

I. INTRODUCCIÓN

1. CAQUEXIA

La caquexia es un síndrome frecuentemente asociado al crecimiento tumoral, así como también a otros estados patológicos como son sepsis, SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), diabetes, etc. La caquexia se caracteriza por una importante y progresiva pérdida de peso corporal debida principalmente a la desaparición de las reservas de grasa y a la disminución de masa muscular. Está acompañada también de anorexia, náuseas, astenia, debilidad, alteración de la homeostasis hormonal e inmunodepresión (Strain, 1979).

Una pérdida de peso superior al 30% se considera irreversible (Studley, 1936); esto ha motivado amplios estudios para dilucidar la etiopatología de la caquexia. Otro hecho importante es que los pacientes que presentan este síndrome tienen una peor respuesta a la quimioterapia (Van Eys, 1982) y a la cirugía (De Wys et al., 1980). La caquexia es responsable del 22% de las muertes en enfermos con cáncer; de hecho, el grado de caquexia está inversamente correlacionado con el tiempo de supervivencia del paciente, y siempre implica un pronóstico desfavorable (Warren, 1932). De los pacientes con cáncer, de un 16 a un 73% presentan los síntomas de la caquexia (Nixon *et al.*, 1980).

Entender la etiopatogenia de este síndrome es muy complejo, pero podemos caracterizarlo por un desgaste que padecen algunos tejidos como son el músculo esquelético y el tejido adiposo. Teniendo en cuenta lo anterior, podemos diferenciar dos componentes básicos entre las causas que conducen al estado caquético: como primer punto tenemos la disminución de la ingesta observada en los pacientes con cáncer, y por otro lado las alteraciones de carácter bioquímico y fisiológico que padecen estos pacientes por la presencia del tumor. Las alteraciones de los factores humorales y tumorales se consideran la causa de la pérdida de las reservas de grasa y del tejido muscular.

La presencia y crecimiento del tumor están asociados invariablemente a un estado de malnutrición debido a la inducción de anorexia o disminución de la ingesta, lo que conduce a un estado de malnutrición. Se han encontrado múltiples factores que intervienen y favorecen la pérdida de peso en los pacientes con cáncer, pero ninguno de éstos es capaz de explicar la etiología de este síndrome. Uno de estos factores puede ser una obstrucción mecánica del tracto gastrointestinal, que conlleva a una absorción deficiente de los nutrientes (Blackwell, 1961). Otro factor muy importante y frecuente es la anorexia, que provoca una menor ingesta. Debemos tener en cuenta que en un caso de crecimiento tumoral, éste compite con el huésped por los nutrientes, lo que lleva al paciente a un acelerado estado de inanición, que provoca a su vez graves perturbaciones metabólicas en el individuo (Argilés *et al.*, 1992).

1.1 MALNUTRICIÓN

La incidencia de la malnutrición en los pacientes neoplásicos varía en función del estado de la enfermedad, del tipo de tumor y de su localización. La malnutrición es responsable, al menos en parte, del deterioro general del huésped. Sin embargo, no es el principal factor, ya que una correcta nutrición por vía parenteral o enteral no consiguen revertir esta situación. Algunos intentos de aumentar la ingesta energética a través de cambios en la dieta no han conseguido revertir la caquexia (Oversen *et al.*, 1993) y otras pruebas con nutrición enteral y parenteral tampoco han conseguido producir beneficios en lo que se refiere a un aumento en el tiempo medio de supervivencia o un aumento de peso a largo plazo. Aunque se observa una ganancia de peso a corto plazo, ésta acaba perdiéndose, lo que sugiere que sea más bien atribuida a retención de agua (Evans *et al.*, 1985). Numerosos estudios sobre las anormalidades del huésped indican que la caquexia no es un simple estado de desnutrición. En este sentido, los individuos portadores de tumor comparten una serie de alteraciones metabólicas con los individuos sanos que están bajo restricción

alimenticia (Brennan, 1981), pero son incapaces de desarrollar unas adaptaciones metabólicas comparables (Nixon *et al.*, 1988). Los individuos normales se adaptan a la restricción de nutrientes exógenos con una reducción compensatoria del gasto energético, y cambiando de la fase inicial aguda de consumo de proteína del músculo y del hígado a una fase de restricción del desgaste proteico y de aumento de la utilización de las reservas de tejido adiposo (Brennan, 1977). Por el contrario, en los individuos portadores de tumor el gasto de energía está inalterado o incluso aumentado (Moldawer y Copeland, 1988), y hay una movilización sostenida de las proteínas corporales, siendo su supervivencia generalmente independiente de las reservas de lípidos (Morrison, 1989). Además, en la caquexia cancerosa el desgaste que presenta el músculo esquelético contrasta con la relativa preservación del hígado y otros órganos, mientras que durante la malnutrición estos últimos también están afectados (Fearon *et al.*, 1988).

Se han descrito diferentes mecanismos que pueden estar implicados en la malnutrición:

1.1.1. ALTERACIONES DEL APARATO DIGESTIVO Y MALABSORCIÓN

Las alteraciones del aparato digestivo pueden ser debidas directamente al tumor, cuando éste se localiza en algún lugar del tracto gastrointestinal, interfiriendo mecánicamente con la digestión. La malabsorción se presenta con frecuencia en pacientes con cáncer y puede contribuir notablemente al empeoramiento del individuo. Puede ser de origen iatrogénico después de un tratamiento quirúrgico, por radiaciones o con fármacos antineoplásicos. A veces puede ser debida directamente a la enfermedad, por ejemplo, cuando el tumor se localiza en el páncreas o en la vía bilio-pancreática. Además, el tracto digestivo puede ser la diana donde actúen los compuestos liberados por el tumor, como esteroides, prostaglandinas y citoquinas (moléculas proteicas producidas por el tumor o por el sistema inmunitario en respuesta a estímulos invasivos). De hecho, después de la administración de citoquinas como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) o la interleuquina 1 (IL-1) se observa una disminución de la absorción de lípidos y aminoácidos (Argilés *et al.*, 1989a).

1.1.2. ANOREXIA

La anorexia se puede definir como la pérdida del apetito sumado a una sensación de saciedad temprana, y se presenta en más de la mitad de los pacientes diagnosticados de cáncer (Grosvenor *et al.*, 1989). La anorexia normalmente se asocia al síndrome de la caquexia, pero ésta no es la causa principal de dicho síndrome, ya que la anorexia por si sola es incapaz de producir el desgaste de los tejidos observado en la caquexia. La caquexia supone una disminución muy importante de la masa muscular (músculo esquelético), situación que no ocurre en la anorexia nerviosa (Moley *et al.*, 1987). Otra prueba de que la anorexia no tiene un papel principal en la caquexia es que este síndrome se puede presentar sin anorexia; esto se ha observado en humanos y ratones (Bibby *et al.*, 1987). Todo esto nos muestra que la anorexia parece ser un fenómeno separado de la caquexia, y que su comprensión es importante para un correcto tratamiento.

1.1.3. MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE LA ANOREXIA

El apetito y los patrones alimenticios están regulados por una serie de factores psicológicos, gastrointestinales, metabólicos y nutricionales, así como por mecanismos neuronales y endocrinos (Plata-Salamán, 1991a). El paciente canceroso anoréxico presenta una precoz sensación de saciedad y una disminución del apetito. Las causas de la anorexia pueden proceder en algunos casos del tratamiento anticanceroso (tales como quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia), que puede producir, en diferentes

grados, náuseas y vómitos y, en consecuencia, anorexia. También pueden contribuir a la reducción de la ingesta alteraciones en la percepción de la comida (sabor y olor) o causas psicológicas, como la depresión (Balducci, 1985).

La anorexia puede ser debida a un efecto directo del tumor, cuando éste esté localizado en el hipotálamo o en el aparato digestivo (Van Eys, 1985). También se ha sugerido que algunos tumores pueden producir bombesina, la cual, actuando a nivel hipotalámico, produciría una sensación de saciedad precoz (Cuttita *et al.*, 1985). Sin embargo, en la mayoría de los casos el origen de la anorexia asociada a caquexia parece provenir de las alteraciones metabólicas que sufre el paciente por la presencia del tumor.

1.1.4. MEDIADORES DE LA ANOREXIA

La ingesta es una actividad compleja que resulta de la interrelación entre distintos sistemas (separados, pero estrechamente interrelacionados): principalmente el sistema nervioso central (SNC), el hígado y el tracto gastrointestinal (Meguid *et al.*, 1996). Dentro de cada sistema, diferentes factores (neurotransmisores, péptidos, hormonas, nutrientes) interaccionan para modular el acto de comer según las necesidades corporales del momento. De este modo, la saciedad, al igual que el hambre, son más el resultado de la interacción recíproca de diferentes estímulos químicos (inhibidores o estimuladores) en diferentes puntos anatómicos, que el efecto de un único factor localizado. Uno de los principales puntos implicados en la regulación de la homeostasis energética es el hipotálamo. La destrucción del núcleo paraventricular (NPV) hipotalámico provoca hiperfagia y obesidad, mientras que la del área lateral provoca una total afagia (Morrison, 1989). Por otra parte, no hay duda de que existen mediadores específicos (p.e.: serotonina) que son determinantes comunes que actúan en una vía final común, desarrollando de este modo un papel importante en la producción de un efecto específico (p.e.: saciedad). Se han propuesto diferentes mediadores, cuya producción o actuación se encuentra alterada en los estados caquéticos, que afectarían al complicado cuadro de regulación de la ingesta a diferentes niveles.

1.1.4.1. CITOQUINAS

Diferentes procesos tanto agudos (infecciosos, inflamatorios) como crónicos (infecciosos, neoplásicos) estimulan la síntesis y liberación de citoquinas inflamatorias, incluyendo IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , e interferón- γ (IFN- γ). Algunas de estas moléculas, principalmente TNF- α , IL-1 β y el factor neurotrópico ciliar (CNTF) han sido descritas como inductoras de anorexia. Numerosas evidencias sugieren que la anorexia producida por citoquinas está mediada por mecanismos neuronales centrales, la principal diana de acción de los cuales reside en el hipotálamo (Woods, 1998). IL-1 β , IL-8 y TNF- α inducen anorexia en ratas a dosis capaces de producir concentraciones patofisiológicas en el fluido cerebroespinal (CSF) en modelos animales o en pacientes con procesos de desgaste (Moldawer *et al.*, 1987a). Estas citoquinas son liberadas a la circulación y transportadas al SNC a través de la barrera hemato-encefálica y los órganos circunventriculares (Plata-Salamán, 1991b). Las citoquinas periféricas pueden ejercer sus acciones sobre el cerebro mediante la estimulación de segundos mensajeros como el óxido nítrico y prostanoïdes en el sistema vascular cerebral o vía el nervio vago. Las citoquinas también pueden producirse en el cerebro en respuesta a citoquinas liberadas periféricamente.

1.1.4.2. LEPTINA

El clonaje del gen de la leptina (*Lep*), también conocido como gen de la obesidad (*ob*), demostró claramente el concepto de que las señales circulantes

producidas en proporción a las reservas de grasa influyen el apetito y el gasto energético (Friedman, 1998). La leptina es una hormona producida y secretada por los adipocitos. Sus niveles son directamente proporcionales a las reservas grasas del organismo y su acción es la de reducir el apetito y activar los sistemas aferentes de regulación energética (Inui, 1999). Tanto la mutación del gen de la leptina en los ratones *ob/ob* como la resistencia a la leptina en los ratones diabéticos *db/db* causan obesidad severa. La administración directa de leptina en el SNC reduce fuertemente la ingesta y, por otra parte, han sido encontrados receptores para la leptina en el hipotálamo. Estos factores hacen pensar que el cerebro es una diana principal del efecto anorexigénico de la leptina. Bajos niveles de leptina en el cerebro estimulan la actividad de las señales orexigénicas en el hipotálamo (revisado por INRI, 2002)

Aunque las citoquinas inflamatorias tienen acción anoréxica en ausencia de leptina, se ha demostrado que TNF- α , IL-1 y el factor movilizador de lípidos (LMF) aumentan la expresión del mRNA de la leptina en el tejido adiposo y los niveles plasmáticos de leptina (Grunfeld *et al.*, 1996).

Sobre el papel que juega la leptina en estados patológicos que cursan con caquexia, los resultados son muy controvertidos. López-Soriano *et al.* (1999) han determinado en el modelo de rata Yoshida AH-130, que tanto los niveles circulantes como la expresión del mRNA de la leptina están disminuidos. Por otra parte, Tessitore *et al.* (2000) han observado en pacientes con cáncer de mama que los niveles plasmáticos y la expresión de leptina están aumentados; contrariamente estos resultados no se observan en cambio en pacientes con cáncer de colon.

1.1.4.3. GRELINA

La grelina es un péptido gastrointestinal que estimula la ingesta y la secreción de la hormona del crecimiento. Hanada *et al.* (2004) han demostrado que la grelina se produce bajo condiciones de balance energético negativo y en ratones portadores de tumor. Estos científicos sugieren que este péptido tiene un papel importante en la homeostasis energética en la caquexia cancerosa. Este mismo grupo de investigación ha presentado resultados que demuestran un efecto beneficioso de la grelina al ser administrada a ratones portadores de tumor y que presentan caquexia. Esta molécula aumenta la ingesta de los animales con tumor, comparados con los animales tratados sólo con el vehículo. Además, el tratamiento con grelina aumenta la masa del tejido adiposo y normaliza los niveles de leptina circulantes (Hanada *et al.*, 2003).

Shimizu *et al.* (2003) han establecido un aumento en los niveles plasmáticos de grelina en pacientes con cáncer de pulmón. Estos científicos proponen un mecanismo compensatorio en el desajuste de efectores catabólicos-anabólicos presente en los pacientes con caquexia cancerosa.

1.1.4.4. NEUROPEPTIDOS

1.1.4.4.1. Serotonina

El sistema serotoninérgico central parece contribuir con un papel importante en la regulación de la ingesta durante el crecimiento tumoral. En condiciones normales, este sistema media la sensación de saciedad a través de sus acciones en el hipotálamo, tanto en animales como en humanos (Leibowitz, 1990). A finales de los años 70 se describió por primera vez la posible relación entre los niveles de serotonina cerebrales y un modelo experimental de caquexia cancerosa (Krause *et al.*, 1979). Diversos estudios realizados en ratas con tumor que presentan caquexia y anorexia, han demostrado que la presencia de tumor está asociada frecuentemente a un incremento de los niveles de serotonina. La eliminación de la serotonina no es suficiente para impedir el desarrollo de la anorexia; esto nos permite concluir que la serotonina juega un papel importante en el desarrollo de la anorexia, pero que no es el único efector

desencadenante (Chance *et al.*, 1983). La concentración de serotonina en el cerebro depende del suministro de su aminoácido precursor, el triptófano (Fernstrom y Wurtman, 1971). El triptófano circula en plasma en un 10% libre y un 90% unido a la albúmina. Meguid *et al.* (1992) han determinado que los niveles de triptófano circulantes aumentan drásticamente en pacientes con cáncer (Meguid *et al.*, 1992). En ratas portadoras de tumor se encontraron niveles elevados de triptófano, antes incluso de que se evidenciara físicamente el tumor; estos niveles siguieron una tendencia ascendente hasta que tuvo lugar un aumento de los niveles de serotonina en el cerebro, provocando anorexia (Muscaritoli *et al.*, 1996). Liviano *et al.* (1996) postulan que la anorexia cancerosa está influida por la acción de IL-1, actuando tanto en el ámbito central en el hipotálamo ventromedial (VMH) sobre la liberación de serotonina como en el ámbito periférico sobre los niveles de triptófano.

1.1.4.4.2. Neuropeptido Y (NPY)

El NPY es una molécula clave en la respuesta hipotalámica a la inanición. Es un péptido de 36 aminoácidos que está ampliamente distribuido en el SNC (Inui, 1999). Es sintetizado en las neuronas del núcleo arcuático (ARC) del hipotálamo y es proyectado predominantemente en el NPV del hipotálamo (Heinrichs *et al.*, 1998). El NPY induce la ingesta en varias especies de vertebrados. La administración de NPY en el SNC aumenta la ingesta de energía, disminuye el gasto energético y aumenta la lipólisis, creando de esta forma un estado de balance energético positivo y almacenamiento de reservas. El NPY forma parte de una cascada de señales orexigénicas (estimulantes de la ingesta), que actúan a nivel hipotalámico y que se activan por la caída de los niveles de leptina (Fliers y Maratos-Flier, 1998). Esta red incluye además la galanina, péptido opiodes, MHC, orexina, etc.

El NPY inyectado intrahipotalámicamente tiene una menor capacidad estimuladora de la ingesta en ratas portadoras de tumor que en sus controles (Chance, 1996). Además, los niveles de liberación de NPY en el hipotálamo están reducidos en las ratas portadoras de tumor, mientras que están aumentados en animales ayunados o en controles nutricionales a los que se les ha restringido la ingesta de modo que el peso final de su carcasa sea el mismo que el de las ratas con tumor (Chance, 1994). La implantación de un tumor a ratas sanas causó anorexia severa a pesar de la existencia de niveles elevados de mRNA del NPY en el ARC hipotalámico (Jensen *et al.*, 1998). Además, hay una disminución de la afinidad del receptor de NPY en el hipotálamo en las ratas portadoras de tumor (Jensen *et al.*, 1998). Se ha propuesto que las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1, LMF y CNTF, en los casos de anorexia cancerosa, interfieren con la acción de NPY, aumentando los niveles de expresión de leptina, la cual interaccionaría con el NPY (Grunfeld *et al.*, 1996), o en el caso del CNTF, interfiriendo incluso directamente en la expresión de NPY (Xu *et al.*, 1998).

Todos estos resultados indican que la disfunción del sistema del NPY es un factor fundamental en la etiología de la anorexia cancerosa.

1.1.4.4.3. Factor liberador de corticotropina (CRF)

El CRF es un neuropeptido hipotalámico catabólico que contribuye a la homeostasis energética y que está regulado, en parte, por leptina e insulina (Inui, 1999). Al contrario que el NPY, el CRF produce anorexia continuada e incrementa la actividad del sistema nervioso simpático, incrementando por tanto la termogénesis, el gasto energético y la lipólisis. La anorexia inducida por la administración intracerebrovascular de IL-1 puede ser revertida parcialmente con antisuero anti-CRF, lo que indica un papel del CRF intrahipotalámico en esta respuesta (Uehara, 1989). Es posible que la acción de las citoquinas proinflamatorias en el hipotálamo esté mediada por una estimulación persistente del CRF en el NPV y, de hecho, se han

encontrado niveles elevados de CRF en ratas portadoras de tumor con anorexia (MacCarthy y Daun, 1993).

1.1.4.5. HORMONAS PEPTÍDICAS

1.1.4.5.1. Insulina

La insulina, al igual que la leptina, es secretada en proporción al nivel de adiposidad corporal, y tiene dianas en el SNC a donde puede ser transportada, actuando mediante la activación de la sensación de saciedad e inhibiendo la ingesta. La insulina promueve un estado de balance energético negativo en el cerebro, contrarrestando su potente acción anabólica en los tejidos periféricos (Plata-Salaman, 1998). La insulina actúa estimulando la expresión del gen de la leptina (Firedman, 1998), y a su vez su producción está regulada por citoquinas procaquéticas como la IL-1 (Plata-Salamán, 1991b).

1.1.4.5.2. Glucagón

El glucagón producido en el páncreas, y el péptido *glucagon-like I* (GLP-I) del intestino y el cerebro, son potentes péptidos anorexigénicos (Gibbs y Smith, 1992). En la rata, la administración de un anticuerpo altamente específico contra glucagón aumentó la ingesta, lo que sugiere un papel fisiológico del glucagón en el control de la ingesta.

La presencia de un tumor está asociada a una disminución de la relación insulina/glucagón, y este estado hiperglucagónico podría ser la alteración hormonal más importante a la hora de causar las anormalidades metabólicas de la caquexia cancerosa (Noguchi *et al.*, 1989). La inhibición de la secreción de glucagón consigue incrementar el peso de la carcasa, preservar la proteína muscular e incluso inhibir el crecimiento tumoral (Bartlett *et al.*, 1995). Otro indicio de la implicación del glucagón en los estados anoréxicos-caquéticos es que citoquinas tales como la IL-6 estimulan la secreción de glucagón en humanos (Tsigos, 1997).

1.2. ALTERACIONES METABÓLICAS

Además de la presencia de anorexia, una de las principales características de la caquexia cancerosa es el desgaste tisular que sufre el huésped, particularmente en el músculo esquelético y el tejido adiposo, mientras que otros órganos, como hígado, bazo, riñón y adrenales, pueden aumentar de peso transitoriamente. Las alteraciones metabólicas representan el aspecto más importante y peculiar de la caquexia cancerosa, ya que incluso en ausencia de malnutrición, pueden *per se* determinar un balance energético y nitrogenado negativo junto con un grave deterioro del organismo. Por otra parte, aunque la anorexia es un componente casi universal del síndrome caquético, ella sola no explica el serio desgaste observado en el paciente, ya que los patrones de pérdida de peso y el cambio de composición corporal difieren de los de la inanición, y sus efectos catabólicos no pueden ser revertidos mediante la administración extra de calorías. El punto de vista emergente es que la caquexia cancerosa es principalmente debida a las alteraciones metabólicas producidas por la presencia del tumor. De este modo, se observan en el paciente tumoral una incrementada lipólisis, favorecida por una disminución de la actividad lipoproteína lipasa (LPL) del tejido adiposo blanco (Evans y Williamson, 1988) y que conduce a un aumento de los triacilglicérols circulantes, un aumento en el recambio proteico tisular (Buzby *et al.*, 1980) y un incrementado uso, por parte del hígado, del lactato producido en gran cantidad por el tumor (Argilés y López-Soriano, 1991). Durante mucho tiempo se pensó que estos desajustes metabólicos eran causados por algún factor secretado por el tumor, o por la competencia del tumor con el huésped por los nutrientes, pero en

la actualidad se sabe que estos factores proceden del huésped en respuesta al crecimiento tumoral (Argilés *et al.*, 1992). En la tabla 1 se muestran las principales alteraciones metabólicas presentes en la caquexia (Argilés *et al.*, 1997a).

| |
|---|
| METABOLISMO GLUCÍDICO |
| Intolerancia a la glucosa |
| Gluconeogénesis hepática incrementada |
| Actividad del ciclo de Cori incrementada |
| Disminución de la captación de glucosa por el músculo esquelético |
| METABOLISMO LIPÍDICO |
| Disminución de las reservas lipídicas |
| Hiperlipidemia |
| Lipólisis aumentada |
| Disminución de la actividad de la LPL en el tejido adiposo blanco |
| METABOLISMO NITROGENADO |
| Tasa de recambio proteico aumentada |
| Síntesis proteica hepática aumentada |
| Degradación proteica en el músculo esquelético aumentada |
| Disminución de la captación de aminoácidos por el músculo esquelético |
| Recambio elevado de los aminoácidos de cadena ramificada |
| Cambios en el patrón de aminoácidos circulantes |
| CAMBIOS HORMONALES |
| Resistencia a la insulina |
| Secreción de insulina normal o disminuida |
| Aumento de las hormonas contrareguladoras (cortisol, catecolaminas) |

Tabla 1. Principales alteraciones metabólicas en el síndrome de la caquexia (Argilés *et al.*, 1997).

1.2.1 METABOLISMO ENERGÉTICO

Muchos autores han descrito un gasto energético aumentado, tanto en reposo como en actividad, en los pacientes de cáncer que presentaban pérdida de peso (Hytlander, 1993). En un estudio en pacientes con tumores sólidos, se ha encontrado que el aumento en el gasto energético precede a la pérdida de peso, lo que sugiere que este aumento puede ser más una causa de la caquexia que una consecuencia (Hytlander *et al.*, 1993). Mientras que la pérdida de peso en personas sanas conduce a una adaptación metabólica que comporta una disminución del gasto energético, éste se encuentra aumentado en los pacientes con cáncer. Los organismos portadores de tumor mantienen crónicamente un balance energético negativo, ya que la energía gastada excede a la ingerida. Esto conduce a una pérdida de las reservas energéticas vitales. Inicialmente, el individuo portador de un tumor moviliza el glucógeno hepático y muscular; seguidamente tiene lugar un aumento de la lipólisis en el tejido adiposo blanco, con la consiguiente liberación de ácidos grasos, que son oxidados para proporcionar energía y glicerol, el cual a través de la gluconeogénesis es transformado en glucosa. Además, la proteólisis muscular proporciona aminoácidos que entran en la vía gluconeogénica, o bien son oxidados directamente para producir energía.

Se ha sugerido que el aumento de la actividad de un ciclo análogo al de Cori que se establece entre el músculo y el hígado implica un gasto energético en los pacientes de cáncer. El tumor, a través de la glucólisis anaeróbica, produce grandes cantidades de ácido láctico, que se convierten en glucosa en el hígado y en el riñón del huésped, con el consiguiente gasto de ATP (Lawson *et al.*, 1982). El resultado es el reciclaje de la glucosa gastada por el tumor, asociado a un importante gasto de energía por parte del huésped, que incrementa así su tasa metabólica basal. Otro ciclo

fútil activado en la caquexia que puede contribuir al aumento del gasto energético es el que resulta del mal funcionamiento de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$. Se han observado alteraciones en la estequiometría de esta bomba en las células del tumor ascítico de Ehrlich (Racker, 1976). Por otra parte, existe una serie de compuestos secretados por el tumor que provocan el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial en los tejidos del huésped, favoreciendo así la disipación de una importante cantidad de energía metabólica en forma de calor (Tisdale, 1993).

Otro factor que puede contribuir al gasto energético es la fiebre, que se observa frecuentemente durante la enfermedad neoplásica o como consecuencia de complicaciones infecciosas. El incremento de un grado de temperatura determina un aumento del 13% del consumo basal de energía.

Por otro lado, se ha sugerido que la hiperestimulación adrenérgica puede ser importante a la hora de determinar la situación hipermetabólica que se observa en los pacientes neoplásicos (Lowry, 1991). De hecho, se encuentra una elevada concentración plasmática de catecolaminas y un aumento de la excreción urinaria de sustancias adrenérgicas en pacientes con cáncer (Tisdale, 1993); los pacientes con malnutrición sin cáncer, por contra, muestran una disminución del recambio de catecolaminas.

