whole body protein turnover (synthesis and breakdown) and energy expenditure in children with newly diagnosed acute lymphocytic leukemia. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 11: 129-34 (1987)
- Kimura K, Nishimura H, Hirose K, Matsuguchi T, Nimura Y and Yoshikai Y.** Immunogene therapy of murine fibrosarcoma using IL-15 gene with high translation efficiency. *Eur. J. Immunol.* 29: 1532-42 (1999)
- Kinoshita N, Hiroi T, Ohta N, Fukuyama S, Park EJ and Kiyono H.** Autocrine IL-15 mediates intestinal epithelial cell death via the activation of neighboring intraepithelial NK cells. *J. Immunol.* 169: 6187-92 (2002)
- Kirchheis R, Milleck J, Korobko VG, Shingarova LN, Behnke D and Schmidt HE.** Biological activity of mutants of human tumour necrosis factor-alpha. *Immunology.* 76: 433-8 (1992)
- Kirman I and Nielsen OH.** Increased numbers of interleukin-15-expressing cells in active ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 91: 1789-94 (1996)
- Kirschke H and Barrett AJ.** Chemistry of lysosomal proteases. In: *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown*. Academic Press, London. pp. 193-238 (1987)
- Kirschke H, Langner J, Riemann S, Wiederanders B, Ansoerge S and Bohley P.** Lysosomal cysteine proteinases. In: *Protein degradation in health and disease. CIBA Foundation Symposium.* 75: 15-35 (1980)
- Kisselev AV, Akopian TN and Goldberg AL.** Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J. Biol. Chem.* 273: 1982-9 (1998)

- Kitada S, Hays EF and Mead JF.** Lipid mobilizing factor from tumors. *Prog. Lipid Res.* 20: 823-6 (1981)
- Klausner JD, Makonkawkeyoon S, Akarasewi P, Nakata K, Kasinrerak W, Corral L, Dewar RL, Lane HC, Freedman VH, Kaplan G.** The effect of thalidomide on the pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 and M. tuberculosis infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 11: 247-57 (1996)
- Klein S, Simes J, Blackburn GL.** Total parenteral nutrition and cancer clinical trials. *Cancer.* 58: 1378-86 (1986)
- Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR and Newmeyer DD.** The release of cytochrome c from mitochondria, a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 275: 1132-6 (1997)
- Knight KR, Messina A, Hurley JV, Zhang B, Morrison WA and Stewart AG.** Muscle cells become necrotic rather than apoptotic during reperfusion of ischaemic skeletal muscle. *Int. J. Exp. Path.* 80: 169-75 (1999)
- Koga M, Hiromatsu Y, Jimi A, Inoue Y and Nonaka K.** Possible involvement of Fas-mediated apoptosis in eye muscle tissue from patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *Thyroid.* 8: 311-8 (1998)
- Koishi K, Zhang M, McLennan IS and Harris AJ.** MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers. *Dev Dyn.* 202: 244-54 (1995)
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H and Kangawa K.** Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptid from stomach. *Nature.* 402: 656-60 (1999)
- Koka R, Burkett PR, Chien M, Chai S, Chan F, Lodolce JP, Boone DL and Ma A.** Interleukin (IL)-15R[alpha]-deficient natural killer cells survive in normal but not IL-15R[alpha]-deficient mice. *J. Exp. Med.* 197: 977-84 (2003)
- Kolesnick RN and Kronke M.** Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 60: 643-65 (1998)
- Kono A, Hara Y, Sugata S, Karube Y, Matsushima Y, Ishitsuka H.** Activation of 5'-deoxy-5-fluorouridine by thymidine phosphorylase in human tumors. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 31: 175-8 (1983)
- Kozack W, Poli V, Soszynski D, Conn CA, Leon LR and Kluger MJ.** Sickness behavior in mice deficient in interleukin-6 during turpentin abscess and influenza pneumonitis. *Am. J. Physiol.* 272: R621-R630 (1997)
- Kralovic BC, Zepp EA and Cenedella RJ.** Studies of mechanism of carcass fat depletion in experimental cancer. *Eur. J. Cancer* 13: 1091-7 (1977)
- Krause R, James JH, Ziparo V and Fischer JE.** Brain tryptophan and the neoplastic anorexia-cachexia syndrome. *Cancer.* 44: 1003-8 (1979)
- Krause H, Jandrig B, Wernicke C, Bulfone-Paus S, Pohl T and Diamantstein T.** Genomic structure and chromosomal localization of the human interleukin 15 gene (IL-15). *Cytokine.* 8: 667-74 (1996)
- Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I and Lu SD.** A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic trans-membrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell.* 53: 45-53 (1988)
- Kroemer G, Dallaporta B and Resche-Rigon M.** The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 619-42 (1998)

Krown KA, Yasui K, Brooker MJ, Dubin AE, Nguyen C, Harris GL, McDonough PM, Glembotski CC, Palade PT and Sabbadini RA. TNF alpha receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF alpha inhibition of L-type Ca^{2+} current and Ca^{2+} transients. *FEBS Lett.* 376: 24-30 (1995)

Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJ and Sabbadini RA. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J.Clin. Invest.* 98: 2854-65 (1996)

Kukita T, Arima N, Matsushita K, Arimura K, Ohtsubo H, Sakaki Y, Fujiwara H, Ozaki A, Matsumoto T and Tei C. Autocrine and/or paracrine growth of adult T-cell leukaemia tumour cells by interleukin 15. *Br. J. Haematol.* 119: 467-74 (2002)

Kumagai T, Miki T, Kikuchi M, Fukuda T, Miyasaka N, Kamiyama R and Hirose S. The proto-oncogene Bcl6 inhibits apoptotic cell death in differentiation-induced mouse myogenic cells. *Oncogene.* 18: 467-75 (1999)

Kumaki S, Ochs HD, Timour M, Schooley K, Ahdieh M, Hill H, Sugamura K, Anderson D, Zhu Q, Cosman D, et al. Characterization of B-cell lines established from two X-linked severe combined immunodeficiency patients: interleukin-15 binds to the B cells but is not internalized efficiently. *Blood.* 86: 1428-36 (1995)

Kumara-Siri MH, Lee K and Surks MI. Regulation of thyrotropin secretion in rats bearing the Walker 256 carcinoma. *Endocrinology.* 109: 1760-8 (1981)

Kuniyasu H, Oue N, Nakae D, Tsutsumi M, Denda A, Tsujiuchi T, Yokozaki H and Yasui W. Interleukin-15 expression is associated with malignant potential in colon cancer cells. *Pathobiology.* 69: 86-95 (2001)

Kunkel SL, Spengler M, May MA, Spengler R, Larrick J and Remick D. Prostaglandin E_2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *J. Biol. Chem.* 263: 5380-4 (1988)

Kurowska M, Rudnicka W, Kontny E, Janicka I, Chorazy M, Kowalczewski J, Ziolkowska M, Ferrari-Lacraz S, Strom TB and Maslinski W. Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients express functional IL-15 receptor complex: endogenous IL-15 in autocrine fashion enhances cell proliferation and expression of Bcl-x(L) and Bcl-2. *J. Immunol.* 169: 1760-7 (2002)

Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, Entman ML and Maan DL. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *PNAS.* 97: 5456-61 (2000)

Kurys G, Tagaya Y, Bamford R, Hanover JA and Waldmann TA. The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15. *J. Biol. Chem.* 275: 30653-9 (2000)

Kurzer M and Meguid MM. Cancer and protein metabolism. *Surg. Clin. North Am.* 66: 969-1001 (1986)

L

Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E and Negoescu A. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections, critical evaluation and improvement. *J. Histochem. Cytochem.* 46: 327-34 (1998)

Lai MM, Burnett PE, Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH. Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J Biol Chem.* 273: 18325-31(1998)

- Lai YG, Gelfanov V, Gelfanova V, Kulik L, Chu CL, Jeng SW and Liao NS.** IL-15 promotes survival but not effector function differentiation of CD8⁺ TCR α beta⁺ intestinal intraepithelial lymphocytes. *J. Immunol.* 163: 5843-50 (1999)
- Lalani R, Bhasin S, Byhower F, Tarnuzzer R, Grant M, Shen R, Asa S, Ezzat S and Gonzalez-Cadauid NF.** Myostatin and insulin-like growth factor-I and -II expression in the muscle of rats exposed to the microgravity environment of the NeuroLab space shuttle flight. *J Endocrinol.* 167: 417-28 (2000)
- Lancaster Jr JR, Laster SM and Gooding LR.** Inhibition of target cell mitochondrial electron transfer by tumor necrosis factor. *FEBS Lett.* 248: 169-174 (1989)
- Landing BH, Dixon LG and Wells TR.** Studies on isolated human skeletal muscle fibres. Including a proposed pattern of nuclear distribution and a concept of nuclear territories. *Hum. Pathol.* 5: 441-61 (1974)
- Lang CH, Dobrescu C and Bagby GJ.** Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology.* 130: 43-52 (1992)
- Lang CH.** Beta-adrenergic blockade attenuates insulin resistance induced by tumor necrosis factor. *Am. J. Physiol.* 264: R984-R991 (1993)
- Lasek W, Golab J, Maslinski W, Switaj T, Balkowiec EZ, Stoklosa T, Giermasz A, Malejczyk M and Jakobisiak M.** Subtherapeutic doses of interleukin-15 augment the antitumor effect of interleukin-12 in a B16F10 melanoma model in mice. *Eur. Cytokine Netw.* 10: 345-56 (1999)
- Laster SM, Wood JG and Gooding LR.** Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *J. Immunol.* 141: 2629-34 (1988)
- Lauzon RJ, Patton CW and Weissman IL.** A morphological and immunohistochemical study of programmed cell death in *Botryllus schlosseri* (Tunicata, Ascidiacea). *Cell Tissue Res.* 272: 115-27 (1993)
- Laviano A, Meguid MM, Yang ZJ, Gleason JR, Cangiano C, Rossi Fanelli F.** Cracking the riddle of cancer anorexia. *Nutrition.* 12: 706-10 (1996)
- Lawler JM and Song W.** Specificity of antioxidant enzyme inhibition in skeletal muscle to reactive nitrogen species donors. *Biochem Biophys Res Commun.* 294: 1093-100 (2002)
- Lawlor MA and Rotwein P.** Coordinate control of muscle cell survival by distinct insulin-like growth factor activated signaling pathways. *J. Cell. Biol.* 151: 1131-40 (2000)
- Lawson DH, Richmon A, Nixon DW and Rudman D.** Metabolic approaches to cancer cachexia. *Annu. Rev. Nutr.* 2: 227-301 (1982)
- Lazarus DD, Destree AT, Mazzola LM, McCormack TA, Dick LR, Xu B, Huang JQ, Pierce JW, Read MA, Coggins MB, Solomon V, Goldberg AL, Brand SJ and Elliott PJ.** A new model of cancer cachexia: contribution of the ubiquitin-proteasome pathway. *Am. J. Physiol.* 277: E332-E341 (1999)
- Lazo PA.** Amino acids and glucose utilization by different metabolic pathways in ascites-tumour cells. *Eur. J. Biochem.* 117: 19-25 (1981)
- Lecker SH, Solomon V, Mitch WE and Goldberg AL.** Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Nutr.* 129: 227S-237S (1999a)
- Lecker SH, Solomon V, Price SR, Kwon YT, Mitch WE and Goldberg AL.** Ubiquitin conjugation by the N-end rule pathway and mRNAs for its components increase in muscles of diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 104: 1411-20 (1999b)

- Leclercq G, Debacker V, de Smedt M and Plum J.** Differential effects of interleukin-15 and interleukin-2 on differentiation of bipotential T/natural killer progenitor cells. *J. Exp. Med.* 184: 325-36 (1996)
- Ledgerwood EC, Prins JB, Bright NA, Johnson DR, Wolfreys K, Pober JS, O'Rahilly S and Bradley JR.** TNF is derived to mitochondria where a TNF binding protein is localized. *Lab. Invest.* 78: 1583-9 (1998a)
- Ledgerwood EC, Prins JB, Bright NA, Johnson DR, Wolfreys K, Pober JS, O'Rahilly S and Bradley JR.** Tumour necrosis factor is trafficked to a mitochondrial tumour necrosis factor binding protein. *Biochem. Soc. Trans.* 26: S316 (1998b)
- Lee DH, Goldberg AL.** Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 8: 397-403 (1998)
- Lee LE and Altschel R.** Electron microscopy of the nuclei of denervated skeletal muscle. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 61: 168-82 (1963)
- Lee MD, Zentella A, Pekala PH and Cerami A.** Effect of endotoxin-induced monokines on glucose metabolism in the muscle cell line L6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 2590-4 (1987)
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landwatter SW, Strickler JE, McLaughlin MM, Siemens IR, Fischer SM, Livi GP, White JR, Adams JL and Young PR.** A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature.* 372: 739-46 (1994)
- Lee YB, Satoh J, Walker DG, Kim SU.** Interleukin-15 gene expression in human astrocytes and microglia in culture. *Neuroreport.* 7: 1062-6 (1996)
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtke H.** RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry.* 16: 4743-51
- Leibowitz SF.** The role of serotonin in eating disorders. *Drugs.* 399: 33 (1990)
- Levin L and Gevers W.** Metabolic alterations in cancer II. *S. Afr. Med. J.* 59: 553-6 (1981)
- Levine S, Kaiser L, Leferovich J and Tikunov B.** Cellular adaptations in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 337: 1799-806 (1997)
- Levinger L and Varshavsky A.** Selective arrangement of ubiquitinated and D1 protein-containing nucleosomes within the Drosophila genome. *Cell.* 28: 375-385 (1982)
- Lewis SE, Kelly FJ, Goldspink DF.** Pre- and post-natal growth and protein turnover in smooth muscle, heart and slow- and fast-twitch skeletal muscles of the rat. *Biochem J.* 217: 517-26 (1984)
- Lewis M, Tartaglia LA, Lee A, Bennet GL, Rice GC, Wong GHW, Chen EY and Goeddel DV.** Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 2830-4 (1991)
- Li JB and Goldberg AL.** Effects of food deprivation on protein synthesis and degradation in rat skeletal muscles. *Am. J. Physiol.* 231: 441-8 (1976)
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES and Wang X.** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91: 479-89 (1997)
- Li YP, Schwartz RJ, Waddell ID, Holloway BR and Reid MB.** Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. *FASEB J.* 12: 871-80 (1998)

