

**ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE
CAQUEXIA CANCEROSA: EFECTOS DE
LOS POLIFENOLES CURCUMINA Y
RESVERATROL**

Antonio Penedo Vázquez

TESIS DOCTORAL UPF / 2021

DIRECTORA DE TESIS:

Dr. Esther Barreiro Portela

Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud



“Si supiese qué es lo que estoy haciendo, no lo llamaría investigación, ¿verdad?”

Albert Einstein

Agradecimientos

A Esther Barreiro por el esfuerzo y guía.

A mi familia y amigos por el gran apoyo durante todo el proceso.

A mis compañeros de laboratorio por su colaboración esencial.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----------|
| ABSTRACT | 10 |
| RESUMEN | 12 |
| PREFACIO | 14 |
| ABREVIATURAS | 17 |
| INTRODUCCIÓN | 19 |
| 1.1 Estructura y organización del músculoesquelético | 19 |
| 1.2. Tipos musculares | 24 |
| 1.2.1. Músculos de las extremidades | 24 |
| 1.2.1.1. Gastrocnemio | 25 |
| 1.2.1.2. Sóleo | 25 |
| 1.3 Composición fibrilar de los músculos | 26 |
| 2. Caquexia muscular | 30 |
| 2.1 Condiciones asociadas a caquexia y desgastemuscular | 33 |
| 2.1.1 Caquexia cancerosa | 33 |
| 3. Mecanismos moleculares implicados en la caquexia cancerosa ... | 34 |
| 3.1 Estrés oxidativo y nitrosativo | 34 |
| 3.2 Inflamación | 37 |
| 3.2.1 Citoquinas inflamatorias | 38 |
| 3.3 Regulación epigenética | 40 |
| 3.4.2 Vía IGF1-Akt-mTOR-FoxO | 44 |
| 3.4.2 Vía NF-kB | 45 |
| 3.4.3 Sistemas proteolíticos | 47 |
| 3.4.3.1 Sistema Ubiquitina-proteasoma | 47 |
| 4. Enfoques terapéuticos | 49 |
| 4.1 Curcumina | 50 |
| 4.2 Resveratrol | 51 |

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| HIPÓTESIS GENERAL..... | 54 |
| OBJETIVOS..... | 55 |
| MÉTODOS..... | 56 |
| Estudio #1 | 58 |
| RESULTADOS DESTACABLES:..... | 78 |
| DISCUSIÓN | 80 |
| CONCLUSIÓN | 90 |
| PRESPECTIVAS FUTURAS..... | 92 |
| BIBLIOGRAFÍA | 94 |

ABSTRACT

Muscle atrophy and cancer cachexia are two comorbidities presented in chronic diseases, such as respiratory diseases, cancer or muscle disuse. This also increases the mortality of the patients independently of the disease prognosis that caused the cachexia. Treatment with polyphenolic compounds such as curcumin or resveratrol may attenuate muscle mass loss. In this thesis, a model of cancer induced cachectic mice (LP07 adenocarcinoma lung cancer cells inoculation) were treated with either curcumin or resveratrol. This two treatments induced beneficial effects (total body and muscle weights, structure, apoptosis, proteolysis and signaling pathways) in gastrocnemius and soleus muscles. The activation of Sirt-1 by curcumin and resveratrol respectively induce a protective effect to the cachectic muscles of these mice, by inhibiting proteolytic and NF-kB and FoxO pathways. These results show the possible treatment of cancer cachexia with these polyphenols.

Keywords: Cancer-induced cachexia, curcumin, resveratrol, muscle function and structure, sirtuin-1, proteolysis, atrophy signaling pathways.

RESUMEN

La atrofia muscular y la caquexia cancerosa son dos manifestaciones frecuentes en las enfermedades crónicas, como las respiratorias y el cáncer. La afectación muscular aumenta en gran medida la mortalidad de los pacientes con independencia del pronóstico de la enfermedad de base. El tratamiento de la caquexia con compuestos polifenólicos puede reducir la pérdida de masa muscular y mejorar las condiciones de estos pacientes. En la presente tesis, se empleó un modelo de ratones con caquexia cancerosa (inoculación de células tumorales LP07, cáncer de pulmón) que fueron tratados con curcumina y resveratrol respectivamente. Ambos tratamientos indujeron efectos beneficiosos (peso corporal y de los músculos, estructura muscular, proteólisis y apoptosis) en gastrocnemio y sóleo de los grupos de ratones caquécticos tratados. Estos efectos beneficiosos se deben a la activación de Sirtuin-1, inducida por la administración de curcumina y de resveratrol. Esto indujo un efecto protector sobre los músculos de los ratones con caquexia cancerosa mediante la inhibición de la proteólisis y de las vías de señalización de atrofia como NF- κ B y FoxO. Estos resultados ilustran sobre la posible aplicabilidad clínica de los polifenoles en pacientes con caquexia cancerosa en futuros estudios.

Palabras clave: caquexia cancerosa, curcumina, resveratrol, estructura y función muscular, sirtuina-1, proteólisis, atrofia muscular, vías de señalización.

PREFACIO

Los experimentos correspondientes al desarrollo de esta tesis actual se han llevado a cabo en el Grupo de investigación de caquexia y desgaste muscular en enfermedades respiratorias crónicas y cáncer de pulmón, del Instituto de investigaciones médicas del Hospital del Mar (IMIM)-Hospital del Mar, Barcelona, España.

1.Comunicaciones

Parte de los resultados obtenidos en la tesis fueron presentados en forma de resumen (en forma de poster o de comunicación oral) en conferencias nacionales.

1. Antonio Penedo, María Guitart, Laura Mañas, Esther Barreiro. Therapeutic approaches against lung cancer-induced cachexia in a mouse model: effects of treatment with curcumin and resveratrol. *XIII Jornadas de Formación en CIBERES*. Versión online, noviembre 2020.

2. A Penedo, M Guitart, L Mañas, E Barreiro. Therapeutic approaches against lung cancer-induced cachexia in a mouse model: Effects of treatment with curcumin and resveratrol. *Arch Bronconeumol* 2020; 56 (Supl Congr 2): 28-29

3. **A Penedo**, L Mañas, M Guitart, Esther Barreiro. Muscle regenerative potential in lung cancer-induced cachexia during immobilization in mice: Insights on activation of satellite cells. *Tercera Jornada de Recerca Bàsica en Pneumologia, XXXVII Diada Pneumològica*, Terrassa, Barcelona, Abril 2019.

2.Publicaciones

Estudio #1

Curcumin and Resveratrol Improve Muscle Function and Structure through Attenuation of Proteolytic Markers in Experimental Cancer-Induced Cachexia.**Penedo-Vázquez A**, Duran X, Mateu J, López-Postigo A, Barreiro E.

Molecules. 2021 Aug 13;26(16):4904. doi: 10.3390/molecules26164904. PMID: 34443492; PMCID: PMC8402048.

Estudio #2

Prolonged immobilization exacerbates the loss of muscle mass and function induced by cancer-associated cachexia through enhanced proteolysis in mice.

Mañas-García L, **Penedo-Vazquez A**, López-Postigo A, Deschrevel J, Durán X, Barreiro E.

Int J Mol Sci. 2020 Oct 31;21(21):8167.

IF: 4.556, Q1 in biochemistry and molecular biology

3. Financiación

Los experimentos de la tesis han sido financiados por el *Instituto de Salud Carlos-III*, números de subvención de contrato, CIBERES, FIS 18/00075 (FEDER), Ministerio Español de Ciencia e Innovación, Sociedad Española de Neumología Cirugía y Torácica (SEPAR) 2020.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

Akt: proteína quinasa B

AMP: adenosín monofosfato

AMPK: quinasa activada por AMP

Ang II: Factor de la angiotensina II

ARN: ácido desoxirribonucleico

ATP: Adenosin trifosfato

Atrogin-1: gen de atrofia muscular f box

CRH: hormona liberadora de corticotropina

CRH: hormona liberadora de corticotropina

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FoxO: Factor de transcripción fork-head box

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HATs: histona acetiltransferasas

HDACs: histona deacetilasa

HNE: 4-hidroxi-2-nonena

IFN- γ : interferón gamma

IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1

IL: interleukina

JAK: quinasa Janus

MD: malondialdehído

mnSOD: manganeso superóxido dismutasa

mTORC1: complejo 1 de rampamicina

MuRF-1: proteína-1 del dedo anular del músculo

MyHC: Cadena pesada de la miosina

NF-κB: Factor nuclear kappa B

NO: óxido nítrico

NO₂: dióxido de nitrógeno

O₂⁻: anión superóxido

O₂: Oxígeno

OH: radical hidroxilo

ONOO⁻: peroxinitrilo

RNS: Especies reactivas al nitrógeno

ROS: Especies reactivas al oxígeno

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

Sirt-1: sirtuina 1

STAT: transductoras de señales y activadoras de la transcripción

TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa

UPS: Sistema ubiquitina-proteasoma

INTRODUCCIÓN

1. Músculo esquelético

Existen tres tipos de tejido muscular: el cardíaco, el liso y el esquelético. El músculo esquelético es el más abundante en el cuerpo y se caracteriza por actuar de forma voluntaria sobre distintas funciones del cuerpo (1). Supone el 40 % del peso corporal, que incluye el 50-75 % de todas las proteínas presentes en el cuerpo. Este tejido es un tejido especializado con la capacidad de contraerse y relajarse de forma voluntaria en respuesta a los mensajes (impulsos nerviosos) que provienen del sistema nervioso. Su función principal es la de producir movimiento y generar fuerza para las distintas acciones diarias a la vez se encarga de mantener la postura.

Destaca por su plasticidad la cual le permite desarrollarse o atrofiarse en función de distintos factores ambientales como el ejercicio, el envejecimiento, el crecimiento o el desuso muscular (2). Además, supone una reserva de nutrientes básicos como carbohidratos y aminoácidos, que se emplearán para preservar los niveles de glucosa en sangre o el déficit de aminoácidos durante periodos de inanición y falta de nutrientes (3,4).

1.1 Estructura y organización del músculo esquelético

El tejido muscular posee una estructura y una organización muy bien descrita y que se compone en su mayoría de células musculares también llamadas fibras musculares o miofibras,

que, junto con las fibras nerviosas, los vasos sanguíneos y el tejido conectivo formarán los músculos del cuerpo (1). Las fibras musculares son la unidad principal del músculo esquelético y se encuentran rodeadas y separadas entre si por una capa de tejido conectivo llamada endomisio (**Fig. 1**) (1,3). Los músculos esqueléticos están compuestos por agrupaciones de estas fibras musculares llamadas fascículos, donde estas fibras o células musculares están organizadas con su eje longitudinal en paralelo. Los fascículos están formados por al menos diez fibras musculares organizadas y rodeadas por otra capa de tejido conectivo, el perimisio, que formará y mantendrá la unidad de estas agrupaciones de fibras musculares. Finalmente, el músculo esquelético se encuentra rodeado por una tercera capa de tejido conectivo, el epimisio, la capa más externa, que se encarga de la conexión entre el músculo y el tendón y de la inserción de este en el hueso, permitiendo así el movimiento independiente de cada músculo (**Fig. 1**) (1,4).

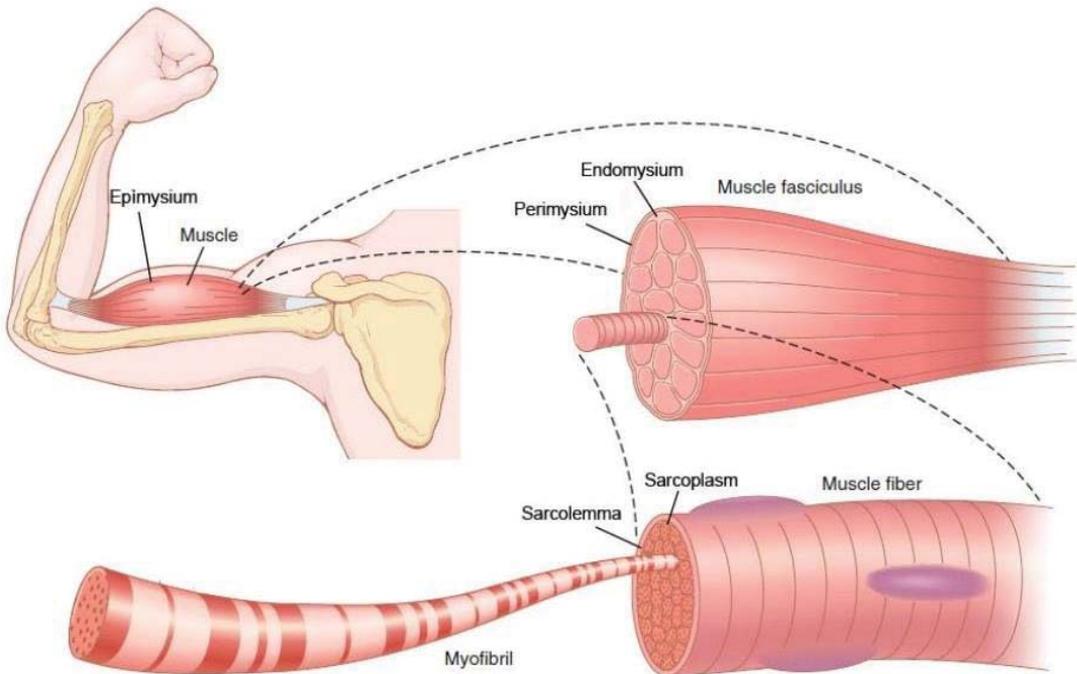


Figura 1. Organización del músculo esquelético y sus coberturas conectivas. Los músculos esqueléticos están formados por fibras (células) musculares, que forman fascículos y se encuentran rodeadas de tres capas de tejido conectivo. En el sarcoplasma están presentes los elementos contráctiles de las miofibrillas (*Adapted from Hall Je 2015 (5)*)

Por su parte cada fibra muscular se encuentra rodeada de una membrana celular llamada sarcolemma, y posee un citoplasma llamado sarcoplasma. En este sarcoplasma se encuentran múltiples núcleos para cada fibra muscular, mitocondrias, y miofibrillas, que son la principal estructura intracelular en músculos estriados. Estas miofibrillas están formadas por distintos tipos de proteínas: Contráctiles como actina y miosina; reguladoras como troponina y tropomiosina; y proteínas accesorias como tinina y nebulina (4). Las moléculas

de actina se encuentran agrupadas en racimos formando así los filamentos delgados, mientras que las de miosina se encuentran unidas juntas formando los filamentos gruesos (2,4).

La disposición de estos filamentos delgados y gruesos forman un patrón repetitivo de bandas claras y oscuras, que es una de las principales características del músculo esquelético (1). Cada unidad de este patrón se conoce como sarcómero, que es la unidad funcional de las fibras musculares. Los sarcómeros se sitúan entre dos regiones proteicas densas conocidas como discos Z, el área entre estos discos alterna bandas claras y oscuras, conocidas como bandas I y A respectivamente. Las bandas A están compuestas de filamentos gruesos y las I exclusivamente de filamentos finos. La actina y la miosina se encuentran superpuestas en las regiones externas de las bandas A mientras que, en la región central, conocida como región H sólo contienen miosina. En el centro de la región H se encuentra la línea M, donde se unen los filamentos gruesos (**Fig. 2A**) (6,7).

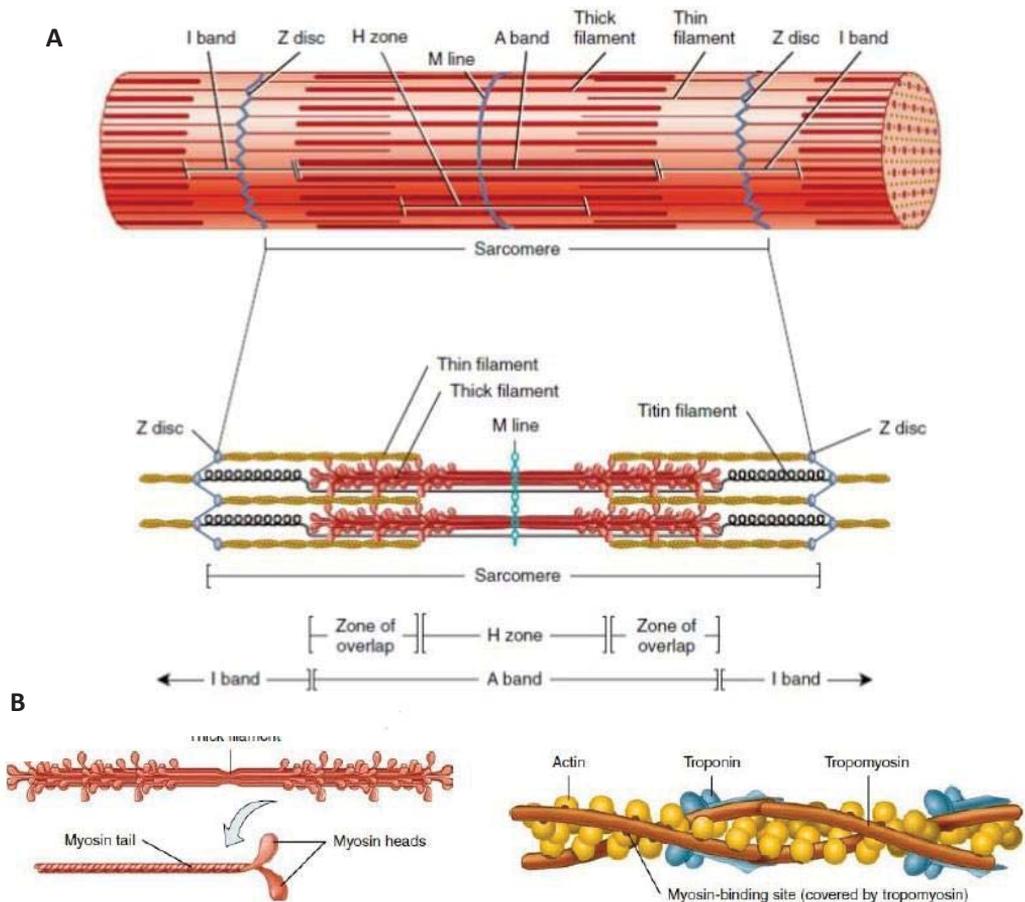


Figura 2. Disposición de los filamentos en el músculo esquelético. A)

Las fibras musculares están formadas por dos tipos de miofilamentos, los finos y los gruesos, que conjuntamente forman el sarcómero. **B)** Estructura de los filamentos finos y gruesos. Los filamentos gruesos tienen colas de miosina que forman su eje y sus uniones. Los filamentos finos están formados por actina y proteínas reguladoras como troponina y tropomiosina (Adapted from Tortora GJ et al. 2012 (1))

La principal diferencia entre filamentos finos y gruesos se encuentra en su composición y en su actuación: Los componentes principales de los filamentos gruesos son los miosina, proteínas C de unión a miosina, tinina y oscurina; por su parte los filamentos finos se componen principalmente de

actina, troponina, tropomiosina y nebulina (6,7). En cuanto a su actuación, los filamentos gruesos y finos se diferencian por sus proteínas contráctiles principales, la actina y la miosina. La miosina actúa como motor proteico transformando la energía química del adenosin-trifosfato (ATP) en energía mecánica en forma de movimiento y/o fuerza. El resto de las proteínas de estos filamentos también desempeñan funciones esenciales en el músculo esquelético, de forma que la troponina y la tropomiosina actúan regulando la unión entre la proteína C de unión a miosina y la actina para realizar la contracción muscular. Además, la tinina, la oscurina y la nebulina desempeñan un papel estructural proporcionando la elasticidad, alineamiento y estabilidad de las miofibras (**Fig. 2B**) (1,6,7).

1.2. Tipos musculares

1.2.1. Músculos de las extremidades

Los músculos de las extremidades son los músculos que van a realizar el proceso fisiológico del movimiento y apoyo del cuerpo, se caracterizan porque su movimiento es totalmente voluntario. En humanos se dividen en músculos superiores e inferiores, mientras que en animales la terminología sería delanteros y traseros según la región en la que se encuentran en ambos casos. Los principales músculos de estudio difieren también entre humanos y animales: en humanos los principales músculos de estudio de contracción rápida son el cuádriceps y el tibial anterior, mientras que en modelos animales son el gastrocnemio y el tibial anterior; por su parte

el sóleo es el músculo de contracción lenta más empleado en ambas especies. En nuestro grupo, el gastrocnemio y el sóleo son dos músculos ampliamente estudiados en animales roedores (8–12).

1.2.1.1. Gastrocnemio

El gastrocnemio, popularmente conocido como gemelos, es el músculo más superficial de la parte posterior de la pierna y recibe popularmente este nombre, debido a que se compone de dos cabezas similares conocidas como medial y lateral. Está principalmente compuesto de fibras musculares de contracción rápida debido a las funciones que realiza: La flexión plantar del pie en la articulación del tobillo y la flexión de la pierna en la articulación de la rodilla. Debido a su composición fibrilar el gastrocnemio permite correr, saltar y otros movimientos rápidos de la pierna, además de contribuir a andar y a mantener la postura en menor grado (13–15).

1.2.1.2. Sóleo

El sóleo es un músculo ancho y pequeño ubicado en la pierna debajo del gastrocnemio. Se une al extremo proximal de la tibia y peroné y a ligamentos tendinosos. Junto al gastrocnemio ayuda en la flexión plantar del pie, pero su importancia se debe a que es vital para funciones esenciales como caminar, correr y mantenimiento de la postura, para los cuales requiere su composición rica en fibras de activación lenta (13).

1.3 Composición fibrilar de los músculos

Los músculos del cuerpo destacan por su gran heterogeneidad y por su característica más importante, su plasticidad, las cuales le permite a un mismo músculo contribuir en una gran variedad de capacidades funcionales (15–17).

La plasticidad de los músculos les confiere la habilidad de adaptarse a los cambios de requerimientos funcionales que se pueden dar a lo largo de la vida, cuando estos ocurren de forma prolongada. Esto ocurre mediante variaciones de las propiedades funcionales y estructurales de estos músculos. Estos cambios pueden ser de transición de un tipo fibrilar a otro, es decir, pasar de una composición de fibras mayoritariamente de actuación lenta a una con mayor proporción de fibras rápidas o viceversa, pero principalmente se tratan de cambios en el tamaño de las fibras musculares (16,17). Esta capacidad adaptativa debida a la plasticidad de los músculos puede darse en respuesta al envejecimiento del cuerpo (18), a enfermedades crónicas (19–21), al ejercicio o entrenamiento (22), y a factores ambientales.

Como origen de esta heterogeneidad, se encuentra la variedad de fibras musculares existentes, lo que permite a los individuos adaptarse a las diferentes condiciones fisiológicas del día a día (23). Las características y la función de la fibra muscular estarán determinadas a su vez por la expresión de las distintas isoformas de la cadena pesada de la miosina (MyHC). Esto confiere a las fibras una gran variedad de perfiles

y propiedades metabólicas (2,3,23).