El descubrimiento de algunos de los miembros de la familia de proteínas desacopladoras de la cadena respiratoria mitocondrial (*uncoupling proteins*, UCPs) ha abierto la posibilidad de estudiar su posible contribución en el gasto energético aumentado que se observa en animales portadores de tumor, así como en pacientes con cáncer y otras situaciones catabólicas (revisado por Argilés *et al.*, 2002). En concreto, UCP2 y UCP3, a diferencia de UCP1, se expresan en el músculo esquelético (Fleury *et al.*, 1997; Vidal-Piug *et al.*, 1997), el cual supone aproximadamente un 40% de masa corporal total, y existen estudios que sugieren que estas moléculas son determinantes en el gasto energético basal en humanos (Barbe *et al.*, 1998; Schrawen *et al.*, 1999). De hecho, la actividad termogénica del tejido adiposo marrón también se encuentra aumentada en diferentes situaciones de crecimiento tumoral (Brooks *et al.*, 1981; Rothwell, 1990). Sanchís *et al.* (1998) han observado que la expresión de la UCP2 y UCP3 está aumentada en el músculo esquelético de ratas portadoras del hepatoma ascítico Yoshida AH-130. En contraste, Dejong *et al.* (2004) no han observado cambios en los patrones de expresión de UCP2 y UCP3 en el músculo de pacientes con cáncer de páncreas, los cuales no presentan cambios en el gasto energético en reposo. Además, se ha observado que diferentes citoquinas, sobre todo la IL-1, la IL-6 y el TNF- α , pueden jugar un papel importante en la repuesta termogénica en diferentes patologías. La adición de TNF- α al medio de cultivo de células musculares produce una activación de la termogénesis (medida por el consumo de oxígeno total) y un aumento en la expresión de UCP2 y UCP3; además, el efecto del TNF- α está mediado por PGC-1 (*PPAR γ coactivator 1*) (Puigserver *et al.*, 2001).

1.2.2. METABOLISMO GLUCÍDICO

Los niveles de glucosa, tanto en pacientes neoplásicos como en animales experimentales portadores de tumor, pueden presentar una amplia variabilidad, en función del tipo de tumor y de la fase de desarrollo del mismo. Los tumores de crecimiento rápido se caracterizan por su gran capacidad glucolítica, la cual puede condicionar un aumento en la gluconeogénesis hepática por parte del huésped. Se ha observado un aumento en la producción de glucosa por parte del hígado en individuos portadores de tumor, a partir de substratos como lactato, glicerol y diversos aminoácidos, así como una activación de las enzimas gluconeogénicas (Shaw y Wolfe, 1986). No es fácil saber cuál es la señal metabólica que activa este proceso, que está controlado metabólicamente y hormonalmente, siendo inhibido por la insulina y activado por el glucagón, las catecolaminas y los glucocorticoides. En situaciones de crecimiento

tumoral, los niveles de insulina pueden ser bajos (Jasani *et al.*, 1978) y los niveles de glucocorticoides pueden estar aumentados. También puede ocurrir que la gluconeogénesis hepática estuviese activada por la liberación de precursores gluconeogénicos, como el lactato (glucólisis del tumor), aminoácidos (proteólisis muscular) y glicerol (lipólisis). Es interesante observar como las alteraciones del metabolismo glucídico inducidas por el tumor pueden producir alteraciones en otros tejidos como el adiposo y el músculo esquelético, con la única finalidad de obtener substratos gluconeogénicos (revisado por Argilés y López-Soriano, 1997a).

Con frecuencia, el paciente neoplásico presenta intolerancia a la glucosa (Norton *et al.*, 1987), que se observa previamente a la aparición de la caquexia. La intolerancia a la glucosa es una de las alteraciones metabólicas más tempranamente reconocible en la caquexia, y lleva a una situación parecida a la del diabético de tipo II. Esta incapacidad de metabolizar la glucosa exógena puede estar relacionada con una disminuida sensibilidad a la insulina por parte de los tejidos (Jasani *et al.*, 1978). Los pacientes con cáncer presentan un claro estado de resistencia a la insulina que afecta al tejido adiposo, músculo esquelético e hígado. En el músculo esquelético la utilización de glucosa está disminuida tanto en animales de experimentación como en pacientes de cáncer, siendo éste el resultado de una clara resistencia a la insulina. Como señala Tayek (1992), el paciente canceroso se comporta como el diabético de tipo II que no es capaz de maximizar la captación de glucosa en presencia de grandes cantidades de insulina. La disminuida estimulación de la captación de glucosa no parece ser un defecto en la unión de la insulina al receptor, sino más bien un defecto postreceptor. La resistencia a la insulina en músculo esquelético también se observa en la síntesis de glucógeno, la cual está claramente disminuida en los pacientes de cáncer (Lundholm *et al.*, 1978). La aumentada producción hepática de glucosa es en parte el resultado de cierto grado de resistencia a insulina en el hígado. La resistencia a la insulina del individuo portador del tumor se puede superar con el uso de insulina exógena, lo que en animales ha mejorado el grado de caquexia (Tessitore *et al.*, 1993b), así como la respuesta a la terapia anticancerosa, incluida la cirugía y la quimioterapia.

En resumen, el paciente de cáncer presenta un metabolismo glucídico muy diferente al del sujeto normal sano, básicamente porque los tumores tienden a usar grandes cantidades de glucosa, generando de esta forma la activación de un mecanismo compensatorio en el hígado (tanto para la hipoglucemia como para la acidosis) que resulta en una mayor producción de glucosa, y que es desencadenado principalmente tanto por la resistencia a insulina como por el aumento en hormonas contrarreguladoras, tales como los glucocorticoides (Werk *et al.*, 1964) o el glucagón (Incelet *et al.*, 1987).

1.2.3. METABOLISMO LIPÍDICO

Tanto en pacientes humanos como en modelos experimentales, se observa un metabolismo lipídico alterado; en concreto, se observa una hiperlipidemia y una reducción de las reservas del tejido adiposo (Kralovic *et al.*, 1977), lo cual contribuye a la pérdida de peso corporal de los individuos caquéticos. Esta movilización de las reservas lipídicas parece estar directamente relacionada con la masa tumoral y tiene lugar en las primeras etapas de la enfermedad, cuando el tamaño del tumor todavía es muy pequeño. La progresiva disolución de las reservas lipídicas contribuye tanto al mantenimiento del huésped como al desarrollo tumoral. En un principio se pensó que este proceso era activado por algún factor lipolítico liberado por el propio tumor, pero aún no se conoce la naturaleza de este compuesto. Posteriormente, los estudios se han centrado en un mediador del sistema inmune, el TNF- α , que es capaz de inhibir la actividad LPL (Kern, 1988a), lo que podría estar implicado en la hiperlipidemia observada en animales portadores de tumor. Todorov *et al.* (1996) han descrito un factor inductor de proteólisis aislado del modelo tumoral MAC16; este factor, llamado

PIF (*proteolysis-inducing factor*), es capaz de inducir pérdida de peso en animales sanos (Lorite *et al.*, 1998) (para más detalles ver apartado 1.3.6.).

En situaciones como el ayuno o la diabetes, los elevados niveles de ácidos grasos circulantes y su utilización hepática dan lugar a una producción aumentada de cuerpos cetónicos (acetoacetato y β -hidroxibutirato) y a un aumento de los niveles circulantes de estos compuestos (Miles *et al.*, 1980). Los hepatomas de rápido crecimiento utilizan activamente acetoacetato, y también se ha observado una aumentada actividad β -hidroxibutirato deshidrogenasa en hepatomas de Morris (Fenselau, 1975); contrariamente, en un carcinoma mamario de rata se observa una baja capacidad para el metabolismo de los cuerpos cetónicos (Meuller, 1961). La hipercetonemia que se observa en la caquexia puede ser en parte beneficiosa para el huésped, ya que proporciona una fuente de energía alternativa a la glucosa y con esto evita por un tiempo la proteólisis muscular y la utilización excesiva de aminoácidos de cadena ramificada (AACR: leucina, isoleucina y valina) (Thompson y Wu, 1991).

La masiva movilización de lípidos da lugar a una intensa hiperlipidemia (Kralovic *et al.*, 1977), con elevados niveles de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y ácidos grasos circulantes (Muller y Watkin, 1961). Esta respuesta metabólica es consecuencia del intenso drenaje de glucosa por parte del tumor, el cual somete al huésped a condiciones hipoglucémicas y, por tanto, activa la maquinaria metabólica responsable de la movilización lipídica, forzando a los tejidos del huésped a un cambio de substrato energético (de glucosa a ácidos grasos).

La LPL es la responsable de la captación de los triacilgliceroles de la sangre por los adipocitos, y tiene un papel clave en las anomalías del metabolismo lipídico en individuos portadores de tumor. Su actividad está disminuida en el músculo y tejido adiposo blanco de animales portadores de tumor como en pacientes humanos (Vlassara *et al.*, 1986; Evans y Williamson, 1988), hecho que está de acuerdo con la elevada concentración plasmática de triacilgliceroles. Los tumores que inducen una mayor pérdida de peso provocan una mayor inhibición de la LPL.

La hiperlipidemia en los estados de caquexia cancerosa parece ser el resultado de un conjunto de factores, como un aumento de la lipólisis, y alteraciones del metabolismo del colesterol. Esto provoca una elevación tanto de los triacilgliceroles como del colesterol total. Busquets *et al.* (2001) han demostrado en ratas portadoras del Yoshida AH-130 que la hiperlipidemia podría modular la expresión de la UCP3, y que este efecto es dependiente del tipo de fibra muscular. La hipercolesterolemia se observa a menudo tanto en pacientes humanos como en modelos animales de tumor; este proceso se debe principalmente a una disminución de la actividad de la lecitin-colesterol aciltransferasa (LCAT), con la consiguiente disminución del colesterol unido a la fracción HDL (Dessi *et al.*, 1992a, 1992b). Las perturbaciones durante el estado tumoral incluyen cambios en los perfiles de lipoproteínas, en particular, un importante descenso en la cantidad de colesterol transportado en la fracción de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Dessi *et al.*, 1991 y 1995), fracción que es la encargada del transporte del exceso de colesterol desde los tejidos extrahepáticos hasta el hígado. Existe la posibilidad de que los disminuidos niveles de colesterol en HDL sean consecuencia tanto de la inhibición de la LPL, como del aclaramiento del colesterol circulante por parte del tumor.

Las células tumorales presentan una baja capacidad para sintetizar lípidos, pero éstos son fundamentales para la producción de energía y para la proliferación celular. Casi siempre la capacidad biosintética es insuficiente para el abastecimiento de las necesidades de la célula tumoral, y ésta, por tanto, los ha de obtener a partir del hígado del huésped, en el que la síntesis de ácidos grasos está generalmente aumentada. Por lo tanto, el aumento de los lípidos circulantes parece ser una característica de los estados tumorales, hasta el punto de que algunos autores han sugerido que sus niveles en plasma pueden usarse para detectar la presencia de cáncer en los pacientes (Eisenberg, 1984).

1.2.4. METABOLISMO NITROGENADO

En diferentes tipos de cáncer se ha descrito la rápida aparición de un balance nitrogenado negativo (Kern y Norton, 1988b) asociado a un fuerte desgaste muscular. De hecho, la astenia (fatiga física y mental) es una de las principales características del síndrome caquético, y está directamente relacionada con el desgaste muscular observado en la caquexia. Emery *et al.* (1984) sugieren que en el desarrollo de la caquexia, la masa muscular está regulada principalmente por alteraciones en la tasa de síntesis proteica, mientras que los cambios en la degradación proteica son secundarios. En cambio, un elevado número de estudios parecen indicar que la aumentada degradación de proteínas tisulares o el acelerado recambio de la proteína corporal pueden ejercer un importante papel en el desgaste proteico que se observa en los pacientes neoplásicos (Norton *et al.*, 1981). El músculo esquelético comprende el 50% de la masa proteica corporal total, y si la cantidad de proteína baja de los niveles considerados críticos sobreviene la muerte (Norton *et al.*, 1987).

Experimentos llevados a cabo por nuestro grupo usando diferentes modelos, han demostrado claramente que la síntesis proteica apenas está afectada en el músculo esquelético durante el crecimiento del tumor, mientras que hay un gran incremento de la degradación proteica, efecto que ha sido estudiado tanto *in vivo* (Costelli *et al.*, 1993; Carbó *et al.*, 1994) como *in vitro* (García-Martínez *et al.*, 1995). Además, nuestro grupo ha identificado el mecanismo proteolítico implicado en la degradación del músculo esquelético durante la caquexia (Llovera *et al.*, 1995): un sistema proteolítico no lisosomal dependiente de ATP y ubiquitina que está activado en el músculo esquelético de los animales portadores de tumor.

Diferentes trabajos describen una aumentada síntesis proteica hepática en los animales portadores de tumor (Tessitore *et al.*, 1987), de forma similar a lo que pasa en situaciones de sepsis o trauma (Fischer y Hasselgren, 1991). Además, en el paciente con cáncer se ha observado un aumento de las proteínas de fase aguda, como la α -glicoproteína ácida, α -antitripsina, proteínas c-reativas y haptoglobinas (Levin y Gevers, 1981), que han sido utilizadas como marcadores de la progresión tumoral en una gran variedad de tumores humanos. Por el contrario, disminuyen los niveles de albúmina, pero la patogénesis de la hipoalbuminemia es compleja. En ratones portadores de un tumor que produce elevadas cantidades de TNF- α , se ha observado la inhibición de la expresión del gen que codifica para la albúmina (Brenner *et al.*, 1990), lo que sugiere que esta citoquina puede tener un papel importante en la hipoalbuminemia. Estos efectos sobre el hígado pueden ser perfectamente mimetizados por citoquinas como el TNF- α , la IL-1 y la IL-6. Parece ser que la IL-6 juega un papel fundamental en la respuesta de fase aguda, ya que es capaz de estimular la síntesis de estas proteínas en hepatocitos.

El crecimiento del tumor necesita el aporte de metabolitos suministrados por el huésped, y como fuente de nitrógeno utiliza preferentemente los aminoácidos procedentes del músculo esquelético. Estos aminoácidos son captados tanto para ser oxidados como para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. El balance nitrogenado negativo que se establece en el músculo esquelético conduce a la liberación masiva de aminoácidos, especialmente en forma de alanina y glutamina (Argilés y Azcón-Bieto, 1988), que en gran parte serán captados por el hígado para la gluconeogénesis (Waterhouse *et al.*, 1979) y la síntesis de proteínas (Pain *et al.*, 1984), de manera que se establece un importante flujo de aminoácidos desde el músculo esquelético hacia el hígado (Fischer y Hasselgren, 1991). La liberación de aminoácidos está también potenciada por la inhibición del transporte de aminoácidos en el músculo. La glutamina, aparte de ser el principal vehículo transportador de nitrógeno entre el huésped y el tumor (Medina *et al.*, 1992), es uno de los aminoácidos más abundantes en la sangre de animales portadores de tumor. Éste es uno de los aminoácidos más utilizados por el tumor, siendo uno de los precursores más importantes de la síntesis de proteínas y bases nitrogenadas. Por tanto, el tumor

induce una respuesta específica en el huésped que conduce al aumento de los niveles circulantes de glutamina.

Los aminoácidos de cadena ramificada (AACR) son nutrientes esenciales tanto para el hombre como para los animales, representando un 40% de los requerimientos mínimos diarios de aminoácidos esenciales en los seres humanos (Abidi, 1976). En los procesos de desgaste (cáncer, trauma), los niveles de AACR están a menudo incrementados y sus tasas de recambio alteradas. En el caso de la leucina, se ha visto una aumentada oxidación en estados de sepsis y crecimiento tumoral (Goodlad *et al.*, 1981). Se desconoce el mecanismo causante de estos cambios. Es posible que la mayor contribución a la oxidación de los AACR en los estados tumorales sea por parte del músculo esquelético (Argilés y López-Soriano, 1990). De hecho, los AACR son los únicos aminoácidos que son ampliamente degradados en músculo esquelético, y se ha demostrado que estimulan la síntesis e inhiben la degradación proteica *in vivo* (Buse y Reid, 1975) e *in vitro* (Blomstrand, 1991). Busquets *et al.* (2000) han descrito que los AACR, en particular la leucina, pueden inhibir la proteólisis en un modelo de incubaciones de músculo esquelético de rata *in vitro*, y que este efecto está mediado principalmente por una inhibición de la expresión de algunos genes del sistema proteolítico dependiente de ATP y ubiquitina. Además, han determinado que la leucina no es capaz de revertir el efecto proteolítico del tumor en el mismo modelo de incubaciones de músculos, procedentes de ratas portadoras del hepatoma ascítico Yoshida AH-130, aunque logra disminuir la expresión de los genes de la ubiquitina, C8 y catepsina B (Busquets *et al.*, 2002).

1.3. MEDIADORES DE LA CAQUEXIA

Aunque la malnutrición y la competencia metabólica que se establecen entre el tumor y el huésped están implicadas en la caquexia, se han de tener en cuenta diferentes factores circulantes liberados por el tumor directamente y/o generados por la reacción del huésped frente al tumor, y que desarrollan un papel crucial. Algunos de los efectos sistémicos que se observan en individuos con cáncer han sido atribuidos a factores lipolíticos y proteolíticos circulantes producidos o inducidos por el tumor (Beck y Tisdale, 1987). Además, el estado hormonal del huésped puede tener un papel importante, ya que se han descrito niveles elevados de hormonas catabólicas, niveles bajos de insulina y resistencia a la insulina en tejidos periféricos.

1.3.1. INSULINA

La insulina tiene la capacidad de estimular la acumulación de proteína a través de la disminución de la proteólisis y el aumento de la síntesis proteica (Fulks *et al.*, 1975). El importante papel que tiene la insulina se evidenció a partir de los estudios realizados con animales ayunados y diabéticos, en los cuales los bajos niveles de insulina contribuían a la aceleración de la proteólisis muscular (Li y Goldberg, 1976). De todas maneras, se ha descrito que para algunos tipos de tumor, a pesar de presentar hiperinsulinemia, el huésped pierde peso y masa muscular, debido seguramente al desarrollo de resistencia a la insulina (Lawson *et al.*, 1982), pero el mecanismo no se conoce todavía.

Por otra parte, se ha observado un mayor aclaramiento de la insulina en pacientes neoplásicos y anoréxicos (Byerley *et al.*, 1991), que puede evitar la supresión normal de la producción hepática de glucosa, evitando así la aparición de hipoglucemia. Estas alteraciones en el metabolismo pueden reflejar una capacidad adaptativa del individuo para evitar la hipoglucemia como consecuencia de la restricción calórica, y es reversible por medio de la administración de alimento (Zuñiga-Guijardo *et al.*, 1986).

1.3.2. HORMONAS TIROIDEAS

Desde hace tiempo se han descrito alteraciones en los niveles de las hormonas tiroideas asociadas a enfermedades neoplásicas. Se observan niveles bajos de T3 asociados a niveles normales, elevados o reducidos de T4. Los niveles bajos de T3 pueden ser debidos a la inhibición de la enzima responsable de la conversión de T4 a nivel periférico (Chopra *et al.*, 1978). Los niveles bajos de T4 se asocian con enfermedades graves, y están correlacionados positivamente con la tasa de mortalidad. Se ha descrito que animales portadores del carcinoma de Walker 256 presentan niveles bajos de ambas hormonas. Tanto en este caso como en el de la patología humana, los niveles de hormona estimuladora del tiroides (TSH) son normales, lo que sugiere que la glándula tiroidea no se encuentra en condiciones de hipofuncionalidad (Kumara-Siri *et al.*, 1981).

1.3.3. GLUCOCORTICOIDES

En diferentes patologías como infección, anorexia y cáncer, se ha descrito un aumento en los niveles de cortisol. Este aumento en la secreción de glucocorticoides por la glándula adrenal podría facilitar la movilización de proteínas musculares y la captación hepática de los aminoácidos liberados. En casos de cáncer de mama, se ha descrito una correlación directa entre el estadio clínico de la enfermedad y el aumento de la producción de cortisol (Saez, 1971). Por otra parte, en animales portadores de tumor se ha observado una marcada hipertrofia de la glándula suprarrenal, que no puede evitarse con alimentación forzada (Begg, 1958). En las fases primaria y terminal del crecimiento del tumor, la glándula suprarrenal es poco sensible a la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (Kavetsky *et al.*, 1962), con un periodo intermedio de elevada sensibilidad. Sin embargo, se desconoce el papel de los glucocorticoides en el crecimiento tumoral.

1.3.4. CATECOLAMINAS

La adrenalina y la noradrenalina son mediadores que actúan sobre el sistema simpático y son sintetizados en la zona medular de la glándula suprarrenal. Normalmente, en los animales portadores de tumor los niveles de catecolaminas están aumentados. Las catecolaminas proporcionan al organismo una mayor cantidad de substratos susceptibles de ser oxidados, como el glicerol, los ácidos grasos, y los cuerpos cetónicos, y al mismo tiempo deprimen la oxidación de glucosa. Esta disponibilidad de substratos transformables en energía permite al organismo superar situaciones de estrés de diferentes orígenes.

1.3.5. FACTORES MOVILIZADORES DE LÍPIDOS

Se ha sugerido que parte de los efectos observados en animales de experimentación portadores de tumor podrían ser el resultado de la acción directa de los compuestos segregados por el propio tumor o por el huésped en respuesta al crecimiento tumoral. Estos compuestos se denominaron colectivamente factores movilizadores de lípidos (LMF), y favorecen el desarrollo de la caquexia. Parece ser que la concentración de estos compuestos en el suero de los pacientes con cáncer está relacionada con la magnitud de la pérdida de peso. En este sentido, Nakahara y Fukuoka (1948) aislaron a partir de tejidos tumorales un factor denominado toxohormona, que es una proteína de 75 kDa responsable de la depleción lipídica y de la inmunodepresión. Un factor con las mismas características se ha encontrado en el suero de los pacientes con caquexia cancerosa pero, en cambio, está ausente en el suero de individuos sanos alimentados o en ayuno. Posteriormente, tanto a partir de ratones portadores de sarcoma, como de pacientes con hepatoma, se aisló la

denominada toxohormona-L, la cual produce movilización lipídica cuando se administra a animales de experimentación (Masuno *et al.*, 1984). También se ha purificado un factor lipolítico de 5 kDa a partir del timo de ratones portadores del linfoma AKR y de líneas derivadas de este tumor. (Kitada *et al.*, 1981).

Por otro lado, el grupo de investigación del Dr. Tisdale (1990) ha desarrollado un modelo tumoral, un adenocarcinoma murino de colon inducido con metilcolantreno (MAC16), que es capaz de inducir caquexia con poca masa tumoral y sin causar hipofagia; en este modelo se ha encontrado un factor plasmático movilizador de lípidos responsable de la disolución del tejido adiposo y que también está implicado en la degradación de la proteína muscular (Beck y Tisdale, 1987). Sin embargo, en un adenocarcinoma análogo pero no caquético (MAC13), el plasma presentó una actividad lipolítica muy inferior. Cuando el factor lipolítico aislado de animales portadores del adenocarcinoma MAC16 se inyectó en animales sanos, determinó una reducción del peso corporal acompañada de una depleción del tejido adiposo, sin producir ninguna variación en la ingesta (Beck *et al.*, 1990).

1.3.6. FACTOR INDUCTOR DE PROTEOLISIS

Dos son los factores inductores de proteólisis (PIF) aislados por el grupo de Tisdale: uno a partir del tumor murino inductor de caquexia MAC16 (Lorite *et al.*, 1998) y otro, idéntico inmunológicamente, a partir del melanoma humano G361, tumor también inductor de caquexia cuando se inocula en ratones *nude* (Todorov *et al.*, 1999). Ambos factores indujeron disminución del peso corporal cuando se inyectaron en ratones sanos, sin provocar cambios en la ingesta ni de la bebida, siendo en ambos casos la pérdida de peso debida a la disminución de la masa no grasa de la carcasa (Lorite *et al.*, 1998; Todorov *et al.*, 1999). Por otra parte, se han encontrado niveles elevados de PIF en pacientes con cáncer que presentaban pérdida de peso (Belizario *et al.*, 1998; Wigmore *et al.*, 2000). El PIF, administrado en ratones normales, produce una marcada disminución del peso corporal, acompañado de una activación del sistema proteolítico dependiente de ATP y ubiquitina (Lorite *et al.*, 2001).

Este factor, adicionado al medio de cultivo de células musculares de la línea celular C2C12, produce una inhibición de la síntesis proteica y una activación de la degradación. Este efecto es dependiente de la dosis de PIF adicionada al medio de cultivo; además, parece estar modulado por el ácido eicosapentaenoico (EPA), ya que al pretratar las células con este compuesto se logra inhibir el efecto del PIF (Smith *et al.*, 1999). Este mismo grupo ha establecido que el PIF puede actuar directamente sobre la entrada de glucosa a las células musculares, como también que puede interferir con la utilización de la glucosa durante la caquexia; todos estos efectos son contrarrestados por el EPA (Hussey y Tisdale, 1999). En células de la línea celular C2C12, el PIF produce un aumento de la actividad quimiotripsina del proteasoma, efecto que es dependiente de la dosis de PIF (Lorite *et al.*, 2001). Smith y Tisdale (2003a) han demostrado que el PIF puede causar apoptosis en miotubos de la línea celular C2C12, hecho confirmado por la ruptura proteolítica de las caspasas 2, 3 y 6, además de por el aumento del citocromo c y Bax (proteína proapoptótica), pero no de Bcl-2 (proteína antiapoptótica), estos resultados fueron confirmados por fragmentación del DNA (fenómeno tardío de la apoptosis). Por último, el EPA puede inhibir el efecto proapoptótico del PIF (Smith y Tisdale, 2003a).

Se ha identificado la cascada de señalización implicada en el efecto activador del proteasoma que presenta el PIF en la línea celular C2C12. El PIF induce la fosforilación de los residuos p44 y p42 de la MAPK, efecto que puede ser revertido por la adición de PD98059 (un inhibidor de MAPKK). Estos resultados sugieren que las MAPK están implicadas en el proceso por el que PIF activa la expresión de algunas subunidades del proteasoma (Smith y Tisdale, 2003b). Resultados muy recientes publicados por este mismo grupo de investigación implican a la proteína quinasa C (PKC) y al factor de transcripción NF- κ B en la cascada de señalización que es

activada por el PIF y que termina por activar la proteólisis muscular por medio del proteasoma en la línea celular C2C12 (Smith *et al.*, 2004). Watchorn *et al.* (2001) han demostrado en cultivos primarios de hepatocitos y en la línea celular HepG2, que la presencia de PIF en el medio de cultivo produce una activación de los factores de transcripción NF- κ B y STAT3, con una posterior liberación de citoquinas y una marcada respuesta inflamatoria. Estos investigadores proponen que el PIF y la activación de estos factores están involucrados en la respuesta inflamatoria asociada a la caquexia cancerosa (Watchorn *et al.*, 2001).

1.3.7. ANGIOTENSINA II Y IGF-I

El IGF-I es un factor endocrino, autocrino y paracrino, al cual se le han descrito múltiples efectos. En el músculo esquelético y células musculares en cultivo es un factor anabólico, aumentando la utilización de glucosa y aminoácidos, además de aumentar la síntesis y disminuir la degradación proteica (Fryburg *et al.*, 1995; Ding *et al.*, 1996). Así, también puede inducir la diferenciación de mioblastos en cultivo (Husmann *et al.*, 1996). Para más detalles, vease el apartado "IGFs y diferenciación muscular".