- Lieberman SA, Butterfield GE, Harrison D, Hoffman AR.** Anabolic effects of recombinant insulin-like growth factor-I in cachectic patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 8: 404-10 (1994)
- Lin JX and Vilcek J.** Tumor necrosis factor and interleukin-1 cause a rapid and transient stimulation of c-fos and c-myc messenger-RNA levels in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 262: 1908-11 (1987)
- Lin JX, Migone TS, Tsang M, Friedmann M, Weatherbee JA, Zhou L, Yamauchi A, Bloom ET, Mietz J, John S, et al.** The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity.* 2: 331-9 (1995)
- Lindner G, Ruckert R, Bulfone-Paus S and Paus R.** Inhibition of chemotherapy-induced keratinocyte apoptosis in vivo by an interleukin-15-IgG fusion protein. *J. Invest. Dermatol.* 110: 457-8 (1998)
- Lindvall L, Lantz M, Gullberg U and Olsson I.** Modulation of the constitutive gene expression of the 55 kDa tumor necrosis factor receptor in hematopoietic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172: 557-63 (1990)
- Linnik MD, Zobrist RH and Hatfield MD.** Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 24: 2002-9 (1993)
- Lissoni P, Barni S, Tancini G, Brivio F, Tisi E, Zubelewicz B, Braczkowski R.** Role of the pineal gland in the control of macrophage functions and its possible implication in cancer: a study of interactions between tumor necrosis factor-alpha and the pineal hormone melatonin. *J Biol Regul Homeost Agents.* 8: 126-9 (1994)
- Lissoni P, Paolorossi F, Tancini G, Barni S, Ardizzioia A, Brivio F, Zubelewicz B, Chatikhine V.** Is there a role for melatonin in the treatment of neoplastic cachexia? *Eur J Cancer.* 32A: 1340-3 (1996)
- Lissoni P, Paolorossi F, Ardizzioia A, Barni S, Chilelli M, Mancuso M, Tancini G, Conti A, Maestroni GJ.** A randomized study of chemotherapy with cisplatin plus etoposide versus chemoendocrine therapy with cisplatin, etoposide and the pineal hormone melatonin as a first-line treatment of advanced non-small cell lung cancer patients in a poor clinical state. *J Pineal Res.* 23: 15-9 (1997)
- Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL.** Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell.* 66: 807-15 (1991)
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R and Wang X.** Induction of apoptotic program in cell free extracts, requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 86: 147-57 (1996)
- Liu S, Liu P, Borrás A, Chatila T, Speck SH.** Cyclosporin A-sensitive induction of the Epstein-Barr virus lytic switch is mediated via a novel pathway involving a MEF2 family member. *EMBO J.* 16: 143-53 (1997)
- Liu H, Su YC, Becker E, Treisman J and Skolnik EY.** A Drosophila TNF-receptor-associated factor (TRAF) binds the ste20 kinase Misshapen and activates Jun kinase. *Curr Biol.* 28: 101-4 (2003)
- Liu Z, Geboes K, Colpaert S, D'Haens GR, Rutgeerts P and Ceuppens JL.** IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production. *J. Immunol.* 164: 3608-15 (2000)
- Liviano A, Meguid MM, Yang ZJ, Gleason JR, Cangiano C, Rossi-Fanelli F.** Cracking the riddle of cancer anorexia. *Nutrition.* 12: 706-10 (1996)
- Llovera M, López-Soriano FJ and Argilés JM.** Effects of tumor necrosis factor- α on muscle protein turnover in vivo in female rats. *J. Natl. Cancer. Inst.* 85: 1334-9 (1993a)
- Llovera M, López-Soriano FJ and Argilés JM.** Chronic tumor necrosis factor- α treatment modifies protein turnover in rats tissues. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 30: 29-36 (1993b)

- Llovera M, García-Martínez C, Agell N, Marzabal M, López-Soriano FJ and Argilés JM.** Ubiquitin gene expression is increased in skeletal muscle of tumour-bearing rats. *FEBS Lett.* 338: 311-8 (1994)
- Llovera M, García-Martínez C, Agell N, López-Soriano FJ and Argilés JM.** Muscle wasting associated with cachexia is linked to an important activation of the ATP-dependent ubiquitin-mediated proteolysis. *Int. J. Cancer.* 61: 138-41 (1995)
- Llovera M, García-Martínez C, Costelli P, Agell N, Carbó N, López-Soriano FJ and Argilés JM.** Muscle hypercatabolism during cancer cachexia is not reversed by the glucocorticoid receptor antagonist RU38486. *Cancer Lett.* 99: 7-14 (1996a)
- Llovera M, Carbó N, García-Martínez C, Costelli P, Tessitore L, Baccino FM, Agell N, Bagby GJ, López-Soriano FJ and Argilés JM.** Anti-TNF treatment reverts increased muscle ubiquitin gene expression in tumour-bearing rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221: 653-5 (1996b)
- Llovera M, García-Martínez C, Agell N, López-Soriano FJ and Argilés JM.** TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230: 238-41 (1997)
- Llovera M, García-Martínez C, López-Soriano J, Carbó N, Agell N, López-Soriano FJ and Argilés JM.** Role of TNF receptor 1 in protein turnover during cancer cachexia using gene knockout mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 142: 183-9 (1998a)
- Llovera M, García-Martínez C, López-Soriano J, Agell N, López-Soriano FJ, García I and Argilés JM.** Protein turnover in skeletal muscle of tumour-bearing transgenic mice overexpressing the soluble TNF receptor-1. *Cancer Lett.* 130: 19-27 (1998b)
- Llovera M, García-Martínez C, Agell N, López-Soriano FJ, Authier FJ, Gherardi RK and Argilés JM.** Ubiquitin and proteasome gene expression is increased in skeletal muscle of slim AIDS patients. *Int J Mol Med.* 2: 69-73 (1998c)
- Llovera M, Carbó N, López-Soriano J, García-Martínez C, Busquets S, Alvarez B, Agell N, Costelli P, López-Soriano FJ, Celada A and Argilés JM.** Different cytokines modulate ubiquitin gene expression in rat skeletal muscle. *Cancer Lett.* 133: 83-7 (1998d)
- Lockshin RA and Williams CM.** Programmed cell death. I. Cytology of the generation of the intersegmental muscles of the *Pernyi silkworm*. *J. Insect. Physiol.* 11: 123-33 (1965)
- Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S and Ma A.** IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity.* 9: 669-76 (1998)
- Lodolce JP, Burkett PR, Boone DL, Chien M and Ma A.** T cell-independent interleukin 15Ralpha signals are required for bystander proliferation. *J. Exp. Med.* 194: 1187-94 (2001)
- Loetscher H, Steinmetz M and Lesslauer W.** Tumor necrosis factor: receptors and inhibitors. *Cancer Cells.* 3: 221-6 (1991)
- Long CL, Birkhahn RH, Geiger JW, Blakemore WS.** Contribution of skeletal muscle protein in elevated rates of whole body protein catabolism in trauma patients. *Am J Clin Nutr.* 34: 1087-93 (1981)
- Long NC, Kunkel SL, Vander AJ and Kluger MJ.** Antiserum against TNF enhances LPS fever in the rat. *Am. J. Physiol.* 258: R332-R337 (1990)
- Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Copeland NG, Gilbert DJ, Thomas S, Disteche C, Jenkins NA, Rao A.** NF-AT5: the NF-AT family of transcription factors expands in a new direction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 64: 517-26 (1999)

- López-Soriano J, Argilés JM and López-Soriano FJ.** Effects of tumour necrosis factor- α on the enzymatic activities related to glucose metabolism. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 30: 21-7 (1993)
- López-Soriano J, Carbó N, Tessitore L, López-Soriano FJ and Argilés JM.** Leptin and tumor growth in rats. *Int. J. Cancer.* 81: 726-9 (1999)
- Loprinzi CL, Michalak JC, Schaid DJ, Mailliard JA, Athmann LM, Goldberg RM, Tschetter LK, Hatfield AK, Morton RF.** Phase III evaluation of four doses of megestrol acetate as therapy for patients with cancer anorexia and/or cachexia.. *J Clin Oncol.* 11: 762-7 (1993a)
- Loprinzi CL, Schaid DJ, Dose AM, Burnham NL, Jensen MD.** Body-composition changes in patients who gain weight while receiving megestrol acetate. *J Clin Oncol.* 11: 152-4 (1993b)
- Lorite MJ, Thompson MG, Darke JL, Carling G and Tisdale MJ.** Mechanism of muscle protein degradation induced by a cancer cachectic factor. *Br. J. Cancer.* 78: 850-6 (1998)
- Lowell BB, Ruderman NB and Goodman MN.** Evidence that lysosomes are not involved in the degradation of myofibrillar proteins in rat skeletal muscle. *Biochem. J.* 234: 237-40 (1986)
- Lowry SF.** Cancer cachexia revisited: old problems and new perspectives. *Eur. J. Cancer.* 27: 1-3 (1991)
- Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L and Afzelius B.** A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical and morphological study. *J. Clin. Invest.* 41: 1776-1804 (1962)
- Lundholm K, Edstrom S, Ekman L, Karlberg I, Bylund AC and Schersten T.** Comparative study of influence of malignant tumor on host metabolism in mice and man. Evolution of an experimental model. *Cancer.* 42: 453-61 (1978)
- Lundholm K, Ekman L, Edstrom S, Karlberg I, Jagenburg R, Schersten T.** Protein synthesis in liver tissue under the influence of a methylcholanthrene-induced sarcoma in mice. *Cancer Res.* 39: 4657-61 (1979)
- Lundholm K, Ekman L, Karlberg I, Edstrom S and Schersten T.** Comparison of hepatic cathepsin D activity in response to tumour growth and to caloric restriction in mice. *Cancer Res.* 40: 1680-5 (1980)

M

- McGrath JA, Goldspink DF.** Glucocorticoid action on protein synthesis and protein breakdown in isolated skeletal muscles. *Biochem J.* 206: 641-5 (1982)
- MacLachlan TK and Giordano A.** TRAF2 expression in differentiated muscle. *J. Cell. Biochem.* 71: 461-6 (1998)
- Madge LA, Pober JS.** TNF signaling in vascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol.* 70: 317-25 (2001)
- Mafune K, Wong JM, Staniunas RJ, Lu ML, Ravikumar TS, Chen LB and Steele GD.** Ubiquitin hybrid protein gene expression during human colon cancer progression. *Arch. Surg.* 126: 462-466 (1991)
- Magari K, Miyata S, Ohkubo Y, Mutoh S, Goto T.** Calcineurin inhibitors exert rapid reduction of inflammatory pain in rat adjuvant-induced arthritis. *Br J Pharmacol.* 139: 927-34 (2003)
- Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quarantino S and Londei M.** Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology.* 119: 996-1006 (2000)
- Malik STA.** The activity of TNF in experimental cancer models. In: Tumor necrosis factor: the molecules and their emerging role in medicine. Beutler, B., ed. Raven Press Ltd. pp. 407-22 (1992)
- Mallat Z, Tedgui A, Fontaliran F, Frank R, Durigon M and Fontaine G.** Evidence for apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *N. Engl. J. Med.* 335: 1190-6 (1996)

- Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV and Wallach D.** MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature*. 385: 540-4 (1997)
- Maltais F, Jobin J, Sullivan MJ, Bernard S, Whittom F, Killian KJ, Desmeules M, Belanger M and LeBlanc P.** Metabolic and hemodynamic responses of lower limb during exercise in patients with COPD. *J Appl Physiol*. 84: 1573-80 (1998)
- Maltais F, Sullivan MJ, LeBlanc P, Duscha BD, Schachat FH, Simard C, Blank J and Jobin J.** Altered expression of myosin heavy chain in the vastus lateralis muscle in patients with COPD. *Eur Respir J*. 13: 850-4 (1999)
- Mampuru LJ, Chen SJ, Kalenik JL, Bradley ME and Lee TC.** Analysis of events associated with serum deprivation-induced apoptosis in C3H/Sol8 muscle satellite cells. *Exp. Cell. Res*. 226: 372-80 (1996)
- Männel DN, Jänicke R, Westenfelder U, Orosz PG, Echtenacher B, Kist A and Falk W.** Tumor cell-induced TNF production. In: Tumor necrosis factor: structure-function relationship and clinical application. Osawa, T. and Bonavida, B., eds. Basel, Karger. pp. 166-172 (1992)
- Manson JM, Smith RJ, Wilmore DW.** Growth hormone stimulates protein synthesis during hypocaloric parenteral nutrition. Role of hormonal-substrate environment. *Ann Surg*. 208: 136-42 (1988)
- Mantovani G, Ghiani M, Curreli L, Maccio A, Massa D, Succu G, Lai P, Massa E, Mudu MC, Astaro G.** Assessment of the efficacy of two dosages and schedules of human recombinant erythropoietin in the prevention and correction of cisplatin-induced anemia in cancer patients. *Oncol Rep*. 6: 421-6 (1999)
- Masuda A, Matsuguchi T, Yamaki K, Hayakawa T and Yoshikai Y.** Interleukin-15 prevents mouse mast cell apoptosis through STAT6-mediated Bcl-xL expression. *J. Biol. Chem*. 276: 26107-13 (2001)
- Masuno H, Yamasaki N and Okuda H.** Purification and characterization of a lipolytic factor (toxohormone-L) from cell-free fluid of ascites sarcoma 180. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol*. 20: 1174-85 (1984)
- Mathison JC, Wolfson E and Ulevitch RJ.** Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J. Clin. Invest*. 81: 1925-37 (1988)
- Matsuda R, Nishikawa A and Tanaka H.** Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue, evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *J. Biochem*. 118: 959-64 (1995)
- Matsui S, Sandberg AA, Negoro S, Sean BK and Goldstein G.** Isopeptidase: a novel eukaryotic enzyme that cleaves isopeptide bonds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79: 1535-9 (1982)
- Matthews N, Neale ML, Jackson SK and Stark JM.** Tumor cell killing by tumor necrosis factor. Inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. *Immunology*. 62: 153-5 (1987)
- Matthews W, Driscoll J, Tanaka k, Ichihara A and Goldberg AL.** Involvement of the proteasome in various degradative processes in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 2597-601 (1989)
- Matthys P, Dijkmans R, Proost P, Van Damme J, Heremans H, Sobis H and Billiau A.** Severe cachexia in mice inoculated with interferon-gamma-producing tumor cells. *Int. J. Cancer*. 49: 77-82 (1991b)
- Matthys P, Dooms H, Rottiers P, Mitera T, Overgergh L, Leclercq G, Billiau A and Grooten J.** Induction of IL-15 by TCR/CD3 aggregation depends on IFN-gamma and protects against apoptosis of immature thymocytes in vivo. *Clin. Exp. Immunol*. 130: 379-85 (2002)