Debido a esta gran variabilidad existen numerosos criterios de clasificación de fibras musculares, siendo los principales y más usados: 1) Fatigabilidad, que se relacionara con el contenido mitocondrial de la fibra (fatigable contra resistentes a la fatiga), 2) color (blancas y rojas), 3) por la predominancia de un mecanismo metabólico (glucolíticas contra oxidativas), 4) por sus propiedades contráctiles, 5) por el metabolismo del calcio en el retículo endoplasmático (rápidas contra lentas), 7) por la isoforma proteica predominante (24,25). Con sus diferentes clasificaciones la más usada en el ámbito científico es la que destaca la isoforma proteica expresada en la fibra, ya que se emplea como marcador molecular de los distintos tipos fibrilares. Bajo estos criterios las fibras musculares se dividen en las cuatro isoformas principales de la miosina en mamíferos, llamadas tipo I, tipo IIa, tipo IIx y por último tipo IIb, a pesar de que puedan coexistir con otras isoformas de miosina de manera temporal, como son la embrionica, la neonatal o la extraocular (3,15,26). A pesar de ser las principales isoformas, no todos los mamíferos presentan todas las isoformas: los roedores poseen las cuatro isoformas en sus músculos, pero sin embargo, los músculos humanos carecen de la isoforma IIb (15). Las características de las cuatro isoformas se diferencian a varios niveles entre los que destacamos el nivel metabólico, el nivel bioquímico, el fisiológico y por último el morfológico como se puede comprobar en la tabla a continuación:

| | Tipo I | Tipo IIa | Tipo IIx | Tipo IIb |
|--------------------------|---------------------|--|------------------------|------------------------|
| Especies | Todos los mamíferos | Todos los mamíferos | Todos los mamíferos | Sólo roedores |
| Velocidad de contracción | Lenta | Rápida | Muy rápida | Muy rápida |
| Resistencia al uso | Resistente a fatiga | Poco resistente a la fatiga | Poco fatigable | Fatigable |
| Metabolismo | Aeróbico oxidativo | Aeróbico-anaeróbico Oxidativo-glucolítico | Anaeróbico glucolítico | Anaeróbico glucolítico |
| Actividad ATPasa | Baja | Alta | Muy alta | Muy alta |

Las fibras tipo I son fibras de contracción lenta y con metabolismo aeróbico exclusivamente. Se encuentran rodeadas por gran cantidad de vasos sanguíneos y poseen numerosas mitocondrias que generaran continuamente ATP de forma aeróbica, lo que le confiere a este tipo fibrilar una importante resistencia contra la fatiga. A su vez son generalmente las fibras más pequeñas en diámetro y se caracterizan por tener color rojizo debido a su gran contenido en mioglobinas (5,16,24,26). En segundo lugar, las fibras tipo

Ila son fibras de contracción rápida con metabolismo tanto oxidativo como glucolítico. Esto les permite generar ATP a través de la respiración aeróbica y a través de la glucólisis anaeróbica. Son semejantes las fibras de tipo I, ya que poseen numerosos vasos sanguíneos y mitocondrias como ellas, pero debido a la contracción rápida de las fibras tipo Ila, se produce en ellas una mayor hidrólisis de ATP, lo que les confiere una menor resistencia a la fatiga (15,16,24,26). Por su parte, las fibras tipo IIX y IIb son de contracción rápida y con metabolismo glucolítico exclusivamente. Este metabolismo glucolítico genera una hidrolización del ATP más rápida en el músculo, y por lo tanto causa que este se fatigue con mayor facilidad (15,16,24,26). De esta forma cabe destacar, que a pesar de que la mayoría de las fibras musculares solo expresan una isoforma de miosina, existen fibras musculares que expresan varias isoformas y son conocidas como fibras híbridas (21).

La heterogeneidad muscular no solo ocurre entre los distintos músculos de un mismo individuo, sino que también se da entre los músculos equivalentes entre especies y géneros (15,23,27). En roedores, por ejemplo, el diafragma, músculo respiratorio de función continua, posee un 10% de fibras de tipo I y un 90% de fibras tipo II, mientras que en humanos las proporciones rondan el 55% de fibras tipo I y 45% de fibras tipo II (27). Por su parte, los músculos de las extremidades, están formados principalmente por fibras tipo II, siendo el más representativo en humanos el vasto lateral, que contiene alrededor de 30% fibras tipo I y 70% fibras tipo II, y el gastrocnemio en roedores con una proporción aproximada al

13% de fibras tipo I y 87% de fibras tipo II (14,15).

De esta forma el ejercicio y una buena alimentación aumentaría el área de las fibras musculares y con esta la masa muscular y el porcentaje de fibras tipo I, confiriendo al músculo mayor fuerza y resistencia para realizar funciones que requieran más energía y potencia muscular. Por otra parte, el desuso, las enfermedades crónicas o una mala alimentación provocaría el efecto contrario sobre los músculos, haciendo que estos pierdan masa muscular, por la reducción del área de las fibras musculares, y se produciría una transición de fibras tipo I a fibras tipo II, lo que provocaría que el músculo tenga menor fuerza y que sea más fatigable (5,14,16,22,28).

2. Caquexia muscular

Para hablar de la caquexia muscular debemos hablar de la disfunción y pérdida de masa muscular, ya que son las características principales asociadas a la caquexia. Esta disfunción muscular se define como la reducción en fuerza y resistencia que puede sufrir el músculo esquelético (29,30). Estas son las dos características principales del músculo esquelético: siendo la fuerza la capacidad del músculo de realizar un esfuerzo, mayor o menor, a través de la contracción muscular y que está relacionada directamente con la masa del músculo, es decir a mayor masa, mayor fuerza y viceversa; mientras que por su parte la resistencia es la capacidad que tiene el músculo de mantener esa fuerza y estará relacionada con la composición fibrilar de cada músculo (30).

De esta forma, la caquexia se define por consenso como el síndrome multifactorial caracterizado por la pérdida continua de músculo esquelético, acompañado o no de pérdida de masa adiposa, que no puede ser revertido con una nutrición convencional y deriva en un impedimento funcional progresivo asociado a una enfermedad crónica (31). Se caracteriza por un equilibrio proteico y energético negativo, con mayor degradación que síntesis. Además, la caquexia produce un gran aumento en los niveles de inflamación, estrés oxidativo y nitrosativo y en los niveles de marcadores de proteólisis. Por ello la caquexia es una complicación en muchas enfermedades severas como el cáncer, sepsis, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), fallos cardíacos o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (32–35). La pérdida de masa muscular no solo causa una reducción de la fuerza del músculo, sino que además causa un importante deterioro de la calidad de vida del paciente, aumentando en gran medida el riesgo de hospitalización. Con todo ello este desgaste muscular también provoca una mala prognosis del paciente acompañada de una reducción de tolerancia al tratamiento [36,37].

Debido a las distintas fases de la caquexia, a sus distintas causas y a la distinta forma de afectar a cada paciente, se realizó un consenso internacional para poder diagnosticar si un paciente padece caquexia, que determinó la presencia de caquexia si se daba en el paciente al menos una de las siguientes condiciones; 1) Pérdida de peso mayor al 5% en los últimos 6 meses en ausencia de ayuno; o 2) Índice de masa corporal menor a 20 y cualquier pérdida de peso corporal

mayor del 2%; o 3) Índice apendicular del musculo esquelético compatible con sarcopenia y cualquier grado de pérdida de peso mayor del 2% (31). Con este consenso se permitió el diagnóstico de la caquexia y su posterior clasificación en tres estados en los que se dividió el avance de la patología, a pesar de que no todos los pacientes sufran todas las etapas (**Fig. 3**) (31,36).

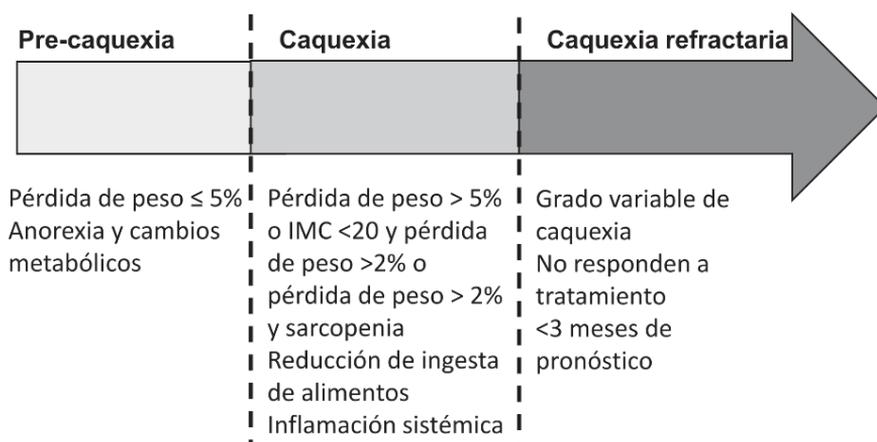


Figura 3. Fases de la caquexia. La caquexia se clasifica por convenio en tres estadios clínicos: pre-caquexia, caquexia y caquexia refractaria. La caquexia refractaria es la más crítica, y generalmente la expectativa de vida no es mayor a tres meses (adaptado de Fearon k et al 2011 (31)).

La importancia de la caquexia se debe a que está presente en las últimas etapas en casi la totalidad de enfermedades crónicas, afectando hasta al 42% de los pacientes con fallos cardíacos, al 30% de los pacientes que padecen EPOC, o incluso llegando a afectar al 80% de los pacientes con cáncer de páncreas, o al 60% en los pacientes de cáncer de pulmón. En segundo lugar, su importancia se debe a que estos

porcentajes de prevalencia están relacionados directamente con la mortalidad de estos pacientes caquéticos, que además verán su calidad de vida reducida en gran manera, a causa de la caquexia, que además reducirá la efectividad del tratamiento de la enfermedad causante de dicha caquexia (38).

2.1 Condiciones asociadas a caquexia y desgaste muscular

2.1.1 Caquexia cancerosa

Como se mencionó anteriormente, la caquexia está asociada a una gran variedad de enfermedades crónicas como EPOC, SIDA o diabetes, que afecta a estos pacientes de distinta forma y con distinta prevalencia. Con estos dos factores en cuenta, cabe destacar la caquexia cancerosa o caquexia causada por cáncer ya que afecta a más del 50% de los pacientes de cáncer. Más de la mitad de los pacientes con cáncer de pulmón, además de otros pacientes con cánceres crónicos, sufren una importante pérdida muscular, con una gran bajada de peso al desarrollar caquexia (31,39,40).

Además la caquexia no afecta únicamente al músculo de forma directa, sino que además los pacientes que sufren caquexia cancerosa experimentan numerosas complicaciones que reducen enormemente su calidad de vida y limitan su supervivencia, debido a que empeoran la respuesta a la quimioterapia (31,40). El efecto de la caquexia cancerosa dependerá completamente del tipo de cáncer que padece el

paciente, lo que hace variar la prevalencia y la gravedad de la caquexia (41).

En nuestro grupo se estudió un modelo animal sinérgico que desarrollase caquexia cancerosa. El modelo animal se basó en una inyección subcutánea de células tumorales, que provoca el crecimiento rápido del tumor a los 15 días de la inyección, con el consecuente desarrollo de caquexia cancerosa (42). Numerosos estudios de nuestro grupo han empleado células de adenocarcinoma de pulmón P07 para desarrollar la caquexia cancerosa en el modelo animal, debido al potencial carcinogénico de estas células (8,43–45). Se demostró, con este modelo el desgaste muscular producido por la caquexia cancerosa, que se observó en la reducción de las áreas de sección transversal de las fibras musculares en ratones, además de una proteólisis aumentada debida al aumento en la expresión del sistema ubiquitina proteasoma (UPS), causada por las desregulación de sus principales factores nucleares, los factores nucleares kappa B (NF-KB) y la familia de factores de transcripción Fox (Forkhead box) (8,43–47).

3. Mecanismos moleculares implicados en la caquexia cancerosa

3.1 Estrés oxidativo y nitrosativo

El estrés oxidativo y nitrosativo ocurre normalmente en músculos esqueléticos que están sufriendo atrofia, y se les considera importantes reguladores del proceso de síntesis y

degradación de proteínas. El estrés oxidativo y nitrosativo se produce debido al aumento en la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) y/o especies reactivas al nitrógeno (RNS) en las mitocondrias. Tienen un importante papel en la modulación de las rutas de síntesis y degradación de proteínas, resultando en un importante aumento de la atrofia del músculo esquelético. Estas especies reactivas se definen como radicales libres que en este caso se asocian con oxígeno o sus equivalentes, teniendo gran reactividad con otras moléculas (48–52). En las especies ROS destacamos la molécula de oxígeno (O_2), anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH), y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Y en las especies RNS destacan EL peroxinitrito ($ONOO^-$), el dióxido de nitrógeno (NO_2) y el óxido nítrico (NO) (48,49).

En condiciones normales, es necesario la presencia de cierto nivel de estrés oxidativo y nitrosativo, ya que, a niveles basales, se encargan de regular varios procesos fisiológicos como el mantenimiento del tono vascular o la defensa ante agentes infecciosos. En estas condiciones normales hay un perfecto equilibrio entre la formación de ROS y RNS y la formación de sistemas antioxidantes. Este equilibrio, durante enfermedades o inflamación crónica va a verse alterado, por un aumento de las especies reactivas, por pérdida de antioxidantes de defensa o por ambas (48,51).

Las enfermedades crónicas traen consigo normalmente un proceso inflamatorio crónico que acompaña a la enfermedad. Esta inflamación crónica es una de las principales causas del aumento de especies ROS y RNS debido a los mediadores

inflamatorios que se liberan durante este proceso, destacando los elevados niveles de interleuquina-6, del factor de necrosis tumoral alfa (TNF), de la angiotensina II (Ang II) y de la proteína C-reactiva (53). Entre estos factores, TNF y Ang II desempeñan un papel principal en el aumento de la producción de ROS en las fibras de los músculos esqueléticos. Se determinó que la producción intracelular de ROS se inicia por acción de TNF al activar el receptor TNF-1 del sarcolema, lo cual activa una cascada de señalización que finaliza con el aumento de la producción de superóxido (O_2^-) en las mitocondrias (53,54). Por su parte Ang II aumenta sus niveles en el plasma por acción de diferentes enfermedades crónicas y actúa aumentando la caquexia y la producción de ROS por medio del aumento de los niveles de citoquinas circulantes incluyendo TNF, que incrementará los niveles de ROS, por el mecanismo comentado anteriormente. Y además Ang II se unirá a receptores de angiotensina I en el sarcolema, activando así la oxidasa NAD(P)H que generará radicales de superóxido (O_2^-). Por su parte la producción de RNS se da por la presencia de altos niveles de citoquinas circulantes como TNF (55).

El efecto negativo de este aumento, en los niveles de especies reactivas a oxígeno y nitrógeno, se da usualmente por que causan daños en las estructuras celulares tales como membranas proteicas o lipídicas y daño en las cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN). La peroxidación de los lípidos, a causa de la presencia de ROS, contribuye al aumento del daño celular por la formación de productos de

oxidación como 4-hidroxi-2-noneno (HNE) y malondialdehído (MD), que son considerados a su vez marcadores de estrés oxidativo. Además de contribuir al aumento del daño celular, las especies ROS y RNS inhiben la síntesis proteica, ya que bloquean la fosforilación de la proteína quinasa B (Akt) lo que provoca la inactivación de la diana en mamíferos para el complejo 1 de rapamicin (mTORC1). De esta forma uno de los principales mecanismos de síntesis de proteínas en músculo, el sistema del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y la Akt queda inhibido por las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (48,49,51–56).

3.2 Inflamación

La inflamación es un mecanismo defensivo de los seres vivos que protege el organismo contra alteraciones en su homeostasis, que pueden darse por diferentes estímulos biológicos, físicos o químicos, y también protege frente a células dañadas, infectas o neoplásicas. Para ello, la respuesta inflamatoria posee un mecanismo de autorregulación del equilibrio entre agentes inflamatorios y antiinflamatorios, pero este mecanismo cuando la inflamación ocurre de forma persistente puede fallar y darse un proceso de inflamación crónica. De esta forma, la inflamación crónica provocaría un aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias circulantes, que como se explicó anteriormente, son capaces de afectar a diferentes vías de expresión y señalización relacionadas con caquexia, causando así daños en la estructura muscular y alterando la contracción muscular (29,48).

3.2.1 Citoquinas inflamatorias

El inicio y la progresión del cáncer en un paciente está estrechamente relacionado con las citoquinas presentes en el cuerpo, siendo consideradas como las principales determinantes de la respuesta al tratamiento, de la progresión de la caquexia, de la calidad de vida del paciente y de su supervivencia. Estas citoquinas ejercen su efecto sobre las células al unirse a receptores específicos en la membrana de la célula diana, de forma que inducen proliferación, activación, diferenciación o muerte celular. Las citoquinas no son reguladoras exclusivas de la inflamación, sino que se encuentran formando una red interactiva de comunicación celular (57),(58)

En la caquexia cancerosa se distingue dos tipos de citoquinas: las proinflamatorias y las antiinflamatorias. Las citoquinas proinflamatorias también son conocidas como citoquinas procaquecticas siendo las principales IL-6, IL-1, TNF- α y el interferón gamma (IFN)- $\gamma\gamma$ (58). Como se comentó anteriormente, el estrés oxidativo y nitrosativo y la inflamación, están estrechamente relacionados como desencadenantes del desgaste muscular, ya que la inflamación puede alterar la expresión de ROS y RNS, y el estrés oxidativo puede activar la expresión de citoquinas inflamatorias (54,55).

Entre las citoquinas proinflamatorias destacamos TNF- α , ya que se encuentra muy relacionada con la progresión de la caquexia cancerosa en el paciente (58). Actúa mediante varios mecanismos como el aumento que produce en los niveles de

la hormona liberadora de corticotropina (CRH) o la reducción en la toma de alimentos lo que lleva a la anorexia. Entre estos mecanismos también destacamos el efecto de TNF- α sobre la energía metabólica, ya que induce el aumento en su producción, que de igual forma aumenta la degradación de proteínas miofibrilares y causa la activación de rutas catabólicas por medio del sistema ubiquitina-proteasoma (59). TNF- α actúa sobre las rutas catabólicas por medio de la activación de la cascada de NF- κ B, que provoca el aumento en la expresión de muscle RING-finger protein-1 (MuRF-1), y con este la degradación proteica. Además de estimula las rutas catabólicas, TNF- α va a regular a su vez los procesos anabólicos reduciéndolos en gran medida por la inhibición que produce sobre la vía de señalización transduccional de Akt/mTOR (59–63).

IL-6, como se comentó anteriormente, es una de las citoquinas proinflamatorias más importantes junto a TNF- α , ya que se la ha relacionado con el aumento de mortalidad y se ha correlacionado con el ratio de supervivencia de los pacientes con cáncer (64,65). A pesar de ello, IL-6 también posee un efecto antiinflamatorio, ya que en relación al ejercicio, IL-6 adopta un papel inhibitorio sobre IL-1 y TNF- α y se le ha relacionado con el aumento en la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-1RA e IL-10 (66). En ausencia de ejercicio y presencia de infección o inflamación crónica IL-6 adopta su papel proinflamatorio induciendo la activación de la quinasa Janus (JAK) cuya función es activar las proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción

(STAT) desencadenando una importante degradación proteica. Además, IL-6 inhibe de forma indirecta la vía Akt/mTOR e induce NF- κ B y la quinasa activada por AMP (AMPK) (64,66–68).

3.3 Regulación epigenética

Las proteínas tienen un proceso complejo de síntesis desde la transcripción del ADN en ácido ribonucleico (ARN), seguido de la traducción del ARN en la cadena de aminoácidos que va a formar la proteína, hasta los numerosos plegamientos que van a sucederse en la cadena proteica, a razón de las distintas fuerzas de unión y enlaces, para formar la estructura terciaria, es decir la conformación en la que dicha proteína es funcional. Durante el proceso de formación de su estructura terciaria, estas proteínas se someten a diferentes modificaciones postraduccionales como fosforilación, ubiquitinación y acetilación, que van a determinar su estado de activación y su función. Este conjunto de modificaciones postraduccionales se les conoce como modificaciones o control epigenéticos, que se define como el proceso de regulación de la expresión genética por mecanismo heredados que no modifican la secuencia nucleotídica de ADN. De esta forma se regulan numerosos procesos como la adaptación muscular a los factores ambientales, a la inmovilización o desuso (69–71).

Una de las principales modificaciones epigenéticas en los músculos de las extremidades son las acetilaciones de histonas, a través de dos tipos de enzimas; las histonas acetiltransferasas (HATs) y las deacetilasas (HDACs). Las

primeras se encargan de añadir una molécula de acetilo y las segundas de quitarla. Se observó que durante enfermedades crónicas como el cáncer o EPOC, con desgaste muscular para el paciente, este proceso regulatorio se ve alterado y se produce un desequilibrio entre acetilación y desacetilación, produciéndose lo que se conoce como hiperacetilación de las proteínas, lo cual provoca que el mecanismo de control no realice su función normal sobre la regulación de la diferenciación muscular, el desarrollo muscular y la determinación del tipo fibrilar, que por lo tanto se verán alteradas contribuyendo al proceso de desgaste muscular y caquexia (72,73).

La acetilación está relacionada con la activación de factores de transcripción asociados con la atrofia muscular, como el factor nuclear (NF)-kB y el factor fork-head box (FoxO) (74–76). Los factores de transcripción FoxOs regulan la atrofia muscular por medio de su acción sobre las dos E3 ligasas del sistema ubiquitina-proteasoma: Atrogin-1 también conocido como gen de atrofia muscular F-box; y sobre muscle ring finger-1, más conocido como MuRF-1. De esta forma la hiperacetilación de esta familia de factores de transcripción supone el incremento de la expresión de estos genes de atrofia muscular y por lo tanto el aumento de la pérdida de masa muscular (75,77–80). Este proceso de hiperacetilación también puede ocurrir sobre los factores NF-kB, que resultaría en una mayor activación de las vías de atrofia muscular.

Ante esta hiperacetilación se requiere de la actuación de las anteriormente mencionadas deacetilasas (HDACs), como

HDAC3, HDAC6 o sirtuin-1, que es una importante deacetilasa de clase III. Durante procesos de desgaste muscular, se observó, como se comentó anteriormente, un aumento de la expresión y de la actividad de las HAT y una importante reducción en la expresión de las HDACs, lo cual explica los altos niveles de acetilación observados en los factores de transcripción de estos modelos de atrofia muscular (72,73,75,76). Además, se observó que el aumento de los niveles de estas deacetilasas, en especial sirtuin-1 (Sirt-1), reducían en gran medida los niveles de acetilación de los factores de transcripción, inactivándolos, y también produce un aumento de los niveles de antioxidantes, como el manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), reduciendo gradualmente la atrofia muscular mediante estos dos mecanismos (72,73,75,76).