Brink *et al.* (1996) han demostrado que la infusión de angiotensina II a ratas sanas produce una disminución del IGF-I, lo que concuerda con una marcada pérdida de peso corporal, además de inducir anorexia (Brink *et al.*, 1996). Estudios recientes demuestran que la angiotensina II induce la pérdida de masa corporal, aumentando la degradación proteica y disminuyendo los efectos autocrinos del IGF-I (Brink *et al.*, 2001). Pacientes con fallo cardíaco crónico y con fallo renal presentan niveles aumentados de angiotensina II en plasma (Staroukine *et al.*, 1984); estos niveles elevados pueden asociarse a la pérdida de masa corporal que acompaña a estos dos estados patológicos (Kuroda y Shida, 1983).

1.3.8. CITOQUINAS

Se ha sugerido que, entre los mecanismos desencadenantes de la caquexia cancerosa, las citoquinas pueden desempeñar un papel a través de un amplio abanico de acciones fisiológicas. Estos mediadores son fundamentales para que la respuesta inmunitaria sea eficaz; sin embargo, un desequilibrio en su producción puede conducir a una amplia gama de alteraciones metabólicas. A continuación veremos algunas de las principales citoquinas implicadas en el desarrollo de la caquexia cancerosa.

En situaciones de infección, trauma o crecimiento tumoral, el huésped sufre toda una serie de alteraciones fisiológicas, como son anorexia, pérdida de peso, fiebre, movilización proteica muscular y cambios en los patrones leucocitarios y en el metabolismo. Inicialmente se pensó que estos cambios eran causados por compuestos producidos por el agente invasor, pero actualmente se sabe que estos mediadores son producidos por el propio huésped como mecanismo de defensa frente a un estímulo invasor. En muchos casos, estos cambios son responsables de la recuperación del huésped, fomentando las necesidades anabólicas de los tejidos inmunes y reduciendo el grado de destrucción celular (Evans *et al.*, 1989). Muchas de estas alteraciones están causadas por la producción endógena de citoquinas. Las citoquinas son péptidos sintetizados y liberados principalmente por las células del sistema inmune, que inducen la respuesta del huésped frente al estímulo invasivo y cuya misión es la eliminación del agente invasor, aunque para ello lleguen a provocar anomalías en el huésped, como lesiones generalizadas, *shock* y, en casos extremos, la muerte. Estos factores fueron inicialmente descritos como actividades que se encontraban en sobrenadantes crudos de cultivos celulares y que podían modular una gran variedad de respuestas biológicas, como la producción de anticuerpos, el aumento de la respuesta de las células T a antígenos o mitógenos, crecimiento y diferenciación de células precursoras hematopoyéticas, etc.

Las citoquinas ejercen una gran variedad de actividades biológicas, que incluyen inmunidad, inflamación, hematopoyesis, curación de heridas y participación en la respuesta sistémica a agentes invasivos y otras enfermedades. En este sentido, se ha observado que en algunas de estas situaciones patológicas tiene lugar un aumento de la biosíntesis de citoquinas (Moldawer *et al.*, 1988). El término citoquina se ha asociado en ocasiones con *hormone-like protein* (proteína similar a hormona), ya que los dos tipos de moléculas (citoquinas y hormonas) actúan como mensajeros intercelulares, pero mientras que las hormonas son generalmente producidas por órganos especializados (glándulas endocrinas) y ejercen sus efectos sobre células distantes del punto de producción, las citoquinas son producidas por células aisladas de diferentes órganos del cuerpo y su papel biológico consiste en establecer una red de comunicaciones entre las células de cada tejido u órgano; de este modo, las acciones de la citoquina permanecen confinadas en el microambiente de la célula productora (Billiau y Vandekerckhove, 1991).

Las citoquinas regulan las interacciones entre célula y célula en situaciones normales y patofisiológicas, y pueden ejercer su acción de forma autocrina, paracrina o endocrina, a través de la interacción con receptores específicos en la superficie de la célula diana. Esta interacción puede inducir la proliferación, activación, diferenciación o muerte de la célula diana. Inicialmente se consideró a las citoquinas como reguladoras de la respuesta inmune, pero posteriormente se ha sabido que poseen una función mucho más amplia en la comunicación celular. Actualmente se sabe que las citoquinas forman una red interactiva, de manera que sus acciones pueden solaparse, ser antagónicas o sinérgicas, e inducir la producción de otras citoquinas y sus receptores. Por lo tanto, han de existir mecanismos que controlen su biosíntesis, liberación y acción. Se sabe que la biosíntesis y liberación de las citoquinas está estrechamente regulada por otras citoquinas y factores. Esta regulación puede tener lugar a diferentes niveles: degradación proteolítica, modulación de receptores celulares o inhibición de la transducción de la señal del receptor. La producción y liberación de las citoquinas está influenciada por ciclos de retroalimentación positivos y negativos de la propia citoquina o de otras. Las citoquinas también forman redes interactivas con las hormonas. Se han descrito además dos mecanismos que pueden controlar la acción de las citoquinas. En primer lugar están los antagonistas de los receptores (inhibidores de citoquinas de tipo I): son moléculas con elevada homología a las citoquinas y que se unen al receptor correspondiente aunque sin inducir la transducción de la señal, estableciéndose así una competencia con la citoquina. El segundo mecanismo consiste en las moléculas solubles del receptor (inhibidor de tipo II), las cuales se unen a las citoquinas compitiendo así con los receptores celulares (Gehr., 1992).

Las citoquinas normalmente no son producidas de forma constitutiva, son efectivas en el rango del picogramo al nanogramo y, cuando son liberadas, su vida media es corta. Los efectos de las citoquinas están mediados por su unión a receptores de alta afinidad en la superficie celular. Estos receptores están presentes en un número bajo (100 a 1000) pero muestran una elevada afinidad, y cuando las células se activan están sujetos a una espectacular sobreexpresión.

Durante las últimas décadas se ha avanzado mucho en el conocimiento de estos compuestos y de las funciones específicas de cada uno de ellos, lo que ha conllevado una cierta confusión de la nomenclatura. De esta forma, en un principio se les denominó usando diferentes términos como interleuquinas (“molécula que se mueve entre los linfocitos”), monoquinas (“moléculas sintetizadas por los monocitos”) y citoquinas (“moléculas que se mueven entre las células”). Todas estas designaciones no son del todo correctas; por ejemplo, las interleuquinas no llevan sólo mensajes entre los leucocitos sino también entre otros tipos celulares, y las linfoquinas y monoquinas pueden ser sintetizadas y actuar sobre células no linfoides.

1.3.8.1. CLASIFICACIÓN DE LAS CITOQUINAS

Las citoquinas forman una gran superfamilia de compuestos polipeptídicos solubles que tienen características bioquímicas similares, lo que hace que sea muy difícil su purificación. Aunque la existencia de varias citoquinas fue descrita hace unos 30 años, su aislamiento en forma pura a partir de tejidos ha sido un trabajo arduo. Esta dificultad reside en que las citoquinas son producidas en cantidades ínfimas, poseen una potente actividad a concentraciones muy bajas, y además, son muy lábiles. Hasta la década de los 80 estas dificultades no pudieron ser resueltas; sin embargo, gracias a los avances de las tecnologías del DNA recombinante y de los ensayos inmunoquímicos, se han podido purificar y secuenciar los genes de varias citoquinas (Trotta, 1991). En la tabla 2 podemos observar la clasificación de las citoquinas por familias.

Interleuquinas

Se conocen hasta el momento de la IL-1 a la IL-29

Factores de crecimiento hematopoyéticos

Eritropoyetina

CFS (factor estimulador de colonias)

Multi-CSF (IL-3)

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

G-CSF (*granulocyte-CSF*)

M-CSF (*macrophage-CSF*)

Interferones

IFN- α , IFN- β y IFN- γ .

Factores Necróticos Tumorales

TNF- α o caquectina

TNF- β o linfotoxina

Factores de crecimiento

EGF (*epidermal growth factor*)

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

FGF (*fibroblast growth factors*)

PDGF (*platelet-derived growth factor*)

NGF (*nerve growth factor*)

IGF (*insulin-like growth factor*)

Quimiocinas

RANTES

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

Tabla 2. Clasificación de las citoquinas por familias.

Las citoquinas implicadas en la activación de la respuesta inflamatoria desencadenada por el sistema inmunitario en respuesta a estímulos invasivos reciben el nombre de proinflamatorias, siendo las principales el TNF- α , el TNF- β (linfotoxina), la IL-1, la IL-6, el IFN- α , el IFN- β e el IFN- γ . Las citoquinas que han sido implicadas en la respuesta caquética (citoquinas procaquéticas) pertenecen a este grupo de proinflamatorias y entre ellas cabe destacar el TNF- α , la IL-1, la IL-6 y el IFN- γ . Estas citoquinas, secretadas por el sistema inmunitario, actúan sobre numerosos tejidos diana (médula ósea, miocitos, hepatocitos, células endoteliales, etc.) donde activan una compleja cascada de respuestas biológicas que llevan al desgaste asociado a la caquexia (Argilés y López-Soriano, 1999). Entre sí, estas citoquinas comparten muchos efectos metabólicos y su actividad está íntimamente interrelacionada, mostrando en muchos casos efectos sinérgicos. El grupo de las citoquinas antiinflamatorias o anticaquéticas actúa en sentido contrario, modulando la acción de

las proinflamatorias. En este grupo se incluyen la IL-10, la IL-4, el IL-1ra y la IL-13. Aunque no desempeñe un papel en el sistema inmunitario que pueda definirse como antiinflamatorio, la IL-15 es una candidata importante al grupo de citoquinas anticaquéticas debido a sus acciones anabólicas sobre el músculo esquelético (Quinn *et al.*, 1995). Además, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la administración de IL-15 a ratas portadoras de hepatoma ascítico Yoshida AH-130 redujo considerablemente las alteraciones producidas por el tumor (Carbó *et al.*, 2000). Figueras *et al.* (2004) han demostrado que la administración de IL-15 a ratas portadoras de tumor redujo la apoptosis que se presentó en el músculo esquelético de estos animales.

A continuación se describen algunos de los aspectos más importantes del TNF- α . Para el desarrollo de esta tesis sólo nos hemos centrado en esta citoquina.

1.4. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF- α)

En 1893, Coley introdujo la idea de que la regresión del tumor en pacientes humanos de cáncer podía conseguirse administrándoles toxinas bacterianas. Mucho más tarde, se describió el factor de necrosis tumoral- α como un factor derivado de macrófagos inducido por endotoxinas, que podía causar la necrosis hemorrágica de tumores sólidos (Carswell *et al.*, 1975). Esta actividad fue más tarde clonada y expresada como una proteína recombinante que mostraba actividad antitumoral *in vivo* (Pennica *et al.*, 1984). Independientemente, el TNF- α fue también identificado como “caquectina”, un factor secretado por macrófagos responsable del desgaste (caquexia) observado durante infecciones parasitarias crónicas (Beutler y Cerami, 1987). Desde entonces, al TNF- α se le ha implicado en una serie de diversas situaciones malignas, inflamatorias e infecciosas. En el ámbito celular, se ha demostrado que modula un amplio espectro de respuestas, incluyendo la activación de muchos genes implicados en respuestas inflamatorias e inmunorreguladoras, proliferación celular, respuesta antiviral, inhibición del crecimiento y muerte celular (Fiers, 1991; Beutler, 1995). En general, el TNF- α es considerado principalmente como un mediador endógeno de la inflamación y sus fenómenos asociados (p.e.; el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), y se ha identificado a las células endoteliales vasculares como la principal diana de las acciones proinflamatorias del TNF- α . El TNF- α carece de actividad enzimática, y todas sus acciones son el resultado de las respuestas de la célula diana a la presencia de la citoquina.

1.4.1. EFECTOS FISIOLÓGICOS Y METABOLICOS DEL TNF- α

1.4.1.1. TEMPERATURA CORPORAL

Desde hace muchos años se sabe que la endotoxina bacteriana produce fiebre. La mediación de esta respuesta fisiológica fue atribuida al denominado pirógeno endógeno, hoy conocido como IL-1. La acción de la IL-1 sobre la temperatura corporal parece deberse a la acción de la citoquina sobre el área preóptica del hipotálamo anterior, donde estimula la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2). Dinarello *et al.* (1986) describieron que el TNF- α , al igual que la IL-1 o el IFN- α , pueden causar fiebre y estimular directamente la síntesis y liberación hipotalámica de PGE2. No obstante, el papel del TNF- α sería discutible porque activa la síntesis de IL-1, la cual podría mediar la respuesta febril. Se ha descrito que la administración intracerebroventricular de TNF- α en ratas produce fiebre, así como un aumento en el consumo de oxígeno y en la actividad del tejido adiposo marrón (Rothwell, 1988). Este tejido podría ser responsable de parte de la respuesta febril, como resultado de su activación simpática. El TNF- α aumenta la actividad termogénica de este tejido (Coombes *et al.*, 1987). En un estudio con pacientes de cáncer a los que se infundió TNF- α , se reproducían los

efectos causados por las endotoxinas, entre ellos la fiebre (Michie *et al.*, 1988). Sin embargo, Mathison *et al.*, (1988) hallaron que el pretratamiento de conejos con anticuerpos policlonales contra TNF- α protegía contra la hipotensión y la letalidad inducidas por LPS, pero la fiebre no sólo no era atenuada sino que aumentaba considerablemente. Resultados similares fueron obtenidos utilizando ratas como modelo experimental (Long *et al.*, 1990). Se ha sugerido por todo esto que el TNF- α tiene una actividad antipirética, cuya función sería la de limitar la magnitud de la fiebre; la neutralización de la actividad biológica del TNF- α causaría por ello una respuesta febril exagerada.

1.4.1.2. INGESTA Y VACIADO GÁSTRICO

Un componente común de los estados de estrés, particularmente en la infección y el crecimiento tumoral, es la anorexia o disminución de la ingesta. Esto lleva a una movilización de las reservas de carbohidratos, proteínas y lípidos, lo cual se traduce en una importante pérdida de peso corporal. El TNF- α ha sido propuesto como mediador en los patrones alterados de ingesta y desgaste tisular. Algunos estudios indican que el TNF- α no produce anorexia ni pérdida de peso en animales sanos (Old, 1985), mientras que la IL-1 sí que es una potente inductora de anorexia (McCarty *et al.*, 1985). En muchos casos, el fracaso en la producción de la respuesta anoréxica podría deberse a la utilización de dosis muy bajas al efectuar los estudios en roedores. En ratones resistentes a la endotoxina de la cepa C3H/HeJ, se ha estimado que la administración de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de TNF- α humano produce una reducción transitoria de la ingesta del 10-15% (Moldawer *et al.*, 1988). Otros trabajos con dosis más altas (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en ratas han obtenido reducciones aún mayores, de hasta el 40% (Tracey *et al.*, 1988). El tratamiento crónico con TNF- α produce una fuerte disminución de la ingesta durante el tiempo de la infusión, pero este efecto desaparece al desarrollarse tolerancia a sus efectos anorexigénicos, lo cual sugiere que el TNF- α no sería el principal mediador de la respuesta tumoral (Bernstein *et al.*, 1991).

La inhibición del vaciado gástrico es una posible explicación a la inducción de la anorexia que produce la administración aguda o crónica de TNF- α o IL-1 (Patton *et al.*, 1987). También se ha observado que el TNF- α o la IL-1 en tratamientos agudos, reducen la tasa de absorción de lípidos ingeridos (Evans y Williamson, 1988). Por otra parte, se ha descrito que una parte importante del TNF- α administrado se localiza en el tracto gastrointestinal (Beutler *et al.*, 1985). También se ha observado necrosis en el intestino como consecuencia de la administración de TNF- α (Tracey *et al.*, 1986). Por último, se ha observado que la administración aguda de TNF- α produce una rápida disminución de la absorción intestinal de la glucosa, que no es debida a cambios en el metabolismo intestinal sino a una reducción de la tasa de vaciado gástrico (Arbós *et al.*, 1992).

1.4.1.3. METABOLISMO GLUCÍDICO

Ha sido descrito por diferentes autores que, a corto plazo, la infusión de TNF- α produce alteraciones en el metabolismo de la glucosa similares a las observadas en pacientes con enfermedades crónicas (Lang *et al.*, 1992). Tanto en la infección sistémica como en la caquexia cancerosa se produce un aumento de la producción hepática de glucosa por aumento de la glucogenólisis y de la gluconeogénesis. Substratos como el lactato y aminoácidos como la alanina y la glutamina, liberados por los tejidos periféricos, son reutilizados en el hígado para la producción de glucosa. El TNF- α parece estar implicado en este complejo proceso, aunque no hay evidencias de que actúe en el ámbito celular.

La administración de elevadas dosis de TNF- α produce hiperglucemia, con un incremento que oscila entre el 10 y el 23 % en humanos (Van der Poll *et al.*, 1991).

Similares resultados se han obtenido en ratas y perros (Bagby *et al.*, 1988; Evans *et al.*, 1989). Este efecto es proporcional a la dosis, aunque no es un efecto directo, ya que el bloqueo β -adrenérgico reduce la aumentada liberación hepática de glucosa observada tras la infusión de TNF- α (Bagby *et al.*, 1992), y no se ha observado efecto alguno de la citoquina sobre la gluconeogénesis en hepatocitos de rata *in vitro* (Rofe *et al.*, 1987).

Diversos estudios han evidenciado un aumento de la captación hepática de aminoácidos o de sus análogos no metabolizables (como el α -aminoisobutirato), si bien este efecto parece estar mediado por el glucagón (Warren *et al.*, 1987a) y no se observa *in vitro*. Otro substrato gluconeogénico importante es el lactato, cuya producción periférica parece también estar aumentada por el TNF- α (Tracey *et al.*, 1987a; Starnes *et al.*, 1988). Se ha descrito que el TNF- α estimula la producción de lactato *in vitro* en miotubos L6 (Lee *et al.*, 1987), si bien no en hemidiafragma de rata (Rofe *et al.*, 1987). Además, en la rata se ha demostrado que el aumento de los niveles de lactato tras la administración aguda de TNF- α puede ser prevenido por el bloqueo adrenérgico (Bagby *et al.*, 1992), evidenciando nuevamente un efecto indirecto de esta citoquina.

Se ha descrito ampliamente que el TNF- α determina *in vivo* un aumento de la captación de glucosa por los tejidos periféricos (Evans *et al.*, 1989; Douglas *et al.*, 1991), en especial en aquellos tejidos ricos en macrófagos como bazo, piel, intestino y riñón, además del hígado. En miotubos L6, este incremento parece estar marcado por un aumento en el número de transportadores de glucosa en la membrana plasmática (Lee *et al.*, 1987). En estas células está aumentado el metabolismo glucídico, con aumento de la captación de glucosa, glucólisis y degradación de lactato, con la presencia de un ciclo fútil entre fosfofructoquinasa y fructosa-bisfosfato fosfatasa (Zentella *et al.*, 1993). También se ha descrito que el TNF- α aumenta la captación de glucosa en preadipocitos 3T3-L1 *in vitro* (Cornelius *et al.*, 1990).

Otro aspecto muy importante de la acción del TNF- α es la inducción de resistencia a la insulina. La administración crónica de TNF- α causa resistencia sistémica a la insulina (Lang *et al.*, 1992). Se ha descrito que en humanos sanos produce resistencia a la hormona al inducir hiperglucemia sin bajar los niveles de insulina. Se han encontrado elevados niveles de expresión de TNF- α en pacientes humanos con diabetes de tipo II (Hotamisligil *et al.*, 1995), y además en cuatro modelos animales de obesidad (la rata Zucker *fa/fa*, el ratón *ob/ob*, el ratón *tub/tub* y el ratón diabético *db/db*) que presentan resistencia a la insulina, se encontró una inducción del mRNA del TNF- α en tejido adiposo blanco, con la correspondiente elevación de los niveles de la proteína TNF- α , tanto local como sistémicamente (Hotamisligil *et al.*, 1993). Es interesante destacar estudios *in vitro* con adipocitos 3T3-L1 totalmente diferenciados, que mostraron que las células expuestas a TNF- α se volvieron resistentes a la insulina en tanto que no podían estimular el transporte de hexosas en respuesta a la insulina (Stephens y Pekala, 1991). Esto parece ser una consecuencia de una disminución de la expresión de GLUT4, el transportador de glucosa inducible por insulina. De hecho, se ha descrito que el tratamiento prolongado con TNF- α de adipocitos 3T3-F442A produjo una *down-regulation* del mRNA de GLUT4 (Spiegelman y Hotamisligil, 1993). Otro dato interesante es la incrementada expresión del gen del TNF- α encontrada por Saghizadeh *et al.* (1996) en el músculo esquelético en pacientes humanos diabéticos. Los estudios llevados a cabo *in vivo*, tanto en pacientes como en animales de experimentación, sugieren que las elevaciones prolongadas de TNF- α en la terapia o la producción crónica de TNF- α pueden ser un importante mecanismo para el aumentado flujo de glucosa, así como de la resistencia a la insulina observada en estas situaciones (Lang *et al.*, 1992). También la infusión intravenosa de TNF- α durante 6 horas en perros produjo un incremento de la captación de glucosa en la extremidad (Evans *et al.*, 1989). Varios estudios con músculos incubados llevaron a la conclusión de que el TNF- α no interfiere con el

metabolismo de la glucosa en el músculo esquelético, ni el transporte de glucosa ni su incorporación a glucógeno (Fürnsil *et al.*, 1997; Meszaros *et al.*, 1998; Nolte *et al.*, 1998). Sin embargo, se encontraron resultados diferentes utilizando cultivos de células musculares. Lee *et al.* (1987) encontraron que el tratamiento con TNF- α en cultivos de la línea muscular L6 producía una estimulación de la captación de glucosa, de la formación de lactato y de la degradación de glucógeno, efecto que los autores proponían dependiente de la síntesis de nuevos transportadores de glucosa y su inserción en la membrana. Otros estudios con cultivos de miocitos primarios (Ciaraldi *et al.*, 1998) han encontrado una estimulación de la captación basal de glucosa y una inhibición de la síntesis de glucógeno. En otros estudios con la línea L6 se encontró que el tratamiento con TNF- α , o bien no producía cambios (Ranganathan y Davidson, 1996), o bien inhibía tanto el transporte de glucosa inducido por insulina como el transporte basal (Begum y Ragolia, 1996). La razón de la contraposición de estos resultados está por elucidar. En conjunto, a pesar de que los estudios llevados a cabo con músculos incubados hayan dado resultados decepcionantes, los estudios *in vivo* y con cultivos musculares parecen indicar que TNF- α es capaz de estimular el transporte basal de glucosa, inhibir la síntesis de glucógeno, y facilitar la formación de lactato a partir de glucosa (revisado por Argilés, 1999).

Respecto a los mecanismos por los cuales el TNF- α induce resistencia a la insulina, la atención está centrada en la cascada de transducción de señal de insulina y los mecanismos que determinan la sobreexpresión específica de tejido. En este sentido, Hotamisligil *et al.* (1996) han demostrado que el TNF- α interfiere con la actividad tirosina quinasa del receptor de la insulina. El TNF- α induce la fosforilación del substrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) en serina, convirtiéndolo en un inhibidor de la actividad tirosina quinasa del receptor de la insulina *in vitro*. Se ha sugerido, por tanto, que la expresión del TNF- α está implicada en una espiral fisiológica destinada quizás a limitar la obesidad a expensas de promover resistencia a la insulina.

1.4.1.4. METABOLISMO LIPÍDICO

La infección, el trauma y los procesos inflamatorios, así como la caquexia tumoral, se caracterizan por inducir importantes cambios en el metabolismo lipídico del huésped. Estas alteraciones han sido atribuidas a la acción de las citoquinas, siendo el TNF- α la que desempeña el papel primordial en esta respuesta. Durante la caquexia hay una importante pérdida de tejido adiposo blanco, básicamente debido a una caída en la actividad de la enzima LPL y a un aumento de la actividad de la lipasa sensible a hormonas (la enzima limitante en la vía lipolítica). También se observa en la caquexia una disminución del transporte de glucosa y de la lipogénesis *de novo* en el tejido adiposo blanco, y unos incrementados niveles de lípidos circulantes, tanto triacilgliceroles como colesterol.

Se ha demostrado que el TNF- α disminuye la actividad LPL en adipocitos 3T3-L1 (Price *et al.*, 1986), de forma asociada a un descenso en el mRNA de esta enzima (Cornelius *et al.*, 1988). La disminución de la actividad LPL causada por el tratamiento con TNF- α ha sido descrita también en cultivo organotípico (Fried y Zechner, 1989) y en experimentos *in vivo* (Semb *et al.*, 1987). Se ha demostrado que esta inhibición de la actividad disminuye la captación de lípidos exógenos por parte del tejido adiposo, con el consecuente incremento de VLDL producidas por el hígado (Feingold y Grunfeld, 1987). Sin embargo, el tratamiento con TNF- α de cultivos primarios de adipocitos no fue capaz de disminuir la LPL (Kern, 1988b). La adición del TNF- α en adipocitos totalmente diferenciados sí que produjo un aumento de la lipólisis (Feingold *et al.*, 1992). Además, esta citoquina produjo una inhibición en el transporte de glucosa en adipocitos, lo que significa una disminución de los substratos disponibles para la lipogénesis. Durante la diferenciación preadipocitaria, el TNF- α produjo una disminución de los niveles de mRNA de la acetil-CoA carboxilasa (enzima clave en la

lipogénesis), si bien no se observó en adipocitos totalmente diferenciados (Pape y Kim, 1988). Por el contrario, se ha demostrado que el TNF- α no tiene una acción directa sobre la lipogénesis *de novo* en el tejido adiposo blanco de ratas ayunadas (Feingold y Grunfeld, 1987). Otro importante factor que puede contribuir a la hiperlipidemia es la síntesis *de novo* de ácidos grasos que tiene lugar en el hígado. De hecho, ha sido demostrado que el TNF- α es capaz de aumentar la lipogénesis hepática *in vivo* y la subsiguiente producción de VLDL (Feingold *et al.*, 1989).

En los últimos años se ha demostrado que el TNF- α es capaz de producir apoptosis en adipocitos de la línea celular 3T3-L1 en cultivo (Niesler *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2004).

En conjunto, parece probable que el TNF- α , junto con las alteraciones metabólicas, esté implicado en decantar el balance metabólico del adipocito hacia la vertiente catabólica. De hecho, experimentos llevados a cabo en nuestro grupo utilizando un anticuerpo policlonal anti-TNF- α , demostraron la implicación de esta citoquina en las alteraciones metabólicas observadas en los roedores portadores de tumor (Carbó *et al.*, 1994).