- Mattson JP and Poole DC.** Pulmonary emphysema decreases hamster skeletal muscle oxidative enzyme capacity. *J Appl Physiol.* 1998 Jul;85(1):210-4
- Mauras N, Horber FF, Haymond MW.** Low dose recombinant human insulin-like growth factor-I fails to affect protein anabolism but inhibits islet cell secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 75: 1192-7 (1992)
- Mayer RJ, Arnold J, Laszlo L, Landon M and Lowe J.** Ubiquitin in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1089: 141-57 (1991)
- McCall GE, Goulet C, Grindeland RE, Hodgson JA, Bigbee AJ and Edgerton VR.** Bed rest suppresses bioassayable growth hormone release in response to muscle activity. *J. Appl. Physiol.* 83: 2086-90 (1997)
- McCarthy DO, Kluger MJ and Vander AJ.** Suppression of food intake during infection: is interleukin 1 involved? *Am. J. Clin. Nutr.* 42: 1179-82 (1985)
- McCarthy DO and Daun JM.** The effects of cyclooxygenase inhibitors on tumor induced anorexia in rats. *Cancer.* 71: 486-492 (1993)
- McClearn D, Medville R and Noden D.** Muscle cell death during the development of head and neck muscles in the chick embryo. *Dev. Dyn.* 202: 365-77 (1995)
- McGarry JD.** What if Minkowski had been agenic? An alternative angle on diabetes. *Science.* 258: 766-70 (1992)
- McInnes IB, al-Mughales J, Field M, Leung BP, Huang FP, Dixon R, Sturrock RD, Wilkinson PC and Liew FY.** The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 2: 175-82 (1996)
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ.** Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature.* 387: 83-90 (1997)
- Meadows KA, Holly JM and Stewart CE.** Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis is associated with suppression of insulin-like growth factor binding protein-5 secretion in differentiating murine skeletal myoblasts. *J. Cell. Physiol.* 183: 330-7 (2000)
- Meazza R, Verdiani S, Biassoni R, Coppolecchia M, Gaggero A, Orengo AM, Colombo MP, Azzarone B and Ferrini S.** Identification of a novel interleukin-15 (IL-15) transcript isoform generated by alternative splicing in human small cell lung cancer cell lines. *Oncogene.* 12: 2187-92 (1996)
- Medina MA, Márquez J and Núñez de Castro I.** Interchange of amino acids between tumor and host. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 48: 1-7 (1992)
- Medina R, Wing SS and Goldberg AL.** Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy. *Biochem. J.* 307: 631-7 (1995)
- Meguid MM, Yang ZJ and Gleason JR.** The gut-brain and brain-gut axis in anorexia: toward an understanding of food intake regulation. *Nutrition.* 12: S57 (1996)
- Meister A, Anderson ME.** Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 52: 711-60 (1983)
- Melville S, McNurlan MA, Calder AG, Garlick PJ.** Increased protein turnover despite normal energy metabolism and responses to feeding in patients with lung cancer. *Cancer Res.* 50: 1125-31 (1990)
- Memon RA, Feingold KR and Grunfeld C.** The effects of cytokines on intermediary metabolism. *The Endocrinologist.* 4: 56-63 (1994)
- Mention JJ, Ben Ahmed M, Begue B, Barbe U, Verkarre V, Asnafi V, Colombel JF, Cugnenc PH, Ruemmele FM, McIntyre E, Brousse N, Cellier C and Cerf-Bensussan N.** Interleukin 15: a key to

disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology*. 125: 730-45 (2003)

Mercier JG, Hokanson JF, Brooks GA. Effects of cyclosporine A on skeletal muscle mitochondrial respiration and endurance time in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 151: 1532-6 (1995)

Messmer UK, Lapetina EG and Brüne B. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is antagonized by protein kinase C -and protein kinase A- activating compounds. *Mol. Pharmacol*. 47: 757-65 (1996)

Mészáros K, Lang CH, Bagby GJ and Spitzer JJ. Tumor necrosis factor increases in vivo glucose utilization of macrophage-rich tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 149: 1-6 (1987)

Mészáros K, Lang CH, Bagby GJ and Spitzer JJ. In vivo glucose utilization by individual tissues during nonlethal hypermetabolic sepsis. *FASEB J*. 2: 3083-6 (1988)

Meyers G, Rumenapf T and Thiel HJ. Ubiquitin in a togavirus. *Nature*. 341: 491 (1989)

Meyers G, Tautz N, Dubovi EJ and Thiel HJ. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology*. 180: 602-16 (1991)

Mezquita J and Mezquita C. Characterization of a chicken polyubiquitin gene preferentially expressed during spermatogenesis. *FEBS Lett*. 279: 69-72 (1991)

Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM and Wilmore DW. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *Diabetes*. 29: 926-30 (1988)

Mider GB. Some aspects of nitrogen and energy metabolism in cancerous subjects. *Cancer. Res*. 11: 821-9 (1951)

Migheli A, Cavalla P, Marino S and Schiffer D. A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end-labeling of DNA strand breaks. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 53: 606-16 (1994)

Migheli A, Mongini T, Doriguzzi C, Chiado-Piat L, Piva R, Ugo I and Palmucci L. Muscle apoptosis in humans occurs in normal and denervated muscle, but not in myotonic dystrophy, dystrophinopathies or inflammatory disease. *Neurogenetics*. 1: 81-7 (1997)

Miles JM, Rizza RA, Haymond MW and Gerich JE. Effects of acute insulin deficiency on glucose and ketone body turnover in man. *Diabetes*. 29: 926-30 (1980)

Miller SC, Ito H, Blau HM and Torti FM. Tumor necrosis factor inhibits human myogenesis in vitro. *Mol Cell Biol*. 8: 2295-301 (1988)

Mitch WE, Medina R, Griebler S, May RC, England BK, Price SR, Bailey JL and Goldberg AL. Metabolic acidosis stimulates muscle protein degradation by activating the adenosine triphosphate-dependent pathway involving ubiquitin and proteasomes. *J. Clin. Invest*. 93: 2127-33 (1994)

Mitch WE and Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N. Engl. J. Med*. 335: 1897-905 (1996)

Mitchelson F. Pharmacological agents affecting emesis. A review (Part I). *Drugs*. 43: 295-315 (1992)

Mitsiades CS, Poulaki V, Mitsiades N. The role of apoptosis-inducing receptors of the tumor necrosis factor family in thyroid cancer. *J Endocrinol*. 178: 205-16 (2003)

Miyagoe Y, Hanaoka K, Nonaka I, Hayasaka M, Nabeshima Y, Arahata K, Nabeshima Y and Takeda S. Laminin alpha2 chain-null mutant mice by targeted disruption of the Lama2 gene: a new model of merosin (laminin 2)-deficient congenital muscular dystrophy. *FEBS Lett*. 415: 33-9 (1997)

- Miyazaki T, Kawahara A, Fujii H, Nakagawa Y, Minami Y, Liu ZJ, Oishi I, Silvennoinen O, Witthuhn BA, Ihle JN, et al.** Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science*. 266: 1045-7 (1994)
- Miyazaki T, Liu ZJ, Kawahara A, Minami Y, Yamada K, Tsujimoto Y, Barsoumian EL, Permuter RM and Taniguchi T.** Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell*. 81: 223-31 (1995)
- Mohamadzadeh M, Takashima A, Dougherty I, Knop J, Bergstresser PR, Cruz PD Jr.** Ultraviolet B radiation up-regulates the expression of IL-15 in human skin. *J Immunol* 155: 4492-6 (1995)
- Moldawer LL, Georgieff M and Lundholm K.** Interleukin 1, tumour necrosis factor-alpha (cachectin) and the pathogenesis of cancer cachexia. *Clin. Physiol*. 7: 263-274 (1987a)
- Moldawer LL, Svaninger G, Gelin J and Lundholm K.** Interleukin 1 and tumor necrosis factor do not regulate protein balance in skeletal muscle. *Am. J. Physiol*. 253: C766-C773 (1987b)
- Moldawer LL and Copeland EM.** Proinflammatory cytokines, nutritional support and the cachectic syndrome. *Cancer*. 79: 1828-1839 (1988)
- Moldoveanu AI, Shephard RJ, Shek PN.** Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha in blood mononuclear cells. *J Appl Physiol*. 89: 1499-504 (2000)
- Moley JF, Morrison SD, Gorschboth CM, Norton JA.** Body composition changes in rats with experimental cancer cachexia: improvement with exogenous insulin. *Cancer Res*. 48: 2784-7 (1988)
- Monici MC, Toscano A, Girlanda P, Aguenouz M, Musumeci O and Vita G.** Apoptosis in metabolic myopathies. *Neuroreport*. 9: 2431-5 (1998)
- Montes de Oca M, Rassulo J, Celli BR.** Respiratory muscle and cardiopulmonary function during exercise in very severe COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. 154: 1284-9 (1996)
- Morales A, Miranda M, Sanchez-Reyes A, Colell A, Biete A, Fernandez-Checa JC.** Transcriptional regulation of the heavy subunit chain of gamma-glutamylcysteine synthetase by ionizing radiation. *FEBS Lett*. 427: 15-20 (1998)
- Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinis A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G.** Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med*. 177: 1675-80 (1993)
- Mori M, Yamaguchi K, Honda S, Nagasaki K, Ueda M, Abe O and Abe K.** Cancer cachexia syndrome developed in nude mice bearing melanoma cells producing leukemia-inhibitory factor. *Cancer Res*. 51: 6656-9 (1991)
- Mori K, Fujimoto-Ouchi K, Ishikawa T, Sekiguchi F, Ishitsuka H, Tanaka Y.** Murine interleukin-12 prevents the development of cancer cachexia in a murine model. *Int J Cancer*. 67: 849-55 (1996)
- Morrison SD.** Influence of tumor development on the host. Liotta, A.L., ed. Kluwer Academic Publisher, Netherlands. pp. 176-213 (1979)
- Morrison SD.** Contributions of reduced hunger and premature satiety to cancerous hypophagia in rats. *Cancer Res*. 44: 1041-5 (1984)
- Morrison SD.** Tumor development on the host. Ed. Liotta, A.L., Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 176-213 (1989)
- Morrison WL, Gibson JN, Scrimgeour C and Rennie MJ.** Muscle wasting in emphysema. *Clin Sci (Lond)*. 75: 415-20 (1988)

- Mosselmans R, Hepburn A, Dumont JE, Fiers W and Galand P.** Endocytic pathway of recombinant murine tumor necrosis factor in L-929 cells. *J. Immunol.* 141: 3096-100 (1988)
- Mostert R, Goris A, Weling-Scheepers C, Wouters EF and Schols AM.** Tissue depletion and health related quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 94: 859-67 (2000)
- Mrozek E, Anderson P and Caligiuri MA.** Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 87: 2632-40 (1996)
- Mueller PS and Watkin D.** Plasma unesterified fatty acid concentrations in neoplastic disease. *J. Lab. Clin. Med.* 57: 95-108 (1961)
- Mueller YM, Bojczuk PM, Halstead ES, Kim AH, Witek J, Altman JD and Katsikis PD.** IL-15 enhances survival and function of HIV-specific CD8+ T cells. *Blood.* 101: 1024-9 (2003)
- Mulligan K, Grunfeld C, Hellerstein MK, Neese RA, Schambelan M.** Anabolic effects of recombinant human growth hormone in patients with wasting associated with human immunodeficiency virus infection. *J Clin Endocrinol Metab.* 77: 956-62 (1993)
- Mukasa T, Momoi T and Momoi MY.** Activation of caspase-3 apoptotic pathway in skeletal muscle fibers in laminin alpha2-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260: 139-42 (1999)
- Muller JM, Brenner U, Dienst C, Pichlmaier H.** Preoperative parenteral feeding in patients with gastrointestinal carcinoma. *Lancet.* 1: 68-71 (1982)
- Muller U, Jongeneel CV, Nedospasov SA, Lindahl KF and Steimetz M.** Tumor necrosis factor and lymphotoxin genes map close to H-2D in the mouse major histocompatibility complex. *Nature.* 325: 265-7 (1987)
- Müller-Taubenberger A, Haggmann J, Noegel A and Gerisch G.** Ubiquitin gene expression in Dictyostelium is induced by heat and cold shock, cadmium, and inhibitors of protein synthesis. *J. Cell. Biol.* 90: 51-58 (1988)
- Munger W, DeJoy SQ, Jeyaseelan R Sr, Torley LW, Grabstein KH, Eisenmann J, Paxton R, Cox T, Wick MM and Kerwar SS.** Studies evaluating the antitumor activity and toxicity of interleukin-15, a new T cell growth factor: comparison with interleukin-2. *Cell. Immunol.* 165: 289-93 (1995)
- Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, Tanaka K and Ichihara A.** Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature.* 360: 597-9 (1992)
- Murr C, Fuith LC, Widner B, Wirleitner B, Baier-Bitterlich G, Fuchs D.** Increased neopterin concentrations in patients with cancer: indicator of oxidative stress? *Anticancer Res.* 19: 1721-8 (1999)
- Murray RZ and Norbury C.** Proteasome inhibitors as anti-cancer agents. *Anticancer Drugs.* 11: 407-17 (2000)
- Murray AW.** Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell.* 116: 221-34 (2004)
- Musaro A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N.** IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature.* 400: 581-5 (1999)
- Muscaritoli M, Meguid MM, Beverly JL, Yang ZJ, Cangiano C, Rossi-Fanelli F.** Mechanisms of early tumor anorexia. *J. Surg. Res.* 60: 389-397 (1996)
- Musso T, Calosso L, Zucca M, Millesimo M, Ravarino D, Giovarelli M, Malavasi F, Ponzi AN, Paus R and Bulfone-Paus S.** Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15. *Blood.* 93: 3531-9 (1999)

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME and Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*. 85: 817-27 (1996)

N

Nagaraju K, Casciola-Rosen L, Rosen A, Thompson C, Loeffler L, Parker T, Danning C, Rochon PJ, Gillespie J and Plotz P. The inhibition of apoptosis in myositis and in normal muscle cells. *J. Immunol*. 164: 5459-65 (2000)

Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Date Y, Nakazato M, Okumura H, Hosoda H, Shimizu W, Yamagishi M, Oya H, Koh H, Yutani C, Kangawa K. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation*. 104: 2034-8 (2001)

Nagaya N, Kangawa K. Ghrelin improves left ventricular dysfunction and cardiac cachexia in heart failure. *Curr Opin Pharmacol*. 3: 146-51 (2003)

Nakahara W and Fukuoka F. Toxohormone. *Jpn. Med. J.* 1: 271-7 (1948)

Nakano M, Knowlton AA, Dibbs Z and Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha confers resistance to hypoxic injury in the adult mammalian cardiac myocyte. *Circulation*. 97: 1392-400 (1998)

Nakatsu F, Sakuma M, Matsuo Y, Arase H, Yamasaki S, Nakamura N, Saito T and Ohno H. A Di-leucine signal in the ubiquitin moiety. Possible involvement in ubiquitination-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem*. 275: 26213-9 (2000)

Narula J, Haider N, Virmani R, DoSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW and Khaw BA. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N. Engl. J. Med*. 335: 1182-9 (1996)

Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, Kolodgie FD, Dal Bello B, Semigran MJ, Bielsa-Masdeu A, Dec GW, Israels S, Ballester M, Virmani R, Saxena R and Kharbanda S. Apoptosis in heart failure. Release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 8144-9 (1999)

Nedospasov SA, Shakhov AN, Turetskaya RL, Mett VA, Azizov MM, Georgiev GP, Korobko VG, Dobrynin VN, Filippov SA, Bystrov NS, Boldyreva EF, Chuvpilo SA, Chumakov AM, Shingarova LN and Ovchinnikov YA. Tandem arrangement of genes coding for tumor necrosis factor (TNF- α) and lymphotoxin (TNF- β) in the human genome. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol*. 51: 611 (1986)

Negosecu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C and Brambilla E. In situ apoptotic cell death labeling by the TUNEL method, improvement and evaluation on cell preparations. *J. Histochem. Cytochem*. 44: 959-68 (1996)