Como se mencionó con anterioridad, sirt-1 es una deacetilasa de clase III, que ha mostrado numerosos efectos protectores contra enfermedades cardiovasculares, inflamación, enfermedades neurodegenerativas y además contra el cáncer. Su acción como deacetilasa se realiza normalmente sobre histonas, pero Sirt-1 además ejerce su efecto sobre factores de transcripción y proteínas del citoplasma (72). Sirt-1 actúa deacetilando proteínas como parte de la modificación postraducciona, lo que puede determinar la activación o desactivación de la proteína afectada, que además puede ver comprometida su estabilidad para unirse a ADN o a otras proteínas (72,73,81).

Sirt-1 es la principal deacetilasa en humanos, a pesar de existir 7 tipos diferentes, es la más estudiada y la que desempeña un papel más relevante. Su acción principal es la regulación del coactivador del receptor gamma 1- alfa (PGC1- α) que es un factor de transcripción que regula la biogénesis mitocondrial, y que en situación de atrofia muscular se encuentra reprimido, es decir su expresión es menor de lo normal. Sirt-1 regula PGC1-alfa de forma directa, ya que PGC1-alfa permanece inactivo mientras se encuentra acetilado, por lo que necesita la acción de sirt-1 sobre el para poder activarse y ejercer su efecto protector contra la atrofia muscular (72,73,81).

Las actividades de la célula están reguladas no únicamente por el contenido genético sino por el conjunto de procesos que regulan la expresión de este. De esta forma cuando un estímulo, interno o externo, activa un receptor específico, se inician una serie de procesos bioquímicos en la célula para dar respuesta a ese estímulo. Generalmente esta cascada de señalización conlleva numerosos pasos que van a amplificar la respuesta a la señal. De esta forma en el músculo esquelético existen varias vías implicadas en el equilibrio homeostático entre síntesis y degradación de proteínas. Las principales vías de la atrofia muscular son: factor nuclear kB (NF-kB), la familia de factores forkhead box O (FoxO) que estará relacionada a su vez con la vía del factor de crecimiento insulínico tipo I/PI3K/Akt/mTOR.

3.4.2 Vía IGF1-Akt-mTOR-FoxO

Como se mencionó anteriormente, para la homeostasis muscular es necesario el equilibrio entre la síntesis de proteínas y su degradación. De esta forma las proteínas deterioradas o que ya han realizado su función se degradan y se generan nuevas para cumplir estas funciones, formando un equilibrio perfecto. Cuando se produce un desequilibrio a favor de la degradación de proteínas se ocasiona el desgaste y atrofia muscular. La principal vía de señalización de síntesis de proteínas en el músculo esquelético es la vía de IGF1/PI3K/Akt, que por medio de IGF-1 activa la vía PI3K, que tras varios pasos finaliza con la activación de Akt (54,82). La activación de Akt conlleva dos acciones: por una parte, activa mTOR; y por otro inhibe los factores de transcripción FoxOs. Esto conlleva un efecto protector con diferentes efectos biológicos, como un efecto antiapoptótico y un aumento de la supervivencia celular (83–86). La principal función de mTOR es la estimulación de la síntesis de proteínas y del proceso de traducción. Mientras que la inactivación de FoxO por Akt va a inhibir el sistema ubiquitina-proteasoma disminuyendo los procesos catalíticos dentro del músculo esquelético (35,82,86). Además, algunos estudios reportaron la capacidad de activación de la atrofia muscular a partir únicamente de la actividad de la familia FoxO (79,80,87).

La supresión que realiza Akt sobre FoxO está basada en la adición de un grupo fosfato, lo cual provoca la represión de este, y con ella la inhibición de la inducción de las dos ligasas

de ubiquitina principales (87–89). La fosforilación de FoxO promueve la salida de FoxO del núcleo al citoplasma, donde queda recluido y no puede realizar su función (89–91).

Durante procesos de atrofia muscular, Akt se encuentra deprimido y ve reducida su expresión, lo que conlleva una menor fosforilación de FoxO, y por lo tanto una importante acumulación de FoxOs en el interior del núcleo. Esta acumulación va a promover un perfil de atrofia muscular (89). Por su parte FoxO estará regulado por diferentes modificaciones postraduccionales, como la citada fosforilación, acetilación y ubiquitinación. Estas modificaciones vienen inducidas por el estrés oxidativo o energético, o pueden deberse a acetilaciones donde destaca el papel regulador de la sirtuina-1 (SIRT-1). De esta forma, el conjunto de modificaciones post transduccionales van a determinar la actividad o inhibición de estas rutas de atrofia muscular.

3.4.2 Vía NF- κ B

La familia de factores de transcripción del factor nuclear κ B (NF- κ B), son una familia muy conservada, que desempeñan una función muy importante en la regulación del músculo esquelético y se compone de cinco miembros: RelA/p65, RelB, c-Rel, p50 y p52(92). Esta familia de factores de transcripción se caracteriza por que cada uno de sus miembros puede formar homodímeros o heterodímeros entre ellos, lo cual va a determinar su estado de represión o activación, respectivamente. Los homodímeros de p50/50 o p52/52, son la forma inactiva de transcripción, mientras que los

heterodímeros p65/p50 o p65/p52 son la forma activa (92,93).

Como se mencionó anteriormente, la activación de NF- κ B se verá potenciada por la acción de citoquinas inflamatorias, como TNF- α e IL-1, del estrés oxidativo, y de factores de crecimiento (93,94). Dependiendo de los factores de transcripción, de las vías de señalización que se activen, y de la subunidad del complejo quinasa I κ B (IKK) que intervenga, la activación de NF- κ B puede ocurrir de dos maneras, la clásica o la alternativa. En un estado de no atrofia los factores NF- κ B permanecen inactivos por su unión a la familia de proteínas inhibitorias I κ B. En este contexto, la activación clásica ocurre por el aumento de la expresión de TNF- α , lo cual induce la activación del complejo IKK y en especial de I κ B, fosforilándolo lo cual provoca su poliubiquitinación y su posterior degradación en la proteasoma. Finalmente, NF- κ B se transloca al núcleo celular donde activa la transcripción de genes proapoptóticos, además de interferir en la diferenciación celular de las células musculares impidiendo su regeneración (51,93–97). Se demostró que la inactivación de la vía clásica coincide con la activación de la vía alternativa (94).

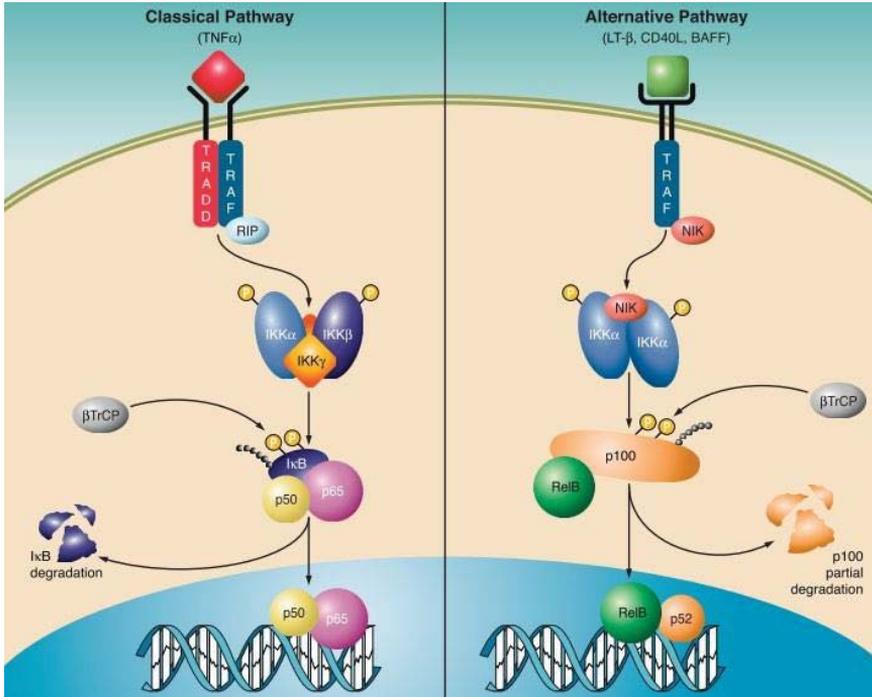


Figura 4. Vías de señalización NF-κB clásica y alternativa. La activación clásica ocurre por la unión de TNF-α a su receptor, y el reclutamiento del complejo IKK con la resultante fosforilación de IκB, lo cual promueve su poliubiquitinación y consecuente degradación, lo que permite la translocación del heterodímero clásico p65/p50 que mediará la transcripción de los factores NF-κB. La vía alternativa se inicia por la unión de otros ligandos (CD40L, lymphotoxinB y BAFF) lo cual finaliza con la activación de NIK, que fosforila IKKα, que a su vez fosforila p100 que genera la subunidad p52. La formación del complejo RelB/p52 se translocará al núcleo transcribiendo los genes NF-κB (Extraído de *Bakkar N et al. 2010 (94)*)

3.4.3 Sistemas proteolíticos

3.4.3.1 Sistema Ubiquitina-proteasoma

Durante los procesos de atrofia muscular se produce, como se comentó anteriormente, un importante aumento de la ratio de degradación de proteínas. Esta degradación incrementada es la causante del desequilibrio proteico y por lo tanto de la

caquexia. Se ha visto relacionada con el aumento de los niveles de ubiquitinación de las proteínas musculares (89, 98). El principal sistema de degradación proteica durante la caquexia cancerosa es el sistema Ubiquitina-proteasoma (UPS)(89).

El UPS es un sistema dependiente de ATP, e inicia su función por medio de 3 tipos de componentes proteicos enzimáticos: En primer lugar, la enzima activadora de ubiquitina E1, recluta las moléculas de ubiquitina y las activa, transfiriéndolas a los segundos componentes enzimáticos, las conjugasas de ubiquitinas E2. Estas enzimas añaden un valor energético a las moléculas de ubiquitina por la unión de un tioletéster, para finalmente producirse la unión entre estas moléculas de ubiquitina y el sustrato diana. La unión se realiza por el tercer componente enzimático del sistema, las E3 ligasas, cuya expresión se ha visto aumentada durante los procesos de atrofia muscular (98,99). Finalmente, la proteína diana a la que se ha unido la cadena de ubiquitinas, va a ser guiada por quimiotaxis hasta el proteasoma. El proteasoma gracias a la cadena poliubiquitinada, va a identificar a la proteína diana y la va a degradar en sus correspondientes aminoácidos.

Los genes que se encuentran sobreexpresados en situación de atrofia muscular, se les conoce como genes relacionados a la atrofia o atrogenes, y necesitan de una regulación específica durante la atrofia muscular, por lo que están controlados por una gran variedad de rutas de señalización y factores de transcripción (87,89,98,99).

Las E3 ligasas musculares más importantes son MuRF-1 y Atrogin-1, también conocido como Fbox de atrofia muscular (MAFbx1). La expresión de estas ligasas se encuentra inducida en la mayoría de los modelos de atrofia muscular, lo que destaca su importancia y su lugar clave en la vía de la atrofia muscular.

4. Enfoques terapéuticos

Como se comentó anteriormente, la acetilación de factores de transcripción relacionados con la atrofia muscular puede revertirse por la inhibición de HAT y la activación de HDAC. La hiperacetilación de factores de transcripción como NF- κ B y FoxOs se relacionó con el aumento de la atrofia muscular debido al aumento de la expresión de atrogenes como MuRF-1 y atrogin-1 (77,87,100). De esta forma la reducción en los niveles de acetilación de estos factores puede ser una importante diana terapéutica en patologías y condiciones relacionadas con la pérdida de masa y atrofia muscular.

Varios fármacos y compuestos naturales tienen la función de inhibir HATs o de inducir HDACs, como la garcinola, el ácido anacardino o los polifenoles como curcumina o resveratrol (100,101). Estos polifenoles, como muchos otros compuestos farmacológicos, tienen diversas formas de actuación, entre las que destacan la activación de Sirtuin-1, que gracias a su acción de eliminación de grupos acetilo- de factores de transcripción de atrofia, ejerce un efecto protector sobre los músculos esqueléticos. Por ello en nuestro grupo se comenzó

a estudiar el efecto de estos polifenoles sobre modelos de atrofia muscular (102–104).

4.1 Curcumina

La curcumina (diferuloilmetano) es un compuesto polifenólico extraído de la especia cúrcuma (*Curcuma longa*), que ha sido parte de la medicina tradicional asiática y que se ha relacionado con numerosos efectos favorables para los tejidos del cuerpo (105,106). La curcumina se usó para tratar diferentes patologías, como los problemas respiratorios, enfermedades hepáticas, anorexia, reumatismo y sinusitis (106,107). Además entre las aplicaciones más importantes que se le dio a la curcumina fue la curación de heridas, su uso como agente antiinflamatorio y su uso como agente anticancerígeno (105–107).

Uno de sus principales mecanismos de acción es la activación de la expresión que produce de Sirtuin-1, con los efectos protectores que esto conlleva, además de tener un importante efecto antioxidante, antiinflamatorio y anticancerígeno (108–112).

Numerosos estudios demostraron la efectividad de la curcumina para aumentar la expresión de Sirt-1, lo cual confiere un efecto protector contra el daño muscular, gracias a la inhibición de los factores NF-kB(112,113) y a la inhibición de la familia FoxO (114–116). Además, se relacionó con la promoción de la biosíntesis de mitocondrias, y con la reducción de la degradación de proteínas en modelos de

sepsis y otras enfermedades (117,118).

Con estos antecedentes, se seleccionó la curcumina, como un posible tratamiento para reducir e inhibir los mecanismos que inducen la pérdida de masa y función muscular en pacientes y modelos animales de caquexia cancerosa, por medio de la activación de Sirt-1.

4.2 Resveratrol

El resveratrol es un compuesto natural polifenólico, que se caracteriza por sus propiedades antioxidantes, y cuyo efecto beneficioso se ha relacionado con el aumento que provoca en la expresión de Sirt-1 (119). Se extrae de la piel de las uvas, arándanos, frambuesas y moras, donde se produce de manera natural como respuesta al ataque de patógenos (120). Entre sus propiedades más características destacan sus propiedades antioxidantes, que reducen el estrés oxidativo y los procesos inflamatorios (102,121–123).

Como se mencionó anteriormente, el resveratrol es un potente activador de sirtuin-1, lo cual lo coloca en la lista de posibles terapias contra la caquexia cancerosa. La activación de sirt-1 ejerce su efecto protector a través de la regulación de los factores NF-kB y FoxOs, por medio de su desacetilación, lo cual inhibe la expresión de estos factores y por lo tanto, inhibe también la consecuente atrofia que se provocaría con su activación (102,103,121,122,124,125). Diferentes estudios relacionaron el tratamiento con resveratrol con atenuación de esteatosis hepática en ratones (123), con la reducción del

estrés oxidativo en ratas con patologías cardíacas (121) o diabetes (125) , además de en células humanas de modelo de diabetes (119).

Estos estudios previos, sugieren que el aumento de la expresión de Sirt-1 por efecto del tratamiento con resveratrol, puede prevenir la atrofia muscular por desacetilación, y consecuente inhibición, de factores de transcripción de la atrofia muscular (102,103,121,122,124,125).

HIPÓTESIS GENERAL

En la presente tesis, se propuso la hipótesis de que, en un modelo murino de caquexia cancerosa y atrofia muscular, el tratamiento intraperitoneal de estos ratones con curcumina o resveratrol tendrá un efecto protector contra la pérdida de masa y función muscular.

Además, se planteó, que este efecto se debería a la activación de la sirtuina-1, por parte de tanto curcumina como resveratrol, y a la inhibición de factores de atrofia muscular que esta activación produce. De esta forma, los grupos de ratones tratados presentarían un mayor tamaño fibrilar, mayor peso corporal y muscular, especialmente en gastrocnemio y sóleo.

OBJETIVOS

Los objetivos específicos de la presente tesis son:

1. Analizar la variación en fuerza y peso muscular de los grupos de ratones caquéticos como resultado a los diferentes tratamientos.
2. Explorar la morfometría y composición fibrilar del gastrocnemio y sóleo de los distintos grupos de ratones caquéticos al finalizar el estudio.
3. Estudiar la estructura muscular y determinar el porcentaje de fracción normal en cada grupo de estudio.
4. Identificar los niveles de proteínas estructurales del músculo y de la sirtuina-1 como resultado de los diferentes tratamientos.
5. Reconocer las proteínas marcadoras de proteólisis y factores de transcripción de atrofia muscular como resultado de los diferentes tratamientos

MÉTODOS

| DISEÑO EXPERIMENTAL | | |
|---|------------------------|---|
| Inducción de la caquexia cancerosa | Cepa del modelo | Grupos |
| Inyección subcutánea de células cancerosas de adenocarcinoma LP07 | Ratones Balb/c | (1) LC-induced cachexia (N=10) (2) LC-cachexia+curcumin (N=10) (3) LC-cachexia+resveratrol (N=10) |

| MEDICIONES EN VIVO Y TRATAMIENTOS | |
|---|--|
| Mediciones | Tratamientos |
| Peso corporal Peso muscular Fuerza de las extremidades Ingesta de alimentos Extracción de sangre (Día 0, 15 y 30) | (1) suero salino (Día 15→30) (2) 1mg/kg/24h curcumina (Día 15→30) (3) 20 mg/kg/24h resveratrol (Día 15→30) |

| DURACIÓN DEL ESTUDIO Y OBTENCION DE MUESTRAS | | | |
|---|--------------------------------|--------------|---------------|
| Duración | Recolección de muestras | | |
| | Músculo | Tumor | Sangre |
| | | | |

| | | | |
|---------|---------------------------------------|----|----|
| 30 días | Gastrocnemio, diafragma y sóleo | Si | Si |
|---------|---------------------------------------|----|----|

| ANÁLISIS DE BIOLOGÍA MOLECULAR | |
|---|--|
| Técnicas | Análisis |
| Inmunohistoquímica/ Tinción con hematoxilina y eosina y microscopio óptico | Composición y morfometría muscular Daño muscular |
| Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) | Niveles de troponina I en sangre |
| Inmunoblotting de electrophoresis de una dimensión | Proteínas contráctiles y funcionales del músculo Marcadores de proteólisis Sirtuina-1 |

Resultados

Estudio #1

Curcumin and Resveratrol Improve Muscle Function and Structure through Attenuation of Proteolytic Markers in Experimental Cancer-Induced Cachexia

Artículo publicado: Curcumin and Resveratrol Improve Muscle Function and Structure through Attenuation of Proteolytic Markers in Experimental Cancer-Induced Cachexia

Penedo-Vázquez, A; Duran, X; Mateu, J; López-Postigo, A; Barreiro, E. *Molecules* 2021, 26 , 4904.

Article

Curcumin and Resveratrol Improve Muscle Function and Structure through Attenuation of Proteolytic Markers in Experimental Cancer-Induced Cachexia

Antonio Penedo-Vázquez ¹, Xavier Duran ², Javier Mateu ³, Adrián López-Postigo ¹  and Esther Barreiro ^{1,4,*}

¹ Department-Muscle Wasting and Cachexia in Chronic Respiratory Diseases and Lung Cancer Research Group, IMIM-Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, Health and Experimental Sciences Department (CEXS), Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona Biomedical Research Park (PRBB), 08003 Barcelona, Spain; ac.penedo94@gmail.com (A.P.-V.); alopez2@imim.es (A.L.-P.)

² Scientific and Technical Department, Hospital del Mar-IMIM, 08003 Barcelona, Spain; xduran@imim.es

³ Department of Pharmacy, Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, 08003 Barcelona, Spain; fmateu@parcdesalutmar.cat

⁴ Centro de Investigación en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 08003 Barcelona, Spain

* Correspondence: ebarreiro@imim.es; Tel.: +34-93-316-0385; Fax: +34-93-316-0410

Abstract: Muscle wasting and cachexia are prominent comorbidities in cancer. Treatment with polyphenolic compounds may partly revert muscle wasting. We hypothesized that treatment with curcumin or resveratrol in cancer cachectic mice may improve muscle phenotype and total body weight through attenuation of several proteolytic and signaling mechanisms in limb muscles. In gastrocnemius and soleus muscles of cancer cachectic mice (LP07 adenocarcinoma cells, N = 10/group): (1) LC-induced cachexia, (2) LC-cachexia+curcumin, and (3) LC-cachexia + resveratrol, muscle structure and damage (including blood troponin I), sirtuin-1, proteolytic markers, and signaling pathways (NF-κB and FoxO3) were explored (immunohistochemistry and immunoblotting). Compared to non-treated cachectic mice, in LC-cachexia + curcumin and LC-cachexia + resveratrol groups, body and muscle weights (gastrocnemius), limb muscle strength, muscle damage, and myofiber cross-sectional area improved, and in both muscles, sirtuin-1 increased, while proteolysis (troponin I), proteolytic markers, and signaling pathways were attenuated. Curcumin and resveratrol elicited beneficial effects on fast- and slow-twitch limb muscle phenotypes in cachectic mice through sirtuin-1 activation, attenuation of atrophy signaling pathways, and proteolysis in cancer cachectic mice. These findings have future therapeutic implications as these natural compounds, separately or in combination, may be used in clinical settings of muscle mass loss and dysfunction including cancer cachexia.

Keywords: cancer-induced cachexia mouse model; curcumin; resveratrol; muscle function and structure; sirtuin-1; troponin I; muscle proteolysis; atrophy signaling pathways



Citation: Penedo-Vázquez, A.; Duran, X.; Mateu, J.; López-Postigo, A.; Barreiro, E. Curcumin and Resveratrol Improve Muscle Function and Structure through Attenuation of Proteolytic Markers in Experimental Cancer-Induced Cachexia. *Molecules* **2021**, *26*, 4904. <https://doi.org/10.3390/molecules26164904>

Academic Editor: Chiara Porro

Received: 8 July 2021

Accepted: 3 August 2021

Published: 13 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cachexia and muscle wasting are major systemic manifestations in many chronic diseases and in cancer [1,2]. Specifically, cancer-induced cachexia deteriorates the quality of life of the patients independently of the underlying tumor status [1,2]. The prognosis of the cancer patients is also severely influenced by the presence of cachexia and muscle wasting [1,2]. The etiology of cancer cachexia is complex, and several factors are involved.

Oxidative stress, inflammation, signaling pathways, and increased proteolysis are important contributors to the process of muscle wasting and cachexia, as has been shown in different studies [3–7]. For instance, in several models [3–7] a rise in proteolysis, proteolytic markers, and the expression of atrophy signaling pathways was shown in the diaphragm and limb muscles of tumor-bearing mice that developed severe cachexia. In the peripheral muscles of patients with oncologic cachexia, mechanisms that enhance proteolysis and lead

to the loss of muscle mass and function were also shown along with increased oxidative stress and systemic inflammation [8]. Despite recent progress in the identification of the underlying biology leading to muscle wasting and cachexia, more therapeutic opportunities are still needed.