1.4.1.5. METABOLISMO PROTEICO

En la sepsis y durante el crecimiento tumoral, se observan profundas alteraciones en el metabolismo proteico del huésped, que pueden resumirse en un incrementado recambio proteico muscular y un patrón de síntesis proteica hepática marcadamente diferente (Argilés *et al.*, 1992; Van der Poll y Sauerwein, 1993).

La incrementada síntesis proteica en el hígado inducida por el TNF- α está asociada a un aumento en la captación de aminoácidos, particularmente alanina y otros aminoácidos transportados por el sistema A. La administración de TNF- α *in vivo* aumenta la captación hepática de α -aminoisobutirato (Warren *et al.*, 1988; Argilés *et al.*, 1989b). No obstante, los efectos del TNF- α no se observan *in vitro* (Warren *et al.*, 1988b), sugiriendo que estos efectos son indirectos. El glucagón y los glucocorticoides parecen ser los responsables de la aumentada captación hepática de aminoácidos, y de hecho, sus niveles están incrementados tras la administración de TNF- α (Warren *et al.*, 1987b, 1988b).

En el músculo esquelético, el TNF- α es capaz de alterar tanto el transporte de aminoácidos como el recambio proteico. Estudios *in vivo* en músculo esquelético han encontrado que la administración aguda de TNF- α producía una disminución del transporte de aminoácidos, efecto que parecía no estar mediado por los glucocorticoides (Argilés *et al.*, 1989b; Tayek, 1996). Sin embargo, los resultados obtenidos en músculos incubados dejan menos claro si el efecto del TNF- α es directo (García-Martínez *et al.*, 1993a; Zamir *et al.*, 1993).

Es interesante destacar el hecho de que el tratamiento con TNF- α incrementa el recambio de AACR (leucina, isoleucina y valina) (Nawabi *et al.*, 1990; García-Martínez *et al.*, 1995). Estos aminoácidos representan el 40% de las necesidades diarias de aminoácidos esenciales en el hombre, y su utilización por el músculo esquelético se halla notablemente incrementada en situaciones catabólicas como el cáncer y la sepsis.

Existen muchas evidencias de que el TNF- α participa en el desgaste proteico y la pérdida de nitrógeno asociada a situaciones catabólicas. El tratamiento crónico de ratas con TNF- α recombinante produjo en los animales tratados una depleción de proteína al compararlas con los controles *pair-fed* (Fong *et al.*, 1989). De hecho, el tratamiento crónico con TNF- α o IL-1 dió como resultado la redistribución de la proteína corporal y una considerable disminución del contenido proteico muscular, asociado a una disminución coordinada de los niveles de mRNA de proteínas miofibrilares (Fong *et al.*, 1989). Los estudios relacionados con la administración de TNF- α recombinante *in vivo* han demostrado un incremento del flujo de salida del

músculo esquelético de pacientes con cáncer diseminado que no presentaban pérdida de peso (Warren *et al.*, 1987b). Otros autores, por medio de la infusión de ^{14}C -leucina a ratas, mostraron que la administración crónica de TNF- α aumentaba notablemente la proteólisis muscular (Flores *et al.*, 1989). Goodman (1991), midiendo la liberación tanto de tirosina como de 3-metil-histidina en músculos incubados procedentes de ratas tratadas agudamente con la citoquina, concluyeron que el TNF- α estaba implicado en la activación de la proteólisis muscular. Los mecanismos responsables de estas acciones están cada vez mejor descritos. Nuestro grupo de investigación demostró que el tratamiento con TNF- α aumenta la degradación proteica medida *in vivo* en el músculo esquelético (Llovera *et al.*, 1993a, 1993b), y que al menos durante el crecimiento tumoral el desgaste muscular está asociado con la activación de una actividad proteolítica no lisosomal dependiente de ATP y ubiquitina (Llovera *et al.*, 1994, 1995), estando esta activación mediada probablemente por TNF- α (García-Martínez *et al.*, 1993a, 1993b, 1994a). Respecto al posible papel directo del TNF- α en la proteólisis muscular, se ha descrito la presencia de ambos receptores (TNFR-I y TNFR-II) en el músculo esquelético (Tartaglia y Goeddel, 1992), y nuestro grupo ha demostrado que la acción de la citoquina en la inducción de la proteólisis mediada por ubiquitina puede ser directa (Llovera *et al.*, 1997). Parece, por tanto, que el TNF- α , solo o con otras citoquinas, podría mediar los cambios del metabolismo nitrogenado muscular asociados a estados caquéticos.

Los efectos del TNF- α sobre el recambio proteico han sido estudiados también utilizando sistemas de cultivos musculares. Frost *et al.* (1997) describieron que la presencia transitoria de TNF- α en el medio de cultivo inhibía la activación de la síntesis proteica estimulada por el factor de crecimiento *insulin-like* I (IGF-I) de forma proporcional a la dosis. Sin embargo, el tratamiento de los mioblastos con TNF- α no tuvo ningún efecto ni sobre la unión del IGF-I a su receptor ni sobre su capacidad de estimular la incorporación de timidina. Los autores concluyeron que las acciones del IGF-I sobre la síntesis proteica podrían estar dificultadas durante los estados catabólicos, en los cuales el TNF- α está sobreexpresado. Con relación a este estudio, se observó también que la administración de TNF- α exógeno a animales de experimentación reducía el contenido de IGF-I muscular (Fan *et al.*, 1995).

Otros autores, utilizando células diferenciadas de la línea muscular C2C12, describieron una activación de la proteólisis debida al tratamiento con TNF- α ; proteólisis que iba acompañada de una activación del sistema dependiente de ubiquitina y que parecía estar mediada por NF- κ B (Li *et al.*, 1998b). Contrariamente, utilizando el mismo modelo, otros autores describieron que el TNF- α producía un aumento de la vida media de las proteínas de vida larga por medio de la disminución de la tasa de degradación proteica (Ebisui *et al.*, 1995). En otro estudio en el que se realizó la perfusión con TNF- α de extremidades aisladas de pacientes con dos tipos de tumor, no se observó ningún cambio en el metabolismo glucídico o proteico muscular, sugiriendo que la citoquina no tiene un efecto directo en el metabolismo del músculo humano (De Blaaw *et al.*, 1997).

1.4.2. ESTADOS PATOLÓGICOS

1.4.2.1. INFLAMACIÓN Y ARTRITIS REUMATOIDE

El TNF- α parece jugar un papel crucial tanto en las etapas tempranas como las tardías del desarrollo de la inflamación, desde localizar al agente nocivo y amplificar la respuesta celular y la mediada (tanto local como sistemáticamente, como la eliminación (apoptosis) de las células dañadas y la reparación el daño inflamatorio. El TNF- α parece estar implicado también en algunas de las alteraciones fisiológicas asociadas a la inflamación. Se ha demostrado que el TNF- α y la IL-1, localizados tanto periféricamente como en el cerebro, son responsables (probablemente a través de la

inducción de IL-6) de la respuesta pirogénica observada en la inflamación causada por trementina (Luheshi *et al.*, 1997).

Aunque son varias las citoquinas que se han encontrado en elevados niveles en pacientes con artritis reumatoide (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ) (Houssiau *et al.*, 1988), el TNF- α ha ganado protagonismo como el mediador proinflamatorio central de la artritis reumatoide, y anticuerpos anti-TNF- α o proteínas de fusión TNFR-II-Fc han sido utilizados con éxito en el tratamiento de este tipo de pacientes (Kalden-Nemeth *et al.*, 1997; Moreland *et al.*, 1997).

1.4.2.2. SEPSIS Y SHOCK SÉPTICO

Se define la sepsis como un conjunto de síntomas resultantes de una excesiva respuesta inflamatoria sistémica a la infección. Esta respuesta inflamatoria está mediada por citoquinas. El TNF- α , la IL-6, y la IL-1 se encuentran frecuentemente elevados en el suero de pacientes humanos con sepsis, y los niveles de las citoquinas se correlacionan con la gravedad y el estado de la enfermedad (Edwards y Moldawer, 1998). Los ratones deficientes en IL-6 no están afectados por la anorexia, fiebre o caquexia asociada con los abscesos de trementina (un modelo experimental de inflamación localizada) pero sí lo están los infectados con el virus de la gripe, lo que sugiere que la IL-6 estaría más implicada en el desarrollo del estado patológico durante la inflamación local que durante la infección (Kozak *et al.*, 1997). También ha sido descrito que los ratones *knock-out* tanto para el receptor 1 del TNF- α como para el receptor 1 de la IL-1 eran resistentes a la administración de endotoxina (0% de mortalidad vs. 100% en los controles), aunque sólo los deficientes en el IL-1R1 eran resistentes a la mortalidad causada por bacterias gram-negativas, lo que sugiere que la señal mediada por la IL-1 es más crítica que la mediada por el TNF- α a la hora de provocar los efectos sistémicos tóxicos, mientras que esta última es más importante en la mediación de la activación de los mecanismos locales de defensa en el lugar de la infección (Fisher *et al.*, 1996).

Respecto al *shock* séptico (síndrome asociado a infecciones invasivas y que causa la muerte en un 30% de los casos), existen estudios que indican que el TNF- α y la cascada secundaria de citoquinas (IL-1, IL-6) determinan en gran parte el curso y la letalidad de este síndrome (Tracey y Cerami, 1993). De hecho, la administración de TNF- α a diferentes especies de mamíferos produce un estado de *shock* y lesiones tisulares que son similares al síndrome de *shock* séptico y la inhibición del TNF- α con anticuerpos anti-TNF- α en modelos de *shock* séptico previene el desarrollo del *shock* y protege a los animales de la mortalidad asociada con este estado (Tracey, 1991).

1.4.2.3. RESISTENCIA A LA INSULINA Y OBESIDAD

La resistencia a la insulina es un estado en el cual disminuye la tasa de utilización de glucosa periférica y aumenta de forma relativa la gluconeogénesis hepática. Existen varias evidencias que involucran al TNF- α en este estado metabólico. Primero, la administración de TNF- α de forma crónica disminuye la acción de la insulina regulando la captación de glucosa periférica y en la producción de glucosa hepática (Lang *et al.*, 1992); segundo, el TNF- α puede inducir una disminución de GLUT4, un importante transportador de glucosa en músculo y tejido adiposo blanco (Stephens y Pekala, 1991); tercero, el TNF- α está sobreexpresado en animales obesos con resistencia a la insulina (Hotamisligil *et al.*, 1993); y cuarto, muchos de los estados que cursan con resistencia a la insulina también presentan concentraciones plasmáticas o tisulares de TNF- α elevadas.

Los receptores β -adrenérgicos se han involucrado en el mecanismo por el cual el TNF- α puede inducir la resistencia a la insulina, dado que el bloqueo de éstos, implica una disminución de la resistencia a la insulina inducida por esta citoquina

(Lang. 1993). Por último, el TNF- α se ha involucrado en el desarrollo de la obesidad, patología que cursa con resistencia a la insulina (Bullo-Bonet *et al.*, 1999).

Otras citoquinas proinflamatorias, como el factor de migración de macrófagos, pueden jugar un papel muy importante en los mecanismos de resistencia a la insulina observados en la obesidad y la diabetes. En concreto, este factor se encuentra sobreexpresado en el tejido adiposo epididimal, y el TNF- α puede inducir su producción y secreción en adipocitos 3T3-L1 (Hirokawa *et al.*, 1997)

1.4.2.4. SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA (SIDA)

Se ha descrito que el TNF- α y otras citoquinas están implicadas en el desarrollo del SIDA por su posible papel mediador en el desarrollo de la caquexia, la activación de infecciones latentes, y la replicación del virus de tipo 1 de la inmunodeficiencia humana (HIV-1). En este sentido, se ha observado que los pacientes caquéticos con SIDA producen TNF- α , y en algunos casos se ha sugerido que la cantidad de TNF- α producida está relacionada con la gravedad de la enfermedad (Lahdevirta *et al.*, 1988). Pero se ha observado que, aunque en los enfermos de SIDA el HIV-1 activa la producción de TNF- α e IFN- α , los niveles de este último parecen estar más relacionados con el estadio de la enfermedad que los niveles del primero (Von Sydow *et al.*, 1991). En los enfermos de SIDA, después de un estado agudo de replicación intensa, tiene lugar la inducción de la producción de IFN- α , que da lugar a una inhibición parcial de la síntesis vírica; entonces es reprimida la infección por mecanismos de inmunidad humoral y celular, y se llega a un estadio crónico con una replicación vírica limitada (Ehrnst *et al.*, 1988; Coombs *et al.*, 1989; Ho *et al.*, 1989). Posteriormente aparecen diversos patógenos oportunistas cuando la supresión inmune es lo bastante pronunciada; estos patógenos inducen la síntesis de TNF- α , el cual estimula la replicación del HIV-1, y seguidamente se induce de nuevo la síntesis de IFN- α . En este momento, el balance entre las fuerzas interactivas del TNF- α y el IFN- α marcará el progreso de la infección. Finalmente, el agotamiento de la producción de IFN (Rossol *et al.*, 1989), junto con el descenso de los mecanismos de inmunidad humoral y celular, favorecen la activación de la replicación vírica por el TNF- α y la transactivación de virus oportunistas.

Por otra parte, la IL-6 ha sido implicada en la progresión del sarcoma de Kaposi, un tumor de origen vascular asociado al SIDA. Se ha demostrado que la IL-6 estimula la proliferación de las células del sarcoma de Kaposi, a través de un sistema que incluye a la oncostatina M. La IL-6 actúa como un factor de crecimiento autocrino, siendo su producción estimulada por la acción de la oncostatina M en las células del sarcoma de Kaposi. En un trabajo en el que se usaron oligonucleótidos antisentido para la IL-6, se inhibió la proliferación de las células de este sarcoma en un 50% (Miles *et al.*, 1990). Se ha encontrado que la proteína tat, un activador de la transcripción producido por el HIV-1, induce la producción de IL-6 en las células del sarcoma de Kaposi, estimulando su propio crecimiento (Ensoli *et al.*, 1992).

1.4.2.5. CÁNCER

Aunque el TNF- α fue descrito originalmente como un factor capaz de causar necrosis hemorrágica en tumores, el papel de esta citoquina en diferentes modelos tumorales es extraordinariamente complejo, y en algunos casos contradictorio. Aunque se han encontrado elevados niveles de TNF- α y otras citoquinas en sepsis y trauma, no sucede siempre lo mismo en el crecimiento tumoral, donde la correlación entre la concentración de TNF- α y el desarrollo del cáncer es discutible (Männel *et al.*, 1992). Balkwill *et al.* (1987) han descrito que el 50% de los pacientes neoplásicos estudiados presentan niveles elevados de TNF- α , aunque otros autores no han hallado este

aumento (Selby *et al.*, 1988). Igualmente, en modelos tumorales se han encontrado resultados dispares, dependiendo del modelo tumoral escogido.

La actividad antitumoral del TNF- α , descrita inicialmente por Coley y posteriormente por otros autores, fue redescrita en un modelo de sarcoma (Carswell *et al.*, 1975). Estudios más recientes con este mismo modelo de sarcoma han demostrado que la acción del TNF- α era directamente proporcional a la dosis, así como variable en función de la vía y periodicidad de su administración (Haranaka *et al.*, 1984; Sohmura *et al.*, 1986; Creasey *et al.*, 1986). Sin embargo, la actividad antitumoral observada *in vivo* no se reproduce en los experimentos *in vitro*, sugiriendo la participación de otros factores en el desarrollo de la actividad antitumoral (Palladino *et al.*, 1987). La participación de otras citoquinas y, sobre todo, la profunda alteración en la vasculatura próxima al tumor y la activación de células inmunitarias (macrófagos, células T y células NK), parecen las responsables de este efecto (Malik, 1992).

Los efectos antiproliferativos del TNF- α sobre las células tumorales pueden verse notablemente aumentados *in vitro* por algunas citoquinas, esencialmente la IL-2 y el IFN- γ (Sugarman *et al.*, 1985; Ruggiero y Baglioni, 1987). Igualmente, el TNF- α puede activar mecanismos tumoricidas activados *in vivo* por otras citoquinas, como la IL-2 (Owen-Schaub *et al.*, 1988) o el IFN- γ (Hori *et al.*, 1987). La combinación de TNF- α e IL-2 ha sido estudiada por diferentes autores. Winkelhake *et al.* (1989) han descrito que la administración conjunta de ambas citoquinas inhibía completamente el crecimiento subcutáneo de cinco líneas tumorales diferentes, aunque ninguna citoquina presentaba apenas actividad por separado. Similares resultados han sido obtenidos por diferentes autores, si bien sólo con tumores inmunogénicos (Nishimura *et al.*, 1987; Agah *et al.*, 1988).

La producción de TNF- α por células tumorales ha sido descrita para diferentes líneas celulares (Männel *et al.*, 1992). En estas células, el TNF- α parece actuar como factor de crecimiento, activando además colagenasas tumorales y la adhesión de estas células, contribuyendo de esta manera al proceso metastásico (Malik, 1992). No obstante, aún funcionando como factor de crecimiento *in vitro* para estas células, el TNF- α puede teóricamente inhibir su capacidad metastásica mediante su capacidad antitumoral *in vivo*, al estimular las células efectoras de la defensa del huésped (macrófagos, células NK, células T citotóxicas, etc.). En la figura 1 se puede observar un modelo esquemático de los efectos del TNF- α en situaciones catabólicas como son el crecimiento tumoral o la infección aguda (Argilés y López-Soriano, 1998).

El papel del TNF- α como mediador del desgaste asociado a la caquexia cancerosa ha sido discutido anteriormente en el apartado 1.4., y sobre la anorexia asociada caquexia en el apartado 1.1.2. Otras citoquinas han sido también implicadas en la caquexia cancerosa. Así, Strassman *et al.* (1993), usando un modelo de adenocarcinoma, mostraron que el tratamiento con anti-IL-6 murina era eficaz para revertir los parámetros clave la caquexia en ratones portadores de tumor. Por otra parte, utilizando células diferenciadas de la línea muscular C2C12, otros autores describieron que la incubación con IL-6 producía aumento de la tasa de degradación proteica (Ebisui *et al.*, 1995). Sin embargo, otros estudios tanto *in vivo* (Soda *et al.*, 1994) como con músculos incubados (García-Martínez *et al.*, 1994b) se contraponen a evidenciar un papel catabólico para la IL-6 en la proteólisis muscular. Otro candidato interesante como mediador de la caquexia es el IFN- γ . Esta citoquina presenta sinergismo con el TNF- α en muchas de sus actividades biológicas, y es capaz de mimetizar los efectos del éste en el metabolismo lipídico (Argilés *et al.*, 1997). Matthys *et al.* (1991a), usando un anticuerpo monoclonal contra IFN- γ , fueron capaces de revertir el síndrome de desgaste asociado al crecimiento del carcinoma pulmonar de Lewis en ratón. Este mismo grupo demostró que ratones *nude* inoculados con células CHO que producían constitutivamente IFN- γ , desarrollaban caquexia severa en poco tiempo (Matthys *et al.*, 1991b).

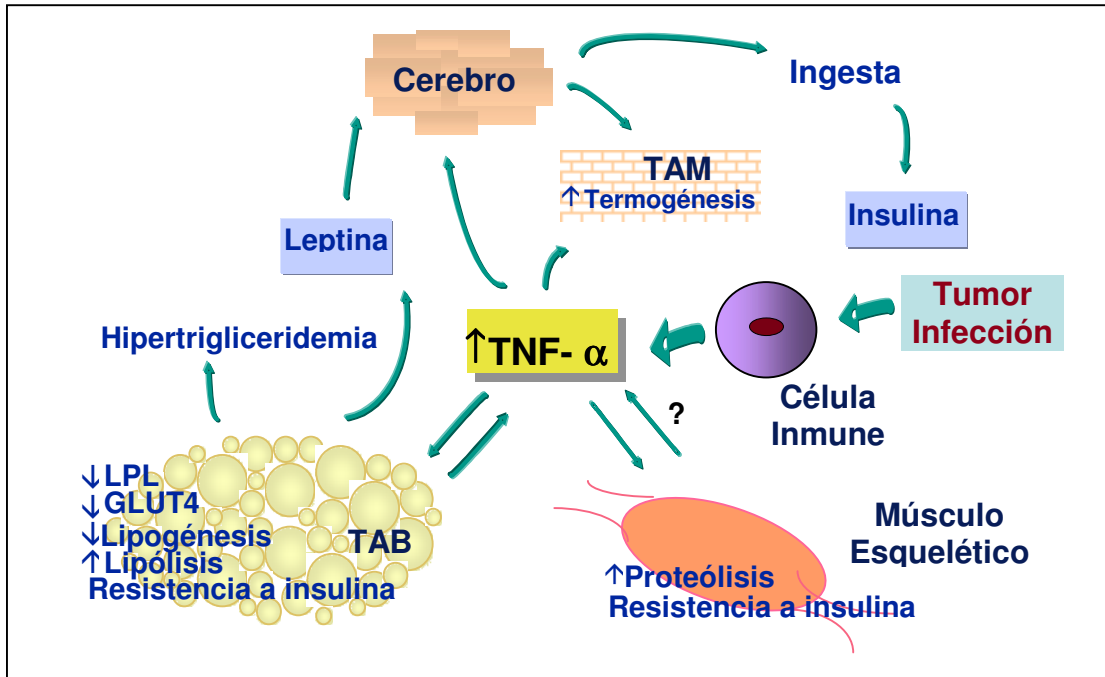


Figura 1. Interacciones del TNF- α y el organismo durante la caquexia o la infección aguda (Argilés y López-Soriano, 1998).

Otras citoquinas como el LIF (Mori *et al.*, 1991), el TGF- β (Zugmaier *et al.*, 1991) o la IL-1 (Moldawer *et al.*, 1987b) también han sido propuestas como mediadores de la caquexia. En concreto, de esta última citoquina, aunque se conocen bien sus acciones anorexigénica y pirogénica, se ha sugerido que su papel en la caquexia cancerosa (si es que lo tiene) puede ser secundario a la acción de otros mediadores, ya que la administración del IL-1ra a ratas portadoras de tumor no dió lugar a mejora alguna en el grado de caquexia (Costelli *et al.*, 1995b).

2. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA CAQUEXIA

2.1. SISTEMAS PROTEOLÍTICOS.

La proteólisis intracelular lleva a cabo una importante función, ya que muchos aspectos de la fisiología y del desarrollo celular están controlados por la degradación de proteínas específicas. En el caso concreto del músculo esquelético, las proteínas están sometidas a un recambio continuo, que es el resultado del balance entre las tasas de síntesis y degradación proteica. La regulación de la proteólisis muscular juega un papel muy importante en la homeostasis energética, el control de la masa muscular y el crecimiento corporal, así como en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas.

Mientras que la biosíntesis de proteínas es un proceso bastante conocido, al menos en términos generales, el catabolismo de las proteínas no está tan claro. A pesar de todo, los conocimientos sobre los mecanismos de la proteólisis intracelular han experimentado un gran avance durante los últimos años. Actualmente es bien conocido que las células de los mamíferos tienen diferentes sistemas proteolíticos que se utilizan para diferentes funciones fisiológicas. Estos procesos degradativos son mucho más complejos de lo que se había pensado inicialmente, y los podríamos clasificar como se indica en la tabla 3.

Sistema lisosomal

Sistema citosólicos no lisosomales:

Dependiente de calcio

Caspasas o proteasas ICE (*Interleukin- β converting enzymes*)

Dependientes de ATP y ubiquitina

Dependientes de ATP e independientes de ubiquitina

Sistemas mitocondriales

Dependiente de ATP

Tabla 3. Clasificación de los sistemas proteolíticos en células eucariotas (Lecker et al., 1999).

2.1.1. SISTEMA LISOSOMAL

La proteólisis lisosomal es uno de los sistemas proteolíticos más extensamente estudiados en las células de los mamíferos. Los lisosomas son orgánulos celulares que contienen un gran número de proteasas ácidas (catepsinas), así como otras hidrolasas ácidas. El lisosoma es el principal lugar donde se degradan las proteínas de membrana y las glicoproteínas, así como los receptores de hormonas. Se conocen más de 40 enzimas lisosómicas, todas ellas son enzimas hidrolíticas: proteasas, nucleasas, glucosidasas, lipasas, fosfolipasas, fosfatasa y sulfatasas. Además, todas son hidrolasas ácidas, con una actividad óptima próxima al pH 5 (el pH del interior del orgánulo); esta característica también protege a la célula en el caso de que haya una ruptura de la membrana lisosomal.

La vía autofágica lisosomal de la proteólisis intracelular es un proceso en gran parte no selectivo, que se considera que es el principal responsable de la degradación total de las proteínas celulares; en este sentido, se estima que más del 90 % de las proteínas de vida larga y una gran fracción de las de vida corta son degradadas en el lisosoma (Ahlberg *et al.*, 1985). Se ha descrito que la proteólisis es iniciada por unas endopeptidasas, que son el paso limitante, y después el proceso es continuado por unas exopeptidasas. El músculo esquelético contiene pocos lisosomas, y varias observaciones sugieren que las principales proteasas lisosomales (catepsinas B, H, L y D) no contribuyen de manera relevante a la proteólisis general en músculos incubados en condiciones óptimas (Temparis *et al.*, 1994). Además, según otros

trabajos, los lisosomas no están implicados en la degradación de proteínas miofibrilares (Lowell *et al.*, 1986). En general, existe la convicción de que la proteólisis lisosomal no es selectiva.

2.1.1.1. REGULACIÓN DE LA PROTEÓLISIS LISOSOMAL

Bajo condiciones nutricionales deficientes, se activa la degradación de varias proteínas solubles en los lisosomas. Se ha observado que la no adición de insulina, aminoácidos o suero en el medio de incubación, provoca un aumento de la proteólisis lisosomal en diferentes tejidos, como el músculo esquelético y cardíaco (Kettelhut *et al.*, 1988), fibroblastos (Chiang y Dice, 1988) e hígado (Lardeaux y Mortimore, 1987), sin que comporte cambios en el contenido de enzimas lisosómicas. En cambio, el hipotiroidismo puede disminuir la proteólisis lisosomal en músculos incubados, así como el contenido de proteasas lisosomales (Tawa y Goldberg, 1991).

2.1.1.2. CATEPSINAS

Las principales catepsinas existentes en músculo esquelético son:

- **Catepsina D:** Una de las enzimas lisosómicas más abundantes, al menos en hígado de rata. Es una aspartil-proteinasa con especificidad similar a la pepsina, que lleva a cabo la hidrólisis de residuos hidrofóbicos. Su pH óptimo está entre 3 y 5, y es una proteína dimérica.
- **Catepsina L:** Es la cisteinil-proteasa más potente. La hidrólisis catalizada por esta enzima necesita que los sustratos tengan aminoácidos hidrofóbicos en las posiciones P3 y P2, y si además hay un aminoácido apolar en posición P1, la hidrólisis es más rápida (Kirschke *et al.*, 1980).
- **Catepsina B:** Se ha detectado en la mayoría de tejidos y órganos de mamíferos. Tiene actividad endopeptidasa, aunque no se conoce su especificidad (Kirschke y Barret, 1987). Tiene baja actividad en comparación a la catepsina L (menos del 10%).
- **Catepsina H:** Se ha detectado en todos los órganos y tejidos de rata. Actúa óptimamente entre un pH de 6-7 como una aminopeptidasa sobre péptidos que no tienen bloqueado el extremo N-terminal y sobre el extremo N-terminal de proteínas y de productos peptídicos de su propia acción endopeptidasa. La actividad de esta catepsina sobre las proteínas es muy limitada, y no representa más de un 5% de la actividad proteolítica total.