Negre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Troly M, Salvayre R, Penicaud L and Casteilla L. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J*. 11: 809-15 (1997)

Neri B, Garosi VL, Intini C. Effect of medroxyprogesterone acetate on the quality of life of the oncologic patient: a multicentric cooperative study. *Anticancer Drugs*. 8: 459-65 (1997)

Ng EH, Rock CS, Lazarus DD, Staiino-Coico L, Moldawer LL, Lowry SF. Insulin-like growth factor I preserves host lean tissue mass in cancer cachexia. *Am J Physiol*. 262: R426-31 (1992)

Nguyen DT, Eskandari MK, DeForger LE, Raiford CL, Strieter RM, Kunkel SL and Remick DG. Cyclosporin A modulation of tumor necrosis factor gene expression and effects in vitro and in vivo. *J. Immunol*. 144: 3822-8 (1990)

Nickel BE, Allis CD and Davie JR. Ubiquitinated histone H2B is preferentially located in transcriptionally active chromatin. *Biochemistry*. 28: 958-63 (1989)

Nishimura H, Washizu J, Nakamura N, Enomoto A and Yoshikai Y. Translational efficiency is up-regulated by alternative exon in murine IL-15 mRNA. *J. Immunol*. 160: 936-42 (1998)

Nishimura H, Yajima T, Naiki Y, Tsunobuchi H, Umemura M, Itano K, Matsuguchi T, Suzuki M, Ohashi PS and Yoshikai Y. Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo. *J. Exp. Med*. 191: 157-70 (2000)

Nishikawa A and Hayashi H. Spatial, temporal and hormonal regulation of programmed muscle death during metamorphosis of the frog *Xenopus laevis*. *Differentiation*. 59: 207-14 (1995)

Nishimura T, Ohta S, Sato N, Togashi Y, Goto M and Hashimoto Y. Combination tumor immunotherapy with recombinant tumor necrosis factor and recombinant interleukin 2 in mice. *Int. J. Cancer*. 40: 255-61 (1987)

Nishiyama R, Sakaguchi T, Kinugasa T, Gu X, MacDermott RP, Podolsky DK and Reinecker HC. Interleukin-2 receptor beta subunit-dependent and -independent regulation of intestinal epithelial tight junctions. *J. Biol. Chem*. 276: 35571-80 (2001)

Nixon DW, Heymsfield SB, Cohen AE, Kutner MH, Anslay J, Lawson DH and Rudman D. Protein-calorie undernutrition in hospitalized cancer patients. *Am J. Med*. 68: 683-90 (1980)

Noguchi Y, Vydellingum NA and Brennan MF. The reversal of increased gluconeogenesis in tumor bearing rat by tumor removal and food intake. *Surgery*. 106: 423-31 (1989)

Noguchi M, Yi H, Rosenblatt HM, Filipovich AH, Adelstein S, Modi WS, McBride OW and Leonard WJ. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell*. 73: 147-57 (1993)

Noguchi Y, Yoshikawa T, Marat D, Doi C, Makino T, Fukuzawa K, Tsuburaya A, Satoh S, Ito T, Mitsuse S. Insulin resistance in cancer patients is associated with enhanced tumor necrosis factor-alpha expression in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 253: 887-92 (1998)

North RJ and Havell EA. The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF): Analysis of the role of endogenous TNF in endotoxin-induced hemorrhagic necrosis and regression of an established sarcoma. *J. Exp. Med*. 167: 1086-99 (1988)

Norton JA, Moley JF, Green MV, Carson RE and Morrison SD. Parabolic transfer of cancer anorexia/cachexia in male rats. *Cancer Res*. 48: 654-7 (1985)

Norton JA, Peacock JL and Morrison SD. Cancer cachexia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 7: 289 (1987)

Nyman U, Mussener A, Larsson E, Lorentzen J, Klareskog L. Amelioration of collagen II-induced arthritis in rats by the type IV phosphodiesterase inhibitor Rolipram. *Clin Exp Immunol*. 108: 415-9 (1997)

O

Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA and Hannun YA. Programmed cell death induced by ceramide. *Science*. 259: 1769-71 (1993)

Oberley LW and Buettner GR. Role of superoxide-dismutase in cancer. *Cancer Res*. 39: 1141-9 (1979)

Odedra BR, Dalal SS, Millward DJ. Muscle protein synthesis in the streptozotocin-diabetic rat. A possible role for corticosterone in the insensitivity to insulin infusion in vivo. *Biochem J*. 202: 363-8 (1982)

- Odedra BR, Millward DJ.** Effect of corticosterone treatment on muscle protein turnover in adrenalectomized rats and diabetic rats maintained on insulin. *Biochem J.* 204: 663-72 (1982)
- Odedra BR, Bates PC, Millward DJ.** Time course of the effect of catabolic doses of corticosterone on protein turnover in rat skeletal muscle and liver. *Biochem J.* 214: 617-27 (1983)
- Odessey R and Parr B.** Effect of insulin and leucine on protein turnover in rat soleus muscle after burn injury. *Metabolism.* 31: 82-7 (1982)
- O'Driscoll JG, Green DJ, Ireland M, Kerr D, Larbalestier RI.** Treatment of end-stage cardiac failure with growth hormone. *Lancet.* 349: 1068 (1997)
- Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S.** Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature.* 364: 806-9 (1993)
- Ogasawara K, Hida S, Azimi N, Tagaya Y, Sato T, Yokochi-Fukuda T, Waldmann TA, Taniguchi T and Taki S.** Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature.* 391: 700-3 (1998)
- Ohkawa S, Wright KC, Mahajan H, Mavligit GM and Wallace S.** Hepatic arterial infusion of human recombinant tumor necrosis factor-alpha. An experimental study in dogs. *Cancer.* 63: 2096-102 (1989)
- Ohmachi T, Giorda R, Shaw DR and Ennis HL.** Molecular organization of developmentally regulated Dictyostelium discoideum ubiquitin cDNAs. *Biochemistry.* 28: 5226-31 (1989)
- Ohno M, Takemura G, Ohno A, Misao J, Hayakawa Y, Minatoguchi S, Fujiwara T and Fujiwara H.** Apoptotic myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation. Analysis by immunogold electron microscopy combined with *in situ* nick end-labeling. *Circulation.* 98: 1422-30 (1998)
- Ohta H, Yatomi Y, Sweeney EA, Hakomori S and Igarashi Y.** A possible role of sphingosine in induction of apoptosis by tumor necrosis factor-alpha in human neutrophils. *FEBS Lett.* 355: 267-70 (1994)
- Ohta N, Hiroi T, Kweon MN, Kinoshita N, Jang MH, Mashimo T, Miyazaki J and Kiyono H.** IL-15-dependent activation-induced cell death-resistant Th1 type CD8 alpha beta+NK1.1+ T cells for the development of small intestinal inflammation. *J. Immunol.* 169: 460-8 (2002)
- Ohteki T, Ho S, Suzuki H, Mak TW and Ohashi PS.** Role for IL-15/IL-15 receptor beta-chain in natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha beta+ cell development. *J. Immunol.* 159: 5931-5 (1997)
- Ohteki T, Yoshida H, Matsuyama T, Duncan GS, Mak TW and Ohashi PS.** The transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1) is important during the maturation of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ (NK1+ T) cells, natural killer cells, and intestinal intraepithelial T cells. *J. Exp. Med.* 187: 967-72 (1998)
- O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA.** FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature.* 357: 692-4 (1992)
- Old LJ.** Tumor necrosis factor (TNF). *Science.* 230: 630-2 (1985)
- Olivé M, Martínez-Matos JA, Montero J and Ferrer I.** Apoptosis is not the mechanism of cell death of muscle fibers in human muscular dystrophies and inflammatory myopathies. *Muscle Nerve.* 20: 1328-30 (1997)
- O'Malley WE, Achinstein B and Shear MJ.** Action of bacterial polysaccharide on tumors. II. Damage of sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide, and induced tolerance. *J. Natl. Cancer Inst.* 29: 1169-75 (1962)

Onu A, Pohl T, Krause H and Bulfone-Paus S. Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms. *J. Immunol.* 158: 255-62 (1997)

Orengo AM, Di Carlo E, Comes A, Fabbi M, Piazza T, Cilli M, Musiani P and Ferrini S. Tumor cells engineered with IL-12 and IL-15 genes induce protective antibody responses in nude mice. *J. Immunol.* 171: 569-75 (2003)

Ortega A, Ferrer P, Carretero J, Obrador E, Asensi M, Pellicer JA, Estrela JM. Down-regulation of glutathione and Bcl-2 synthesis in mouse B16 melanoma cells avoids their survival during interaction with the vascular endothelium. *J Biol Chem.* 278: 39591-9 (2003)

Osborn L, Kunkel S and Nabel GJ. Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa-B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 2336-40 (1989)

Ostrowski K, Schjerling P, Pedersen BK. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans--effect of intensity of exercise. *Eur J Appl Physiol.* 83: 512-5 (2000)

Owen-Schaub LB, Gutterman J and Grimm EA. Synergy of tumor necrosis factor and interleukin-2 in activation of human cytotoxic lymphocytes: effect of tumor necrosis factor α and interleukin-2 in generation of human lymphokine activated killer activity. *Cancer Res.* 48: 788-92 (1988)

Özkaynak E, Finley D, Solomon MJ and Varshavsky A. The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J.* 6: 1429-39 (1987)

P

Packer M. Is tumor necrosis factor an important neurohormonal mechanism in chronic heart failure? *Circulation.* 92: 1379-82 (1995)

Padilla GV. Psychological aspects of nutrition and cancer. *Surg. Clin. North. Am.* 66:1121-1135 (1986)

Pain VM, Randall DP and Garlick PJ. Protein synthesis in liver and skeletal muscle of mice bearing an ascites tumor. *Cancer Res.* 44: 1054-7 (1984)

Palange P, Forte S, Felli A, Galassetti P, Serra P and Carlone S. Nutritional state and exercise tolerance in patients with COPD. *Chest.* 107: 1206-12 (1995)

Palladino MAJr, Refaat-Shalaby M and Kramer SM. Characterization of the antitumor activities of human tumor necrosis factor α and the comparison with other cytokines: induction of tumor-specific immunity. *J. Immunol.* 138: 4023-32 (1987)

Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL and Maniatis T. The ubiquitin proteasome-pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell.* 78: 773-85 (1994)

Parag HA, Raboy B and Kulka RG. Effect of heat shock on protein degradation in mammalian cells: involvement of the ubiquitin system. *EMBO J.* 6: 55-61 (1987)

Patton JS, Shepard HM, Wilking H, Lewis G, Aggarwal BB, Eessalu TE, Gavin LA, Grunfeld C. Interferons and tumor necrosis factors have similar catabolic effects on 3T3 L1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83: 8313-7 (1986)

Patton JS, Peters PM, McCabe J, Crase D, Hansen S, Chen AB and Liggitt D. Development of partial tolerance to gastrointestinal effects of high doses of recombinant tumor necrosis factor- α in rodents. *J. Clin. Invest.* 80: 1587-96 (1987)

Pavlakakis M, Strehlau J, Lipman M, Shapiro M, Maslinski W and Strom TB. Intragraft IL-15 transcripts are increased in human renal allograft rejection. *Transplantation.* 62: 543-5 (1996)

- Paxton K, Ward LC and Wilce PA.** Amino acid oxidation in the tumour-bearing rat. *Cancer Biochem. Biophys.* 9: 343-51 (1988)
- Pedersen PL.** Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Progr. Exptl. Tumor Res.* 22: 190-274 (1978)
- Pelletier M, Ratthe C and Girard D.** Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2. *FEBS Lett.* 532: 164-70 (2002)
- Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JF, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB and Goeddel DV.** Human tumor necrosis factor: precursor, structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature.* 312: 724-9 (1984)
- Pennica D, Hayflick JS, Bringman TS, Palladino MA and Goeddel DV.** Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 6060-4 (1985)
- Pereno R, Gaggero A, Scudeletti M, Lanza L, Meazza R, Mishal Z, Jasmin C, Indiveri F, Ferrini S and Azzarone B.** IL-15/IL-15R alpha intracellular trafficking in human cells and protection from apoptosis. *Ann. NY Acad. Sci.* 876: 236-45 (1999)
- Perlmutter DH, Dinarello CA, Punsal PI and Colten HR.** Cachectin/tumor necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression. *J. Clin. Invest.* 78: 1349-54 (1986)
- Peters JM.** Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem. Sci.* 19: 377-82 (1994)
- Petrache I, Otterbein LE, Alam J, Wiegand GW and Choi AM.** Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 278: L312-9 (2000)
- Petrache I, Verin AD, Crow MT, Birukova A, Liu F and Garcia JG.** Differential effect of MLC kinase in TNF-alpha-induced endothelial cell apoptosis and barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* J280: L1168-78 (2001)
- Pettit DK, Bonnert TP, Eisenman J, Srinivasan S, Paxton R, Beers C, Lynch D, Miller B, Yost J, Grabstein KH and Gombotz WR.** Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modeling. *J. Biol. Chem.* 272: 2312-8 (1997)
- Plata-Salamán CR.** Regulation of hunger and satiety in man. *Dig. Dis.* 9: 253-268 (1991a)
- Plata-Salamán CR.** Immunoregulators in the nervous system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15: 185-215 (1991b)
- Plata-Salaman CR.** Anorexia during acute and chronic disease. *Nutrition.* 12: 69-78 (1996)
- Podhorska-Okolow M, Sandri M, Zampieri S, Brun B, Rossini K and Carraro U.** Apoptosis of myofibres and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 24: 518-31 (1998)
- Pomposelli JJ, Flores EA and Bistrrian BR.** Role of biochemical mediators in clinical nutrition and surgical metabolism. *J. Parent. Ent. Nutr.* 12: 212-218 (1988)
- Pons S, Torres-Aleman I.** Insulin-like growth factor-I stimulates dephosphorylation of ikappa B through the serine phosphatase calcineurin (protein phosphatase 2B). *J Biol Chem.* 275: 38620-5 (2000)

Popp MB, Fisher RI, Wesley R, Aamodt R and Brennan MF. A prospective randomized study of adjuvant parenteral nutrition in the treatment of advanced diffuse lymphoma: influence on survival. *Surgery*. 90: 195-203 (1981)

Porter RK. Allometry of mammalian cellular oxygen consumption. *Cell Mol Life Sci*. 58: 815-22 (2001)

Porter RK. Mitochondrial proton leak: a role for uncoupling proteins 2 and 3? *Biochim Biophys Acta*. 1504: 120-7 (2001)

Portis T, Harding JC and Ratner L. The contribution of NF-kappa B activity to spontaneous proliferation and resistance to apoptosis in human T-cell leukemia virus type 1 Tax-induced tumors. *Blood*. 98: 1200-8 (2001)

Pouch MN, Petit F, Buri J, Briand Y and Schmid HP. Identification and initial characterization of a specific proteasome (prosome) associated RNase activity. *J. Biol. Chem*. 279: 22023-8 (1995)