Polyphenols are a large family of phytochemicals with diverse chemical properties usually present in several plants, food, nutraceuticals, and species. Despite the reported beneficial effects in many investigations, the potential value of polyphenols as predictors of disease progression and staging may be questionable given their complex and variable structure and their interactions with other bioactive components from the diet [9]. The polyphenolic compound curcumin is the component of the turmeric plant (root of the *Curcuma longa* plant) with the largest reported effects on health. Important benefits of treatment with curcumin have been demonstrated on tissues through the action of a wide range of mechanisms. For instance, smooth muscle and endothelial cell senescence were hindered in response to curcumin therapy, as a result of sirtuin-1 activity [10]. Interestingly, the inhibition of NF- κ B activity elicited by curcumin was shown to improve the phenotype and function of skeletal muscles in several models characterized by alterations of this tissue [11–13]. Furthermore, treatment of mice with the NF- κ B inhibitor curcumin also favored the process of muscle regeneration in experimental models of disuse muscle atrophy [14,15]. In a subacute model of oncologic cachexia in rats, however, curcumin significantly reduced tumor growth, while it was not able to attenuate muscle protein loss [16]. Whether curcumin may exert anticachectic effects in other models of cancer cachexia of longer duration remains to be fully identified.

Resveratrol is also a natural polyphenol extracted from grapes, red wine, peanuts, and other plants. It is a powerful antioxidant [17], while it also induced beneficial effects on several tissues probably through the action of sirtuin-1 activity [18–21]. As such, exercise and resveratrol through a sirtuin-1 dependent mechanism was shown to improve muscle biogenesis in mice [22]. Resveratrol also ameliorated the lifespan of animals as a result of different mechanisms [19,21,23]. Muscle injury also diminished in the gastrocnemius of the rats that received treatment with resveratrol [24]. In mice exposed to hindlimb immobilization, muscle recovery and regeneration following atrophy were also significantly favored by the action of resveratrol treatment [15]. In subacute in vivo models of cancer cachexia, however, resveratrol did not elicit an improvement in muscle wasting [25].

Whether beneficial effects on muscle mass loss and enhanced proteolysis may be seen in other models of cancer, cachexia needs to be identified. Selection of the best polyphenol with therapeutic purposes to be administered to animal models or patients is not simple due to the lack of reliable quantitative biomarkers [26]. In the current investigation, curcumin and resveratrol were selectively used as they are easily available and previous studies have proven their beneficial effects on skeletal muscles in diverse experimental models [15,26,27].

Hence, we hypothesized that treatment of muscle wasting with either curcumin or resveratrol in cancer-induced cachexia may attenuate the loss of muscle mass and function, muscle phenotype, and total body weight through mitigation of several proteolytic and signaling mechanisms in limb muscles of mice. Hence, the study objectives were that in two hindlimb muscles, namely gastrocnemius and soleus, of lung cancer (LC) cachectic mice treated with either curcumin or resveratrol for 15 consecutive days: (1) limb muscle strength and weight, (2) muscle fiber type and morphometry, (3) muscle structural abnormalities, (4) sirtuin-1 and muscle-specific protein content, (5) proteolytic markers including troponin I, and (6) signaling mechanisms were examined. A group of cancer cachectic mice that received no treatment with any of the polyphenolic compounds was used as the control animals. Female mice were used for the sake of consistency with previously reported results in our group [3,7,15,27–29]. Specifically, trans-resveratrol was used in the current investigation.

2. Methods

2.1. Animal Experiments

2.1.1. Tumor Inoculation and Treatments

LP07 cell line was acquired from an *in vitro* subculture of P07 LC tumor, which is a transplantable adenocarcinoma that naturally emerged in the lungs of a BALB/c mouse [3,29–31]. The cell line was validated for its characteristics as an identical tumor developer, tumor incidence, pathological features, and the potential to induce cachexia, like its progenitor P07 tumor [3,29–31]. The model used in the current study has been extensively validated [3,7,28,31]. Resveratrol was purchased from Fagron Ibérica (Terrassa, Barcelona, Spain): molecular weight 228.2 g, C₁₄H₁₂O₃, 98.6% purity, and the *trans* conformation was used. Curcumin (CURCUMA COMPLEX 10,000 mg) was purchased from Airbiotic Health and Wellness Research Ltd. (Northumberland, UK), containing 95% purity.

2.1.2. Experimental Protocol

Ten-week-old female BALB/c mice (weight ~20 g) were acquired from Harlan Interfauna Iberica SL (Barcelona, Spain). Female mice were used for practical reasons, since most investigations have also been carried out in this type of rodent in our group [3,7,15,27–29].

With the aim to reproduce a model of cancer cachexia, the mice were subcutaneously inoculated in the left flank (day 1) with the LP07 cells (4×10^5), which were resuspended in 0.2 mL minimal essential medium (MEM), [3,29–31]. The research was conducted for a period of one month for all the groups (n = 10/group).

The study protocol is shown in Figure 1. Mice were subdivided randomly into three different groups: (1) LC control, inoculation of LP07 cells and concomitant daily intraperitoneal injection with saline for the last 15 days (LC-induced cachexia), (2) LC cachexia group treated with curcumin, inoculation of LP07 cells and concomitant daily intraperitoneal treatment with 1 mg/kg/day curcumin for the last 15 days (LC-cachexia+curcumin), and (3) LC cachexia mice treated with resveratrol, inoculation of LP07 cells and concomitant intraperitoneal treatment with 20 mg/kg/day resveratrol for the last 15 days (LC-cachexia + resveratrol, Figure 1). In this protocol, administration of the different treatments started on day 15, when the tumors were visible in the mice. Before that timepoint, administration of the treatments was not justified for ethical reasons as advised by the Animal Research Committee (see below). Moreover, also for ethical reasons, a nontumor control group of mice was not included in the investigation. Differences between nontumor animals and tumor-bearing mice have been extensively described in this model of lung cancer-induced cachexia [3,7,28,31].

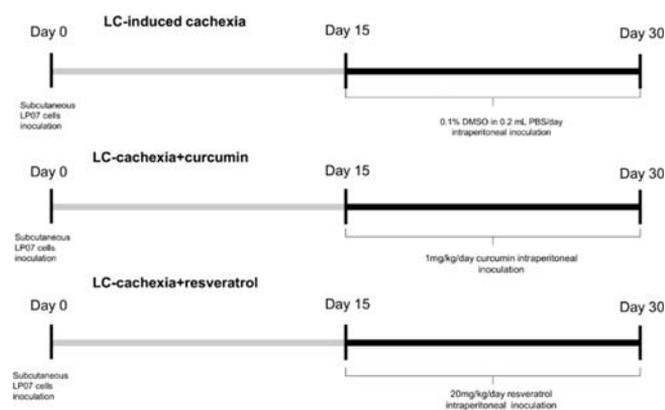


Figure 1. Schematic representation of the study protocol for all the groups of mice.

Animals were kept under pathogen-free conditions with a 12:12 hour light–dark cycle. All the animal experiments were conducted in the animal facilities of the building Barcelona

Biomedical Research Park (PRBB). Ethical regulations on animal experimentation set by the European Community Directive 2010/63/EU, Spanish legislation (*Real Decreto* 53/2013, BOE 34/11370-11421), and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (1986) were all followed in the present study. All animal experiments were approved by the Animal Research Committee at PRBB (Animal Welfare Department in Catalonia, Spain, protocol # EBP-17-0005).

2.1.3. Studies in Mice: In Vivo Measurements

The parameters food intake and total body weight were recorded on daily basis. Water and food were supplied ad libitum daily. In all the animals, grip strength was quantified using a grip strength meter (Bioseb, Vitrolles, France). Plasma samples were extracted on day 0, on day 15 before starting the different treatments, and on day 30, right before the sacrifice of the mice [3,15,27–29,31]. Limb strength and total body weight gains were calculated as the percentage of the measurements obtained on day 30 with respect to baseline measurements (day 0) [3,15,27–29,31].

2.1.4. Sacrifice and Sample Collection

All the mice were sacrificed 30 days after the start of the study protocol. All the animals received an intraperitoneal injection containing 0.1 mL sodium pentobarbital (60 mg/Kg). Total anesthetic depth (pedal and blink reflexes) was verified in all the animals prior to their sacrifice. Animals were sacrificed upon diaphragm removal. Immediately afterwards, the gastrocnemius and soleus muscles were extracted from all the animals simultaneous to the time of sacrifice in order to keep the muscles oxygenated. A fragment of the muscle samples was snap-frozen in liquid nitrogen to be stored frozen at -80°C up until further use. An additional part of the gastrocnemius and soleus muscles was paraffin-embedded for morphometrical analyses [3,15,27–29,31].

2.2. Biological Analyses

2.2.1. Immunoblotting of 1D Electrophoresis

Immunoblotting was used to detect levels of the different antigens as also reported in previous investigations [3,15,27–29,31]. Stored frozen samples from the gastrocnemius and soleus muscles were homogenized in a buffer containing the following compounds: 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 150 mM NaCl, 100 mM NaF, 10 mM Na pyrophosphate, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.5% Triton-X, 2 micrograms/mL leupeptin, 100 micrograms/mL phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 2 micrograms/mL aprotinin, and 10 micrograms/mL pepstatin A. The myofibrillar compartment was also isolated to detect the contractile proteins actin and myosin heavy chain (MyHC) as previously reported [3,15,27–29,31].

Proteins in each muscle sample were separated through electrophoresis, transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes, and blocked with bovine serum albumin (BSA) to be incubated overnight with specific primary antibodies. The following primary antibodies were used in the investigation to detect the target antigens: NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1 (anti-sirtuin-1 antibody, ProteinTech Group Inc., Rosemont, IL, USA), nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) p50 (anti-p50 antibody, Santa Cruz Biotechnology), Forkhead box O3 (FoxO-3) (anti-FoxO-3 antibody, Acris, Herford, Germany), MyHC (anti-MyHC antibody, clone A4.1025, Upstate-Millipore, Temecula, CA, USA), α -actin (anti-alpha-sarcomeric actin antibody, clone 5C5, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) total ubiquitinated proteins (anti-protein ubiquitination antibody, Boston Biochem, Cambridge, MA, USA), 20S proteasome subunit C8 (anti-C8 antibody, Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA), ubiquitin-ligase atrogin-1 (anti-atrogin-1 antibody, Acris), ubiquitin-ligase muscle ring finger (MURF)-1 (anti-MURF-1 antibody, Santa Cruz Biotechnology), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, anti-GAPDH antibody, Santa Cruz Biotechnology).

Following an overnight incubation with the primary antibodies, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (IgG) were also incubated for two more hours at room temperature. A chemiluminescence kit was also used to detect the specific antigen bands in the different immunoblots.

Samples from the different groups were always run together for all the immunoblots. Moreover, membranes from all the samples were always analyzed simultaneously under identical exposure times for the sake of comparisons. Antibody specificity was tested by omission of the primary antibodies for each specific antigen. PVDF membranes were scanned using the spectral fluorescence imaging system Alliance Q9 Advanced (UVITEC, Cambridge, UK) using the software NineAlliance Q9 (UVITEC). Optical densities of the target protein bands were also calculated using the software NineAlliance Q9 (UVITEC). Optical densities obtained in each specific group of muscle and mice corresponded to those of the mean values of the different samples for each target antigen. The glycolytic enzyme GAPDH was used as the protein loading control in all the immunoblots.

2.2.2. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) Plasma Skeletal Muscle Troponin-I Levels

In the plasma compartment of the study animals, muscle troponin-I levels were detected using a specific ELISA kit (Troponin I ELISA kit, Elabscience Biotechnology Inc., Houston, Texas, USA) and standard procedures in our group [15,27,28]. Plasma samples and reagents were equilibrated to room temperature prior to the initiation of the assay. A standard curve (100 µL/standard) was always run with each assay following the manufacturer's instructions. Samples were diluted (1:3 dilution) and equal volumes of each sample (100 µL) were loaded onto the plates. All the samples were incubated with 100 µL of biotinylated detection antibody at 37 °C for one hour. Following three washes with wash buffer, samples were additionally incubated with 100 µL HRP-secondary antibody at 37 °C for 30 min. The samples were washed five more times with wash buffer and were then incubated with substrate reagent at 37 °C for 15 minutes. The reaction was stopped using 50 µL of the stop solution. Optical densities were measured at 450 nm wavelength in a microplate reader (Infinite M200, TECAN, Männedorf, Switzerland). Intra-assay coefficients of variation for the measurements of plasma skeletal muscle troponin-I levels ranged from 2 to 10%. As all the samples were analyzed on the same day, no interassay coefficients of variation could be calculated.

2.2.3. Muscle Fiber Typing and Morphometry

Paraffin-embedded gastrocnemius and soleus muscle sections were cut on a microtome (Leica RM 2035, Leica Biosystems, Nussloch, Germany) into three-micrometer sections. Slow- and fast-twitch muscle fibers were identified using immunohistochemical procedures with mouse specific monoclonal anti-MyHC I antibody (ab11083, Abcam) and anti-MyHC II antibody (ab51263, Abcam), respectively [15,27,28]. The cross-sectional area, mean least diameter, and proportions of type I and type II fibers were assessed using a conventional optical microscope (×20 objective, Olympus BX61, Olympus, Tokyo, Japan) coupled with an image-digitizing camera (Olympus U-TV1X-2, Olympus, Tokyo, Japan) and the Image J software (National Institute of Health, available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, accessed on 1 April 2020). In each muscle cross-section, a minimum number of 100 fibers were counted for each limb muscle (gastrocnemius and soleus) in all the study groups of mice [15,27,28].

2.2.4. Muscle Morphological Features

Three-micrometer paraffin-embedded sections of gastrocnemius and soleus of all groups of mice were used to assess the area fraction of normal and abnormal muscle. The sections were stained using hematoxylin-eosin to quantify the proportions of morphological features in the study muscles. Quantitative analyses were conducted using computer-assisted morphometric procedures. The setup consisted of an IBM-compatible computer with a stereology software package (The Gridder; WillRich Technologies, American Megatrends Inc., Georgia, United States) and a Nikon light microscope with a camera

lucida. Using this software program, a grid consisting of 63 point-intercepts (7 × 9 rectangular pattern) was projected from the computer monitor via the camera lucida and superimposed onto the image of the muscle cross sections viewed down the light microscope. The observer was blinded to the identity of all the slides. The following features were evaluated in each one of the 63 point-intercepts of every image: (1) normal muscle; (2) internal nuclei; (3) inflammatory cells; (4) lipofuscin; (5) abnormal fibers; (6) necrotic or inflamed fibers; (7) blood vessels. The sections were divided into normal muscle (1), abnormal muscle (2–6), or blood vessels (7), and the percentages of normal and abnormal muscle were calculated for each sample type [4].

2.2.5. Statistical Analysis

Results are presented as mean values and standard deviations. The normality of the study variables was explored using the Shapiro–Wilks test. Sample size was calculated according to body weight change in all the study groups. Ten mice in each group were sufficient to achieve a 90% statistical power in the investigation.

The variables of food intake and percentage of change of both total body weight and limb strength for all the study mouse groups are represented in a table, while the biological variables are represented in figures (whiskers and box plots).

Potential differences among the study groups were explored using one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett’s post hoc analysis (to adjust for multiple comparisons among the study groups) for all the study variables. A level of significance of $p \leq 0.05$ was established. All the statistical analyses were performed using the software for Statistics and Data Science (STATA, StataCorp LLC, College Station, TX, USA).

3. Results

3.1. Physiological Characteristics of the Study Animals

Compared to nontreated cachectic mice, the loss of body weight was significantly attenuated in the cachexia groups treated with either curcumin or resveratrol, while food intake did not vary across groups (Table 1). The weight of the gastrocnemius and soleus muscles significantly improved in the cachexia groups treated with either curcumin or resveratrol compared to nontreated cachectic mice (Table 1). In comparison with the nontreated cachectic mice, tumor weight significantly decreased in the cachectic animals treated with resveratrol (≈30% reduction), whereas no significant differences were seen in the mice treated with curcumin (17% reduction, Table 1). Limb strength gain was greater in the animals treated with either curcumin (larger increase) or resveratrol compared to the nontreated cachectic mice (Table 1).

Table 1. Physiological parameters in the experimental groups of mice.

| | LC-Induced Cachexia (N = 10) | LC-Cachexia + Curcumin (N = 10) | LC-Cachexia + Resveratrol (N = 10) |
|-----------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| Age at baseline (weeks) | 10 | 10 | 10 |
| Body weight at baseline (g) | 20.43 (1.08) | 20.31 (1.13) | 20.3 (1.08) |
| Final body weight (g) | 15.76 (1.67) | 18.5 (1.31) *** | 19.25 (1.55) *** |
| Body weight gain (%) | −22.87 (6.98) | −8.87 (4.35) *** | −5.22 (3.8) *** |
| Food intake (g/24 h) | 2.53 (0.52) | 2.64 (0.58) | 2.69 (0.58) |
| Gastrocnemius weight (g) | 0.086 (0.01) | 0.105 (0.01) *** | 0.104 (0.008) *** |
| Soleus weight (g) | 0.0064 (0.001) | 0.0075 (0.001) * | 0.0073 (0.001) * |
| Tumor weight (g) | 2.136 (0.56) | 1.77 (0.41) (17%) | 1.49 (0.79) * (30%) |
| Limb strength gain (%) | −25.01 (2.29) | −1.51 (3.29) ***, +93% | −5.27 (6.9) ***, +78% |

Variables are presented as mean (standard deviation). Abbreviations: LC, lung cancer; g, grams; h, hour. Statistical significance is represented as follows: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ between any of the cachectic mice treated with either curcumin or resveratrol and the nontreated LC-induced cachexia mice.

3.2. Structural Phenotypic Characteristics

No significant improvements in the proportions of muscle fiber types were detected in any of the analyzed muscles in the mice treated with the polyphenolic compounds (Table 2 and Figure 2A,B). Importantly, the areas of both type I and type II fibers were significantly greater in the gastrocnemius and soleus muscles of cachectic mice treated with either curcumin or resveratrol than in nontreated cachectic rodents (Table 2 and Figure 2A,B). The proportions of muscle abnormalities, including the proportions of internal nuclei and inflammatory cells, were significantly lower in the gastrocnemius and soleus of the cachectic mice treated with either curcumin or resveratrol compared to nontreated cachectic animals (Table 2 and Figure 3A,B).

Table 2. Structural characteristics of the gastrocnemius and soleus muscles in the study groups of mice.

| Muscle | | LC-Induced Cachexia (N = 10) | LC-Cachexia + Curcumin (N = 10) | LC-Cachexia + Resveratrol (N = 10) |
|---|---------------|---------------------------------|---------------------------------------|--|
| Muscle fiber type, % | | | | |
| Type I fibers | Gastrocnemius | 12.34 (1.9) | 16.03 (4.4) | 14.16 (3.4) |
| | Soleus | 49.08 (5.01) | 52.98 (9.38) | 54.87 (5.94) |
| Type II fibers | Gastrocnemius | 87.65 (1.9) | 83.97 (4.4) | 85.83 (3.4) |
| | Soleus | 50.92 (5.01) | 47.02 (9.38) | 45.13 (5.94) |
| Cross-sectional areas | | | | |
| Type I fibers (μm^2) | Gastrocnemius | 499.34 (71.9) | 695.06 (136.63) *, +34% | 711.44 (240.26) ***, +36% |
| | Soleus | 528.65 (111.06) | 799 (159.48) **, +51% | 770.66 (102.86) **, +46% |
| Type II fibers (μm^2) | Gastrocnemius | 464.79 (53.88) | 688.04 (132.61) ***, +49% | 648.2 (134.2) **, +34% |
| | Soleus | 443.16 (69.50) | 603.17 (103.95) **, +36% | 592.01 (99.27) *, +34% |
| Muscle structural abnormalities, % | | | | |
| Total abnormal fraction | Gastrocnemius | 3.8 (0.84) | 2.85 (0.94) * | 1.9 (0.27) *** |
| | Soleus | 9.25 (1.88) | 3.57 (0.55) *** | 3.73 (0.39) *** |
| Internal nuclei | Gastrocnemius | 2.34 (0.54) | 2.23 (0.8) | 1.21 (0.2) ** |
| | Soleus | 6.08 (1.36) | 3.17 (0.43) *** | 2.3 (0.5) *** |
| Inflammatory cells | Gastrocnemius | 1.26 (0.59) | 0.5 (0.32) * | 0.58 (0.31) * |
| | Soleus | 1.56 (1.48) | 0.36 (0.29) * | 0.49 (0.3) * |

Variables are presented as mean (standard deviation). Abbreviations: LC, lung cancer; μm^2 , square micrometers. Statistical significance is represented as follows: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ between any of the cachectic mice treated with either curcumin or resveratrol and the nontreated LC-induced cachexia mice.

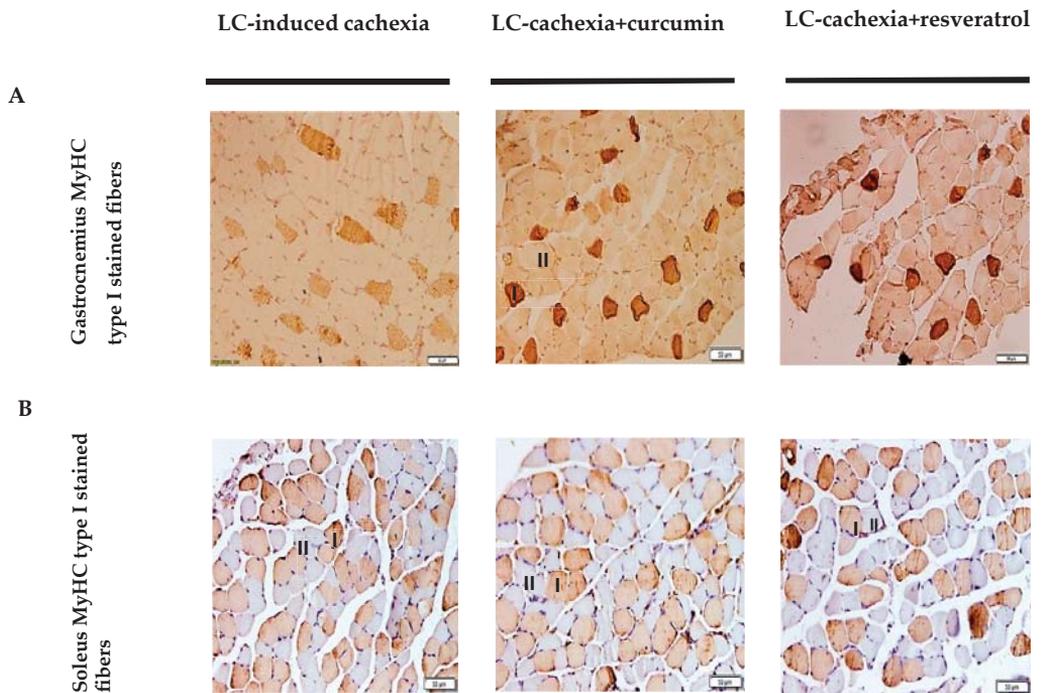


Figure 2. (A) Representative images of muscle fibers ($\times 200$) of gastrocnemius (A) and soleus (B) muscle of all study groups of mice. Slow-twitch fibers (I symbol within the fibers) were positively stained with the corresponding antibody (brown color), while the nonstained fibers were fast-twitch ones (II symbol within the fibers).