2.1.2. SISTEMA DEPENDIENTE DE CALCIO: CALPAÍNAS

Las calpaínas o proteinasas neutras activadas por calcio (CANPs) son proenzimas reguladas, al menos *in vitro*, por su unión al calcio y modificaciones autoproteolíticas. Además, la identificación de dos proteínas reguladoras, un inhibidor y un estimulador, indica que estas proteasas forman parte de un complejo sistema proteolítico ampliamente distribuido entre las células eucariotas. Las calpaínas son enzimas intracelulares, la mayoría de las cuales son citosólicas, y entre un 7 y un 30 % están asociadas a estructuras de membrana (Samis y Elce, 1989). En la membrana la distribución de las calpaínas no es uniforme, pero pueden estar asociadas a varios componentes, como las placas de adhesión (Beckerle *et al.*, 1987).

2.1.2.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES CATALÍTICAS

Entre las dos isoformas de las calpaínas no existen grandes diferencias, excepto la concentración de calcio necesaria para activar la proteólisis: mientras que la calpaína I requiere concentraciones del orden micromolar para su actividad completa, la calpaína II necesita concentraciones del orden milimolar. Estas enzimas tienen un pH óptimo alrededor de 7,5 y son cisteinil-proteasas. La mayoría de los cationes

divalentes no pueden sustituir al Ca^{2+} , pero el Sr^{2+} también puede activar esta proteasa aunque a una mayor concentración. Las calpaínas son de naturaleza heterodimérica, formadas por dos subunidades: una subunidad catalítica de 80 kDa y una subunidad reguladora de 30 kDa. Todas las calpaínas del organismo utilizan la misma subunidad reguladora, y las diferencias en la especificidad y en la activación del calcio de diferentes subtipos de calpaínas son debidas a la estructura de la subunidad catalítica. En la subunidad de 30 kDa existen dos dominios: el extremo N-terminal presenta un gran número de residuos de glicina, y en el extremo C-terminal se ubica el dominio de unión a calcio (Sakihama *et al.*, 1985). Parece ser que los dominios N-terminales de ambas subunidades están implicados en la activación de la calpaína II mediante la asociación a las membranas plasmáticas. En cambio, el proceso autolítico del dominio N-terminal de la subunidad de 80 kDa está implicado en la reducción del requerimiento de calcio para la actividad de la calpaína I (Imajoh *et al.*, 1986).

2.1.2.2. CALPAÍNAS Y ESTADOS PATOLÓGICOS

La actividad de las calpaínas ha sido estudiada en diferentes patologías musculares; en este sentido, se han encontrado elevados niveles de calpaínas en músculo cardíaco asociados a cardiomiopatías y a hipertensión (Spalla *et al.*, 1985).

Se ha observado que la inactivación de las proteasas activadas por calcio no bloquea la acelerada proteólisis causada por la denervación (Furuno *et al.*, 1990) o por el ayuno (Han *et al.*, 1988) en músculo esquelético. Además, la adición de inhibidores de las calpaínas a preparaciones de músculo esquelético no disminuye la proteólisis basal (Rodeman *et al.*, 1982). Estos datos, junto con experimentos realizados con ratas alimentadas con una dieta deficiente en proteína, sugieren que en condiciones fisiológicas el proceso proteolítico dependiente de calcio no contribuye significativamente a la proteólisis muscular total (Tawa *et al.*, 1992). Aunque las funciones exactas de las calpaínas todavía no se conocen, parece ser que están relacionadas con la proteólisis específica en acontecimientos que pueden alterar la estructura y el metabolismo intracelular (Johnson, 1990). En el músculo de ratas portadoras del tumor Yoshida AH-130, se presenta una clara inducción de la expresión de m-calpaína, mientras que la expresión de la calpaína 3, que es específica del músculo disminuye; este fenómeno se trataría de un mecanismo contrarregulador de la proteólisis muscular (Busquets *et al.*, 2000a).

2.1.3. SISTEMA DEPENDIENTE DE ATP Y UBIQUITINA

La ubiquitina se encuentra implicada en un listado casi inacabable de procesos celulares. Ausente en procariotas, esta proteína de 76 aminoácidos está presente en todos los eucariotas estudiados, tanto en forma libre como unida a una gran variedad de proteínas citoplasmáticas, nucleares y de membrana. Se ha postulado que el sistema proteolítico dependiente de ubiquitina sería una de las principales vías por la cual se degradarían selectivamente las proteínas intracelulares. Todas las funciones celulares en las que participa las realiza a través de su asociación a un complejo sistema multienzimático (al que llamaremos “sistema de la ubiquitina” o “sistema ubiquitina/ATP-dependiente”), que se encarga de unir o desunir moléculas de ubiquitina a una gran variedad de substratos proteicos. Las características más relevantes de esta proteína son su gran conservación a lo largo de la escala evolutiva, su gran abundancia y su gran estabilidad estructural. Se ha demostrado que la ubiquitinización juega un importante papel en el metabolismo de tres tipos relevantes de macromoléculas: proteínas, RNA y DNA (Schlesinger, 1990).

2.1.3.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

La ubiquitina es una proteína de pequeño tamaño, con un peso molecular de 8.5 kDa. Su estructura cristalina, así como el análisis por resonancia magnética nuclear (Vijay-Kurnar *et al.*, 1987; Weber *et al.*, 1987), revelan una conformación globular compacta, constituida por cinco láminas β y una hélice α de tres vueltas y media. Contiene un núcleo hidrofóbico y un gran número de puentes de hidrógeno, lo que explica su gran estabilidad frente a los cambios de temperatura (es estable por debajo de los 80°C) y de pH (permanece plegada entre pH 1-13) (Cary *et al.*, 1980), así como su resistencia a la degradación proteica aún manteniendo un estrecho contacto con las proteasas de su sistema. Uno de los puntos más característicos de la estructura de la ubiquitina es que su extremo C-terminal (Arg₇₄-Gly₇₅-Gly₇₆) sobresale de la estructura globular formando un apéndice de gran movilidad. A través de este extremo interactúa con las enzimas de su sistema (E1,E2,E3), así como con las proteínas diana.

La ubiquitina es una de las proteínas más abundantes en la célula junto con la actina, la tubulina y las histonas; se ha estimado que, dependiendo del tipo celular, existen del orden de 8×10^7 a 2×10^8 moléculas de ubiquitina por célula (Haas y Bright, 1985; Carlson y Rechsteiner, 1987). La ubiquitina se encuentra en un equilibrio dinámico entre la forma libre y las formas conjugadas, sea con histonas, con proteínas de alto peso molecular, o con enzimas de activación o conjugación de su sistema (Carlson y Rechsteiner, 1987).

2.1.3.2. DEGRADACIÓN PROTEICA

Ésta es, sin duda, la función más estudiada y conocida de la ubiquitina (revisado por Rechsteiner, 1987; Hershko, 1991; Jentsch, 1992; Varshavsky, 1992). El sistema de la ubiquitina ejerce un importante papel tanto en la degradación de la mayor parte de las proteínas celulares, como en el proceso selectivo y presentación de antígenos por el complejo MHC de clase I.

En la célula, la ubiquitina se puede encontrar libre o bien conjugada mediante una unión covalente entre su extremo C-terminal y el grupo ϵ -amino de los residuos de lisina de las proteínas. Para que tenga lugar la degradación de proteínas por este sistema, es necesaria la unión covalente de la ubiquitina a los sustratos proteolíticos. Las proteínas conjugadas con múltiples ubiquitinas son las que tienen una mayor probabilidad de ser degradadas por este sistema. La conjugación de la ubiquitina a los sustratos proteicos es un proceso que tiene lugar en sucesivas reacciones en las que están implicados diferentes enzimas del sistema de la ubiquitina y que requiere de la presencia de ATP.

2.1.3.3. ENZIMAS DEL SISTEMA

2.1.3.3.1. E1 O ENZIMA ACTIVADORA DE LA UBIQUITINA

La primera reacción consiste en la activación de la ubiquitina, reacción catalizada por la enzima E1 o "enzima activadora de la ubiquitina". Es una reacción dependiente de ATP en la que se forma adenilato de ubiquitina, seguida de la transferencia del extremo C-terminal de la ubiquitina a un residuo cisteína de la enzima E1 mediante un enlace tioéster. E1 está asociada a los tres componentes principales del citoesqueleto. La distribución variable de E1 en las líneas celulares estudiadas y la aparente distribución en el citoesqueleto sugieren que esta enzima y el sistema dependiente de ubiquitina tienen funciones pleiotrópicas (Tausch, 1993).

2.1.3.3.2. E2 O ENZIMA CONJUGADORA DE LA UBIQUITINA

La ubiquitina activada es transferida de la enzima E1 a un residuo específico de cisteína de unos de los diferentes enzimas E2 (“enzimas conjugadoras o transportadoras de la ubiquitina”) mediante un enlace tioéster. Finalmente, estas enzimas E2 transfieren la ubiquitina al sustrato proteico, y se forma así una proteína conjugada ramificada en la que el extremo C-terminal del residuo de glicina-76 de la ubiquitina se une mediante un enlace isopeptídico a residuos de lisina internos de la proteína diana.

2.1.3.3.3. E3 O UBIQUITINA - LIGASAS

Algunas de las reacciones de conjugación ubiquitina-proteína requieren de la presencia de un tercer tipo de enzimas llamadas E3 o ubiquitina-ligasas, que ayudan al reconocimiento de los sustratos susceptibles de ser ubiquitinizados (Ciechanover y Schwartz, 1989; Hershko, 1991). En estos casos, la unión de la ubiquitina a las proteínas diana tiene lugar en dos etapas: primero el sustrato proteico se une a un lugar específico de E3, y después la ubiquitina activada es transferida de E2 a la proteína. Se ha sugerido que, para facilitar esta transferencia, es probable que E3 tenga un lugar de unión a E2. Debido a la alta estabilidad de los lugares de unión del sustrato proteico, E3 parece ejercer un importante papel en la selección de las proteínas que han de ser degradadas.

2.1.3.3.4. PROTEASOMA 26S

Las proteínas ubiquitinizadas pueden ser degradadas por el llamado complejo proteasoma 26S (1500 kDa) dependiente de ATP (Goldberg y Rock, 1992; Rivett, 1993), o bien la ubiquitina puede liberarse de la proteína diana por acción de ciertas hidrolasas (Matsui *et al.*, 1982), con lo que se generaría ubiquitina libre, que podría ser reutilizada en un nuevo ciclo de conjugación. El proteasoma 26S funciona como una proteasa dependiente de ATP, y está implicado en la degradación de proteínas anormales, proteínas reguladoras de vida corta y de antígenos de presentación (Peters, 1994).

Estudios electroforéticos e inmunoquímicos han permitido demostrar que el gran complejo 26S degrada sustratos multiubiquitinizados de una forma dependiente de ATP, tiene una actividad ATP-asa que le suministra la energía necesaria para la proteólisis, y presenta una actividad isopeptidasa que genera ubiquitina libre dependiente de Mg^{2+}/ATP . El proteasoma 26S no se detecta tan solo en el citoplasma, sino también en el núcleo, lo que sugiere que este sistema proteolítico controla tanto las proteínas citosólicas como las nucleares. El complejo 26S parece ser el responsable de la proliferación y diferenciación de las células a través de la eliminación selectiva de varias proteínas reguladoras implicadas en la progresión del ciclo celular. Se han obtenido evidencias que demuestran que el proteasoma es el responsable de la proteólisis del sistema de la ubiquitina. Es interesante destacar que no siempre la ubiquitinización es esencial para el reconocimiento de los sustratos por el proteasoma, y existen evidencias que así lo demuestran (Driscoll y Goldberg, 1990).

2.1.3.3.5. UBIQUITINA HIDROLASA C-TERMINALES

El último paso en el mecanismo proteolítico de la ubiquitina consiste en la regeneración de la ubiquitina libre y su reutilización, en un proceso llevado a cabo por las hidrolasas C-terminales de la ubiquitina o isopeptidasas. Para poder reciclar la ubiquitina después de la degradación proteica, se requiere la actividad de estas enzimas, que actúan sobre los puentes isopeptídicos de la ubiquitina con la proteína conjugada y dan lugar a la escisión de la ubiquitina de los péptidos pequeños. Estas

enzimas también son necesarias para la conjugación reversible de proteínas con ubiquitina, para eliminar la ubiquitina de las proteínas conjugadas “incorrectamente”; en este caso, estas enzimas tendrían una posible función correctora (Matsui *et al.*, 1982). Otra función esencial de estas enzimas es el procesamiento de los precursores biosintéticos de la ubiquitina (Özkaynak *et al.*, 1987).

Respecto al funcionamiento de la proteólisis asociada a la ubiquitina, hay todavía varios puntos por resolver. Uno de ellos sería la existencia de un *pool* de proteínas conjugadas con ubiquitina que son metabólicamente estables y no son degradadas, lo cual sugiere que la proteólisis no es la única función del sistema de la ubiquitina. Se han detectado conjugados estables con ubiquitina de las siguientes proteínas: las histonas H2A y H2B (Goldknopf y Busch, 1975), la actina, el receptor de PDGF (Yarden *et al.*, 1986), y el receptor de la hormona del crecimiento, y estas ubiquitinizaciones pueden ser reversibles. De manera análoga a la fosforilación de las proteínas, la ubiquitinización reversible podría tener un importante papel modulando la función de las proteínas marcadas. En la figura 2 se muestra una imagen de la activación del sistema proteolítico dependiente de ATP y ubiquitina.

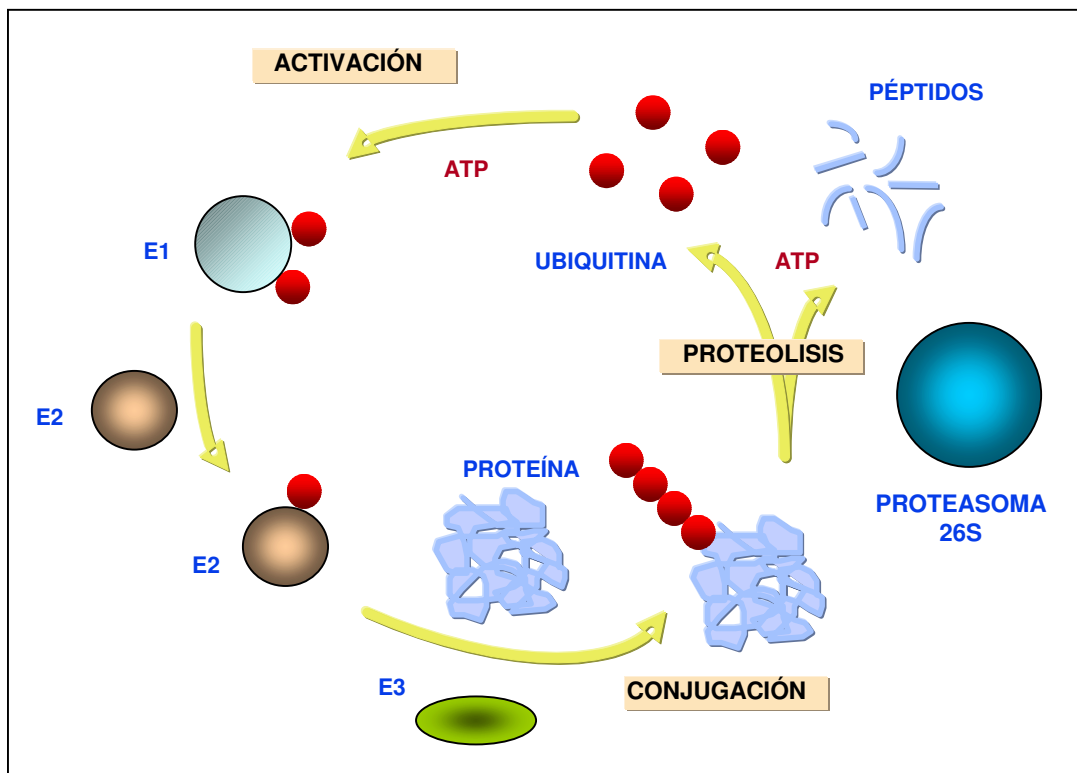


Figura 2. Degradación proteolítica a través del sistema dependiente de ATP y ubiquitina.

2.1.3.4. RECONOCIMIENTO DE SUBSTRATOS

Existen tres vías principales por las cuales una proteína que ha de ser degradada es reconocida y ubiquitinizada: 1) que esté mal plegada o presente daños en su estructura; 2) que sea ubiquitinizada en función de las señales que presente, es decir, que esté programada genéticamente; o 3) que sufra modificaciones inducibles como la fosforilación (revisado por Wilkinson, 1999 y 2000).

La regulación de la conjugación de la ubiquitina se lleva a cabo a través de mecanismos post-traduccionales. Se ha especulado que la actividad de los diferentes enzimas del sistema ubiquitina podría estar regulada por fosforilación. Por otro lado, parece ser que el control del sistema de la ubiquitina podría estar directamente

regulado en el ámbito de los sustratos proteicos; de hecho, diferentes autores sugieren que ha de existir una serie de mecanismos responsables de los cambios moleculares que transforman a las proteínas en sustratos del sistema de la ubiquitina. Por ejemplo, el estrés, el calor, análogos de aminoácidos, etanol y metales pesados, pueden afectar la estructura de las proteínas, y conducir a la exposición de lugares de reconocimiento críticos de éstas para E2 o E3. Estos cambios, que transforman las proteínas normales en sustratos de la conjugación de la ubiquitina, pueden ser debidos a diferentes mecanismos; por ejemplo, en el caso de las ciclinas tiene lugar a través de fosforilaciones (Glotzer *et al.*, 1991). Actualmente se sabe que la mayoría de las proteínas citosólicas tienen un extremo N-terminal acetilado, y son degradadas por el sistema de la ubiquitina, y que las proteínas del músculo caquético lo hacen por este sistema (revisado por Hasselgren y Fischer, 2001).

Un punto interesante es el mecanismo mediante el cual las proteínas son reconocidas por el sistema de la ubiquitina. Uno de los primeros modelos propuestos sobre el reconocimiento de sustratos en la degradación proteica se basa en el residuo aminoacídico en posición N-terminal. La “regla N-terminal” (*N-end rule*) propone que la vida media de las proteínas *in vivo* está en función de tipo de residuo N-terminal (Bachmair *et al.*, 1986). Por tanto, los 20 aminoácidos se pueden clasificar como “estabilizadores” o “desestabilizadores” respecto a la vida media que confieren a la proteína cuando están situados en éste. Rogers *et al.* (1986) observaron que todas las proteínas de vida corta contenían regiones ricas en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T). Por tanto, estas secuencias, llamadas PEST, constituyen una señal que marca a ciertas proteínas para que sean degradadas rápidamente. Treinta de las 32 proteínas de vida corta estudiadas contenían una o más secuencias PEST (Rechsteiner, 1990). La regla N-terminal puede estar implicada solamente en un número limitado de sustratos proteicos, ya que pocas proteínas son marcadas para la conjugación y su degradación por esta vía.

Recientemente se ha descrito una secuencia que consta de dos leucinas juntas a la ubiquitina; éstas pueden estar involucradas en la endocitosis mediada por la ubiquitina de proteínas de membrana y su posterior degradación en el lisosoma (Nakatsu *et al.*, 2000). Esto demuestra que la ubiquitina está relacionada con otro sistema proteolítico que conduce a las proteínas a ser degradadas de forma independiente de ATP y el proteasoma.

2.1.3.5. GENES DE LA UBIQUITINA

Aunque hay excepciones en las que aparece como un monómero, la ubiquitina se encuentra codificada como una proteína de fusión. Dentro de este grupo podemos encontrar dos tipos de genes: los genes de poliubiquitina y los genes de las proteínas de fusión ribosomales, que serían fusiones de ubiquitina con proteínas ribosomales de 52 aminoácidos (CEP52: *carboxy extension protein*) y de 76-81 aminoácidos (CEP76-81), la longitud de la cual varía según las especies. Todas estas proteínas de fusión son procesadas por hidrolasas específicas inmediatamente después de su traducción. Estos dos tipos de genes se expresan de diferente forma: mientras que los transcritos de las proteínas de fusión ribosomales son más abundantes en las células normales, los transcritos de la poliubiquitina se encuentran aumentados en condiciones de estrés.

2.1.3.5.1. GENES DE LA POLIUBIQUITINA

Los genes de la poliubiquitina se encuentran constituidos por repeticiones en tándem cabeza-cola de monómeros de ubiquitina. Podemos encontrar más de un gen de poliubiquitina en un mismo organismo, los cuales pueden estar formados por diferente número de monómeros, y también pueden estar regulados transcripcionalmente de diferente manera. En el genoma humano se han identificado

tres genes que codifican para la ubiquitina, UbA, UbB y UbC, que dan lugar a RNAs de diferentes longitud (650, 1100 y 2500 nucleótidos respectivamente). En el genoma murino también se encuentran tres genes que codifican para ubiquitina: UbA, UbB y UbC; igual que en el hombre, UbB y UbC son genes que codifican para transcritos de la poliubiquitina y UbA es un gen que codifica para un transcrito de una proteína de fusión ribosomal de 52 aminoácidos (Finch *et al.*, 1992). Como podemos observar, el genoma humano y el de otros mamíferos posee una familia multigénica de genes de la ubiquitina, con una organización y secuencia de DNA inusual, ya que no existen espacios entre las repeticiones de las secuencias codificantes, sino que son adyacentes.

Se ha observado la existencia de una gran homología entre los genes de la poliubiquitina de diferentes especies en la región 3' no traducida y al mRNA maduro, lo que sugiere que esta región podría tener una función reguladora de la expresión génica, y que además éstos podrían pertenecer a una subfamilia con origen común.

2.1.3.5.2. GENES DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN RIBOSOMALES

Los otros genes que codifican para la ubiquitina, CEP52 y CEP76-81, consisten en un monómero de ubiquitina fusionado por el extremo N-terminal a una secuencia que codifica para una proteína ribosomal. Respecto a las características generales de estos genes, se puede decir que, excepto algunos casos, existen uno o dos genes de cada una de las proteínas de fusión por organismo, presentando intrones con más frecuencia la zona codificante para la ubiquitina y por la extensión que la región 5' no codificante, a diferencia de los que sucede a los genes de poliubiquitina. Pero la característica más importante en estos genes es la presencia de elementos comunes con los genes de las proteínas ribosomales. Esto indica que estas proteínas ribosomales son más estables cuando se encuentran fusionadas a la ubiquitina, que actuaría sobre éstas como una chaperonina, aumentando la estabilidad de la proteína naciente al impedir su degradación por proteasas celulares o al acelerar su incorporación al ribosoma.

2.1.3.6. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA POLIUBIQUITINA

La regulación de los genes de la poliubiquitina y de las extensiones ribosomales ha sido documentada en diversas especies. En general, los genes de fusión ribosomales se expresan preferentemente en estados de crecimiento celular, poniendo en relación el sistema de la ubiquitina con la actividad traduccional de la célula (Finley *et al.*, 1989; Redman y Rechsteiner, 1989). Por el contrario, los genes de la poliubiquitina se expresan preferentemente en situaciones de estrés, en las que se necesita un mayor aporte de ubiquitina (Finley *et al.*, 1987; Müller-Taudenberger, 1988).

2.1.3.7. UBIQUITINA Y PROTEÓLISIS MUSCULAR DURANTE ESTADOS PATOLÓGICOS

El desgaste muscular que se produce en situaciones caquéticas tales como el cáncer, las infecciones crónicas o los traumatismos, parece estar relacionado con un aumento en la degradación de proteínas, sin apenas cambios en el patrón de síntesis, lo que lleva a la aparición de un claro balance nitrogenado negativo a nivel del tejido muscular. La aparente selectividad del sistema dependiente de ubiquitina lo hace un candidato considerable para explicar el desgaste muscular (Furuno y Goldberg. 1986; Han *et al.*, 1988). Posteriormente este papel ha sido confirmado para diversos estados patológicos (Argilés *et al.*, 1998).

Nuestro grupo de investigación lleva un largo tiempo dedicado a la investigación básica en este campo, y ha conseguido resultados que permiten indicar que este sistema proteolítico es fundamental en el desarrollo de la caquexia. García-Martínez *et al.* (1993) han determinado un aumento en las proteínas conjugadas a la ubiquitina en ratas portadoras del hepatoma ascítico Yoshida AH-130. También ha demostrado un incremento de algunos de los genes relacionados con este sistema proteolítico en el mismo modelo tumoral inductor de caquexia (Llovera *et al.*, 1994). Esta activación del sistema proteolítico dependiente de ubiquitina y ATP ha sido demostrado en el modelo de incubación de músculo esquelético *in vitro* (Llovera *et al.*, 1995). Dejong *et al.* (2004) han determinado un aumento en la expresión de uno de los transcritos codificantes para la ubiquitina en pacientes con cáncer de páncreas. Bossola *et al.* (2001) han demostrado un incremento en la expresión del mRNA de la ubiquitina, así como que este parámetro no se correlaciona con el estado nutricional del paciente, y que la activación de la expresión de la ubiquitina precede a los síntomas clínicos de la caquexia.

La activación de este sistema parece no estar relacionada con la concentración de glucocorticoides en plasma, ya que un antagonista del receptor de glucocorticoides (RU38486) no logra revertir la activación de este sistema (Llovera *et al.*, 1996a). En cambio, en situación de ayuno los glucocorticoides sí que son capaces de activar este sistema proteolítico (Wing y Goldberg, 1993). La activación de este sistema proteolítico es revertida por la administración de clenbuterol, un agonista β_2 -adrenérgico (Costelli *et al.*, 1995a).