Prabhakar U, Lipshutz D, Bartus JO, Slivjak MJ, Smith EF 3rd, Lee JC, Esser KM. Characterization of cAMP-dependent inhibition of LPS-induced TNF alpha production by rolipram, a specific phosphodiesterase IV (PDE IV) inhibitor. *Int J Immunopharmacol*. 16: 805-16 (1994)

Preedy VR, Garlick PJ. The response of muscle protein synthesis to nutrient intake in postabsorptive rats: the role of insulin and amino acids. *Biosci Rep*. 6: 177-83 (1986)

Price SR, Olivecrona T and Pekala PH. Regulation of lipoprotein lipase synthesis by recombinant tumor necrosis factor. The primary role of the hormone in 3T3-L1 adipocytes. *Arch. Biochem. Biophys*. 251: 738-46 (1986)

Price SR, Bailey JL, Wang X, Jurkovitz C, England BK, Ding X, Phillips LS and Mitch WE. Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. *J. Clin. Invest*. 98: 1703-8 (1996)

Prinz M, Hanisch UK, Kettenmann H and Kirchhoff F. Alternative splicing of mouse IL-15 is due to the use of an internal splice site in exon 5. *Brain Res. Mol. Brain Res*. 63: 155-62 (1998)

Pushkareva M, Obeid LM and Hannun YA. Ceramide: an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression. *Immunol. Today*. 16: 294-7 (1995)

Q

Quinn LS, Haugk KL and Grabstein KH. Interleukin 15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology*. 136: 3669-72 (1995)

Quinn LS, Haugk KL and Damon SE. Interleukin-15 stimulates C2 skeletal myoblast differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 239: 6-10 (1997)

Quinn LS, Anderson BG, Drivdahl RH, Álvarez B and Argilés JM. Overexpression of interleukin-15 induces skeletal muscle hypertrophy in vitro: implications for treatment of muscle wasting disorders. *Exp. Cell. Res*. 280: 55-63 (2002)

R

Racker E. Why do tumor cells have a high aerobic glycolysis? *J. Cell Physiol*. 89: 697 (1976)

Rahman I and MacNee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Radic Biol Med*. 21: 669-81 (1996a)

Rahman I, Morrison D, Donaldson K and MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 154: 1055-60 (1996b)

- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ and Davis RJ.** Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem.* 270: 7420-6 (1995)
- Ralston E and Hall ZW.** Restricted distribution of mRNA produced from a single nucleus in hybrid myotubes. *J. Cell. Biol.* 119: 1063-8 (1992)
- Ranganathan S and Davidson MB.** Effects of tumor necrosis factor- α on basal and insulin-stimulated glucose transport in cultured muscle and fat cells. *Metabolism.* 45: 1089-94 (1996)
- Rannels DE, Hjalmarson AC and Morgan HE.** Effects of noncarbohydrate substrates on protein synthesis in muscle. *Am. J. Physiol.* 226: 528-39 (1974)
- Rao A, Luo C, Hogan PG.** Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 15: 707-47 (1997)
- Rabinovich RA, Ardite E, Troosters T, Carbo N, Alonso J, Gonzalez de Suso JM, Vilaro J, Barbera JA, Polo MF, Argiles JM, Fernandez-Checa JC, Roca J.** Reduced muscle redox capacity after endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 164: 1114-8 (2001)
- Rechsteiner M.** Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 3: 1-30 (1987)
- Redman KL and Rechsteiner M.** Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a. *Nature.* 338: 438-40 (1989)
- Reed JC.** Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature.* 387: 773-6 (1997)
- Reid MB.** Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Med Sci Sports Exerc.* 33: 371-6 (2001)
- Reinecker HC, MacDermott RP, Mirau S, Dignass A and Podolsky DK.** Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15. *Gastroenterology.* 111: 1706-13 (1996)
- Reinhart K, Wiegand-Lohnert C, Grimminger F, Kaul M, Withington S, Treacher D, Eckart J, Willatts S, Bouza C, Krausch D, Stockenhuber F, Eiselstein J, Daum L, Kempeni J.** Assessment of the safety and efficacy of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody-fragment, MAK 195F, in patients with sepsis and septic shock: a multicenter, randomized, placebo-controlled, dose-ranging study. *Crit Care Med.* 24: 733-42 (1996). Erratum in: *Crit Care Med.* 24: 1608 (1996)
- Repine JE, Bast A and Lankhorst I.** Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 156: 341-57 (1997)
- Reynolds GJ and Hooley R.** cDNA cloning of a tetraubiquitin gene, and expression of ubiquitin-containing transcripts, in aleurone layers of *Avena fatua*. *Plant. Mol. Biol.* 20: 753-8 (1992)
- Rhind SG, Castellani JW, Brenner IK, Shephard RJ, Zamecnik J, Montain SJ, Young AJ, Shek PN.** Intracellular monocyte and serum cytokine expression is modulated by exhausting exercise and cold exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281: R66-75 (2001)
- Riches DWH, Chan ED, Zahradka EA, Winston BW, Remigio LK and Lake FR.** Cooperative signaling by tumor necrosis factor receptors CD120a (p55) and CE120b (p75) in the expression of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase by mouse macrophages. *J. Biol. Chem.* 273: 22800-6 (1998)
- Riede U, Förstermann U and Drexler H.** Inducible nitric oxide synthase in skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 32: 964-69 (1998)
- Riise GC, Larsson S, Lofdahl CG and Andersson BA.** Circulating cell adhesion molecules in bronchial lavage and serum in COPD patients with chronic bronchitis. *Eur Respir J.* 7: 1673-7 (1994)

- Rivera S.** Introducció al metabolisme dels aminàcids al carcinoma pulmonar de Lewis. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona. (1985)
- Rivett AJ.** Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem. J.* 291: 1-10 (1993)
- Robinson AM and Williamson DH.** Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol. Res.* 60: 143-87 (1980)
- Roby KF and Hunt JS.** Mouse endometrial tumor necrosis factor- α messenger ribonucleic acid and protein: localization and regulation by estradiol and progesterone. *Endocrinology.* 135: 2780-9 (1994)
- Rocamora N and Agell N.** Methylation of chick UbI and UbII polyubiquitin genes and their differential expression during spermatogenesis. *Biochem. J.* 267: 821-9 (1990)
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D and Goldberg AL.** Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 78: 761-71 (1994)
- Rodella L, Zamai L, Rezzani R, Artico M, Peri G, Falconi M, Facchini A, Pelusi G and Vitale M.** Interleukin 2 and interleukin 15 differentially predispose natural killer cells to apoptosis mediated by endothelial and tumour cells. *Br. J. Haematol.* 115: 442-50 (2001)
- Rodríguez T, Busquets S, Alvarez B, Carbó N, Agell N, López-Soriano FJ and Argilés JM.** Protein turnover in skeletal muscle of the diabetic rat: activation of ubiquitin-dependent proteolysis. *Int. J. Mol. Med.* 1: 971-7 (1998)
- Rofe AM, Conyers RAJ, Bais R, Gamble JR and Vadas MA.** The effects of recombinant tumor necrosis factor (cachectin) on metabolism in isolated rat adipocyte, hepatocyte and muscle preparations. *Biochem. J.* 247: 789-92 (1987)
- Rogers S, Wells R and Rechsteiner M.** Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science.* 234: 364-68 (1986)
- Ross ME and Caligiuri MA.** Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response. *Blood.* 89: 910-8 (1997)
- Rossi-Fanelli F, Cangiano C.** Increased availability of tryptophan in brain as common pathogenic mechanism for anorexia associated with different diseases. *Nutrition.* 7: 364-7 (1991)
- Rothe M, Sarma V, Dixit VM and Goeddel DV.** TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science.* 269: 1424-7 (1995)
- Rothe H, Hausmann A and Kolb H.** Immunoregulation during disease progression in prediabetic NOD mice: inverse expression of arginase and prostaglandin H synthase 2 vs. interleukin-15. *Horm. Metab. Res.* 34: 7-12 (2002)
- Rothermel B, Vega RB, Yang J, Wu H, Bassel-Duby R, Williams RS.** A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J Biol Chem.* 275: 8719-25 (2000)
- Rothstein JL and Schreiber H.** Relationship of tumour necrosis factor and endotoxin to macrophage cytotoxicity, haemorrhagic necrosis and lethal shock. *Ciba Found. Symp.* 131: 124-39 (1987)
- Rothwell NJ.** Central effects of TNF- α on thermogenesis and fever in the rat. *Biosci. Rep.* 8: 345-52 (1988)
- Rothwell NJ.** Hormones and nutrition in obesity and cachexia. Eds. Müller, M.J., Danforth, E., Burger, A.G., Siedentopp, U. Springer-Verlag, Berlin. pp: 77-85 (1990)

Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T and Nebreda AR. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*. 78: 1027-37 (1994)

Roy RR, Baldwin KM and Edgerton VR. The plasticity of skeletal muscle, effects of neuromuscular activity. *Exerc. Sport. Sci. Rev.* 19: 269-312 (1991)

Rufini S, Rainaldi G, Abbracchio MP, Fiorentini C, Capri M, Franceschi C and Malorni W. Actin cytoskeleton as a target for 2-chloro adenosine: evidence for induction of apoptosis in C2C12 myoblastic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238: 361-6 (1997)

Ruggiero V and Baglioni C. Synergistic antiproliferative activity of interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 138: 661-3 (1987)

S

Sáez S. Adrenal function in cancer: relation to the evolution. *Eur. J. Cancer*. 7: 381-7 (1971)

Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR and Kern PA. The expression of TNF- α by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 97: 1111-6 (1996)

Saido TC, Sorimachi H and Suzuki K. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J.* 8: 814-22 (1994)

Sakai T, Kusugami K, Nishimura H, Ando T, Yamaguchi T, Ohsuga M, Ina K, Enomoto A, Kimura Y and Yoshikai Y. Interleukin 15 activity in the rectal mucosa of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 114: 1237-43 (1998)

Sala E, Roca J, Marrades RM, Alonso J, Gonzalez De Suso JM, Moreno A, Barbera JA, Nadal J, de Jover L, Rodriguez-Roisin R, Wagner PD. Effects of endurance training on skeletal muscle bioenergetics in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 159: 1726-34 (1999)

Samis JA and Elce JS. Immunogold electron-microscopic localization of calpain I in human erythrocytes. *Tromb. Haemost.* 61: 250-3 (1989)

Sampaio EP, Kaplan G, Miranda A, Nery JA, Miguel CP, Viana SM, Sarno EN. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J Infect Dis*. 168: 408-14 (1993)

Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med*. 173: 699-703 (1991)

Sanchez I, Hughes RT, Mayer BJ, Yee K, Woodgett JR, Avruch J, Kyriakis JM and Zon LI. Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature*. 372: 794-8 (1994)

Sandri M, Carraro U, Podhorska-Okolow M, Rizzi C, Arslan P, Monti D and Franceschi C. Apoptosis, DNA damage and ubiquitin expression in normal and mdx muscle fibers after exercise. *FEBS Lett*. 373: 291-5 (1995)

Sandri M, Podhorska-Okolow M, Geromel V, Rizzi C, Arslan P, Franceschi C and Carraro U. Sudden spontaneous exercise increases myonuclear ubiquitination and apoptosis of dystrophin deficient muscle. *Basic Appl. Myol.* 6: 285-9 (1996)

Sandri M, Podhorska-Okolow M, Geromel V, Rizzi C, Arslan P, Franceschi C and Carraro U. Exercise induces myonuclear ubiquitination and apoptosis in dystrophin-deficient muscle of mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56: 45-57 (1997)

- Sandri M, Minetti C, Pedemonte M and Carraro U.** Apoptotic myonuclei in human Duchenne Muscular Dystrophy. *Lab. Invest.* 78: 1005-16 (1998a)
- Sandri M, Massimino ML, Cantini M, Giurisato E, Sandri C, Arslan P and Carraro U.** Dystrophin deficient myotubes undergo apoptosis in mouse primary muscle cell culture after DNA damage. *Neurosci. Lett.* 252: 123-6 (1998b)
- Sandri M and Carraro U.** Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 1373-90 (1999)
- Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Pavinen M and Viopio-Pulkki LM.** Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation.* 95: 320-3 (1997)
- Saraste A.** Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz.* 24: 189-95 (1999)
- Sastre J, Asensi M, Gasco E, Pallardo FV, Ferrero JA, Furukawa T, Vina J.** Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol.* 263: R992-5 (1992)
- Sauer LA, Stayman JW and Dauchy RY.** Amino acid, glucose and lactic acid utilization in vivo by rat tumors. *Cancer Res.* 42: 4090-7 (1982)
- Sauleda J, Garcia-Palmer F, Wiesner RJ, Tarraga S, Harting I, Tomas P, Gomez C, Saus C, Palou A, Agusti AG.** Cytochrome oxidase activity and mitochondrial gene expression in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 157: 1413-7 (1998)
- Sayed MM.** Alterations in calcium signaling and cellular responses in septic injury. *New Horiz.* 4: 72-86 (1996)
- Scalfi L, Coltorti A, Sapio C, di Biase G, Borrelli R and Contaldo F.** Predicted and measured resting energy expenditure in healthy young women. *Clin. Nutr.* 12: 1-7 (1993)
- Schall TJ, Lewis M, Koller KJ, Lee A, Rice GC, Wong GHW, Gatanaga T, Granger GA, Lentz R, Raab H, Kohr WJ and Goeddel DV.** Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell.* 61: 361-70 (1990)
- Scheurich P, Thoma B, Unglaub R and Pfizenmaier K.** Tumor necrosis factor/cachectin and related cytokines. Bonavida, Gefford, Kirchner and Old, eds. Karger, Basel. .p.p 38-44 (1988)
- Scheurich P, Kobrich G and Pfizenmaier K.** Antagonistic control of tumor necrosis factor receptors by protein kinase A and kinase C. Enhancement of TNF receptor synthesis by protein kinase and transmodulation of receptors by protein kinase C. *J. Exp. Med.* 170: 947-58 (1989)
- Schievella AR, Chen JH, Graham JR and Lin LL.** MADD, a novel death domain protein that interacts with the type 1 tumor necrosis factor receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 272: 12069-75 (1997)
- Shimizu Y, Nagaya N, Isobe T, Imazu M, Okumura H, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Kohno N.** Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clin Cancer Res.* 9: 774-8 (2003)
- Shinohara H, Killion JJ, Bucana CD, Yano S and Fidler IJ.** Oral administration of the immunomodulator JBT-3002 induces endogenous interleukin 15 in intestinal macrophages for protection against irinotecan-mediated destruction of intestinal epithelium. *Clin. Cancer. Res.* 5: 2148-56 (1999)
- Shinozaki M, Hirahashi J, Lebedeva T, Liew FY, Salant DJ, Maron R and Kelley VR.** IL-15, a survival factor for kidney epithelial cells, counteracts apoptosis and inflammation during nephritis. *J. Clin. Invest.* 109: 951-60 (2002)
- Schlesinger MJ.** The ubiquitin system and the heat shock response. In: Stress Proteins. Schlesinger, Santoro, Garaci, eds. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 81-88 (1990)