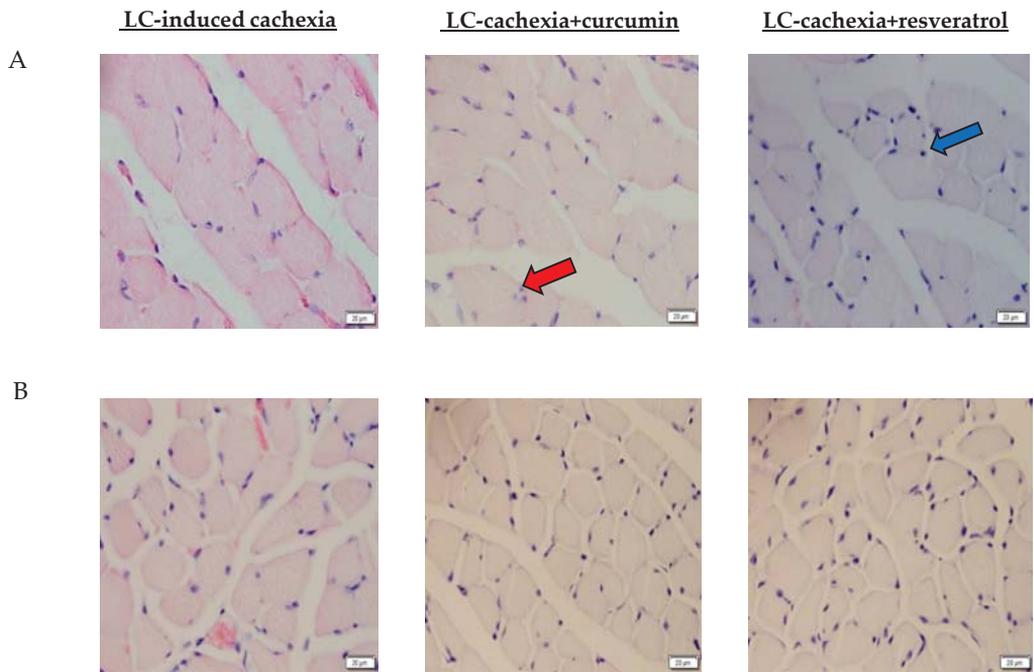


Figure 3. Representative images of cross gastrocnemius (**A**) and soleus (**B**) muscle sections with H&E staining. An example of an internal nucleus (red arrow) and an inflammatory cell (blue arrow) are indicated.

3.3. Sirtuin-1 Protein Content

Sirtuin-1 protein levels significantly increased in both limb muscles of the cachectic mice treated with either curcumin or resveratrol compared to nontreated cachectic rodents (Figure 4A–C).

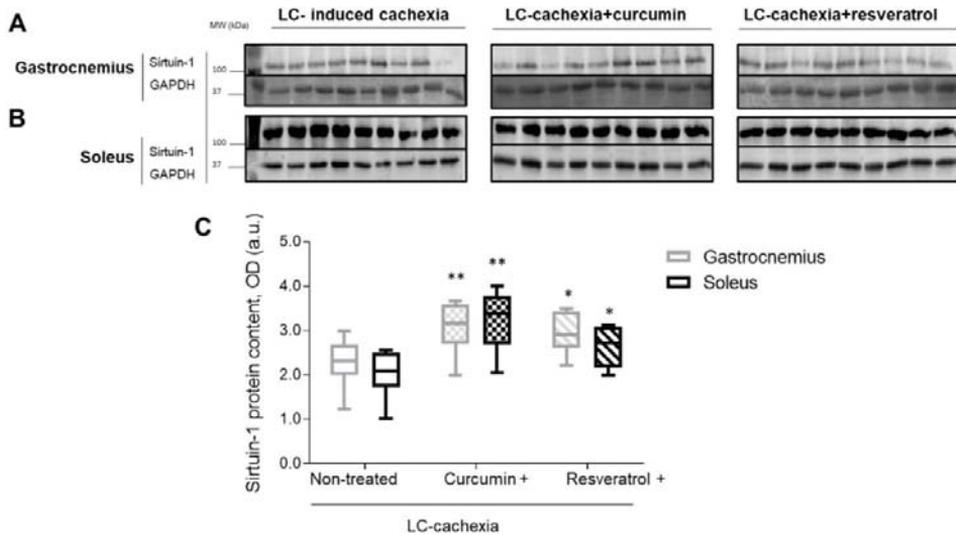


Figure 4. Representative immunoblots of sirtuin-1 and GAPDH proteins in the gastrocnemius (A) and soleus (B) muscles of all study groups of mice. Definition of abbreviations: MW, molecular weight; kDa, kilodalton; OD, optical densities; a.u., arbitrary units; LC, lung cancer; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; (C) box plots of sirtuin-1 protein content in gastrocnemius and soleus muscles of the different study groups of mice, as measured by optical densities in arbitrary units (OD, a.u.). Statistical significance is represented as follows: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ between any of the study groups and the LC-induced cachexia mice in gastrocnemius and soleus muscles.

3.4. Muscle Specific Proteins

No significant differences in protein levels of actin or myosin heavy chain were detected in either gastrocnemius or soleus muscles among the study groups of mice (Figure 5A–D).

3.5. Muscle Proteolytic Markers

A significant increase in plasma troponin I levels was detected in the cachectic mice only on day 30 compared to levels on days 0 and 15 (Figure 6). Interestingly, a significant decline in systemic troponin I levels was seen in mice treated with either curcumin or resveratrol only in the 30-day time-point (Figure 6). A significant reduction in protein levels of MuRF-1 and atrogin-1 was observed in the gastrocnemius and soleus muscles of cachectic mice treated with either curcumin or resveratrol compared to limb muscles in the nontreated mice (Figure 7A–D). Protein levels of the 20S subunit of the C8 proteasome marker were significantly lower only in the gastrocnemius, but not in the soleus, of the cachectic mice treated with either curcumin or resveratrol compared to nontreated cachectic animals (Figure 7A,B,E). Total levels of protein ubiquitination did not significantly differ among the study groups for any of the study muscles (Figure 7A,B,F).

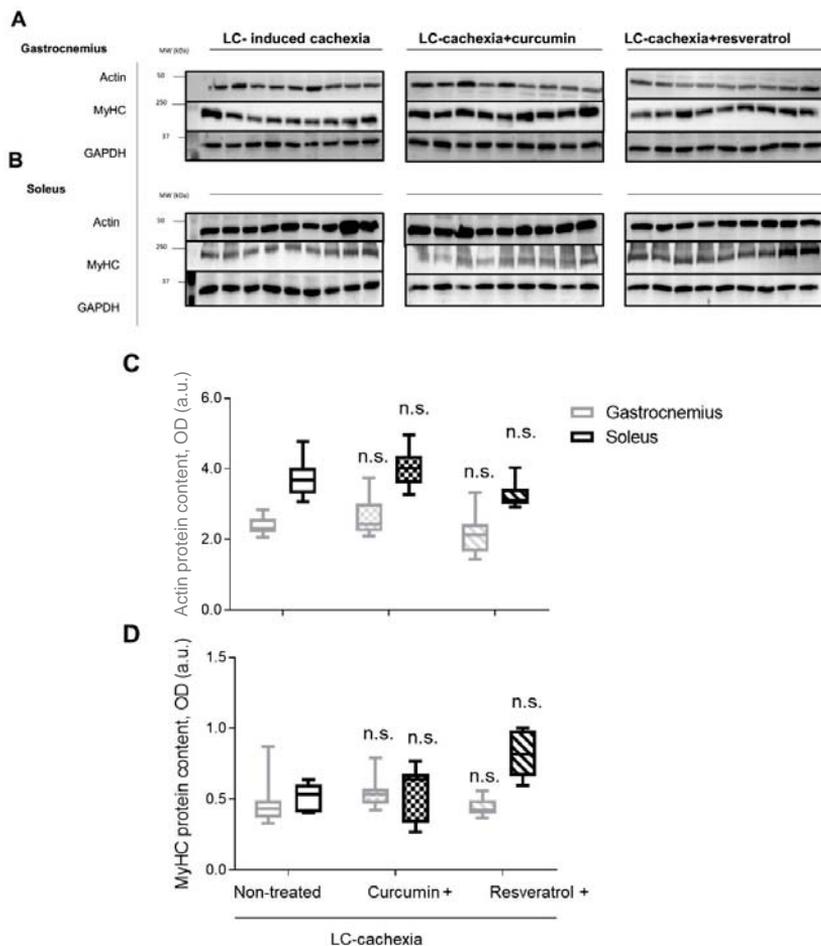


Figure 5. Representative immunoblots of actin, MyHC, and GAPDH protein content in the gastrocnemius (**A**) and soleus (**B**) muscles of all study groups of mice. Box plots of actin (**C**) and MyHC (**D**) protein content in gastrocnemius and soleus muscles of the different study groups of mice, as measured by optical densities in arbitrary units (OD, a.u.). Definition of abbreviations: a.u., arbitrary units; MW, molecular weight; kDa, kilodalton; LC, lung cancer; MyHC, myosin heavy chain; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. ns, non significant.

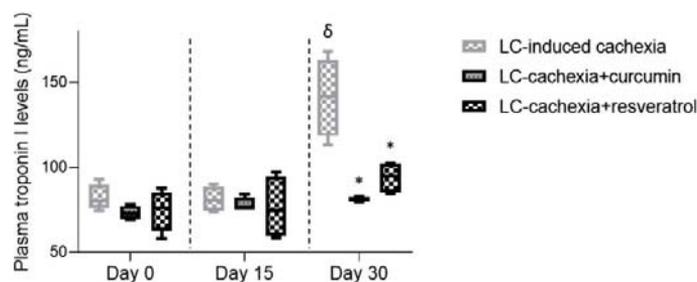


Figure 6. Box plots of plasma troponin I (ng/mL) of the different study groups of mice on days 0, 15 and 30. Definition of abbreviations: ng, nanogram; mL, milliliter; LC, lung cancer. Statistical significance is represented as follows: δ , $p \leq 0.05$ levels in plasma of LC-induced cachexia mice between day 30 and day 0; *, $p \leq 0.05$; plasma levels in cachectic mice treated with either curcumin or resveratrol and the nontreated cachectic mice at day 30.

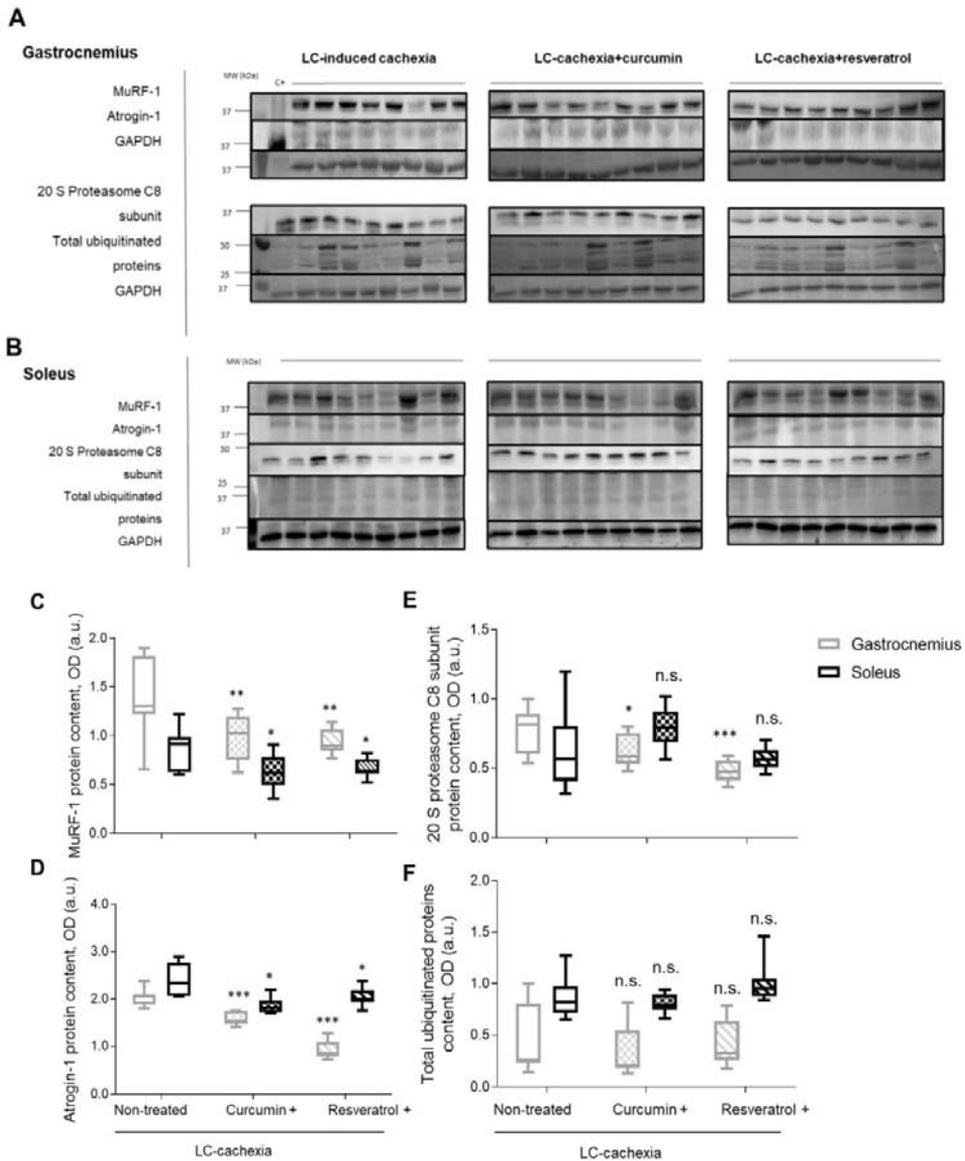


Figure 7. Representative immunoblots of C8-20S, total ubiquitinated proteins, MuRF-1, Atrogin-1, and GAPDH protein content in the gastrocnemius (A) and soleus (B) muscles of all study groups of mice. Box plots of MuRF-1 (C), Atrogin-1 (D), 20S subunit of the C8 proteasome marker (E), and total ubiquitinated proteins (F) protein content in gastrocnemius and soleus muscles of the different study groups of mice, as measured by optical densities in arbitrary units (OD, a.u.). (Definition of abbreviations: OD, optical densities; a.u., arbitrary; MW, molecular weight; kDa, kilodalton; LC, lung cancer; C8-20S, 20S proteasome alpha subunit; MuRF-1, muscle ring finger protein 1; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Statistical significance is represented as follows: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$, ns, non significant, between any of the study groups and the LC-induced cachexia mice in gastrocnemius and soleus muscles.

3.6. Muscle Atrophy Signaling Markers

Total levels of the signaling marker NF- κ B p50 significantly decreased in the soleus, but not in the gastrocnemius, of the cachectic mice treated with either curcumin or resveratrol

compared to nontreated animals (Figure 8A–C). Total protein levels of FoxO3 significantly declined in both limb muscles of the cachectic mice treated with either curcumin or resveratrol compared to nontreated mice (Figure 8A,B,D).

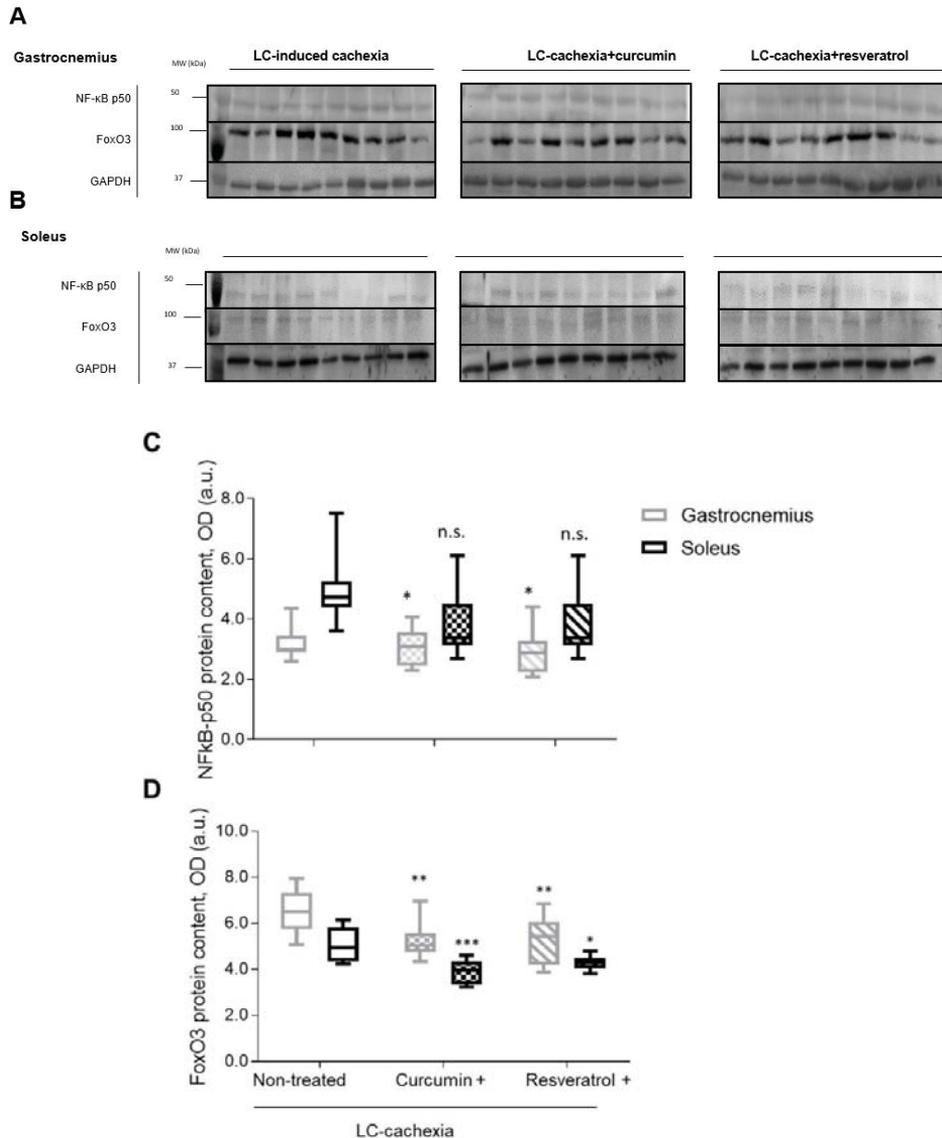


Figure 8. Representative immunoblots of NF-κB p50, FoxO3, and GAPDH protein content in the gastrocnemius (**A**) and soleus (**B**) muscles of all study groups of mice. Box plots of NF-κB p50 (**C**) and FoxO3 (**D**) protein content in gastrocnemius and soleus muscles of the different study groups of mice, as measured by optical densities in arbitrary units (OD, a.u.). Definition of abbreviations: OD, optical densities; a.u., arbitrary units; MW, molecular weight; kDa, kilodalton; LC, lung cancer; NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; FoxO3, Forkhead box O3; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Statistical significance is represented as follows: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$, ns, non significant, between any of the study groups of mice treated with either curcumin or resveratrol and the LC-induced cachexia mice in gastrocnemius and soleus muscles.

4. Discussion

In the current study, the most relevant results were that treatment with the polyphenolic compounds curcumin and resveratrol via a sirtuin-1 mechanism elicited beneficial effects in tumor-bearing mice with severe cachexia as demonstrated by the clear improvement seen in body and muscle weights as well as in limb muscle strength. Importantly, cross-sectional areas of both slow- and fast-twitch muscle fibers also significantly increased in the limb muscles of the cachectic mice treated with either curcumin or resveratrol. Moreover, muscle proteolysis and the expression of the target proteolytic markers was also attenuated by the effects of curcumin and resveratrol in both slow- and fast-twitch type muscles in this model of cancer cachexia. Expression levels of atrophy signaling markers were also attenuated as a result of treatment with either resveratrol or curcumin in both limb muscle types. The most relevant findings are discussed below.

In this model of cancer cachexia, treatment with either resveratrol or curcumin elicited an improvement in muscle phenotype of the target limb muscles. Furthermore, the weights of the gastrocnemius and soleus muscles were significantly greater in the cachectic mice treated with the polyphenolic compounds. The degree of muscle structural abnormalities also declined in the hindlimb muscles of the treated animals. Altogether these are relevant findings that may partly account for the amelioration observed in limb muscle strength in the cachectic mice treated with the polyphenolic compounds compared to the nontreated animals. In line with this, similar results were also reported in different models, in which the mouse limb muscles were exposed to disuse muscle atrophy [15,27] and animals received treatment with curcumin and resveratrol.

Biological events such as DNA repair, cell survival, and aging [32,33] are regulated by the nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)⁺ dependent histone deacetylase sirtuin-1. Muscle proteolysis may also be modulated by the action of sirtuin-1 activity [27]. In keeping with this, a decline in sirtuin-1 protein levels was also demonstrated in limb muscles and myotubes of patients with COPD and severe muscle wasting [34], as well as in mice exposed to hindlimb unloading [15,27]. In the present investigation, treatment with resveratrol and curcumin of the cancer cachectic mice elicited favorable effects in a similar fashion in both slow- and fast-twitch limb muscle types. Interestingly, a significant rise in sirtuin-1 protein content was detected in the gastrocnemius and soleus muscles of mice treated with either curcumin or resveratrol. These relevant findings suggest that the benefits observed in the cachectic limb muscles are mediated to a great extent by the actions of sirtuin-1. Furthermore, skeletal muscle damage, a common feature in cancer-induced cachexia [3,4,7,28,31], also decreased in the animals treated with any of the two polyphenolic compounds compared to the nontreated mice. Interestingly, the reduction in muscle structural abnormalities was further confirmed by the significant reduction observed in plasma troponin I levels of the treated mice. In addition, protein levels of the E3 ligases MuRF-1 and atrogin-1 and the 20S proteasome C8 subunit also decreased in the limb muscles in response to treatment with either resveratrol or curcumin in the cachectic rodents. Collectively, these results suggest that the polyphenolic compounds most likely exerted their beneficial effects on muscle phenotype and function through the action of sirtuin-1, as also previously reported in models of disuse muscle atrophy [15,27]. In fact, curcumin was demonstrated to attenuate the expression of atrophy signaling pathways and muscle protein degradation [27].