El TNF- α tiene un papel muy importante en la activación del sistema de la ubiquitina. El tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α revierte el incremento de los niveles de expresión de la ubiquitina y C8 (una de las subunidades del proteasoma), en el músculo esquelético de ratas portadoras de tumor (Llovera *et al.*, 1996b). En ratones *knockout* para el receptor de TNF- α de tipo I, la implantación del carcinoma pulmonar de Lewis no produce niveles altos de expresión de los genes involucrados en el sistema proteolítico dependiente de ubiquitina y ATP, lo que indica que la activación de este sistema en presencia de tumor es debido en parte a la unión del TNF- α a su receptor de tipo I (Llovera *et al.*, 1998a). En ratones portadores del carcinoma pulmonar de Lewis, la sobreexpresión del receptor soluble de tipo I no logra revertir los efectos producidos por el tumor (Llovera *et al.*, 1998b). Además, la administración de TNF- α incrementa la expresión de la ubiquitina en el músculo de ratas sanas (García-Martínez *et al.*, 1994a). Llovera *et al.* (1997) han demostrado que el TNF- α puede actuar directamente sobre la activación del sistema proteolítico dependiente de ubiquitina y ATP (Llovera *et al.*, 1997).

Otras citoquinas, como el IFN- γ y la IL-1 administradas intravenosamente, producen un incremento de la expresión de los genes de la ubiquitina, mientras que la IL-6 y el LIF (factor inhibidor de leucemia) no producen ningún cambio en la expresión de los genes de este sistema proteolítico (Llovera *et al.*, 1998a). Otros estudios indican que la IL-1 no parece estar involucrada en la activación de la proteólisis en ratas portadoras de tumor (Costelli *et al.*, 1995a).

En modelos experimentales de infección aguda también ha podido ser demostrada la activación del sistema de la ubiquitina en el ámbito de músculo esquelético. La ligadura y punción cecal que llevan al animal a un estado de sepsis, provocan un incremento de la expresión de la ubiquitina (García-Martínez *et al.*, 1995). Tiao *et al.* (1994), usando un modelo de ligadura y punción cecal, han descrito aumentos del 50% y del 440% en la degradación de la proteína total y miofibrilar, respectivamente, en el músculo de animales sépticos. Este incremento estaba asociado con un aumento en la proteólisis dependiente de ATP y en los conjugados de ubiquitina y la expresión del gen de la ubiquitina (Tiao *et al.*, 1994) y de la expresión de E2 (Hobler *et al.*, 1999). Estos resultados también se han observado en pacientes humanos con infecciones agudas (Tiao *et al.*, 1997). García-Martínez *et al.* (1994b)

han determinado que la IL-6 no parece estar involucrada en la activación de la proteólisis en ratas afectadas por una infección aguda. Asimismo, en modelos de acidosis se ha descrito un aumento de la actividad del sistema dependiente de ubiquitina en músculo esquelético (Mitch *et al.*, 1994), lo que se puede relacionar con la persistente pérdida de masa muscular que acompaña a los pacientes afectados por fallo renal crónico, y que puede ser revertida con la simple administración de bicarbonato para compensar el estado acidótico. Bossola *et al.* (2002) han descrito que los niveles de expresión de la ubiquitina en el músculo de pacientes con insuficiencia renal crónica y sometidos a hemodiálisis no están aumentados (Bossola *et al.*, 2002).

Por otra parte, pacientes afectados por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) con claros signos de caquexia, presentan un aumento en la expresión de los genes del sistema proteolítico dependiente de ubiquitina a nivel del músculo esquelético (Llovera *et al.*, 1998a).

Hay trabajos que apuntan a que, en situaciones catabólicas, hay una mayor degradación por parte del sistema dependiente de ubiquitina de la fracción miofibrilar del músculo. En este sentido, Helliwell *et al.*, (1998) encontraron que la atrofia de las fibras musculares observada en pacientes en estado crítico estaba asociada con la pérdida de filamentos de miosina y con la presencia de ubiquitina y enzimas lisosomales.

Se ha demostrado que el músculo soleus tiene un *pool* de ubiquitina libre y de conjugados intracelulares más grande que el de otros músculos mixtos (EDL o extensor digitorum longus, plantaris y gastrocnemius), lo que sugiere que estos valores han de ser específicos del tipo muscular. En cambio, el porcentaje de conjugación (ubiquitina conjugada/ubiquitina conjugada + ubiquitina libre) es similar en los cuatro músculos; esto implica que éste es más específico del tejido muscular que del tipo de músculo (Riley *et al.*, 1988). Estas diferencias en el *pool* de ubiquitina están correlacionadas inmunohistoquímicamente con la composición del tipo de fibras musculares que componen los diferentes tipos de músculos; por ejemplo, el músculo soleus está compuesto casi exclusivamente de fibras oxidativas, mientras que los otros tres músculos están formados por una mezcla de fibras oxidativas y glucolíticas. Por tanto, las fibras oxidativas contienen un mayor *pool* de conjugados y de ubiquitina libre que las fibras glucolíticas. Estos datos están de acuerdo con las observaciones realizadas por Li y Goldberg (1976), quienes demostraron que las fibras oxidativas presentan una tasa de recambio proteico un 50% más grande que las fibras glucolíticas. Por tanto, el elevado *pool* absoluto de conjugados de ubiquitina observado en las fibras oxidativas se correlaciona con su elevada tasa de degradación proteica.

En resumen, existen diferentes evidencias que apuntan a un importante papel de la ubiquitina en la regulación del recambio proteico muscular: a) la incrementada conjugación en el interior de las fibras oxidativas; b) la aumentada localización de conjugados de ubiquitina tanto en las bandas Z como en regiones de degeneración local; y c) el aumento en los niveles de conjugados de ubiquitina así como la expresión de los genes relacionados con este sistema en situaciones catabólicas acompañadas de caquexia.

2.2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y CAQUEXIA

La caquexia es una complicación muy frecuente en los pacientes con enfermedades malignas como sepsis, SIDA o cáncer. Se caracteriza, tal como ya se ha indicado, por una importante pérdida del peso corporal, anorexia, anemia y un progresivo desgaste de los tejidos, principalmente músculo esquelético y tejido adiposo (Argilés *et al.*, 1997). Sobre los mecanismos que inducen el desgaste muscular, aún no se conocen del todo los mismos, pero cobran gran importancia la excesiva producción de algunas citoquinas como son TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN γ , que pueden ser producidas tanto por el huésped como por las células tumorales (Argilés *et*

al., 1992; Costelli *et al.*, 1993). Si tenemos en cuenta lo anterior y pensamos en el tejido muscular, nos podemos preguntar qué efectos producen estas citoquinas en las células musculares y de qué forma estas células responden a ellos.

Sabemos que esta sobreproducción de citoquinas se observa en distintas situaciones catabólicas, como son la sepsis, el trauma y el crecimiento tumoral (Moldawer y Copeland, 1988) y que viene a ser una respuesta del huésped al proceso invasivo. Para que estas citoquinas se sobreproduzcan y para que ocurran estas alteraciones metabólicas, deben primero haber cambios en el patrón de expresión de los distintos genes involucrados en este proceso, y si pensamos en qué está controlando la expresión de estos genes llegamos a los factores de transcripción, que sin dudarlos tienen un papel muy importante en el síndrome de la caquexia, aunque aún queden muchas cuestiones por contestar (revisado por Mitch and Price, 2001).

En 1993 un grupo de investigadores logró bloquear mediante terapia génica (usando oligonucleótidos antisentido contra la subunidad p65 de NF κ B) la aparición de tumores y causó una regresión del tumor en un modelo de ratón y bajo distintos tipos de tumoraciones (Higgins *et al.*, 1993). Kawamura *et al.* (1999) lograron revertir la caquexia en un modelo de ratón *in vivo*, mediante la inyección intratumoral de oligonucleótidos con la secuencia de unión para NF κ B. Más tarde los mismos autores y mediante la inyección intravenosa de oligonucleótidos contra NF κ B consiguieron inhibir las metástasis en un modelo de ratón (Kawamura *et al.*, 2001).

Sobre los factores de transcripción que podrían estar involucrados en el proceso de desgaste muscular observado en la caquexia (*in vivo*), se sabe muy poco, pero aparecen algunos factores como posibles candidatos tanto en el desencadenamiento como en la regulación de este proceso. NF- κ B y AP-1 son dos factores de transcripción que están activados en distintos tejidos en procesos inflamatorios (Karin *et al.*, 1997; Barnes y Karin, 1997). Penner *et al.* (2001) han descrito que NF κ B y AP-1 tienen una regulación diferencial en músculo esquelético de rata durante el proceso de sepsis. Estos científicos observaron que tanto NF- κ B como AP-1 aumentan después de la inducción de la sepsis. Cuando analizaron la proteína inhibidora de NF- κ B, (I κ B α), no vieron cambios en su patrón de expresión; este resultado coincide con lo descrito por Imbert *et al.* (1996), que demostraron que puede existir activación de NF- κ B sin degradación de I κ B α . Además, han demostrado que la actividad de unión al DNA de NF- κ B aumenta cuando los animales son tratados con el antagonista del receptor de glucocorticoides RU38486; en cambio la actividad de unión al DNA para AP-1 no se vió alterada. Estos datos demuestran una regulación diferencial de estos dos factores de transcripción durante el proceso de sepsis en el músculo esquelético (Penner *et al.*, 2001). El mismo grupo ha determinado que C/EBP, otro factor de transcripción involucrado en el proceso de inflamación, aumenta su actividad de unión al DNA en músculo de ratas sépticas, y que este proceso es dependiente de glucocorticoides (Penner *et al.*, 2002).

Zhou *et al.* (2003) analizaron el papel que tiene NF- κ B en el desarrollo de la caquexia. Estos investigadores demostraron que la implantación del tumor desencadena un aumento drástico de TNF- α y IL-6, y que este efecto puede ser contrarrestado con un tratamiento con indometacina, postulando como mecanismo la activación de NF- κ B en las células del bazo y la posterior liberación de citoquinas, de manera que la indometacina logra revertir esta activación y disminuir la caquexia en este modelo tumoral de ratón (Zhou *et al.*, 2003).

Datos muy recientes implican un aumento en la actividad de unión al DNA para el factor de transcripción NF- κ B, la degradación de I κ B α y la alta expresión de iNOS en el músculo de pacientes con enfermedad obstructiva crónica pulmonar (COPD), con la caquexia observada en estos pacientes (Agusti *et al.*, 2004).

2.2.1. FAMILIA DE RECEPTORES NUCLEARES PPAR's

Otra familia de receptores nucleares que podrían tener una gran importancia en el proceso de desgaste y en su tratamiento son los "*Peroxisome proliferator activated receptors*" (PPAR's), factores que están involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos por un mecanismo dependiente de ligando que produce la activación de genes clave (Kliwer *et al.*, 2001). Estos PPARs regulan la expresión de los genes heterodimerizando con RXR (*retinoid X receptor*) y uniéndose a secuencias específicas de DNA llamadas elementos de respuesta a PPAR (PPRE) (Tugwood *et al.*, 1992). Diversos estudios demuestran que tanto PPAR α como PPAR γ son reguladores negativos de la respuesta inflamatoria (revisado por Delerive *et al.*, 2001). Un hecho que demuestra este efecto es que ratones deficientes para PPAR α responden de una manera descontrolada bajo una estimulación con LPS (Delerive *et al.*, 1999a). Estudios realizados para determinar el mecanismo por el cual PPAR α ejerce su efecto anti-inflamatorio, han demostrado que PPAR α antagoniza con la cascada de señalización de NF- κ B (Poynter *et al.*, 1998; Staels *et al.*, 1998; Delerive *et al.*, 1999a; Marx *et al.*, 1999). PPAR α además puede estimular la expresión de I κ B α , aunque no se observa asociación entre este aumento de I κ B α y la disminución de la actividad de unión al DNA de NF- κ B (Delerive *et al.*, 2000b). Ensayos de retardamiento en gel han permitido demostrar que PPAR α no sólo inhibe la respuesta inflamatoria por antagonismo con NF- κ B, sino también por interacción con AP-1. Esta represión de AP-1 la realiza mediante la interacción directa con el extremo aminoterminal de c-Jun (Delerive *et al.*, 1999 a, b). Por último, dos antecedentes clínicos de tratamientos con fibratos (activadores de PPAR α) demuestran que activadores de PPAR α disminuyen la respuesta inflamatoria en estos pacientes (Staels *et al.*, 1998; Madej *et al.*, 1998), lo que permite concluir que los agonistas de PPAR α podrían ser usados en el tratamiento de enfermedades que cursen con una respuesta inflamatoria crónica como es el cáncer. PPAR γ también ejerce su efecto anti-inflamatorio inhibiendo la activación de NF- κ B, AP-1 y STAT1. Los agonistas de PPAR γ son capaces de reprimir NF- κ B inhibiendo el complejo de IKK y previniendo la degradación de I κ B α (Castrillo *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2000). El mecanismo de inhibición que ejerce sobre AP-1 es similar al que ejerce PPAR α (Delerive *et al.*, 1999b); además, Law *et al.* (1996) han descrito que las glitazonas inhiben c-Fos. Por otra parte, las rosiglitazonas inhiben la activación de las JNKs *in vivo* (Khandoudi *et al.*, 2002). Li *et al.* (2000b) han propuesto que el mecanismo por el cual PPAR γ inhibe la transactivación de STAT1, AP-1 y NF- κ B por unión directa con CBP y SRC-1; con este modelo de competición, se limita la actividad de otros factores (Li *et al.*, 2000b). Yang *et al.* (2000) han demostrado que PPAR γ inhibe la producción de IL-2 en linfocitos T interaccionando con el factor nuclear de células T activas (NFAT). Los resultados de las glitazonas y rosiglitazonas en experimentos *in vivo* midiendo su efecto anti-inflamatorio son muy controvertidos. Por último, Lenhard *et al.* (1999) han descrito que tanto los agonistas de PPAR γ como los agonistas de RXR son efectivos disminuyendo la caquexia en ratones diabéticos (Lenhard *et al.*, 1999).

Las UCP (proteínas desacopladoras) son una familia de proteínas que se encuentran en la membrana de las mitocondrias y que están relacionadas con el desacoplamiento de la cadena respiratoria, y por ello con la pérdida de energía como calor. Estas proteínas están íntimamente relacionadas a diversos estados patológicos, entre los que está el síndrome de la caquexia. En músculo de ratas que portan tumor y que presentan caquexia se puede observar un aumento de la expresión de UCP-2 y UCP-3; este hecho explicaría en parte la pérdida de energía asociada al crecimiento tumoral (Sanchis *et al.*, 1998). En este sentido, Puigserver *et al.* (2001) determinaron que distintas citoquinas y el lipopolisacárido (LPS) son capaces de activar directamente la termogénesis en cultivos de células musculares, y que este efecto lo

realizan por medio de p38 MAP quinasa y el coactivador transcripcional PGC-1 (*PPAR gamma coactivator-1*); además, determinaron que usando un inhibidor específico de MAP quinasa se logra revertir este efecto bloqueando la fosforilación de PGC-1 (Puigserver *et al.*, 2001).

2.2.2. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AP-1

AP-1 (*activating protein-1*) fue uno de los primeros factores de transcripción en ser descubiertos, pero su función aún no está totalmente desvelada. Dos funciones claras de AP-1 son la proliferación y la muerte celulares, es decir, la vida y la muerte de la célula (revisado por Shaulian y Karin, 2002). AP-1 es una familia de factores de transcripción consistente en homodímeros y heterodímeros de Jun, Fos o ATF. Todas las proteínas de la familia Jun forman heterodímeros muy estables con los miembros de las familias Fos y ATF. Los dímeros formados por Jun-Jun y Jun-Fos preferentemente se unen a un elemento de respuesta al TPA (TRE), formado por una secuencia base TGACTCA, mientras que el dímero Jun-ATF o ATF homodímeros preferentemente se unen al elemento de respuesta a cAMP (CRE), que tiene una secuencia base TGACGTCA. Ambos elementos son palindrómicos y contienen el mismo AP-1 "half-site".

2.2.2.1. FAMILIA JUN/FOS

Los factores de transcripción Jun y Fos fueron inicialmente identificados como integrantes del factor nuclear AP-1. Son proteínas bZip (*basic region-leucine zipper*), al igual que los factores CREB/ATF, y su funcionalidad está relacionada con la capacidad de formar homo- y heterodímeros con miembros de diferentes familias de factores de transcripción. Participan en la vía de transducción de señal de diversas quinasas, y activan la expresión de múltiples genes en respuesta a señales extracelulares, a través de elementos TRE/AP-1. El primer miembro de la familia caracterizado fue c-Fos, gracias a su implicación en la proliferación y diferenciación celular. Se observó que este factor coimmunoprecipitaba con el producto del gen *c-jun*, y que esta proteína era necesaria para la transactivación generada por c-Fos (Curran *et al.*, 1985). Posteriormente, se han identificado otros miembros de la familia en base a la similitud con c-Jun, Jun B y JunD, y c-Fos, Fos B, Fra 1 y Fra 2.

La secuencia TRE ha sido identificada en la región promotora de un gran número de genes, lo que ha permitido definir una secuencia *consenso* TGA^G/C TCA (Angela y Karin, 1991), que diverge de la secuencia CRE en un único residuo. Al igual que CRE, la afinidad del TRE por el complejo AP-1 es influida por nucleótidos flanqueantes que determinan la especificidad de la secuencia (Montminy *et al.*, 1986; Deutsch *et al.*, 1988). Jun y Fos se unen al TRE como heterodímeros (Turner y Tjian, 1989), pero Jun también puede formar homodímeros. Se pueden formar diferentes heterodímeros entre los componentes de la familia, con efectos tanto activadores como inhibidores de la transcripción génica (Chiu *et al.*, 1989).

2.2.2.2. REGULACIÓN Y FUNCIONALIDAD DE AP-1

El complejo AP-1 es modulable a dos niveles: síntesis y actividad. c-Jun es un factor inducible y regulado por diversos estímulos como factores de crecimiento, interleuquinas (Lamph *et al.*, 1988), hormonas y algunos agentes genotóxicos, como la luz ultravioleta (Karin *et al.*, 1995). Su actividad es regulada principalmente a nivel post-traducciona. Las actividades quinasa responsables de la activación de Jun son las JNKs (*Jun amino-terminal kinase*) (Hibi *et al.*, 1993; Derijard *et al.*, 1994), que fosforilan a la proteína en los residuos de serina 63 y 73, situados en el dominio de activación de la región amino-terminal. Se ha demostrado el incremento de la actividad de estas enzimas por diversos estímulos extracelulares. La actividad de la proteína

Jun aumenta gracias a que se estimula la interacción de la proteína con el cofactor CBP (Kwok *et al.*, 1994). En la figura 3 se presentan los componentes clásicos de la cascada de señalización que da lugar a la activación del factor de transcripción AP-1.

La fosforilación en el dominio C-terminal disminuye la capacidad transactivadora de Jun, disminuyendo su afinidad por el DNA. A diferencia de la atenuación de la actividad transcripcional de CREB por desfosforilación, la capacidad de Jun por unirse al DNA se ve estimulada por la desfosforilación (Boyle *et al.*, 1991). Diversos estímulos, como ésteres de forbol o algunos tipos de radiación, estimulan la actividad de Jun reduciendo el grado de fosforilación en el dominio C-terminal, a la vez que se estimula la fosforilación de la región amino-terminal.

Algunos miembros de la superfamilia de los receptores nucleares inhiben la actividad AP-1. Esta inhibición ha sido descrita inicialmente para los receptores de glucocorticoides (Jonat *et al.*, 1990). Posteriormente se ha demostrado que otros miembros de la superfamilia, como los receptores de vitamina D, RA y T₃ (Nicholson *et al.*, 1990; Jaaskelainen *et al.*, 1994), también inhiben la actividad de AP-1. El antagonismo entre estos factores es debido a interacciones proteína-proteína, y es independiente de la interacción con el DNA. Los receptores nucleares, al igual que Jun, dependen de la presencia del coactivador CBP para transactivar la expresión génica (Kamei *et al.*, 1996). Este efecto antagónico sería el resultado de la competencia directa entre estos factores por la disponibilidad de CBP. Otro mecanismo para la inhibición de AP-1 es a través de la inhibición de la vía JNK, bloqueando así la fosforilación de los receptores nucleares c-Jun, ATF-2 y Elk-1, inhibiendo su inducción (Caelles *et al.*, 1997).

El gen *c-jun* se expresa en múltiples tipos celulares a un nivel basal, que puede verse incrementado en respuesta a mitógenos y oncogenes. En su región promotora se han identificado dos elementos TRE que responden al heterodímero c-Jun/ATF2 (Van Dam *et al.*, 1993). De esta manera, la misma proteína c-Jun regula la expresión del gen que la codifica. La mayoría de estímulos que regulan la expresión de *c-jun* también regulan la transcripción de *c-fos*. En función del tipo celular, el AMPc puede estimular o inhibir la expresión de *c-jun* y *c-fos* (Lamph *et al.*, 1990; Borran *et al.*, 1996). La regulación de estos dos genes por un mismo estímulo depende del contexto celular en el que se encuentren, ya que un mismo estímulo puede terminar en distintos efectos; este hecho sugiere que estos dos factores participan en diversos programas génicos.

Son muchas y muy diversas las evidencias que implican al factor AP-1 en el desarrollo embrionario y en el control de la proliferación celular. Ratones *knockout* para *c-jun* y *junB* mueren durante la gestación (Hilberg *et al.*, 1993; Jonson *et al.*, 1993). Fibroblastos derivados de estos embriones tienen muy disminuida la proliferación celular. El desarrollo de unos ratones *knock-in* para c-Jun (ratones JunAA) ha permitido contribuir a esclarecer la funcionalidad de c-Jun y las JNKs en la apoptosis y la proliferación celular. Estos ratones contienen un c-Jun mutado en los residuos 63 y 73 (se les han cambiado las serinas por alaninas). Estos ratones son viables y además presentan una mayor resistencia a la apoptosis, y los fibroblastos derivados de éstos no tienen deficiencias en el desarrollo del ciclo celular (Behrens *et al.*, 1999; Eferl *et al.*, 2003).

Los miembros de la subfamilia Fos participan en la viabilidad, diferenciación y proliferación de muchos tipos celulares. La inactivación de uno de estos genes individualmente no afecta la proliferación, pero si bloqueamos la actividad de los cuatro factores Fos se inhibe el ciclo celular (Piechaczyk y Blanchard, 1994; Bros *et al.*, 1996). La implicación de AP-1 en el ciclo celular se ha demostrado al observar que la inactivación de AP-1 endógeno inhibe la progresión del ciclo celular inducido por suero; con esto, las células quedan paradas en la fase replicativa del ciclo celular.

Los miembros de estas familias pueden homodimerizar o heterodimerizar entre ellas o con los integrantes de las familias CREB/ATF. Esta unión la realizan mediante su dominio bZip (Hai y Curran, 1991; Benbrook y Jones, 1994). No todas las

combinaciones son posibles, y no todos los dímeros tienen la misma actividad ni afinidad; así, Fos es capaz de heterodimerizar con Jun, pero no puede homodimerizar, y en cambio Jun sí puede homodimerizar. La afinidad de los hétero-dímeros Jun-CREB por los distintos elementos CRE y TRE es muy variada (Hai y Curran, 1991).

2.2.2.3. AP-1 Y MIOGÉNESIS

AP-1 es un factor de transcripción clave en la diferenciación de múltiples tipos celulares. Bengal *et al.* (1992) han descrito la interacción directa entre c-Jun y MyoD, un factor de transcripción clave en la diferenciación muscular; este grupo de investigadores determinaron que c-Jun puede unirse a MyoD mediante el “*leucine zipper domain*” de c-Jun y la región “*helix loop helix*” del factor MyoD, y que esta unión resultaría en la inhibición de la actividad de MyoD, que ya no es capaz de activar los genes implicados en la miogénesis como la creatina quinasa (Bengal *et al.*, 1992). Finkel *et al.* (1993) desarrollaron un método *in vivo* para detectar las interacciones proteína-proteína entre MyoD, E12 y Id; adicionalmente, este método les permitió detectar una unión estable entre MyoD y c-Jun.

Otro dato importante que relaciona a AP-1 con la miogénesis es que la infección de mioblastos derivados de músculo esquelético de pollo con un virus que contiene el cDNA para c-Jun inhibe la diferenciación miogénica (Su *et al.*, 1991). Por otra parte, la sobreexpresión de c-Jun puede bloquear la diferenciación miogénica en la línea celular C2; estos investigadores determinaron que tanto los niveles de c-Jun como la actividad de unión al DNA de AP-1 se mantienen a través de la diferenciación en la línea celular derivada de ratón C2C12 y en la línea L6 derivada de rata. Con estos resultados concluyen que c-Jun a niveles fisiológicos no interfiere con la diferenciación (Thinakaran *et al.*, 1993; Thinakaran y Bag, 1993).

Por otro lado, son muchos los trabajos que relacionan directamente a c-Jun y la actividad de unión al DNA de AP-1 con la miogénesis. TNF- α es una de las citoquinas con mayor relevancia en el proceso de la caquexia. Esta citoquina es capaz de activar tanto la expresión de c-Jun como la actividad de unión al DNA de AP-1 (Brenner *et al.*, 1989). Stewart *et al.* (2004) determinaron que TNF- α es capaz de activar las JNK 1 y 2, y que esto formaría parte del proceso por el que esta citoquina bloquea la diferenciación miogénica e induce la apoptosis. Park *et al.* (1992) demostraron que la inhibición de la miogénesis causada por ácido okadaico se correlaciona con una inducción de AP-1. En este mismo año, otro grupo de investigación determinó que Fos y Jun reprimen la activación de dos importantes factores de transcripción miogénicos: miogenina y MyoD. Esta represión estaría mediada por la interacción entre el extremo aminoterminal de c-Jun y la región *helix-loop-helix* de MyoD y miogenina (Li *et al.*, 1992; Henderson y Stein, 1994). El factor de transcripción AP-1 es capaz de unirse a un elemento CRE presente en la región promotora de MyoD y causar una regulación negativa de la expresión de este factor en un modelo de mioblastos en proliferación (Pedraza-Alva *et al.*, 1994). La insulina es capaz de estimular la miogénesis en C2C12; esta estimulación estaría mediada por un aumento en la actividad de unión al DNA del factor NF- κ B y una disminución de la actividad para AP-1 (Conejo *et al.*, 2001). Lehtinen *et al.* (1996) describieron que 12 horas después de poner el medio de diferenciación a las células, se observa una clara disminución de la actividad de unión al DNA de los factores AP-1, NF- κ B y SP-1, la cual se revierte con la adición de toxina colérica o ácido okadaico, dos claros inhibidores de la miogénesis. Además, estos autores observaron una disminución de las proteínas c-Fos y c-Jun. JunB, otro miembro de la familia Jun, se ha visto involucrado en la inhibición de la diferenciación mediada por “*bone morphogenic protein-2*” (BMP-2); la sobreexpresión de JunB es suficiente para inhibir la diferenciación en C2C12 (Chaloux *et al.*, 1998). Andreucci *et al.* (2002) analizaron la composición y función de AP-1 durante la diferenciación miogénica, determinando que Fra-2, c-Jun y JunD se expresan a lo largo de la diferenciación de las células musculares C2C12. Mediante ensayos de retardamiento

en gel y combinándolos con anticuerpos específicos, determinaron que Fra-2 es el mayor componente de AP-1 en células musculares en diferenciación. Estos autores proponen que la función de AP-1 en la miogénesis es dependiente de las subunidades que compongan AP-1, siendo Fra-2, c-Jun y JunD compatibles con la diferenciación muscular (Andreucci et al., 2002). Finalmente, Frost *et al.*, (2003) han demostrado que el TNF- α disminuye la expresión de IGF-I (un importante factor anabólico muscular) en células C2C12, y que este efecto es dependiente de JNKs y AP-1.