- Schoenfeld HJ, Poeschl B, Frey HR, Loetscher H, Hunziker W, Lusting A and Zulauf M.** Efficient purification of recombinant human factor beta from *E. coli* yields biologically active proteins with trimeric structure that binds to both TNF receptors. *J. Biol. Chem.* 266: 3863-9 (1991)
- Schols AM, Soeters PB, Dingemans AM, Mostert R, Frantzen PJ and Wouters EF.** Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. *Am Rev Respir Dis.* 147: 1151-6 (1993)
- Schols AM, Soeters PB, Mostert R, Pluymers RJ and Wouters EF.** Physiologic effects of nutritional support and anabolic steroids in patients with chronic obstructive pulmonary disease. A placebo-controlled randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 152: 1268-74 (1995)
- Schols AM, Buurman WA, Staal van den Brekel AJ, Dentener MA and Wouters EF.** Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 51: 819-24 (1996)
- Schols AM, Slangen J, Volovics L and Wouters EF.** Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 157: 1791-7 (1998)
- Schrauwen P, Xia J, Bogardus C, Pratley RE and Ravussin E.** Skeletal muscle UCP3 expression is a determinant of energy expenditure in Pima Indians. *Diabetes.* 48: 146-9 (1999b)
- Schulze PC, Kratzsch J, Linke A, Schoene N, Adams V, Gielen S, Erbs S, Moebius-Winkler S, Schuler G.** Elevated serum levels of leptin and soluble leptin receptor in patients with advanced chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 5: 33-40 (2003)
- Schulze-Osthoff K, Walczak H, Dröge W and Kramer PH.** Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J. Cell. Biol.* 127: 15-20 (1994)
- Schutze S, Machleidt T and Kronke M.** Mechanisms of tumor necrosis factor action. *Semin Oncol.* 19: 16-24 (1992)
- Schütze S, Potthoff K, Machleidt T, Berkovic D, Wuegmann K and Krönke M.** TNF activates NF- κ B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced acidic sphingomyelin breakdown. *Cell.* 71: 765-76 (1992)
- Schwartz LM, Kosz L and Kay B.** Gene activation is required for developmentally programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 6594-8 (1990)
- Schwartz LM, Myer A, Kosz L, Engelstein M and Maier C.** Activation of polyubiquitin gene expression during developmentally programmed cell death. *Neuron.* 5: 411-9 (1990)
- Schwartz LM and Osborne BA.** Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol. Today.* 14: 582-90 (1993)
- Sciurba FC, Rogers RM, Keenan RJ, Slivka WA, Gorcsan J 3rd, Ferson PF, Holbert JM, Brown ML, Landreneau RJ.** Improvement in pulmonary function and elastic recoil after lung-reduction surgery for diffuse emphysema. *N Engl J Med.* 334: 1095-9 (1996)
- Selby PJ, Hobbs S, Viner C, Jackson E, Smith IE and McElwain TJ.** Endogenous tumor necrosis factor in cancer patients. *Lancet.* 8583: 483 (1988)
- Semb H, Peterson J, Tavernier J and Olivecrona T.** Multiple effects of tumor necrosis factor on lipoprotein lipase in vivo. *J. Biol. Chem.* 262: 8390-4 (1987)
- Semple PD, Beastall GH, Watson WS, Hume R.** Serum testosterone depression associated with hypoxia in respiratory failure. *Clin Sci (Lond).* 58: 105-6 (1980)

- Semsarian C, Wu MJ, Ju YK, Marciniec T, Yeoh T, Allen DG, Harvey RP, Graham RM.** Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature*. 400: 576-81 (1999)
- Servidei S, Mirabella M, Spinazzola A, Di Giovanni S, Silvestri G, Crociani P, DiMauro S and Tonali P.** Coenzyme Q10 reverses clinical and biochemical impairment and prevents apoptosis in familial muscle CoQ10 deficiency. *Neuromusc. Disord*. 8: 268 (1998)
- Sgonc R and Gruber J.** Apoptosis detection, an overview. *Exp. Gerontol*. 33: 525-33 (1998)
- Shang F, Gong X and Taylor A.** Activity of ubiquitin-dependent pathway in response to oxidative stress. Ubiquitin-activating enzyme is transiently up-regulated. *J. Biol. Chem*. 272: 23086-93 (1997)
- Shaw JH and Wolfe RR.** Glucose, fatty-acid, and urea kinetics in patients with severe pancreatitis: the response to substrate infusion and total parenteral nutrition. *Surgery*. 101: 181-91 (1986)
- Shear MJ and Turner FC.** Chemical treatment of tumors. V. Isolation of the hemorrhage-producing fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) culture filtrate. *J. Natl. Cancer Inst.* 4: 81-97 (1943)
- Sherry B, Jue DM, Zentella A and Cerami A.** Characterization of high molecular weight glycosylated forms of murine tumor necrosis factor. *Biophys. Biochem. Res. Commun*. 173: 1072-8 (1990)
- Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Akao Y, Kosaka H, Hasegawa JI, Matsuda H and Tsujimoto Y.** Involvement of ICE family proteases in apoptosis induced by reoxygenation of hypoxic hepatocytes. *Am. J. Physiol*. 271:G949-G958 (1996)
- Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Waguri S, Uchiyama Y, Matsuda H and Tsujimoto Y.** Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene*. 13: 21-9 (1996)
- Shimizu Y, Nagaya N, Isobe T, Imazu M, Okumura H, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K and Kohno N.** Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clin Cancer Res*. 9: 774-8 (2003)
- Siafakas NM and Tzanakis N.** Diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary disease: evidence-based medicine. *Monaldi Arch Chest Dis*. 53: 704-8 (1998)
- Sidhu RS and Bollon AP.** Tumor necrosis factor activities and cancer therapy: a perspective. *Pharmacol. Ther*. 57: 79-128 (1993)
- Sidoti-de Fraisse C, Rincheval V, Risler Y, Mignotte B and Vayssiere JL.** TNF-alpha activates at least two apoptotic signaling cascades. *Oncogene*. 17: 1639-51 (1998)
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res*. 175: 184-91 (1988)
- Sluss HK, Barrett T, Derijard B and Davis RJ.** Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol Cell Biol*. 14: 8376-84 (1994)
- Smith MR, Munger WE, Kung KF, Takacs L and Durum SK.** Direct evidence for an intracellular role for tumor necrosis factor- α . Microinjection of tumor necrosis factor kills target cells. *J. Immunol*. 144: 162-9 (1990)
- Smith KL and Tisdale MJ.** Mechanism of muscle protein degradation in cancer cachexia. *J. Cancer*. 68: 314-8 (1993)
- Smith J, Fowkes G and Schofield PN.** Programmed cell death in dystrophic (mdx) muscle is inhibited by IGF-II. *Cell Death Differ*. 2: 243-51 (1995)

- Smith J.** Muscle growth factors, ubiquitin and apoptosis in dystrophic muscle: apoptosis declines with age in the mdx mouse. *Basic Appl. Myol.* 6: 279-84 (1996)
- Smolewska E, Brozik H, Smolewski P, Biernacka-Zielinska M, Darzynkiewicz Z and Stanczyk J.** Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 62: 761-3 (2003)
- Smulson ME, Pang D, Jung M, Dimtchev A, Chasovskikh S, Spoonde A, Simbulan-Rosenthal C, Rosenthal D, Yakovlev A, Dritschilo A.** Irreversible binding of poly(ADP)ribose polymerase cleavage product to DNA ends revealed by atomic force microscopy: possible role in apoptosis. *Cancer Res.* 58: 3495-8 (1998)
- Snider GL.** Chronic obstructive pulmonary disease: risk factors, pathophysiology and pathogenesis. *Annu Rev Med.* 40: 411-29 (1989)
- Soda K, Kawakami M, Kashii A and Miyata M.** Characterization of mice bearing subclones of colon 26 adenocarcinoma disqualifies interleukin-6 as the sole inducer of cachexia. *Jpn. J. Cancer Res.* 85: 1124-30 (1994)
- Soddu S, Blandino G, Scardigli R, Coen S, Marchetti A, Rizzo MG, Bossi G, Cimino L, Crescenzi M and Sacchi A.** Interference with p53 protein inhibits hematopoietic and muscle differentiation. *J. Cell. Biol.* 134: 193-204 (1996)
- Soddu S, Coen S, Cerone MA, Porrello A and Mazzaro G.** Wild-type p53 protein is involved in skeletal muscle differentiation: dissection of molecular mechanism. *Abstract book VII Telethon Convention.* p.p. 163 (1998)
- Sohmura Y, Nakata K, Yoshida H, Kashimoto S, Matsui Y and Fwuichi H.** Recombinant human tumor necrosis factor. Antitumor effect on murine and human tumors transplanted in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 8: 357-68 (1986)
- Solomon V, Lecker SH and Goldberg AL.** The N-end rule pathway catalyzes a major fraction of the protein degradation in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 273: 25216-22 (1998)
- Song W, Lu X, Feng Q.** Tumor necrosis factor- α induces apoptosis via inducible nitric oxide synthase in neonatal mouse cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 45: 595-602 (2000)
- Sorimachi H, Ishiura S and Suzuki K.** Structure and physiological function of calpains *Biol. J.* 328: 721-32 (1997)
- Spangenburg EE, Williams JH, Roy RR, Talmadge RJ.** Skeletal muscle calcineurin: influence of phenotype adaptation and atrophy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 280: R1256-60 (2001)
- Spencer MJ, Walsh CM, Dorshkind KA, Rodrigues EM and Tidball JG.** Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx mouse occurs by perforin-mediated cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* 99: 2745-51 (1997)
- Spiegel RJ, Schaefer RJ, Magrath IT and Edwards BK.** Plasma lipid alterations in leukaemia and lymphoma. *Am. J. Med.* 72: 775-82 (1982)
- Spiegelman BM and Hotamisligil GS.** Through thick and thin: wasting, obesity and TNF- α . *Cell.* 73: 625-7 (1993)
- Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, Fiers W, Pious D and Strominger JL.** Genes for the tumor necrosis factor- α and factor- β are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 8699-702 (1986)
- Spitzer JJ, Bagby GJ, Mészáros K and Lang CH.** Altered control of carbohydrate metabolism in endotoxemia. *Prog. Clin. Biol. Res.* 286: 145-65 (1989)

- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES.** Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell.* 1: 949-57 (1998)
- Srivastava MD, Srivastava BI, Brouhard B.** Delta9 tetrahydrocannabinol and cannabidiol alter cytokine production by human immune cells. *Immunopharmacology.* 40: 179-85 (1998)
- Stangel M, Zettl UK, Mix E, Zielasek J, Toyka KV, Hartung HP and Golg R.** H₂O₂ and nitric oxide-mediated oxidative stress induces apoptosis in rat skeletal muscle myoblasts. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55: 36-43 (1996)
- Stansbie D, Brownsey RW, Crettaz M, Denton RM.** Acute effects in vivo of anti-insulin serum on rates of fatty acid synthesis and activities of acetyl-coenzyme A carboxylase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats. *Biochem J.* 160: 413-6 (1976)
- Starnes HF, Warren RS, Conti PS, Calvano SE and Brennan MF.** Redistribution of amino acids in rat liver and muscle induced by tumor necrosis factor requires the adrenal response. *Surg. Forum.* 18: 41-2 (1987)
- Starnes HF, Warren RS, Jeevanandam M, Gabrilove JL, Larchian W, Oettgen HF and Brennan MF.** Tumor necrosis factor and the acute metabolic response to tissue injury in man. *J. Clin. Invest.* 82: 1321-5 (1988)
- Stedman HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguie HC, Panettiere RA, Petrof B, Narusawa M, Leferovich JM, Sladky JT and Kelly AM.** The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature.* 352: 536-9 (1991)
- Steller H.** Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* 267: 1445-9 (1995)
- Stephens JM and Pekala PH.** Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor- α . *J. Biol. Chem.* 266: 21835-45 (1991)
- Stewart CE and Rotwein P.** Insulin-like growth factor-II is an autocrine survival factor for differentiating myoblasts. *J. Biol. Chem.* 271: 11330-8 (1996)
- Stoeck M, Kromer W and Gekeler V.** Induction of IL-15 mRNA and protein in A549 cells by pro-inflammatory cytokines. *Immunobiology* 199: 14-22 (1998)
- Stolpen AH, Guinan EC, Fiers W and Pober JS.** Recombinant tumor necrosis factor and immune interferon act singly and in combination to recognize human vascular endothelial cell monolayers. *Am. J. Pathol.* 123: 16-24 (1986)
- Stupka N, Gregorevic P, Plant DR, Lynch GS.** The calcineurin signal transduction pathway is essential for successful muscle regeneration in mdx dystrophic mice. *Acta Neuropathol (Berl).* 107: 299-310 (2004)
- Strain AJ.** Cancer cachexia in man: a review. *Invest. Cell. Pathol.* 2:181-193 (1979)
- Strassmann G, Fong M, Freter CE, Windsor S, D'Alessandro F and Nordan RP.** Suramin interferes with interleukin-6 receptor binding in vitro and inhibits colon-26-mediated experimental cancer cachexia in vivo. *J. Clin. Invest.* 92: 2152-9 (1993)
- Studley HO.** *J. Am. Med. Assoc.* 106: 458 (1936)
- Suffys P, Beyaert R, De Valck D, Vanhaesebroeck B, Van Roy F and Fiers W.** Tumor-necrosis-factor-mediated cytotoxicity is correlated with phospholipase-A₂ activity, but not with arachidonic acid per se. *Eur. J. Biochem.* 195: 465-75 (1991)
- Suffys P, Beyaert R, Van Roy F and Fiers W.** Reduced tumor necrosis factor induced cytotoxicity by inhibitors of the arachidonic acid metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149: 735-43 (1987)

Sugarman BJ, Aggarwal BB and Hass PE. Recombinant human tumor necrosis factor α : effects of proliferation on normal and transformed cells in vitro. *Science*. 230: 943-5 (1985)

Sugiura T, Murakawa Y, Nagai A, Kondo M and Kobayashi S. Fas and Fas ligand interaction induces apoptosis in inflammatory myopathies: CD4+ T cells cause muscle cell injury directly in polymyositis. *Arthritis Rheum*. 42: 291-8 (1999)

Sun XM and Hsueh W. Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by platelet-activating factor. *J. Clin. Invest*. 81: 1328-31 (1988)

Sun L, Youn HD, Loh C, Stolow M, He W, Liu JO. Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity*. 8: 703-11 (1998)

Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M and Kroemer G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med*. 184: 1331-42 (1996)

Suzuki H, Duncan GS, Takimoto H and Mak TW. Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain. *J. Exp. Med*. 185: 499-505 (1997)

Szalay K, Razga Z and Duda E. TNF inhibits myogenesis and downregulates the expression of myogenic regulatory factors myoD and myogenin. *Eur J Cell Biol*. 74: 391-8 (1997)

Szlachcic J, Massie BM, Kramer BL, Topic N and Tubau J. Correlation and prognostic implication of exercise capacity in chronic heart failure. *Am. J. Cardiol*. 55: 1037-42 (1985)