Another point that warrants attention is to explore whether the administration of a combined therapy with curcumin and resveratrol may enhance the beneficial effects on the skeletal muscles in this mouse model of cancer-associated cachexia as previously shown to occur in patients with chronic kidney failure [35]. Indeed, this will be an excellent avenue for research in the near future. Another aspect that also deserves special attention was the significant reduction seen in tumor weight in the cachectic mice treated with resveratrol (30%), but not in those treated with curcumin (17%). Despite that the reduction in tumor size was not very large, in the animals treated with resveratrol, a potential direct effect on the muscles resulting from the smaller tumor burden cannot be ruled out. On the other

hand, curcumin predominantly exerted its beneficial effects directly on muscle proteolysis and function. Indeed, the improvement in limb muscle strength elicited by curcumin was larger than that induced by resveratrol. Previous results put forward that resveratrol also significantly reduced tumor burden through inhibition of proliferation and induction of autophagy in mice with ovarian cancer for several weeks [36].

Resveratrol-related effects on health and lifespan are dependent on the activation of sirtuin-1 [37]. Muscle mass and function also significantly improved in elderly subjects in response to combined treatment with aerobic exercise training and resveratrol [38]. In a model of muscle-specific sirtuin-1-deficient mice, resveratrol elicited a beneficial effect on mitochondrial function and biogenesis [22]. On the other hand, sirtuin-1 has also been implicated in the negative regulation of insulin-like growth factor (IGF)-I and downstream Akt/mTOR signaling in skeletal muscles during senescence [39]. In one review [39], the role of sirtuin-1 in maintaining skeletal muscle mass in healthy aging was thoroughly discussed. Furthermore, in mice, resveratrol was also shown to induce beneficial effects on the process of muscle regeneration following unloading for several days [15].

Importantly, it has been recently proposed that resveratrol may exert dichotomic effects in different experimental models [40,41]. Previous work clearly demonstrated that tyrosyl-tRNA synthetase is a biological and physiological target of resveratrol and that this step is crucial in the conversion of trans- to cis-resveratrol [41]. Also, trans-resveratrol was shown to convert to cis-resveratrol in physiological processes, and cis- and trans-resveratrol forms were identified in the metabolic profiles of cells and tissues exposed to trans-resveratrol treatment [40,42]. Thus, the trans- to cis- conversion accounts for a novel thiol-dependent mechanism that mediates the favorable effects of resveratrol in vivo models [40]. The tyrosyl-tRNA synthetase signaling mechanism probably accounts for most of the beneficial effects of resveratrol, including anti-inflammatory properties [43]. However, full elucidation of the biological significance of the two distinct conformations of resveratrol is still needed in different models. Future research should focus on the identification of whether cis- or trans- conformations exert the beneficial effects seen in different experimental models.

In the present investigation, expression of the signaling pathway NF- κ B p50 subunit declined only in the gastrocnemius of the animals treated with the polyphenolic compounds compared to nontreated mice. These findings imply that the NF- κ B pathway partly signaled the process of loss of muscle mass and function in the cachectic mice. Hence, it is likely that the decrease in NF- κ B pathway expression observed in the mice treated with either resveratrol or curcumin partly elicited the beneficial effects seen on muscle function, structure, and biology. Likewise, similar effects were also reported in other models such as in aged muscles, in which NF- κ B was also involved [19–21,23].

Importantly, expression levels of FoxO3 also experienced a decline in both muscle types as a result of the treatment with either resveratrol or curcumin of the cachectic mice. These relevant observations suggest that FoxO3 may be a prominent pathway in this model of muscle wasting and that the polyphenolic compounds may also exert their beneficial effects through attenuation of FoxO3 signaling pathway. These results also confirm previous findings reported in other models of muscle wasting and sarcopenia, in which FoxO3 was also involved in the process of muscle wasting [8,28].

Study Critique

A limitation in this study is related to the potential extrapolation of the results to clinical settings of patients with cancer-associated cachexia. In view of the present findings, future investigations targeted to identify whether resveratrol and curcumin or even other polyphenolic compounds may attenuate muscle proteolysis in patients with oncologic cachexia should be designed. On the other hand, it should also be mentioned that previous investigations did not show positive effects on muscle wasting in rats or mice in subacute (7–14 days) cancer-induced cachexia models [16,25]. In the latter model [25], in vitro administration of resveratrol did elicit beneficial effects as a reduction in protein degradation

as observed in rat limb muscles. The nature of the cancer cells inoculated to the rodents, the different conformations of resveratrol (cis- and trans-) [40], the different doses used in vivo and in vitro, and the duration of the experimental models may account for discrepancies or differences in the reported results among studies [16,25,40].

Despite these concerns, in the present study, a significant improvement in limb muscle strength was observed in the cachectic mice treated with either polyphenolic compound. In the mice treated with curcumin, this improvement was even greater, while tumor size did not differ significantly from the nontreated controls. Thus, curcumin exerted anticachectic effects in this mouse model of cancer cachexia.

Another potential limitation was related to the use of female mice in the study. For the sake of coherence and consistency with previously published results [3,7,15,27–29,31], female mice were used in the current investigation. Furthermore, cancer cachexia usually develops at a relatively late stage in life, time at which differences between men and female patients are less likely.

5. Conclusions

The polyphenolic compounds curcumin and resveratrol elicited beneficial effects on fast- and slow-twitch limb muscle types in cachectic mice through attenuation of atrophy signaling pathways and induction of a sirtuin-1 dependent mechanism. Limb muscle strength, body and muscle weight, and the size of both slow- and fast-twitch myofibers along with reduced muscle damage and troponin I levels notably improved in response to treatment with either curcumin or resveratrol through attenuation of muscle proteolysis in cancer cachectic mice. Curcumin exerted more powerful anticachectic effects as tumor size was not significantly modified by this compound, while a larger improvement in muscle function, structure, and biology was demonstrated in the cancer cachectic mice. Future studies should specifically target the profile of the biological and physiological outcomes resulting from the two distinct resveratrol conformations. Furthermore, the potential beneficial enhancement of combination therapy with curcumin and resveratrol on cachectic muscles should also be explored in future investigations. The findings reported herein have future therapeutic implications, as these natural compounds may be used in clinical settings for muscle mass loss and dysfunction including cancer cachexia.

Author Contributions: Conception and design, E.B.; animal experiments, A.P.-V., J.M., and A.L.-P.; sample collection: A.P.-V.; molecular biology analyses: A.P.-V., A.L.-P., E.B.; statistical analyses and data interpretation: X.D., A.P.-V., and E.B.; manuscript drafting and intellectual input: E.B. and A.P.-V.; manuscript writing—final version: E.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The current research was supported by *Instituto de Salud Carlos-III*, contract grant numbers CIBERES, FIS 18/00075 (FEDER); the Spanish Ministry of Science and Innovation; and *Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica* (SEPAR) 2020.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not available.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Not available.

References

1. Argilés, J.M.; Busquets, S.; López-Soriano, F.J. Cancer cachexia, a clinical challenge. *Curr. Opin. Oncol.* **2019**, *31*, 286–290. [[CrossRef](#)]
2. Barreiro, E.; Sznajder, J.I.; Nader, G.A.; Budinger, G.R.S. Muscle dysfunction in patients with lung diseases a growing epidemic. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2015**, *191*, 616–619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Chacon-Cabrera, A.; Fermoselle, C.; Urtreger, A.J.; Mateu-Jimenez, M.; Diamant, M.J.; de Kier Joffé, E.D.B.; Sandri, M.; Barreiro, E. Pharmacological Strategies in Lung Cancer-Induced Cachexia: Effects on Muscle Proteolysis, Autophagy, Structure, and Weakness. *J. Cell. Physiol.* **2014**, *229*, 1660–1672. [[CrossRef](#)]
4. Salazar-Degracia, A.; Blanco, D.; Vilà-Ubach, M.; Biurrun, G.; Solórzano, C.O.; Montuenga, L.M.; Barreiro, E. Phenotypic and metabolic features of mouse diaphragm and gastrocnemius muscles in chronic lung carcinogenesis: Influence of underlying emphysema. *J. Transl. Med.* **2016**, *14*, 244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Salazar-Degracia, A.; Busquets, S.; Argilés, J.M.M.; Bargalló-Gispert, N.; López-Soriano, F.J.J.; Barreiro, E. Effects of the beta 2 agonist formoterol on atrophy signaling, autophagy, and muscle phenotype in respiratory and limb muscles of rats with cancer-induced cachexia. *Biochimie* **2018**, *149*, 79–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Salazar-Degracia, A.; Busquets, S.; Argilés, J.M.; López-Soriano, F.J.; Barreiro, E. Formoterol attenuates increased oxidative stress and myosin protein loss in respiratory and limb muscles of cancer cachectic rats. *PeerJ* **2017**, *5*, e4109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Salazar-Degracia, A.; Granado-Martínez, P.; Millán-Sánchez, A.; Tang, J.; Pons-Carretero, A.; Barreiro, E. Reduced lung cancer burden by selective immunomodulators elicits improvements in muscle proteolysis and strength in cachectic mice. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 18041–18052. [[CrossRef](#)]
8. Puig-Vilanova, E.; Rodríguez, D.A.; Lloreta, J.; Ausin, P.; Pascual-Guardia, S.; Broquetas, J.; Roca, J.; Gea, J.; Barreiro, E. Oxidative stress, redox signaling pathways, and autophagy in cachectic muscles of male patients with advanced COPD and lung cancer. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *79*, 91–108. [[CrossRef](#)]
9. Tresserra-Rimbau, A.; Lamuela-Raventós, R.M.; Moreno, J.J. Commentary Polyphenols, food and pharma. Current knowledge and directions for future research. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *156*, 186–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Xiao, J.; Sheng, X.; Zhang, X.; Guo, M.; Ji, X. Curcumin protects against myocardial infarction-induced cardiac fibrosis via SIRT1 activation in vivo and in vitro. *Drug Des. Devel. Ther.* **2016**, *10*, 1267–1277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Duan, W.; Yang, Y.; Yan, J.; Yu, S.; Liu, J.; Zhou, J.; Zhang, J.; Jin, Z.; Yi, D. The effects of curcumin post-treatment against myocardial ischemia and reperfusion by activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Basic Res. Cardiol.* **2012**, *107*, 263. [[CrossRef](#)]
12. Receno, C.N.; Liang, C.; Korol, D.L.; Atalay, M.; Heffernan, K.S.; Brutsaert, T.D.; Deruisseau, K.C. Effects of prolonged dietary curcumin exposure on skeletal muscle biochemical and functional responses of aged male rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1178. [[CrossRef](#)]
13. Huang, Z.; Ye, B.; Dai, Z.; Wu, X.; Lu, Z.; Shan, P.; Huang, W. Curcumin inhibits autophagy and apoptosis in hypoxia/reoxygenation-induced myocytes. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *11*, 4678–4684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Thaloor, D.; Miller, K.J.; Gephart, J.; Mitchell, P.O.; Pavlath, G.K. Systemic administration of the NF- κ B inhibitor curcumin stimulates muscle regeneration after traumatic injury. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **1999**, *277*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Mañas-García, L.; Guitart, M.; Duran, X.; Barreiro, E. Satellite cells and markers of muscle regeneration during unloading and reloading: Effects of treatment with resveratrol and curcumin. *Nutrients* **2020**, *12*, 1870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Busquets, S.; Carbó, N.; Almendro, V.; Quiles, M.T.; López-Soriano, F.J.; Argilés, J.M. Curcumin, a natural product present in turmeric, decreases tumor growth but does not behave as an anticachectic compound in a rat model. *Cancer Lett.* **2001**, *167*, 33–38. [[CrossRef](#)]
17. Jackson, J.R.; Ryan, M.J.; Hao, Y.; Alway, S.E. Mediation of endogenous antioxidant enzymes and apoptotic signaling by resveratrol following muscle disuse in the gastrocnemius muscles of young and old rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2010**, *299*, R1572–R1581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Chaplin, A.; Carpéné, C.; Mercader, J. Resveratrol, Metabolic Syndrome, and Gut Microbiota. *Nutrients* **2018**, *10*, 1651. [[CrossRef](#)]
19. Donnelly, L.E.; Newton, R.; Kennedy, G.E.; Fenwick, P.S.; Leung, R.H.F.; Ito, K.; Russell, R.E.K.; Barnes, P.J. Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: Molecular mechanisms. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2004**, *287*, L774–L783. [[CrossRef](#)]
20. Zhu, W.; Chen, S.; Li, Z.; Zhao, X.; Li, W.; Sun, Y.; Zhang, Z.; Ling, W.; Feng, X. Effects and mechanisms of resveratrol on the amelioration of oxidative stress and hepatic steatosis in KKAY mice. *Nutr. Metab.* **2014**, *11*, 35. [[CrossRef](#)]
21. Jiang, Q.; Cheng, X.; Cui, Y.; Xia, Q.; Yan, X.; Zhang, M.; Lan, G.; Liu, J.; Shan, T.; Huang, Y. Resveratrol regulates skeletal muscle fibers switching through the AdipoR1-AMPK-PGC-1 α pathway. *Food Funct.* **2019**, *10*, 3334–3343. [[CrossRef](#)]
22. Menzies, K.J.; Singh, K.; Saleem, A.; Hood, D.A. Sirtuin 1-mediated effects of exercise and resveratrol on mitochondrial biogenesis. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 6968–6979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Jarolim, S.; Millen, J.; Heeren, G.; Laun, P.; Goldfarb, D.S.; Breitenbach, M. A novel assay for replicative lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2004**, *5*, 169–177. [[CrossRef](#)]
24. Feng, Y.; He, Z.; Mao, C.; Shui, X.; Cai, L. Therapeutic Effects of Resveratrol Liposome on Muscle Injury in Rats. *Med. Sci. Monit.* **2019**, *25*, 2377–2385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Busquets, S.; Fuster, G.; Ametller, E.; Oliván, M.; Figueras, M.; Costelli, P.; Carbó, N.; Argilés, J.M.; López-Soriano, F.J. Resveratrol does not ameliorate muscle wasting in different types of cancer cachexia models. *Clin. Nutr.* **2007**, *26*, 239–244. [[CrossRef](#)]
26. Spencer, J.P.E.; Abd El Mohsen, M.M.; Minihane, A.-M.; Mathers, J.C. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: Strengths, limitations and application in nutrition research. *Br. J. Nutr.* **2008**, *99*, 12–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Mañas-garcía, L.; Bargalló, N.; Gea, J.; Barreiro, E. Muscle phenotype, proteolysis, and atrophy signaling during reloading in mice: Effects of curcumin on the gastrocnemius. *Nutrients* **2020**, *12*, 388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Mañas-García, L.; Penedo-Vázquez, A.; López-Postigo, A.; Deschrevel, J.; Durán, X.; Barreiro, E. Prolonged immobilization exacerbates the loss of muscle mass and function induced by cancer-associated cachexia through enhanced proteolysis in mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8167. [[CrossRef](#)]
29. Chacon-Cabrera, A.; Fermoselle, C.; Salmela, I.; Yelamos, J.; Barreiro, E. MicroRNA expression and protein acetylation pattern in respiratory and limb muscles of Parp-1^{-/-} and Parp-2^{-/-} mice with lung cancer cachexia. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2015**, *1850*, 2530–2543. [[CrossRef](#)]
30. Urtreger, A.J.; Diamant, M.J.; Ranuncolo, S.M.; Del, C. Vidal, M.; Puricelli, L.I.; Klein, S.M.; De Kier Joffe, E.D. New murine cellline derived from a spontaneous lung tumor induces paraneoplastic syndromes. *Int. J. Oncol.* **2001**, *18*, 639–647. [[CrossRef](#)]
31. Chacon-Cabrera, A.; Mateu-Jimenez, M.; Langohr, K.; Fermoselle, C.; García-Arumí, E.; Andreu, A.L.; Yelamos, J.; Barreiro, E. Role of PARP activity in lung cancer-induced cachexia: Effects on muscle oxidative stress, proteolysis, anabolic markers, and phenotype. *J. Cell. Physiol.* **2017**, *232*, 3744–3761. [[CrossRef](#)]
32. Pardo, P.S.; Boriek, A.M. The physiological roles of Sirt1 in skeletal muscle. *Aging* **2011**, *3*, 430–437. [[CrossRef](#)]
33. Ryall, J.G.; Dell’Orso, S.; Derfoul, A.; Juan, A.; Zare, H.; Feng, X.; Clermont, D.; Koulis, M.; Gutierrez-Cruz, G.; Fulco, M.; et al. The NAD⁺-dependent sirt1 deacetylase translates a metabolic switch into regulatory epigenetics in skeletal muscle stem cells. *Cell Stem Cell* **2015**, *16*, 171–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Barreiro, E.; Puig-Vilanova, E.; Salazar-Degracia, A.; Pascual-Guardia, S.; Casadevall, C.; Gea, J. The phosphodiesterase-4 inhibitor roflumilast reverts proteolysis in skeletal muscle cells of patients with COPD cachexia. *J. Appl. Physiol.* **2018**, *125*, 287–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Murillo Ortiz, B.O.; Fuentes Preciado, A.R.; Ramírez Emiliano, J.; Martínez Garza, S.; Ramos Rodríguez, E.; de Alba Macías, L.A. Recovery of Bone and Muscle Mass in Patients with Chronic Kidney Disease and Iron Overload on Hemodialysis and Taking Combined Supplementation with Curcumin and Resveratrol. *Clin. Interv. Aging* **2019**, *14*, 2055–2062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Tan, L.; Wang, W.; He, G.; Kuick, R.D.; Gossner, G.; Kueck, A.S.; Wahl, H.; Opiari, A.W.; Liu, J.R. Resveratrol inhibits ovarian tumor growth in an in vivo mouse model. *Cancer* **2016**, *122*, 722–729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Morselli, E.; Maiuri, M.C.; Markaki, M.; Megalou, E.; Pasparaki, A.; Palikaras, K.; Criollo, A.; Galluzzi, L.; Malik, S.A.; Vitale, I.; et al. Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death Dis.* **2010**, *1*, e10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Alway, S.E.; McCrory, J.L.; Kearcher, K.; Vickers, A.; Frear, B.; Gilleland, D.L.; Bonner, D.E.; Thomas, J.M.; Donley, D.A.; Lively, M.W.; et al. Resveratrol Enhances Exercise-Induced Cellular and Functional Adaptations of Skeletal Muscle in Older Men and Women. *J. Gerontol. Ser. A* **2017**, *72*, 1595–1606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Sharples, A.P.; Hughes, D.C.; Deane, C.S.; Saini, A.; Selman, C.; Stewart, C.E. Longevity and skeletal muscle mass: The role of IGF signalling, the sirtuins, dietary restriction and protein intake. *Aging Cell* **2015**, *14*, 511–523. [[CrossRef](#)]
40. Jhanji, M.; Rao, C.N.; Sajish, M. Towards resolving the enigma of the dichotomy of resveratrol: Cis- and trans-resveratrol have opposite effects on TyrRS-regulated PARP1 activation. *GeroScience* **2021**, *43*, 1171–1200. [[CrossRef](#)]
41. Sajish, M.; Schimmel, P. A human tRNA synthetase is a potent PARP1-activating effector target for resveratrol. *Nature* **2015**, *519*, 370–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Fernández-Castillejo, S.; Macià, A.; Motilva, M.J.; Catalán, Ú.; Solà, R. Endothelial Cells Deconjugate Resveratrol Metabolites to Free Resveratrol: A Possible Role in Tissue Factor Modulation. *Mol. Nutr. Food Res.* **2019**, *63*, 1800715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Yanez, M.; Jhanji, M.; Murphy, K.; Gower, R.M.; Sajish, M.; Jabbarzadeh, E. Nicotinamide Augments the Anti-Inflammatory Properties of Resveratrol through PARP1 Activation. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

RESULTADOS DESTACABLES:

En grupos de ratones con tumor tratados con curcumina o resveratrol comparados con ratones tumor no tratados:

El peso corporal y muscular se presenta aumentado junto con el tamaño fibrilar y la fuerza muscular. Además, el daño muscular producido por el tumor se ve disminuido en ambos grupos tratados con polifenoles, lo que también se ve reflejado en el descenso en los niveles de troponina I en sangre. Por su parte los niveles de Sirtuin-1 se vieron incrementados como efecto de ambos tratamientos, mientras que los niveles de marcadores de proteólisis descendieron significativamente, destacando: MuRF-1, Atrogin-1 y proteasoma. Por último, destacó la importante disminución de los factores de transcripción NFkB-p50 y FoxO3, como resultado de la sobreexpresión de Sirt-1, por parte de ambos grupos tratados con polifenoles.

DISCUSIÓN

La caquexia cancerosa supone un proceso de progresivo deterioro y pérdida de masa muscular. Este deterioro resulta como consecuencia del desarrollo de una enfermedad crónica, como el cáncer o EPOC, lo cual afectará desde un primer momento a las características principales del músculo esquelético, que son la fuerza y la resistencia (11,31,126–130).

Este desgaste muscular va a acarrear una mala prognosis para el paciente, que sufrirá unos efectos cada vez más agudizados de la patología que originó la caquexia. De esta forma, un paciente con cáncer, al desarrollar caquexia, disminuye enormemente su probabilidad de supervivencia ante este. Por una parte, el cuerpo del paciente está demasiado debilitado para luchar contra el avance de la enfermedad de forma natural, lo cual acaba favoreciendo el progreso de la enfermedad, y por otro lado, esta menor fuerza y resistencia disminuye en gran medida la tolerancia del paciente al tratamiento, lo que junto con la pérdida de las defensas naturales va a disminuir en gran medida su supervivencia y su calidad de vida (11,126–128). Ante esta situación, y teniendo en cuenta que la caquexia puede asociarse a numerosas enfermedades, es importante y necesario, la búsqueda de un tratamiento efectivo contra la caquexia, que mejore la calidad y la esperanza de vida de estos pacientes.

Estudios anteriores, confirmaron el modelo animal de caquexia cancerosa por inoculación subcutánea de células LP07, que permiten el desarrollo de un modelo murino de

caquexia cancerosa (11,12,128,131). De esta forma se logró representar esta afección a la perfección, con una pérdida de masa y fuerza muscular similar a la caquexia natural, y con una importante activación de las rutas de proteólisis, con aumento de sus componentes como MuRF-1 o Atrogin-1 y de marcadores moleculares de atrofia en los grupos tumor comparados a los grupos control sanos (11,12,57,128,131–135). A partir de la bibliografía del modelo animal de caquexia y de estudios que relacionaban la curcumina y el resveratrol con una menor pérdida de masa muscular (123), desarrollo de tumores, menor perfil oxidativo y mayor presencia de antioxidantes, permitieron el diseño del estudio de la presente tesis, para tratar de observar y validar el efecto protector de curcumina y resveratrol en un modelo murino de caquexia cancerosa.