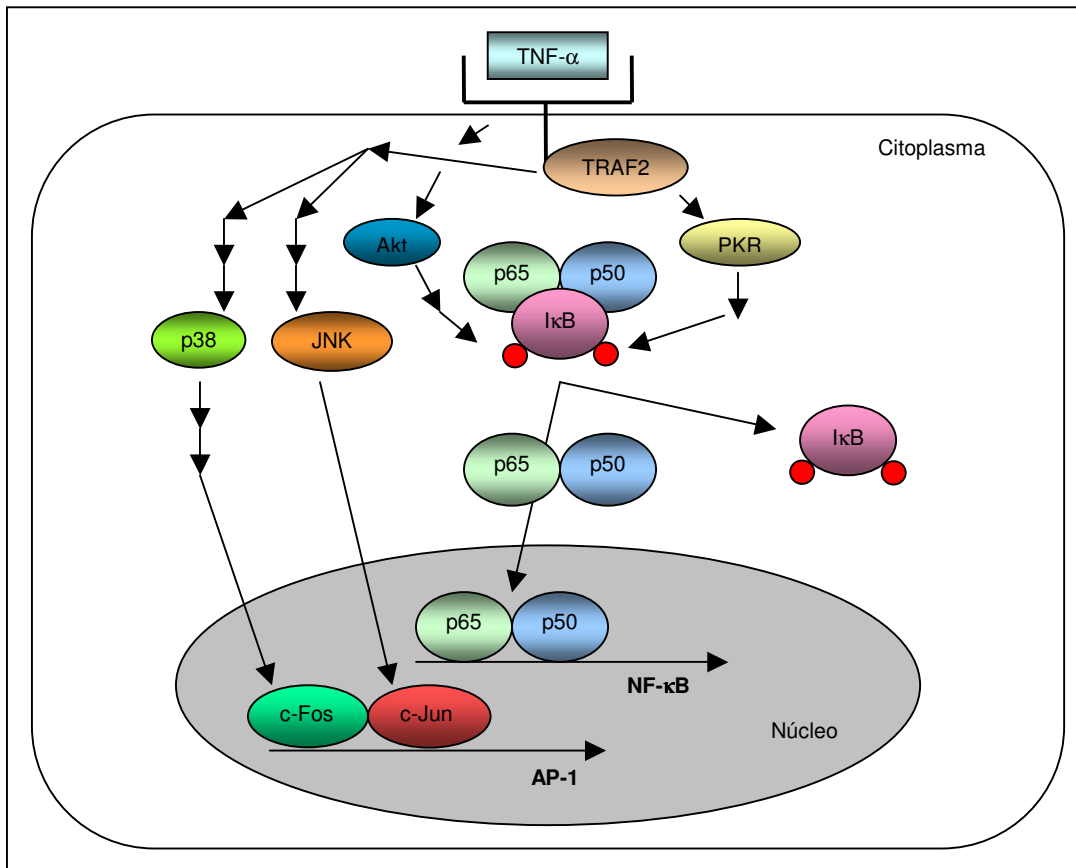


Figura 3. Componentes clásicos de las cascadas de activación de NF- κ B y AP-1 (Hunter *et al.*, 2002).

2.2.3. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B

La familia de factores de transcripción NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) tiene un papel crucial en la respuesta inmunitaria, inflamatoria y apoptótica induciendo la expresión de un gran número de genes virales y celulares (Baldwin *et al.*, 1996). NF- κ B se ha implicado en la fusión de los mioblastos en un modelo de embriones de pollo (Lee *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1997).

2.2.3.1. EL COMPLEJO NF- κ B/I κ B

NF- κ B comprende homodímeros y heterodímeros de proteínas relacionadas que comparten un dominio de unión al DNA conservado y un dominio de dimerización llamado dominio de homología Rel. Entre estas proteínas están P50, P65 (RelA), P52, Rel, c-Rel. El heterodímero P50-P65 es el factor de transcripción NF- κ B prototipo, y se encuentra en un gran número de tipos celulares (Baeuerle y Baltimore 1996). El mecanismo más común de activación de NF- κ B se inicia en el citoplasma, donde NF- κ B está secuestrado por una de las proteínas llamadas I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , p105/I κ B- γ y

p100/ κ B- δ . En respuesta a diversos estímulos (incluyendo las citoquinas, los mitógenos y diversas proteínas víricas), el NF- κ B se activa y se transloca al núcleo como resultado de la completa degradación proteolítica de I κ B o de la degradación parcial de los que son sus precursores, p105 y p100. Este mecanismo se ha estudiado principalmente en el caso de la proteína inhibidora I κ B α ; para la degradación de esta proteína se requiere la fosforilación de dos residuos específicos de serina (S32 y S36), poliubiquitinación y degradación mediante el proteasoma 26S (Verma *et al.*, 1995). En la figura 3 se pueden observar los componentes clásicos de las cascadas de activación del factor de transcripción NF- κ B.

2.2.3.2. LAS I κ B QUINASAS (IKKS)

Recientemente un gran complejo multiproteico citoplasmático (700-900 kDa) se ha identificado como el responsable de la actividad de la serina proteína-quinasa específica de la fosforilación de I κ B α . Se han clonado dos subunidades quinasa (IKK1/ α y IKK2/ β) y una subunidad reguladora (NEMO/IKK γ /IKKAP) de este complejo multiproteico (Regnier *et al.*, 1997; Rothwarf *et al.*, 1998; Yamaoka *et al.*, 1998M; Didonato *et al.*, 1997; Mercurio *et al.*, 1997; Woronicz *et al.*, 1997; Zandi *et al.*, 1997; Mercurio *et al.*, 1999).

El complejo IKK esta formado por homodímeros o heterodímeros de las quinasas IKK α e IKK β , y de un número indeterminado de copias de la proteína reguladora IKK γ (NEMO), necesaria para la activación del complejo.

In vitro, las proteínas IKK α e IKK β forman homodímeros y heterodímeros. Construcciones recombinantes de estas dos proteínas fosforilan I κ B α en los residuos específicos de serina, hecho que demuestra que la dimerización es requerida para la actividad quinasa del complejo.

Aun cuando la homología entre estas dos quinasas es muy elevada, a nivel funcional estas dos proteínas no son intercambiables. Así lo indican los estudios en ratones *knockout* de IKK α o IKK β . Estos estudios demuestran que mientras IKK α está implicado en procesos de morfogénesis, el IKK β es fundamental en la activación de la respuesta inmunitaria y por diversos estímulos proinflamatorios (Li Z.W. *et al.*, 1999; Li Q.T. *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 1999).

2.2.3.3. LA QUINASA INDUCTORA DE NF- κ B, NIK

Diversas proteínas de la familia de las MAPKKKs (“mitogen activated protein kinase kinase kinases”) se han involucrado en la fosforilación y la activación del complejo IKK en respuesta a estímulos específicos. Estas proteínas son las NIK (NF- κ B-inducing kinase), MEKK1 (MAP Kinase/Erk Kinase Kinase) (Mercurio y Manning 1999) y TAK1 (TGF- β Activated Kinase 1) (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999). La proteína NIK activa al NF- κ B en respuesta al TNF o IL-1 (Malinin *et al.*, 1997). En referencia a la activación del complejo IKK, la IKK α es mejor sustrato de NIK que la IKK β ; además se ha demostrado que la NIK fosforila la IKK α específicamente en la Ser-176 (Ling *et al.*, 1998). Finalmente, algunos estudios relacionan a la proteína PKB/Akt en la activación del complejo IKK (Ozes *et al.*, 1999; Romashkova *et al.*, 1999).

2.2.3.4. VÍAS DE ACTIVACIÓN DE NF- κ B DEPENDIENTES DE PI 3-K

Romashkova *et al.* (1999) describieron que la señalización antiapoptótica inducida por PDGF (Platelet-derived Growth Factor) requiere de PI 3-K para la activación de NF- κ B. La PI 3-K también regula la activación de NF- κ B en casos de hipoxia y reoxigenación (Beraud *et al.*, 1999) y en la estimulación de la respuesta inflamatoria causada por TNF- α (Ozes *et al.*, 1999).

2.2.3.5. NF- κ B, TNF- α Y MIOGÉNESIS

Ya en 1988 Miller *et al.* determinaron que el TNF- α es capaz de inhibir la diferenciación miogénica en cultivos de músculo humano. El mecanismo por el cual el TNF- α puede detener la diferenciación aún no está claro. En 1997 Szalay *et al.* confirmaron que el TNF- α es capaz de inhibir la diferenciación miogénica en células C2C12 en cultivo, y que este bloqueo lo realiza mediante la inhibición de la expresión del mRNA de MyoD y miogenina, dos importantes factores de transcripción involucrados en la activación de los genes que codifican para las proteínas miofibrilares; además, el TNF- α bloquea la expresión de marcadores de diferenciación miogénica tales como MHC y alfa-actina. Como resultado del tratamiento con TNF- α , las células no pueden formar miofibras y, por consiguiente, los mioblastos no pueden diferenciarse a miotubos (Szalay *et al.*, 1997).

Diversos estudios afirman que el TNF- α es un potente activador de NF- κ B, provocando la degradación proteolítica de I κ B α y la traslocación de NF- κ B al núcleo; también es conocido que NF- κ B es un inductor de la expresión de diversas citoquinas incluyendo TNF, IL-1 e IL-6 (Li *et al.*, 1998; Ghosh *et al.*, 1998). El papel de NF- κ B en la miogénesis es aún muy controvertido: mientras algunos autores lo postulan como un factor promotor de la miogénesis (Kaliman *et al.*, 1999; Conejo *et al.*, 2001), otros lo proponen como un inhibidor de la miogénesis (Guttridge *et al.*, 1999; Li y Reid, 2000). Guttridge *et al.* (2000) determinaron, usando un modelo celular proveniente de músculo de ratón (C2C12), que NF- κ B induce la pérdida del mRNA que codifica para el factor miogénico MyoD. Estos científicos determinaron además que TNF- α por sí solo es capaz de activar NF- κ B e inducir la pérdida de MyoD en células indiferenciadas, y con esto detener la diferenciación. Este efecto no se observa en células diferenciadas, pero si combinamos TNF- α con INF γ se observa una disfunción en las fibras musculares. Estos mismos científicos determinaron que la combinación de estas dos citoquinas (TNF- α e INF γ) produce apoptosis (detectada por TUNEL) sólo en las células indiferenciadas que no presentan MHC, y que esta apoptosis no puede afectar a los miotubos ya formados. Junto con esto, determinaron que tratamientos combinados de TNF- α e INF γ inhiben la expresión del mRNA de MyoD en músculo esquelético de ratón (Guttridge *et al.*, 2000). El mismo año, otro grupo de investigadores determinaron que NF- κ B mediaría la pérdida de proteína inducida por TNF- α en células musculares de ratón (C2C12) diferenciadas a miotubos (Yi-Ping and Reid, 2000). En el año 2001, otro grupo de investigadores determinaron por relación causa-efecto, entre la inhibición de la diferenciación de las células musculares producida por el TNF- α y la activación de NF- κ B; estos científicos lograron revertir el efecto de TNF- α al sobreexpresar I κ B α , la subunidad inhibitoria de NF- κ B (Langen *et al.*, 2001). Este mismo grupo determinó que el TNF- α es capaz de inhibir la miogénesis a través de un mecanismo dependiente e independiente del estado redox de las células (Langen *et al.*, 2002). Para la correcta diferenciación de los mioblastos a miotubos, estas células deben salir del ciclo celular y entrar en diferenciación; para ello deben acumular proteínas específicas de músculo y disminuir la expresión de otras que las mantienen en el ciclo celular. Langen *et al.* (2004) demostraron que el TNF- α mantiene aumentada la ciclina D1, una de las proteínas fundamentales en el mantenimiento de los mioblastos en proliferación; mediante el uso del promotor de troponina I, un marcador de miogénesis, y ensayos de luciferasa, demostraron que la activación transcripcional de NF- κ B es necesaria para la inhibición de la miogénesis, y que esta activación puede ser mediada por la adición de TNF- α al medio como por la sobreexpresión de IKKs. Asimismo, también lograron demostrar que el dominio de transactivación de p65 es fundamental para la inhibición de la miogénesis. Según estos autores, el TNF- α , además de disminuir claramente MyoD en células en diferenciación, es capaz de desestabilizar, hecho comprobado midiendo la vida media

de MyoD, que aumenta al diferenciar las células. Este aumento observado al diferenciar los mioblastos a miotubos, es inhibido por la adición de TNF- α al medio. Por último, estos científicos analizaron el efecto del TNF- α en un modelo de regeneración *in vivo*, y observaron que la administración de TNF- α reduce la capacidad de regeneración del músculo mediante la inhibición de la salida del ciclo celular por parte de las células satélite (Langen *et al.*, 2004). Stewart *et al.* (2004) propusieron que la inhibición de la progresión del programa de diferenciación es el resultado de un desequilibrio entre un complejo grupo de factores, uno de los cuales es NF- κ B, pero existen otros, como JNKs y gadd45 β . Además, estos investigadores postularon que el TNF- α puede estimular la activación de la caspasa 8 y con ello la apoptosis. Asimismo, observaron que la inhibición de NF- κ B favorece la progresión de la diferenciación, pero aumenta la apoptosis por un mecanismo dependiente de gadd45 β (Stewart *et al.*, 2004).

Hasta este momento, siempre se había relacionado al TNF- α con NF κ B y éste, a su vez, con la inhibición de la diferenciación, pero en el año 2002 Coletti *et al.* han demostraron que la inhibición de la diferenciación observada en tratamientos con TNF- α no es totalmente dependiente de la activación de NF κ B, sino de otro factor llamado PW1, que se expresa en las células musculares y que se ha relacionado en el mecanismo con que p53 media la muerte celular. Estos investigadores han demostrado que la activación de NF κ B no es suficiente para detener la diferenciación de células musculares *in vitro*, y que PW1 detiene la diferenciación muscular mediante la activación de caspasas, que este proceso es independiente de apoptosis y que es independiente de la activación de NF κ B (Coletti *et al.*, 2002). Este estudio es contradictorio con los anteriores, ya que le quita el papel principal a NF- κ B, y relaciona a éste con la supervivencia celular; este hecho no es algo aislado, ya que desde hace mucho tiempo se conoce la importancia de NF- κ B en la supervivencia celular (Amer and Baltimore, 1996). Otro trabajo relacionado con este aspecto demuestra que NF- κ B controla negativamente la expresión de C3, una de las subunidades del proteasoma, y que los glucocorticoides inducen la expresión de C3 y la activación del proteasoma, oponiéndose a la represión que ejerce NF- κ B sobre la expresión de C3 (Du *et al.*, 2000). Otras proteínas involucradas en este proceso son las "Heat shock proteins"; estas proteínas protegen a las células musculares del efecto catabólico de la dexametasona, previniendo la disminución de NF- κ B (Luo *et al.*, 2001).

3. MIOGÉNESIS

La formación del músculo esquelético durante la embriogénesis se conoce como miogénesis. Este proceso incluye la determinación de las células progenitoras mesodérmicas al linaje miogénico y la subsiguiente diferenciación de los mioblastos en miotubos. Durante la embriogénesis de los vertebrados, las células progenitoras miogénicas se forman en el soma. Estas células están determinadas a un destino miogénico, pero no expresan marcadores fenotípicos musculares hasta que reciben los estímulos ambientales apropiados. Las señales que inducen la miogénesis *in vivo* aún no se conocen exactamente, pero gracias a los estudios en mioblastos de músculo esquelético en cultivo se ha observado que la diferenciación de estas células está altamente controlada por mecanismos represores, inducidos por suero o por factores de crecimiento peptídicos exógenos. Estos factores evitan que la célula entre en el programa de diferenciación miogénica hasta que la concentración de estos factores en la célula disminuye por debajo de los niveles críticos (figura 4).

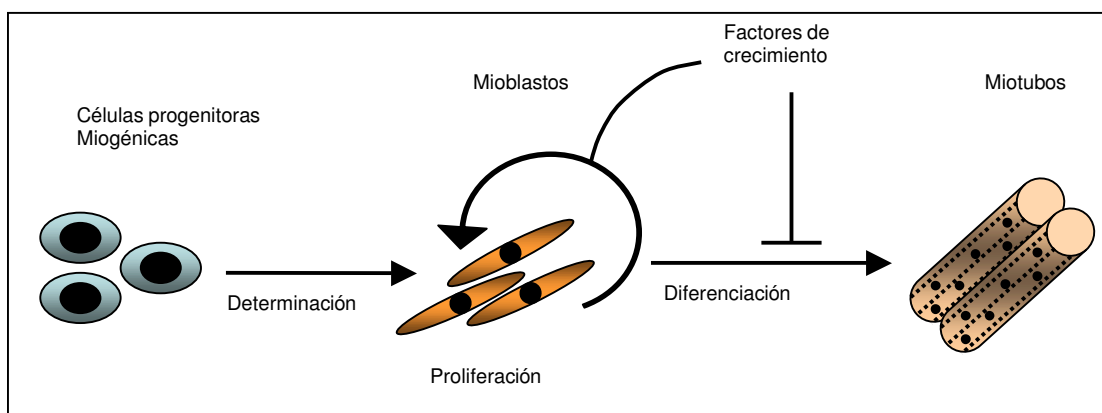


Figura 4. Mecanismos que regulan la diferenciación de las células musculares (modificado de Florini *et al.*, 1996).

La diferenciación de mioblastos en miotubos requiere que la célula salga del ciclo celular. Durante este proceso, los mioblastos paran el crecimiento en la fase G₀/G₁, donde se inicia la transcripción de los genes específicos del músculo. En esta fase se transcriben los genes que regulan el inicio del programa de diferenciación miogénica, y se evita la expresión de proteínas inhibitoras de la miogénesis implicadas en la regulación de otras fases del ciclo celular.

La determinación y diferenciación de las células del músculo esquelético en los vertebrados depende de dos familias de factores de transcripción. Estas proteínas reguladoras son la familia de los factores de determinación muscular o MRFs, que presentan estructura básica *helix-loop-helix* (bHLH): MyoD, miogenina, Myf-5 y MRF4 (Weintraub *et al.*, 1993), y la familia del factor miogénico potenciador 2, MEF2 (Olson *et al.*, 1995).

Gracias a los estudios en ratones a los que se les ha eliminado la expresión de uno o más de los genes bHLH, se ha obtenido información sobre los papeles de estos genes en la especificación y diferenciación del músculo esquelético (Figura 5). Estos estudios muestran que los ratones que no expresan MyoD son viables y aparentemente tienen el músculo esquelético normal (Rudnicki *et al.*, 1992). Otros trabajos en los que se ha eliminado la expresión de Myf-5 en ratones muestran que estos neonatos también presentan un músculo esquelético normal, pero mueren en el estado perinatal como consecuencia de deformidades en las costillas (Braun *et al.*, 1992; Tajbakhsh *et al.*, 1996). En cambio, la miogenina tiene un papel esencial como un factor regulador de la diferenciación muscular, ya que los ratones sin miogenina son viables, pero no se pueden mover al nacer, y sus mioblastos no se diferencian

eficientemente en miotubos. Este defecto no se observa en los mioblastos miogenina (-/-) cultivados *in vitro* (Hasty *et al.*, 1993; Nabeshima *et al.*, 1993). Finalmente, los ratones deficientes en Myf-5 y MyoD presentan una ausencia completa de mioblastos y de miofibras (Rudnicki *et al.*, 1993).

El cuarto factor miogénico, MRF4, actúa en etapas posteriores de la vía miogénica, tal como sugiere su patrón de expresión. Los ratones sin MRF4 producen un músculo débil y a su vez menos funcional (Braun *et al.*, 1995; Patapoutian *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995). Estudios más recientes demuestran que el MRF4 es capaz de promover la diferenciación muscular de manera similar a la miogenina (Zhu *et al.*, 1997; Rawis *et al.*, 1998).

La secuencia temporal de activación de los genes MRF durante la embriogénesis y los fenotipos que presentan los mutantes para estos genes, nos permite resumir el proceso de miogénesis esquelética en dos fases: (a) la activación inicial de Myf-5 y MyoD para la determinación de las células premiogénicas del soma en mioblastos, y (b) la activación de los factores miogenina y MRF4, que regulan la expresión de genes inducidos durante y después de la fusión y formación de los miotubos (figura 5).

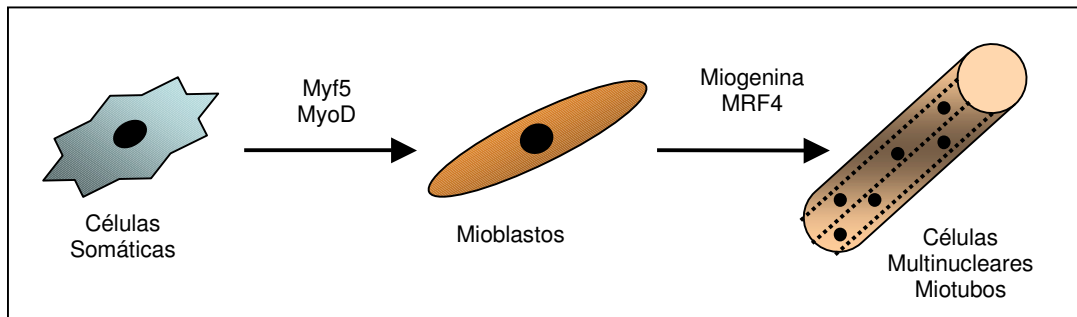


Figura 5. Regulación de la diferenciación miogénica por la familia de factores de transcripción MRF (modificado de Rudnicki y Jaenisch, 1995).

Los factores miogénicos bHLH forman heterodímeros preferentemente con miembros de la familia de proteínas E, proteínas básicas que también tienen estructura *helix-loop-helix*. Los heterodímeros proteína E / proteína miogénica bHLH se unen a cajas E (*E-box*) del DNA, localizadas en las regiones que controlan la expresión de genes específicos de músculo (como es la creatina-quinasa muscular, algunas miosinas, la desmina y el receptor de acetilcolina, entre otros).

La otra familia de factores de transcripción importantes en el control de la miogénesis, es la familia MEF2. En vertebrados se han descrito cuatro genes MEF2 que codifican para proteínas que forman homodímeros o heterodímeros, y que se unen a una secuencia de DNA consenso rica en A-T que se encuentra en las regiones promotoras de muchos genes específicos de músculo. Estas proteínas tienen papeles importantes en la miogénesis: en *Drosophila* el gen D-MEF2 es esencial para la diferenciación de las células musculares (Bour *et al.*, 1995; Lilly *et al.*, 1995; Rabganayakulu *et al.*, 1995), y en ratones la mutación del gen MEF2C impide la morfogénesis y la miogénesis cardíaca (Lin *et al.*, 1997). Se sabe que la proteína MEF2 no sólo regula la activación de genes específicos del músculo por su unión al DNA, sino que también por interacciones proteína-proteína con heterodímeros de bHLH miogénicos / proteína E que se unen a la secuencia consenso de la caja E (Black *et al.*, 1998).

La salida del ciclo celular es un requisito para la activación del programa de diferenciación del músculo esquelético. En los mioblastos, el hecho de dividirse o diferenciarse está controlado por un balance de reguladores positivos y negativos del ciclo celular (Walsh *et al.*, 1997). Las quinasas dependientes de ciclinas o Cdks (*cyclin-dependent kinases*) regulan la transición del ciclo celular formando complejos

con ciclinas específicas que controlan la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb). La expresión de las proteínas CKIs (proteínas inhibidoras de quinasas dependientes de ciclinas) p21 y p57 se incrementa al inicio de la miogénesis. De esta manera, se inhiben las Cdks y se favorece la hipofosforilación de Rb. En este momento, se produce una parada en el crecimiento en la fase G1 del ciclo celular. Estudios previos han demostrado que la hipofosforilación de Rb es requerida para la salida irreversible de los mioblastos del ciclo celular en respuesta a MyoD y para la activación transcripcional de promotores específicos de músculo por parte de MyoD (Walsh *et al.*, 1997).

La proteína Rb también está involucrada en la regulación de la activación de MEF2C, pero no en la unión de este factor de transcripción al DNA (Novitch *et al.*, 1999). Los mioblastos Rb^{-/-} tienen la proteína MEF2C funcionalmente inactiva y, como consecuencia, la activación de los genes específicos del músculo está perturbada. A pesar de esto, aún no se conoce el mecanismo de regulación, ya que la actividad de MEF2 no está restringida a células en proceso de diferenciación, sino que también es importante en las células en proliferación. Este hecho implica la existencia de un mecanismo de regulación de MEF2C dependiente de la fase del ciclo celular.

En la diferenciación del músculo esquelético existen otros factores de transcripción que modulan positiva o negativamente la actividad de los MRFs y la expresión de otros genes específicos del músculo. Entre estos factores está Pax-3, un modulador esencial en la miogénesis que regula la expresión de MyoD (Rawls y Olson, 1997). La proteína Id (inhibidora de la unión al DNA) es una proteína con estructura *helix-loop-helix* que no presenta el dominio básico de unión al DNA, y que actúa secuestrando proteínas bHLH y formando complejos que no se pueden unir al DNA (Langlands *et al.*, 1997). Mist1 es una proteína bHLH que actúa regulando negativamente la actividad de MyoD mediante la formación de heterodímeros inactivos MyoD-Mist1 y homodímeros Mist1 que bloquean las cajas E (Lemerrier *et al.*, 1998). La proteína I-mfa es otro factor que evita la miogénesis defectuosa; esta proteína inhibe la transactivación producida por los miembros de la familia MyoD. Esta proteína, además de asociarse a MyoD y retenerlo en el citoplasma, es capaz de interferir la de los MRFs al DNA (Chen *et al.*, 1996). ZEB (*zinc-finger/E-box binding*) se une a las cajas E de las regiones promotoras de los genes musculares e impide la transcripción hasta que es desplazado por una alta concentración de factor miogénico bHLH. Este sistema ofrece a las células musculares un mecanismo de regulación tanto del orden como del momento de la expresión de los genes musculares, y que es dependiente de las concentraciones relativas de ZEB y proteínas miogénicas bHLH y de la afinidad de éstas por las cajas E (Postigo *et al.*, 1997).

3.1. LOS IGF's EN LA DIFERENCIACIÓN MUSCULAR

En mioblastos en cultivo, la depleción de suero del medio de crecimiento induce la diferenciación mediante mecanismos de señalización que conducen a la activación de los genes de la familia Bhlh, entre los cuales se encuentra MyoD, y por tanto a la diferenciación.