T

Tagaya Y, Burton JD, Miyamoto Y and Waldmann TA. Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells. *EMBO J*. 15: 4928-39 (1996a)

Tagaya Y, Bamford RN, DeFilippis AP and Waldmann TA. IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* 4: 329-36 (1996b)

Tagaya Y, Kurys G, Thies TA, Losi JM, Azimi N, Hanover JA, Bamford RN and Waldmann TA. Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 14444-9 (1997)

Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Hino T, Saito H, Yuki H, Kato S and Tomoike H. Circulating leptin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 159: 1215-9 (1999)

Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Inoue S, Hino T, Saito H, Yuki H, Kato S and Tomoike H. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 161: 1179-84 (2000)

Takahashi A. Caspase, executioner and undertaker of apoptosis. *Int. J. Hematol*. 70: 226-32 (1999)

Takeda K, Iwamoto S, Sugimoto H, Takuna T, Kawatani N, Noda M, Masaki A, Morise H, Arimura H and Konno K. Identity of differentiation-inducing factor and tumor necrosis factor. *Nature*. 323: 338-40 (1986)

Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, Marumo F and Hiroe M. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ. Res*. 75: 426-33 (1994)

- Tanaka Y, Eda H, Tanaka T, Udagawa T, Ishikawa T, Horii I, Ishitsuka H, Kataoka T, Taguchi T.** Experimental cancer cachexia induced by transplantable colon 26 adenocarcinoma in mice. *Cancer Res.* 50: 2290-5 (1990)
- Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA and Goeddel DV.** The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 9292-6 (1991)
- Tartaglia LA and Goeddel DV.** Two TNF receptors. *Immunol. Today.* 13: 151-3 (1992)
- Tartaglia LA, Pennica D and Goeddel DV.** Ligand passing: The 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signalling through by the 55-kDa TNF receptor. *J. Biol. Chem.* 268: 18542-8 (1993)
- Tayek JA, Bistrrian BR, Hehir DJ, Martin R, Moldawer LL and Blackburn GL.** Improved protein kinetics and albumin synthesis by branched chain amino acid-enriched total parenteral nutrition in cancer cachexia. A prospective randomized crossover trial. *Cancer.* 58: 147-57 (1986)
- Tayek JA, Heber D, Chlebowski RT.** Effect of hydrazine sulphate on whole-body protein breakdown measured by ¹⁴C-lysine metabolism in lung cancer patients. *Lancet.* 2: 241-4 (1987)
- Tayek JA.** A review of cancer cachexia and abnormal glucose metabolism in humans with cancer. *J. Am. Coll. Nutr.* 11: 455-6 (1992)
- Taylor DJ, Whitehead RJ, Evanson JM, Westmacott D, Feldmann M, Bertfield H, Morris MA and Woolley DE.** Effect of recombinant cytokines on glycolysis and fructose 2,6-bisphosphate in rheumatoid synovial cells in vitro. *Biochem. J.* 250: 111-5 (1988)
- Temparis S, Asensi M, Taillander D, Aurousseau E, Larbaud D, Obled A, Bechet D, Ferrara M, Estrela JM, Attaix D.** Increased ATP-ubiquitin dependent proteolysis in skeletal muscle of tumor bearing rats. *Cancer Res.* 54: 5568-73 (1994)
- Tessitore L, Bonelli G, Isidoro C, Kazakova OV, Baccino FM.** Comparative studies on protein turnover regulations in tumor cells and host tissues: development and analysis of an experimental model. *Toxicol Pathol.* 14: 451-6 (1986)
- Tessitore L, Bonelli G and Baccino FM.** Early development of protein metabolic perturbations in the liver and skeletal muscle of tumour-bearing rats. A model system for cancer cachexia. *Biochem. J.* 241: 153-9 (1987)
- Tessitore L, Costelli P and Baccino FM.** Humoral mediation for caquexia in tumor bearing rats. *Br. J. Cancer.* 67: 15 (1993)
- Tessitore L, Costelli P, Bonetti G, Baccino FM.** Cancer cachexia, malnutrition, and tissue protein turnover in experimental animals. *Arch Biochem Biophys.* 306: 52-8 (1993)
- Tews DS and Goebel HH.** DNA-fragmentation and expression of apoptosis-related proteins in muscular dystrophies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 23: 331-8 (1997a)
- Tews DS, Goebel HH and Meinck HM.** DNA-fragmentation and apoptosis-related proteins of muscle cells in motor neuron disorders. *Acta. Neurol. Scand.* 96: 380-6 (1997b)
- Tews DS, Goebel HH, Schneider I, Gunkel A, Stennert E and Neiss WF.** DNA-fragmentation and expression of apoptosis-related proteins in experimentally denervated and reinnervated rat facial muscle. *Neuropathol. Appl. Neurol.* 23: 141-49 (1997c)
- Tews DS and Goebel HH.** Cell death and oxidative damage in inflammatory myopathies. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 87: 240-7 (1998)

- Thomas HC, Lame MW, Dunston SK, Segall HJ and Wilson DW.** Monocrotaline pyrrole induces apoptosis in pulmonary artery endothelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151: 236-44 (1998)
- Thomason DB, Morrison PR, Oganov V, Ilyina-Kakueva E, Booth FW and Baldwin KM.** Altered actin and myosin expression in muscle during exposure to microgravity. *J. Appl. Physiol.* 73: S90-S93 (1992)
- Thompson JR and Wu G.** The effect of ketone bodies on nitrogen metabolism in skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 100: 209-16 (1991)
- Thompson HS and Scordilis SP.** Ubiquitin changes in human biceps muscle following exercise-induced damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204: 1193-8 (1994)
- Thornberry NA and Lazebnik Y.** Caspases. Enemies within. *Science.* 281: 1312-6 (1998)
- Tiao G, Fagan JM, Samuels N, James JH, Hudson K, Lieberman M, Fischer JE and Hasselgren PO.** Sepsis stimulates nonlysosomal, energy-dependent proteolysis and increases ubiquitin mRNA levels in rat skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 94: 2255-64 (1994)
- Tiao G, Hobler S, Wang JJ, Meyer TA, Luchette FA, Fischer JE and Hasselgren PO.** Sepsis is associated with increased mRNAs of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in human skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 99: 163-8 (1997)
- Tidball JG, Albrecht DE, Lokensgard BE and Spencer MJ.** Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle. *J. Cell. Science.* 108: 2197-204 (1995)
- Tisdale MJ.** Newly identified factors that alter host metabolism in cancer cachexia. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 153-9 (1990)
- Tisdale MJ.** Cancer cachexia. *Anticancer drugs.* 4: 115-25 (1993)
- Tisdale MJ.** Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations. *Nutrition.* 13: 1-7 (1997)
- Todorov P, Cariuk P, McDevitt T, Coles B, Fearon K and Tisdale MJ.** Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature.* 379: 739-42 (1996)
- Todorov PT, Field WN and Tisdale MJ.** Role of a proteolysis-inducing factor (PIF) in cachexia induced by a human melanoma (G361). *Br. J. Cancer.* 80: 1734-7 (1999)
- Tomas FM, Murray AJ, Jones LM.** Modification of glucocorticoid-induced changes in myofibrillar protein turnover in rats by protein and energy deficiency as assessed by urinary excretion of Ntau-methylhistidine. *Br J Nutr.* 51: 323-37 (1984)
- Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R and Mann DL.** Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation.* 92: 1487-93 (1995)
- Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Harirri RJ, Fahey TJ, Zentella A, Albert JD, Shires GT and Cerami A.** Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science.* 234: 470-4 (1986a)
- Tracey KJ, Lowry SF, Beutler B, Cerami A, Albert JD and Shires GT.** Cachectin/tumor necrosis factor mediates changes of skeletal muscle plasma membrane potential. *J. Exp. Med.* 164: 1368-73 (1986b)
- Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, Nguyen HT, Kuo GC, Beutler B, Cotran RS, Cerami A and Lowry SF.** Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia and inflammation. *J. Exp. Med.* 167: 1211-27 (1988)
- Tracey KJ.** TNF and other cytokines in the metabolism of septic shock and cachexia. *Clin. Nutr.* 11: 1-11 (1992)

Tracey KJ and Cerami A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9: 317-43 (1993)

Trausch JS, Grenfell SJ, Handley-Gearhart PM, Ciechanover A and Schwart AL. Immunofluorescent localization of the ubiquitin-activating enzyme, E1, to the nucleus and cytoskeleton. *Am. J. Physiol.* 264: C93-C102 (1993)

Tredget EE, Yu YM, Zhong S, Burini R, Okusawa S, Gelfand JA, Dinarello CA, Young VR and Burke JF. Role of interleukin 1 and tumor necrosis factor in energy metabolism in rabbits. *Am. J. Physiol.* 255: E760-8 (1988)

Trent JM, Kaneko Y and Mitelman F. Report of the committee on structural chromosome changes in neoplasia. Tenth International Workshop on Human Gene Mapping. *Cytogen. Cell Genet.* 51: 533-62 (1989)

Trotta PP. Cytokines: an overview. *Am. J. Reprod. Immunol.* 25: 137-41 (1991)

Trucco C, Oliver FJ, de Murcia G, Menissier-de Murcia J. DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Res.* 26: 2644-9 (1998)

Tsigos C, Papanicolau DA, Kyrou I, Defensor R, Mitsiadis CS and Chrousos GP. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 4167-4170 (1997)

Tsubata T. Apoptosis of mature B cells. *Int. Rev. Immunol.* 18: 347-65 (1999)

Tsujimoto Y. Apoptosis and necrosis. Intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death Differ.* 4: 429-34 (1997)

U

Uehara A, Sekiya C, Takasugi Y and Namiki M. Neuropeptide Y and the development of cancer anorexia. *Am. J. Physiol.* 257: 613-7 (1989)

Ullum H, Haahr PM, Diamant M, Palmo J, Halkjaer-Kristensen J, Pedersen BK. Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, or TNF-alpha pre-mRNA in BMNC. *J Appl Physiol.* 77: 93-7 (1994)

Umansky SR, Pisarenko O, Serebryakova L, Studneva I, Tskitishvili O, Khutzian S, Sukhova T, Lichtenstein A, Ossina N and Kiefer M. Dog cardiomyocyte death induced in vivo by ischemia and reperfusion. *Basic Appl. Myol.* 6: 227-35 (1996)

Umpleby AM, Russell-Jones DL. The hormonal control of protein metabolism. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 10: 551-70 (1996)

V

Vainer B, Nielsen OH, Hendel J, Horn T and Kirman I. Colonic expression and synthesis of interleukin 13 and interleukin 15 in inflammatory bowel disease. *Cytokine* 12: 1531-6 (2000)

Vaisman N and Hahn T. Tumor necrosis factor- α and anorexia. Cause or effect?. *Metabolism.* 40: 720-3 (1991)

Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR and Verma IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science.* 274: 787-9 (1996)

- Van Buren CT, Rudolph FB, Kulkarni A, Pizzini R, Fanslow WC, Kumar S.** Reversal of immunosuppression induced by a protein-free diet: comparison of nucleotides, fish oil, and arginine. *Crit Care Med.* 18(2 Suppl): S114-7 (1990)
- Van Eys J.** Effects of nutritional status in response to therapy. *Cancer Res.* 42: S747-53 (1982)
- Van Eys J.** Nutrition and cancer: physiological interrelationships. *Annu. Rev. Nutr.* 5: 435-42 (1985)
- van Royen M, Carbo N, Busquets S, Alvarez B, Quinn LS, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM.** DNA fragmentation occurs in skeletal muscle during tumor growth: A link with cancer cachexia? *Biochem Biophys Res Commun.* 270: 533-7 (2000)
- Van Wyk JJ, Bruton ET.** Molecular basis for species and ligand specificity of a monoclonal antibody raised against human IGF-I. *Endocrinology.* 138: 4521-2 (1997)
- Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R and Fiers W.** Two tumor necrosis factor receptors: structure and functions. *Trends. Cell. Biol.* 5: 392-9 (1995)
- Van-Ostade X, Vandenabeele P, Everaerd B, Loetscher H, Gentz R, Brockhaus M, Lesslauer W, Tavernier J, Brouckaert P and Fiers W.** Human TNF mutants with selective activity on the p55 receptor. *Nature.* 361: 266-9 (1993)
- Varshavsky A.** The N-end rule. *Cell.* 69: 725-35 (1992)
- Vassilakopoulos T, Zakyntinos S, Roussos C.** Strenuous resistive breathing induces proinflammatory cytokines and stimulates the HPA axis in humans. *Am J Physiol.* 277: R1013-9 (1999). Erratum in: *Am J Physiol* 277: preceding 1541 (1999)
- Veal EA and Jackson MJ.** Ubiquitin, c-myc, bcl-2, bax and other relevant genes in normal and mdx mouse muscle at various stages of the life cycle. *Basic Appl. Myol.* 6: 311 (1996)
- Vercammen D, Brouckaert G, Denecker G, Van de Craen M, Declercq W, Fiers W and Vandenabeele P.** Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J. Exp. Med.* 188: 919-30 (1998)
- Vescovo G, Zennaro R, Sandri M, Carraro U, Leprotti C, Ceconi C, Ambrosio GB and Dalla-Libera L.** Apoptosis of skeletal muscle myofibers and interstitial cells in experimental heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30: 2449-59 (1998)
- Vescovo G, Volterrani M, Zennaro R, Sandri M, Ceconi C, Lorusso R, Ferrari R, Ambrosio GB and Dalla Libera L.** Apoptosis in the skeletal muscle of patients with heart failure: investigation of clinical and biochemical changes. *Heart.* 84: 431-7 (2000)
- Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha V, Cortright R, Muoio DM and Lowell BB.** Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J. Biol. Chem.* 275: 16258-66 (2000a)
- Vidal-Puig AJ.** Uncoupling expectations. *Nature Genet.* 26: 387-8 (2000b)
- Viegi G, Scognamiglio A, Baldacci S, Pistelli F and Carrozzi L.** Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Respiration.* 68: 4-19 (2001)
- Vigano A, Watanabe S, Bruera E.** Anorexia and cachexia in advanced cancer patients. *Cancer Surv.* 21: 99-115 (1994)
- Vijay-Kurnar S, Bugg CE and Cook WJ.** Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 194: 531-44 (1987)

Vincenz C and Dixit VM. Fas-associated death domain protein interleukin-1beta-converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling. *J Biol Chem.* 272: 6578-83 (1997)

Viña J, Servera E, Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Ferrero JA, Garcia-De-La-Asuncion J, Anton V, Marin J. Exercise causes blood glutathione oxidation in chronic obstructive pulmonary disease: prevention by O₂ therapy. *J Appl Physiol.* 81: 2198-202 (1996)

Vita G, Monici MC, Toscano A, Musumeci O, Aguenouz M and Migliorato A. DNA fragmentation in metabolic myopathies. *Neuromusc. Disor.* 8: 257 (1998)