Estos estudios previos anteriormente citados (10–12,57,126,128,131–135), confirmaron que en un modelo murino de caquexia cancerosa por inoculación de células tumorales, el peso corporal y muscular, el área de sus fibras y la fracción normal del músculo se ven enormemente reducidas por efecto del desarrollo del tumor, que aumenta el estrés oxidativo, el proceso inflamatorio y aumenta la expresión de marcadores de proteólisis.

Con estos precedentes se trató de probar la hipótesis mediante un modelo murino (Balb/c) de atrofia y caquexia muscular, por inoculación de células LP07, tratados con curcumina o resveratrol. De esta forma, como se mostró en la presente tesis, la hipótesis ha sido confirmada. Los

tratamientos con los dos polifenoles curcumina y resveratrol, activadores de la sirtuina-1, ejercieron un efecto protector contra la caquexia en un modelo murino ya que los ratones tratados presentaron un mayor peso corporal y muscular, mayor tamaño de sección en sus fibras musculares (gastrocnemio y sóleo) y además presentaron un menor perfil proteolítico que el grupo tumor no tratado.

En primer lugar, los grupos tratados presentan una disminución mucho menor en la variación del peso total de los ratones de cada grupo, donde se observó un descenso abrumador del peso de los ratones caquéticos no tratados, hasta valores no compatibles con la vida de los animales. Por su parte, en ambos grupos tratados, el descenso fue muy leve y significativamente menor que el del grupo no tratado. Además, destacó también el efecto protector de ambos polifenoles en la pérdida de músculo concentrado, como ocurre en el caso del peso de los gastrocnemios de los ratones, donde se observa un significativo aumento de peso en los grupos tratados frente al grupo caquético sin tratamiento. Lógicamente este mayor peso total y muscular en los grupos tratados, también marcaron diferencia en la prueba de fuerza, donde ambos grupos tratados mostraron un

aumento de la fuerza de las extremidades durante el proceso de estudio, es decir desde el día 0 al 30, en comparación al grupo no tratado que disminuyó su fuerza a lo largo del proceso, como consecuencia del desarrollo de la caquexia sin tratamiento.

En segundo lugar, los tratamientos además mostraron cierto

efecto protector a nivel de la estructura molecular del músculo esquelético de las extremidades. Tanto el gastrocnemio como el sóleo de ambos grupos de ratones caquéticos tratados, tanto con curcumina como resveratrol, mostraron una mayor área de sus fibras musculares, tanto de las fibras tipo I como de las fibras tipo II. Este mayor tamaño fibrilar se ve traducido en una mayor masa muscular, y por lo tanto en mayor fuerza muscular. A su vez, el deterioro que causa el tumor en las fibras, rompiéndolas, inflamándolas o necrosándolas se vio significativamente reducido en los grupos de ratones caquéticos tratados en comparación con el control caquético no tratado.

Por último, para completar el estudio in vivo y el análisis estructural, se realizaron diferentes pruebas para medir la proteólisis y el estado de las proteínas estructurales y funcionales de los distintos grupos de ratones. Se midió la concentración de la troponina I en sangre, que se utiliza en numerosos estudios como marcador de la proteólisis, y se realizaron pruebas de western-blotinmunoblot para hacer una comparación semicuantitativa, entre los grupos caquéticos tratados y el control caquético no tratado, de los marcadores proteicos claves en el estudio: desde los marcadores más comunes implicados en la proteólisis (MuRF-1, Atrogin-1, proteasoma, Ubiquitina total), proteínas estructurales del músculo (actina y miosina), proteínas implicadas en la señalización de la atrofia muscular (FoXO3, NFkB-p50) y por último se midió la concentración de Sirtuina-1 de cada grupo para comprobar la activación de esta deacetilasa por parte de

los dos polifenoles. Como resultado, se observó el efecto activador de los polifenoles ya que se confirmó el significativo aumento de Sirt-1 en ambos grupos tratados comparados con el grupo caquético control sin tratamiento. Esta activación de la sirtuina-1 por parte de los grupos tratados con curcumina o resveratrol podría ser la clave para los resultados observados en los marcadores de proteólisis y señalizadores de caquexia: Tanto los ratones caquéticos tratados con curcumina , como los tratados con resveratrol mostraron un perfil proteico con significativamente menor componente proteolítico y atrófico que el grupo control no tratado, que consecuentemente, mostró un perfil proteico con elevada presencia de marcadores de proteólisis y atrofia muscular.

Como se mostró anteriormente, ambos compuestos por separado ejercieron un efecto similar. Presentan ciertas cualidades estructurales comunes, ya que ambos son polifenoles, pero su origen natural es muy distinto. Por lo tanto, la razón de su efecto común se debe a su principal mecanismo de actuación: la activación de la deacetilasa sirtuina-1.

Estos descubrimientos resultaron en acuerdo con la biografía previa. El efecto protector de ambos polifenoles (105–107,119) por separado, para evitar la acelerada pérdida de peso corporal y muscular en procesos caquéticos, ya se había observado en modelos animales de otras patologías como problemas respiratorios, enfermedades hepáticas, anorexia reumatismos y sinusitis (102,106,107,121–123). Ambos tratamientos presentan, como se comentó, un mecanismo común, la activación de la sirtuina-1. Esta

activación, como se vio en estudios previos del grupo (9) y en la presente tesis produce una cascada de señalización, por aumento de la expresión de Sirt-1, que inhibe la expresión de los factores NF- κ B y FoxO (102,103,112–116,121,122,124,125), factores clave en la proteólisis muscular, y por lo tanto disminuye la pérdida de masa muscular y la reducción del área de las fibras que forman los músculos de los animales tratados por causa del tumor.

El efecto protector de la curcumina contra la proteólisis, ya se había observado en estudios anteriores del grupo (9), en los cuales el tratamiento con curcumina de animales con atrofia muscular por inmovilización, disminuía significativamente el perfil proteolítico, medido por la liberación de tirosina y la concentración de troponina I en sangre, que se verían significativamente reducidas. Además numerosos estudios confirmaron la regulación celular que ejerce la activación de Sirt-1, reduciendo la respuesta al estrés de las células, alterando su metabolismo y mejorando la supervivencia celular por desacetilación de proteínas diana (136–138). De esta forma se confirmarían estos anteriores resultados con los obtenidos en la presente tesis, en los que los valores de troponina I en sangre, usado como marcador de proteólisis en numerosos estudios, disminuyen en ambos grupos caquéticos tratados con curcumina o resveratrol en comparación con el grupo caquético control sin tratamiento. A este resultado se le une una menor fracción anormal presente en las fibras de los músculos de los grupos tratados con curcumina o resveratrol frente al grupo tumor no tratado,

confirmando este efecto protector de los polifenoles sobre la apoptosis de las células musculares inducida por daño en el material genético y por el estrés oxidativo (139–141).

La principal vía de proteólisis y desgaste muscular asociado a atrofia y a caquexia es el UPS. Es un sistema regulado por dos E3 ligasas de ubiquitina, atrogin-1 y MuRF-1 principalmente. Cuando se padece de caquexia o atrofia muscular por diferentes patologías o condiciones, estas ligasas se sobreexpresan, lo cual se ve traducido en un desequilibrio entre síntesis y degradación de proteínas, que lleva a los músculos a un estado de pérdida de masa muscular. Este aumento de atrogin-1 y MuRF-1 será responsable de una mayor ubiquitinación de proteínas que posteriormente serán degradadas por el proteasoma (77,87,142). Estudios previos del grupo y externos han confirmado el aumento de los distintos componentes del UPS en modelos de atrofia muscular por enfermedad crónica (12,104,128,143) o inmovilización (11,87,144) de las extremidades. Partiendo de estos conocimientos, para que la curcumina y el resveratrol fueran tratamientos válidos para la caquexia, debería observarse cierta reducción de esta sobreexpresión de marcadores de proteólisis. Destacaría aquí las diferencias significativas obtenidas de los grupos tratados con curcumina y resveratrol, que ambos grupos disminuyeron significativamente sus concentraciones de las E3 ligasas nombradas, MuRF-1 y atrogin-1, tanto en gastrocnemio como en soleo, además de que se observó una disminución significativa de la expresión de la subunidad C8-20S del

proteasoma. Estas disminuciones de los marcadores de proteólisis del UPS confirmaron los resultados obtenidos en el ELISA de troponina I en sangre y en el análisis de la fracción anormal de los músculos de las extremidades (gastrocnemio y sóleo). Estos resultados implican como consecuencia directa los resultados fisiológicos obtenidos, en los que los dos grupos tratados tanto con curcumina como con resveratrol presentan un menor perfil proteolítico, lo cual lógicamente se traduce en una mayor masa muscular como se ve reflejada en un mayor peso corporal y del gastrocnemio en los grupos tratados frente al grupo caquético no tratado.

Entre otros, estas alteraciones del UPS durante la caquexia cancerosa, vienen reguladas por factores de transcripción, siendo los más importantes las familias de NF- κ B y FoxOs. Por su parte los niveles proteicos de los factores FoxO se encuentran aumentados durante los procesos de atrofia y desgaste muscular por caquexia o inmovilización muscular, como se confirmó por anteriores estudios (11,80,87,144). Este aumento se ha relacionado con una mayor activación de las E3 ligasas de ubiquitina, que se traduce en una mayor degradación muscular. En la presente tesis, la desregulación de los factores FoxO se vio reducida en los dos grupostratados con polifenoles, en gastrocnemio y sóleo, en comparación con el grupo no tratado. Estos resultados serían acordes al resultado obtenido para las concentraciones de las E3 ligasas, ya que la disminución de FoxO3 concuerda con la disminución de MuRf-1 y atrogin-1.

A la par que FoxO, como se comentó con anterioridad, la vía

de señalización NF- κ B ejerce un papel regulatorio fundamental del desgaste y la atrofia muscular. Durante condiciones de atrofia y desgaste muscular, asociado a caquexia o inmovilización muscular, la familia NF- κ B se encuentra en mayor concentración en comparación con un individuo sano. Estudios previos (145,146) reportaron que una mayor expresión de factores de transcripción NF- κ B inducen una mayor atrofia fibrilar y una mayor pérdida de masa muscular, a través de una sobreexpresión y activación del UPS. Los resultados obtenidos en la presente tesis confirman la disminución de la expresión del factor de transcripción NF- κ B p50 como consecuencia de ambos tratamientos comparados con el control caquético no tratado.

Este proceso regulatorio vendrá desempeñado por la sirtuina-1, una deacetilasa implicada en la regulación de la atrofia y desgaste muscular. Sirt-1, tras su activación por parte de tanto la curcumina como del resveratrol, ejerce su acción principal sobre las familias de factores NF- κ B y FoxOs, regulando función a través de la desacetilación de estos factores. Estos resultados iban acordes a los publicados en otros estudios en el que estos factores eran desacetilados por la sirtuina-1(147–149). La reducción del perfil atrófico de los grupos caquéticos tratados puede deberse a la reducción tanto en autofagia como en proteólisis en respuesta a su tratamiento con los compuestos polifenólicos, como ponen de acuerdo otros estudios que afirman que el tratamiento con compuestos polifenólicos reduce la ratio de núcleos apoptóticos en el músculo (150–152).

Tomando en consideración los resultados obtenidos, junto con las afirmaciones de otros estudios sobre los efectos positivos de la curcumina sobre el aumento de la síntesis proteica, por medio del bloqueo de la vía NF-kB, indican los efectos beneficiosos que ejerce la curcumina sobre el gastrocnemio de los ratones, gracias a la reducción de la proteólisis y al aumento de la síntesis (109,118,153). Además, el resveratrol también se vio relacionado con el aumento de la proliferación de precursores miogénicos, mejorando la reparación muscular tras el daño. De esta forma estos dos compuestos se ha confirmado que por una parte inhiben las rutas proteolíticas y atroficas por medio de la activación de Sirt-1, y por otra parte potencian la síntesis proteica. Esta afirmación con la confirmación de la hipótesis de la presente tesis, pone de manifiesto la importancia de tanto la curcumina y resveratrol como tratamiento contra la caquexia producida por enfermedades crónicas, como en este caso el cáncer de pulmón.

CONCLUSIÓN

Los compuestos polifenólicos, curcumina y resveratrol, ejercieron un efecto protector sobre los músculos rápidos y lentos en ratones caquéticos, debido a la activación que ejercen sobre el mecanismo dependiente de sirtuina-1.

La fuerza muscular, el peso total y muscular, el tamaño de las fibras musculares y la reducción del daño muscular y niveles de troponina I mejoraron en gran medida en los ratones tratados con curcumina o resveratrol.

El efecto protector de los polifenoles viene determinado además de por la activación de Sirt-1, por la inactivación de mecanismos de atrofia como el de la familia FoXO y NF-kB.

Los tratamientos de la caquexia cancerosa con curcumina y resveratrol en ratones ejercieron un poderoso efecto protector contra la caquexia, con una importante mejora de la función y la estructura muscular. Este descubrimiento nos permite presentar a ambos polifenoles como un posible tratamiento contra la caquexia.

PRESPETIVAS FUTURAS

Investigaciones futuras deberían tratar de explorar el potencial de estos polifenoles con un tratamiento más prolongado, para tratar de comprender los beneficios totales de estos polifenoles y su efecto protector. Podría realizarse con este cometido un estudio comparativo entre diferentes periodos de tratamiento y tratar de hallar la pauta de tratamiento que mejores beneficios produzca.

Además, estos tratamientos con polifenoles no son tan invasivos como otros tratamientos contra estas patologías, por lo que se podría también, tratar de hallar una combinación entre un tratamiento químico, como sería el tratamiento con polifenoles, y un tratamiento físico, como un entrenamiento muscular, también poco invasivo y que con cierta certeza sería una buena terapia frente a la caquexia y atrofia muscular.

Con esta idea se podría tratar de diseñar un tratamiento paralelo, poco invasivo y centrado en la caquexia cancerosa, para complementar el tratamiento a la enfermedad que produce esta caquexia. En nuestro caso se trataría de desarrollar un entrenamiento y una pauta nutritiva complementaria a la quimioterapia, que mejore el estado físico del paciente, permitiéndole una mayor resistencia a la quimioterapia, y por lo tanto una mejor calidad de vida y mejores perspectivas de futuro.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tortora GJ, Derrickson B. anatomy & physiology.
2. Ojima K. Myosin: Formation and maintenance of thick filaments. *Anim Sci J*. 2019;90(7):801–7.
3. Frontera WR, Ochala J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. 2015;183–95.
4. Trovato FM, Imbesi R, Conway N, Castrogiovanni P. Morphological and Functional Aspects of Human Skeletal Muscle. :289–302.
5. Khonsary S. Guyton and Hall: Textbook of Medical Physiology. *Surg Neurol Int* [Internet]. 2017
6. Lin BL, Song T, Sadayappan S. Myofilaments: Movers and Rulers of the Sarcomere. *Compr Physiol*. 2017 Mar;7(2):675–92.
7. Henderson CA, Gomez CG, Novak SM, Mi-Mi L, Gregorio CC. Overview of the muscle cytoskeleton. *Compr Physiol*. 2017;7(3):891–944.
8. Salazar-Degracia A, Busquets S, Argilés JMM, Bargalló-Gispert N, López-Soriano FJJ, Barreiro E. Effects of the beta 2 agonist formoterol on atrophy signaling, autophagy, and muscle phenotype in respiratory and limb muscles of rats with cancer-induced cachexia. *Biochimie* [Internet]. 2018 Jun 1
9. Mañas-garcía L, Bargalló N, Gea J, Barreiro E. Muscle

phenotype, proteolysis, and atrophy signaling during reloading in mice: effects of curcumin on the gastrocnemius. *Nutrients*. 2020;12(2).

10. Wiley J. Reduced lung cancer burden by selective immunomodulators elicits improvements in muscle proteolysis and strength in cachectic mice. *Journal: Journal of Cellular Physiology* Manuscript ID JCP.
11. Chacon-Cabrera A, Lund-Palau H, Gea J, Barreiro E. Time-Course of muscle mass loss, damage, and proteolysis in gastrocnemius following unloading and reloading: Implications in chronic diseases. *PLoS One*. 2016;11(10):1–30.
12. Chacon-Cabrera A, Fermoselle C, Urtreger AJ, Mateu-Jimenez M, Diament MJ, de Kier Joffé EDB, et al. Pharmacological Strategies in Lung Cancer-Induced Cachexia: Effects on Muscle Proteolysis, Autophagy, Structure, and Weakness. *J Cell Physiol*. 2014;229(11).
13. Hirsch BE. Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice. Vol. 301, *Jama*. 2009. p. 1825.
14. Chacon-Cabrera A, Fermoselle C, Urtreger AJ, Mateu-Jimenez M, Diament MJ, de Kier Joffé EDB, et al. Pharmacological Strategies in Lung Cancer-Induced Cachexia: Effects on Muscle Proteolysis, Autophagy, Structure, and Weakness. *J Cell Physiol* [Internet]. 2014 Nov 1
15. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in Mammalian

- skeletal muscles. *Physiol Rev* [Internet]. 2011 Oct
16. Blaauw B, Schiaffino S, Reggiani C. Mechanisms Modulating Skeletal Muscle Phenotype. In: *Comprehensive Physiology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013
 17. Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* [Internet]. 2000 Sep 15
 18. Single Muscle Fiber Proteomics Reveals Fiber-Type-Specific Features of Human Muscle Aging | Elsevier Enhanced Reader [Internet].
 19. Talbot J, Maves L. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease [Internet]. Vol. 5, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. John Wiley and Sons Inc.; 2016
 20. Gea J, Pascual S, Casadevall C, Orozco-Levi M, Barreiro E. Muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: update on causes and biological findings. *J Thorac Dis* [Internet]. 2015;7(10):E418-38.
 21. Ciciliot S, Rossi AC, Dyar KA, Blaauw B, Schiaffino S. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting [Internet]. Vol. 45, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Elsevier Ltd; 2013
 22. Qaisar R, Bhaskaran S, Van Remmen H. Muscle fiber

- type diversification during exercise and regeneration. *Free Radic Biol Med*. 2016 Sep 1;98:56–67.
23. Murgia M, Toniolo L, Nagaraj N, Ciciliot S, Vindigni V, Schiaffino S, et al. Single Muscle Fiber Proteomics Reveals Fiber-Type-Specific Features of Human Muscle Aging. *Cell Rep* [Internet]. 2017 Jun 13
 24. Polla B, D'Antona G, Bottinelli R, Reggiani C. Respiratory muscle fibres: Specialisation and plasticity [Internet]. Vol. 59, *Thorax*. Thorax; 2004
 25. Galpin AJ, Raue U, Jemiolo B, Trappe TA, Harber MP, Minchev K, et al. Human skeletal muscle fiber type specific protein content. *Anal Biochem* [Internet]. 2012 Jun 15
 26. Scott W, Stevens J, Binder–Macleod SA. Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications. *Phys Ther* [Internet]. 2001 Nov 1
 27. Lessa TB, de Abreu DK, Bertassoli BM, Ambrósio CE. Diaphragm: A vital respiratory muscle in mammals [Internet]. Vol. 205, *Annals of Anatomy*. Elsevier GmbH; 2016
 28. Barreiro E, Jaitovich A. Muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease: molecular basis and potential therapeutic targets. *J Thorac Dis* [Internet]. 2018;10(Suppl 12):S1415–24.
 29. Gea J, Pascual S, Casadevall C, Orozco-Levi M, Barreiro E. Muscle dysfunction in chronic obstructive

- pulmonary disease: Update on causes and biological findings [Internet]. Vol. 7, Journal of Thoracic Disease. Pioneer Bioscience Publishing; 2015
30. Gea J, Agustí A, Roca J. HIGHLIGHTED TOPIC Muscle Dysfunction in COPD Pathophysiology of muscle dysfunction in COPD. J Appl Physiol [Internet]. 2013
 31. Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, et al. Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus [Internet]. Vol. 12, The Lancet Oncology. Lancet Oncol; 2011
 32. Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, López-Soriano FJ. Cachexia and sarcopenia: Mechanisms and potential targets for intervention [Internet]. Vol. 22, Current Opinion in Pharmacology. Elsevier Ltd; 2015
 33. Evans WJ, Morley JE, Argilés J. UC Irvine UC Irvine Previously Published Works Title Cachexia: a new definition Permalink Publication Date. Clin Nutr [Internet]. 2008
 34. Anker SD, Coats AJS, Morley JE, Rosano G, Bernabei R, von Haehling S, et al. Muscle wasting disease: A proposal for a new disease classification [Internet]. Vol. 5, Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle. Wiley Online Library; 2014
 35. Argilés JM, Anker SD, Evans WJ, Morley JE, Fearon KCH, Strasser F, et al. Consensus on cachexia

- definitions [Internet]. Vol. 11, Journal of the American Medical Directors Association. Elsevier Inc.; 2010
36. Sakuma K, Yamaguchi A. Sarcopenia and cachexia: The adaptations of negative regulators of skeletal muscle mass. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2012;3(2):77–94.
 37. Penet MF, Bhujwalla ZM. Cancer cachexia, recent advances, and future directions [Internet]. Vol. 21, *Cancer Journal (United States)*. Lippincott Williams and Wilkins; 2015
 38. Haehling S, Anker MS, Anker SD. Prevalence and clinical impact of cachexia in chronic illness in Europe, USA, and Japan: facts and numbers update 2016. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* [Internet]. 2016 Dec 2
 39. Scott HR, McMillan DC, Brown DJF, Forrest LM, McArdle CS, Milroy R. A prospective study of the impact of weight loss and the systemic inflammatory response on quality of life in patients with inoperable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* [Internet]. 2003 Jun 1
 40. Blum D, Stene GB, Solheim TS, Fayers P, Hjermstad MJ, Baracos VE, et al. Validation of the Consensus-Definition for Cancer Cachexia and evaluation of a classification model-a study based on data from an international multicentre project (EPCRC-CSA). *Ann Oncol* [Internet]. 2014

41. Baracos V, Martin L, Korc M, Guttridge DC. Cancer-associated cachexia International audit of Nutrition care in patients with FORegut tuMors (INFORM) View project.
42. Bennani-Baiti N, Walsh D. Animal models of the cancer anorexia-cachexia syndrome. Support Care Cancer [Internet]. 2011 Sep 17
43. Barreiro E, Puig-Vilanova E, Salazar-Degracia A, Pascual-Guardia S, Casadevall C, Gea J. The phosphodiesterase-4 inhibitor roflumilast reverts proteolysis in skeletal muscle cells of patients with COPD cachexia. J Appl Physiol [Internet]. 2018;125(2):287–303.
44. Salazar-Degracia A, Granado-Martínez P, Millán-Sánchez A, Tang J, Pons-Carreto A, Barreiro E. Reduced lung cancer burden by selective immunomodulators elicits improvements in muscle proteolysis and strength in cachectic mice. J Cell Physiol [Internet]. 2019 Oct 1
45. Busquets S, Pérez-Peiró M, Salazar-Degracia A, Argilés JM, Serpe R, Rojano-Toimil A, et al. Differential structural features in soleus and gastrocnemius of carnitine-treated cancer cachectic rats. J Cell Physiol [Internet]. 2020 Jan 26
46. Chacon-Cabrera A, Mateu-Jimenez M, Langohr K, Fermoselle C, García-Arumí E, Andreu AL, et al. Role of PARP activity in lung cancer-induced cachexia:

Effects on muscle oxidative stress, proteolysis, anabolic markers, and phenotype. *J Cell Physiol* [Internet]. 2017 Dec 1

47. Chacon-Cabrera A, Fermoselle C, Salmela I, Yelamos j, barreiro e. Microrna expression and protein acetylation pattern in Respiratory and limb muscles of *parp-1-/-* and *parp-2-/-* mice with lung cancer cachexia. *Biochim Biophys Acta*. 2015
48. Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ. Reactive oxygen species: Impact on skeletal muscle. *Compr Physiol* [Internet]. 2011 Apr
49. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [Internet]. Vol. 39, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. *Int J Biochem Cell Biol*; 2007
50. Barreiro E. Protein carbonylation and muscle function in COPD and other conditions. *Mass Spectrom Rev* [Internet]. 2014;33(3):219–36.
51. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state [Internet]. Vol. 15, *Nutrition Journal*. BioMed Central Ltd.; 2016
52. Barreiro E, Fermoselle C, Mateu-Jimenez M, Sanchez-Font A, Pijuan L, Gea J, et al. Oxidative stress and inflammation in the normal airways and blood of

- patients with lung cancer and COPD. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2013;65:859–71.
53. Reid MB, Moylan JS. Beyond atrophy: Redox mechanisms of muscle dysfunction in chronic inflammatory disease. In: *Journal of Physiology* [Internet]. *J Physiol*; 2011
 54. Powers SK, Morton AB, Ahn B, Smuder AJ. Redox control of skeletal muscle atrophy. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2016 Sep 1
 55. Sriram S, Subramanian S, Sathiakumar D, Venkatesh R, Salerno MS, McFarlane CD, et al. Modulation of reactive oxygen species in skeletal muscle by myostatin is mediated through NF- κ B. *Aging Cell* [Internet]. 2011 Dec 1
 56. Barreiro E, Hussain SNA. Protein carbonylation in skeletal muscles: Impact on function [Internet]. Vol. 12, *Antioxidants and Redox Signaling. Antioxid Redox Signal*; 2010
 57. Argilés JM, Busquets S, Toledo M, López-Soriano FJ. The role of cytokines in cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care* [Internet]. 2009 Dec
 58. Seruga B, Zhang H, Bernstein LJ, Tannock IF. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer [Internet]. Vol. 8, *Nature Reviews Cancer. Nat Rev Cancer*; 2008

59. Patel HJ, Patel BM. TNF- α and cancer cachexia: Molecular insights and clinical implications. Vol. 170, Life Sciences. Elsevier Inc.; 2017. p. 56–63.
60. Londhe P, Guttridge DC. Inflammation induced loss of skeletal muscle [Internet]. Vol. 80, Bone. Elsevier Inc.; 2015
61. Zhou J, Liu B, Liang C, Li Y, Song YH. Cytokine Signaling in Skeletal Muscle Wasting [Internet]. Vol. 27, Trends in Endocrinology and Metabolism. Elsevier Inc.; 2016
62. Li Y-P, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, et al. TNF- α acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. FASEB J [Internet]. 2005 Mar
63. Costamagna D, Costelli P, Sampaolesi M, Penna F. Role of Inflammation in Muscle Homeostasis and Myogenesis. Vol. 2015, Mediators of Inflammation. Hindawi Limited; 2015.
64. Utech AE, Tadros EM, Hayes TG, Garcia JM. Predicting survival in cancer patients: The role of cachexia and hormonal, nutritional and inflammatory markers. J Cachexia Sarcopenia Muscle [Internet]. 2012
65. Spruit MA, Singh SJ, Garvey C, ZuWallack R, Nici L, Rochester C, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: key

- concepts and advances in pulmonary rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2013;188(8):e13-64.
66. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 [Internet]. Vol. 1813, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. *Biochim Biophys Acta*; 2011 Carson JA, Hardee JP, VanderVeen BN. The emerging role of skeletal muscle oxidative metabolism as a biological target and cellular regulator of cancer- induced muscle wasting [Internet]. Vol. 54, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Academic Press; 2016
67. Narsale AA, Carson JA. Role of interleukin-6 in cachexia: Therapeutic Implications [Internet]. Vol. 8, *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*. Lippincott Williams and Wilkins; 2014
68. Barreiro E. Epigenetics and Muscle Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. In: *Translating Epigenetics to the Clinic*. Elsevier Inc.; 2017. p. 71–95.
69. Barreiro E, Gea J. Respiratory and Limb Muscle Dysfunction in COPD. *COPD* [Internet]. 2015;12(4):413–26
70. Barreiro E, Gea J. Molecular and biological pathways of skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Chron Respir Dis* [Internet]. 2016 Aug 23
71. Alamdari N, Aversa Z, Castellero E, Hasselgren PO.

Acetylation and deacetylation - Novel factors in muscle wasting [Internet]. Vol. 62, Metabolism: Clinical and Experimental. Metabolism; 2013

72. Bianchi M, Renzini A, Adamo S, Moresi V. Coordinated actions of microRNAs with other epigenetic factors regulate skeletal muscle development and adaptation [Internet]. Vol. 18, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2017
73. Wall BT, Dirks ML, Snijders T, van Dijk JW, Fritsch M, Verdijk LB, et al. Short-term muscle disuse lowers myofibrillar protein synthesis rates and induces anabolic resistance to protein ingestion. Am J Physiol - Endocrinol Metab [Internet]. 2016 Jan 15;310(2):E137–47.
74. Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. Med Hypotheses [Internet]. 2007;69(2):310–21.
75. Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy [Internet]. Vol. 287, American Journal of Physiology - Cell Physiology. Am J Physiol Cell Physiol; 2004
76. Gordon BS, Kelleher AR, Kimball SR. Regulation of muscle protein synthesis and the effects of catabolic states [Internet]. Vol. 45, International Journal of Biochemistry and Cell Biology. Elsevier Ltd; 2013. p. 2147–57.

77. Bergouignan A, Rudwill F, Simon C, Blanc S. Physical inactivity as the culprit of metabolic inflexibility: evidence from bed-rest studies [Internet]. Vol. 111, Journal of Applied Physiology. J Appl Physiol (1985); 2011. p. 1201–10.
78. Chacon-Cabrera A, Gea J, Barreiro E. Short- and Long-Term Hindlimb Immobilization and Reloading: Profile of Epigenetic Events in Gastrocnemius. J Cell Physiol [Internet]. 2017 Jun ;232(6):1415–27.
79. Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, et al. FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophying Muscle Cells. Cell Metab [Internet]. 2007 Dec 5;6(6):472–83.
80. Wang Y, Liu N, Zhang Z. Respiratory electrophysiologic studies in chronic obstructive pulmonary disease. Med [Internet]. 2019/01/05. 2019;98(1):e13993.
81. Schiaffino S, Mammucari C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: Insights from genetic models [Internet]. Vol. 1, Skeletal Muscle. Skelet Muscle; 2011
82. Li Y, Li Y, Han F, Yu H, Yang T, Guan W, et al. The role of the PI3K/AKT/mTOR protein synthesis pathway in the skeletal muscle atrophy induced by COPD. Int J Clin Exp Med. 2016;9(3):5677–87.

83. Bonifacio A, Sanvee GM, Bouitbir J, Krähenbühl S. The AKT/mTOR signaling pathway plays a key role in statin-induced myotoxicity. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2015 Aug 1;1853(8):1841–9.
84. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network [Internet]. Vol. 169, *Cell*. Cell Press; 2017. p. 381–405.
85. White JP, Puppa MJ, Gao S, Sato S, Welle SL, Carson JA. Muscle mTORC1 suppression by IL-6 during cancer cachexia: A role for AMPK. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* [Internet]. 2013 May 15;304(10).
86. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy [Internet]. Vol. 6, *DMM Disease Models and Mechanisms*. Dis Model Mech; 2013. p. 25–39.
87. Gao Y, Arfat Y, Wang H, Goswami N. Muscle atrophy induced by mechanical unloading: Mechanisms and potential countermeasures [Internet]. Vol. 9, *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A.; 2018
88. Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy [Internet]. Vol. 23, *Physiology*. Physiology (Bethesda); 2008. p. 160–70.
89. Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, et al. FoxO3 Controls Autophagy in Skeletal Muscle In Vivo. *Cell Metab* [Internet]. 2007 Dec 5;6(6):458–71.

90. Sandri M. Protein breakdown in muscle wasting: Role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome [Internet]. Vol. 45, International Journal of Biochemistry and Cell Biology. Elsevier Ltd; 2013. p. 2121–9.
91. Peterson JM, Bakkar N, Guttridge DC. NF- κ B signaling in skeletal muscle health and disease [Internet]. Vol. 96, Current Topics in Developmental Biology. Curr Top Dev Biol; 2011. 85-119 p.
92. Mourkioti F, Rosenthal N. NF- κ B signaling in skeletal muscle: Prospects for intervention in muscle diseases [Internet]. Vol. 86, Journal of Molecular Medicine. Springer; 2008. p. 747–59.
93. Bakkar N, Guttridge DC. NF- κ B signaling: A tale of two pathways in skeletal myogenesis [Internet]. Vol. 90, Physiological Reviews. Physiol Rev; 2010. p. 495–511.
94. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy [Internet]. Vol. 280, FEBS Journal. FEBS J; 2013. p. 4294–314.
95. Zhao Q, Yang ST, Wang JJ, Zhou J, Xing SS, Shen CC, et al. TNF alpha inhibits myogenic differentiation of C2C12 cells through NF- κ B activation and impairment of IGF-1 signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2015 Mar 20;458(4):790–5.
96. Li H, Malhotra S, Kumar A. Nuclear factor-kappa B

- signaling in skeletal muscle atrophy [Internet]. Vol. 86, Journal of Molecular Medicine. J Mol Med (Berl); 2008. p. 1113–26.
97. Adams J. The proteasome: Structure, function, and role in the cell [Internet]. Vol. 29, Cancer Treatment Reviews. W.B. Saunders Ltd; 2003 [cited 2021 Feb 1]. p. 3–9.
 98. Bence NF, Sampat RM, Kopito RR. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. Science (80-) [Internet]. 2001 May 25;292(5521):1552–5.
 99. Powers SK. Can Antioxidants Protect Against Disuse Muscle Atrophy? [Internet]. Vol. 44, Sports Medicine. Springer International Publishing; 2014. p. 155–65.
 100. Grabowska W, Sikora E, Bielak-Zmijewska A. Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process [Internet]. Vol. 18, Biogerontology. Springer Netherlands; 2017. p. 447–76.
 101. Yang T, Wang L, Zhu M, Zhang L, Yan L. Properties and molecular mechanisms of resveratrol: A review [Internet]. Vol. 70, Pharmazie. Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH; 2015. p. 501–6.
 102. Baltaci SB, Mogulkoc R, Baltaci AK. Resveratrol and exercise (review). Biomed Reports [Internet]. 2016 Nov 1; 5(5):525–30.
 103. Mañas-García L, Penedo-Vázquez A, López-Postigo A,

Deschrevel J, Durán X, Barreiro E. Prolonged immobilization exacerbates the loss of muscle mass and function induced by cancer-associated cachexia through enhanced proteolysis in mice. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21).

104. Singh S. From Exotic Spice to Modern Drug? [Internet]. Vol. 130, *Cell. Cell Press*; 2007 [cited 2021 Feb 4]. p. 765–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17803897/>
105. Corson TW, Crews CM. Molecular Understanding and Modern Application of Traditional Medicines: Triumphs and Trials [Internet]. Vol. 130, *Cell. Cell*; 2007 [cited 2021 Feb 4]. p. 769–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17803898/>
106. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: The Indian solid gold [Internet]. Vol. 595, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2007. p. 1–75.
107. Yang Y, Duan W, Lin Y, Yi W, Liang Z, Yan J, et al. SIRT1 activation by curcumin pretreatment attenuates mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2013;65:667–79.
108. Chen Y, Shu W, Chen W, Wu Q, Liu H, Cui G. Curcumin, both histone deacetylase and p300/CBP-

- specific inhibitor, represses the activity of nuclear factor kappa B and Notch 1 in Raji cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2007 Dec;101(6):427–33.
109. Franceschi F, Feregalli B, Togni S, Cornelli U, Giacomelli L, Eggenhoffner R, et al. A novel phospholipid delivery system of curcumin (Meriva®) preserves muscular mass in healthy aging subjects. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* [Internet]. 2016 Jan 1;20(4):762–6.
 110. Huang Z, Ye B, Dai Z, Wu X, Lu Z, Shan P, et al. Curcumin inhibits autophagy and apoptosis in hypoxia/reoxygenation-induced myocytes. *Mol Med Rep*. 2015 Jun;11(6):4678–84.
 111. He J, Xie H, Wu S. Dietary Supplementation of Curcumin Alleviates NF- κ B-dependent Skeletal Muscle Wasting in Rat. *Endocrine, Metab Immune Disord - Drug Targets* [Internet]. 2016 Jun 25;16(2):140–7.
 112. Aggarwal BB, Gupta SC, Sung B. Curcumin: An orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers [Internet]. Vol. 169, *British Journal of Pharmacology*. *Br J Pharmacol*; 2013. p. 1672–92.
 113. Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, et al. Mammalian SIRT1 Represses Forkhead Transcription Factors. *Cell* [Internet]. 2004 Feb 20; 116(4):551–63.
 114. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL,

- Lin Y, et al. Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase. *Science* (80-) [Internet]. 2004 Mar 26;303(5666):2011–5.
115. Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Aratani S, Ohshima T, Miyagishi M, et al. Silent information regulator 2 potentiates Foxo 1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004 Jul 6;101(27):10042–7.
116. Poylin V, Fareed MU, Neal PO, Alamdari N, Reilly N, Menconi M, et al. The NF- κ B Inhibitor Curcumin Blocks Sepsis-Induced Muscle Proteolysis. 2008;2008.
117. Jin B, Li YP. Curcumin prevents lipopolysaccharide-induced atrogen-1/MAFbx upregulation and muscle mass loss. *J Cell Biochem* [Internet]. 2007 Mar 1;100(4):960–9.
118. Yun JM, Chien A, Jialal I, Devaraj S. Resveratrol up-regulates SIRT1 and inhibits cellular oxidative stress in the diabetic milieu: Mechanistic insights. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2012 Jul;23(7):699–705.
119. Frémont L. Minireview: Biological effects of resveratrol [Internet]. Vol. 66, *Life Sciences*. *Life Sci*; 2000. p. 663–73.
120. Zhang J, Chen J, Yang J, Xu C-W, Pu P, Ding J-W, et al. Resveratrol Attenuates Oxidative Stress Induced by Balloon Injury in the Rat Carotid Artery Through Actions on the ERK1/2 and NF-Kappa B Pathway. *Cell Physiol*

Biochem [Internet]. 2013; 31(2– 3):230–41.

121. Kan NW, Lee MC, Tung YT, Chiu CC, Huang CC, Huang WC. The synergistic effects of resveratrol combined with resistant training on exercise performance and physiological adaptation. *Nutrients* [Internet]. 2018 Oct 1;10(10).
122. Liu C-W, Huang C-C, Hsu C-F, Li T-H, Tsai Y-L, Lin M-W, et al. SIRT1-dependent mechanisms and effects of resveratrol for amelioration of muscle wasting in NASH mice. *BMJ Open Gastroenterol*. 2020;7(1):e000381.
123. Asami Y, Aizawa M, Kinoshita M, Ishikawa J, Sakuma K. Resveratrol attenuates denervation-induced muscle atrophy due to the blockade of atrogen-1 and p62 accumulation. *Int J Med Sci*. 2018 Apr 3;15(6):628–37.
124. Chang CC, Yang MH, Tung HC, Chang CY, Tsai YL, Huang JP, et al. Resveratrol exhibits differential protective effects on fast- and slow-twitch muscles in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Diabetes* [Internet]. 2014 Jan;6(1):60–7.
125. Chacon-Cabrera A, Mateu-Jimenez M, Langohr K, Femoselle C, García-Arumí E, Andreu AL, et al. Role of PARP activity in lung cancer-induced cachexia: Effects on muscle oxidative stress, proteolysis, anabolic markers, and phenotype. *J Cell Physiol* [Internet]. 2017 Dec 1; 232(12):3744–61.
126. Chacon-Cabrera A, Femoselle C, Urtreger AJ, Mateu-

- Jimenez M, Diament MJ, de Kier Joffé EDB, et al. Pharmacological Strategies in Lung Cancer-Induced Cachexia: Effects on Muscle Proteolysis, Autophagy, Structure, and Weakness. *J Cell Physiol* [Internet]. 2014 Nov 1;229(11):1660–72.
127. Salazar-Degracia A, Blanco D, Vilà-Ubach M, Biurrun G, Solórzano CO, Montuenga LM, et al. Phenotypic and metabolic features of mouse diaphragm and gastrocnemius muscles in chronic lung carcinogenesis: Influence of underlying emphysema. *J Transl Med*. 2016 Aug;14(1).
128. Argilés JM, Busquets S, Toledo M, López-Soriano FJ. The role of cytokines in cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care* [Internet]. 2009 Dec 3(4):263–8. /
129. Bermúdez M, Becerra R, Galvis JC. Sarcopenia versus Caquexia. *Rev Repert Med y Cirugía* [Internet]. 2015 Mar 1 24(1):7–15.
130. Mateu-Jimenez M, Curull V, Rodriguez-Fuster A, Aguilo R, Sanchez-Font A, Pijuan L, et al. Profile of epigenetic mechanisms in lung tumors of patients with underlying chronic respiratory conditions. *Clin Epigenetics* [Internet]. 2018;10:7.
131. Tsubouchi H, Yanagi S, Miura A, Matsumoto N, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin relieves cancer cachexia associated with the development of lung adenocarcinoma in mice. *Eur J Pharmacol* [Internet].

2014 Nov 15; 743:1–10.

132. Toledo M, Penna F, Oliva F, Luque M, Betancourt A, Marmonti E, et al. A multifactorial anti-cachectic approach for cancer cachexia in a rat model undergoing chemotherapy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* [Internet]. 2016 Mar 1 7(1):48–59.
133. Penna F, Bonetto A, Aversa Z, Minero VG, Rossi Fanelli F, Costelli P, et al. Effect of the specific proteasome inhibitor bortezomib on cancer-related muscle wasting. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* [Internet]. 2016 Jun 1];7(3):345–54.
134. Piegari M, Ortiz S, Díaz MDP, Eynard AR, Valentich MA. Characterization of a murine lung adenocarcinoma (LAC1), a useful experimental model to study progression of lung cancer. *J Exp Ther Oncol*. 2011;9(3):231–9.
135. Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE, Fenwick PS, Leung RHF, Ito K, et al. Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: Molecular mechanisms. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2004 Oct; 287(4 31-4).
136. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* [Internet]. 2003 Sep 11
137. Horio Y, Hayashi T, Kuno A, Kunimoto R. Cellular and

molecular effects of sirtuins in health and disease
[Internet]. Vol. 121, Clinical Science. Clin Sci (Lond);
2011

138. Tanno M, Kuno A, Yano T, Miura T, Hisahara S, Ishikawa S, et al. Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Mar 12
139. Longo VD, Kennedy BK. Sirtuins in Aging and Age-Related Disease [Internet]. Vol. 126, Cell. Elsevier B.V.; 2006
140. Haigis MC, Guarente LP. Mammalian sirtuins - Emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction [Internet]. Vol. 20, Genes and Development. *Genes Dev*; 2006 [cited 2021 May 17]. p. 2913–21.
141. Barreiro E, Sznajder JI, Nader GA, Budinger GRS. Muscle dysfunction in patients with lung diseases a growing epidemic. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191(6).
142. Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ. Cancer cachexia, a clinical challenge. *Curr Opin Oncol*. 2019 Jul;31(4):286–90.
143. Chacon-Cabrera A, Gea J, Barreiro E. Short- and Long-Term Hindlimb Immobilization and Reloading: Profile of Epigenetic Events in Gastrocnemius. *J Cell Physiol*. 2017;232(6):1415–27.

144. Schmidt SF, Rohm M, Herzig S, Berriel Diaz M. Cancer Cachexia: More Than Skeletal Muscle Wasting [Internet]. Vol. 4, Trends in Cancer. Cell Press; 2018 [cited 2021 May 17]. p. 849–60.
145. He WA, Berardi E, Cardillo VM, Acharyya S, Aulino P, Thomas-Ahner J, et al. NF- κ B-mediated Pax7 dysregulation in the muscle microenvironment promotes cancer cachexia. *J Clin Invest* [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2021 May 17];123(11):4821–35.
146. Park S-J, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, et al. Resveratrol Ameliorates Aging-Related Metabolic Phenotypes by Inhibiting cAMP Phosphodiesterases.
147. Alway SE, McCrory JL, Kearcher K, Vickers A, Frear B, Gilleland DL, et al. Resveratrol Enhances Exercise-Induced Cellular and Functional Adaptations of Skeletal Muscle in Older Men and Women. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* [Internet]. 2017 Nov 9 [cited 2021 May 18];72(12):1595–606.
148. Gutierrez VO, Campos ML, Arcaro CA, Assis RP, Baldan-Cimatti HM, Peccinini RG, et al. Curcumin Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evidences in Streptozotocin-Diabetic Rats Support the Antidiabetic Activity to Be via Metabolite(s). *Evidence-based Complement Altern Med*. 2015;2015.
149. Amat R, Planavila A, Chen SL, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. SIRT1 controls the transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-

activator-1 α (PGC-1 α) gene in skeletal muscle through the PGC-1 α autoregulatory loop and interaction with MyoD. *J Biol Chem* [Internet]. 2009 Aug 14 [cited 2021 May 18];284(33):21872–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19553684/>

150. Cannavino J, Brocca L, Sandri M, Bottinelli R, Pellegrino MA. PGC1- α over-expression prevents metabolic alterations and soleus muscle atrophy in hindlimb unloaded mice. *J Physiol* [Internet]. 2014 Oct 15 [cited 2021 May 18];592(20):4575–89.
151. Michael J, Conboy JJ. Sirt1-Independent Rescue of Muscle Regeneration by Resveratrol in Type I Diabetes. *J Diabetes Metab* [Internet]. 2013 [cited 2021 May 18];04(07):1–6.
152. Xiao J, Sheng X, Zhang X, Guo M, Ji X. Curcumin protects against myocardial infarction-induced cardiac fibrosis via SIRT1 activation in vivo and in vitro. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:1267–77.