Son pocos los factores capaces de estimular la diferenciación morfológica de los mioblastos, la expresión y la activación de la familia de proteínas MyoD. Entre estos factores están los IGFs (IGF-I y IGF-II) o factores de crecimiento similares a la insulina. Estos factores son estimuladores potentes de la diferenciación muscular (Florín *et al.*, 1991; Florín *et al.*, 1996). Tanto el IGF-I como el IGF-II inducen la vía miogénica por activación del receptor IGF-I (Ewton *et al.*, 1987). Cuando los mioblastos están en confluencia y en un medio con una baja concentración de factores de crecimiento, se diferencian espontáneamente. Durante este proceso, los IGFs son secretados por los mismos mioblastos al medio de cultivo, y con esto inducen la de los mioblastos vecinos (Tollefsen *et al.*, 1989; Rosen *et al.*, 1993; Kou Kou *et al.*, 1993). Además, se puede observar una correlación directa entre la cantidad de IGF-II

secretado al medio y la velocidad de los mioblastos de diferenciarse espontáneamente; también se ha demostrado la inhibición de la diferenciación mediante oligonucleótidos antisentido para IGF-II, efecto que se revierte en presencia de IGF-II exógeno (Florín *et al.*, 1991).

La importancia de los IGFs en la miogénesis ha sido confirmada en estudios llevados a cabo en ratones mutantes para estas proteínas. Tanto los mutantes para IGF-I como los de su receptor son viables, pero presentan un desarrollo embrionario anormal y los neonatos mueren inmediatamente después de nacer (Liu *et al.*, 1993; Powell-Braxton *et al.*, 1993).

Se han caracterizado distintas líneas celulares de músculo esquelético; la línea celular C2C12, derivada de ratón adulto, expresa MyoD y miogenina, así como también IGF-I y IGF-II. Por esta razón esta línea celular presenta niveles bajos de respuesta a la diferenciación por IGFs exógenos (Florín *et al.*, 1991).

Los IGFs pueden estimular tanto la proliferación como la diferenciación celular. La mayor parte de las líneas celulares caracterizadas presentan una respuesta mitógena al ser incubadas en presencia de IGF-I. Concretamente, el IGF-I es necesario para atravesar la fase G1 del ciclo celular y por esto se considera un factor de progresión. Engert *et al.* (1996) concluyen que la miogénesis inducida por IGF-I tiene como prerrequisito la inducción de un último ciclo proliferativo, el cual probablemente contribuye a incrementar el contacto entre los mioblastos (Engert *et al.*, 1996).

3.2. REGENERACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO ADULTO: CÉLULAS SATÉLITE

En el músculo adulto, las células satélite representan el 5% del total de células presentes, y son las encargadas de reparar el músculo cuando se produce un daño miofibrilar (Bischoff, 1994). Normalmente estas células no proliferan, pero bajo determinados estímulos, tales como trauma y variaciones de peso, podrían entrar en el ciclo celular y proliferar. Estas células satélite pueden hacer varios ciclos de proliferación, para luego salir del ciclo y fusionarse a las miofibras dañadas. Existen muchos factores en la zona que se produce el daño miofibrilar que podrían servir como activadores de las células satélite (Grunds, 1998; Seale y Rudnicki, 2000). Estas células satélite no expresan niveles detectables de MRFs, pero si presentan M-cadherina, una molécula de adhesión presente en las células musculares. Una vez las células satélite son activadas, comienzan a expresar MyoD o Myf-5, con lo que entran en el ciclo de diferenciación (Cornelison y Wold, 1997).

Se han realizado diversos estudios con el fin de revelar el papel que tienen los MRFs durante la regeneración del músculo dañado. Los ratones mutantes para el factor MyoD nacen sin alteraciones aparentes en su músculo esquelético, pero presentan graves problemas en el momento de regenerar el músculo que ha sido dañado (Megeney *et al.*, 1996). Análisis *in vitro* de células musculares aisladas de estos ratones deficientes en MyoD, demuestran que estas células se mantienen en proliferación cuando las células nativas ya están iniciando la diferenciación. Las células MyoD^{-/-} expresan altos niveles de Myf5, pero esto no les permite terminar la diferenciación. Las células deficientes en MyoD presentan un fenotipo entre células satélite y células progenitoras musculares; ello, sumado a que Myf5 por sí solo no es capaz de terminar la diferenciación miogénica, permite sugerir que Myf5 es un factor fundamental para sacar a las células satélite de su estado quiescente, pero que no finalizar el proceso por sí solo (Sabourin *et al.*, 1999; Yablonka-Reuveni *et al.*, 1999; Sabourin y Rudnicki, 2000).

Otros factores son importantes para la regeneración del músculo dañado, como elMNF (*myocyte nuclear factor*). Este factor se expresa en las células satélite y tiene la propiedad de activar los genes responsables de la determinación de las células progenitoras miogénicas y la activación del programa miogénico (Garry *et al.*, 1997;

Yang *et al.*, 1997; Garry *et al.*, 2000). Otro factor importante es el FGF6 (*fibroblast growth factor 6*); éste actuaría como un represor de la diferenciación, permitiendo así la expansión de las células satélite durante la regeneración del músculo (Floss *et al.*, 1997). GDF8, un miembro de la familia del TGF-beta, es un regulador negativo de la proliferación y diferenciación de los mioblastos, pero tiene un efecto hipertrófico en el músculo, efecto atribuido o mediado por las células satélite (McPherron *et al.*, 1997). Resulta interesante que la sobreexpresión de dos oncogenes (ski y son) produce hipertrofia muscular, y este fenotipo estaría mediado por un antagonismo con los miembros de la familia TGF-beta que regulan negativamente el programa miogénico (Luo *et al.*, 1999; Stroshein *et al.*, 1999; Colmenares y Stavnezer, 1989; Berk *et al.*, 1997).

4. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA COMBATIR LA CAQUEXIA

En los últimos 20 años, la caquexia ha provocado un creciente interés tanto en la medicina clínica como en la investigación básica. La anorexia y las profundas alteraciones que caracterizan este síndrome han definido el desarrollo de diferentes estrategias terapéuticas basadas en estos dos factores (revisado por Argilés *et al.*, 2004).

4.1. CONTRARRESTAR LA ANOREXIA

4.1.1. APROXIMACIÓN FARMACOLÓGICA

4.1.1.1. FÁRMACOS PROGESTÁGENOS

Los fármacos progestágenos son derivados sintéticos de la hormona progesterona. En algunas pruebas clínicas se ha observado una mejora del apetito, la ingesta calórica y el estado nutricional de los pacientes (Bruera *et al.*, 1990; Neri *et al.*, 1997). El acetato de megestrol parece actuar, al menos en parte, por medio del neuropéptido Y (un potente estimulador del apetito en el sistema nervioso central) (McCarthy *et al.*, 1994), y la medroxiprogesterona por medio de la inhibición de la producción de citoquinas implicadas en la respuesta anoréxica (IL-1, TNF- α , IL-6) (Mantovani *et al.*, 1997). Sin embargo, el efecto de estos fármacos parece ser el de provocar edema y aumentar las reservas de tejido adiposo, más que aumentar las reservas de proteína muscular. Estos tratamientos, por tanto, parecen más indicados en los casos en que se intenta combatir la anorexia, náuseas y deterioro de la imagen corporal, pero no para combatir la fatiga y la debilidad muscular (van Roenn *et al.*, 1994; Strang, 1997).

4.1.1.2. CANNABINOIDES

Los cannabinoides (marihuana y sus derivados) son claramente estimuladores de la ingesta. En un estudio clínico llevado a cabo con uno de estos derivados, el dronabidol (Δ^9 -tetrahidrocannabinol), se observó una disminución del ritmo de pérdida de peso y una mejora tanto en el apetito como en el estado de ánimo (Plasse *et al.*, 1991). Se ha propuesto que la actuación de estos compuestos es bien por inhibición de la producción y la secreción de citoquinas (Waltz *et al.*, 1991; Srivastava *et al.*, 1998; Facchinetti *et al.*, 2003) o vía receptores de endorfinas o inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Mitcehlson, 1992). El tratamiento de pacientes con SIDA con dronabidol, resulta en una mejoría de la caquexia asociada a este estado patológico en un 69% de los casos (El-Kamar *et al.*, 2003). Sin embargo, en diferentes pruebas clínicas se ha constatado que un importante porcentaje de los pacientes debía abandonar el tratamiento debido a sus efectos secundarios.

4.1.1.3. CIPROHEPTADINA

Debido a que un aumento de la actividad serotoninérgica en el cerebro parece ser una de las causas de la anorexia, se ha intentado bloquear dicha vía utilizando un antagonista de la serotonina, la ciproheptadina. Aunque los datos clínicos preliminares mostraron un efecto positivo tanto en el apetito como el peso corporal en individuos sanos y pacientes de cáncer con caquexia, no se consiguió revertir la progresiva pérdida de peso de los pacientes en estado avanzado de la enfermedad (Kardinal *et al.*, 1990).

4.1.1.4. INSULINA

Uno de los aspectos más destacados de la caquexia es una importante alteración del metabolismo glucídico, acompañado de resistencia a la insulina y una atenuada secreción de insulina en respuesta a la hiperglucemia. La utilización de insulina exógena en el tratamiento de la caquexia cancerosa en animales experimentales ha mostrado una mejora en la ingesta y el desgaste muscular (Moley *et al.*, 1987; Tessitore *et al.*, 1993b), así como de las reservas de tejido adiposo (Moley *et al.*, 1987), aunque el tratamiento también ha sido asociado a un aumento del peso del tumor (Beck y Tisdale, 1989). En pacientes con SIDA, la administración de insulina por vía subcutánea resulta en una ganancia de peso (Kabadi *et al.*, 2000).

4.1.1.5. CORTICOSTEROIDES

El uso de estas hormonas fue una de las primeras aproximaciones al tratamiento de la anorexia cancerosa. Se han usado tanto la dexametasona como la prednisolona, las cuales parecen actuar a través de su actividad euforizante o de la inhibición del metabolismo de las prostaglandinas (Vigano *et al.*, 1994). El tratamiento con corticosteroides parece mitigar parcialmente algunos síntomas de la caquexia como la anorexia o la astenia, pero su uso prolongado conlleva efectos secundarios muy nocivos (Derogatis y MacDonald, 1982), y aunque sean un buen tratamiento paliativo, en los pacientes con caquexia avanzada no consiguen reducir el índice de mortalidad. Aunque en procesos de sepsis parecen tener un papel crucial en el desarrollo de la caquexia (Fischer y Hasselgren, 1991), en la caquexia cancerosa no parecen estar involucrados (Llovera *et al.*, 1996).

4.1.2. APROXIMACIÓN NUTRICIONAL

4.1.2.1. NUTRICIÓN ENTERAL Y PARENTERAL TOTAL

La nutrición enteral es una opción razonable para pacientes con un intestino funcional y que conservan el apetito y un buen estado general, pero que no pueden tragar los alimentos por tener, por ejemplo, tumores en la cabeza o el cuello (Vigano *et al.*, 1994).

La nutrición parenteral total se ha utilizado en pacientes malnutridos que no pueden recibir nutrición oral ni enteral. Aunque algunos estudios describen algunos efectos beneficiosos (Derogatis y MacDonald, 1982), otros los desvalorizan debido a las secuelas y complicaciones que conlleva (Klein *et al.*, 1986). La nutrición parenteral es además considerablemente más costosa que la enteral, proporcionando resultados similares respecto al mantenimiento de la proteína y el peso corporal.

En conjunto, las estrategias nutricionales representan, más bien, complementos para el tratamiento de la caquexia que combinados con las estrategias farmacológicas, sí que pueden dar resultados interesantes.

4.2. NEUTRALIZAR LOS CAMBIOS METABÓLICOS

4.2.1. MEDIACIÓN DE LAS CITOQUINAS

Algunas de las citoquinas producidas por el sistema inmunitario en respuesta a un estímulo invasivo (TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ) han sido implicadas en el desgaste asociado a la caquexia (Evans *et al.*, 1989), y el bloqueo de su síntesis o de su acción es una de las estrategias terapéuticas que se ha seguido para el tratamiento de este síndrome (Yamamoto *et al.*, 1998).

4.2.1.1. PENTOXIFILINA

La pentoxifilina, un derivado de la metilxantina, es un inhibidor de la fosfodiesterasa que inhibe la síntesis de TNF- α mediante la disminución de su transcripción génica. Algunos estudios en modelos animales sugieren que la pentoxifilina puede disminuir la toxicidad mediada por citoquinas de algunos agentes antineoplásicos y aún así mantener su eficacia antitumoral (Balazs y Kiss, 1994). Sin embargo, estudios clínicos han demostrado que el fármaco no consigue mejorar el apetito o aumentar el peso de los pacientes (Goldberg *et al.*, 1995)

4.2.1.2. ROLIPRAM

El rolipram es un inhibidor de la fosfodiesterasa de tipo IV, capaz de disminuir la producción de TNF- α por monocitos estimulados con LPS (Semmler *et al.*, 1993), por lo que es un potencial agente terapéutico para los estados patológicos en los que el TNF- α sea mediador de la patogénesis, como el *shock* séptico.

4.2.1.3. TALIDOMIDA

La talidomida (α -N-ftalimidoglutaramida) suprime la producción de TNF- α por monocitos *in vitro* (Sampaio *et al.*, 1991) y normaliza los niveles elevados de TNF- α *in vivo* (Sampaio *et al.*, 1993). Su acción parece ser debida a una desestabilización selectiva del mRNA del TNF- α (Moreira *et al.*, 1993). Su utilidad en el tratamiento de la caquexia cancerosa está aún por establecer. Este compuesto se usa en pacientes con tuberculosis para contrarrestar los altos niveles de citoquinas circulantes (Tramontana *et al.*, 1995). Por otra parte, se ha observado en pacientes con SIDA que la administración de este compuesto mejora la calidad de vida y el peso de estos pacientes (Klausner *et al.*, 1996).

4.2.1.4. ANTICUERPOS Y RECEPTORES SOLUBLES

El uso de anticuerpos, antagonistas de receptores o receptores solubles, ha proporcionado interesantes resultados. Los ensayos con modelos experimentales de tumor utilizando anticuerpos anti-TNF- α (Costelli *et al.*, 1993; Carbó *et al.*, 1994), anti-IL-6 (Yasumoto *et al.*, 1995) o anti-IFN- γ han conseguido una reversión parcial de la caquexia. En los ensayos clínicos, sin embargo, aunque han descrito efectos positivos utilizando anticuerpos anti-IL-6 (Emilie *et al.*, 1994), no se han visto mejoras significativas con los anticuerpos anti-TNF- α (Reinhart *et al.*, 1996) o bloqueando la acción de la IL-1 por medio del IL-1ra. En pacientes con SIDA la administración de un anticuerpo anti-IL6 mejora considerablemente la caquexia asociada a este proceso patológico (Emilie *et al.*, 1994).

4.2.1.5. CITOQUINAS ANTIINFLAMATORIAS.

Se ha observado una mejora en algunas de las anormalidades asociadas con la caquexia administrando IL-12 (Mori *et al.*, 1996) o IFN- α (Bielefeldt-Ohmann *et al.*, 1995) en modelos experimentales de tumor. En ambos casos, la acción parece estar mediada por una disminución de la producción de IL-6.

Por otra parte, la IL-15, que ha sido descrita como un factor anabólico para el músculo esquelético, es otro potencial agente terapéutico anti-caquexia (Quinn *et al.*, 1995). Carbó *et al.* (2000) han demostrado que la administración de IL-15 a ratas portadoras de tumor reduce significativamente las anormalidades provocadas por el crecimiento tumoral. Asimismo, estudios muy recientes llevados a cabo también en nuestro laboratorio demuestran que la IL-15 es capaz de revertir la apoptosis que se

presenta en el músculo de ratas portadoras de tumor y que presentan caquexia (Figueras *et al.*, 2004). Todos estos resultados hacen de esta citoquina un buen candidato potencial para su posible uso en la terapia contra la caquexia.

4.2.2. MEDIACIÓN HORMONAL

4.2.2.1. HORMONA DEL CRECIMIENTO

Los datos preliminares sugieren que la hormona del crecimiento (GH) promueve un balance nitrogenado positivo y una ganancia de peso en los estudios a corto plazo (Krentz *et al.*, 1991), pero queda por determinar si los efectos son los suficientemente prolongados para producir una mejora considerable en los pacientes de caquexia, y si el tratamiento puede afectar al crecimiento del tumor. En este sentido, se han encontrado resultados positivos en ratas portadoras de tumor (Wolf *et al.*, 1993).

4.2.2.2. IGF-I

El IGF-I o somatomedina-c parece estar implicado en la regulación del recambio proteico, ya que se sabe que estimula la captación de aminoácidos y la síntesis proteica en el músculo esquelético y, además, disminuye la lipólisis en el tejido adiposo (Froesch *et al.*, 1985). Todo esto hace al IGF-I un buen candidato para contrarrestar los efectos de la caquexia en el músculo esquelético. Aunque aún son necesarias más pruebas clínicas, se han obtenido resultados prometedores en pacientes de SIDA (Lieberman *et al.*, 1994) y en modelos experimentales de tumor (Ng *et al.*, 1992). Wang *et al.* (2000) han demostrado que la administración de una mezcla de IGF-I y su proteína de unión IGFBP-3, produce un significativo aumento de peso de los animales, probablemente por una mejoría en la ingesta y en el metabolismo de la glucosa. Lazarus *et al.* (1996) han demostrado en un modelo de ratones portadores de un tumor inductor de caquexia, que la administración de IGF-I e insulina mejora la pérdida de peso de los animales portadores de tumor. Pese a todos estos resultados, el uso de IGF-I en el tratamiento de la caquexia requiere de más estudios, debido principalmente a la amplia gama de resultados y la divergencia entre ellos que se pueden observar en los tratamientos con este factor *in vivo*.

4.2.2.3. MELATONINA

Esta hormona pineal parece influenciar la actividad de las citoquinas durante el crecimiento tumoral. En estudios con pacientes con tumores sólidos metastásicos, el tratamiento con melatonina redujo los niveles de TNF- α circulantes (Lissoni *et al.*, 1996) y se produjo una menor pérdida de peso (Lissoni *et al.*, 1996). Por último, esta hormona reduce los efectos tóxicos de la quimioterapia (Lissoni *et al.*, 1997).

4.2.2.4. SOMATOSTATINA

La caquexia está asociada a una disminución de la relación insulina/glucagón. Muchos trabajos postulan a esta alteración como la causante en parte del progresivo catabolismo observado en la caquexia cancerosa. Bartlett *et al.* (1994), mediante una terapia combinada de somatostatina más insulina y hormona del crecimiento en animales con caquexia, han logrado aumentar la relación insulina/glucagón, lo que ocasiona en un aumento del peso de la carcasa y la masa muscular. La somatostatina actúa disminuyendo los niveles de glucagón.

4.2.3. OTRAS APROXIMACIONES

4.2.3.1. ESTEROIDES ANABÓLICOS

A pesar de los resultados positivos observados en el balance nitrogenado en algunos estudios con pacientes de cáncer (Patton *et al.*, 1986) o de SIDA (Hengge *et al.*, 1996), los efectos secundarios como androgenización retención de líquidos o toxicidad hepática representan un problema.

4.2.3.2. AGONISTAS β_2 -ADRENÉRGICOS

Los estudios preliminares llevados a cabo con estas moléculas demuestran que son capaces de suprimir la activación de la proteólisis muscular durante el crecimiento del tumor (Costelli *et al.*, 1995a; Carbó *et al.*, 1997) y anulan el incremento en la oxidación de los AACR observado durante la caquexia (Costelli *et al.*, 1995b). Busquets *et al.* (2004) han demostrado que el formoterol, reduce la caquexia asociada al crecimiento tumoral mediante una disminución de la actividad de los sistemas proteolíticos (principalmente el sistema dependiente de ATP y ubiquitina) y una inhibición de la apoptosis.

4.2.3.3. ÁCIDOS GRASOS ω -3

Los ácidos grasos poliinsaturados ω 3 (PUFA), presentes en alta proporción en el aceite de pescado, tienen un gran potencial como agentes en el tratamiento de la caquexia. Se ha descrito su capacidad de reducir el crecimiento del tumor (Anti *et al.*, 1994) y el desgaste observado en el tejido adiposo y el músculo esquelético durante la caquexia (Tisdale, 1993). El tratamiento de pacientes con cáncer pancreático con cápsulas de aceite de pescado produjo la mejora del peso corporal y la estabilización del gasto energético basal (Wigmore *et al.*, 1996).

4.2.3.4. AMINOÁCIDOS

La proteólisis muscular periférica, como ocurre durante la caquexia cancerosa, sirve para movilizar aminoácidos que son necesarios para la síntesis proteica en el hígado y en el tumor. Por lo tanto, la administración de aminoácidos exógenos parece ser una buena estrategia para proveer estos substratos preservando la masa muscular. Tayek *et al.* (1990) utilizaron los AACR en nutrición parenteral en pacientes con adenocarcinoma intra-abdominal avanzado, y encontraron una mejora en la cinética proteica y en la síntesis de albúmina. En otro sentido, se han utilizado los AACR para contrarrestar la anorexia asociada a caquexia cancerosa, y se observó una reducción de la gravedad de la anorexia (Cangiano *et al.*, 1996). Parece ser que los AACR pueden competir con el triptófano en su transporte a través de la barrera hematoencefálica, impidiendo así su acción anorexigénica en el sistema central.

La glutamina es uno de los substratos más utilizados por el tumor, el cual consigue deplecionar al huésped de este aminoácido con las correspondientes consecuencias negativas. Se ha utilizado, por ello, la suplementación con glutamina en la nutrición parenteral, y se han encontrado efectos beneficiosos en pacientes con trasplante de médula (Ziegler *et al.*, 1992). Aunque se ha argumentado en contra de este tratamiento su potencialidad para activar el crecimiento del tumor, se ha comprobado en modelos experimentales de tumor que potencia la actividad antitumoral de algunos agentes, al aumentar el número de células en fase S del ciclo celular, la fase de mayor susceptibilidad a la quimioterapia.

Por otra parte, durante los estados de crecimiento tumoral, la incrementada producción de lactato y la incrementada degradación de cisteína a sulfato y protones conducen a una depleción del glutatión intracelular. Se ha argumentado, pues, que

una posible estrategia para contrarrestar los estados catabólicos sería incrementar disponibilidad de cisteína, por medio de la suplementación de N-acetilcisteína. Esta teoría se ha visto reforzada por estudios preliminares en pacientes de SIDA (Van Buren *et al.*, 1990).

4.2.3.5. SULFATO DE HIDRACINA

Este compuesto es un inhibidor de la gluconeogénesis a partir de lactato y aminoácidos, por lo que en teoría serviría para contrarrestar el aumento en la gluconeogénesis y la actividad del ciclo de Cori observados en la caquexia. Los primeros ensayos en pacientes con tumor han descrito una mejora de las alteraciones del metabolismo de los carbohidratos (Chlebowski *et al.*, 1990) y una reducción del flujo de aminoácidos (Tayek *et al.*, 1987).

4.2.3.6. INHIBIDORES DE LAS PROSTAGLANDINAS Y LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

Debido a sus efectos sobre el crecimiento celular, se ha intentado inhibir el crecimiento tumoral, y consecuentemente reducir la caquexia asociada, por medio del control de la interconversión de diferentes tipos de prostaglandinas. Los estudios con inhibidores de las ciclooxigenasas han ofrecido resultados contradictorios, y aunque se observa una disminución del crecimiento del tumor, la reducción de la anorexia o de la pérdida de peso no está tan clara (Homem-De-Bittencourt, 1989; McCarthy y Daun, 1993). Hussey y Tisdale (2000), utilizando meloxicam (un inhibidor de COX-2), han revertido la caquexia en ratones portadores de tumor, posiblemente mediante un efecto directo sobre la degradación proteica (Hussey y Tisdale. 2000).

La inhibición de la producción de óxido nítrico, bloqueando la sintasa del óxido nítrico (NOS), resulta en una reducción del desgaste muscular en un modelo de caquexia; este efecto se puede observar al usar tanto N-nitro-L-arginina (un inhibidor de la NOS) como antioxidantes (Buck y Chojkier. 1996; Cahlin *et al.*, 2000).

4.2.3.7. INHIBIDORES DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ACE)

En pacientes con fallo cardíaco crónico, la administración de enalapril (un inhibidor de ACE) reduce la pérdida de peso asociada a esta patología (Anker *et al.*, 2003). Estudios preliminares llevados a cabo por Adigun y Ajavi (2001) han demostrado que el uso de estos inhibidores resulta en un aumento del tejido adiposo subcutáneo y la masa muscular, con una elevación de los niveles de albúmina y hematocrito (Adigun y Ajavi. 2001). El captopril, otro inhibidor de ACE, es capaz de disminuir la producción de TNF- α por las células mononucleares, lo que podría explicar el efecto beneficioso de estos inhibidores en la caquexia cardíaca (Zhao y Xie. 2001).

4.2.3.8. 5'DESOXI-5-FLUORIDINA

El tratamiento de ratones portadores de tumor con este agente citostático produjo una mejora en las alteraciones metabólicas asociadas en la caquexia (Tanaka *et al.*, 1990), y algunos autores postulan que su efecto anticaquético es independiente de su acción antiproliferativa (Eda *et al.*, 1991). Es éste, por tanto, un candidato interesante en la terapia anticaquética.

4.2.3.9. INHIBIDORES DEL PROTEASOMA

El proteasoma es una pieza clave en la degradación proteica por el sistema proteolítico dependiente de ATP y ubiquitina. La lactacistina y β -lactona son dos péptidos con la capacidad de inhibir en un 90% la actividad del proteasoma en células en cultivo, por lo que han sido propuestos como posibles fármacos anticaquécticos (Lee y Goldberg. 1998). Lamentablemente, su toxicidad y su falta de especificidad *in vivo* los hacen muy difíciles de usar en terapia (Von Heahling *et al.*, 2002).

4.2.3.10. ESTRATEGIAS BASADAS EN FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Los factores de transcripción han surgido en los últimos años como una diana importante en el desarrollo de estrategias y terapias para contrarrestar los efectos moleculares de algunos de los mediadores clave en el desarrollo de la caquexia (revisado por Mitch y Price, 2001). Kawamura *et al.* (1999) han logrado revertir la caquexia usando un oligonucleótido antisentido con la secuencia consenso para el factor NF- κ B en un modelo de ratón (Kawamura *et al.*, 1999). Sin embargo, la curcumina (un inhibidor natural de NF- κ B), no logra revertir la caquexia en el modelo de hepatoma ascítico AH-130 de rata, aunque sí tiene un claro efecto antitumoral (Busquets *et al.*, 2001).