Vlassara H, Spiegel RJ, Sandoval D and Cerami A. Reduced plasma-lipoprotein lipase activity in patients with malignancy-associated weight-loss. *Horm. Metab. Res.* 18: 698-703 (1986)

Von Roenn JH, Armstrong D, Kotler DP, Cohn DL, Klimas NG, Tchekmedyian NS, Cone L, Brennan PJ, Weitzman SA. Megestrol acetate in patients with AIDS-related cachexia. *Ann Intern Med.* 121: 393-9 (1994)

W

Waage A and Spevik T. Interleukin 1 potentiates the lethal effect of tumor necrosis factor-alpha/cachectin in mice. *J. Exp. Med.* 167: 1987-92 (1988)

Waalkes TP, Udenfriend S. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. *J Lab Clin Med.* 50: 733-6 (1957)

Wachtel H. Species differences in behavioural effects of rolipram and other adenosine cyclic 3H, 5H-monophosphate phosphodiesterase inhibitors. *J Neural Transm.* 56: 139-52 (1983)

Wallace DC, Richter C, Borh VA, Cortopassi G, Kadenbach B, Linn S, Linnane AW and Shay JW. The role of bioenergetics and mitochondrial DNA mutations in aging and age-related diseases. In: Konferenz Dahlem. Molecular Aspects of Aging, Wiley, Chichester. p.p. 199-225 (1995)

Wallach D. Preparations of lymphotoxin induce resistance to their own cytotoxic effect. *J. Immunol.* 132: 2464-9 (1984)

Wallstrom J, Andersson AK and Sandler S. Effects of interleukin-15 on suppression of rat pancreatic islets in vitro induced by proinflammatory cytokines. *Immunol. Lett.* 88: 141-5 (2003)

Wang CY, Mayo MW and Baldwin AS. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science.* 274: 784-7 (1996a)

Wang J and Walsh K. Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation. *Science.* 273: 359-61 (1996b)

Wang ZM, Messi ML, Renganathan M, Delbono O. Insulin-like growth factor-1 enhances rat skeletal muscle charge movement and L-type Ca²⁺ channel gene expression. *J Physiol.* 516: 331-41 (1999)

Warburg O. Metabolism of tumors. Arnold Costable, London. (1930)

Warren S. The immediate causes of death in cancer. *Am. J. Med. Sci.* 184: 610-5 (1932)

Warren RS, Donner DB, Starnes HF Jr and Brennan MF. Modulation of endogenous hormone action by recombinant human tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 8619-22 (1987a)

Warren RS, Starnes HF, Gabrilove JL, Oettgen HF and Brennan MF. The acute metabolic effects of tumor necrosis factor administration in humans. *Arch. Surg.* 122: 1396-400 (1987b)

- Warren RS, Starnes HF, Alcock N, Calvano S and Brennan MF.** Hormonal and metabolic response to recombinant human tumor necrosis factor in rat: in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol.* 255: E206-12 (1988)
- Washizu J, Nishimura H, Nakamura N, Nimura Y and Yoshikai Y.** The NF-kappaB binding site is essential for transcriptional activation of the IL-15 gene. *Immunogenetics* 48: 1-7 (1998)
- Waterhouse C, Jeanpetre N and Keitlson J.** Gluconeogenesis from alanine in patients with progressive malignant disease. *Cancer Res.* 39: 1968-72 (1979)
- Watzl B, Scuderi P, Watson RR.** Marijuana components stimulate human peripheral blood mononuclear cell secretion of interferon-gamma and suppress interleukin-1 alpha in vitro. *Int J Immunopharmacol.* 13: 1091-7 (1991)
- Webb JN.** Cell death in developing skeletal muscle: histochemistry and ultrastructure. *J. Pathol.* 123: 175-80 (1977)
- Weber P, Brown S and Mueller L.** ¹H-NMR resonance assignments and secondary structure identification of human ubiquitin. *Biochemistry.* 26: 7282-90 (1987)
- Weiler M, Rogashev B, Einbinder T, Hausmann MJ, Kaneti J, Chaimovitz C, Douvdevani A.** Interleukin-15, a leukocyte activator and growth factor, is produced by cortical tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 9: 1194-201(1998)
- Weiss T, Grell M, Hessabi B, Bourteele S, Muller G, Scheurich P and Wajant H.** Enhancement of TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptor p80: requirement of the TNF receptor-associated factor-2 binding site. *J. Immunol.* 158: 2398-404 (1997)
- Werk EE, Sholiton LJ and Marnell RT.** *Metabolism.* 13: 1425 (1964)
- Westermann S, Vollmar B, Thorlaciuss H and Menger MD.** Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. *Surgery.* 126: 881-9 (1999)
- Wherry JC, Pennington JE and Wenzel RP.** Tumor necrosis factor and the therapeutic potential of anti-tumor necrosis factor antibodies. *Crit. Care Med.* 21: S436-40 (1993)
- White CW and Repine JE.** Pulmonary antioxidant defense mechanisms. *Exp Lung Res.* 8: 81-96 (1985)
- Wiborg O, Pedersen MS, Wind A, Berglund LE, Marcker KA and Vuust J.** The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences. *EMBO J.* 4: 755-9 (1985)
- Wiemann B and Starnes CO.** Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmac. Ther.* 64: 529-64 (1994)
- Wiergnann K, Schütze S, Machleidt T, Witte D and Kronke M.** Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell.* 78: 1005-15 (1994)
- Wigmore SJ, Falconer JS, Plester CE, Ross JA, Maingay JP, Carter DC and Fearon KC.** Ibuprofen reduces energy expenditure and acute phase protein production compared with placebo in pancreatic cancer patients. *Br. J. Cancer.* 72: 185-8 (1995)
- Wigmore SJ, Ross JA, Falconer JS, Plester CE, Tisdale MJ, Carter DC, Fearon KC.** The effect of polyunsaturated fatty acids on the progress of cachexia in patients with pancreatic cancer. *Nutrition.* 12: S27-30 (1996)
- Wigmore SJ, Plester CE, Richardson RA and Fearon KCH.** Changes in nutritional status associated with unresectable pancreatic cancer. *Br. J. Cancer.* 75: 106-9 (1997a)

- Wigmore SJ, Plester CE, Ross JA and Fearon KCH.** Contribution of anorexia and hypermetabolism to weight loss in anicteric patients with pancreatic cancer. *Br. J. Surg.* 84: 196-7 (1997b)
- Wigmore SJ, Todorov PT, Barber MD, Ross JA, Tisdale MJ and Fearon KC.** Characteristic of patients with pancreatic cancer expressing a novel cancer cachectic factor. *Br. J. Surg.* 87: 53-8 (2000)
- Wilkinson KD.** Ubiquitin-dependent signaling: the role of ubiquitination in the response of cells to their environment. *J. Nutr.* 129: 1933-6 (1999)
- Wilkinson KD.** Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Cell Dev. Biol.* 11: 141-8 (2000)
- Williams A, Sun X, Fischer JE and Hasselgren PO.** The expression of genes in the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway is increased in skeletal muscle from patients with cancer. *Surgery.* 126: 744-50 (1999)
- Wing SS and Goldberg AL.** Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting. *Am. J. Physiol.* 264: E668-E676 (1993)
- Winkelhake JL, Stampfl S and Zimmerman RJ.** Synergistic effects of combination therapy with human recombinant interleukin-2 and tumor necrosis factor in immune tumor models. *Cancer Res.* 47: 3948-53 (1989)
- Wolf RF, Heslin MJ, Newman E, Pearlstone DB, Gonenne A, Brennan MF.** Growth hormone and insulin combine to improve whole-body and skeletal muscle protein kinetics. *Surgery.* 112: 284-91 (1992a)
- Wolf RF, Pearlstone DB, Newman E, Heslin MJ, Gonenne A, Burt ME, Brennan MF.** Growth hormone and insulin reverse net whole body and skeletal muscle protein catabolism in cancer patients. *Ann Surg.* 216: 280-8 (1992b)
- Wong JM, Mafune K, Yow H, Rivers EN, Ravikumar TS, Steele GDjr and Chen LB.** Ubiquitin-ribosomal protein S27a gene overexpressed in human colorectal carcinoma is an early growth response gene. *Cancer Res.* 53: 1916-20 (1993)
- Woods SC, Seeley RJ, Porte D Jr and Schwartz MW.** Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science.* 280: 1378-1383 (1998)
- Wu M, Lee H, Bellas RE, Schauer SL, Arsura M, Katz D, FitzGerald MJ, Rothstein TL, Sherr DH and Sonenshein GE.** Inhibition of NF-kappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J.* 15: 4682-90 (1996)
- Wu TS, Lee JM, Lai YG, Hsu JC, Tsai CY, Lee YH and Liao NS.** Reduced expression of Bcl-2 in CD8+ T cells deficient in the IL-15 receptor alpha-chain. *J. Immunol.* 168: 705-12 (2002)
- Wuttge DM, Eriksson P, Sirsjo A, Hansson GK and Stemme S.** Expression of interleukin-15 in mouse and human atherosclerotic lesions. *Am. J. Pathol.* 159: 417-23 (2001)
- Wyllie AH.** Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 284: 555-6 (1980)

X

- Xu B, Dube MG, Kalra PS, Farmerie WG, Kaibara A, Moldawer LL, Martin D and Kalra SP.** Anorectic effects of the cytokine, ciliary neurotrophic factor, are mediated by hypothalamic neuropeptide Y: comparison with leptin. *Endocrinology.* 139: 466-473 (1998a)

Y

Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*. 270: 725-7 (1977)

Yamakawa T, Eguchi S, Matsumoto T, Yamakawa Y, Numaguchi K, Miyata I, Reynolds CM, Motley ED and Inagami T. Intracellular signaling in rat cultured vascular smooth muscle cells: roles of nuclear factor-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase on tumor necrosis factor-alpha production. *Endocrinology*. 140: 3562-72 (1999)

Yamamoto N, Kawamura I, Nishigaki F, Tsujimoto S, Naoe Y, Inami M, Elizabeth L, Manda T, Shimomura K. Effect of FR143430, a novel cytokine suppressive agent, on adenocarcinoma colon26-induced cachexia in mice. *Anticancer Res*. 18: 139-44 (1998)

Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP and Wang X. Prevention of apoptosis by bcl-2, release of cytochrom c from mitochondria blocked. *Science*. 275: 1129-32 (1997)

Yang L, Thornton S and Grom AA. Interleukin-15 inhibits sodium nitroprusside-induced apoptosis of synovial fibroblasts and vascular endothelial cells. *Arthritis. Rheum*. 46: 3010-4 (2002)

Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H and Tamaki K. Interleukin 15 induces the signals of epidermal proliferation through ERK and PI 3-kinase in a human epidermal keratinocyte cell line, HaCaT. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 301: 841-7 (2003)

Yasuhara S, Kanakubo E, Perez ME, Kaneki M, Fujita T, Okamoto T and Martyn JA. The 1999 Moyer award. Burn injury induces skeletal muscle apoptosis and the activation of caspase pathway in rats. *J. Burn. Care. Rehabil*. 20: 462-70 (1999)

Yokoyama T, Nakano M, Bednarczyk JL, McIntyre BW, Entman M and Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation*. 95: 1247-52 (1997)

Yoshikai Y. The interaction of intestinal epithelial cells and intraepithelial lymphocytes in host defense. *Immunol. Res*. 20: 219-35 (1999)

Yuan JY and Horvitz HR. The caenorhabditis elegans genes ced-3 and ced-4 act cell autonomously to cause programmed cell death. *Dev. Biol*. 138: 33-41 (1990)

Yue TL, Ma XL, Wang X, Romanic AM, Liu GL, Loudon C, Gu JL, Kumar S, Poste G, Ruffolo RR and Feuerstein GZ. Possible involvement of stress-activated protein kinase signaling pathway and FAS receptor expression in prevention of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis by carvedilol. *Circ. Res*. 82: 166-74 (1998)

Z

Zamir O, Hasselgren PO, Kunkel SL, Frederick J, Higashiguchi T, Fischer JE. Evidence that tumor necrosis factor participates in the regulation of muscle proteolysis during sepsis. *Arch. Surg*. 127: 170-4 (1992)

Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssiere JL, Petit PX and Kroemer G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med*. 181: 1661-72 (1995)

Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M and Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med*. 183: 1533-44 (1996)

- Zapf J, Hauri C, Waldvogel M, Froesch ER.** Acute metabolic effects and half-lives of intravenously administered insulinlike growth factors I and II in normal and hypophysectomized rats. *J Clin Invest.* 77: 1768-75 (1986)
- Zentella Z, Manogue K and Cerami A.** Cachectin/TNF-mediated lactate production in cultured myocytes is linked to activation of a futile substrate cycle. *Cytokine.* 5: 436-47 (1993)
- Zhang XM, Weber MI and Chen MJ.** Site-directed mutational analysis of human tumor necrosis factor- α receptor binding site and structure-functional relationship. *J. Biol. Chem.* 267: 24069-75 (1992)
- Zhang LS and Aggarwal BB.** Role of sulphhydryl groups in induction of cell surface down-modulation and shedding of extracellular domain of human TNF receptors in human histiocytic lymphoma U937 cells. *J. Immunol.* 153: 3745-54 (1994)
- Zhang Y, Pilon G, Marette A, Baracos VE.** Cytokines and endotoxin induce cytokine receptors in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 279: E196-205 (2000)
- Zhao SP, Xie XM.** Captopril inhibits the production of tumor necrosis factor-alpha by human mononuclear cells in patients with congestive heart failure. *Clin Chim Acta.* 304: 85-90 (2001)
- Zhivotosky B, Burgess DH, Vanags DM and Orrenius S.** Involvement of cellular proteolytic machinery in apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230: 481-88 (1997)
- Zhu J, Shibasaki F, Price R, Guillemot JC, Yano T, Dotsch V, Wagner G, Ferrara P, McKeon F.** Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell.* 93: 851-61 (1998)
- Ziegler TR, Young LS, Benfell K, Scheltinga M, Hortos K, Bye R, Morrow FD, Jacobs DO, Smith RJ, Antin JH.** Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation. A randomized, double-blind, controlled study. *Ann Intern Med.* 116: 821-8 (1992)
- Zorzano A, Balon TW, Garetto LP, Goodman MN, Ruderman NB.** Muscle alpha-aminoisobutyric acid transport after exercise: enhanced stimulation by insulin. *Am J Physiol.* 248: E546-52 (1985)
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutsch G and Wang X.** Apaf-1, a human protein homologous to C.elegans CED-4, participates in cytochrom c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* 90: 405-13 (1997)
- Zou H, Li Y, Liu X and Wang X.** An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274: 11549-56 (1999)
- Zugmaier G, Paik S, Wilding G, Knabbe C, Bano M, Lupu R, Deschauer B, Simpson S, Dickson RB and Lippman M.** Transforming growth factor beta 1 induces cachexia and systemic fibrosis without an antitumor effect in nude mice. *Cancer Res.* 51: 3590-4 (1991)
- Zúñiga-Guijardo S, Garfinkel PE and Zinman B.** Changes in insulin sensitivity and clearance in anorexia nervosa. *Metabolism* 35: 1096-100 (1986)